

T/7-27

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 11/7/03
ENTRADA NUM. 2219

TESIS DOCTORAL

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
N.º Documento 613653271
N.º Copia 15722648

**ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN CONCERTADA,
FILOGENIA E IDENTIFICACIÓN DE ESPECÍMENES
EN EL ORDEN ACIPENSERIFORMES.**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
18 JUN. 2003
COMISION DE DOCTORADO

FRANCISCA ROBLES RODRÍGUEZ

GRANADA, JUNIO DE 2003



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

TESIS DOCTORAL

**ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN CONCERTADA,
FILOGENIA E IDENTIFICACIÓN DE ESPECÍMENES
EN EL ORDEN ACIPENSERIFORMES.**

PRESENTADA POR

FRANCISCA ROBLES RODRÍGUEZ

GRANADA, JUNIO DE 2003



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN CONCERTADA,
FILOGENIA E IDENTIFICACIÓN DE ESPECÍMENES
EN EL ORDEN ACIPENSERIFORMES.

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

FDO. FRANCISCA ROBLES RODRÍGUEZ

DIRECTORES:

FDO. DR. MANUEL RUIZ REJÓN

FDO. DR. MANUEL A. GARRIDO RAMOS

FDO. DR. ROBERTO DE LA HERRÁN MORENO



Granada, Junio de 2003

Parte de los resultados obtenidos en esta Memoria figuran en los siguientes artículos:

ROBLES, F.; DE LA HERRÁN, R.; LUDWIG, A.; RUIZ REJÓN, C.; RUIZ REJÓN, M. and GARRIDO-RAMOS, M. Non-concerted evolution of repetitive DNA sequences in Acipenseriformes. **Genetics** (enviado).

DE LA HERRÁN, R.; ROBLES, F.; MARTÍNEZ-ESPÍN, E.; LORENTE, J.A.; RUIZ REJÓN, C.; GARRIDO-RAMOS, M.A. and RUIZ REJÓN, M. Clarifying the sturgeon species living western Europe using molecular markers and forensic techniques. **Mol. Ecol.** (enviado).

Asimismo, se han presentado comunicaciones en los siguientes Congresos:

II Seminario de Citogenética. Miraflores de la Sierra, Madrid. (España), 2002.

XIV Seminario de Genética de Poblaciones y Evolución. Gandía (España), 2002.

IX Congreso Nacional de Acuicultura. Cádiz (España), 2003.

AGRADECIMIENTOS

Antes de cerrar esta memoria, me gustaría que quedase plasmada la gratitud que siento hacia todas las personas que, de una forma u otra, me ayudaron en la ardua tarea que emprendí hace unos años. Ha sido un honor para mí contar con la inestimable colaboración de todas ellas.

Quiero hacer un reconocimiento especial y mostrar mi más sincera gratitud a los directores de esta memoria, al Dr. Manuel Ruiz Rejón, al Dr. Manuel Garrido Ramos y al Dr. Roberto de la Herrán Moreno, quienes apostaron por este trabajo y me hicieron partícipe de sus sugerencias. Por toda la ayuda recibida y por el interés que siempre han mostrado. Ha sido un lujo para mí poder trabajar con vosotros.

Al Dr. Carmelo Ruiz Rejón, quien amablemente se interesó por mi trabajo y me dio ánimos para seguir adelante.

Al Dr. Francesco Fontana y al Dr. Leonardo Congiu, por su colaboración desinteresada proporcionándome las muestras necesarias para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

Al Dr. Arne Ludwig, por el material facilitado y por favorecer mi trabajo con sus continuos consejos y sugerencias.

A D. Alberto Domezain Fau, que siempre estuvo dispuesto a sacrificar a sus "bichos" y se mostró muy interesado por la marcha del trabajo.

Asimismo, quisiera agradecer su colaboración al equipo del Dr. Jose Antonio Lorente Acosta, y en especial a Esther Martín Espín, por facilitar mi trabajo con su experiencia en técnicas forenses.

A mis compañeros de laboratorio, Trini, Vicky y Rafa, quienes me acompañaron durante tantas horas de laboratorio y me ayudaron en todo lo que les fue posible. A Inma y Victor, por hacer más llevaderos los momentos más duros en la recta final de esta memoria (por las veces que subiste la persiana para ver la calle).

A Ángel Martín Alganza, porque siempre estuvo dispuesto a resolver mis problemas con el ordenador, incluidos los sábados. También quiero agradecer el interés y los ánimos que me han dado a Sebastián Cuadros y al resto de miembros del departamento de Genética.

Al Dr. Jaime Castro, por las charlas y consejos que tuvo a bien darme en muchos sentidos.

A Lourdes, por su buen humor.

A mis compañeras de piso, Gema, Delia, Eva, Gema Martín y Vilma, porque han compartido mis inquietudes, muchos buenos momentos y alguna que otra gotera.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo continuo de mi familia, que siempre se interesaron en mi trabajo y me animaron a seguir adelante. En especial a Juan Jesús, por su apoyo sentimental, por ayudarme en todo lo que estuvo en su mano y aguantar mis nervios, que no fueron pocos.

A todos, gracias.

RESUMEN

Los esturiones (Familia Acipenseridae) y los peces espátula (Familia Polyodontidae) se encuadran dentro del Orden Acipenseriformes, que se distribuyen exclusivamente en el hemisferio Norte. Considerados fósiles vivientes, 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.

Constituyen un grupo de especies muy interesante desde el punto de vista ecológico, evolutivo y comercial. Pero es a nivel genético y molecular donde encontramos las características más peculiares que lo convierten en un interesante material de estudio. Una de esas características es la baja tasa evolutiva que presentan diversas regiones, codificadoras y no-codificadoras, del genoma de estos peces, encontrando además, en éstas últimas, una forma evolutiva poco frecuente en este tipo de secuencias, como es la ausencia de evolución concertada.

En este trabajo, se ha llevado a cabo el análisis de tres familias de secuencias repetidas nucleares, la familia de ADN satélite *HindIII* y *PstI* y las secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S, en catorce especies de este orden, determinando que la ausencia de evolución concertada es la norma general que siguen las secuencias repetidas en el genoma de los esturiones. Se han analizado las posibles causas y factores que influyen en la ausencia de evolución concertada, tanto fallos inherentes a los propios mecanismos moleculares implicados en la homogenización de secuencias, como a fenómenos de hibridación, poliploidización, así como la actuación de la selección natural.

Las secuencias repetidas, debido a que evolucionan a un ritmo muy superior al de otras fracciones del genoma eucariota y siguen una pauta evolutiva conocida como evolución concertada, constituyen un excelente marcador filogenético y taxonómico cuando se trata de analizar las relaciones

existentes entre especies emparentadas. Con la particularidad que caracteriza a las secuencias analizadas en esta memoria, hemos analizado las relaciones filogenéticas entre las especies de esturión hasta donde ha sido posible. Así, nuestros datos sostienen que la especie *H. huso* podría incluirse dentro del género *Acipenser*, ya que no tiene identidad suficiente para ser considerada un género independiente. Encontramos también la asociación cladística, clado *A. sturio*-*A. oxyrinchus*, clado *Scaphirhynchus* clado Atlántico y clado Pacífico, de acuerdo a consideraciones filogenéticas y biogeográficas descritas por otros autores.

También hemos estudiado la utilidad de estas secuencias nucleares, en comparación con secuencias mitocondriales, como marcadores taxonómicos. Así, hemos tratado de aclarar el estatus específico al que pertenecen los ejemplares de esturión conservados en diferentes museos, y que fueron capturados en el Mediterráneo occidental, haciendo especial énfasis en los esturiones capturados en el Guadalquivir. Se llega a la conclusión de que los ejemplares EBD8173 y EBD8401 se corresponden con la especie *A. naccarii* para todos los marcadores moleculares y el origen híbrido del ejemplar EBD8174, ya que se corresponde con la especie *A. naccarii* para los marcadores nucleares y con *A. sturio* para los mitocondriales. Estos datos revelan además que las especies de esturión autóctonas de la Península Ibérica fueron *A. sturio* y *A. naccarii*, y que esta última especie no es endémica del Mar Adriático.

ABREVIATURAS

2n	Número cromosómico diploide
A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosómico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNr	ARN ribosómico
C	Citosina
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético
FISH	Hibridación <i>in situ</i> por
G	Guanina
IGS	Espaciador intergénico
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactósido
ITS	Espaciador transcrito intergénico
kb	Kilo base
NOR	Región organizadora del nucleolo
NTS	Secuencias espaciadoras
pb	Par de bases
PCR	Amplificación en cadena de la polimerasa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SSC	Citrato sódico salino
T	Timinia
TBE	Tris-borato-EDTA
Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	LOS ESTURIONES Y SU CLASIFICACIÓN.	1
1.2	PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS EVOLUTIVAS DE LOS ESTURIONES.	9
1.3	LOS ESTURIONES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA. EL CASO DEL RÍO GUADALQUIVIR.....	14
1.4	EL ADN REPETIDO.....	18
	EI ADN SATÉLITE.....	20
	EL ADN RIBOSÓMICO.....	22
1.5	EVOLUCIÓN DE LAS SECUENCIAS REPETIDAS.	25
1.6	EL ADN REPETIDO COMO MARCADOR FILOGENÉTICO Y TAXONÓMICO.	30
2	OBJETIVOS.....	37
3	MATERIAL Y MÉTODOS	41
3.1	MATERIAL EMPLEADO.	41
3.2	EXTRACCIÓN DE ADN.....	44
3.2.1	<i>Extracción de ADN a partir de tejido sólido.</i>	<i>44</i>

3.2.2	<i>Obtención de ADN a partir de sangre.....</i>	45
3.2.3	<i>Extracción de ADN a partir de ejemplares de museo.</i>	46
3.3	IDENTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LOS ADN _s SATÉLITES <i>Hind</i> III Y <i>Pst</i> I.....	48
3.3.1	<i>Identificación y aislamiento de los ADN_s satélites Hind</i> III y <i>Pst</i> I.	48
	A. Obtención de las unidades monoméricas de las familias de ADN satélite <i>Hind</i> III y <i>Pst</i> I mediante clonación convencional.	48
	B. Obtención de las diferentes unidades monoméricas de la familia de ADN satélite <i>Hind</i> III y <i>Pst</i> I mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).49	
3.3.2	<i>Clonación de las Familias de ADN satélite Hind</i> III y <i>Pst</i> I.	51
	A. Clonación del ADN satélite aislado mediante enzimas de restricción.	51
	B. Clonación del ADN satélite obtenido mediante PCR.....	53
3.4	ANÁLISIS DE LAS FAMILIAS DE ADN SATÉLITE <i>Hind</i> III Y <i>Pst</i> I MEDIANTE HIBRIDACIONES TIPO SOUTHERN-BLOT Y DOT-BLOT. .	54
3.4.1	<i>Restricción del ADN genómico, electroforesis y transferencia a membrana. .</i>	54
3.4.2	<i>Preparación de los dot-blot.....</i>	55
3.4.3	<i>Obtención de los fragmentos utilizados como sondas.....</i>	55
3.4.4	<i>Marcaje de sondas e hibridación.</i>	56
3.5	IDENTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LA UNIDAD DE REPETICIÓN DE LOS GENES RIBOSÓMICOS 5S.	58
3.6	AMPLIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE MARCADORES MITOCONDRIALES.....	59

3.7	SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.....	60
3.7.1	<i>Análisis de la variabilidad intraespecífica.</i>	62
3.7.2	<i>Análisis de la divergencia interespecífica.</i>	63
4	RESULTADOS.....	69
4.1	CARACTERIZACIÓN DEL ADN SATÉLITE <i>Hind</i> III DE LA FAMILIA ACIPENSERIDAE.	69
4.1.1	<i>Clonación y caracterización de la familia de ADN satélite Hind</i> III.....	69
4.1.2	<i>Análisis de la variabilidad intraespecífica.</i>	71
4.1.3	<i>Estudio de la divergencia interespecífica.</i>	71
4.1.4	<i>Análisis de la varianza molecular (AMOVA).</i>	77
4.1.5	<i>Análisis del proceso de homogenización y divergencia entre especies.</i>	77
4.1.6	<i>Clasificación de los sitios polimórficos.</i>	79
4.1.7	<i>Cálculo de la tasa de mutación.</i>	79
4.1.8	<i>Análisis de la conversión génica.</i>	80
4.2	CARACTERIZACIÓN DE LA FAMILIA DE ADN SATÉLITE <i>Pst</i> I.	80
4.2.1	<i>Análisis del ADN satélite Pst</i> I de <i>Acipenser naccarii</i>	80
4.2.2	<i>Análisis de la variabilidad intraespecífica.</i>	85
4.2.3	<i>Estudio de la divergencia interespecífica.</i>	85
4.2.4	<i>Análisis de la varianza molecular (AMOVA).</i>	93
4.2.5	<i>Análisis del proceso de homogenización y divergencia entre especies.</i>	93

4.2.6	<i>Clasificación de los sitios polimórficos</i>	94
4.2.7	<i>Cálculo de la tasa de mutación</i>	94
4.2.8	<i>Análisis de la conversión génica</i>	94
4.3	ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS ESPACIADORAS DE LOS GENES RIBOSÓMICOS 5S DE LA FAMILIA ACIPENSERIDAE.....	96
4.3.1	<i>ANÁLISIS DEL ESPACIADOR TIPO 1</i>	102
4.3.1.1	Análisis de la variabilidad intraespecífica.....	102
4.3.1.2	Estudio de la divergencia interespecífica.....	104
4.3.1.3	Análisis de la varianza molecular (AMOVA).....	107
4.3.1.4	Análisis del proceso de homogenización y divergencia entre especies.	107
4.3.1.5	Clasificación de los sitios polimórficos.....	109
4.3.1.6	Cálculo de la tasa de mutación.....	109
4.3.1.7	Análisis de la conversión génica.....	109
4.3.2	<i>ANÁLISIS DEL ESPACIADOR TIPO 2</i>	109
4.3.2.1	Análisis de la variabilidad intraespecífica.....	109
4.3.2.2	Estudio de la divergencia interespecífica.....	110
4.3.2.3	Análisis de la varianza molecular (AMOVA).....	113
4.3.2.4	Análisis del proceso de homogenización y divergencia entre especies.	113
4.3.2.5	Clasificación de los sitios polimórficos.....	114
4.3.2.6	Análisis de la conversión génica.....	114
4.4	ANÁLISIS DE LOS EJEMPLARES DE ESTURIÓN CAPTURADOS EN EL MEDITERRÁNEO OCCIDENTAL.....	115
4.4.1	<i>ANÁLISIS DE LOS MARCADORES NUCLEARES</i>	116
4.4.1.1	Análisis de la Familia de ADN satélite <i>HindIII</i>	116
4.4.1.2	Análisis de la Familia de ADN satélite <i>PstI</i>	120

4.4.1.3	Análisis de las secuencias espaciadoras de los genes de ARN ribosómico 5S.	124
4.4.1.3.1	Secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S Tipo 1....	126
4.4.1.3.2	Secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S Tipo 2....	127
4.4.2	<i>ANÁLISIS DE LOS MARCADORES MITOCONDRIALES.</i>	131
4.4.2.1	Análisis del gen del citocromo b.....	131
4.4.2.2	Análisis del gen ribosómico 12S.....	133
5	DISCUSIÓN.	139
5.1	¿EXPERIMENTA EL ADN REPETIDO DEL GENOMA DE LOS ESTURIONES EVOLUCIÓN CONCERTADA?	139
5.1.1	<i>Características generales de las tres familias de ADN repetido analizadas....</i>	139
5.1.2	<i>Análisis de la evolución concertada.</i>	143
5.2	EL ADN REPETIDO Y LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LOS ESTURIONES.....	154
5.3	UTILIZACIÓN DE LOS MARCADORES MOLECULARES PARA CLARIFICAR LAS ESPECIES DE ESTURIÓN DEL MEDITERRÁNEO OCCIDENTAL.....	156
6	CONCLUSIONES.	165
7	BIBLIOGRAFÍA.	171

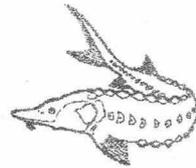
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Áreas principales de distribución biogeográfica de las especies del Orden Acipenseriformes.....	5
Figur 2: Árbol filogenético donde se refleja las relaciones de parentesco entre las especies de la familia Acipenseridae según criterios morfológicos.....	7
Figura 3: Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de las secuencias del citocromo b.....	8
Figura 4: Cariotipo de las especies <i>A. naccarii</i> y <i>A. sturio</i>	10
Figura 5: Distribución de los esturiones en la Península Ibérica.....	15
Figura 6: Sollos en la fábrica Villa Pepita, Coria del Río, Sevilla.....	16
Figura 7: Etiqueta de una lata de caviar.....	16
Figura 8: Representación gráfica de los estados de transición.....	65
Figura 9: Patrón de hibridación del inserto del plásmido pHAN19 (unidad de repetición de la familia de ADN satélite <i>HindIII</i> de <i>A. naccarii</i>).....	70
Figura 10: Resultado de la amplificación de la familia de ADN satélite <i>HindIII</i>	70
Figura 11: Alineamiento de las unidades monoméricas <i>HindIII</i> en el conjunto de especies analizadas.....	73
Figura 12: Árbol filogenético realizado con las unidades monoméricas <i>HindIII</i> de todas las especies analizadas.....	76
Figura 13: Patrón de hibridación del ADN satélite <i>PstI</i> de <i>A. naccarii</i> revelado por hibridación con el clon NAC-19.....	82
Figura 14: Alineamiento de las cinco unidades monoméricas <i>PstI</i> de <i>A. naccarii</i>	83
Figura 15: Alineamiento de las unidades monoméricas <i>PstI</i> en el conjunto de especies analizadas.....	88
Figura 16: Árbol filogenético realizado con las unidades monoméricas <i>PstI</i> de todas las especies analizadas.....	92
Figura 17: Electroforesis en gel de agarosa de los genes ribosómicos 5S amplificados mediante PCR en la especie <i>A. naccarii</i>	96
Figura 18: Patrón de restricción del gen ribosómico 5S de <i>A. naccarii</i> revelado por hibridación con el clon Nac-12.....	98
Figura 19: Alineamiento de las 9 secuencias espaciadoras del gen 5S en la especie <i>A. naccarii</i>	99
Figura 20: Árbol filogenético realizado con las 68 secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S de todas las especies analizadas.....	101
Figura 21: Alineamiento de las secuencias espaciadoras tipo 1 de los genes ribosómicos 5S en el conjunto de especies en las que se encuentra representadas.....	103
Figura 22: Árbol filogenético realizado con las secuencias espaciadoras del tipo 1 de los genes ribosómicos 5S en todas las especies que lo presentan.....	106
Figura 23: Alineamiento de las secuencias espaciadoras tipo 2 de los genes ribosómicos 5S en el conjunto de especies en las que se encuentra representado.....	111
Figura 24: Árbol filogenético realizado con las secuencias espaciadoras tipo 2 del ADN ribosómico 5S en todas las especies analizadas que lo presentan.....	112

Figura 25: Electroforesis en gel de agarosa de la familia de ADN satélite <i>Hind</i> III amplificada mediante PCR en los ejemplares capturados en el Guadalquivir.....	119
Figura 26: Alineamiento de las secuencias <i>Hind</i> III obtenidas para cada uno de los ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana así como para la especie <i>A. naccarii</i>	120
Figura 27: Electroforesis en gel de agarosa de la familia de ADN satélite <i>Pst</i> I amplificada mediante PCR en los especímenes EBD.....	121
Figura 28: Alineamiento de las unidades monoméricas <i>Pst</i> I correspondientes a las especies <i>A. naccarii</i> , a <i>A. sturio</i> y a los ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana.....	122
Figura 29: Árbol de secuencias monoméricas de la familia de ADN satélite <i>Pst</i> I pertenecientes a los ejemplares EBD y a las especies <i>A. naccarii</i> y <i>A. sturio</i>	124
Figura 30: Electroforesis en gel de agarosa de los genes ribosómicos 5S amplificados mediante PCR en los especímenes EBD.....	125
Figura 31: Alineamiento de las secuencias espaciadoras tipo 1 de los genes ribosómicos 5S en las especies <i>A. naccarii</i> y <i>A. sturio</i> , así como en los tres ejemplares EBDs.....	126
Figura 32: Árbol de secuencias espaciadoras tipo 1 correspondiente a los ejemplares capturados en el río Guadalquivir y a las especies <i>A. naccarii</i> y <i>A. sturio</i>	127
Figura 33: Alineamiento de las secuencias espaciadoras tipo 2 de las especies <i>A. naccarii</i> , <i>A. sturio</i> y los tres ejemplares EBDs.....	128
Figura 34: Árbol de secuencias espaciadoras tipo 2 correspondiente a los ejemplares capturados en el río Guadalquivir y a las especies <i>A. naccarii</i> y <i>A. sturio</i>	128
Figura 35: Árbol filogenético realizado con las unidades monoméricas <i>Pst</i> I de todas las especies analizadas junto con las obtenidas para los ejemplares EBD.....	130
Figura 36: Electroforesis en gel de agarosa del resultado de la PCR con los cebadores Cytb-2F y Cytb-3R.....	131
Figura 37: Alineamiento de los fragmentos de citocromo b obtenidos para los tres ejemplares EBD y <i>A. naccarii</i> y <i>A. sturio</i>	132
Figura 38: Árbol del citocromo b con los tres ejemplares EBD y las especies <i>A. naccarii</i> y <i>A. sturio</i>	133
Figura 39: Electroforesis en gel de agarosa del resultado de la PCR con los cebadores 12S-2R y 12S-3F.....	133
Figura 40: Alineamiento de los fragmentos del gen ribosómico 12S obtenidos en los tres ejemplares EBD, y en <i>A. naccarii</i> y <i>A. sturio</i>	135
Figura 41: Árbol de los fragmentos del gen 12S de los tres ejemplares EBD y de las especies <i>A. naccarii</i> y <i>A. sturio</i>	135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación taxonómica de las especies pertenecientes al orden Acipenseriformes.....	3
Tabla 2: Revisión de los números cromosómicos y cariotipos de algunas especies del Orden Acipenseriformes.....	12
Tabla 3: Especies de esturiones analizadas en esta memoria y procedencia de las mismas.	42
Tabla 4: Especímenes de museo estudiados en este trabajo, indicándose la procedencia y el estado del material.....	43
Tabla 5: Características de las unidades monoméricas de la familia de ADN satélite <i>HindIII</i> presentes en las diferentes especies analizadas.....	72
Tabla 6: Distancias medias intra e interespecíficas siguiendo el modelo propuesto por Jukes and Cantor (1969) para las secuencias <i>HindIII</i>	72
Tabla 7: Varianza intra e interespecífica de las secuencias <i>HindIII</i>	78
Tabla 8: Estados de transición para la familia de ADN satélite <i>HindIII</i>	78
Tabla 9: Comparaciones realizadas con el programa GENECONV para poner de manifiesto la actuación del mecanismo de conversión génica.....	80
Tabla 10: Características de las unidades monoméricas de la familia de ADN satélite <i>PstI</i> en las diferentes especies analizadas.....	86
Tabla 11: Distancias medias intra e interespecíficas siguiendo el modelo propuesto por Jukes and Cantor (1969), para las secuencias <i>PstI</i>	87
Tabla 12: Varianza intra e interespecífica de las secuencias <i>PstI</i>	93
Tabla 13: Estados de transición entre pares de especies relacionadas para la familia de ADN satélite <i>PstI</i> calculados siguiendo el método de Strachan <i>et al.</i> (1985).	95
Tabla 14: Comparaciones realizadas con el programa GENECONV para poner de manifiesto la actuación del mecanismo de conversión génica.	95
Tabla 15: Posiciones y nucleótidos que definen los dos tipos de secuencias espaciadoras.....	100
Tabla 16: Resumen de las secuencias espaciadoras tipo 1.	105
Tabla 17: Distancias medias intra e interespecíficas siguiendo el modelo propuesto por Jukes y Cantor (1969), para las secuencias espaciadoras tipo 1.	105
Tabla 18: Varianza intra e interespecífica de las secuencias espaciadoras tipo 1.	107
Tabla 19: Estados de Transición para las secuencias espaciadoras tipo 1.....	108
Tabla 20: Resumen de las secuencias espaciadoras tipo 2.....	110
Tabla 21: Distancias medias intra e interespecífica siguiendo el modelo propuesto por Jukes and Cantor (1969), para las secuencias espaciadoras de tipo 2.....	110
Tabla 22: Varianza intra e interespecífica de las secuencias espaciadoras tipo 2.....	113
Tabla 23: Estados de Transición para las secuencias espaciadoras tipo 2.....	114
Tabla 24: Resumen de la procedencia, el estatus taxonómico de los especímenes de museo analizados y las secuencias obtenidas para cada uno de los marcadores estudiados.	117
Tabla 25: Estados de transición 4, 5 y 6 calculados siguiendo el método de Strachan <i>et al.</i> ,(1985) para la comparación de secuencias <i>PstI</i> de la especie <i>A. sturio</i> frente a secuencias <i>PstI</i> de la especie <i>A. naccarii</i> y ejemplares del Guadalquivir.....	123



INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LOS ESTURIONES Y SU CLASIFICACIÓN.

Los esturiones son peces óseos muy primitivos, con 375 millones de años de antigüedad. Se consideran verdaderos fósiles vivientes (Gardiner, 1984), ya que sus restos se han encontrado en sustratos que datan del Jurásico, y no parece que hayan sufrido muchos cambios morfológicos desde el origen del grupo. Los esturiones tienen aspecto escualiforme, y conservan caracteres muy antiguos, como son los escudetes y las placas óseas. Así, su piel carece de escamas y presenta cinco hileras longitudinales de placas romboides y puntiagudas (escudetes). La cabeza está cubierta de placas óseas anchas subcutáneas y la cola es heterocerca (dos lados desiguales). La boca, sin dientes, es protráctil y está situada en la parte ventral. Se alimenta por succión de pequeños animales bentónicos, como gusanos, caracoles, etc., detectados por cuatro apéndices o barbillas que van barriendo el fondo. Por lo general, son organismos muy grandes, pudiendo encontrar ejemplares de longitudes que oscilan entre 2 y 5 metros y pesos de entre 80 y 400 Kg.

Estos peces viven exclusivamente en el Hemisferio Norte y se encuentran en grandes sistemas fluviales, lagos, aguas costeras y mares internos en China, Kazajstán, Turkmenistán, República Islámica de Irán, Azerbaiyán, Federación Rusa, Ucrania, Turquía, Rumanía, Bulgaria, y otros países de Europa, así como en América del Norte.

La mayoría de los esturiones son anfibióticos, de forma que sólo algunas especies son estrictamente dulceacuícolas. Las especies anfibióticas 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. Ésta, ocurre

entre los 5-16 años, según la especie, en los machos y entre los 6-20 años, según la especie, en las hembras. Los esturiones sexualmente maduros regresan a los ríos de origen. A los peces con este comportamiento migratorio se les denomina anádromos.

Estos peces tienen una gran importancia económica como fuente de ingresos y de empleo, ya que aunque tienen un crecimiento lento, producen altos rendimientos económicos debido a la calidad de su carne, y sobre todo, por la obtención de caviar. El término caviar se emplea para los preparados de ovocitos de varias especies de esturión. Considerado en la actualidad un manjar exquisito, a principios del siglo XIX era servido como tapa en tabernas de Estados Unidos, ya que resultaba mucho más barato que los cacahuets salados (a principios del siglo XIX, Estados Unidos era el principal productor de caviar). Las cualidades del caviar no se limitan a las alimentarias (100 gramos de caviar tienen 2.900 K/calorías y un alto contenido en aminoácidos esenciales), sino que también se está empleando en cosmética por su alto contenido en lípidos y yodo.

En la actualidad, las poblaciones de esturión, debido a diversas causas como la sobrepesca o las alteraciones ambientales del hábitat fluvial, entre otras, se encuentran en retroceso en todo el mundo, de forma que la mayoría son especies amenazadas o en peligro de extinción. Así, desde el 1 de Abril de 1998, 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..).

Los esturiones se encuadran dentro del superorden de los Condrósteos. De los 17 órdenes que lo componen se han extinguido 16 y en la actualidad queda como único representante el Orden Acipenseriformes (Tabla 1). Este

Orden Acipenseriformes	Nombre Común
Familia Acipenseridae	
Subfamilia Acipenserinae	
Género <i>Acipenser</i> Linnaeus, 1758	
<i>A. baerii</i> Brandt, 1869	Esturión siberiano.
<i>A. brevirostrum</i> Lesueur, 1818	Esturión chato.
<i>A. dabryanus</i> Duméril, 1869	Esturión del Yangtze.
<i>A. fulvescens</i> Rafinesque, 1817	Esturión lacustre.
<i>A. gueldenstaedtii</i> Brandt y Ratzeberg, 1833	Esturión ruso u osetra*
<i>A. medirostris</i> Ayres, 1854	Esturión verde asiático.
<i>A. mikadoi</i> Hilgendorf, 1892	Esturión verde americano
<i>A. naccarii</i> Bonaparte, 1836	Esturión del Adriático.
<i>A. nudiventris</i> Lovetzky, 1828	Esturión barba de flecos.
<i>A. oxyrinchus</i> Mitchill, 1814	Esturión atlántico americano.
<i>A. persicus</i> Borodin, 1897	Esturión pérsico.
<i>A. ruthenus</i> Linnaeus, 1758	Esturión esterlete.
<i>A. schrenckii</i> Brandt, 1869	Esturión del Amur.
<i>A. sinensis</i> Gray, 1834	Esturión chino.
<i>A. stellatus</i> Pallas, 1771	Esturión estrellado o sevruga*
<i>A. sturio</i> Linnaeus, 1758	Esturión atlántico europeo.
<i>A. transmontanus</i> Richardson, 1836	Esturión blanco.
Género <i>Huso</i> Brandt, 1869	
<i>H. dauricus</i> Georgi, 1775	Kaluga*
<i>H. huso</i> Linnaeus, 1758	Beluga*
Subfamilia Scaphirhynchinae	
Género <i>Scaphirhynchus</i> Heckel, 1836	
<i>S. albus</i> Forbes y Richardson, 1905	Esturión pálido.
<i>S. platorhynchus</i> Rafinesque, 1820	Esturión hocico de pala.
<i>S. suttkusi</i> Williams y Clemmer, 1991	Esturión de Alabama.
Género <i>Pseudoscaphirhynchus</i> . Nikolsky, 1900	
<i>P. fedtschenkoi</i> Kessler, 1872	Esturión del Syr-Darya.
<i>P. hermanni</i> Kessler, 1877	Esturión del Amu-Darya
<i>P. kaufmanni</i> Kessler, 1877	Esturión falso hocico de pala.
Familia Polyodontidae	
Género <i>Polyodon</i>	
<i>P. spathula</i> Walbaum, 1792	Pez espátula.
Género <i>Psephurus</i>	
<i>P. gladius</i> Martens, 1862	Pez espátula chino.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de las especies pertenecientes al orden Acipenseriformes. La columna de la derecha corresponde al nombre común por el que se conoce a cada una de las especies. Los términos marcados con * hacen referencia al tipo de caviar que se obtiene de la especie.

orden está formado por 27 especies, de las cuales, 25 pertenecen a la Familia Acipenseridae (esturiones), que está compuesta a su vez de 4 géneros (*Acipenser* con 17 especies, *Huso* con 2, *Schaphirhynchus* con 3 especies y *Pseudoscaphirhynchus* con con 3). Los géneros *Acipenser* y *Huso* constituyen la subfamilia Acipenserinae y los géneros *Schaphirhynchus* y *Pseudoscaphirhynchus* pertenecen a la subfamilia Scaphirhynchinae. Las dos especies restantes del orden corresponden a la Familia Polyodontidae (peces espátula).

Los esturiones se distribuyen en grandes áreas biogeográficas (Figura 1) (Choudhury y Dick, 1998):

En la costa atlántica del Norte de América encontramos a *A. oxyrinchus*, distribuido desde el estuario del Río San Lorenzo hasta el Golfo de México. *A. brevirostrum*, vive en los estuarios que se encuentran desde New Brunswick (Canadá) al estado de Georgia (Estados Unidos). La especie *A. sturio* vive en las costas del mar del Norte, en las costas atlánticas europeas y se adentra en el Mar Mediterráneo y Mar Negro

El área que comprende el Mar Mediterráneo, Mar Negro, Mar Caspio y Mar de Aral (agrupación Mediterráneo-Ponto-Cáspica) es la que alberga mayor número de especies. En las aguas del Mediterráneo podemos encontrar a las especies *H. huso*, *A. stellatus*, *A. sturio* y *A. naccarii*, aunque esta última, de forma general, se ha considerado endémica del Mar Adriático. En el Mar Negro podemos encontrar especies como *A. nudiventris*, *A. gueldenstaedtii* y *A. ruthenus*. En el Mar Caspio encontramos, además de algunas de las especies mencionadas anteriormente (*A. stellatus*, *H. huso*, *A. nudiventris*, *A. gueldenstaedtii*, *A. ruthenus*) a *A. persicus*. Esta última especie se localiza en la costa iraní principalmente. Las especies del género *Pseudoscaphirhynchus* viven en los ríos Syr-Darya y Amu-Darya, que desembocan en el Mar de Aral, donde vive *A. nudiventris*.

En la costa pacífica del Norte de América, encontramos a la especie *A. transmontanus*, que vive en el mismo rango latitudinal que *A. medirostris*, pero

ésta, en costas asiáticas (Mar de Okhotsk, Mar de Bering, Mar del Japón y Estrecho de Tartar). En los Ríos Amur (frontera nororiental entre China y Rusia) y Yangtze (China) podemos situar a las especies *A. schrencki*, *H. dauricus*, *A. medirostris* en el primero y a *A. dabrianus* y *A. sinensis* en el segundo. En el Norte de Asia, viviendo en los grandes ríos siberianos (Obi, Lenisei, Lena, Indigirka y Kolyma), podemos situar a la especie *A. baerii*.

En ríos interiores del Norte de América encontramos la especie *A. fulvescens*, donde las Montañas Rocosas y los Apalaches forman una barrera natural que aísla a esta especie. Las especies del género *Scaphirhynchus* y de la Familia Polyodontidae, como *P. spathula*, las encontramos en los Ríos Mississippi y Missouri.



Figura 1: Áreas principales de distribución biogeográfica de las especies del Orden Acipenseriformes. El área A incluye a las especies que viven en aguas del Atlántico, tanto en la parte europea como americana. El área B agrupa a las especies que viven en los mares Mediterráneo, Adriático, Negro, Caspio y Mar de Aral. A esta región se la denomina Mediterráneo-Ponto-Cáspica. En el área C encontramos a las especies que se distribuyen por la costa pacífica americana. El área D corresponde a las especies que viven en la región asiática bañada por aguas del Pacífico.

Los caracteres utilizados en un primer momento para diferenciar y catalogar las especies han sido, principalmente, caracteres merísticos, como: la longitud total del cuerpo, la distancia de la punta del hocico a las barbillas, distancia de las barbillas a la boca, entre otros (Holcik *et al.*, 1989, Sokolov, 1989; Svetovidov, 1989). En estudios más recientes, la clasificación taxonómica y sistemática de estas especies se ha realizado basándose además de en datos morfológicos, en datos cromosómicos (Revisado en Artyukhin, 1995, Figura 2). De esta manera, en función de la forma y la longitud del hocico (nodo 1, Figura 2) se han separado la Familia Polyodontidae de la Familia Acipenseridae, y dentro de ésta, la subfamilia Acipenserinae de la Scaphirhynchinae. La posesión o no de un estómago bentófago (nodo 2) (adaptado para triturar moluscos bentónicos) es el carácter de separación de los géneros *Acipenser* y *Huso*. Aunque este autor finalmente separa a las especies de *Huso* de las de *Acipenser* en su árbol filogenético (Figura 2), muestra serias dudas de la existencia de *Huso* como género y propone la inclusión de *H. huso* y *H. dauricus* dentro del género *Acipenser*. Las primeras especies en divergir dentro del género *Acipenser* son *A. sturio* y *A. oxyrinchus*, que se separan del resto de especies por la disposición longitudinal de las osificaciones de la piel (nodo 3). La progresiva disminución del número de placas óseas (nodo 4) separa a la especie *A. stellatus* del resto de especies. La última gran diferencia se establece de acuerdo a criterios cromosómicos (nodo 5), especies que tienen unos 240 cromosomas se separan de las que tienen aproximadamente 120. Dentro de esta división las especies se separan atendiendo a características tales como la localización de las barbillas por un lado (nodo 6), según la forma y el tamaño de las aletas pectorales por otro lado (nodo 7), y según la ausencia casi total de escudetes, por otro (nodo 8). En su revisión, Artyukhin observa que las especies presentan cierta agrupación dependiendo del área biogeográfica, encontrando así agrupadas a las especies *A. sturio* y *A. oxyrinchus* (correspondientes a las costas atlánticas, tanto norteamericana como europea), agrupaciones de las especies

del área Ponto-Cáspica (*A. ruthenus*, *A. nudiventris*...) y a las de la costa del Pacífico (*A. sinensis*, *A. transmontanus*...).

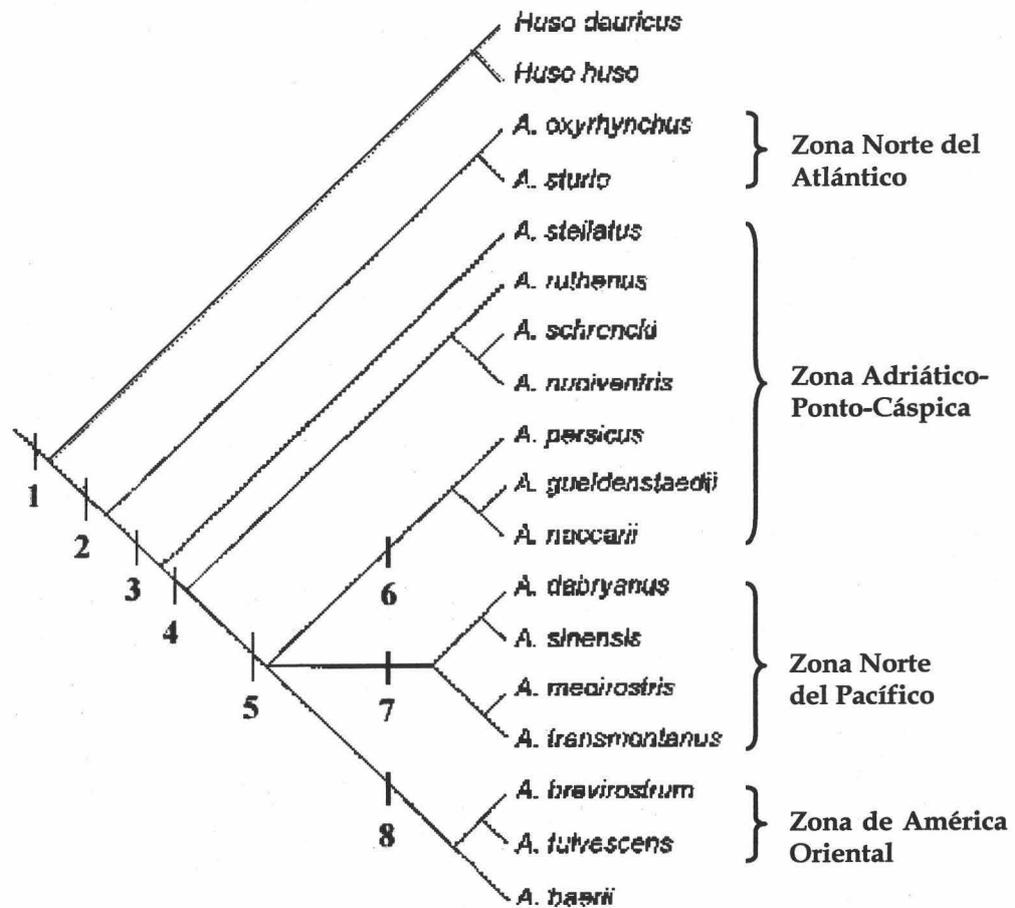


Figura 2: Árbol filogenético donde se reflejan las relaciones de parentesco entre las especies de la familia Acipenseridae según criterios morfológicos. Modificado de Artyukhin, 1995. La numeración del 1 al 8 corresponde a cada una de las características que diferencian a las distintas especies (Ver detalles en el texto).

Posteriormente, el empleo de técnicas moleculares como herramienta en estudios evolutivos, ha permitido profundizar en las relaciones filogenéticas de este grupo de peces. Las filogenias más recientes incluyen a las especies del género *Huso* dentro del género *Acipenser*, y consideran a *A. sturio* y *A. oxyrinchus* como las especies del género *Acipenser* que antes se separaron del resto (hace 90

millones de años según Birstein y DeSalle, 1998). Recientemente, diversos autores han establecido las relaciones filogenéticas de los esturiones utilizando como marcador diversas regiones del ADN mitocondrial de estas especies.

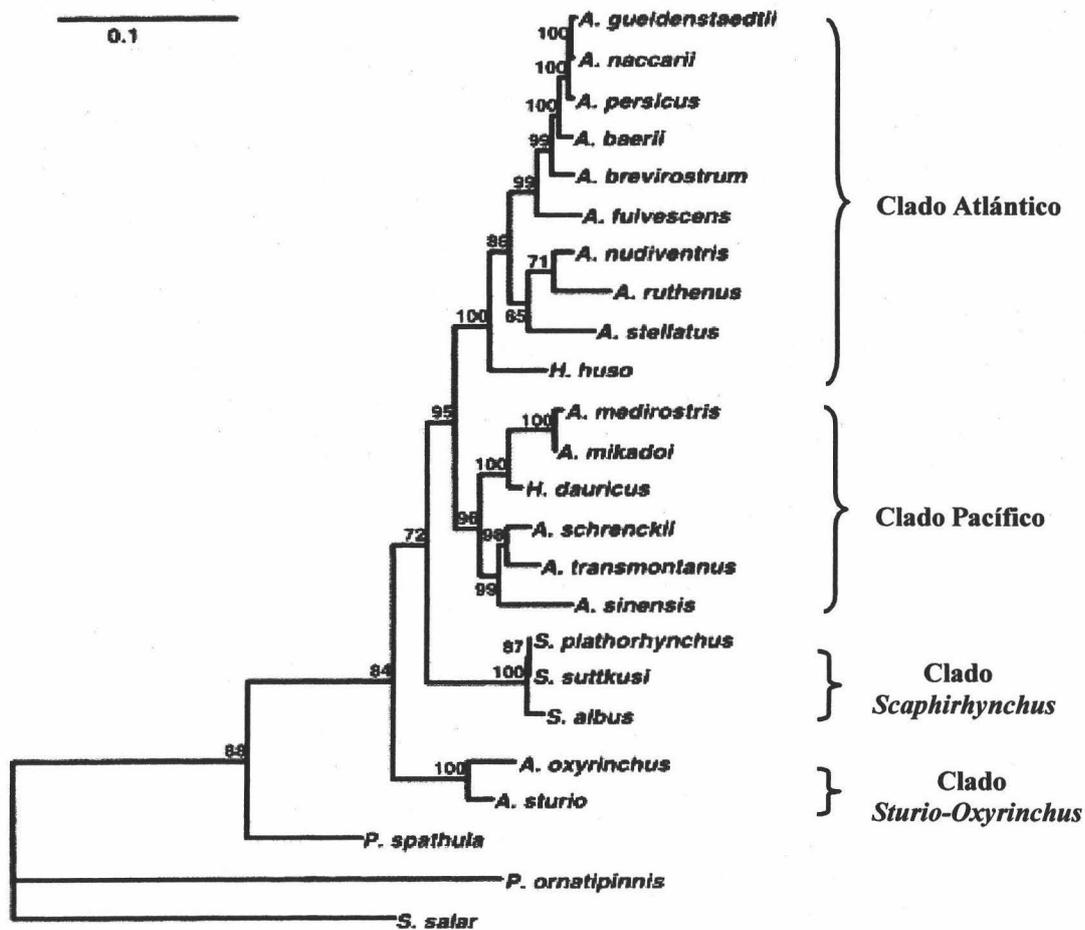


Figura 3: Árbol filogenético obtenido a partir del análisis de las secuencias del citocromo b (Modificado de Ludwig *et al.*, 2001).

Cabe destacar aquí los estudios de Birstein *et al.* (1997), el de Birstein y DeSalle (1998), el de Krieger *et al.* (2000) y el de Ludwig *et al.* (2001). Aunque con algunas discrepancias entre los diversos estudios, existe más o menos un consenso acerca de la filogenia de los esturiones. La que se muestra en la Figura 3 es la filogenia que aparece en el trabajo publicado por Ludwig *et al.* (2001). Según ésta, lo géneros *Acipenser* y *Scaphirhynchus* forman una agrupación

monofilética, la familia Acipenserinae. Las especies *A. sturio* y *A. oxyrinchus* se agrupan juntas. Y existen dos grupos monofiléticos dentro de la agrupación *Acipenser/Huso*, separando por un lado especies como *A. baerii*, *A. brevisrostrum*, *A. gueldenstaedtii*, *A. naccarii*, *A. nudiventris*, *A. persicus*, *A. ruthenus*, *A. stellatus* y *H. huso* y por otro a *A. medirostris*, *A. mikadoi*, *A. schrenki*, *A. sinensis*, *H. dauricus* y *A. transmontanus*.

En el árbol filogenético mencionado, podemos observar que esa agrupación de especies (que a partir de ahora denominaremos clados) se corresponde con las áreas biogeográficas anteriormente mencionadas. Así, encontramos el clado formado por las especies *A. sturio*-*A. oxyrinchus*, que son las especies Atlánticas tanto del norte de América como del Norte de Europa. El clado *Scaphirhynchus* agrupa a las especies de este género. Las especies que se distribuyen por las costas del Océano Pacífico, tanto de la parte asiática, como la americana, se agrupan juntas en lo que se denomina Clado Pacífico. Mientras el Clado Atlántico agrupa a la especie *A. brevisrostrum* con el resto de especies de distribución europea y asiática.

1.2 PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS EVOLUTIVAS DE LOS ESTURIONES.

Los esturiones presentan una serie de características evolutivas que los convierten en un grupo muy interesante desde el punto de vista de la evolución morfológica, cromosómica y molecular. A continuación detallamos las cuatro características evolutivas principales:

- 1.- El cariotipo de las especies del Orden Acipenseriformes se caracteriza por presentar variada morfología y un elevado número de cromosomas, de los cuales más de la mitad son minicromosomas (en la Figura 4 podemos observar como ejemplo los cariotipos de las especies *A. naccarii* y *A. sturio*).

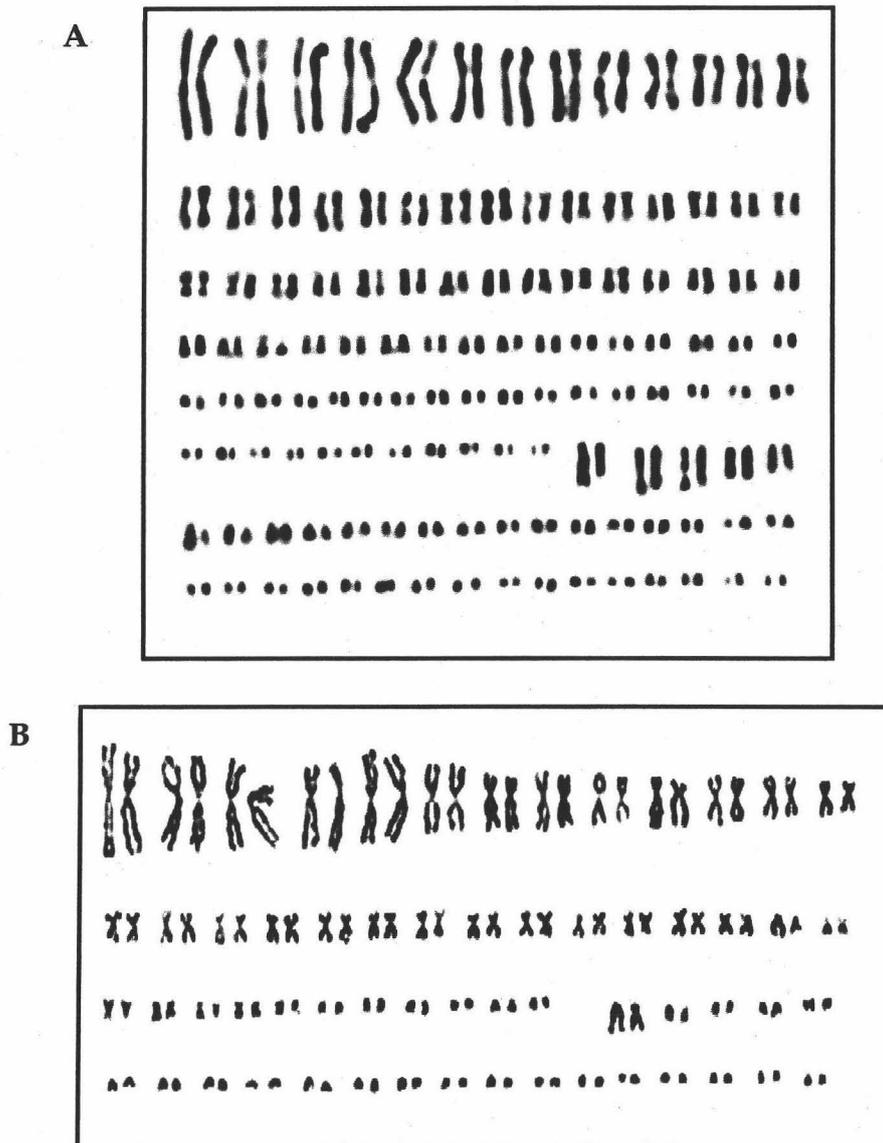


Figura 4: La figura A muestra el cariotipo de la especie *A. naccarii* (248 ± 4 cromosomas), modificado de Fontana *et al.* (1999), y la figura B muestra el cariotipo de la especie *A. sturio* (121 ± 3 cromosomas), modificado de Tagliavini *et al.* (1999a). En ambos casos podemos apreciar el elevado número cromosómico y la disparidad de formas y tamaños de los cromosomas.

La asignación de un número cromosómico exacto puede ser algo arbitraria porque depende de la técnica de observación de esos minicromosomas. De forma general, podemos clasificar las especies de este orden en tres clases (Tabla 2): la clase I incluye especies que poseen un número

cromosómico entre $2n=110$ y $2n=130$; la clase II, incluye a la especies cuyo número cromosómico oscila entre $2n=220$ y $2n=276$ cromosomas y la clase III que comprende a las especies con aproximadamente $2n=500$ cromosomas (Ludwig *et al.*, 2001; Revisado en Birstein *et al.* (1997) y en Fontana, 2002).

Por tanto, a nivel cromosómico encontramos especies que poseen aproximadamente 120 cromosomas y que divergieron hace mucho tiempo (como las especies *H. huso*, *A. ruthenus* y *A. stellatus* en comparación con *P. spathula*) y, sin embargo, presentan cariotipos similares.

La determinación exacta de los niveles de ploidía en estas especies resulta controvertida al tratarse de especies con un número cromosómico tan elevado. Se han utilizado diferentes técnicas para conseguir el objetivo de determinar dichos niveles, y así Birstein *et al.* (1997) y Birstein y DeSalle (1998), analizaron el número de señales de hibridación sobre la región organizadora del nucleolo (NOR), y sugirieron que las especies con unos 120 cromosomas eran tetraploides ($4n$) y las de alrededor de 250 cromosomas eran octoploides ($8n$). Sin embargo, otros autores (Fontana, 1994; Fontana *et al.*, 1998a; Tagliavini *et al.*, 1999a) estudiando el número y posición de los NORs (mediante tinción con plata y mediante hibridación *in situ* (FISH)) y estudiando el número de señales de hibridación en los cromosomas de los genes ribosómicos 5S (Lanfredi *et al.*, 2001), sugieren que las especies diploides ($2n$) son aquellas que tienen unos 120 cromosomas, y tetraploides ($4n$) las especies con un número cromosómico de unos 250. Recientemente, mediante el estudio de marcadores altamente polimórficos, como son los microsátélites, Ludwig *et al.* (2001) han demostrado que las especies que tienen alrededor de 120 cromosomas, aunque tuvieran un origen tetraploide, hoy día se han diploidizado y son diploides funcionales; mientras que las especies con unos 250 cromosomas serían tetraploides. Igualmente, denominan octoploides a las especies con unos 500 cromosomas.

Clase	Especie	Número Cromosómico	Cariotipo	Cita Bibliográfica
I	<i>A. sturio</i>	116±4	70m/sm, 4a, 40mc	Fontana y Colombo (1974)
		121±3	78m/sm, 43a/mc, 198NF	Tagliavini <i>et al.</i> (1999a)
	<i>A. oxyrinchus</i>	99-112		Li <i>et al.</i> (1985)
	<i>A. ruthenus</i>	116±4	66m/sm, 40a/mc, 172NF	Fontana <i>et al.</i> (1975)
		118±4		Fontana <i>et al.</i> (1999)
	<i>A. stellatus</i>	118±2	70±4m/sm, 118±2+70±4NF	Birstein y Vasil'ev (1987)
		114		Nowruzfashkhami y Khosroshahi (1999)
	<i>A. nudiventris</i>	118±3	54±4m, 4a, 60±3mc, 172NF	Arefjev (1983)
		118±2		Sokolov y Vasil'ev (1989)
	<i>S. platorhynchus</i>	112	50m, 14a, 48mc, 162NF	Ohno <i>et al.</i> (1969)
<i>H. huso</i>	116±4	68m/sm, 46a, 182NF	Fontana y Colombo (1974)	
	117		Nowruzfashkhami y Khosroshahi (1999)	
<i>H. dauricus</i>	120		Burtzev <i>et al.</i> (1976)	
<i>P. spathula</i>	120	32m, 8sm, 8a, 72mc, 160FN	Digerkus y Howell (1976)	
II	<i>A. naccarii</i>	239±7	150m/sm, 88a/mc, 388NF	Fontana y Colombo (1974)
		248±4	174m/sm, 2st, 72a/mc, 388FN	Fontana <i>et al.</i> (1999)
	<i>A. baerii</i>	246±10	308NF	Vasil'ev <i>et al.</i> (1980)
		249±5		Fontana <i>et al.</i> (1997)
	<i>A. gueldenstaedtii</i>	250±8	92±4m/sm, 250±8+92±4NF	Birstein y Vasil'ev (1987)
		258±4	106 m/sm, 150a, 364±8FN	Fontana <i>et al.</i> (1996)
	<i>A. schrenckii</i>	240		Vasil'ev <i>et al.</i> (1980)
	<i>A. transmontanus</i>	237-243	132 m/sm, 44 a, 98 mc,	Hedrick <i>et al.</i> (1991)
		271±2.5	306FN	Van Eenennaam <i>et al.</i> (1998)
	<i>A. sinensis</i>	264±4	78 m, 20 sm, 166 a/mc, 362FN	Yu <i>et al.</i> (1987)
<i>A. persicus</i>	>200		Nowruzfashkhami (1996)	
	258±2		Nowruzfashkhami <i>et al.</i> (2000)	
<i>A. medirostris</i>	249±8	96m/sm, 16a, 144mc, 352NF	Van Eenennaam <i>et al.</i> (1999)	
III	<i>A. mikadoi</i>	500		Birstein <i>et al.</i> (1993)
	<i>A. brevirostrum</i>	500		Blackledge y Bidwell (1993)

Tabla 2: Revisión de los números cromosómicos y cariotipos de algunas especies del Orden Acipenseriformes. Las iniciales corresponden a la morfología de los cromosomas. m: metacéntrico, sm: submetacéntrico, st: subtlocéntrico, a: acrocéntrico, mc: microcromosoma y NF: número fundamental. Modificado de Fontana, 2002.

2.- Los esturiones presentan una baja tasa evolutiva. La baja tasa de evolución de las especies de este orden se ha observado, en primer lugar, a nivel morfológico. Así, peces que hace 200 millones de años desde su aparición, no han sufrido muchos cambios en su morfología, considerándolos en la actualidad como fósiles vivientes (Gardiner, 1984). Cuando se analizan secuencias que, de forma general, presentan una evolución muy rápida, como el ADN satélite, hay autores (De la Herrán *et al.*, 2001a) que encuentran bajas tasas de mutación y homogenización, algo que no es habitual en este tipo de secuencias. Estudios llevados a cabo mediante el análisis del ADN mitocondrial (región control D-loop y gen del citocromo b, entre otros), revelan también muy poca diferencia entre las secuencias de distintas especies de este orden que han divergido hace mucho tiempo (Birstein y DeSalle, 1998; Krieger *et al.*, 2000). En secuencias funcionales, como los genes de ARN ribosómico 18S (Birstein *et al.*, 1997; Krieger y Fuerst, 2002a), tampoco existen gran cantidad de diferencias entre distintas especies. De hecho, de forma general, la tasa de mutación en peces y organismos acuáticos es menor que en mamíferos y ha sido, por lo general, relacionada con la ectotermia y una baja tasa metabólica (Martin y Palumbi, 1993; Martin, 1999). Estudios realizados en el ADN mitocondrial de algunos Perciformes revelan que su tasa de mutación es de tres a cinco veces más baja que la de mamíferos (Cantatore *et al.*, 1994). Pero es que la de esturión es inferior incluso a la del resto de peces. Así, Krieger y Fuerst (2002b) han estudiado un total de 23 genes y proteínas para comparar las tasas de evolución molecular en los Acipenseriformes con las de los teleósteos, encontrando sólo dos casos en los que la tasa de evolución de estas secuencias es algo más rápida en Acipenseriformes que en teleósteos. Esta reducida tasa de evolución en comparación con mamíferos se ha encontrado también en tiburones y tortugas, que son dos grupos que comparten características biológicas con los esturiones, como es el largo tiempo de generación, un tamaño del cuerpo grande, ectotermia y una baja tasa metabólica (Martin y Palumbi 1993; Martin 1999). En un primer momento, se pensó que el tiempo de generación y/o la baja tasa

metabólica podrían ser responsables de la baja tasa de evolución molecular observada en los esturiones y peces espátula (Martin *et al.*, 1992, Rico *et al.*, 1996; Martin, 1999). Sin embargo, otros autores han relacionado esta baja tasa de evolución también con los niveles de poliploidía de estos peces y con el posible origen híbrido de algunas de estas especies (Krieger y Fuerst, 2002b).

3.- La familia de ADN satélite *HindIII* de los esturiones no evoluciona de manera concertada, debido a bajas tasas de mutación y homogenización (De la Herrán *et al.*, 2001a) a diferencia de lo que ocurre en las familias de ADN repetido en otros organismos. Este es un hecho insólito por cuanto sólo se había observado previamente en casos en los que el tipo de divergencia entre las especies que se comparaban era escaso (Trick y Dover, 1984; Strachan *et al.*, 1985).

4.- La mayoría de especies están en peligro de extinción y en muchos ríos han desaparecido los esturiones, estando en duda el estatus taxonómico de los esturiones que los habitaban en el pasado (Garrido-Ramos *et al.*, 1997; Almodóvar *et al.*, 2000 y Gasent-Ramírez *et al.*, 2001).

1.3 LOS ESTURIONES DE LA PENÍNSULA IBÉRICA. EL CASO DEL RÍO GUADALQUIVIR.

La presencia de esturiones se ha puesto de manifiesto en varios puntos de la Península Ibérica (Figura 5). La población de esturión encontrada en la Bahía de Vizcaya (Lelek, 1987), podría pertenecer a la misma población que vive en el Río Girona (Francia). De los ríos que desembocan en el Mediterráneo, hay constancia de la existencia de estos peces en el Río Ebro principalmente (Steindachner, 1866; Gibert, 1911, 1913; Lozano-Rey, 1919). Y, de forma más puntual, en la Costa Valenciana, en la desembocadura de los Ríos

Turia y Júcar (Cisternas, 1877), así como en aguas que bañan las Islas Baleares (Barceló y Combis, 1868).

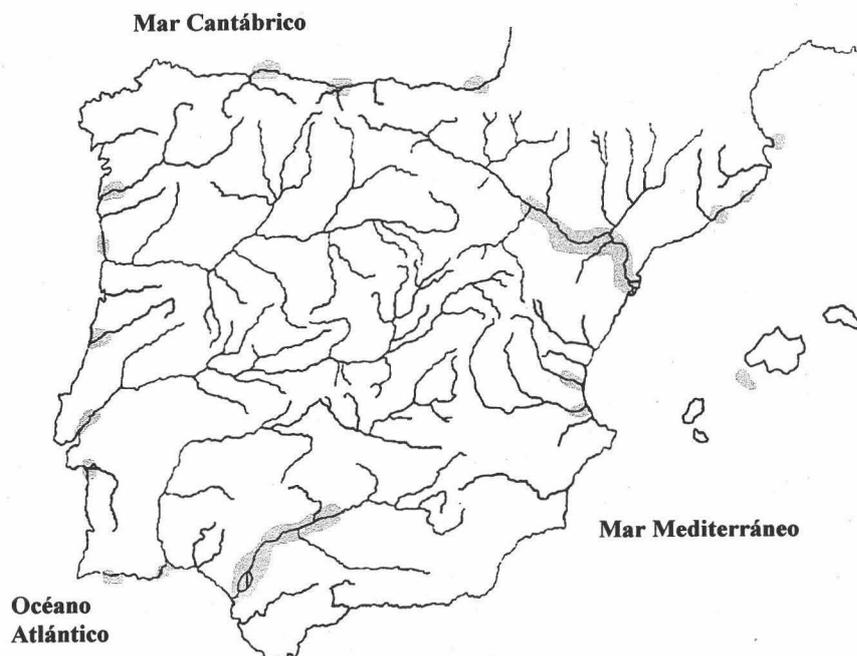


Figura 5: Distribución de los esturiones en la Península Ibérica. En el caso de los ríos Ebro y Guadalquivir, se ha señalado el trayecto de remonte para el desove, llegando hasta Tudela (Navarra) en el primer caso y hasta Lora del Río (Sevilla) en el segundo.

En los ríos que desembocan en la vertiente Atlántica, del Miño al Guadalquivir (incluidos los ríos portugueses, Vieira, 1898), encontramos citas y fechas de capturas que confirman la presencia de esturiones en estos ríos (Almaça, 1988; Gonçalves, 1942; Classen, 1944).

Pero la abundancia de esturiones en el Río Guadalquivir no fue comparable con la de ningún otro río de la Península Ibérica (Elvira *et al.*, 1991). La pesca del esturión en el Río Guadalquivir, también llamado sollo en esta región, es muy antigua y en tiempos remotos la cantidad de ejemplares capturados era considerable (Figura 6). Tanta era su importancia que, como en la mayoría de pueblos ibéricos, las monedas de Coria del Río fueron acuñadas

con la reproducción del producto más característico de la localidad, que en este caso eran dos peces: un sábalo o un esturión (estas últimas monedas, rarísimas). Incluso los Reyes Católicos otorgaron el monopolio de la preparación del "caviare" a los monjes de la Cartuja de Sevilla, y el derecho de ahumar el esturión a una cofradía que tenía su domicilio en el conocido como barrio de los ahumadores.



Figura 6: Sollos en la fábrica Villa Pepita, Coria del Río, Sevilla. (Primera factoría de este tipo en Europa, exceptuando Rusia). Los ejemplares son de hembras vivas. Año 1936.

Pero fue la familia Ybarra la que comenzó a explotar esta especie en la localidad, donde, hasta entonces, se echaba el caviar a los puercos. De esta forma, la casa Ybarra llegó a instalar una industria de producción de caviar (Figura 7) en Coria del Río (Sevilla) en 1931 que duró hasta 1970, cuando las capturas de esturiones empezaron a escasear.



Figura 7: Etiqueta de una lata de caviar. Según el catálogo de precios de 1939, una lata de 1.100 gramos de "caviar español Ybarra selecto" se vendía a lo que hoy equivaldría a 1 euro.

El continuo retroceso en las poblaciones de esturión continúa hoy en día en todo el mundo, tal como comentamos al principio, hasta considerar a estas especies en peligro de extinción. Concretamente, en el Río Guadalquivir sólo se han capturado cuatro ejemplares desde 1974, de los que tres se conservan en la Estación Biológica de Doñana (EBD8173, EBD8401 y EBD8174), por lo que resulta obvia la necesidad de desarrollar programas de repoblación de este río con esturiones autóctonos como solución a este problema. Pero, para llevar a cabo esta tarea, necesitamos conocer e identificar las especies que habitaban en el Río Guadalquivir.

Tradicionalmente se ha considerado *A. sturio* como la única especie existente en la Península Ibérica, y concretamente en el Río Guadalquivir (Almaça, 1988; Doadrio *et al.*, 1991; Elvira y Almodóvar, 1993 y Pereira, 1995). Sin embargo, existen referencias que citan la presencia de la especie *A. naccarii* (considerada como especie endémica del Adriático) en los ríos de la Península Ibérica (Capello, 1869; Gonçalves, 1942).

Los intentos de identificación de los tres especímenes (EBD8173, EBD8401 y EBD8174) capturados en los años 70 y conservados en la Estación Biológica de Doñana, han resultado controvertidos. Catalogados como *A. sturio* por considerarse la única especie existente en la Península, estudios morfométricos y genéticos (utilizando un marcador nuclear: el ADN satélite *HindIII*) contradicen esta asignación a favor de la especie *A. naccarii* (Garrido-Ramos *et al.*, 1997).

Desde este momento, son varios los estudios moleculares utilizando marcadores mitocondriales, como fragmentos del citocromo b y fragmentos del gen 12S, los que se han llevado a cabo y que han tratado de esclarecer la pertenencia de estos tres ejemplares a una u otra especie (Almodóvar *et al.*, 2000 y Gasent-Ramírez *et al.*, 2001). Estos autores tan sólo obtienen resultados del espécimen EBD8174, donde ponen de manifiesto que pertenecía a la especie *A.*

sturio. Más concretamente, el progenitor femenino de este ejemplar pertenecería a la especie *A. sturio*.

Precisamente, utilizando técnicas moleculares, se han encontrado casos de introgresión de esturiones en regiones en las que en la actualidad no existen. Así, recientemente, Ludwig *et al.* (2002) han puesto de manifiesto que la especie *A. oxyrinchus* (especie que se distribuye por la costa atlántica del Norte de América), habitó el mar Báltico durante la Edad Media. Por otro lado, se han encontrado dos clados mitocondriales distintos en una población de la especie *A. naccarii* del Río Po (Italia), posiblemente debido a una introgresión, esta vez, de la especie *A. gueldenstaedtii* del Mar Negro, en el área de distribución de la especie *A. naccarii* (Arne Ludwig, comunicación personal). De esta forma, no es descabellado pensar que en algún momento de la historia de los esturiones, la especie *A. naccarii*, actualmente endémica del Mar Adriático, hubiera llegado a las costas de la Península, o que, por el contrario, fueran dos las especies autóctonas de la Península Ibérica, *A. sturio* y *A. naccarii*, siendo el centro de distribución de esta última el Mediterráneo occidental y no el Adriático.

1.4 EL ADN REPETIDO.

Desde los estudios de Britten y Kohne de finales de los años 60 del siglo pasado (Britten y Kohne, 1968), se sabe que en el genoma de los eucariotas existe una gran variedad de secuencias repetidas de diverso tipo. La existencia de este tipo de secuencias, dado que en su mayor proporción forman parte de lo que se conoce como ADN no génico, viene a explicar la llamada paradoja del valor de C. El valor C viene determinado por el contenido en ADN del genoma haploide de una especie. Aunque, en líneas generales, se puede sostener que a mayor complejidad evolutiva mayor valor de C, se conoce desde hace mucho tiempo que especies próximas con niveles de complejidad similares pueden diferir enormemente en su contenido en ADN. Por otro lado, en muchas

ocasiones, especies menos evolucionadas presentan una cantidad de ADN mayor a otras con nivel de complejidad evolutiva superior. Así, el hombre tiene un genoma 300 veces más grande que la levadura *S. cerevisiae*, pero 200 veces más pequeño que el de la ameba *Amoeba dubia* (Li, 1997; Gregory y Hebert, 1999). El hecho de que el tamaño de los genomas no esté relacionado con la complejidad de los organismos es lo que llamamos paradoja del valor de C (Lewin 1997, Graur y Li, 1999), que se explica por la existencia de ADN no génico. Así, por ejemplo, el 90% del genoma humano es ADN no génico, mientras que el 10% restante se reparte entre un 1.5% de secuencias codificadoras de proteínas (exones), un 3.5% de secuencias codificadoras de ARNs funcionales y un 5% de secuencias reguladoras (secuencias reguladoras de la transcripción, orígenes de replicación, ADN centromérico y ADN telomérico). Aunque un porcentaje importante del ADN no génico es ADN de secuencia única (25% intrones y 15% secuencias espaciadoras), la mayor parte del ADN no génico es ADN repetido (50% del genoma; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Pero la proporción del genoma que representan las secuencias repetidas varía ampliamente entre especies. En levaduras esta proporción es del 5%, mientras que en animales oscila entre el 5% del mosquito *Chironomus tetans* y el 90% del tritón *Necturus masculus* (Graur y Li, 1999). En muchas especies vegetales, la proporción de ADN repetido es muy alta, aproximadamente del 80% (Flavell, 1986) aunque en algunas especies por ejemplo en guisante, *Pisum sativum*, es del 97% (Murray *et al.*, 1981).

Dentro del ADN repetido no génico podemos distinguir entre secuencias que se disponen en tándem o bien dispersas en los genomas (Graur y Li, 1999). Entre las secuencias que se repiten en tándem están los microsátélites (secuencias de pequeño tamaño, de 1 a 6 pares de bases que se repiten en muchos loci dispersos por la eucromatina un número variable de veces), los minisátélites (similares a las anteriores pero con un tamaño entre 10 y 60 pares

de bases) y el ADN satélite (secuencias de mayor tamaño que se repiten entre cientos de miles a millones de veces en la heterocromatina). Entre las secuencias repetidas dispersas están las secuencias SINEs (retrotranscritos de ARNs codificados por genes de tipo III) y LINEs (retrotransposones no virales), además de otros tipos de secuencias como transposones y elementos retrovirales. En el caso del genoma humano, por ejemplo, el 5% del genoma es ADN repetido en tándem y el 45% está constituido por ADN repetido disperso. No todo el ADN repetido es ADN no génico. Entre el ADN repetido cabe incluir a las familias multigénicas como las de los genes de las globinas, las actinas y las histonas entre otras (Singer y Berg, 1991; Lewin, 1994). Entre las familias multigénicas también encontramos situaciones en las que los miembros de la familia se distribuyen de manera dispersa por el genoma, como es el caso de los genes de los ARN transferentes, o en tándem, como por ejemplo los genes ribosómicos 18S, 5.8S y 28S o los genes ribosómicos 5S (Singer y Berg, 1991).

En esta memoria hemos analizado dos familias de ADN satélite y los espaciadores de los genes 5S. Es por ello por lo que pasamos a continuación a describir en más profundidad los detalles de su estructura, su función y su evolución.

El ADN SATÉLITE

El ADN satélite está constituido por familias de secuencias cortas de ADN que se repiten de cientos de miles a millones de veces en un genoma (Ugarković y Plohl, 2002). Por lo general son secuencias no codificadoras (Elder y Turner, 1995) aunque existen raras excepciones (McGregor y Sessions, 1986; Pardue y Henning, 1990), y representan el principal constituyente de la heterocromatina constitutiva (Elder y Turner, 1995).

En una misma especie pueden existir diferentes familias de ADN satélite, cada una caracterizada por una secuencia diferente de la unidad monomérica

repetitiva y por una localización cromosómica diferente. Así, la heterocromatina y el ADN satélite, que suelen acumularse en regiones con baja tasa de recombinación (Charlesworth *et al.*, 1994), se observan en los centrómeros y en las regiones subteloméricas principalmente. Por la misma razón suelen acumularse en los cromosomas sexuales (Charlesworth *et al.*, 1994) y en los cromosomas supernumerarios o cromosomas B (Camacho *et al.*, 2000), así como en los segmentos supernumerarios (Houben *et al.*, 2000), aunque también puede amplificarse una familia de ADN satélite a nivel intercalar (Jamilena *et al.*, 1993; De la Herrán *et al.*, 2001b).

El porcentaje de ADN satélite dentro del genoma de una especie suele ser bajo en los vertebrados. En peces, la familia de ADN satélite *EcoRI* de los espáridos representa un 2% del genoma de especies como la dorada, *Sparus aurata*, (Garrido-Ramos *et al.*, 1995b), mientras que en el genoma del pez cebra, *Danio rerio*, el porcentaje de ADN satélite es del 5% (He *et al.*, 1992). Aunque menos del 5% del genoma humano es ADN satélite, en algunos cromosomas este porcentaje aumenta mucho. El ADN satélite DYZ1 aislado del cromosoma Y humano, comprende el 40% del brazo largo del cromosoma (Nakahori *et al.*, 1986). En otras especies también existen porcentajes considerablemente altos. Así en vacas y ovejas (en bóvidos, en general) el ADN satélite supone un 23% del genoma (Nijman y Lenstra, 2001). En anfibios como las salamandras, género *Triturus*, el ADN satélite ocupa una proporción reducida de su genoma, excepto en *Triturus karelini*, que alcanza el 10% (Vignali *et al.*, 1990). En aves como la cacatua, *Cacatus goffini* (Madsen *et al.*, 1992), encontramos una proporción del 6.7% del genoma. O como en el caso de la serreta mediana, *Mergus serrator* (Orden Anseriformes), que encontramos hasta el 10% (McHugh *et al.*, 1990). En el caso de insectos, podemos distinguir el caso de *Drosophila melanogaster*, con el 20% de su genoma compuesto por ADN satélite y el caso de los escarabajos de la Familia Tenebrionidae donde el ADN satélite representa el 50% (Mravinac *et*

al., 2002). También observamos diferencias entre especies íntimamente relacionadas (especies gemelas) (Graur y Li, 1999).

Aunque se ha considerado ADN "basura" (Ohno, 1972) o se le han atribuido caracteres de "parásito" (Orgel y Crick, 1980), en la actualidad se barajan varias hipótesis sobre la función del ADN satélite. Por ejemplo: 1) la de estar implicado en la formación de compartimentos heterocromáticos importantes para el correcto comportamiento de los cromosomas durante la mitosis y la meiosis (Csink y Henikoff, 1998); 2) La de jugar diversos papeles a nivel subtelo mérico (revisado en Kipling, 1995 y en Blackburn y Greider, 1995); 3) La de jugar un papel en la función centromérica, como se ha propuesto en insectos (Rovira *et al.*, 1993), en peces (Garrido-Ramos *et al.* 1995b), en anfibios (Barsacchi-Pilone *et al.*, 1986; Cremisi *et al.*, 1988), y en mamíferos (Willard, 1991; Tyler-Smith y Willard, 1993), tal como queda revisado en Choo (1997).

Pero el ADN satélite evoluciona de manera muy rápida estando sometido a ciclos explosivos de aparición y desaparición (Singer, 1982 y Miklos, 1985). Así, existen satélites recientes que son propios de una sola especie, como es el caso de los ADN satélites CgoA y el CgoB del primate *Callimico goeldii* (Fanning *et al.*, 1989), o de unas cuantas especies relacionadas, como ocurre en el género *Triturus* (Cremisi *et al.*, 1988), mientras que otros están más conservados, bien por su evolución más lenta (Arnason, 1990; Grétarsdóttir y Arnason, 1992; Mravinac *et al.*, 2002; De la Herrán *et al.*, 2001a) o bien por su posible función (Willard y Waye, 1987a, 1987b).

EL ADN RIBOSÓMICO.

En eucariotas superiores el ADN ribosómico está organizado en dos familias multigénicas distintas compuestas por unidades que se repiten en tándem varios cientos de veces.

Una de estas familias está representada por el ADN ribosómico 45S que codifica para los ARN ribosómicos 18S, 5.8S y 28/26S, estando relacionada con las regiones organizadoras del nucleolo (NOR). Estos genes se encuentran agrupados en una única unidad de transcripción y en ésta, además de los genes, encontramos dos espaciadores internos que se transcriben (Internal Transcribed Spacers o ITS) de longitud y secuencia variable, y otros dos espaciadores externos (External Transcribed Spacers o ETS) que flanquean a los genes 18S y 28S en los extremos 5' y 3' respectivamente y que también son transcritos por la ARN polimerasa I (igualmente, de longitud y secuencia variable). Esa unidad de transcripción está separada por un espaciador que no se transcribe (Nontranscribed Spacer o NTS). Juntos ETSs y NTSs constituyen el Espaciador Intergénico de los Genes ribosómicos (IGS). El tamaño y la secuencia de los genes 18S, 5.8S y 28S están muy conservados en los organismos eucariotas debido a que son funcionales, mientras que las diferencias interespecíficas se deben sobre todo a diferencias en las secuencias espaciadoras, ya que no están sometidas a selección natural al no tener función codificadora.

La segunda familia de genes ribosómicos está representada por el gen 5S que codifica para el ARN ribosómico 5S. Las repeticiones de ADN ribosómico 5S consisten en secuencias codificadoras de unos 120 pares de bases. Presentan un sitio de terminación (TTTTT) para la RNA polimerasa III en el extremo 3' del gen, y motivos de promotores para la ARN polimerasa III internos conservados. Estos motivos corresponden a la región de control interno (ICR, el promotor de este tipo de genes) (Ciliberto *et al.*, 1983), que consiste en 2 cajas, la Caja A (secuencia altamente conservada de unos 10 pares de bases) y la Caja C (secuencia de unas 13 pares de bases). Las secuencias codificadoras de los genes de ARN ribosómicos 5S también están separadas por secuencias espaciadoras que no se transcriben (NTS), y que presentan una longitud variable. El número de copias de los genes de ARN ribosómico 5S es muy variable entre

vertebrados, existiendo unas 2.700 copias en *Xenopus laevis*, mientras que en humanos el número de copias ronda las 2.000 (Lewin, 1997).

La organización estructural y funcional de los genes de ARN ribosómico 5S ha sido ampliamente descrita en plantas (Hanson *et al.*, 1996; Amarasinghe y Carson, 1998; entre otros), en mamíferos (Suzuki *et al.*, 1994; entre otros), en peces (Pendás *et al.*, 1994, 1995; Mórán *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1998; Sajdak *et al.*, 1998; Martins y Galetti, 1999, 2000, 2001, 2001b) y en algunos anfibios (del Pino *et al.*, 1992; entre otros).

Los genes de ARN ribosómico 5S están muy conservados en cuanto a longitud y secuencia nucleotídica se refiere, mientras que las secuencias espaciadoras (NTSs), presentan mayores diferencias. Las variaciones en el tamaño de estas secuencias espaciadoras pueden llegar a dar unidades distintas de ADN ribosómico 5S dentro de una misma especie incluso. Este caso lo encontramos en los peces del género *Leporinus* (Familia Anostomidae, Characiformes) donde un tipo de ADN ribosómico 5S consiste en unidades repetitivas de 200 pares de bases mientras el otro tipo tiene un tamaño de 920 pares de bases en su unidad de repetición. La diferencia en tamaño de los dos tipos es debida a un distinto tamaño en las secuencias del NTS (Martins y Galetti, 2001a), dado que las secuencias del gen 5S se mantienen constantes en ambos casos. A nivel interespecífico puesto que las secuencias NTS no son codificadoras, cambian libremente entre especies y estas diferencias pueden caracterizar especies y usarse en estudios evolutivos (Sajdak *et al.*, 1998).

Aunque los NTS parecen no tener valor en el genoma, recientemente se ha demostrado que secuencias cortas (como las secuencias TATA) localizadas en los NTS, pueden jugar un papel importante en la regulación de la expresión de los genes de ARN ribosómico 5S en mamíferos (Suzuki *et al.*, 1996), en peces como *Oreochromis niloticus* (Martins *et al.*, 2000) y en peces del género *Leporinus* (Martins y Galetti, 2001a).

1.5 EVOLUCIÓN DE LAS SECUENCIAS REPETIDAS.

Las secuencias repetidas, como el ADN satélite y los espaciadores de los genes ribosómicos, evolucionan a un ritmo muy superior al de otras fracciones del genoma eucariota. A esto hay que añadir que las secuencias repetidas, por lo general, siguen una pauta evolutiva conocida como evolución concertada (Dover, 1982, 1986). Es decir, las unidades de repetición no evolucionan de forma independiente, sino que intercambian información de manera que mantienen un alto grado de homogeneidad intrafamiliar. A través de las interacciones genéticas entre los miembros de una familia de secuencias repetidas, una familia multigénica evoluciona como una unidad, de manera concertada. El resultado de la evolución concertada es un conjunto de secuencias homogenizadas. Pero la evolución concertada no requiere sólo de la transferencia horizontal de las mutaciones entre los miembros de una familia (homogenización), sino también de la propagación de ese cambio a todos los individuos de la población (fijación). La tasa de cambio de un ADN satélite o de las secuencias espaciadoras entre los genes 5S es mayor que la de cualquier otra fracción del genoma, ya que al no ser secuencias codificadoras, las mutaciones no están sujetas, por lo general, a la acción de la selección natural. A su vez, la tasa a la que ocurre la homogenización 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 sólo la homogenización intraespecífica sino también la divergencia interespecífica a una velocidad que es mayor a la de otras partes del genoma.

La homogenización y fijación de las secuencias repetidas depende de varios mecanismos moleculares inherentes a los propios mecanismos de homogenización y además, a otros factores como son: el número y la disposición de las repeticiones, la estructura de la unidad repetida, el requerimiento funcional, además de la influencia de la estructura genética de las poblaciones y los cambios acontecidos que en éstas tienen lugar.

En cuanto a los mecanismos moleculares de cambio que intervienen en el proceso de homogenización de este tipo de secuencias se han propuesto (Dover, 1982, 1986): la transposición, el deslizamiento de la hebra en la replicación, la transferencias a través de intermediarios de ARN o a través de elementos circulares extracromosómicos, pero son dos los que principalmente se han considerado como máximos responsables de llevar a cabo la evolución concertada: el entrecruzamiento desigual (Smith, 1976) y la conversión génica (Edelman y Gally, 1970).

El proceso básico de aparición de cualquier familia de secuencias repetidas es la amplificación por duplicación de una secuencia. Una vez duplicada, mecanismos como el entrecruzamiento desigual, facilitan una duplicación aún mayor. El entrecruzamiento desigual es un mecanismo basado en el intercambio desigual entre dos unidades cromosómicas (entre las dos cromátidas hermanas de un 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 homogenización de las mismas. En las grandes familias de secuencias repetidas, el entrecruzamiento desigual es el mecanismo 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.

La conversión génica es un proceso de recombinación no recíproco en el que dos secuencias de la familia interactúan de tal forma que una es convertida en la otra. Según las cromátidas implicadas en el proceso se puede dividir en varios tipos, si bien desde el punto de vista del proceso de evolución concertada, los más importantes son las conversiones no alélicas (por ejemplo,

las conversiones que ocurren entre genes localizados en diferentes loci y no entre formas alélicas). La conversión génica puede ser sesgada o no sesgada. Conversión génica no sesgada significa que la secuencia A tiene la misma probabilidad de convertirse en la secuencia B como la secuencia B tiene de convertirse en la A. Mientras que la conversión génica sesgada significa que no existe igual probabilidad de que ocurra conversión génica entre dos secuencias en las dos direcciones posibles. Si esto ocurre, podemos hablar de ventaja o desventaja conversional de una secuencia sobre la otra. La cantidad de ADN implicado en sucesos de conversión génica puede variar entre pocas pares de bases a miles de ellas. Asimismo varía la tasa y la probabilidad de que ocurra conversión génica dependiendo de la localización. Estudios teóricos han mostrado que la conversión génica puede producir evolución concertada (Ohta, 1990). Este mecanismo se ha sugerido como mecanismo de homogenización en la familia alpha de ADN satélite y en los genes de las gamma-globinas humanas (Scott *et al.*, 1984). A diferencia del entrecruzamiento desigual, la conversión génica no altera el número de copias y puede ser sesgada, de manera que se produzca la fijación de una de las mutaciones en detrimento de la otra. El mecanismo de conversión génica está favorecido si las repeticiones son dispersas y cuando las familias de secuencias repetidas son de pequeño tamaño.

La conversión génica, en algunos casos, presenta una serie de ventajas frente al entrecruzamiento desigual, como mecanismo para llevar a la evolución concertada. Este primer mecanismo no produce cambios en el número de repeticiones dentro de una familia y actúa no sólo en repeticiones en tándem sino también en dispersas (la actuación del entrecruzamiento desigual cuando las repeticiones están dispersas en los cromosomas puede producir la delección o la duplicación de los genes que se encuentren entre las repeticiones). Por último, la conversión génica es un mecanismo que puede ser sesgado, es decir, que tenga una dirección preferente, de manera que afecte a la probabilidad de fijación de una variante en la secuencia. En cambio, el entrecruzamiento

desigual muestra una serie de ventajas frente al mecanismo de conversión génica, siendo más rápido y eficaz en algunos casos, por ejemplo cuando se trata de grandes familias de repeticiones en tándem, porque el número de repeticiones pueden variar sin que cause daños significativos. Es decir, el número de repeticiones que se pueden cambiar es mayor que en la conversión génica (donde el cambio sólo afectaría a la región del heterodúplex).

Como hemos comentado anteriormente, además de los factores intrínsecos de homogenización, existen otros como son: el número de las repeticiones, la disposición de la unidad repetida, la función de las secuencias repetidas, la estructura de la unidad de repetición y la estructura genética de la población. Estos factores influyen en el tiempo necesario para homogenizar y fijar los cambios en una población (Graur y Li, 1999).

El número de repeticiones afecta porque a mayor número de repeticiones, más tiempo tardarán en homogenizarse los cambios aparecidos.

En cuanto a la disposición de las repeticiones, influye porque el tiempo necesario para homogenizar los cambios será mayor si las repeticiones se encuentran dispersas en el genoma que si están agrupadas en tándem. Además, no es lo mismo un ADN repetido en tándem presente en uno sólo o unos pocos loci que un ADN satélite repetido por muchos loci en el genoma.

Respecto a la funcionalidad de las secuencias repetidas, va a depender de si se requiere grandes cantidades del mismo producto (por ejemplo, genes que codifican ARN ribosómicos) o si se requiere diversidad (por ejemplo, genes de las inmunoglobulinas, o del complejo mayor de histocompatibilidad). En el primer caso, el tiempo necesario para homogenizar los cambios será más alto que en el segundo. En los genes para los ARN ribosómicos, la selección tenderá a eliminar las nuevas variantes y promoverá la homogeneidad, facilitando la conversión génica y el entrecruzamiento desigual entre los miembros de la familia, acelerando el proceso de evolución concertada. En el caso de los genes

de las inmunoglobulinas, se espera que las tasas de entrecruzamiento desigual y conversión génica, por el contrario, sean menores, lo que facilita la diversidad genética en esta región. Pero en la unidad de repetición pueden existir diferentes regiones, unas codificadoras y otras no. Es lo que ocurre con los genes ribosómicos. En estos casos la selección no es igual en todas las regiones y, por tanto, mientras se mantienen las secuencias codificadoras, las secuencias intergénicas divergen.

Por último, hay que tener en cuenta la estructura genética de las poblaciones (tamaño efectivo de la población, aislamiento geográfico, acción de la selección natural, etc.), y además, hay que tener en cuenta otros aspectos evolutivos como el tiempo de divergencia entre especies, la hibridación y la poliploidización. El tamaño de la población afecta porque no sólo se requiere que los cambios se propaguen de forma horizontal entre los miembros de una familia de secuencias repetidas, sino también la fijación de tales variantes en todos los individuos de la población (Dover 1982; Ohta y Dover, 1984). La rapidez de fijación de cambios en el total de la población va a depender también del aislamiento geográfico de la misma. La posible formación de individuos híbridos interespecíficos (a veces poliploides) es otro factor que afecta disminuyendo la tasa de evolución concertada.

Así las cosas, la mayoría de los estudios concernientes a la evolución de las secuencias repetidas, coinciden en que éstas evolucionan de manera concertada (Ugarković y Plohl, 2002). Sin embargo, a veces se han encontrado casos en que no existe evolución concertada en el ADN repetido. Uno de los casos mejor conocido es el de la familia de ADN satélite de la mosca tsétsé (Trick y Dover, 1984), para el que los autores de este estudio encuentran altos valores de variación de las secuencias tanto a nivel intra como interespecífico atribuyendo la ausencia de evolución concertada a la baja tasa de homogenización. La compartimentalización cromosómica de las distintas variantes en secuencia y procesos poblacionales peculiares, junto con las altas

tasas de mutación, son las causas propuestas para explicar la ausencia de evolución concertada en la familia de ADN satélite PIM357 de las especies del género *Pimelia* de las Islas Canarias (Pons *et al.*, 2002a, 2002b). La compartimentalización cromosómica de las variantes de las secuencias se ha encontrado que es una causa común de la ausencia de evolución concertada para el ADN satélite de primates (Willard y Wayne, 1987a, 1987b) y para los espaciadores entre los genes 5S del algodón poliploide (Cronn *et al.*, 1996). El impedimento de intercambios cromosómicos debido a diferencias extremas en forma y tamaño de los cromosomas, junto con la baja tasa de mutación, fue propuesto por De la Herrán *et al.* (2001a) para explicar la ausencia de evolución concertada en la familia de ADN satélite *HindIII* de los esturiones.

1.6 EL ADN REPETIDO COMO MARCADOR FILOGENÉTICO Y TAXONÓMICO.

La evolución rápida y concertada del ADN satélite lo convierten en un excelente marcador taxonómico (Bachmann *et al.*, 1993) y filogenético (Stepien y Kocher, 1997) cuando se trata de analizar las relaciones existentes entre especies emparentadas. Así, ha sido muy utilizado en estudios filogenéticos desde que el grupo de Arnason (Arnason, 1990; Arnason *et al.*, 1992; Grétarsdóttir y Arnason, 1992, 1993) empezara a analizar las relaciones filogenéticas de los cetáceos mediante la comparación evolutiva de diferentes familias de ADN satélite conservadas en todo el orden. Las filogenias obtenidas con el ADN satélite eran coincidentes con las obtenidas con otros marcadores moleculares, por ejemplo, con las realizadas con el ADN mitocondrial (Arnason y Gullberg, 1994).

Para algunos autores, sin embargo, el ADN satélite no es un buen marcador filogenético porque muchas veces es exclusivo de una o unas pocas especies (Miklos, 1985; Bachmann *et al.*, 1993) y es difícil utilizarlo así en estudios evolutivos. Sin embargo, cuando una familia de ADN satélite está

conservada en un grupo amplio de especies relacionadas, dada su evolución rápida pero, por lo general, cohesiva y gradual, resulta un excelente marcador filogenético y así ha sido utilizado para resolver filogenias en peces (Franck *et al.*, 1991, 1992; Garrido-Ramos *et al.*, 1999; De la Herrán *et al.*, 2001c), en anfibios (Vignali *et al.*, 1990) y en mamíferos (Grétarsdóttir y Arnason, 1992, 1993; Wijers *et al.*, 1993), así como en invertebrados (Pons *et al.*, 1997; Pons *et al.*, 2002a, 2002b). Es más, el valor cladístico de algunos de estos ADN satélites ha sido decisivo para resolver algunas dudas taxonómicas y filogenéticas dado que, el hecho de que un grupo de especies comparta una misma familia de ADN satélite, demuestra que todas ellas han compartido un ancestral común más recientemente entre ellas que con otras especies. El poder resolutivo de este tipo de análisis se incrementa cuando se usan varias familias de ADN repetido (Garrido-Ramos *et al.*, 1995a, 1995b; De la Herrán *et al.*, 2001c).

Sin embargo, en los análisis filogenéticos hay que ser cautos a la hora de utilizar el ADN satélite. Así, hay que tener en cuenta los casos en los que la evolución del satélite no sigue una pauta cohesiva o no sigue una pauta gradual o ambas.

Así, encontramos que en algunos ADN satélites existen diferentes subfamilias, cada una de las cuales tiene una historia evolutiva diferente, lo que habrá de ser considerado cuando se quiera realizar una estima filogenética (Laursen *et al.*, 1992). También hay que mencionar aquellos ADN satélites cuya unidad monomérica está formada por distintas partes, de tal forma que la evolución de la secuencia monomérica no refleja la historia evolutiva de esa familia de ADN satélite, ya que cada parte ha seguido historias evolutivas diferentes (Cabot *et al.*, 1993). Ante esta situación, como se ha mencionado para el caso de subfamilias, habrá que considerar las distintas partes que forman la unidad monomérica a la hora de estimar una reconstrucción filogenética.

También, en las filogenias basadas en el ADN satélite, debemos considerar, no sólo las tasas de mutación, sino también las de homogenización y fijación. Y es que puede ocurrir que la divergencia entre secuencias consenso sea mayor que la variabilidad intraespecífica. Esto se explica si se tiene en cuenta que los sitios variables en los monómeros de una especie pueden ser sitios en estado de transición en el proceso de fijación de los mismos, mientras que los sitios totalmente homogenizados y fijados en cada especie se verán reflejados en esa secuencia consenso y analizados como sitios divergentes entre las dos especies que se comparan (Gréttarsdóttir y Arnason, 1992). En el caso de que el tiempo que hacen que divergieron las especies que se comparan sea relativamente reciente, o la homogenización y fijación de las variantes sea un proceso relativamente lento, esto puede llevar a pensar que las secuencias monoméricas de dos especies distintas presentan mayor identidad que cuando se comparan cada una con unidades de la misma especie.

Por último, la utilidad del ADN satélite para análisis filogenéticos es debida, principalmente, a su modo de evolución concertada. Sin embargo, existen casos en que este tipo de ADN repetido no muestra esta pauta evolutiva. Esto queda demostrado cuando la variabilidad intraespecífica entre las distintas unidades monoméricas de una especie es mayor que la variación existente cuando se comparan unidades monoméricas de diferentes especies. Esto determina que cuando se alinean las diferentes repeticiones, no puede definirse una secuencia consenso típica para cada una de las especies. A pesar de ello, el carácter cladístico de estos ADN satélites en estos casos, ha sido algunas veces útil incluso (De la Herrán *et al.*, 2001a).

Igualmente, por las características de elevada tasa de cambio y evolución concertada, las secuencias espaciadoras entre los genes ribosómicos 18S y 28S, así como los espaciadores entre los genes 5S, han sido utilizadas con éxito muchas veces para determinar filogenias en diferentes grupos animales y

vegetales (Bain y Jansen, 1995; Bakker *et al.*, 1995; Cronn *et al.*, 1996; Bena *et al.*, 1998; Reed *et al.*, 2000; Pardo, 2001; Presa *et al.*, 2002).

Por otro lado, el ADN satélite parece ser una herramienta como marcador taxonómico. El empleo de éste en el análisis sistemático, nos serviría para comprender la biología de los organismos implicados. Así, por ejemplo, el patrón de hibridación de un ADN satélite puede servir para discriminar entre poblaciones euroasiáticas y japonesas de la mosca *Drosophila bifasciata* (Bachmann *et al.*, 1993). También, el simple análisis de la presencia/ausencia de un ADN satélite ha servido para separar en dos linajes distintos a las especies del género *Pagrus* de las del género *Sparus* (Garrido-Ramos *et al.*, 1998), o diferenciar a la especie de esturión *A. naccarii* de *A. sturio* (Garrido-Ramos *et al.*, 1997). Igualmente, las secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos, además de su utilización en estudios taxonómicos, se han utilizado en diagnóstico molecular (Meredith *et al.*, 1991), como el caso de *Perkinsus atlanticus* que infecta a almejas (De la Herrán *et al.*, 2000), o el de *Marteilia refringens* que infecta a ostras planas (López-Flores *et al.*, 2002).

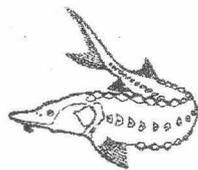
2 OBJETIVOS

El grupo de peces encuadrados dentro del Orden Acipenseriformes es muy interesante desde varios puntos de vista (ecológico, evolutivo, comercial, etc.). Pero es a nivel genético y molecular donde encontramos las características más peculiares y poco frecuentes que lo convierten en un material de estudio muy interesante. Y es que el elevado número cromosómico que presentan, no es una característica habitual en animales. Como tampoco lo es la baja tasa evolutiva que presentan diversas regiones estudiadas de su genoma, tanto codificadoras como no codificadoras. Dentro de éstas últimas, las secuencias repetidas también presentan una característica poco frecuente como es la aparente ausencia de evolución concertada.

Por estas razones, en este trabajo nos hemos planteado los siguientes objetivos:

PRIMERO. Analizar tres familias de secuencias nucleares repetidas para determinar si la ausencia de evolución concertada es la norma general que siguen las secuencias repetidas en el genoma de los esturiones. Estudiaremos, asimismo, las posibles causas y factores que influyen en la ausencia de evolución concertada. Analizaremos también, hasta donde sea posible, las relaciones que se puedan establecer entre especies utilizando estas secuencias como marcadores filogenéticos.

SEGUNDO. Estudiaremos la utilidad de estas secuencias como marcadores taxonómicos, de forma que contribuyan a aclarar el estatus específico al que pertenecen diferentes ejemplares de esturión capturados en ríos del Mediterráneo occidental y conservados en diferentes museos italianos y españoles. En este apartado haremos especial énfasis en los esturiones capturados en el Río Guadalquivir y conservados en la Estación Biológica de Doñana (EBD), en Sevilla. En este último caso también hemos empleado marcadores mitocondriales.



MATERIAL Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 MATERIAL EMPLEADO.

En esta memoria se han analizado 13 especies de esturión pertenecientes a la familia Acipenseridae y 1 especie de pez espátula (*Polyodon spathula*), perteneciente a la familia Polyodontidae. Dentro de la familia Acipenseridae hemos estudiado 1 especie de la subfamilia Scaphirhynchinae (*Scaphirhynchus albus*) y 12 de la subfamilia Acipenserinae (*Acipenser naccarii*, *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. ruthenus*, *Huso huso*, *A. stellatus*, *A. brevirostrum*, *A. fulvescens*, *A. transmontanus*, *A. sinensis*, *A. sturio* y *A. oxyrinchus*).

En la Tabla 3 se indican dichas especies así como su procedencia.

Las muestras de hígado, músculo y sangre de los ejemplares pertenecientes a la especie *A. naccarii*, fueron proporcionadas por D. Alberto Domezain, de la Piscifactoría Sierra Nevada, Riofrío, Granada.

Las muestras, tanto de hígado como de músculo, de las especies *A. baerii*, *A. sturio*, *A. gueldenstaedtii*, *A. ruthenus*, *H. huso*, *A. transmontanus*, *A. brevirostrum*, *A. fulvescens* y *A. stellatus* fueron proporcionadas por los doctores Francesco Fontana y Leonardo Congiu, del Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Ferrara, Italia.

Las muestras, tanto de hígado como de músculo, de las especies *A. sinensis*, *A. oxyrinchus*, *S. albus* y *P. spathula* fueron proporcionadas por el Dr. Árne Ludwig, del Department of Evolutionary Genetics, del Institute for Zoo and Wildlife Research, Berlín, Alemania.

Además, se han analizado varios ejemplares de museo conservados en diferentes instituciones como son la Universidad de Granada, la Estación

Biológica de Doñana, el Museo de Ciencias Naturales de Madrid, así como en diferentes museos italianos. Sus características se detallan en la Tabla 4.

Especie	Número de individuos	País	Procedencia	Ríos de Origen
<i>A. naccarii</i>	20	España	Piscifactoría Sierra Nevada	Río Po
<i>A. baerii</i>	5	Italia	Azienda Agricola V.I.P.	
<i>A. gueldenstaedtii</i>	5	Italia	CRIAP	
<i>A. ruthenus</i>	3	Italia	Azienda Agricola V.I.P.	
<i>H. huso</i>	4	Italia	La Casella Aquaculture Plant	
<i>A. stellatus</i>	3	Rusia	Población natural	Río Volga
<i>A. brevirostrum</i>	2	Estados Unidos	Piscifactoría. EEUU.	
<i>A. fulvescens</i>	3	Estados Unidos	Población Natural. Wisconsin. EEUU.	Ríos Menomince y Wolfe
<i>A. transmontanus</i>	4	Italia	CRIAP	
<i>A. sinensis</i>	3	China	Población Natural	Río Yangtze
<i>A. sturio</i>	14	Francia	CEMAGREF	
<i>A. oxyrinchus</i>	10	Canadá	Población Natural	Río St. John
<i>S. albus</i>	6	Estados Unidos	Población Natural. Estado de Luisiana. EEUU	Río Atchafalaya
<i>P. spathula</i>	7	Estados Unidos	Piscifactoría Estado de Montana. EEUU.	

Tabla 3: Especies de esturiones analizadas en esta memoria y procedencia de las mismas. Piscifactoría Sierra Nevada, Riofrío, Granada. España. Azienda Agricola V.I.P. Orzinuovi. Brescia, Italia. CEMAGREF, Centre National du Machinisme Agricole Burdeos. Francia. CRIAP, Centro Ricerche Idrobiologiche Applicate alla Pesca, Breeding Station. Brescia, Italia. La Casella Aquaculture Plant, Ente Nazionale Energia Elettrica, ENEL, Piacenza, Italia.

Especimen	Estatus específico	Procedencia. Río y año de captura	Lugar de conservación. Estado del material
EBD8173	<i>A. sturio</i>	Río Guadalquivir, Alcalá del Río. Sevilla, España. 1974.	Estación Biológica de Doñana. Sevilla, España. Etanol
EBD8401	<i>A. sturio</i>	Río Guadalquivir, Coria del Río. Sevilla, España. 1981.	Estación Biológica de Doñana. Sevilla, España. Etanol
EBD8174	<i>A. sturio</i>	Río Guadalquivir, Alcalá del Río. Sevilla, España. 1975.	Estación Biológica de Doñana Sevilla, España. Piel seca
MNCZ1582	<i>A. sturio</i>	Río Guadalquivir, Sevilla, España. Entre 1936-1944.	Museo de Ciencias Naturales de Madrid, España. Etanol.
UGRA1	<i>A. sturio</i>	Río Guadalquivir, Sevilla, España. Finales del siglo XIX.	Univ. de Granada. Fac. de Ciencias Granada, España. Piel seca.
MZUF5714	<i>A. sturio</i>	Salerno. Italia. Región Mediterránea. 1886.	Museo Giacomo Doria, Italia. Piel seca.
MZUF5716	<i>A. sturio</i>	Livorno. Italia. Región Mediterránea. 1908.	Museo de Florencia, Italia. Piel seca.
MZUF5704	<i>A. naccarii</i>	Livorno. Italia. Región Mediterránea. 1879.	Museo Giacomo Doria, Italia. Piel seca.
MSNG40364	<i>A. naccarii</i>	Génova. Italia. Región Mediterránea. 1861.	Museo Giacomo Doria, Italia. Piel seca.
MZUF5700	<i>A. naccarii</i>	Chioggia. Italia. Región Adriática. 1882.	Museo de Florencia, Italia. Piel seca.
MZUF6472	<i>A. naccarii</i>	Chioggia. Italia. Región Adriática. 1882.	Museo de Florencia, Italia. Piel seca.

Tabla 4: Especímenes de museo estudiados en este trabajo, indicándose la procedencia y el estado del material a partir del cual se extrajo ADN.

3.2 EXTRACCIÓN DE ADN.

3.2.1 Extracción de ADN a partir de tejido sólido.

La obtención de ADN genómico total a partir de tejido sólido (hígado y músculo) de las diferentes especies de esturión se llevó a cabo siguiendo el método descrito en Sambrook y Rusell (2001). Los pasos seguidos fueron:

1. Maceramos 1g de tejido previamente liofilizado en presencia de N₂ líquido con ayuda de un mortero de porcelana. El tejido macerado se transfiere a un tubo de polipropileno al que se le añaden 10 ml de tampón de extracción compuesto por: 10 mM de Tris-ClH, pH 8; 100 mM de EDTA, pH 8; 20 g/ml ribonucleasa A (ARNasa) y 0.5% SDS.

2. Mantenemos 1 hora a 37°C en un baño con agitación suave.

3. Añadimos 100 µg/ml de Proteinasa K y mantenemos a 50°C durante 3 horas en un baño con agitación.

4. Purificamos el ADN mediante varias extracciones con un volumen de fenol y una última extracción con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), centrifugando durante 10 min a 10.000 rpm.

5. 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.

6. Mezclamos con cuidado para no degradar el ADN y centrifugamos durante 10 min a 10.000 rpm.

7. Decantamos el sobrenadante eliminando los restos de isopropanol con una pipeta.

8. Lavamos el pellet obtenido con un volumen de etanol al 70% centrifugando nuevamente a 10.000 rpm durante 5 min. Eliminamos

completamente los restos de etanol con una pipeta y dejamos secar durante unos minutos.

9. Resuspendemos el ADN añadiendo 100-200 μl de agua ultrapura.

3.2.2 Obtención de ADN a partir de sangre.

Se llevaron a cabo diferentes extracciones de ADN variando el volumen de sangre de partida. Con volúmenes de 150 μl de de sangre se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a calidad y cantidad del ADN. El método de extracción se realizó siguiendo el protocolo que recomienda la casa comercial Rafer para el kit "UltraClean™ DNA Blood Isolation". Para ello se siguieron los siguientes pasos:

1. Se mezcló un volumen de 150 μl de sangre con 900 μl de Solución G1 (solución de cloruro amónico), durante una incubación de 10 min a temperatura ambiente en la que se procedió a invertir suavemente el tubo en dos ocasiones.

2. Las muestras las centrifugamos 1 min a 13.000 rpm, eliminado el sobrenadante con una pipeta.

3. Resuspendimos el pellet completamente mediante agitación por vórtex.

4. Añadimos 300 μl de Solución G2 (solución de detergente) pipeteando arriba y abajo para lisar las células.

5. A continuación añadimos 100 μl de la Solución G3 (Acetato amónico), mezclándolo inmediatamente por vórtex durante 15 seg.

6. Centrifugamos las muestras durante 10 min a 13.000 rpm transfiriendo a continuación el sobrenadante a un tubo limpio y deseamos el precipitado de proteínas y restos de membranas celulares que han quedado en el tubo.

7. Para precipitar el ADN añadimos 300 μ l de Isopropanol mezclando suavemente e incubando a continuación 3 min a temperatura ambiente.

8. Centrifugamos de nuevo 5 min a 13.000 rpm y eliminamos cuidadosamente el sobrenadante para no alterar el pellet.

9. Lavamos el pellet obtenido con 300 μ l de etanol al 70% invirtiendo el tubo 5 veces.

10. Procedimos a centrifugar en dos ocasiones durante 1 min a 13.000 rpm descartando el sobrenadante completamente.

11. Se resuspendió el ADN obtenido con 100 μ l de agua ultrapura.

3.2.3 Extracción de ADN a partir de ejemplares de museo.

La extracción de ADN de los especímenes de museo (piel, músculo y vísceras) se llevó a cabo siguiendo el método descrito en Anderson *et al.* (1999). La extracción fue realizada en el Departamento de Medicina Legal y Forense de la Facultad de Medicina (Universidad de Granada), con la ayuda del grupo del Dr. José Antonio Lorente.

El protocolo seguido fue el que se detalla a continuación:

Previa a la extracción, se realizó una limpieza de las muestras mediante un minitaladro (Dremel®), eliminando la parte externa de las muestras que ha estado en contacto con el etanol o el medio ambiente.

Posteriormente, se pulverizaron las muestras mediante el pulverizador Frezeer Mill, utilizando nitrógeno líquido. Antes y después de utilizar el pulverizador, todos los accesorios que entran en contacto con la muestra son limpiados con una solución de lejía al 10% y expuestos a la luz ultravioleta durante un mínimo de 15 min. La pulverización se llevó a cabo en varias etapas.

Una primera etapa consiste en preenfriar las muestras durante 5 min. A continuación se programan un total de 3 ciclos consistentes en 3 min de molido y 2 min de enfriamiento, eligiendo la frecuencia de impacto al máximo.

1. En un tubo de microcentrífuga se mezclaron 0.25 g de material pulverizado con 750 μ l de tampón de extracción compuesto por: 10 mM Tris; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA y 2% SDS, a pH=8.

2. Añadimos 10 mg/ml de proteinasa K y mezclamos bien.

3. Procedemos a incubar 24 horas en un baño a 56°C sin agitación.

4. Centrifugamos a 13.000 rpm durante 3 minutos y recogemos el sobrenadante.

5. Realizamos varias extracciones con 1 volumen de fenol :cloroformo: isoamílico (25: 24: 1) y centrifugamos a 13.000 rpm durante 3 minutos.

6. Pasamos la muestra a través de un filtro Microcon Ym-100 (Millipore), hidratando previamente el filtro con 100 μ l de agua ultrapura.

7. Centrifugamos 20 minutos a 2.500 rpm. Este paso se realiza las veces necesarias hasta que toda la muestra pase por el filtro.

8. Ponemos en el filtro 200 μ l de agua ultrapura y centrifugamos 20 minutos a 2.500 rpm.

9. Pasamos el filtro a un tubo limpio y resuspendemos el ADN con 100 μ l de agua ultrapura centrifugando 5 minutos a 3.500 rpm.

La cantidad y calidad del ADN genómico obtenido mediante las técnicas anteriores se determinó a través de electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8% con el uso de marcadores de peso molecular conocido (ADN del fago

Lambda digerido con *Hind*III) y mediante espectrofotometría (BECKMAN, DU® Series 60 Spectrophotometer).

3.3 IDENTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LOS ADN_s SATÉLITES *Hind*III y *Pst*I.

3.3.1 Identificación y aislamiento de los ADN_s satélites *Hind*III y *Pst*I.

El aislamiento y la identificación de estas familias de ADN satélite se llevaron a cabo siguiendo dos procedimientos alternativos.

A. Obtención de las unidades monoméricas de las familias de ADN satélite *Hind*III y *Pst*I mediante clonación convencional.

Este procedimiento se empleó en la identificación de estos ADN satélites en el genoma de la especie *A. naccarii* y se llevó a cabo mediante el análisis de las bandas resultantes tras digerir el ADN total de cada especie con diferentes enzimas de restricción (*Hind*III, *Pst*I, *Hind*II, *Hinf*I, *Ssp*I, *Nde*II, *Xba*I, *Eco*RI, *Bcl*II, *Rsa*I, *Sac*I y *Alu*I), separación de las bandas generadas en un gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

Las digestiones se realizaron con 5 unidades de enzima por 1 µg de ADN empleado y en el tampón recomendado por el fabricante (Boehringer-Mannheim) durante 8-16 horas. Los fragmentos de restricción obtenidos tras la digestión se separaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1% en tampón TBE 0.5X (1X TBE: Tris 90 mM, ácido bórico 90mM, EDTA 1mM) conteniendo 0.5 µgr/ml de bromuro de etidio.

Cuando en una unidad típica del ADN satélite está presente la diana de restricción para un enzima, la digestión correspondiente convertirá un tándem repetitivo en un conjunto de fragmentos de ADN de longitud igual a la de la

unidad repetitiva (monómero). Cuando el ADN digerido es sometido a electroforesis en gel, y tras tinción con bromuro de etidio, se observa una banda intensa sobre el rastro generado por el ADN genómico total digerido, compuesta por fragmentos que son los cientos de miles de copias de la unidad repetitiva. Esto es lo que ocurre en *A. naccarii* cuando se digiere su ADN genómico con los enzimas *HindIII* y *PstI*.

Para clonar las unidades monoméricas del ADN satélite contenidas en esas bandas intensas de un gel, 10 µg de ADN se digirieron con los enzimas *HindIII* y *PstI* en las condiciones descritas anteriormente. Los fragmentos de restricción resultantes se separaron en un gel de agarosa NuSieve GTG (FMC) de bajo punto de fusión al 3% en tampón TAE 1X (Tris 4 mM, ácido acético 4 mM, EDTA 1mM) conteniendo 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Tras observar el ADN en un transiluminador de luz ultravioleta, la banda de aproximadamente 180 pares de bases generada por el enzima *HindIII* y la banda de unos 230 pares de bases generada por el enzima *PstI*, se escindieron del gel con la ayuda de un bisturí y se colocaron, cada una de ellas, en un tubo de microcentrífuga.

La purificación de dichas bandas se realizó utilizando el kit de purificación "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" siguiendo el protocolo que recomienda el fabricante (Amersham Biosciences). Este kit se basa en el uso de un agente caotrópico que desnaturaliza las proteínas, disuelve la agarosa y promueve la unión de la doble hebra de ADN a una matriz de fibra de vidrio. Posteriormente las proteínas y sales contaminantes se lavan y el ADN purificado se diluye en agua ultrapura.

B. Obtención de las diferentes unidades monoméricas de la familia de ADN satélite *HindIII* y *PstI* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para el análisis de la familia de ADN satélite *HindIII* en las distintas especies de esturión, las unidades monoméricas fueron amplificadas usando los

cebadores, STUR-1 y STUR-2. Estos cebadores fueron diseñados por De la Herrán *et al.* (2001a) a partir del análisis de las unidades monoméricas de este ADN satélite *HindIII* en varias especies de esturiones. En esta tesis, los cebadores STUR-1 y STUR-2 se han utilizado para ampliar el estudio de este ADN satélite *HindIII* en un mayor número de especies como son: *A. stellatus*, *A. sinensis*, *A. brevirostrum*, *A. fulvoescens* y *Scaphirhynchus albus*, así como en los ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana. La secuencia de estos primers son:

STUR-1: 5'-CGAACCTGTAAGCTT-3'

STUR-2: 5'-TGATCTTCAGAACTACC-3'

La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 50µl que contenían 100 ng de ADN molde, 10 mM Tris-ClH, pH=8.3; 5 mM NH₄C; 50 mM KCl; 0.2 mM de cada dNTPs; 0.2 µM de cada primers y 1.25 unidades de Taq ADN polimerasa. La reacción de amplificación se llevó a cabo durante 40 ciclos, y los parámetros de cada ciclo fueron: 2 minutos a 94°C, 2 minutos a 55°C y 2 minutos a 72°C.

Los resultados fueron observados en geles de agarosa. Para ello, los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis donde se podían observar amplificados de monómeros, dímeros, trímeros, etc, correspondientes al ADN satélite *HindIII*.

Para aislar las unidades de repetición del ADN satélite *PstI* en el genoma del resto de las especies de esturiones analizadas, así como en los ejemplares de esturión conservados en la Estación Biológica de Doñana, se utilizaron los oligonucleótidos *PstI*-1 y *PstI*-2 como cebadores para llevar a cabo la amplificación mediante la reacción catalizada por la Taq polimerasa. Los cebadores se diseñaron a partir de las regiones conservadas de las secuencias

monoméricas del satélite *PstI* previamente obtenidos en *A. naccarii* por clonación convencional. Las secuencias de los cebadores utilizados son:

PstI-1: 5'-GGCACACCTGGGAGATATGC-3'

PstI-2: 5'-TTGATTGGCTGTGAATGGTG-3'

La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 50µl que contenían 100 ng de ADN molde, 10 mM Tris-ClH, pH=8.3; 5 mM NH₄C; 50 mM KCl; 0.2 mM de cada dNTPs; 0.2 µM de cada primers y 1.25 unidades de Taq ADN polimerasa. Se llevó a cabo durante 40 ciclos, siendo los parámetros de amplificación los siguientes: 2 minutos a 94°C, 2 minutos a 50°C y 2 minutos a 72°C.

Los resultados de la amplificación fueron observados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. En estos geles se pueden observar las diversas bandas correspondientes a las unidades monoméricas, diméricas, triméricas, etc del ADN satélite *PstI*. Estos fragmentos fueron posteriormente escindidos del gel y purificados de la agarosa para su posterior clonación en un vector.

3.3.2 Clonación de las Familias de ADN satélite *HindIII* y *PstI*.

La clonación de los ADN satélites *HindIII* y *PstI* se realizó de dos formas diferentes según el método de aislamiento seguido.

A. Clonación del ADN satélite aislado mediante enzimas de restricción.

La clonación de los fragmentos de restricción correspondientes al ADN repetido y escindidos del gel de agarosa, se llevó a cabo utilizando el vector pUC19 y como células huésped la cepa DH5α de *Escherichia coli*. El proceso fue el siguiente:

1.- El plásmido pUC19 fue digerido con *Hind*III y *Pst*I, es decir, con la misma enzima que generó los fragmentos de restricción a clonar, se purificó mediante extracción con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y fue precipitado, a continuación, con etanol.

2.- La ligación de los fragmentos monoméricos al vector pUC19, se realizó en una proporción vector:inserto de 1:4 con 1 unidad de ADN ligasa del fago T4 (Roche) por cada 10 µl de volumen final, en el tampón de ligación recomendado por el fabricante.

3.- La mezcla de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli*, cepa DH5α (GibcoBRL). 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), IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactósido) y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactósido), (Sambrook y Rusell, 2001)

Tras seleccionar las colonias recombinantes mediante coloración colorimétrica, se inocularon en 15 ml de medio LB líquido con ampicilina y se dejaron crecer toda la noche a 37°C con agitación. La extracción y purificación de los plásmidos se realizó utilizando el kit comercial "Quantum Prep® Plasmid Miniprep" (Bio-Rad), según el protocolo descrito por la casa comercial.

La detección de las bacterias recombinantes conteniendo el ADN repetido se realizó mediante hibridación en dot-blot, siguiendo estos pasos:

1. Se seleccionaron las colonias recombinantes y se cultivaron en medio LB líquido durante una noche. El ADN plasmídico de cada uno de los clones se aisló a partir de 2 ml de cultivo siguiendo el método de lisis alcalina propuesto por Sambrook y Rusell (2001).

2. El dot-blot se realizó sobre una membrana de nylon Hybond N⁺ siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante (Amersham

Biosciences). El ADN se desnaturalizó en agua hirviendo durante 10 min, se enfrió en hielo durante 5 min y se diluyó con un volumen de 20XSSC (NaCl 3M, citrato sódico 0.3 M). Una muestra de aproximadamente 50 ng de cada plásmido fue aplicada manualmente a la membrana y se dejó secar a temperatura ambiente. El ADN se fijó a la membrana con NaOH 0.2 M durante 2 min, se lavó a continuación con 6XSSC durante 1 min y se dejó secar a temperatura ambiente.

3. La detección de los clones recombinantes con las secuencias de ADN satélite se realizó hibridando los plásmidos inmovilizados mediante dot-blot con el ADN marcado extraído a partir de la misma banda del gel que se utilizó para clonar. El marcaje y la hibridación se llevaron a cabo utilizando el Kit "ECL™ Gene Detection System" (Amersham Biosciences) en las condiciones que se indican en el apartado 3.4.3.

B. Clonación del ADN satélite obtenido mediante PCR.

En este caso, las bandas obtenidas por PCR y purificadas a partir de geles de agarosa se ligaron al vector pGEM utilizando el Kit "pGEM®-T Easy Vector System II" (Promega), siguiendo las recomendaciones del fabricante. La mezcla de ligación se utilizó para transformar bacterias ultracompetentes de la cepa JM 109 de *Escherichia coli* (cepa recomendada para el vector pGEM), siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial Promega.

Las bacterias transformadas se sembraron en medio LB sólido con ampicilina que contenía X-gal e IPTG, y se incubaron a 37°C toda la noche. Tras seleccionar las colonias recombinantes, éstas se inocularon en 15 ml de medio LB líquido con ampicilina y se dejaron crecer toda la noche a 37°C con agitación.

La detección de los clones recombinantes se realizó mediante digestión de los plásmidos purificados. De esta forma se digirió 1 µg de plásmido con la enzima *EcoRI*, para la liberación del inserto, durante 2 horas a 37°C. El resultado

se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y teñido con bromuro de etidio.

3.4 ANÁLISIS DE LAS FAMILIAS DE ADN SATÉLITE *Hind*III Y *Pst*I MEDIANTE HIBRIDACIONES TIPO SOUTHERN-BLOT Y DOT-BLOT.

Para estudiar la organización y distribución de las secuencias del ADN satélite *Hind*III y *Pst*I en las diferentes especies analizadas, su ADN genómico total fue digerido con diferentes enzimas de restricción. Los fragmentos generados fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa y posteriormente transferidos a una membrana de nylon mediante la técnica de Southern-blot.

Esta membrana conteniendo el ADN genómico digerido se hibridó utilizando como sondas la unidad monomérica del ADN satélite *Hind*III de la especie *A. naccarii* en un caso y la unidad monomérica del ADN satélite *Pst*I también de la especie *A. naccarii* en el otro. El protocolo seguido en ambas ocasiones fue el siguiente:

3.4.1 Restricción del ADN genómico, electroforesis y transferencia a membrana.

Para el análisis de ADN genómico mediante Southern-blot, 5µg de ADN total fueron digeridos con las enzimas de restricción mencionadas anteriormente en las condiciones recomendadas por el fabricante.

Los fragmentos de restricción resultantes se separaron mediante electroforesis en gel horizontal de agarosa al 1% en 0.5 X TBE conteniendo 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. La electroforesis se realizó en un gel de 20 cm de

longitud a 1.5 voltios por cm durante 12-16 horas. El ADN digerido se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta, y el gel se fotografió usando una cámara digital DC265 Zoom Digital Camera (Kodak).

Tras la electroforesis, los fragmentos de restricción se transfirieron a una membrana de nylon Hybond N+ siguiendo el protocolo propuesto por Sambrook y Rusell (2001). La fijación del ADN a la membrana se realizó con NaOH 0.2M durante 2 minutos tal y como recomienda el fabricante (Amersham Biosciences) para el uso del kit de marcaje, hibridación y detección no radiactivo ECL. La membrana se lavó con 6 x SSC durante 1 minuto y se dejó secar a temperatura ambiente.

3.4.2 Preparación de los dot-blot.

Para estudiar la presencia/ausencia de estas familias de ADN satélite en el genoma de las distintas especies analizadas en este trabajo, realizamos una hibridación tipo dot-blot.

Para ello, depositamos en una membrana de nylon una alícuota de ADN genómico total de cada una de las especies digerido en cada ocasión con el enzima *HindIII* o *PstI*, de la misma forma que hemos explicado en el apartado 3.3.2.

3.4.3 Obtención de los fragmentos utilizados como sondas.

Los plásmidos recombinantes conteniendo la unidad monomérica *PstI* utilizada como sonda se amplificaron en *E. coli* y se purificaron mediante el kit comercial "Quantum Prep® Plasmid Miniprep" (Bio-Rad), según el protocolo descrito por la casa comercial. Los plásmidos recombinantes derivados del vector pGEM fueron digeridos con el enzima de restricción *EcoRI* para liberar los fragmentos de ADN utilizados como sondas, y se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en tampón 1X TAE. Las bandas

correspondientes al fragmento de interés se escindieron del gel y se purificaron mediante el kit de purificación "GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit" siguiendo el protocolo que recomienda el fabricante (Amersham Biosciences).

Utilizando como sonda cualquiera de las unidades monoméricas del ADN satélite *Pst*I, los patrones de restricción que detecta la sonda por hibridación son los siguientes:

1.- Una digestión parcial o la ausencia de dianas de restricción en algunas de las unidades repetitivas provocará la aparición en el gel de una escalera de bandas intensas cuyos peldaños corresponden a múltiplos (dímeros, trímeros....) de la unidad repetitiva. Este tipo de digestión se denomina de tipo A (Hörz y Zachau, 1977).

2.- Una digestión de tipo B ocurre cuando un satélite no presenta o presenta ocasionalmente en algunas de sus unidades repetitivas, una diana para un enzima determinado (Hörz y Zachau, 1977).

3.- Por último, se puede dar el caso de que el enzima no corte el ADN satélite porque no existan dianas para ese enzima en ninguna unidad monomérica.

3.4.4 Marcaje de sondas e hibridación.

El marcaje de la sonda y la hibridación se llevaron a cabo utilizando el sistema no radiactivo "ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System" (Amersham Biosciences), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. De esta forma, la membrana se prehibridó con el tampón de hibridación proporcionado por el fabricante conteniendo urea 6 M, NaCl 0.5 M y agente bloqueante al 5% durante 1 hora a 42°C con agitación constante. Transcurrido este tiempo, se añadió la sonda previamente desnaturalizada y

marcada con la enzima peroxidasa a una concentración de 10 ng/ml de solución de hibridación. La membrana se incubó durante 12 horas a 42°C y agitación constante.

Tras la hibridación se lavó la membrana de diferente forma según la astringencia requerida en cada caso y siguiendo la fórmula de Meinkoth y Wahl (1984), basada en las relaciones entre 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⁺ y n es la longitud de la cadena de ADN en pares de bases.

La membrana se lavó dos veces durante 10 minutos con 0.2XSSC y 0.4% de SDS a 55°C (condiciones de alta astringencia) o con 1XSSC y 0.4% de SDS a 55°C (condiciones de baja astringencia). Posteriormente, se lavó dos veces con 2XSSC a temperatura ambiente durante 5 minutos cada vez. 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 guardan una identidad superior al 82% con la sonda de hibridación.

Los lavados fueron seguidos de la detección de los sitios de hibridación usando las soluciones de detección del kit ECL que contienen peróxido de hidrógeno y luminol. Las membranas fueron expuestas durante 30 minutos con una película autorradiográfica (Hyperfilm ECL™, Amersham Biosciences).

Después de cada hibridación y para poder reutilizar la membrana, la sonda es eliminada mediante un lavado en SDS al 5% durante 3 horas, seguido de un lavado con 2XSSC durante 5 minutos.

3.5 IDENTIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LA UNIDAD DE REPETICIÓN DE LOS GENES RIBOSÓMICOS 5S.

Para poder amplificar mediante PCR la unidad ribosómica 5S, se diseñaron primers a partir de una unidad de repetición obtenida en la especie *A.sturio* (Tagliavini *et al.* 1999a). Uno de los primers fue diseñado en la unidad funcional del gen, mientras que el otro, se diseñó en el espaciador. Estos primers sirvieron para amplificar las unidades ribosómica 5S en las especies aquí analizadas, así como en los tres ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana.

Las secuencias de los cebadores son:

5S-REV:5'-ACAGCACTTGATATTCCCA-3'.

ETS-FOR:5'-GTCATGAAAGCAGAAATGCA-3'.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 50µl que contenían 10 mM Tris-ClH, pH=8.3; 5 mM NH₄C; 50 mM KCl; 0.2 mM de cada dNTPs; 0.2 µM de cada primers y 1.25 unidades de Taq ADN polimerasa. La reacción de amplificación se llevó a cabo durante 40 ciclos, y los parámetros de temperaturas fueron: 2 minutos a 94°C, 2 minutos a 52°C y 2 minutos a 72°C.

La cantidad de ADN usada en cada amplificación fue de 100 ng y los resultados procedentes de estas PCRs fueron observados en geles de agarosa.

Posteriormente, los fragmentos amplificados correspondientes a las unidades repetición del ADN ribosómico 5S fueron clonados en el vector de clonación pGemT-easy, como se describe en el apartado 3.3.2.

El análisis mediante Southern-blot de las unidades de repetición de los genes ribosómicos 5S se realizó siguiendo el protocolo anteriormente descrito en el apartado 3.4. de Material y Métodos.

3.6 AMPLIFICACIÓN, PURIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE MARCADORES MITOCONDRIALES.

Hemos amplificado un fragmento de 212 pb del gen del citocromo b del ADN mitocondrial en las especies *A. naccarii* y *A. sturio*, así como en los especímenes conservados en la Estación Biológica de Doñana. Los cebadores utilizados para este fin fueron los diseñados por Gasent-Ramírez *et al.*, 2001 (a partir de secuencias publicadas de *A. sturio* y *A. naccarii* en Birstein y DeSalle, 1998). La secuencias de estos oligonucleótidos son:

Cytb-2F: 5'-ACACAAATCYTAACAGGACT-3'

Cytb-3R: 5'-CAGGTTTCTTTTTGGAGGT-3'

De la misma forma, estos autores diseñaron unos cebadores para amplificar un fragmento de 139 pb del gen del ARN ribosómico 12S (a partir de secuencias publicadas de *A. sturio* y *A. naccarii* en Ludwig y Kirschbaum, 1998), cuyas secuencias son:

12S-2R: 5'-ATAGCCGGCTTCAAAGAAT-3'

12S-3F: 5'-CGAGGTGTAGCGAATGAAGT-3'.

En ambos casos las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando los siguientes parámetros para la obtención de estos fragmentos: 30 segundos a 92°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C, durante 40 ciclos.

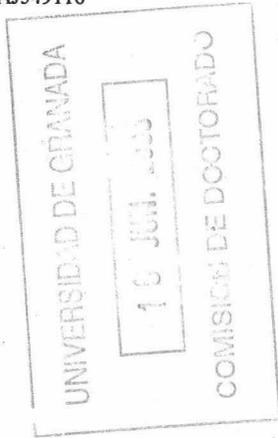
Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa donde se podían observar amplificadores únicos correspondientes a los tamaños de los fragmentos amplificados por los cebadores tanto del citocromo b como del gen 12S

El aislamiento, purificación y posterior clonación de estos fragmentos de PCR se realizaron de la forma descrita en el apartado 3.3.2.

3.7 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS.

Para llevar a cabo la secuenciación de todos los fragmentos de ADN clonados, los plásmidos recombinantes obtenidos se amplificaron en *E. coli* y se purificaron mediante el kit "Quantum Prep® Plasmid Miniprep Kit" (Bio-Rad). Las reacciones de secuenciación se realizaron según el método de Sanger *et al.* (1977), utilizando el kit comercial Dye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer). Las dos cadenas de los plásmidos se secuenciaron utilizando el secuenciador multicapilar ABI 377 (Applied Biosystems) y los primers fluorescentes universal y reverso, según las instrucciones del fabricante.

El análisis comparativo de estas secuencias en relación a otras existentes en las bases de secuencias de la EMBL y del GenBank se realizó usando el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Las secuencias fueron analizadas mediante el uso de diferentes programas informáticos según las necesidades. Así, para el análisis de las frecuencias nucleotídicas, presencia de repeticiones internas y dianas de restricción, fue utilizado el programa GENEPRO v. 6.1 (Riverside Scientific Ent., 1993) y para limpiar las secuencias eliminando las correspondientes al vector plasmídico así como la comprobación de los cromatogramas de cada secuencia se utilizó el programa Chromas v. 1.45 (McCarthy, 1996-1998).

	Satélite HindIII	Satélite PstI	Sec. Espaciadoras	Citocromo b	Gen 12S
<i>A. naccarii</i>	Z499441, AJ286564 a AJ286573	AJ550022 a AJ550026	AJ550032 a AJ550040	AJ549116	AJ549114
<i>A. baerii</i>	AJ286574 a AJ286582	AJ555277 a AJ555282	AJ555348 a AJ555352		
<i>A. gueldenstaedtii</i>	AJ286591 a AJ286602	AJ555293 a AJ555297	AJ555353 a AJ555357		
<i>A. ruthenus</i>	AJ286612 a AJ286615	AJ555312 a AJ555315	AJ555389 a AJ555393		
<i>H. huso</i>	AJ286583 a AJ286590	AJ555298 a AJ555305	AJ555358 a AJ555359		
<i>A. stellatus</i>	AJ555345 a AJ555347	AJ555319 a AJ555321	AJ555382 a AJ555388		
<i>A. brevirostrum</i>	AJ555333 a AJ555335	AJ555283 a AJ555289	AJ555373 a AJ555378		
<i>A. fulvescens</i>	AJ555336, AJ555337	AJ555290 a AJ555292	AJ555379 a AJ555381		
<i>A. transmontanus</i>	AJ286603 a AJ286611	AJ555322 a AJ555326	AJ555360 a AJ555366		
<i>A. sinensis</i>	AJ555342 a AJ555344	AJ555316 a AJ555318	AJ555367 a AJ555372		
<i>A. sturio</i>	-	AJ550027 a AJ550031	AJ550041 a AJ5500		AJ549117
<i>A. oxyrinchus</i>	-	AJ555306 a AJ555311	AJ555397 a AJ555399		
<i>S. albus</i>	AJ555338 a AJ555341	AJ555327 a AJ555330	AJ555394 a AJ555396		
EBD8173	Z50744	AJ543450, AJ543451 AJ543458, AJ543459	AJ543472, AJ543473	AJ543488	AJ543480, AJ543481
EBD8401	AJ543464, AJ543465	AJ543452 a AJ543457	AJ543466 a AJ543471	AJ543485	AJ543482 a AJ543484
EBD8174	AJ543463	AJ543460 a AJ543462	AJ543474 a AJ543478	AJ543486, AJ543487	AJ543479

Listado de Números de Acceso a la base de datos del GenBank para cada una de las secuencias analizadas en esta memoria.

Todas las secuencias analizadas en esta memoria, para cada uno de los marcadores, cuentan con número de acceso a la base de datos del GenBank. Los números de acceso se muestran en el listado adjunto.

3.7.1 Análisis de la variabilidad intraespecífica.

Para llevar a cabo el análisis comparativo de las diferentes secuencias se realizó previamente el alineamiento múltiple de dichas secuencias mediante el programa informático CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997).

Se midió el porcentaje de divergencia (p) entre las secuencias; este parámetro es la relación entre posiciones nucleotídicas que son diferentes entre dos secuencias que se comparan y el total de nucleótidos que componen dichas secuencias,

$$p = n_d / n$$

donde n_d es el número de diferencias nucleotídicas y n el número total de nucleótidos comparados.

La variabilidad global en cada población/taxa se estimó a través del cálculo de dos parámetros diferentes: Polimorfismo y Diversidad Nucleotídica (Nei, 1987). Cuando se comparan todas las secuencias de una población, el polimorfismo es el número de sitios o posiciones nucleotídicas que son variables con respecto al número total de nucleótidos de la secuencia que se estudia.

La diversidad nucleotídica (Nei, 1987) mide el número medio de las diferencias nucleotídicas por sitio entre diferentes secuencias y se calcula como:

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

donde π_{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:

$$n_c = n(n-1)/2$$

donde n es el número de secuencias analizadas

El cálculo del polimorfismo y la diversidad nucleotídica se llevó a cabo utilizando el programa informático DnaSP v. 3.51 (DNA Sequence Polymorphism; Rozas y Rozas, 1999).

3.7.2 Análisis de la divergencia interespecífica.

La divergencia interespecífica es el promedio del número de sustituciones por posición nucleotídica entre las secuencias de dos poblaciones/taxa obtenida en comparaciones dos a dos (Nei, 1987).

Para estudiar el reparto de la varianza molecular (AMOVA) dentro y entre especies hemos usado el programa ARLEQUIN v.2.000 (Schneider *et al.*, 2000).

El fenómeno de conversión génica, se ha propuesto como uno de los mecanismos que provocan la homogenización de secuencias repetidas como el ADN satélite o el ADN ribosómico. Las diferentes zonas originadas por conversión génica se detectaron con el programa GENECONV (Sawyer, 1999).

El análisis de la evolución molecular y filogenética de las secuencias estudiadas fue llevado a cabo usando el programa informático MEGA v.2,1 (Kumar *et al.*, 2001). La divergencia entre secuencias fue calculada siguiendo el modelo de cálculo de distancias propuesto por Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969), y los árboles de distancias obtenidos por el método del vecino más próximo (neighbor-joining, Saitou y Nei, 1987). Para comprobar la robustez del test filogenético se utilizó el método de remuestreo con reemplazamiento, Bootstrap (Felsenstein, 1985).

Finalmente, mediante el método propuesto por Strachan *et al.* (1985) hemos realizado el análisis de los estados de transición en el proceso de homogenización intra e interespecífico para cada uno de los marcadores analizados. Estos autores adoptaron un método para analizar los patrones de variación en cada posición nucleotídica, considerada independientemente, entre todos los clones de una familia de ADN repetido en un par de taxones. Este método de clasificación de la variación revela la fijación de algunas variantes (sustituciones) en táxones muy relacionados y también los diferentes estados de transición en la extensión (homogenización) de estas variantes en un taxón.

El patrón transicional de cada posición nucleotídica considerada independientemente se clasifica en 6 estados de transición tal como se muestra en la Figura 8 (revisado recientemente en Pons *et al.*, 2002a). Así, el estado de transición 1 o clase 1 representa una completa homogenización entre todas las secuencias que comparamos para un par de especies. Las clases 2, 3 y 4 representan estados de transición intermedios en los cuales una de las especies muestra un polimorfismo. La frecuencia del nuevo nucleótido varía y es considerada baja en la clase 2, intermedia en la clase 3, mientras que en el estado de transición 4 la mutación ha reemplazado al nucleótido original en la mayoría de las secuencias de la especie. La clase 5 representa un sitio diagnóstico en el que la nueva variante está totalmente homogenizada y fijada en todas las secuencias de una especie, mientras que en la otra especie se

mantiene el nucleótido original. Por último, la clase 6 representa un paso más sobre el estado de transición 5, en la que aparece una nueva mutación en la especie B. Esta nueva mutación podría tener un proceso de extensión al igual que la primera mutación, reemplazando finalmente a los cambios anteriores.

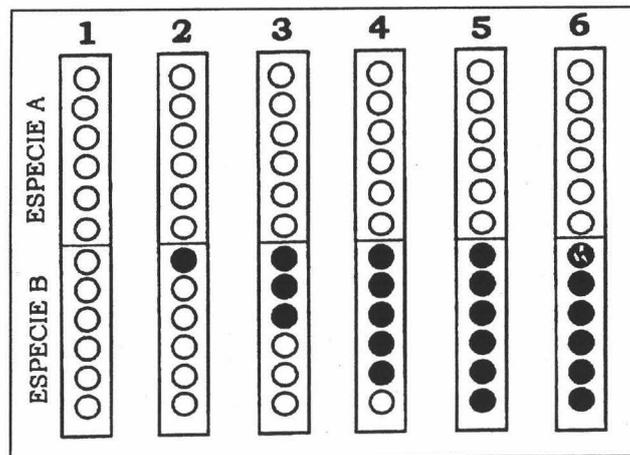
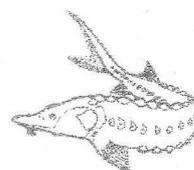


Figura 8: Representación gráfica de los estados de transición (1-6) durante la extensión de las nuevas mutaciones (círculos negros) en una determinada posición nucleotídica a través de los clones (círculos de las columnas) en dos especies (A-B). Modelo propuesto por Strachan *et al.* (1985).

Además de los estados de transición descritos por Strachan *et al.* (1985), a veces se detectan posiciones nucleotídicas que no coincidían con aquéllas y se han denominado estados de transición no-Strachan (Pons *et al.*, 2002a). Estas posiciones se pueden dividir en dos grupos: el primero estaría formado por las posiciones descritas en Strachan, pero que se diferencian por presentar más mutaciones extra distintas en una o muy pocas secuencias, ya sea en las secuencias de una especie o en las secuencias de las dos especies que se comparan, a las que denominamos estados de transición con múltiples mutaciones. El segundo grupo estaría integrado por las posiciones que comparten una misma mutación en una o más secuencias de las dos especies a las que denominamos, finalmente; estados de transición con mutaciones compartidas.



RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL ADN SATÉLITE *Hind*III DE LA FAMILIA ACIPENSERIDAE.

4.1.1 Clonación y caracterización de la familia de ADN satélite *Hind*III.

Este ADN satélite fue previamente aislado en la especie *A. naccarii* (Garrido-Ramos *et al.*, 1997). Está constituido por secuencias monoméricas de 170 pares de bases y una riqueza en AT (adenina/timina) de más del 64%. De la Herrán *et al.* (2001a) pusieron de manifiesto posteriormente que estaba conservado en las especies *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. transmontanus*, *A. ruthenus* y *H. huso*, y Lanfredi *et al.* (2001) observaron su localización a nivel centromérico.

En esta tesis se ha extendido el análisis llevado a cabo por De la Herrán *et al.* (2001a), a un total de 13 especies de esturión. Así, se han analizado las especies *A. naccarii*, *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. transmontanus*, *A. ruthenus*, *H. huso*, *A. sinensis*, *A. fulvescens*, *A. stellatus*, *A. brevirostrum*, *A. sturio*, *A. oxyrinchus* y *Scaphirhynchus albus*. Igualmente se ha analizado su presencia/ausencia en la especie *Polyodon spathula* (Familia Polyodontidae).

Mediante Southern-blot (Figura 9), dot-blot y amplificación por PCR (Figura 10), hemos puesto de manifiesto que está presente en las especies *A. naccarii*, *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. transmontanus*, *A. ruthenus*, *H. huso*, *A. sinensis*, *A. fulvescens*, *A. stellatus*, *A. brevirostrum* y *Scaphirhynchus albus*, y ausente en las especies *A. sturio*, *A. oxyrinchus* y *Polyodon spathula*.

Los amplificados de PCR de las diferentes especies analizadas para este satélite *Hind*III fueron purificados, clonados y secuenciados.

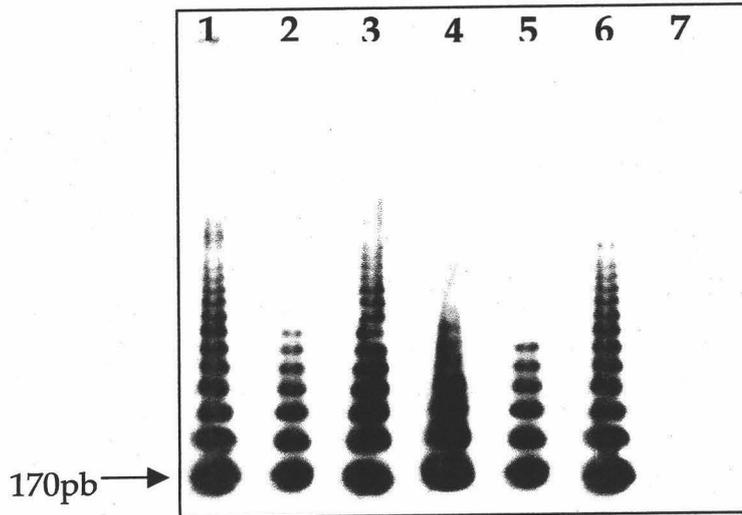


Figura 9: Patrón de hibridación del inserto del plásmido pHAn19 (unidad de repetición de la familia de ADN satélite *Hind*III de *A. naccarii*), sobre una membrana conteniendo el ADN digerido con el enzima de restricción *Hind*III de las especies: *A. baerii* (1); *A. gueldenstaedtii* (2); *A. transmontanus* (3); *A. naccarii* (4); *H. huso* (5); *A. ruthenus* (6) y *A. sturio* (7). La flecha indica la unidad de repetición que corresponde al tamaño del monómero (170 pares de bases).

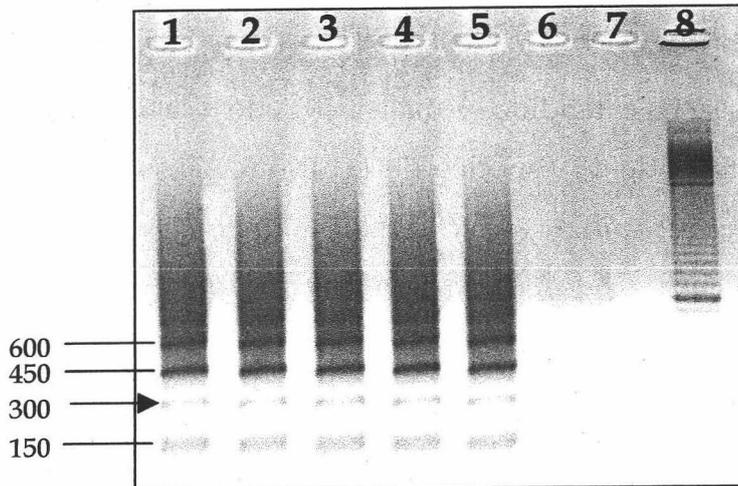


Figura 10: Resultado de la amplificación de la familia de ADN satélite *Hind*III. En la figura se muestra un gel en el que se observan los amplificados de cada especie: *A. sinensis* (1); *A. fulvescens* (2); *A. stellatus* (3); *A. brevirostrum* (4); *S. albus* (5); *A. oxyrinchus* (6) y *P. spathula* (7). El número (8) corresponde al marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Las cifras de la izquierda de la figura indican el tamaño en pares de bases de los fragmentos generados correspondientes a las unidades multiméricas del satélite *Hind*III. La flecha corresponde a la unidad dimérica escindida del gel a partir de la cual hemos realizado las clonaciones de estas especies.

Se han analizado en esta memoria un total de 68 secuencias monoméricas *Hind*III correspondientes al conjunto de especies que presentan esta familia de ADN repetido en sus genomas.

4.1.2 Análisis de la variabilidad intraespecífica.

En el conjunto de unidades monoméricas estudiadas hemos analizado la longitud de las secuencias observando que presentan variaciones, oscilando entre 169 y 172 pares de bases. La diferencia en tamaño se debe a pequeñas inserciones/deleciones en las secuencias de este ADN satélite en algunas de las especies, siendo la deleción más grande de 6 pares de bases, encontrada en la especie *A. sinensis*.

La Tabla 5 muestra el número de secuencias analizadas de cada especie, la longitud de los monómeros, el número de sitios polimórficos y los valores de diversidad nucleotídica (Π).

Como podemos observar, la variabilidad intraespecífica es baja en general, aunque algunas especies muestran valores próximos al 10% de variación intraespecífica (como *A. baerii*, *H. huso* y *A. sinensis*). Los sitios polimórficos se distribuyen aleatoriamente.

4.1.3 Estudio de la divergencia interespecífica.

Una vez alineadas todas las unidades monoméricas *Hind*III en el conjunto de especies (Figura 11), hemos calculado la divergencia a partir de las diferencias medias de las secuencias de cada especie siguiendo el modelo de cálculo de distancias propuesto por Jukes-Cantor. La Tabla 6 recoge los valores de distancias medias para las secuencias *Hind*III.

En muchas comparaciones encontramos que las distancias intraespecíficas son más altas que las distancias interespecíficas. Por ejemplo, las distancias entre las secuencias monoméricas del ADN satélite *Hind*III para la especie *A. baerii* son del 9.4%, mientras que la divergencia entre las secuencias de esta especie con las de las especies *A. naccarii* o *A. fulvescens* son del 4.3% y 4.4% respectivamente. De la misma forma, para la especie *A. transmontanus* encontramos un valor de variabilidad intraespecífica del 7.3%, pero si comparamos las secuencias monoméricas de esta especie con las de la especie *A. fulvescens* observamos que disminuye hasta un 6.9%.

Especies	Nº secuencias	Logitud monómeros	Porcentaje AT	Sitios polimórficos	II
<i>A. naccarii</i>	11	170-171	66.4	20	0.032
<i>A. baerii</i>	9	166-171	66.7	38	0.088
<i>A. gueldenstaedtii</i>	12	169-171	66.8	31	0.049
<i>A. ruthenus</i>	4	171	64.3	19	0.058
<i>H. huso</i>	8	169-172	66	42	0.095
<i>A. stellatus</i>	3	169	64.5	8	0.031
<i>A. sinensis</i>	3	164-170	64	22	0.092
<i>A. transmontanus</i>	9	169-171	65.9	36	0.067
<i>A. fulvescens</i>	2	171	66.7	3	0.017
<i>A. brevirostrum</i>	3	170-171	67.4	15	0.059
<i>S. albus</i>	4	169-170	66.3	19	0.062
<i>A. sturio</i>	-	-	-	-	-
<i>A. oxyrinchus</i>	-	-	-	-	-
<i>P. spathula</i>	-	-	-	-	-

Tabla 5: Características de las unidades monoméricas del ADN satélite *Hind*III presentes en el genoma de 11 especies de esturión.

	NAC	BAE	GUE	HUS	RUT	TRA	SIN	BRE	STE	FUL	SCA
NAC	0.033	0.077	0.043	0.130	0.123	0.075	0.109	0.063	0.108	0.035	0.161
BAE		0.094	0.083	0.120	0.114	0.103	0.137	0.087	0.081	0.074	0.141
GUE			0.053	0.130	0.125	0.079	0.113	0.067	0.110	0.044	0.162
HUS				0.103	0.119	0.135	0.166	0.112	0.103	0.118	0.127
RUT					0.060	0.124	0.156	0.113	0.085	0.113	0.110
TRA						0.073	0.104	0.084	0.114	0.069	0.153
SIN							0.091	0.112	0.150	0.098	0.177
BRE								0.063	0.098	0.048	0.131
STE									0.032	0.101	0.111
FUL										0.018	0.149
SCA											0.065

Tabla 6: Distancias medias intra e interespecíficas siguiendo el modelo propuesto por Jukes and Cantor (1969) para las secuencias *Hind*III.

NAC3	CTTTTCAA	CTTTGGGG	ATTGAAATTA	TGAAAAATA	AAATTGG-CC	AAAATTATTA	60
NAC5T	
NAC18	
NAC25C	
NAC31	
NAC40G	
NAC49	
NAC19	AGC.C	
NAC29	AGC.C	
NAC43	AGC.C	
NAC52	AGC.CT	
BAE3	AG.CA.CT	..GTA--A	
BAE7	AG.CA	..G-A	
BAE12AT	
BAE13	
BAE18ATT	
BAE19	AG.CA	..GTA-	
BAE25	..C	AGAACA.TA	..AT-A	
BAE35	AGC.CTT	
BAE45	AGC.CG	
HUS11	..C	AGAACA.TA	..AC-A	
HUS43	..C	AG.C	
HUS50	AGC.CA.T-	..CG	
HUS52	..C	AG.C.AACT	
HUS10	..C	AG.C.AGC	
HUS18	AGAACA.TA	..A-A	
HUS41	AGC.C-	..CG	
HUS35	AGC.C-	..CGC	
GUE111	
GUE112C	
GUE151	AGC.C	
GUE152	AGC.C	
GUE261AG	
GUE262AT	
GUE311	
GUE312	..C.G	AG.C	..A	
GUE49C	
GUE8	AGC.C	
GUE19C	..C	
GUE44	AGC.CA-	..C	
TRA1	..C	AG.C.A-A	
TRA27	..C.C	TG.C	
TRA31	..C	AG.CA.TT	
TRA7	..C	-G TG.C	
TRA9	AGC.C-	..CT.T	
TRA5	..C	AG.C	..T	
TRA12	..CC	AG.CC	
TRA13	..CCC.G	A..CT-AA	
TRA71	..CCC.G	A..CT-AA	
RUT11	..C.A	ACG.CT	
RUT22	..A	AGAACG	
RUT35	..C	AGAAC	..CCG	
RUT40	..C	AGAACA	..AG	
SIN13	..CC	AGA.CGC	
SIN29	..CC	AGA.CGG	
SIN31	..CC.G	AG.C.AA-	
FUL20	AGC.C	
FUL31	AGC.C	
STE45	AG.CA	..G-A	
STE47	AG.CA	..GG-A	
STE48	..C	AG.CA.A	..GTA-	
BRE54	..C	AG.C	..CA-T	
BRE43	AGC.CAA	
BRE55	AGC.CA	
SCA89	..C	AGAACA.TA	..AGT-	
SCA66	..C	AGAACA.TA	..A-A	
SCA56	..C	AGAACA.TA	..AC-A	
SCA49	..C	AGAACA.TA	..AG-A	

Figura 11: Alineamiento de las unidades monoméricas *Hind*III en el conjunto de especies analizadas. Las tres primeras letras de cada clon corresponde con el nombre de la especie a la que pertenece dicha secuencia. (NAC) *A. naccarii*, (BAE) *A. baerii*, (HUS) *H. Huso*, (GUE) *A. gueldenstaedtii*, (TRA) *A. transmontanus*, (RUT) *A. ruthenus*, (SIN) *A. sinensis*, (FUL) *A. fulvescens*, (STE) *A. stellatus* (BRE) *A. breviostrum* y (SCA) *S. albus*. En esta figura, y en el resto en las que aparecen secuencias alineadas, la secuencia nucleotídica se muestra en el primer clon. En el resto de clones, las posiciones coincidentes se señalan con un punto (.). En las posiciones variables, se muestra el nucleótido presente. Las deleciones se indican con un guión (-).

NAC3	TTTTTTT-GA	CAGGACCGGA	CCAGACCACT	TTTTCAAAAA	AGGGGGATGT	CTAAATTTTG	120
NAC5T.T.T.T.C.C.	
NAC18T.T.T.T.C.C.	
NAC25T.T.T.T.C.C.	
NAC31T.T.T.T.G.G.	
NAC40T.T.T.T.G.G.	
NAC49T.T.T.T.G.G.	
NAC19T.T.T.T.G.G.	
NAC29T.T.T.T.G.G.	
NAC43T.T.T.T.G.G.	
NAC52	.G.....T.T.T.T.G.G.	
BAE3-C.-T.....T.....A.G.....-.....G.....	
BAE7-C.-T.....T.....A.G.....-.....G.....	
BAE12	.A.....T.T.T.T.G.G.	
BAE13T.T.T.T.G.G.	
BAE18T.T.T.T.G.G.	
BAE19-C.....T.....T.....A.G.....-.....G.....	
BAE25-C.....T.....T.....A.G.....-.....G.....	
BAE35T.T.T.T.G.G.	
BAE45T.T.T.T.G.G.	
HUS11-C.....T.T.....T.....A.G.....T.-.....AG.....	
HUS43C.....T.....T.....G.....G.....G.....	
HUS50	..A..C.....T.....T.....G.....A.....G.....	
HUS52CA.....T.....T.....G.....TG.....GA.....	
HUS10C.....T.....T.T.....A.G.....T.-.....G.....	
HUS18-C.....T.....TT.....AT.G.....-.....G.....	
HUS41	..A..T.....T.....T.....G.....-.....G.....	
HUS35C.....T.....T.....G.....-.....G.....	
GUE111T.A.....T.....G.....-.....G.....	
GUE112	A.....T.T.....T.....AG.....-.....G.....	
GUE151T.T.....T.....G.....-.....G.....	
GUE152T.T.....T.....G.....-.....G.....	
GUE261T.T.....T.....G.....-.....G.....	
GUE262T.T.....T.....G.....-.....G.....	
GUE311T.A.....T.....G.....-.....G.....	
GUE312T.....T.....T.....G.....-.....C.....	
GUE49T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
GUE8T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
GUE19T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
GUE44T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
TRA1T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
TRA27T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
TRA31T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
TRA7T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
TRA9T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
TRA5T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
TRA12T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
TRA13T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
TRA71T.....T.....T.....T.....TG.....G.....	
RUT11CA.....T.....T.....A.G.....-.....GG.....	
RUT22CA.....T.....C.....A.G.....-.....GG.....	
RUT35CA.....T.....T.....A.G.....-.....GG.....	
RUT40CA.....T.....TA.....A.G.....-.....GG.....	
SIN13T.....T.....AT.....G.....-.....A.....	
SIN29T.....T.....T.....T.....G.....-.....	
SIN31T.....T.....T.....G.....-.....T.....	
FUL20T.....A.....T.....G.....-.....T.....	
FUL31T.....T.....T.....G.....-.....T.....	
STE45-C.....T.....T.....A.G.....-.....G.....	
STE47-C.....T.....T.....A.G.....-.....G.....	
STE48-C.....T.....T.....A.G.....-.....G.....	
BRE54-A.....T.T.A.....T.....G.....T.....-.....	
BRE43T.....T.....T.....G.....-.....N.....	
BRE55T.....T.....T.....G.....-.....N.....	
SCA89-C.....T.....T.....T.....TA.....G.....	
SCA66-C.....T.....T.....T.....T.....G.....	
SCA56-C.....T.....T.T.....A.G.....T.....-.....	
SCA49	C.....-CA.....T.T.....T.T.....A.G.....-.....GG.....	

Figura 11: Alineamiento de las secuencias monoméricas *HindIII*, continuación.

```

NAC3      GTAGTTC TGA AGATCAAAAA ATTGTGTTTT CTTGACAGGA ACGAACCTGT AAG 173
NAC5      .....T.....G.....
NAC18     .....G.....
NAC25     .T.....
NAC31     .....
NAC40     .....G...A.....
NAC49     .....C.....C.....
NAC19     .....
NAC29     .....A.....
NAC43     .....
NAC52     ..G.....
BAE3      .....T.....G.....AT C.....
BAE7      .....T.....AT C.....
BAE12     .....
BAE13     .....G.....
BAE18     .....A.....
BAE19     .....T.....AT C.....
BAE25     .....T.....T.T CT.....C...
BAE35     .....A.T.....
BAE45     .....
HUS11     .....T...G...G...A...TTT CT.....
HUS43     .....CTCT CT.....
HUS50     .....T...T...T.T CTA.....
HUS52     .....T...G...TTG TT.....
HUS10     .....T...A.T.T CTA..-...
HUS18     .....T...T.T CT.....
HUS41     .....T...T...T.T CT.....
HUS35     .....T...T...CC...TTT CT.....
GUE111    .....G.....
GUE112    .....
GUE151    .....A.....
GUE152    .....
GUE261    .....
GUE262    .....T.....
GUE311    .....
GUE312    .....G...A...T.....
GUE49     .....
GUE8      .....
GUE19     .....AT...G...T.....
GUE44     .....G...T...T.T CT.....
TRA1      .....
TRA27     .....G.....
TRA31     .....T...T.....
TRA7      .....C.....
TRA9      .....A.....
TRA5      .....C.....-...
TRA12     .....C.....
TRA13     .....G.....
TRA71     .....G.....
RUT11     .....T...T C.....
RUT22     .....A...T C.A...A...
RUT35     .....T...T C.....
RUT40     .....T...T C.....
SIN13     .....C...C...CA...C...
SIN29     .C.....T.G.....
SIN31     .....A...-G.....
FUL20     .....
FUL31     .....A.A...
STE45     .....AC C.....
STE47     .....T...AT C.....
STE48     .....T...AT C.....
BRE54     .....T...
BRE43     .....T...
BRE55     .....T...
SCA89     .....C...T.T C.....
SCA66     ..T...A...C...A...T.T C.....
SCA56     .....C...T.T C.....
SCA49     .....C...T.T C.....

```

Figura 11: Alineamiento de las secuencias monoméricas *HindIII*, continuación.

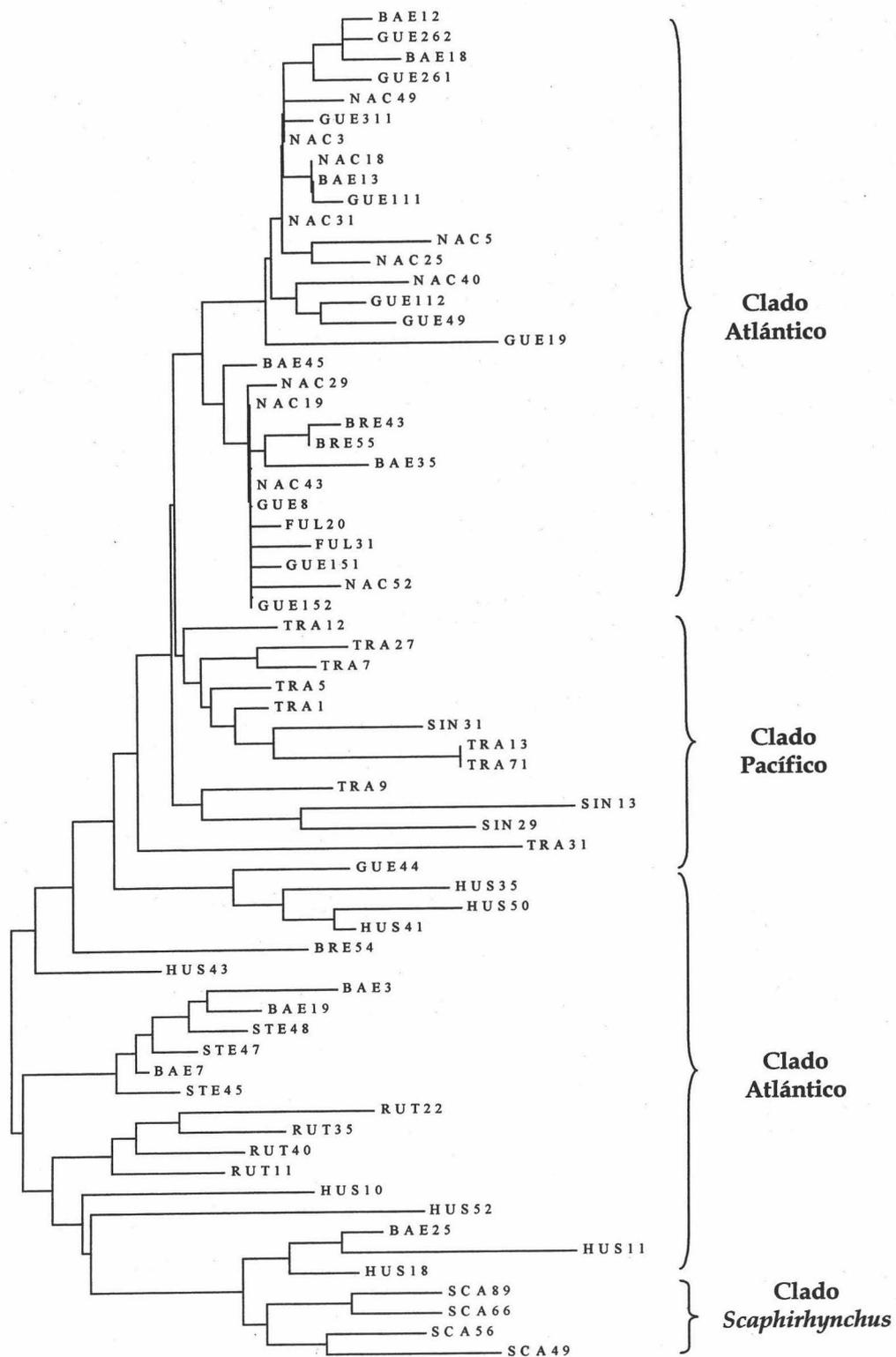


Figura 12 : Árbol filogenético realizado con las 68 unidades monoméricas *Hind*III de todas las especies analizadas utilizando el método del vecino más próximo (Saitou y Nei, 1987). La terminología sigue el patrón mostrado en el alineamiento de la Figura 11.

El árbol de la Figura 12, realizado mediante el método del vecino más próximo a partir de la matriz de distancias de la Tabla 6 muestra que, de acuerdo a lo mencionado anteriormente, las secuencias no se agrupan por afinidad taxonómica, excepto en el caso de *S. albus*. Sin embargo, hay que mencionar que se aprecia una tendencia al agrupamiento de secuencias de *A. transmontanus* y *A. sinensis* (especies del clado Pacífico), diferenciadas del resto de especies pertenecientes al clado del Atlántico. Las especies del clado *A. sturio*-*A. oxyrinchus* no aparecen representadas al no tener secuencias *Hind*III.

La distancia media entre las especies del clado Atlántico es de 0.094, mientras que la distancia entre estas especies y *A. transmontanus* es de 0.098, la distancia con *A. sinensis* es de 0.130, mientras que con *S. albus* es de 0.136.

4.1.4 Análisis de la varianza molecular (AMOVA).

Mediante el análisis de la AMOVA, encontramos que el 63.65% de la variación genética total es debida a la varianza intraespecífica. Este valor aumenta hasta el 66.64% cuando se excluye a la especie *S. albus* del análisis, especie que mostraba sus secuencias claramente diferenciadas del resto de especies. Sólo el 36.35% representa la varianza interespecífica.

Este análisis revela también que el 33.35% de la variación total ocurre entre las especies de la subfamilia Acipenserinae y *S. albus* (subfamilia Scaphirhynchinae); mientras que el 21.44% está distribuido entre las especies dentro de estas dos subfamilias. Los resultados de la AMOVA se recogen en la Tabla 7.

4.1.5 Análisis del proceso de homogenización y divergencia entre especies.

Siguiendo el método de Strachan *et al.* (1985), hemos analizado los patrones de homogenización de las secuencias monoméricas *Hind*III pertenecientes a cada una de las especies estudiadas. La mayoría de las

posiciones nucleotídicas (>95%) pueden ser clasificadas dentro de uno de los 6 estados de transición. Las comparaciones entre las especies *A. naccarii*-*A. gueldenstaedtii* muestran un porcentaje elevado de posiciones en estado 1 y 2.

Por otro lado, muchas de las comparaciones entre las secuencias de las especies de la subfamilia Acipenserinae están en estado 2, algunas en estado 3, pero son pocos los sitios que se encuentran en estados más avanzados de homogenización y fijación (4, 5 ó 6). Sin embargo, las comparaciones con *Scaphirhynchus albus* revelan una mayor proporción de estados 3, 4 y 5.

VARIANZA	PORCENTAJE DE VARIANZA
Intraespecífica	63.65 (66.64)
Interespecífica	36.35 (33.36)
Entre clados	33.35
Entre especies dentro de cada clado	21.44

Tabla 7: Varianza intra e interespecífica de las secuencias *HindIII*. Igualmente se muestran los valores de AMOVA intra e interclados.

	1	2	3	4	5	6	n-St	p-nucl.
NAC-GUE	75.00	21.34	0.00	0.00	0.00	0.00	3.66	164
NAC-BAE	72.56	17.68	4.26	0.00	0.00	0.00	5.50	164
GUE-BAE	70.18	16.14	3.72	0.00	0.00	0.00	9.96	161
GUE-HUS	62.89	23.89	5.03	1.88	0.00	0.00	6.31	159
BAE-HUS	63.97	20.49	0.62	1.24	0.00	0.00	13.68	161
BAE-RUT	72.45	13.77	4.19	0.59	1.19	0.00	7.81	167
RUT-NAC	77.10	12.04	2.40	2.40	3.01	0.60	2.45	166
HUS-NAC	65.43	22.83	5.55	1.85	1.23	0.61	2.50	162
SCA-GUE	68.45	16.66	5.95	2.38	4.76	0.00	1.80	168
SCA-RUT	77.38	13.09	2.97	1.78	2.97	0.00	1.81	168
SCA-BAE	69.69	18.78	4.84	3.03	0.60	0.60	2.46	165

Tabla 8: Porcentajes de los diferentes estados de transición (1-6) para la familia de ADN satélite *HindIII* calculados siguiendo el método de Strachan et al. (1985) entre algunos pares de especies. Las dos últimas columnas corresponden a las posiciones no-Strachan y el total de posiciones nucleotídicas comparadas respectivamente.

4.1.6 Clasificación de los sitios polimórficos.

Sobre el alineamiento múltiple de las secuencias pertenecientes a cada especie (Figura 11), se calculó la proporción de sitios polimórficos compartidos entre 2 ó más especies. Aproximadamente el 11% de los sitios polimórficos podrían ser considerados polimorfismos ancestrales, porque están compartidos por un amplio grupo de especies relacionadas. Otro 11% de sitios polimórficos están compartidos por 2 ó 3 especies estrechamente relacionadas (muchos de estos sitios están compartidos sólo entre un par de especies, las cuales se clasifican como especies hermanas, como por ejemplo *A. naccarii*-*A. gueldenstaedtii*), mientras que el 78% de los sitios polimórficos son autapomorfías (polimorfismos no compartidos) y homoplasias (el polimorfismo lo comparten 2 especies muy alejadas).

4.1.7 Cálculo de la tasa de mutación.

En un intento de conseguir algún valor contrastable para determinar la tasa de mutación de las secuencias *HindIII*, hemos calculado la tasa de variación de las secuencias asumiendo que las distancias genéticas medias entre dos especies podría ser una estima aproximada de la tasa de mutación. Teniendo en cuenta un tiempo de divergencia de 50 millones de años entre los linajes que dieron lugar a *A. brevisrostrum* y a *A. gueldenstaedtii* (Birstein y DeSalle, 1998) y una distancia media entre *A. brevisrostrum* y las especies del linaje de *A. gueldenstaedtii* (*A. gueldenstaedtii*, *A. baerii* y *A. naccarii*), de 0.072, encontramos que la tasa de mutación para las secuencias *HindIII* es de 0.7×10^{-9} .

$$r = 0.072 / 2 \times 50 \times 10^6 = 0.7 \times 10^{-9}$$

4.1.8 Análisis de la conversión génica.

Mediante el uso del programa GENECONV hemos comprobado que en las secuencias *HindIII* existen diversos fragmentos que demuestran que en el proceso de homogenización de este ADN satélite interviene el mecanismo de conversión génica. Así, la Tabla 9 muestra comparaciones entre algunas secuencias estudiadas. Estas comparaciones revelan la existencia de fragmentos de una longitud de hasta 65 pares de bases resultado de evolución por conversión génica.

COMPARACIONES	Sim P	I	F	L	D	T
GUE151;GUE8	0.00000	1	65	65	0	47
NAC29;GUE8	0.00000	1	65	65	0	47
NAC5;HUS43	0.00000	16	65	50	0	55
NAC5;TRA27	0.00000	16	65	50	0	53
NAC3;NAC5	0.00004	11	65	55	0	46

Tabla 9: Ejemplos de algunas de las comparaciones realizadas con el programa GENECONV para poner de manifiesto la actuación del mecanismo de conversión génica. La abreviatura Sim P corresponde a los valores simulados de p (simulated p values) basados en 10.000 permutaciones. Las iniciales I y F corresponden a las posiciones del primer y último nucleótido de la región que resulta de eventos de conversión génica. L=longitud del fragmento que resulta de eventos de conversión génica. D= número de nucleótidos diferentes dentro del fragmento. T= número total de desigualdades entre las dos secuencias.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LA FAMILIA DE ADN SATÉLITE

*Pst*I.

4.2.1 Análisis del ADN satélite *Pst*I de *Acipenser naccarii*.

El ADN genómico total de *A. naccarii* fue digerido con 12 enzimas de restricción (*HindIII*, *Pst*I, *HindII*, *Hinf*I, *Ssp*I, *Nde*II, *Xba*I, *Eco*RI, *Bcl*II, *Rsa*I, *Sac*I y *Alu*I). Los fragmentos generados en la digestión con los distintos enzimas

fueron sometidos a electroforesis en gel agarosa. La tinción con bromuro de etidio puso de manifiesto la existencia de una banda de fragmentos de unos 230 pares de bases de tamaño y múltiplos de ésta, que brillaban intensamente sobre el rastro generado por el ADN genómico digerido con el enzima *Pst*I. Es de suponer que estos fragmentos pertenecen a una misma familia de secuencias repetidas cuya unidad monomérica debe tener una longitud aproximada de 230 pares de bases, y que debe ser una familia de secuencias repetidas en tándem (ADN satélite). Para comprobarlo, la banda de ADN generada por el enzima *Pst*I fue aislada y purificada tras su separación en un gel de agarosa. Los fragmentos que la componían fueron ligados al plásmido vector pUC19 y los plásmidos recombinantes fueron clonados en cepas DH5 α de *E. coli*. Las colonias positivas fueron seleccionadas, crecidas en medio LB y sus plásmidos purificados.

La selección de los clones recombinantes fue realizada de entre aquellos clones que mostraron hibridación positiva en dot-blot con una alícuota marcada de fragmentos aislados a partir de la propia banda de fragmentos de *Pst*I del genoma de *A. naccarii*.

Para comprobar que los fragmentos clonados pertenecían a una familia de ADN satélite, analizamos la organización genómica de este tipo de secuencias mediante la técnica de hibridación tipo Southern, utilizando como sonda insertos marcados de varios de los clones obtenidos.

En la Figura 13 se muestra el resultado de la hibridación del inserto del clon NAC-19 sobre una membrana de nylon conteniendo ADN genómico de *A. naccarii* digerido con diferentes enzimas de restricción. Como cabía esperar de un ADN satélite, la hibridación con la sonda *Pst*I-19 revela un patrón de hibridación en escalera de bandas mono y multiméricas de la unidad repetitiva de unos 230 pares de bases sobre el ADN de *A. naccarii* digerido con los enzimas de restricción *Pst*I, *Nde*II y *Rsa*I. La hibridación de las secuencias

clonadas sobre ADN digerido con el enzima *HinfI* y *BclI* muestra un típico patrón en escalera tipo B de digestión de un ADN satélite. La enzima de restricción *AluI* genera unidades multiméricas de menor tamaño porque presenta dos dianas de corte en la unidad de repetición. La hibridación sobre el ADN digerido con los demás enzimas, revela que no existen dianas para estos enzimas en las unidades monoméricas, ya que dichos enzimas no cortan el ADN satélite de *A. naccarii*.

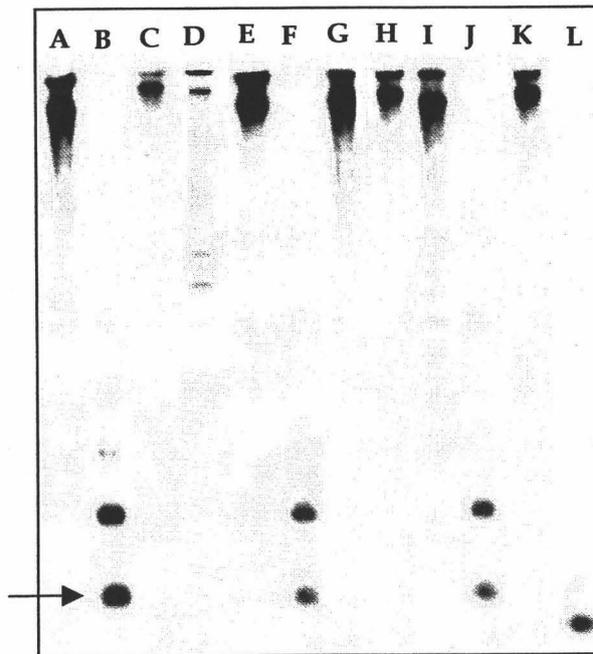


Figura 13 : Patrón de hibridación del ADN satélite *PstI* de *A. naccarii* revelado por hibridación con el clon NAC-19. Las distintas calles se corresponden con la digestión generada por los siguientes enzimas de restricción: (A) *HindIII*, (B) *PstI*, (C) *HindII*, (D) *HinfI*, (E) *SspI*, (F) *NdeII*, (G) *XbaI*, (H) *EcoRI*, (I) *BclI*, (J) *RsaI*, (K) *SacI* y (L) *AluI*. La flecha indica la unidad monomérica de 230 pares de bases de este satélite. La enzima de restricción *AluI* presenta dos dianas de corte en la secuencia monomérica, por lo que las unidades de repetición que genera son de menor tamaño.

Cinco de los clones seleccionados fueron secuenciados (NAC-8, NAC-19, NAC-24, NAC-30 y NAC-90). Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos del GenBank y de la EMBL mediante el uso del programa BLAST. Tras la búsqueda realizada se pudo comprobar que las

secuencias de *A. naccarii* no mostraban homología significativa con otras secuencias.

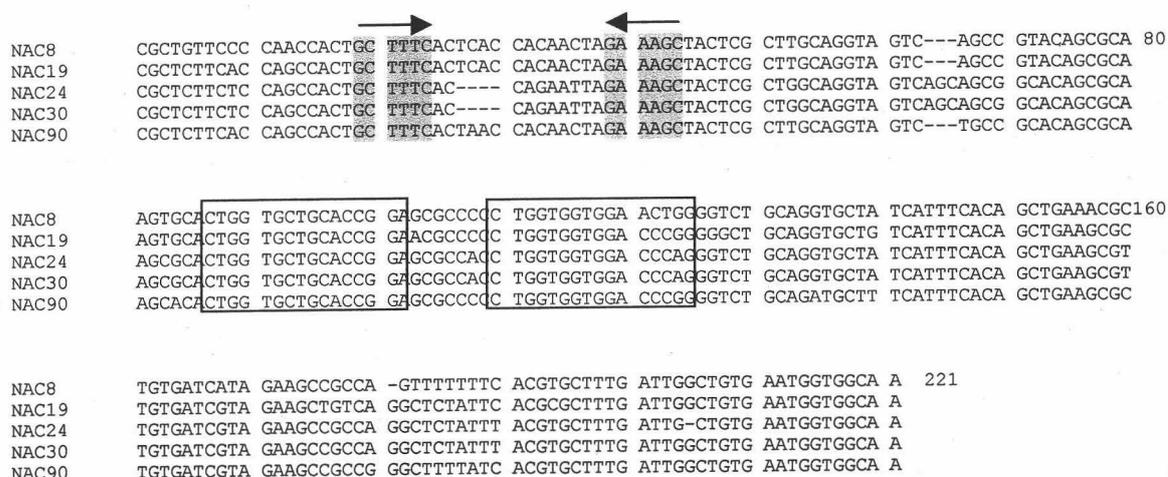


Figura 14: Alineamiento de las cinco unidades monoméricas *PstI* de *A. naccarii*. Las flechas indican las dos repeticiones invertidas, mientras que los rectángulos encuadran las dos repeticiones directas.

En la Figura 14 se muestra el alineamiento múltiple de las secuencias *PstI* de *A. naccarii*. El alineamiento de estas secuencias se ha realizado reordenando los monómeros en función de los cebadores utilizados para amplificar las secuencias *PstI* en el resto de especies, no en función de la diana *PstI*, de esta forma, estandarizamos el alineamiento con el resto de monómeros obtenidos para las demás especies. Las secuencias de los cebadores no se han tenido en cuenta para los análisis posteriores. Así, en la Figura 14 podemos observar que el tamaño de las unidades monoméricas oscila entre 216 y 218 pares de bases. Dichas unidades presentan dos repeticiones directas de 15 pares de bases (CTGGTGG/CTGG/CACCT/C/GG) en las posiciones 87-101 y 110-124 respectivamente, y dos repeticiones invertidas de 6 pares de bases entre las posiciones 19-24 y 39-44 respectivamente. Estas unidades monoméricas no presentan un porcentaje en adenina/timina muy alto, oscilando entre 42.7-45.6%.

Mediante la técnica de hibridación tipo dot-blot hemos estudiado la presencia/ausencia de esta familia de ADN satélite en el genoma de las diferentes especies analizadas en esta memoria. El revelado mostró hibridación positiva en todas las especies de esturión analizadas: *A. baerii*, *A. sturio*, *A. gueldenstaedtii*, *A. transmontanus*, *A. ruthenus*, *H. huso*, *A. sinensis*, *A. fulvescens*, *A. stellatus*, *A. oxyrinchus*, *A. brevirostrum* y *Scaphirhynchus albus* y en ningún caso (realizando los lavados de la membrana tanto a alta como a baja astringencia) obtuvimos hibridación positiva en la especie *Polyodon spathula*.

Para caracterizar esta familia de ADN satélite *Pst*I en las diferentes especies hemos usado la técnica de amplificación mediante PCR, diseñando unos cebadores a partir de la región más conservada de las secuencias de *A. naccarii*.

Tras la PCR, el amplificado se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1%, y el gel se tiñó con bromuro de etidio para visualizar las bandas. Se observa un amplificado en forma de escalera con tamaños próximos a 150, 300 y 450 pares de bases que podrían corresponder a los monómeros, dímeros, trímeros, de la familia *Pst*I en las especies *A. baerii*, *A. sturio*, *A. gueldenstaedtii*, *A. transmontanus*, *A. ruthenus*, *H. huso*, *A. sinensis*, *A. fulvescens*, *A. stellatus*, *A. oxyrinchus*, *A. brevirostrum* y *Scaphirhynchus albus*. No pudimos poner de manifiesto la presencia de esta familia de ADN satélite en el genoma de *Polyodon spathula* ni mediante hibridación tipo dot-blot ni mediante amplificación por PCR.

A continuación se procedió a escindir del gel y purificar el amplificado correspondiente a 300 pares de bases. Se eligió el amplificado de un posible dímero para asegurarnos la presencia de al menos un monómero completo. Se ligó el producto purificado al vector de clonación "pGEM T easy" y se transformaron células competentes de *E. coli* (cepa JM109). Los clones

recombinantes elegidos fueron purificados y secuenciados. Este procedimiento se realizó para cada una de las 12 especies mencionadas.

4.2.2 Análisis de la variabilidad intraespecífica.

Obtuvimos un total de 64 unidades monoméricas de la familia de ADN satélite *PstI* en las 13 especies de esturión analizadas.

Analizamos cada una de las secuencias, comprobando que la longitud de los monómeros era muy variable, oscilando entre 179 y 182 pares de bases los monómeros más cortos y hasta 218 y 219 pares de bases los más largos. Esta variación de tamaño de las unidades monoméricas está presente en la mayoría de las especies, por lo que podemos encontrar en cada una de ellas representantes con máxima y mínima longitud. Estas diferencias en tamaños se deben a grandes deleciones/inserciones de 26 pares de bases encontradas entre las posiciones 111 y 136, ambas inclusive, en las especies *A. sturio* y *A. oxyrinchus* y de 17 pares de bases entre las posiciones 165 y 181, ambas inclusive, en la mayoría de especies (Figura 15).

Estas secuencias presentan un contenido en AT (adenina/timina) también muy variable y en todos los casos menor del 50%.

Como se puede observar en la Tabla 10, la variabilidad de las unidades monoméricas de la familia de ADN satélite *PstI* oscila entre 2.9% en *A. ruthenus* y 29.5% en *A. oxyrinchus*, aunque la mayoría de las especies tienen una variación intraespecífica media de menos del 10%. Los sitios polimórficos se distribuyen al azar, la mayoría de ellos debido a sustituciones.

4.2.3 Estudio de la divergencia interespecífica.

Una vez alineadas todas las unidades monoméricas *PstI* en el conjunto de especies analizadas, calculamos la divergencia a partir de las diferencias

medias de las secuencias de cada especie siguiendo el modelo de cálculo de distancias propuesto por Jukes-Cantor.

De la misma forma que ocurría en el análisis de la familia de ADN satélite *HindIII*, en la Tabla 11 podemos observar que las distancias intraespecíficas son muchas veces mayores que las distancias interespecíficas. Por ejemplo, la distancia entre las secuencias monoméricas del ADN satélite *PstI* para la especie *A. gueldenstaedtii* es del 7%, mientras que la divergencia entre las secuencias de esta especie con las de las especies *A. ruthenus* y *H. huso* es del 5.8% y 6% respectivamente. Lo mismo encontramos en la especie *A. baerii* cuando comparamos los valores de divergencia con las especies *A. gueldenstaedtii*, *A. ruthenus* o *H. huso*.

Especies	Nº secuencias	Logitud monómeros	Porcentaje AT	Sitios polimórficos	II
<i>A. naccarii</i>	5	216-218	44.5	31	0.073
<i>A. baerii</i>	6	179-217	44.9	33	0.067
<i>A. gueldenstaedtii</i>	5	200-218	44.0	30	0.067
<i>A. ruthenus</i>	4	193-201	43.8	11	0.029
<i>H. huso</i>	8	197-218	43.3	28	0.044
<i>A. stellatus</i>	3	200-219	45.5	28	0.095
<i>A. sinensis</i>	3	217-219	46.3	47	0.054
<i>A. transmontanus</i>	5	182-219	46.1	44	0.101
<i>A. fulvescens</i>	3	218	47.2	38	0.117
<i>A. brevirostrum</i>	7	183-218	45.1	41	0.089
<i>S. albus</i>	4	184-196	46.7	34	0.102
<i>A. sturio</i>	5	182-219	49.2	39	0.087
<i>A. oxyrinchus</i>	6	182-219	45.9	100	0.295
<i>P. spathula</i>	-	-	-	-	-

Tabla 10: Resumen de las características de las unidades monoméricas de la familia de ADN satélite *PstI* en las diferentes especies analizadas.

	NAC	BAE	GUE	HUS	RUT	TRA	SIN	BRE	STE	FUL	STU	OXY	SCA
NAC	0.078	0.114	0.102	0.14	0.100	0.136	0.195	0.114	0.118	0.141	0.242	0.327	0.252
BAE		0.073	0.072	0.061	0.056	0.190	0.251	0.116	0.088	0.161	0.264	0.378	0.253
GUE			0.070	0.060	0.058	0.178	0.234	0.112	0.088	0.153	0.261	0.361	0.248
HUS				0.045	0.046	0.181	0.235	0.107	0.079	0.150	0.252	0.365	0.231
RUT					0.037	0.181	0.245	0.107	0.076	0.154	0.250	0.354	0.245
TRA						0.115	0.219	0.174	0.190	0.210	0.270	0.357	0.278
SIN							0.211	0.234	0.252	0.247	0.320	0.409	0.328
BRE								0.103	0.132	0.148	0.255	0.380	0.267
STE									0.102	0.172	0.257	0.383	0.246
FUL										0.131	0.286	0.389	0.282
STU											0.105	0.391	0.334
OXY												0.403	0.462
SCA													0.117

Tabla 11: Distancias medias intra e interespecíficas siguiendo el modelo propuesto por Jukes and Cantor (1969), para las secuencias *PstI*.

El árbol de secuencias obtenido por el método del vecino más próximo, usando la matriz de distancias obtenida para las secuencias *PstI* (Figura 16), muestra que, como en el caso del satélite *HindIII*, las secuencias *PstI* no están agrupadas por afinidad taxonómica, excepto para el caso de las secuencias de *S. albus*. Sin embargo, se observa una asociación cladística entre las secuencias de *A. sturio* y *A. oxyrinchus* por un lado, entre las secuencias de *A. sinensis* y *A. transmontanus* (especies del Pacífico) por otro lado, y entre las secuencias del resto de las especies (clado Atlántico) por otro. Una vez más, al igual que se observaba con el ADN satélite *HindIII*, y en esta ocasión se incluye la agrupación de *A. sturio*-*A. oxyrinchus*, encontramos la asociación en cuatro clados filobiogeográficos existentes en la familia Acipenseridae.

El análisis de cada clado muestra que las distancias medias entre especies del clado Atlántico es de 0.091, mientras que la distancia media entre estas especies y *A. transmontanus* es de 0.176 y con la especie *A. sinensis* es de 0.2. Con *A. sturio* es de 0.25 y con *A. oxyrinchus* es de 0.35 y la distancia media con *S. albus* es de 0.25.

NAC19	CGCTCTTCAC	CAGCCA-CTG	CTTTCACTCA	CC-ACAACATA	GAAAGCTACT	CGC-TTGCAG	60
NAC8	...G...C.	..A...-...-.....-.....	
NAC24T.	---G..T.-G....	
NAC30T.	---G..T.-G....	
NAC90A.-.....	
BAE1G.-.....	
BAE2G.T.	T...-.....	
BAE6G.-.....	
BAE7G.G.G	...-.....	
BAE8G.-A....	
BAE16G.-C-A....	
GUE11-.....	
GUE18G.T--C..C	
GUE54G.-.....	
GUE72G.-.....	
GUE83-.....	
TRA44T.A.	T...-.....	
TRA45	..A...T.T.T.	A.....	...C...-	
TRA47	T...G..TTA	...T-...T.A.	T...-A...	
TRA67	T...G..TTA	...T-...T.A.	T...T...A..	
TRA68	T...G..TTA	...T-...T.A.	T...T...A..	
HUS21AC.	...-.....	
HUS21BG.-T-.....	
HUS31AG.-C....	
HUS31BG.T-.....	
HUS33G.-A....	
HUS43C.G.G.G.	...-.....	
HUS44A	A.....G.-T-.....	
HUS44B	...T.....G.-A....	
RUT40G.-.....	
RUT53G.-.....	
RUT78G.-.....	
RUT79G.	T...-.....	
BRE10	T.....-.....	
BRE14A	..G.....T.-.....	
BRE14B	...T.....T.	A.....	...-A....	
BRE31	.A.....C.-.....	
BRE23A	G.....T.C	A.....	A...-.....	
BRE23B	A.....	...-.....	
BRE47	A.....	...-.....	
STE23G.G.	...-CA..	
STE44A	AC-T.....G.	G..T...CA.	
STE44BG.-.....	
OXY52A	T...C.T.	...-T.CCG.	T...-.....	
OXY52B	..GG..T.	..A...-AC	C TGCT..A.TA	GCGCAA.--	
OXY53A	.T..T.CTCA	A.AAT.-T.	T...G.	G...-.....	
OXY53B	T...C.T.	...-T.CCG.	T...-.....	
OXY75	T...C.T.	...-T.CCG.	T...-.....	
OXY80	..GG..T.	.G...-AC	C TGCT..A.TA	--AA.--	
STU2	T...G..T.	G..T.-T.C	A.....	T...-.....	
STU6	T...G..T.	G..T.-T.C	A.....	T...-.....	
STU5	T...G..T.	G..T.-T.C	A.....	T...-.....	
STU24	T...G..T.	G..T.-T.C	A.....	T...-.....	
STU25	.C.....T.	A.AAATAT.	T.....	T.....	T...-.....	
SIN19	G..A..A.T.T.	A.T...-A..	
SIN33T.	..N...G.	T.....NG.	T...T...-	
SIN44	T.TG.A..T.	...-TG.	T.....G.G.	T...T...-	
FUL33	T.....	T.....-.....	
FUL73AT...T-.....	
FUL73BC.A.A.	...-.....	
SCA11	..T...TTA	..G...-G.	T...-G....	
SCA15	...TG.TTA	..G...-A.G.-G....	
SCA19	..T...TTA	..AG...-G.-G....	
SCA41TTAG.T	...-.....	

Figura 15 : Alineamiento de las unidades monoméricas *PstI* en el conjunto de especies analizadas. Las tres primeras letras de cada clon corresponde con el nombre de la especie a la que pertenece dicha secuencia. (NAC) *A. naccarii*, (BAE) *A. baerii*, (GUE) *A. gueldenstaedtii*, (TRA) *A. transmontanus* (HUS) *H. Huso*, (RUT) *A. ruthenus*, (BRE) *A. brevirostrum* (STE) *A. stellatus*, (OXY) *A. oxyrinchus*, (STU) *A. sturio*, (SIN) *A. sinensis*, (FUL) *A. fulvoscens*, y (SCA) *S. albus*.

NAC19	GTAGTC---A	GCCGTACAGC	-GCAA-GTGC	ACTGGTGCTG	CACC--GGAA	CGCCCC-CTG	120
NAC8G.....	
NAC24AGC.	..G.C.....C.....G.....A.....	
NAC30AGC.	..G.C.....C.....G.....A.....	
NAC90---TC.....CA.....G.....	
BAE1C.....	T.....	A.....G.....T.....-T..	
BAE2T.....G..C.....-T.....G.....T.....	
BAE6C..T.....G.....T.....-T.....G.....T.....	
BAE7C.....	..A.....G.....-GT.....T.....	
BAE8C.....	..A.....G.....-A.....G.....T.....	
BAE16	A..C.....C.....G.....-G.....T.....A.....	
GUE11C.....G..A.....-G.....T.....	
GUE18	C.....C.....G.....-G.....T.....	
GUE54	A.....C.....G.....T.....-G.....T.....	
GUE72G.C.....	..A.....G.....-G.....G.....T.....	
GUE83A..C.....G.....-G.....T.....G.....	
TRA44---T	A.....	..A..C.....-T.....A.....C.....	
TRA45---T	A.A.C.....C.....CG.....-T.....G.....AG.....C.....	
TRA47T.....	..AT..CA.....-G.....A.....C.....	
TRA67T.....	..AT..CA.....-G.....A.....C.....	
TRA68T.....	..AT..CA.....-G.....A.....C.....	
HUS21AC.T.....G.....-G.....T.....	
HUS21BA..C.....G.....-G.....T.....-A.....	
HUS31AC.....T.....G.....A.....-A.....G.....TTA.....	
HUS31BC.....G.....-TG.....T.....	
HUS33C.....G.....-G.....T.....	
HUS43C.....A.....G.....-G.....T.....	
HUS44AG.....G.....-N.....G.....T.....	
HUS44BC.....G.....-G.....T.....	
RUT40C.G.....	T.....G.....-C.....G.....T.....	
RUT53C..N..	T.....A..C.....G.....-G.....T.....	
RUT78T.C..	T.....G.....-G.....T.....	
RUT79G..C.....A.....	GG.....-G.....T.....	
BRE10---T	A.....A.....-A.....G.....T.....	
BRE14AA.....	T.....-G.....T.....	
BRE14B---T	A.....-G.....T.....	
BRE31CA.....-G.....T.....	
BRE23A---T	A.....-A.....G.....T.....	
BRE23B---T	A.....	C..CT.....-G.....T.....T.....	
BRE47---T	A.....	C..CT.....-G.....T.....T.....	
STE23	A..C.....G.....A.....AG.....T.....G.....	
STE44AC.....G.....G.....-T.....T.....G.....	
STE44BC.....	T.....G..C.....-G.....T.....	
OXY52A---T	..C.ACAG	C.G..C.....A.....-A.....CG.....A.....	
OXY52B	-G.C.G---G	TGTAGCACCG	TCGT--CTA	C.C.TGCG..	AG.TG-CAGG	-----	
OXY53A---T	C..C..CAG	CC..CAT	G.....-G.....T.....	
OXY53B	CGGA-----	..C..T.A	T..T--CA	CGGC.C..A	C-TG....	-----	
OXY75	CGGA-----	..C..T.A	T..T--CA	CGGC.C..A	C-TG....	-----	
OXY80	.C.C.G---G	TGTAGCACCG	TCGT--CTA	C.C.TGCG..	AG.TG-CAGG	-----	
STU2---T	C..CG..	T.....CA	G..AGCG--CA..G.	-----	
STU6---T	C..CG..	T.....CA	G..AGCG--CA..G.	-----	
STU5---T	C..CG..	T.....CA	G..AGCG--CA..G.	-----	
STU24---T	C..CG..	T.....CA	G..AGCG--CA..G.	-----	
STU25---T	C..C.T..	-C..CAT	G..C.....G.....	-----	
SIN19	..C.....T	..A.C.....	GC---C.....G..T.....-G.....AA..CA	
SIN33---T	..ACC.....	GC---C.....G.....-G.....T.....	
SIN44---T	..ACC.....	GC---C.....	..A..G.....-G.....A.....	
FUL33	..A.....T	A..T..	T.....AA	..A.....-G.....	
FUL73A	T.....-T.....G.....	
FUL73B	.C.....T	A..C.T..-T.....G.....	
SCA11A..C.....	..T.....C.....-AG.....	
SCA15AC..A.	-TTT.....C.....	..G-A.AGC	GC..A..C.	
SCA19C.....	..T.....C.....	T.G-A.ACC	GC.A..	
SCA41---TC.T..	-A.T.....	..A.....C.	..G-A.AGC	GA.....	

Figura 15: Alineamiento de las unidades monoméricas *PstI*, continuación.

NAC19	GTGGTGGACC	CGGGG-GCTG	CA-GGTGCTG	TCATTTTACA	GCTGAAGCGC	TGTGATCGTA	180
NAC8A.	T....-T...	..-.....AAA...A..	
NAC24A.	A...-T...	..-.....AATT	
NAC30A.	A...-T...	..-.....AATT	
NAC90A.	-T...	..-A...TATT	
BAE1A.	-T...	..-.....AAG.T.G.T.	
BAE2A.	A...-T...	..-.....AAG.T.G.T.	
BAE6A.	A...-T...	..-.....AAG.T.G.T.	
BAE7A.	-T...	..-.....AAG.T.G.T.	
BAE8A.	-T...C	..-.....AAG.T.G.T.	
BAE16A.	-T...	..-.....AAG.T.G.T.	
GUE11	...C.....	T....-T...	..-T...AAAA..A	
GUE18A.	A...-T...	..-.....CGTT	
GUE54A.	T-T...	..-T...AGTT	
GUE72T	-T...	..-.....AGTT	
GUE83A.	-T...	..-.....AGTT	
TRA44A.	-T...	..-.....AGTT	
TRA45	A.....	-T...	..-.....AGTT	
TRA47	...GC...	T....-T...	..-.....AGTT	
TRA67	...GC...	T....-T...	..-.....AGTT	
TRA68	...GC...	T....-T...	..-.....AGTT	
HUS21AA.	-T...	..-.....AGTT	
HUS21BA.	-T...	..-.....AGTT	
HUS31AA.	-T...	..-.....AGTT	
HUS31BT	-T...A	..-.....AGTT	
HUS33T	-T...	..-.....AGTT	
HUS43A.	-T...	..-.....AGTT	
HUS44AT	-T...A	..-.....AGTT	
HUS44BA.	-T...	..-.....AGTT	
RUT40A.	-T...	..-.....AGTT	
RUT53A.	-T...	..-.....AGTT	
RUT78A.	-T...	..-T...AGTT	
RUT79A.	-T...	..-T...AGTT	
BRE10	...T.....	A...-T...	..-A...AATT	
BRE14AA.	-T...	..-A...AATT	
BRE14BA.	-T...	..-.....AATT	
BRE31A.	-T...	..-.....AATT	
BRE23AA.	-T...-CGCTGT	GA.C...AGT	
BRE23B	...G.....	-T...	..-.....AAGT	
BRE47	...G.....	-T...	..-.....AAGT	
STE23A.	-T...	..-.....AGTT	
STE44AA.	-T...T	..-.....AGTT	
STE44BA.	-T...T	..-.....AGTT	
OXY52A	-----C	A...-T...	..-.....AGTT	
OXY52B	-----C	A...-T...	..-.....AGTT	
OXY53A	...GC.T...	A...-T...	..-.....AGTT	
OXY53B	-----C	A...-T...	..-.....AGTT	
OXY75	-----C	A...-T...	..-.....AGTT	
OXY80	-----C	A...-T...	..-.....AGTT	
STU2	-----C	A...-T...	..-.....AGTT	
STU6	-----C	A...-T...	..-.....AGTT	
STU5	-----C	A...-T...	..-.....AGTT	
STU24	-----C	A...-T...	..-.....AGTT	
STU25	...GC.T...	TTA...-T...	..-.....AGTT	
SIN19T	A...-T...	..-.....AGTT	
SIN33	T....A...	T...-T...	..-A...ATTC	
SIN44A.	T.T.G...	..-.....AGTT	
FUL33T	T.GT...	..-.....TGTT	
FUL73AA.	T...-GT...	..-.....AGTT	
FUL73BT	T...-GT...	..-T...AGTT	
SCA11	---CGCC..A	T...-T...C	..-.....AGTT	
SCA15	.C..GCC..A	T...-T...	..-.....AGTT	
SCA19	...GCC...A	T...-T...	..-.....AGTT	
SCA41	---C.GCC..A	T...-T...A	..-.....AGTT	

Figura 15: Alineamiento de las unidades monoméricas *PstI*, continuación.

NAC19	GAAGCTGTC-	AGGCTCTATT	CACGCGCTTT	GATTGGC-TG	TGAATGGTGG	CAA 233
NAC8C.C.-	..T.T.T..	...T.....-..
NAC24C.C.-	T..T.....-..
NAC30C.C.-	T..T.....-..
NAC90C.C.-	G...T.TA.	...T.....-..
BAE1	------..
BAE2	-T.....AT.....-..C	...
BAE6	-----	T..T.....	.A.....	...A.....	...
BAE7	------..
BAE8	------..
BAE16	...T.....	...G.C...	...A.....-..
GUE11	...A.....-..
GUE18	...A.....	TC.CT.....-..
GUE54	------..
GUE72	-----C.C.....-..
GUE83	-----	.A.....	...T.....-..
TRA44	...C.C.-T...	...T.....-..
TRA45	...C...-T.-.....-..	T.....	G..
TRA47	...A.C.-T...	...T.....-..
TRA67	...A.C.-T...	...T.....-..
TRA68	...A.C.-T...	...T.....-..
HUS21A	------..
HUS21B	------..
HUS31A	-----	A.....-..	...C.....	...
HUS31B	------..
HUS33	-----C.C.....-..
HUS43	--N.....-..
HUS44A	------..
HUS44B	------..
RUT40	-----	...AG...-..
RUT53	-----	.T.....	A..T.....-..
RUT78	------..
RUT79	-----A.....-..
BRE10	.C.....	.A.....	.T.....-..
BRE14A	-----	C...G...-..
BRE14B	-----AT.....-..
BRE31	-----T.....-..
BRE23A	-----	..TT.T...	...A.....-..
BRE23B	------..
BRE47	------..
STE23	-----C-	T..T.....-..
STE44A	...T...-	.A.....	.A.....-T..
STE44B	-----T.A...-T..
OXY52A	..T..CTC.G	G.CTCA.T.A	AC..T...-..
OXY52B	..-ACTG.CT...	...T.....A-C	...G.....	...
OXY53A	..-ACTG.C	.T...T...	...T.....C-..	...A.....	...G.
OXY53B	..-CTAC..A	G...AT..	.C..T...-..
OXY75	..-CTAC..A	G...AT..	.C..T...-..
OXY80	AT.A.N-..-	...CT..-A.....
STU2	...TA.-	...GCT..	...T...-..
STU6	...TA.-	...GCT..	...T...-..
STU5	...TA.-	...GCT..	...T...-..
STU24	...TA.-	...GCT..	...T...-..
STU25	...A..C.-	...T...-A	A..G.....	...G.
SIN19	...C.C.-	T...T...-..
SIN33	A..N..AC.-	...T...	...T...-..	...A.....	...
SIN44	...A.CAA.-	.C.T...T.	A.....	...A.....	...
FUL33	-----	A.....-..T	...
FUL73A	...A.C.C.-A.A...-A	...T...T	...
FUL73B	-----AT..C.-..G.	...
SCA11	-----AA-	G.T.....	...A..T...-..T.	...
SCA15	-----A-	G.A.....	...T...	A.....	...A..T.	...
SCA19	-----GA-	G...T...	...A.....-..T.	...
SCA41	-----AA-	G.T.....	...AG.T...-..T.	...

Figura 15: Alineamiento de las unidades monoméricas *PstI*, continuación.

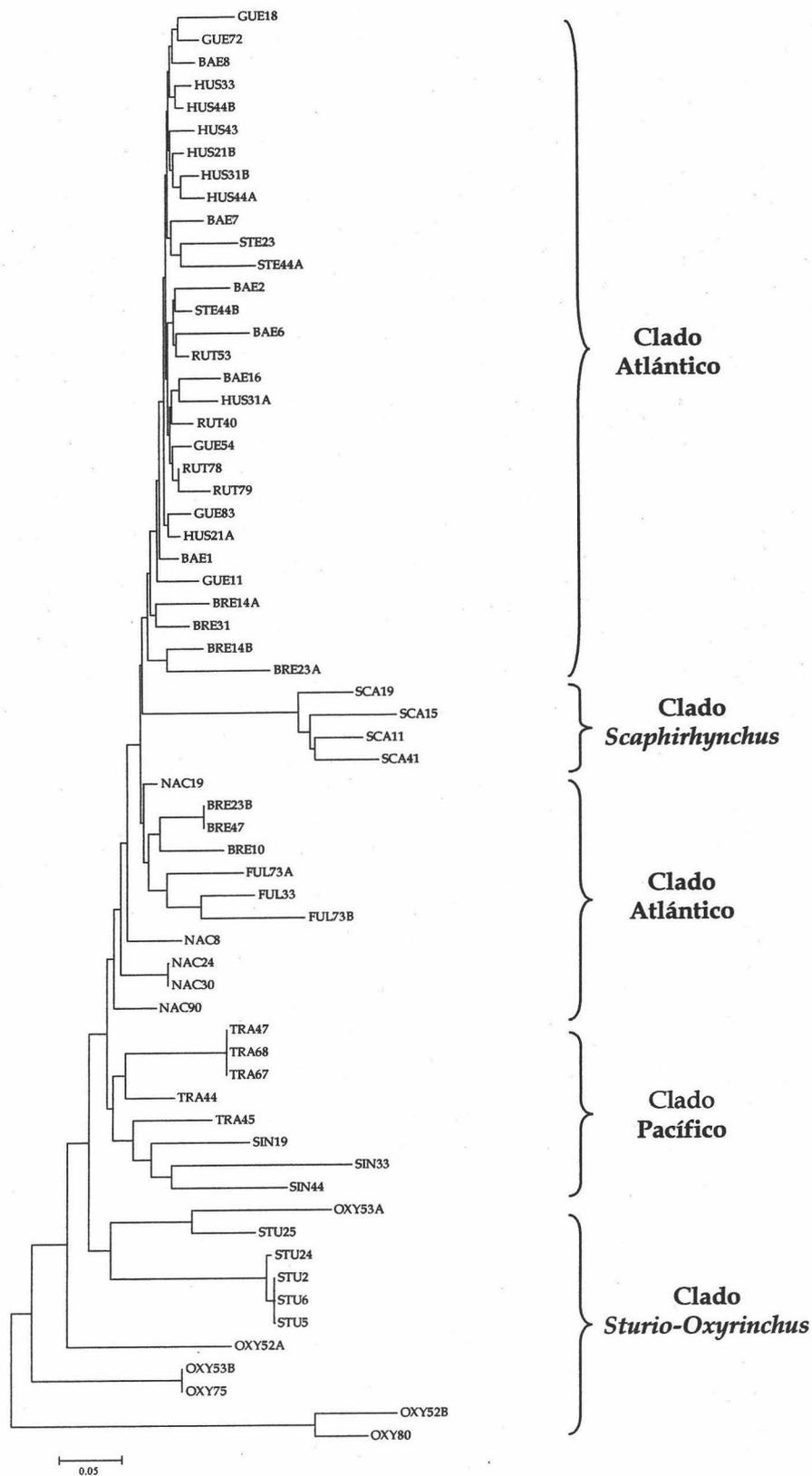


Figura 16 : Árbol filogenético realizado con las 64 unidades monoméricas *PstI* de todas las especies analizadas utilizando el método del vecino más próximo (Saitou y Nei, 1987).

4.2.4 Análisis de la varianza molecular (AMOVA).

El análisis de la AMOVA demuestra que el 62.2% de la variación genética total es debida a la varianza intraespecífica, mientras que el restante 37.8% representa las diferencias entre especies. El 30.97% de la variación total ocurre entre especies del clado Atlántico y las del clado Pacífico, mientras que el 15.75% se distribuye entre las especies dentro de cada clado. Tal como se muestra en la Tabla 12, este análisis demuestra que el 28.12% de la variación total ocurre entre clados (teniendo en cuenta los 4 clados) y el 16.85% entre especies dentro de cada clado.

VARIANZA	PORCENTAJE DE VARIANZA
Intraespecífica	62.20
Interespecífica	37.80
Entre clados	28.12
Entre especies dentro de cada clado	16.85

Tabla 12: Varianza intra e interespecífica de las secuencias *PstI*. También se muestran los valores de AMOVA intra e interclado.

4.2.5 Análisis del proceso de homogenización y divergencia entre especies.

De la misma forma que ocurría con el satélite *HindIII*, aproximadamente el 95% de las posiciones nucleotídicas de los monómeros *PstI* pueden ser clasificadas dentro de uno de los 6 estados de transición descritos por Strachan et al., 1985, como muestra la Tabla 13. En este caso, podemos realizar las comparaciones entre los cuatro clados ya que hay especies representativas de cada uno de ellos. Podemos observar que las comparaciones de las secuencias entre especies del mismo clado, como el caso de *A. baerii*-*A. gueldenstaedtii*, *H. huso*-*A. baerii* o *A. naccarii*-*A. gueldenstaedtii*, presentan la mayoría de posiciones en estados de transición 2 y 3. Sin embargo, el porcentaje de posiciones divergentes fijadas aumenta si realizamos la comparación entre especies de

diferentes clados, como ocurre en el caso de las comparaciones entre *A. naccarii*-*A. sturio*, *S. albus*-*A. gueldenstaedtii* y *A. transmontanus*-*A. baerii*.

4.2.6 Clasificación de los sitios polimórficos.

Hemos analizado la proporción de sitios polimórficos compartidos entre 2 o más especies en el alineamiento múltiple de las secuencias de cada especie. Encontramos que el 2.5% de los sitios polimórficos pueden ser catalogados como polimorfismos ancestrales, el 21% de los sitios polimórficos lo comparten 2 ó 3 especies estrechamente relacionadas, mientras que el 76.5% de los sitios polimórficos eran autapomorfías y homoplasias.

4.2.7 Cálculo de la tasa de mutación.

Asumiendo que las distancias genéticas medias entre dos especies podría ser una estima aproximada de la tasa de mutación, y teniendo en cuenta que la distancia Jukes-Cantor entre *A. brevisrostrum* y las especies del linaje de *A. gueldenstaedtii* (*A. gueldenstaedtii*, *A. baerii* y *A. naccarii*) es de 0.114, encontramos que la tasa de mutación para las secuencias del ADN satélite *PstI* es de 1.14×10^{-9} .

$$r = 0.114 / 2 \times 50 \times 10^6 = 1.14 \times 10^{-9}$$

4.2.8 Análisis de la conversión génica

Con el programa GENECONV encontramos pruebas de apoyo para el fenómeno de conversión génica en varias regiones de las secuencias monoméricas del ADN satélite *PstI*.

La Tabla 14 muestra algunos ejemplos de comparaciones entre secuencias de las diferentes especies analizadas.

	1	2	3	4	5	6	n-St	p-nucl.
BAE-GUE	70.46	25.38	0.00	0.00	0.00	0.00	4.16	193
BAE-HUS	72.10	22.10	0.52	0.00	0.00	0.00	5.28	190
GUE-HUS	73.71	22.68	0.51	0.00	0.00	0.00	3.10	194
NAC-BAE	71.51	19.76	2.32	1.62	1.62	0.00	3.17	172
NAC-GUE	74.47	17.70	1.56	1.56	0.52	0.00	4.19	192
NAC-TRA	70.89	14.55	7.04	1.40	0.46	0.00	5.66	213
GUE-TRA	64.92	18.84	5.75	3.14	3.14	0.00	4.21	191
GUE-BRE	68.68	20.87	1.64	1.09	0.54	0.54	6.64	182
TRA-BAE	61.80	20.60	5.52	2.51	3.51	1.00	5.06	199
STU-NAC	64.32	16.21	1.08	10.27	2.70	2.16	3.26	185
STU-BAE	59.64	20.46	0.58	6.43	5.84	2.92	4.13	171
STU-GUE	61.76	17.64	0.58	10.00	4.70	3.52	1.80	170
STU-TRA	61.70	14.89	4.78	7.97	2.65	2.65	5.36	188
SCA-NAC	64.36	16.48	2.12	4.25	6.91	1.06	4.82	188
SCA-BAE	61.45	18.75	1.56	2.60	7.29	1.56	6.79	192
SCA-GUE	63.53	19.33	1.65	2.20	7.18	2.20	3.91	181
SCA-TRA	62.84	16.93	3.82	4.91	3.82	2.18	5.50	183

Tabla 13: Estados de transición entre pares de especies relacionadas para la familia de ADN satélite *Pst*I calculados siguiendo el método de Strachan *et al.* (1985). Las dos últimas columnas corresponden a las posiciones no-Strachan y el total de posiciones nucleotídicas comparadas respectivamente.

COMPARACIONES	Sim P	I	F	L	D	T
BAE1;STE44B	0.0000	1	84	84	0	59
GUE83;HUS21B	0.0000	33	101	69	0	80
GUE72;RUT78	0.0000	1	66	66	0	109
NAC19;GUE83	0.0000	1	64	64	0	84
GUE83;BRE10	0.0000	2	63	62	0	88
NAC8;BRE31	0.0000	28	79	52	0	96
HUS44B;RUT40	0.0000	6	52	47	0	103
BAE1;SCA19	0.0000	15	52	38	0	108
HUS31B;SCA11	0.0000	15	48	34	0	120
BRE23;STU24	0.0000	18	49	32	0	110
NAC24;TRA44	0.0000	1	26	26	0	135
TRA44;SCA11	0.0000	29	52	24	0	117

Tabla 14: Ejemplos de algunas de las comparaciones realizadas con el programa GENECONV para poner de manifiesto la actuación del mecanismo de conversión génica. La abreviatura Sim P corresponde a los valores simulados de p (simulated p values) basados en 10.000 permutaciones. Las iniciales I y F corresponden a las posiciones del primer y último nucleótido de la región que resulta de eventos de conversión génica. L=longitud del fragmento que resulta de eventos de conversión génica. D= número de nucleótidos diferentes dentro del fragmento. T= número total de desigualdades entre las dos secuencias.

4.3 ESTUDIO DE LAS SECUENCIAS ESPACIADORAS DE LOS GENES RIBOSÓMICOS 5S DE LA FAMILIA ACIPENSERIDAE.

A partir de una unidad de repetición completa, región funcional y secuencia espaciadora, de los genes ribosómicos 5S de la especie *A. sturio* (Tagliavini *et al.* 1999a), hemos diseñado una pareja de cebadores para realizar un estudio de estas unidades ribosómicas 5S en diferentes especies de esturión. Estos cebadores fueron diseñados enfrentados, uno en la región espaciadora (ETS-for) y el otro en la parte funcional (5S-rev).

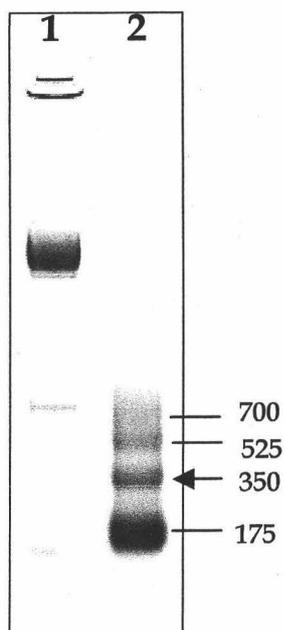


Figura 17 : Electroforesis en gel de agarosa de los genes ribosómicos 5S amplificados mediante PCR en la especie *A. naccarii*. El número (1) corresponde al marcador de peso molecular de 100 pares de bases. El número (2) corresponde al resultado de la amplificación mediante PCR de la especie *A. naccarii*. Las cifras a la derecha de la figura indican el tamaño en pares de bases de los fragmentos amplificados. La flecha corresponde a la unidad dimérica escindida del gel a partir de la cual hemos realizado la clonación.

Utilizando los cebadores ETS-for y 5S-rev, amplificamos las unidades ribosómicas 5S en la especie *A. naccarii*. El amplificado de PCR se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1% y el gel se tiñó con bromuro de etidio para visualizar las bandas. En el gel pudimos observar un amplificado en escalera con tamaños próximos a 175- 350-525 pares de bases (Figura 17).

La banda de 350 pares de bases se escindió del gel y fue purificada. Los fragmentos de 350 pares de bases fueron clonados y secuenciados (apartado de Material y Métodos) El fragmento de 350 pares de bases contenía dos unidades del gen ribosómico 5S, una completa y otra parcial y, separándolos, la región espaciadora completa, tal como demuestra la búsqueda realizada en la base de datos del GenBank y de la EMBL mediante el uso del programa BLAST. Se seleccionaron un total de 9 clones: Nac-1, Nac-2, Nac-7a, Nac-7B, Nac-7C, Nac-12, Nac-13a, Nac-13B y Nac-29.

El clon Nac-12 fue utilizado como sonda para realizar una hibridación tipo Southern sobre una membrana donde, previamente, habíamos fijado ADN de la especie *A. naccarii* digerido con diferentes enzimas de restricción (*HindIII*, *PstI*, *SacI*, *AluI*, *HindII*, *BclI*, *Hinfi*, *SspI* y *EcoRI*). Tras realizar los lavados de la membrana a alta astringencia, observamos que para las enzimas de restricción *PstI* y *Hinfi* aparecían dos señales de hibridación, una más intensa que la otra, de unos 230 pares de bases la primera y 450 la segunda. Para la enzima *AluI*, las señales de hibridación presentaban un tamaño menor, de unos 140 pares de bases la primera señal y 230 pares de bases la segunda (Figura 18). Al analizar los puntos de corte para diferentes enzimas de restricción en esta secuencia, comprobamos que para la enzima *PstI* y *Hinfi* hay una diana de corte, la primera situada en la región codificadora y la segunda en la secuencia espaciadora. La enzima *AluI* genera fragmentos más pequeños porque presenta dos dianas de corte en la secuencia, uno en la parte funcional y otra en la región espaciadora. El patrón de hibridación obtenido para los genes ribosómicos 5S

en la especie de esturión *A. naccarii*, está en consonancia con el obtenido para otros peces, como en el género *Leporinus* (Martins y Galetti Jr, 2001a).

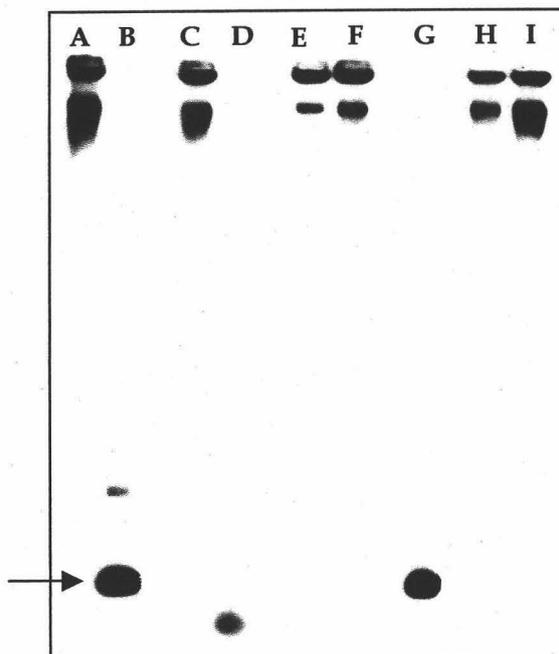


Figura 18 : Patrón de restricción del gen ribosómico 5S de *A. naccarii* revelado por hibridación con el clon Nac-12. Las distintas calles se corresponden con la digestión generada por los siguientes enzimas de restricción: (A) *HindIII*, (B) *PstI*, (C) *SacI*, (D) *AluI*, (E) *HindII*, (F) *BclI*, (G) *HinfI*, (H) *SspI* e (I) *EcoRI*. La flecha indica la unidad de repetición de aproximadamente 230 pares de bases (gen 5S y secuencia espaciadora). La enzima de restricción *AluI* genera unidades de repetición más pequeñas ya que presenta dos dianas de corte en la secuencia.

Como hemos comentado en la Introducción, los genes ribosómicos 5S consisten en una secuencia codificadora altamente conservada y una secuencia espaciadora más variable (NTS, non-transcribed spacer). Las variaciones en el NTS, como inserciones-delecciones, minirrepeticiones y pseudogenes son, con frecuencia, específicos de una especie y se han utilizado en estudios evolutivos (Sajdak *et al.* 1998). Por esta razón hemos realizado el análisis sólo de las secuencias espaciadoras.

Tras realizar el alineamiento de todas las secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S en la especie *A. naccarii* (Figura 19), pudimos observar que

había clones con diferente tamaño de secuencia como Nac-12 con 112 pares de bases y el resto con 98 pares de bases. Esta diferencia en tamaño se debe a una inserción /delección de un fragmento de 14 pares de bases (desde la posición 8 a la 21 ambas inclusive). El análisis de las secuencias revela (Figura 19), de la posición 15 a la 21 una repetición que coincide con el inicio de la secuencia (ACATTTT) y un palíndromo de 10 pares de bases (TGTAATTACA) de la posición 8 a la 17, ambas inclusive.

NAC1	ACATTTT	-----	-----	→-ACAATTGAA	ATGTGTGGAG	GACAAAATGA	AATCTCAGGG	60
NAC2	ACATTTT	-----	-----	-ACAATTGAA	ATGTGTGGAG	GACAAAATGA	AATCTCGGGG	
NAC7A	ACATTTT	-----	-----	-ACAATTGAA	ATGTGTG---	GACAAAATGA	AATCTCGGGG	
NAC7B	ACATTTT	-----	-----	-ACAATTGAA	ATGTGTGGAG	GACAAAATGA	AATCTCGGGG	
NAC7C	ACATTTT	-----	-----	-ACAATTGAA	ATGTGTGGAG	GACAAAATGA	AATCTCGGGG	
NAC12	ACATTTT	TGT	AATTACATTT	TACAATTGAA	ATGTGTGGAG	GACAAAAGGA	AATTTTGGAG	
NAC13A	ACATTTT	-----	-----	-ACAATTGAA	ATGTGTG---	GACAAAATGA	AATNTCGGGG	
NAC13B	ACATTTT	-----	-----	-ACAATTGAA	ATGTGTGGAG	GACAAAATGA	AATNTCGGGG	
NAC29	ACATTTT	-----	-----	-ACAATTGAA	ATGTGTGGAG	GACAAAAGGA	AATTTTGGAG	
NAC1	GAATCACCCC	CAGCTCATCG	AACAGGAGTG	TCATGAAAGC	AGAAATGCAA	TC	112	
NAC2	GAATCACCCC	CAGCTCATCG	AACAGAAAAG	TCATAAAAAGC	AGAACTACAA	TC		
NAC7A	GAATCACCCC	CAGCTCATCG	AACAGAAAAG	TCATAAAAAGC	AGAACTGCAA	TC		
NAC7B	GAATCACCCC	CAGCTCATCG	AACAGAAAAG	TCATAAAAAGC	AGAACTGCAA	TC		
NAC7C	GAATCACCCC	CAGCTCATCG	AACAGAAAAG	TCATAAAAAGC	CGGACTTCAA	TC		
NAC12	GAATCACCCC	CAGCTCACTA	AACATAAAAAG	TCATGAAAGC	AGAAATGCAA	TC		
NAC13A	GAATCACCCC	CAGCTNATCG	AACAGAAAAG	TCATAAAAAGC	AGAACTGCAA	TC		
NAC13B	GAATCACCCC	CAGCTTATCG	AACAGAAAAG	TTATAAAAAGC	AGAACTGCAA	TC		
NAC29	GAATCACCCC	CAGCTCACTA	AACATAAAAAG	TCATGAAAGC	AGAAATGCAA	TC		

Figura 19: Alineamiento de las 9 secuencias espaciadoras del gen 5S en la especie *A. naccarii*. Las flechas señalan la repetición de 7 pares de bases y en negrita la secuencia palindrómica.

De la misma forma que obtuvimos las secuencias funcionales y espaciadoras para la especie *A. naccarii*, obtuvimos las secuencias de las demás especies de esturiones: *A. baerii*, *A. sturio*, *A. ruthenus*, *A. gueldenstaedtii*, *A. transmontanus*, *A. sinensis*, *H. huso*, *A. stellatus*, *A. fulvescens*, *A. brevirostrum* *A. oxyrinchus* y *S. albus*. Así, hemos secuenciado un total de 68 espaciadores del gen ribosómico 5S en las 13 especies analizadas.

Las dos variantes en la longitud de las secuencias espaciadoras las hemos encontrado en la mayoría de las especies (excepto en *A. fulvescens*, *A. oxyrinchus* y *S. albus* que sólo presentan la secuencia espaciadora con 98 pares de bases).

Cuando realizamos un análisis filogenético con estas secuencias utilizando las distancias entre ellas, podemos observar una serie de resultados (Figura 20). En primer lugar, la agrupación de las secuencias espaciadoras de *S. albus* por un lado y por otro las de *A. sturio* y *A. oxyrinchus*. En el resto de especies, las secuencias espaciadoras se asocian en dos grupos claramente separados.

Esta subdivisión no estaba en consonancia con la división de las secuencias según el tamaño del espaciador, porque en ambos grupos podíamos encontrar secuencias con inserción/delección. Tras el análisis exhaustivo de los dos tipos de secuencias, observamos que la diferencia entre ellas se deben a 9 posiciones (53, 59, 61, 83, 84, 85, 90, 100 y 111 en el alinamiento múltiple) que definen dos tipos de secuencias espaciadoras como se muestra en la Tabla 15.

Espaciador Tipo 1:

Posiciones	53	59 61	83 84 85	90 100 111
Nucleótidos	G	T T	C T A	T G A
		C T	C C T	

Espaciador Tipo 2:

Posiciones	53	59 61	83 84 85	90 100 111
Nucleótidos	T	C C	T C G	G A C
		T C	C C G	

Tabla 15: Posiciones y nucleótidos que definen los dos tipos de secuencias espaciadoras claramente separadas en el árbol de distancias.

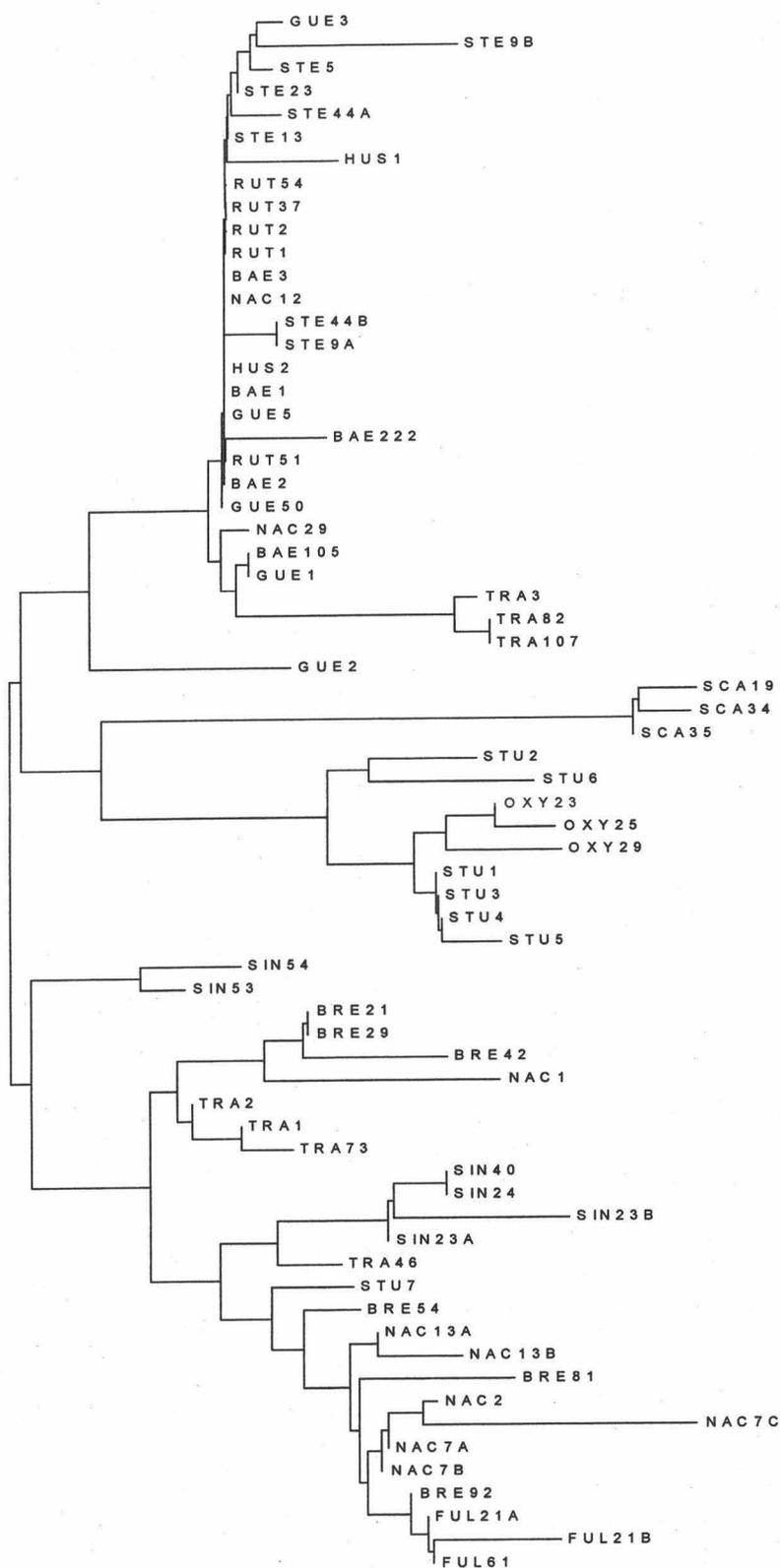


Figura 20 : Árbol filogenético realizado con las 68 secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S de todas las especies analizadas utilizando el método del vecino más próximo (Saitou y Nei, 1987).

Las dos subfamilias de secuencias espaciadoras fueron encontradas en 3 especies: *A. naccarii*, *A. sturio* y *A. transmontanus*. El resto de las especies tenían una de las dos variantes.

A partir de este momento se procedió a analizar por separado las secuencias espaciadoras de cada subfamilia.

Hemos obtenido por tanto 41 secuencias de una de las variantes (que llamamos espaciador tipo 1) en 10 especies, mientras que de la segunda variante (espaciador tipo 2) hemos encontrado un total de 27 secuencias en sólo 6 especies.

4.3.1 ANÁLISIS DEL ESPACIADOR TIPO 1.

4.3.1.1 Análisis de la variabilidad intraespecífica.

Como anteriormente hemos mencionado, la longitud de la secuencia espaciadora tiene un tamaño de 98 ó 112 pares de bases dependiendo de una inserción/delección de 14 pares de bases. Estos tamaños los hemos encontrado en la mayoría de especies analizadas. Pero además, en las especies *A. sturio*, *A. oxyrinchus* y *S. albus* hemos encontrado secuencias espaciadoras de tamaño distinto, 103 pares de bases para las dos primeras especies y 102 pares de bases para la última. Esta diferencia es debida a la inserción de una Guanina y una Adenina en las posiciones 38 y 39, y de tres Adeninas en las posiciones 46, 47 y 48 en las especies *A. sturio* y *A. oxyrinchus*; mientras que en la especie *S. albus* encontramos la inserción del nucleótido Adenina en la posición 39 y la inserción del trinucleótido GAC en las posiciones 46, 47 y 48 (Figura 21).

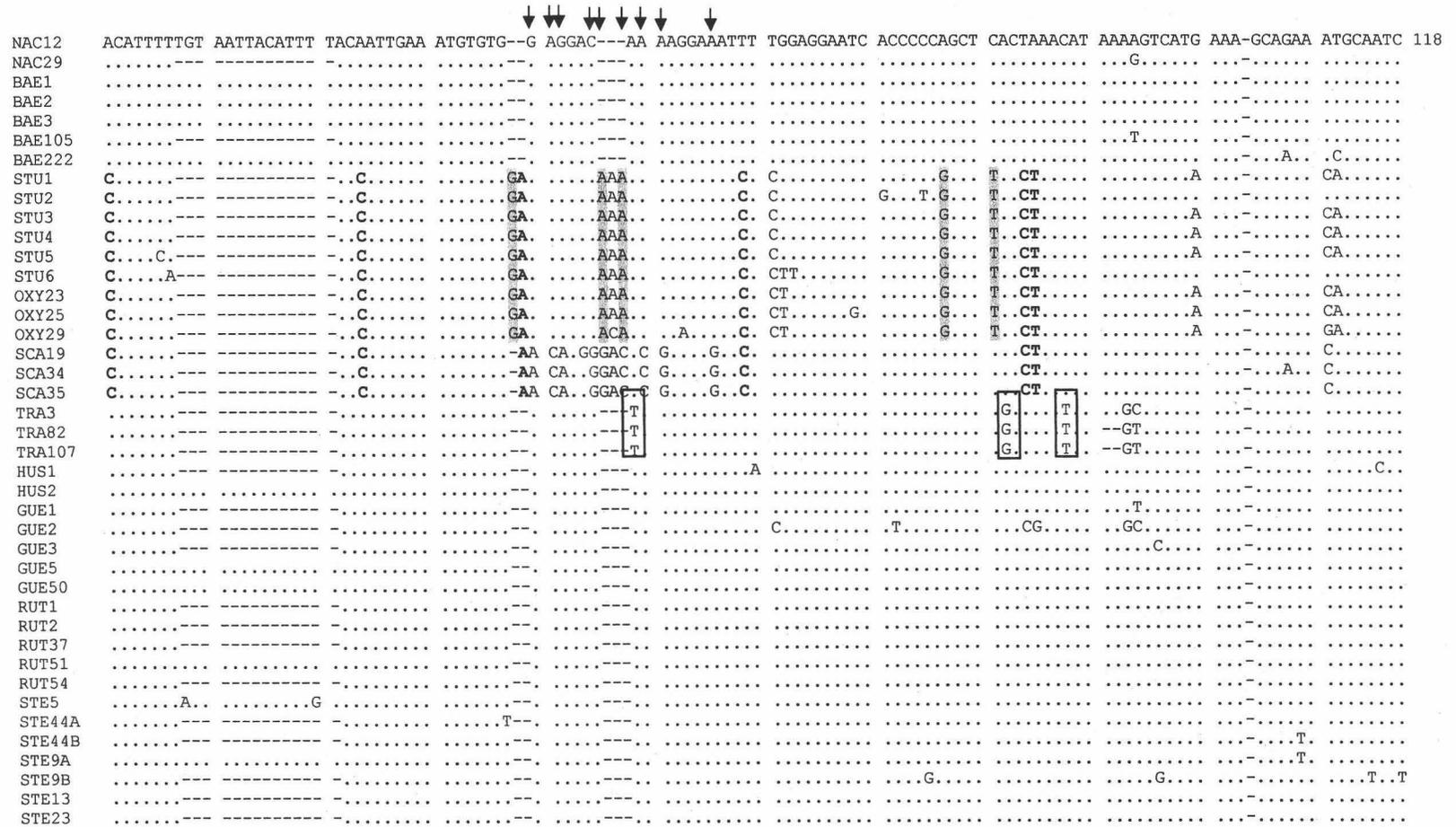


Figura 21 : Alineamiento de las secuencias espaciadoras tipo 1 de los genes ribosómicos 5S en el conjunto de especies en las que se encuentra representado. Las tres primeras letras de cada clon corresponde con el nombre de la especie a la que pertenece dicha secuencia. (NAC) *A. naccarii*, (BAE) *A. baerii*, (STU) *A. sturio*, (OXY) *A. oxyrinchus*, (SCA) *S. albus.*, (TRA) *A. transmontanus* (HUS) *H. Huso*, (GUE) *A. gueldenstaedtii*, (RUT) *A. ruthenus*, y (STE) *A. stellatus*. Las posiciones 1, 24, 39, 59, 84 y 85 (negrita) diferencian el clado *A. sturio-A. oxyrinchus* y el clado *Scaphihrynchus* del resto de las especies. Las posiciones 38, 46, 48, 77, y 81 (sombreado gris) diferencian el clado *A. sturio-A. oxyrinchus* del resto de las especies. Las posiciones 40, 41, 42, 45, 46, 48, 50, 51 y 56 (flechas) difencian el clado *Scaphihrynchus* del resto de las especies. Las posiciones 49, 82 y 88 (rectángulo), diferencian la especie *A. transmontanus* (clado Pacífico), del resto de especies.

La variabilidad intraespecífica encontrada en esta ocasión para las secuencias espaciadoras es bastante baja, variando entre 0% de *A. ruthenus* y 3.4% de *A. sturio* (Tabla 16). No existe un gran número de sitios polimórficos, siendo *A. sturio* la especie que más presenta, con aproximadamente el 8.7% del total de la secuencia.

4.3.1.2 Estudio de la divergencia interespecífica.

La Tabla 17 muestra las distancias medias entre especies para el espaciador tipo 1. Observamos que existen valores de variabilidad intraespecífica más altos que los valores de divergencia interespecífica cuando comparamos especies como *A. gueldenstaedtii* con *A. naccarii*, *A. ruthenus*, *A. baerii*, *A. stellatus* y *H. huso* (todas estas especies pertenecen al clado del Atlántico). Por el contrario las especies *A. transmontanus*, *A. sturio*, *A. oxyrinchus* y *S. albus* presentan valores de variabilidad intraespecífica menores que la interespecífica.

En el árbol de distancias construido mediante el método de neighbor-joining (Figura 22), podemos apreciar que las secuencias de *S. albus* se agrupan entre sí, las de *A. sturio* y *A. oxyrinchus* se agrupan en otro clado, y finalmente el resto de secuencias de las 7 especies restantes aparecen mezcladas en un tercer clado. Aquí encontramos un agrupamiento preferencial de las secuencias de *A. transmontanus* aparte del resto de secuencias de las demás especies.

Especies	N° de unidades secuenciadas	Sitios polimórficos	II
<i>A. naccarii</i>	2	1	0.010
<i>A. baerii</i>	5	3	0.012
<i>A. gueldenstaedtii</i>	5	7	0.031
<i>A. ruthenus</i>	5	0	0.000
<i>H. huso</i>	2	2	0.020
<i>A. stellatus</i>	7	6	0.019
<i>A. transmontanus</i>	3	1	0.006
<i>A. sturio</i>	6	9	0.034
<i>A. oxyrinchus</i>	3	4	0.025
<i>S. albus</i>	3	2	0.013

Tabla 16: Resumen de las secuencias espaciadoras tipo 1. Π corresponde a los valores de diversidad nucleotídica.

	NAC	BAE	GUE	HUS	RUT	TRA	STE	STU	OXY	SCA
NAC	0.010	0.010	0.020	0.016	0.005	0.054	0.017	0.128	0.148	0.161
BAE		0.012	0.022	0.016	0.006	0.057	0.018	0.127	0.147	0.160
GUE			0.033	0.027	0.017	0.060	0.028	0.129	0.149	0.167
HUS				0.021	0.010	0.065	0.022	0.134	0.154	0.167
RUT					0.000	0.054	0.011	0.122	0.142	0.154
TRA						0.007	0.065	0.187	0.210	0.223
STE							0.021	0.134	0.154	0.167
STU								0.036	0.039	0.168
OXY									0.026	0.189
SCA										0.013

Tabla 17: Distancias medias intra e interespecíficas siguiendo el modelo propuesto por Jukes y Cantor (1969), para las secuencias espaciadoras tipo 1.

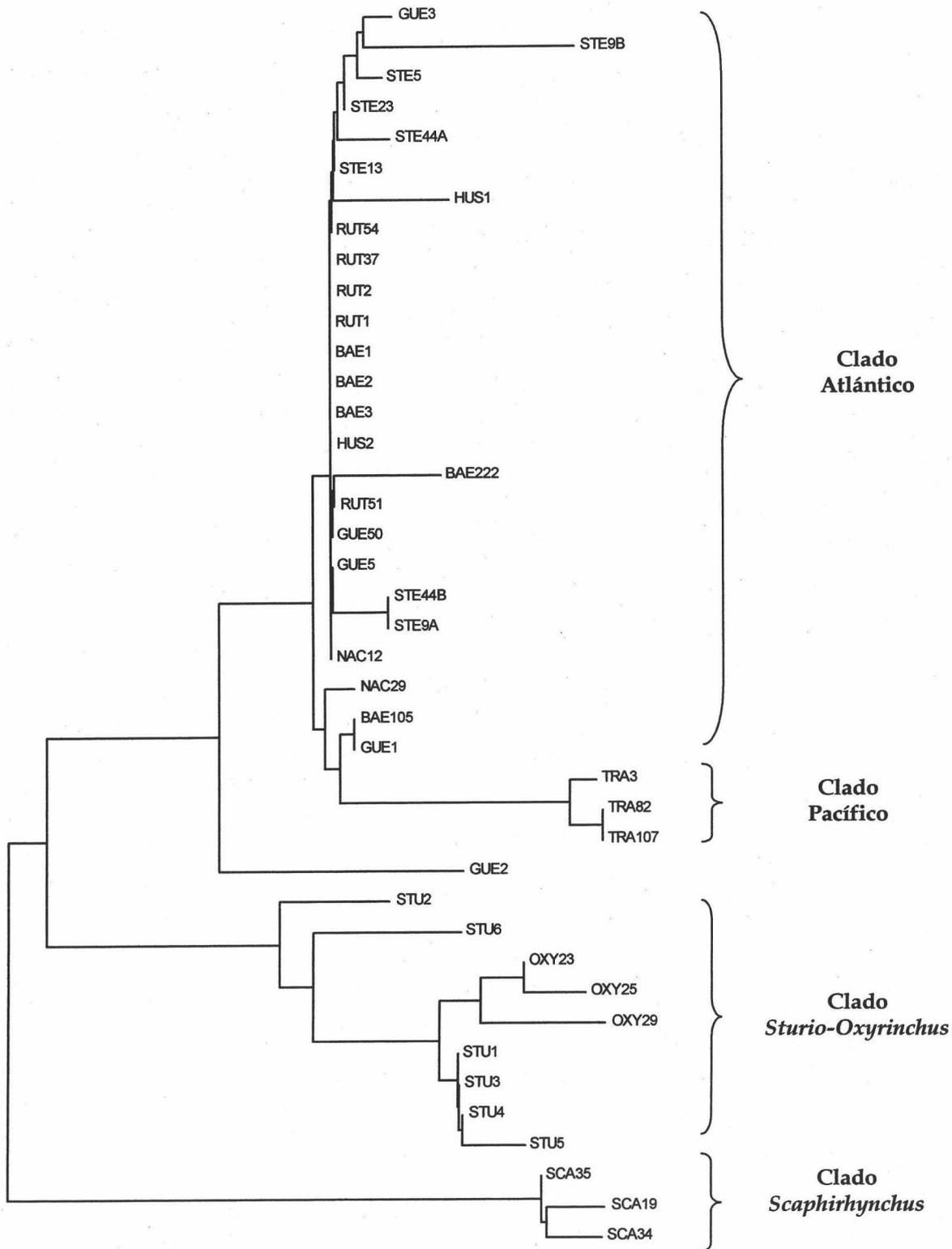


Figura 22 : Árbol filogenético realizado con las 61 secuencias espaciadoras del tipo 1 de los genes ribosómicos 5S en todas las especies que lo presentan utilizando el modelo del vecino más próximo (Saitou y Nei, 1987).

4.3.1.3 Análisis de la varianza molecular (AMOVA).

El análisis de la AMOVA (Tabla 18), demostró que, evitando las secuencias claramente homogenizadas y diferenciadas de *A. sturio*, *A. oxyrinchus* y *S. albus*, el 85.89% del total de la varianza genética es debida a varianza intraespecífica mientras que el 14.11% restante representa la diferenciación interespecífica. El análisis revela que el 68.52% de la variación total ocurre entre los cuatro clados que se obtienen en la Figura 13.

VARIANZA	PORCENTAJE DE VARIANZA
Intraespecífica	41.52 (85.89)*
Interespecífica	58.48 (14.11)*
Entre clados	68.52
Entre especies dentro de cada clado	1.06

Tabla 18: Varianza intra e interespecífica y valores de AMOVA intra e interclado para las secuencias espaciadoras tipo 1. Los asteriscos (*) muestran la varianza cuando no tenemos en cuenta a las especies *A. sturio*, *A. oxyrinchus* y *S. albus*.

4.3.1.4 Análisis del proceso de homogenización y divergencia entre especies.

En esta ocasión el análisis de los estados de transición deben ser considerados con cautela, ya que para algunas especies sólo tenemos 2 ó 3 secuencias espaciadoras.

Cuando realizamos las comparaciones entre las secuencias pertenecientes a especies del mismo clado, como *A. baerii* y *A. ruthenus* o *A. gueldenstaedtii* y *A. stellatus*, comprobamos que la mayoría de las posiciones están conservadas y existe un porcentaje mínimo en estado de transición 2 del proceso de homogenización (Tabla 19).

Por el contrario, encontramos un porcentaje muy alto de posiciones diagnóstico (5) cuando realizamos la comparación entre especies de distinto

clado, por ejemplo *A. sturio* y *A. ruthenus* o *A. oxyrinchus* y *A. baerii*. El mayor número de posiciones fijadas lo encontramos en las comparaciones de *S. albus* con cualquiera de las especies analizadas.

	1	2	3	4	5	6	n-St	p-nucl.
BAE-RUT	96.93	3.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	98
BAE-STE	91.83	8.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	98
BAE-GUE	90.81	8.16	0.00	0.00	0.00	0.00	1.03	98
GUE-RUT	92.85	7.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	98
GUE-STE	87.75	12.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	98
STU-BAE	80.61	8.16	2.04	0.00	8.16	0.00	1.03	98
STU-RUT	83.67	5.10	3.06	0.00	8.16	0.00	0.01	98
STU-GUE	78.57	10.20	3.06	2.04	5.10	1.02	0.01	98
STU-SCA	77.45	7.84	2.94	0.00	11.76	0.00	0.01	102
OXY-BAE	83.67	4.08	0.00	0.00	10.20	2.04	0.01	98
OXY-GUE	81.63	6.12	0.00	2.04	8.16	2.04	0.01	98
SCA-BAE	82.65	3.06	0.00	0.00	13.26	0.00	1.03	98
SCA-GUE	79.59	7.14	0.00	1.02	11.22	1.02	0.01	98

Tabla 19 : Estados de Transición para las secuencias espaciadoras tipo 1 calculados siguiendo el método de Strachan *et al.* 1985 entre pares de especies relacionadas. Las dos últimas columnas corresponden a las posiciones no-Strachan y el total de posiciones nucleotídicas comparadas respectivamente.

En el alineamiento general de todas las secuencias espaciadoras tipo 1 de las 10 especies en las que está representada (Figura 21), podemos observar que existen posiciones fijadas que son diagnósticas para diferenciar especies. Así, por ejemplo, las posiciones 1, 24, 39, 59, 84 y 85 diferencian a los clados *sturio-oxyrinchus* y el clado *Scaphirhynchus* del conjunto de secuencias pertenecientes al resto de las especies. Encontramos posiciones que distinguen esta vez sólo al clado *sturio-oxyrinchus* del resto de las especies como son: 38, 46, 48, 77 y 81. Las que diferencian al clado *Scaphirhynchus* del resto de secuencias son 40, 41, 42, 45, 46, 48, 50, 51, y 56. Tres posiciones, 49, 82 y 88, pertenecientes a la especie *A. transmontanus* (clado Pacífico), diferencian a ésta del resto de las especies.

4.3.1.5 Clasificación de los sitios polimórficos.

Encontramos que aproximadamente el 93% son autapomorfias (polimorfismos no compartidos), mientras que el 7% restante son homoplasias (compartidos entre dos especies muy alejadas). Esto refleja la baja variabilidad intraespecífica encontrada dentro de los espaciadores así como una ligera diferenciación interespecífica.

4.3.1.6 Cálculo de la tasa de mutación

Comparando secuencias del mismo tipo y asumiendo el tiempo de divergencia de 90 millones de años entre los linajes *A. sturio*-*A. oxyrinchus* y el resto de la subfamilia Acipenserinae, estimamos la tasa de mutación en 0.7×10^{-9} .

$$r = 0.126 / 2 \times 90 \times 10^6 = 0.7 \times 10^{-9}$$

4.3.1.7 Análisis de la conversión génica.

Como en el caso de los ADN satélites *HindIII* y *PstI*, igualmente encontramos que la conversión génica es un mecanismo que actúa homogenizando las secuencias espaciadoras de los esturiones, si bien el número de comparaciones que se pueden establecer es significativamente más bajo.

4.3.2 ANÁLISIS DEL ESPACIADOR TIPO 2.

4.3.2.1 Análisis de la variabilidad intraespecífica.

El estudio del tipo de espaciador tipo 2 nos da una información muy limitada, ya que hemos obtenido un número bajo de secuencias dentro de las 6 especies que contenían este tipo, como muestra el alineamiento de la Figura 23.

La longitud de las secuencias se mantiene en 98 y 112 pares de bases sin que existan otras inserciones/deleciones de interés en estas secuencias.

La variabilidad encontrada en esta ocasión para las secuencias espaciadoras es algo más alta que para el espaciador tipo 1, variando desde el 1.3% en *A. fulvescens* y 6.3% en *A. sinensis* (Tabla 20). En cuanto al número de sitios polimórficos, siempre teniendo en cuenta el bajo número de secuencias, destaca en esta ocasión la especie *A. sinensis*, donde encontramos 14 sitios polimórficos, que corresponden aproximadamente al 13% del total de la secuencia.

Especies	Nº de unidades secuenciadas	Sitios polimórficos	II
<i>A. naccarii</i>	7	9	0.030
<i>A. sinensis</i>	6	14	0.063
<i>A. transmontanus</i>	4	6	0.032
<i>A. fulvescens</i>	3	2	0.013
<i>A. brevirostrum</i>	6	10	0.040
<i>A. sturio</i>	1	-	-

Tabla 20 : Resumen de las secuencias espaciadoras tipo 2. II corresponde a los valores de diversidad nucleotídica.

4.3.2.2 Estudio de la divergencia interespecífica.

Encontramos valores ligeramente superiores de variabilidad intraespecífica con respecto a la interespecífica cuando comparamos especies como *A. brevirostrum* 3.8% y *A. fulvescens* 3.2% (que pertenecen al mismo clado) y *A. sinensis* 6.8% y *A. sturio* 6.4% (que pertenecen a clados distintos).

	NAC	TRA	SIN	BRE	FUL	STU
NAC	0.036	0.072	0.087	0.047	0.036	0.040
TRA		0.033	0.073	0.070	0.081	0.055
SIN			0.068	0.089	0.088	0.064
BRE				0.038	0.032	0.047
FUL					0.014	0.039
STU						n/c

Tabla 21: Distancias medias intra e interespecífica siguiendo el modelo propuesto por Jukes and Cantor (1969), para las secuencias espaciadoras de tipo 2.

NAC7B	ACATTTT---	-----	-ACAATTGAA	ATGTGTG--G	AGGAC---AA	AATGAAATCT	CGGGGGAATC	ACCCCCAGCT	CATCGAACAG	AAAAGTCATA	AAA-GCAGAA	CTGCAATC	118
NAC2	-----A.....
NAC1	-----	A.....	G.GT.....G	A.....
NAC7A	-----
NAC7C	-----	A..G..C	T.-.....
NAC13A	-----
NAC13B	-----
TRA1	TGT AATTACATTT	T.....	C.A.....	T.....G	A.....
TRA2	TGT AATTACATTT	T.....	C.A.....	A.....
TRA73	TGT AATTACATTT	T.....	A.....	C.A.....	T.....G	A.....
TRA46	T.C.A.....	A.....
SIN54	TGT AATTACATTT	T.....	T.....	G-AC..G.....	C.A.....	A..T....
SIN53	TGT AATTACATTT	T.....	T.....	G-AC..G.....	A.....	A.....T
SIN40	A.....	A.....
SIN24	A.....	A.....
SIN23A	A.....	A.....
SIN23B	A.....	T.A.....	A.....
FUL21A	A.....
FUL21B
FUL61	G.-..C.....
BRE21	TGT AATTACATTT	T.....	A.....C..
BRE29	TGT AATTACATTT	T.....	A.....C..
BRE42	TGT AATTACATTT	T.....	TC..A.....	A.....C..
BRE54	A.....C..
BRE81	TGT AATTACATTT	T.....	A..AT...
BRE92	TGT AATTACATTT	T.....
STU7	TGT AATTACATTT	T.....

Figura 23 : Alineamiento de las secuencias espaciadoras tipo 2 de los genes ribosómicos 5S en el conjunto de especies en las que se encuentra representado. Las tres primeras letras de cada clon corresponde con el nombre de la especie a la que pertenece dicha secuencia. (NAC) *A. naccarii*, (TRA) *A. transmontanus*, (SIN) *A. sinensis*, (FUL) *A. fulvescens*, (BRE) *A. brevirostrum* y (STU) *A. sturio*. Las posiciones 64 y 83 (rectángulo), diferencian el clado Pacífico del resto de especies. La posición 117 (negrita), diferencia a la especie *A. sturio* del resto de las especies. Las deleciones de las posiciones 38 y 39 se han conservado para mantener la misma numeración nucleotídica que en la secuencia espaciadora de tipo 1.

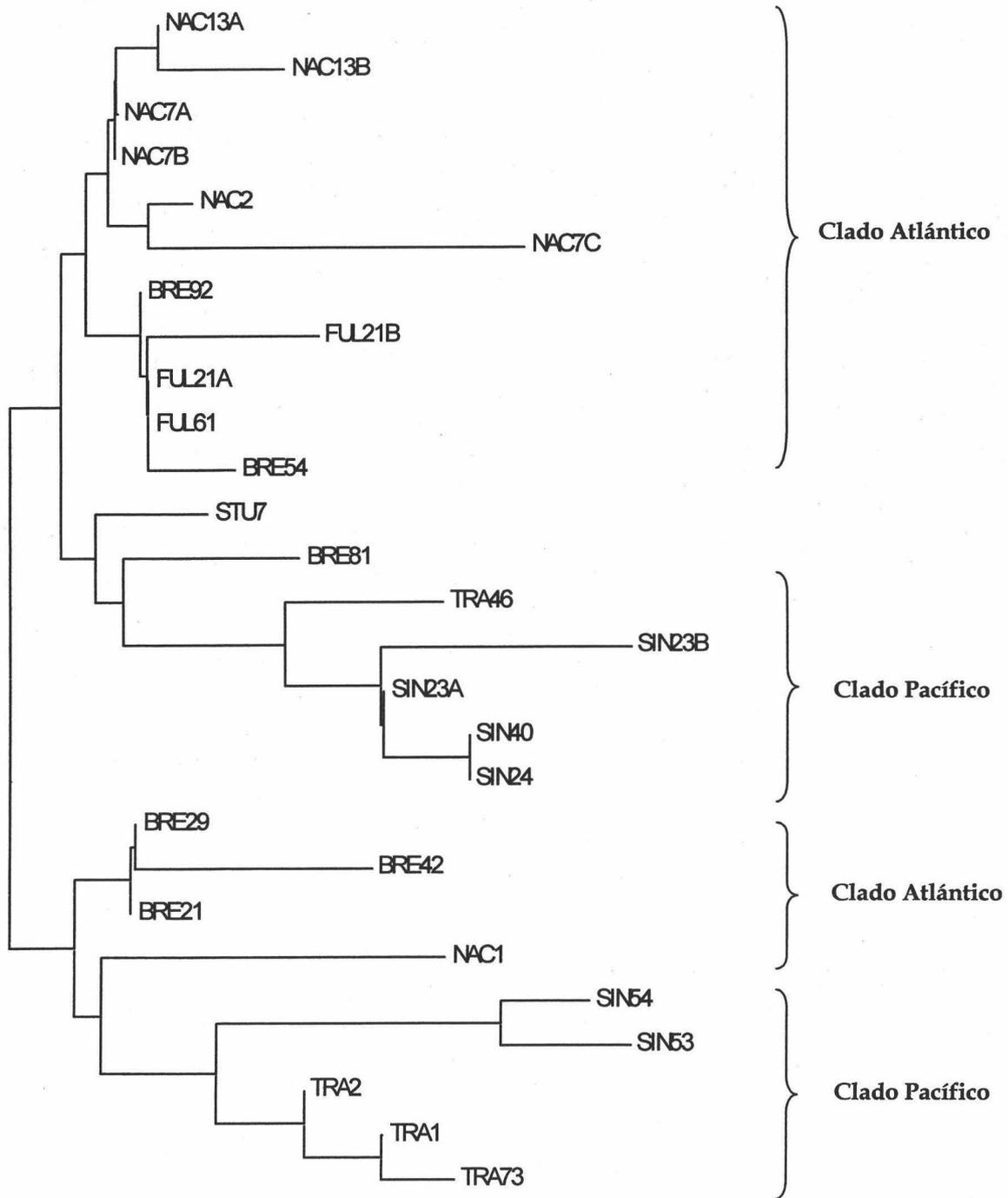


Figura 24: Árbol filogenético realizado con las 27 secuencias espaciadoras tipo 2 del ADN ribosómico 5S en todas las especies analizadas que lo presentan, siguiendo el modelo del vecino más próximo (Saitou y Nei, 1987).

Cuando realizamos un árbol de distancias (Figura 24) con las secuencias espaciadoras de estas especies observamos que tienden a agruparse por afinidad taxonómica, reflejando la separación geográfica de las especies, pero debido al bajo número de secuencias, esta separación no está perfectamente clara, existiendo todavía mezcla de secuencias.

4.3.2.3 Análisis de la varianza molecular (AMOVA).

Este análisis indica que el 59.11% de la varianza es intraespecífica, mientras que la interespecífica es del 40.89%, como muestran los datos de la Tabla 22.

VARIANZA	PORCENTAJE DE VARIANZA
Intraespecífica	59.11
Interespecífica	40.89

Tabla 22 :Varianza intra e interespecífica de las secuencias espaciadoras tipo 2.

4.3.2.4 Análisis del proceso de homogenización y divergencia entre especies.

Para el espaciador tipo 2 encontramos un número más bajo de posiciones conservadas y mayor porcentaje de estados de transición avanzados (estados 3 y 4), cuando comparamos especies pertenecientes al mismo clado. Pero si la comparación la realizamos entre especies de clados distintos, observamos un porcentaje mayor de posiciones fijadas como ocurre en el caso de *A. brevirostrum* y *A. sinensis* o *A. transmontanus* y *A. naccarii*.

La comparación con la especie *A. sturio* proporciona poca información ya que tenemos sólo 1 secuencia de esta especie, pero hay pocas posiciones en estado 5, y sólo una compartida con el resto de especies.

	1	2	3	4	5	6	n-St	p-nucl.
FUL-BRE	87.23	10.63	2.12	0.00	0.00	0.00	0.02	94
NAC-BRE	82.60	14.13	0.00	1.08	0.00	0.00	2.19	92
NAC-SIN	79.78	14.89	2.12	0.00	2.12	0.00	1.09	94
BRE-SIN	79.16	11.45	1.04	1.04	2.08	0.00	5.23	96
BRE-TRA	84.04	8.51	1.06	1.06	2.12	0.00	3.21	94
TRA-SIN	81.25	12.50	2.08	0.00	1.04	0.00	3.13	96
TRA-NAC	86.17	8.51	0.00	0.00	2.12	1.06	2.14	94

Tabla 23 : Estados de Transición para las secuencias espaciadoras tipo 2 calculados siguiendo el método de Strachan *et al.* 1985. Las dos últimas columnas corresponden a las posiciones no-Strachan y el total de posiciones nucleotídicas comparadas respectivamente.

De la misma forma que para las secuencias espaciadoras de tipo 1, en el alineamiento de las secuencias espaciadoras del tipo dos (Figura 23), encontramos posiciones que pueden diferenciar entre especies, aunque hay que tener en cuenta el número limitado de secuencias de que disponemos. Aún así, encontramos como posiciones diagnóstico las posiciones 64 y 83, que diferencian al clado Pacífico del resto de especies analizadas. Tan solo hemos encontrado una posición (117) que diferencia a la especie *A. sturio* del resto.

4.3.2.5 Clasificación de los sitios polimórficos.

Como ocurre con el espaciador tipo 1, en esta ocasión encontramos que el 90% de los sitios polimórficos son autapomorfias y el 10% son homoplasias.

4.3.2.6 Análisis de la conversión génica.

Como en el caso anterior, si bien el número de comparaciones que se pueden establecer es muy bajo, igualmente encontramos que la conversión génica es un mecanismo que actúa homogenizando las secuencias espaciadoras de los esturiones.

4.4 ANÁLISIS DE LOS EJEMPLARES DE ESTURIÓN CAPTURADOS EN EL MEDITERRÁNEO OCCIDENTAL.

En un intento de aclarar el estatus taxonómico de los ejemplares capturados en los últimos años en el Rio Guadalquivir y conservados en la Estación Biológica de Doñana, y de otros ejemplares capturados en la región del Adriático y en el Mediterráneo occidental, en general, y conservados en diferentes museos italianos, hemos tratado de extraer su ADN y estudiar los marcadores descritos anteriormente.

Hemos desarrollado técnicas forenses como las descritas en Material y Métodos para obtener ADN en las mejores condiciones posibles. En las diferentes extracciones que se han realizado, el ADN presentaba claros signos de degradación pero la concentración de las muestras ha resultado suficiente para permitir aplicar la técnica de amplificación mediante PCR.

En estos especímenes hemos tratado de analizar los tres marcadores nucleares, las dos familias de ADN satélite *HindIII* y *PstI*, y las secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S, que hemos estudiado en los apartados previos.

También hemos estudiado dos marcadores citoplasmáticos, un fragmento del gen del citocromo b y un fragmento del gen ribosómico 12S, ambos de la mitocondria. Los datos obtenidos en estos ejemplares se han comparado con los de ejemplares de las especies *A. naccarii* y *A. sturio*, las dos especies implicadas en la controversia.

4.4.1 ANÁLISIS DE LOS MARCADORES NUCLEARES.

4.4.1.1 Análisis de la Familia de ADN satélite *HindIII*.

Como hemos mencionado en el apartado 4.1, la familia de ADN satélite *HindIII* no está presente en el genoma de *A. sturio* pero sí en el de *A. naccarii*. Así, en orden a determinar si los diferentes ejemplares de museo objeto de nuestro estudio pertenecen o no a la especie *A. sturio*, hemos estudiado la presencia de estas secuencias *HindIII* en el genoma de dichos ejemplares mediante hibridación sobre dot-blot (Tabla 24). Para ello, una alícuota conteniendo ADN genómico total sin digerir de cada uno de los ejemplares fue depositada sobre una membrana de nylon. Aplicamos también una alícuota de ADN genómico de las especies *A. naccarii* y *A. sturio*, de manera que sirvieran de control positivo, la primera especie (porque presenta en su genoma la familia de ADN satélite *HindIII*), y como control negativo, la segunda (ya que no presenta ese satélite). Utilizamos como sonda la unidad monomérica de ADN satélite *HindIII* (pHAn 19) de la especie *A. naccarii* y seguimos el protocolo de marcaje descrito en el apartado 3.4.4. de Material y Métodos.

Tanto realizando los lavados de la membrana a baja como a alta astringencia, pudimos observar que los ejemplares (MZUF5700, MZUF6472, MZUF5704 y MSNG40364), capturados en la región Adriática y regiones de Livorno y Génova (Italia) que están clasificados como *A. naccarii* presentan la familia de ADN satélite *HindIII*. Otros ejemplares, capturados en la región de Livorno y la Península Ibérica, y clasificados como *A. sturio*, no presentan este ADN satélite (MZUF5716, MNCZ1582 y UGRA1). Sin embargo, existen ejemplares cuya clasificación no concuerda con la presencia de este ADN satélite en su genoma (están clasificados como *A. sturio* y sí presentan este satélite). Estos ejemplares son: el ejemplar capturado en la región de Salerno (MZUF5714) y los tres ejemplares capturados en el Río Guadalquivir (EBD8173, EBD8401 y EBD8173). (Tabla 24).

ESPÉCIMEN	ESTATUS ESPECÍFICO	PROCEDENCIA	PRESENCIA/ AUSENCIA DEL ADN SATÉLITE <i>HindIII</i>	MARCADORES ESTUDIADOS (Número de secuencias analizadas)
<i>A. naccarii</i>	<i>A. naccarii</i>	Río Po, Italia	+	<i>HindIII</i> (11) <i>PstI</i> (5) Espaciador gen 5S (9) Gen Citb (1) Gen 12S (1)
EBD8173	<i>A. sturio</i>	Río Guadalquivir. Alcalá del Río, Sevilla. España.	+	<i>HindIII</i> (1) <i>PstI</i> (4) Espaciador gen 5S (2) Gen Citb (1) Gen 12S (2)
EBD8401	<i>A. sturio</i>	Río Guadalquivir. Coria del Río, Sevilla. España.	+	<i>HindIII</i> (2) <i>PstI</i> (6) Espaciador gen 5S (6) Gen Citb (1) Gen 12S (3)
EBD8174	<i>A. sturio</i>	Río Guadalquivir. Alcalá del Río, Sevilla. España.	+	<i>HindIII</i> (1) <i>PstI</i> (3) Espaciador gen 5S (5) Gen Citb (2) Gen 12S (1)
MZUF5700	<i>A. naccarii</i>	Región Adriática	+	na
MZUF6472	<i>A. naccarii</i>	Región Adriática	+	na
MZUF5704	<i>A. naccarii</i>	Región de Livorno, Italia	+	na
MSNG40364	<i>A. naccarii</i>	Región de Génova, Italia	+	na
MZUF5714	<i>A. sturio</i>	Región de Salerno, Italia	+	na
MZUF5716	<i>A. sturio</i>	Región de Livorno, Italia	-	na
MNCZ1582	<i>A. sturio</i>	Río Guadalquivir, Sevilla. España.	-	na
UGRA1	<i>A. sturio</i>	Río Guadalquivir, Sevilla.	-	na
<i>A. sturio</i>	<i>A. sturio</i>	Río Gironda, Francia	-	<i>PstI</i> (5) Espaciador gen 5 (7) Gen Citb (1) Gen 12S (1)

Tabla 24: Resumen de la procedencia, el estatus taxonómico de los especímenes de museo analizados y las secuencias obtenidas para cada uno de los marcadores estudiados. na: no analizado.

Para comprobar que las muestras de ADN en los cuales no había hibridación para esta familia de ADN satélite se encontraban en buen estado de conservación, se hibridó la misma membrana con ADN ribosómico 5S (el inserto del plásmido Nac-12 correspondiente a la especie *A. naccarii*) como control positivo. Todos los ADN presentaron hibridación. De la misma forma, para comprobar que la señal de hibridación era específica, se utilizó como control negativo de la hibridación un ADN satélite de otra familia de peces (el inserto del plásmido pUD112 de *Pagrus auriga*, Sparidae). No apareció hibridación en ningún individuo, ni a baja ni a alta astringencia.

Dado su mejor estado de conservación, los ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana han sido estudiados más en profundidad para los diferentes marcadores, tanto nucleares como mitocondriales.

Así, mediante amplificación por PCR utilizando los cebadores STUR-1 y STUR-2, hemos puesto de manifiesto que los tres ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana tenían el ADN satélite *Hind*III en su genoma. (Figura 25).

Hemos purificado y clonado los amplificadores de los ejemplares EBD8401 y EBD8174. De esta forma hemos obtenido dos unidades completas *Hind*III del espécimen EBD8401 y un fragmento de 57 pares de bases del EBD8174. Del ejemplar EBD8173 ya se había puesto de manifiesto la secuencia de una unidad monomérica (clon pA11) obtenida mediante clonación convencional (Garrido-Ramos et al., 1997).

De esta forma, el análisis de la familia de ADN satélite *Hind*III resulta esclarecedor ya que este ADN satélite no está presente en el genoma de la especie *A. sturio* y en este trabajo hemos puesto de manifiesto que las secuencias *Hind*III están presentes en los tres ejemplares del Guadalquivir, tanto por hibridación tipo dot-blot, como por amplificación mediante PCR. En la Figura 26 podemos observar el alineamiento de las secuencias *Hind*III para cada uno

de los ejemplares EBD estudiados, junto con las obtenidas para la especie *A. naccarii*.

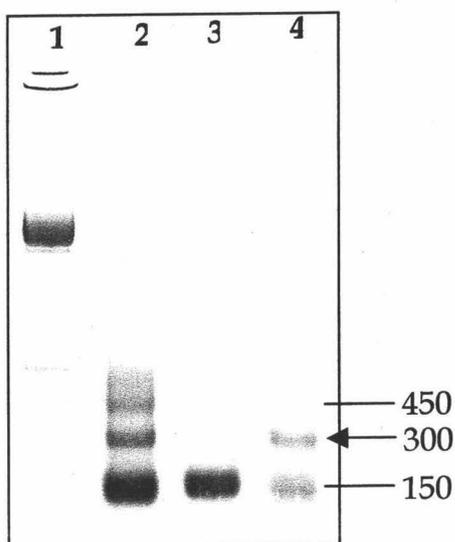


Figura 25: Electroforesis en gel de agarosa de la familia de ADN satélite *HindIII* amplificada mediante PCR en los ejemplares capturados en el Guadalquivir. Los números corresponden a los diferentes especímenes: (2)EBD8173, (3) EBD8174 y (4) EBD8401. El número (1) corresponde al marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Las cifras de la derecha de la figura indican el tamaño en pares de bases de los fragmentos generados correspondientes a las unidades multiméricas del satélite *HindIII*. La flecha corresponde a la unidad dimérica escindida del gel a partir de la cual hemos realizado las clonaciones de cada uno de los especímenes estudiados.

Nuestro estudio revela que las secuencias obtenidas se asemejan bastante a las de la especie *A. naccarii* dado que la distancia media de las secuencias *HindIII* de los ejemplares de la Estación Biológica de Doñana frente a las secuencias de *A. naccarii* es de 0.047. Este valor entra dentro de los parámetros de variación intraespecífica de *A. naccarii* (con un valor medio de 0.033; ver Tabla 6).

NAC3	CTTTTTCAAA	CTTTTGGGGC	ATTGAAATTA	TGAAAAAATA	AAATTGG-CC	AAAATTATTA	60
NAC5T	
NAC18	
NAC25C.....	
NAC31	
NAC40G	
NAC49	
NAC19	AGC.C.....	
NAC29	AGC.C.....	
NAC43	AGC.C.....	
NAC52	AGC.C.....T.....	
EBD8173-1T..TT.G..	
EBD8401-5	AGC.C.....	
EBD8401-6	AGC.C.....	..C.....	
EBD8174-37	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
NAC3	TTTTTTT-GA	CAGGACCGGA	CCAGACCACT	TTTTCAAAA	AGGGGGATGT	CTAAATTTTG	120
NAC5TC...	
NAC18	
NAC25C...	
NAC31	
NAC40T.....G...	
NAC49	
NAC19	
NAC29	
NAC43	
NAC52	..G.....	
EBD8173-1T	G.....C...	
EBD8401-5AA	
EBD8401-6	G...T.....T...C...C...	
EBD8174-37	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
NAC3	GTAGTTCTGA	AGATCAAAA	ATTGTGTTTT	CTTGACAGGA	ACGAACCTGT	AAG	173
NAC5T...G	
NAC18G.....	
NAC25	..T.....	
NAC31	
NAC40G...	..A.....	
NAC49CC.....	
NAC19	
NAC29A.....	
NAC43	
NAC52	..G.....	
EBD8173-1T	
EBD8401-5	
EBD8401-6C.....T.T.T	CT.....	
EBD8174-37	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

Figura 26 : Alineamiento de las secuencias *HindIII* obtenidas para cada uno de los ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana así como para la especie *A. naccarii*.

4.4.1.2 Análisis de la Familia de ADN satélite *PstI*.

De la misma forma, tratamos de poner de manifiesto la presencia de la familia de ADN satélite *PstI* en el genoma de los tres especímenes conservados en la Estación Biológica de Doñana, amplificándolo con los cebadores diseñados para tal fin. El resultado de esta PCR se muestra en la Figura 27.

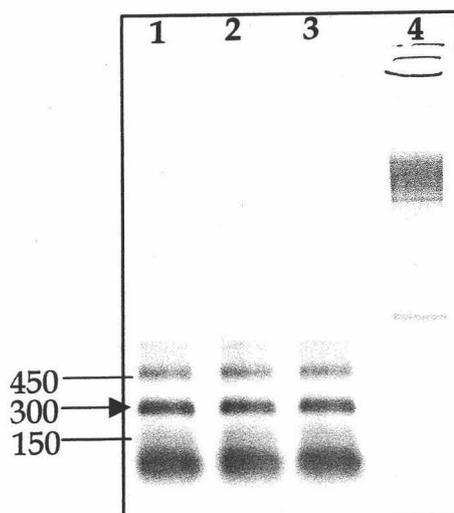


Figura 27 : Electroforesis en gel de agarosa de la familia de ADN satélite *PstI* amplificada mediante PCR en los especímenes EBD. (1) EBD8173, (2) EBD8401, (3) EBD8174, (4) marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Las cifras a la izquierda de la figura indican el tamaño en pares de bases de los fragmentos amplificados. La flecha corresponde a la unidad dimérica escindida del gel a partir de la cual hemos realizado las clonaciones en cada uno de los ejemplares analizados.

Como hemos comprobado en el apartado 4.2.1, esta familia de ADN satélite *PstI* está presente en los géneros *Acipenser*, *Huso* y *Scaphirhynchus*, incluyendo las especies *A. sturio* y *A. oxyrinchus*. El procedimiento que se ha seguido para la obtención de las secuencias *PstI* es el mismo que para obtener esta familia de ADN satélite en cualquiera de las especies de esturión analizadas.

Hemos secuenciado un total de 14 clones entre los tres ejemplares. El alineamiento de estas unidades monoméricas, junto con las unidades de repetición *PstI* correspondientes a las especies *A. naccarii* y *A. sturio*, se muestra en la Figura 28.

NAC19	CGCTCTTCAC	[*] CAGCCA-CTG	CTTTCACTCA	CC-ACAACCTA	[*] GAAAGCTACT	CGC-TTGCAG	GTAGTC---A	GCCGTACAGC	80
NAC8	...G...C	..A...-	
NAC24TG.TGAGCG.C	
NAC30TG.TGAGCG.C	
NAC90ATC	
EBD8173-5G.T	
EBD8173-15	A.....G-G-C.GCT.C	
EBD8173-14GC	
EBD8173-23T	N.....G.TGAGCGT	
EBD8401-7A	AT.....	T.....T	T.....CT	
EBD8401-7B	A.....N	T.....	T.....C.T.T	T.....CA.C.G	
EBD8401-30	A.....	T.....T	T.....CC.T	
EBD8401-32	A.....	T.....T	T.....CC.T	
EBD8401-44	A.....	T.....T	T.....CC.T	
EBD8401-47	A.....	T.....T	T.....CC.T	
EBD8174-9	CT.....G	G.....C	
EBD8174-30	T.....G-GC	
EBD8174-55	T.....	AT.....G	T.....GC	
STU2	T...G...T	G.T...-TC	A...TC	
STU6	T...G...T	G.T...-TC	A...TCG	
STU5	T...G...T	G.T...-TC	A...TCG	
STU24	T...G...T	G.T...-TC	A...TCG	
STU25	.C.....T	A.AAATAT	T.....	T...TC.T	
NAC19	-GCAA-GTGC	ACTGGTGTG	CACC--GGAA	CGCCCC-CTG	GTGGTGGACC	CGGGG-GCTG	CA-GGTGCTG	TCATTTCACA	160
NAC8G	T.....A	
NAC24CGATA	
NAC30CGATA	
NAC90CAGTAT	
EBD8173-5	G.....GTA	
EBD8173-15C	G.....	T.....G	C.....A	
EBD8173-14	G.....GGTA	
EBD8173-23	T.....CGATAA	
EBD8401-7A	GC.....GT.TA	
EBD8401-7B	T.....	N.....ACTA	
EBD8401-30	G.....AGA	
EBD8401-32	G.C.....GTA	
EBD8401-44	G.....AGA	
EBD8401-47	G.....AGA	
EBD8174-9GGGT.GTTA	
EBD8174-30	T.....	G.....GTA	
EBD8174-55	G.....GTA	
STU2	T...-CA	G.AGCG	CA.G	A.C.....AT	
STU6	T...-CA	G.AGCG	CA.G	A.C.....AT	
STU5	T...-CA	G.AGCG	CA.G	A.C.....AT	
STU24	T...-CA	G.AGCG	CA.G	A.C.....AT	
STU25	-C...-CAT	G.C.....	G	GC.T	TTA-	A.A.....G	
NAC19	GCTGAAGCGC	TGTGATCGTA	GAAGCTGTC-	AGGCTCTATT	CACGCGCTTT	GATTGGC-TG	TGAATGGTGG	CAA	233
NAC8AAC.C-T.T.TT	
NAC24TC.C-	T...T	
NAC30TC.C-	T...T	
NAC90C.C-	G...T.TAT	
EBD8173-5A	A.A.AA.C-	A.T	C...-	
EBD8173-15A	T GCC	
EBD8173-14AG	T GCC	
EBD8173-23T	C...CCG.C	T...T	C...T	
EBD8401-7AGGG	
EBD8401-7BA.C-GNTGG	
EBD8401-30GT	T GCC	
EBD8401-32	A.....	T...A	TGG	
EBD8401-44	A.....GT	TGG	
EBD8401-47GT	TGG	
EBD8174-9TTA	C AT	
EBD8174-30A	C AT	
EBD8174-55TT-AA	G..	
STU2	T...T	A...CTTA-GCTT	
STU6	T...T	A...CTTA-GCTT	
STU5	T...T	A...CTTA-GCTT	
STU24	T...T	A...CTTA-GCTT	
STU25	AT.....CA.C-T	A.A.G...G	

Figura 28: Alineamiento de las unidades monoméricas *PstI* correspondientes a las especies *A. naccarii*, a *A. sturio* y a los ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana. Las posiciones marcadas en negrita corresponden a los estados de transición 4; las sombreadas en gris, los estados de transición 5 y los asteriscos (*) las 6. Las posiciones 1, 11, 40, 51, 64 y 80 hacen más diferentes las secuencias del ejemplar EBD8401 en comparación con las secuencias de la especie *A. naccarii* e incluso con el resto de secuencias pertenecientes a los EBD.

En este alineamiento hemos señalado posiciones que claramente diferencian las secuencias *A. sturio* de las secuencias de *A. naccarii* y, a su vez, de las de los EBD. En concreto, hemos encontrado estados de transición en avanzado estado de homogenización y fijación (4, 5 y 6) entre las secuencias de *A. sturio* y el conjunto de secuencias pertenecientes a los ejemplares EBD8173, EBD8401, EBD8174 y la especie *A. naccarii*. La mayoría de posiciones están conservadas (estado de transición 1) o se encuentran en niveles de homogenización bajos (estados 2 y en menor medida 3), cuando comparamos las secuencias de los EBD con las secuencias *PstI* de *A. naccarii*. Cuando esta comparación se realiza con la especie *A. sturio*, observamos que el número de posiciones conservadas disminuye y aumenta la cantidad de sitios que se encuentran en niveles superiores de homogenización (estados 3 y 4), encontrando incluso posiciones fijadas (estados 5 y 6). La Tabla 25 muestra las posiciones nucleotídicas que se encuentran en estados de transición superiores.

Estados de transición	Posiciones nucleotídicas
4	30-109-151-160
5	53-71-162
6	14-45

Tabla 25 : Estados de transición 4, 5 y 6 calculados siguiendo el método de Strachan *et al.*,(1985) para la comparación de secuencias *PstI* de la especie *A. sturio* frente a secuencias *PstI* de la especie *A. naccarii* y ejemplares del Guadalquivir.

Como muestra la Figura 28, podemos comprobar que las secuencias *PstI* del ejemplar EBD8401 presentan más diferencias con las secuencias de la especie *A. naccarii* para este satélite porque existen 6 posiciones (1, 11, 40, 51, 64 y 80) que hacen diferentes las secuencias de este ejemplar incluso con las secuencias *PstI* del resto de los EBD.

Un análisis filogenético nos da un árbol de secuencias como el de la Figura 29. En este árbol observamos que aparecen bien diferenciadas las

secuencias de *A. sturio* por un lado y el resto de secuencias por otro. Agrupadas entre sí aparecen las secuencias *Pst*I del ejemplar EBD8401 que, según el análisis, son las que presentan menos semejanza con las de la especie *A. naccarii*. También aparecen agrupadas las secuencias del ejemplar EBD8174, que presenta algo más de similitud con la especie *A. naccarii* que el ejemplar EBD8401. Las secuencias del ejemplar EBD8173 aparecen entremezcladas con las secuencias de *A. naccarii* y las del ejemplar EBD8174.

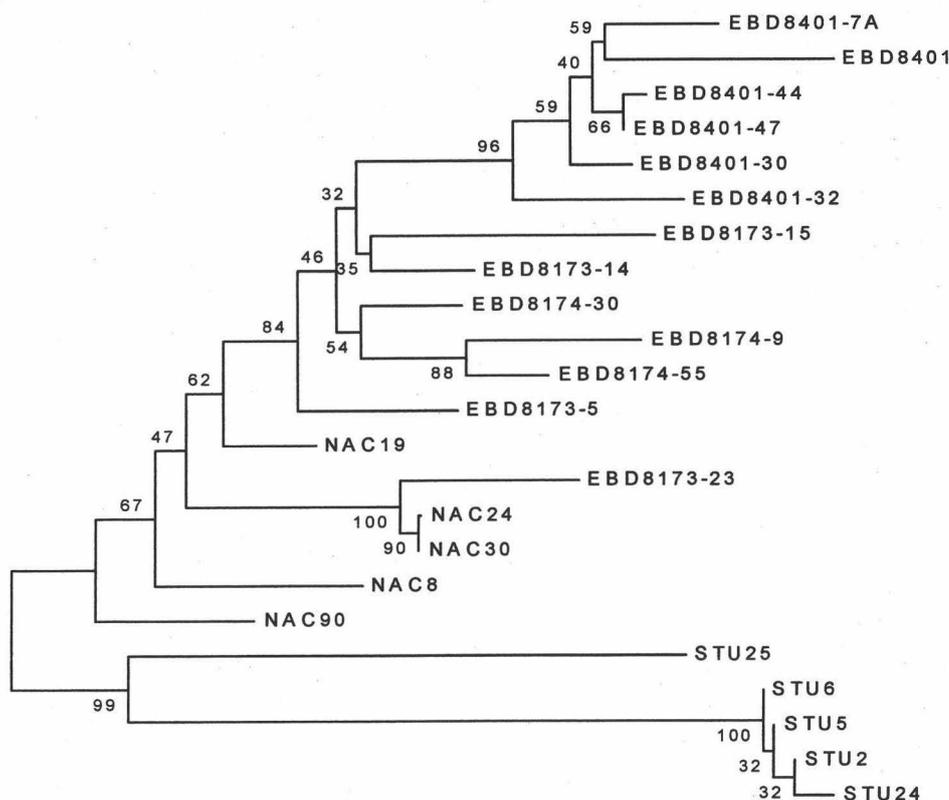


Figura 29: Árbol de secuencias monoméricas de familia de ADN satélite *Pst*I pertenecientes a los ejemplares EBD y a las especies *A. naccarii* y *A. sturio*.

4.4.1.3 Análisis de las secuencias espaciadoras de los genes de ARN ribosómico 5S.

Igual que para el análisis de las secuencias espaciadoras estudiadas en el resto de especies, hemos utilizado los cebadores ETS-for y 5S-rev para

amplificar las unidades ribosómicas 5S en los ejemplares EBD8173, EBD8401 y EBD8174. El resultado de esta PCR se muestra en la Figura 30.

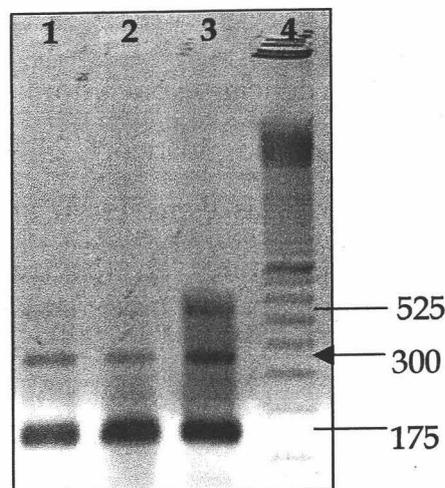


Figura 30: Electroforesis en gel de agarosa de los genes ribosómicos 5S amplificados mediante PCR en los especímenes EBD. (1) EBD8401, (2) EBD8174, (3) EBD8173, (4) marcador de peso molecular de 100 pares de bases. Las cifras a la derecha de la figura indican el tamaño en pares de bases de los fragmentos amplificados. El asterisco (*) corresponde a la unidad dimérica escindida del gel a partir de la cual hemos realizado las clonaciones en cada uno de los ejemplares analizados.

El amplificado de 300 pares de bases de los distintos ejemplares fue clonado y secuenciado.

Tras el alineamiento de las unidades espaciadoras pertenecientes a los tres especímenes, comprobamos la existencia de unidades de distinta longitud, 98 y 112 pares de bases. En las secuencias obtenidas de los ejemplares EBD, el análisis de las posiciones nucleotídicas que eran diagnóstico para la discriminación entre los dos tipos de espaciadores, confirman que, en este caso, también se obtienen dos tipos de secuencias.

El análisis de las secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S obtenidas para los tres ejemplares EBD, y para las especies *A. naccarii* y *A. sturio*

se ha realizado teniendo en cuenta los dos tipos anteriormente descritos, si bien el número de secuencias representativo de cada subfamilia es bajo.

4.4.1.3.1 *Secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S Tipo 1.*

En el alineamiento de las secuencias espaciadoras del tipo 1 mostrado en la Figura 31, encontramos posiciones diagnóstico 1, 24, 38, 39, 46, 47, 48, 59, 61, 77, 81 y 85 capaces de diferenciar a las especies *A. naccarii* de *A. sturio*. Las variantes encontradas en esas posiciones en los tres ejemplares EBDs se corresponden con las de la especie *A. naccarii* y no con las de *A. sturio*.

NAC12	ACATTTTGT	AATTACATT	TACAATTGAA	ATGTGTG--G	AGGAC---AA	AAGGAAATTT	60
NAC29	----	-----	-----	-----	-----	
EBD8173-19	----	-----	-----G--G.	-----	
EBD8173-13	----	-----A.	-----	-----	
EBD8401-30A	----	-----	-----	-----T.	-----	
EBD8401-30B	----	-----	-----	-----T.	-----	
EBD8401-60	----	-----	-----	-----T.	-----A	
EBD8174-11	----	-----	-----	-----	-----	
EBD8174-29	.T.....	----	-----	-----	-----	-----	
EBD8174-32	----	-----	-----	-----T.	-----	
EBD8174-45	----	-----	-----	-----T.	-----	
STU1	C.....	----	-----C	-----GAAAA.	-----C	
STU2	C.....	----	-----C	-----GAAAA.	-----C	
STU3	C.....	----	-----C	-----GAAAA.	-----C	
STU4	C.....	----	-----C	-----GAAAA.	-----C	
STU5	C.....C	----	-----C	-----GAAAA.	-----C	
STU6	C.....A	----	-----C	-----GAAAA.	-----C	
NAC12	TGGAGGAATC	ACCCCCAGCT	CACTAAACAT	AAAAGTCATG	AAA-GCAGAA	ATGCAATC	118
NAC29	-----	-----G.....	-----	-----	
EBD8173-19	-----CG.	-----	-----C.....	
EBD8173-13	-----	-----	-----	-----A.....	
EBD8401-30A	-----	.G.....TGT.	-----	-----	
EBD8401-30B	-----	.G.....TGT.	-----C.A	
EBD8401-60	-----	.G.....TGT.A.....C.-	
EBD8174-11	-----	-----	-----	-----	-----	
EBD8174-29	-----	-----	-----	-----	-----	
EBD8174-32	-----	.G.....TGT.	-----	-----	
EBD8174-45	-----	.G.....TGT.	-----	-----	
STU1	C.....G....	T...CT	-----A	-----CA....	
STU2	C.....	G...T.G.	T...CT	-----	-----	-----	
STU3	C.....G....	T...CT	-----A	-----CA....	
STU4	C.....G....	T...CTA	-----CA....	
STU5	C.....G....	T...CTA	-----CA....	
STU6	CTT.....G....	T...CT	-----	-----	-----	

Figura.31 : Alineamiento de las secuencias espaciadoras tipo 1 de los genes ribosómicos 5S en las especies *A. naccarii* y *A. sturio*, así como en los tres ejemplares EBDs. El sombreado indica las posiciones que diferencian a las dos especies. Para esas variantes las secuencias de los especímenes conservados en la Estación Biológica de Doñana, se parecen a la especie *A. naccarii*.

El correspondiente árbol de secuencias (Figura 32) demuestra que las de los ejemplares EBD8173, EBD8174 EBD8401 y las de la especie *A. naccarii* aparecen entremezcladas entre sí, pero completamente alejadas de las *A. sturio*.

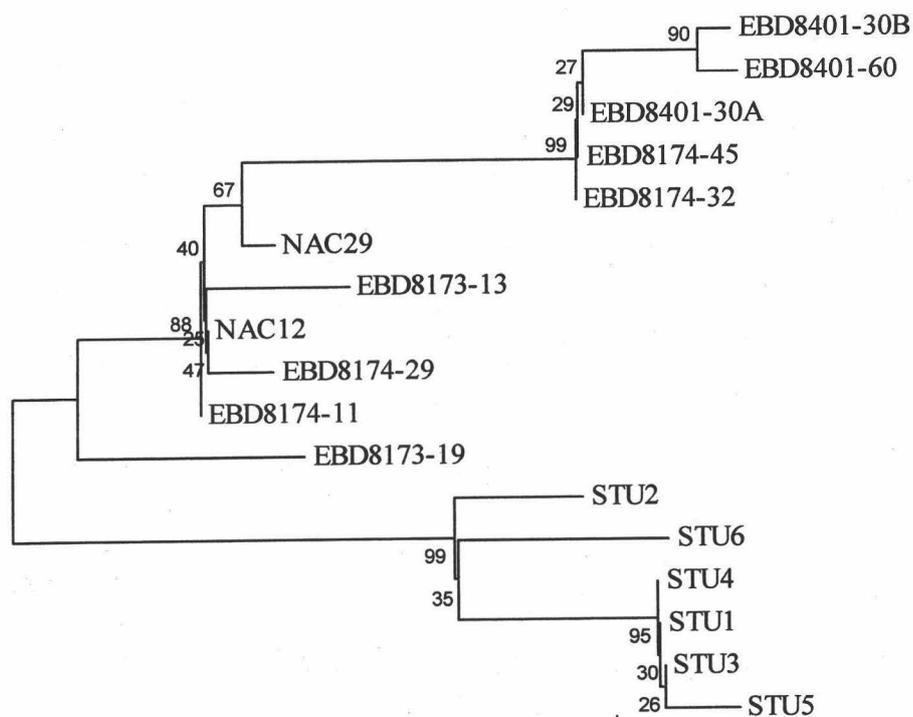


Figura 32 : Árbol de secuencias espaciadoras tipo 1 correspondiente a los ejemplares capturados en el río Guadalquivir y a las especies *A. naccarii* y *A. sturio*.

4.4.1.3.2 Secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S Tipo 2.

En el alineamiento de las secuencias espaciadoras tipo 2 de los ejemplares EBD y las especies *A. naccarii* y *A. sturio* podemos observar un número de secuencias todavía más bajo que para el caso del espaciador tipo 1 (Figura 33). Para la única variante encontrada en la posición 117, los ejemplares EBDs se parecen a *A. naccarii* y no a *A. sturio*.

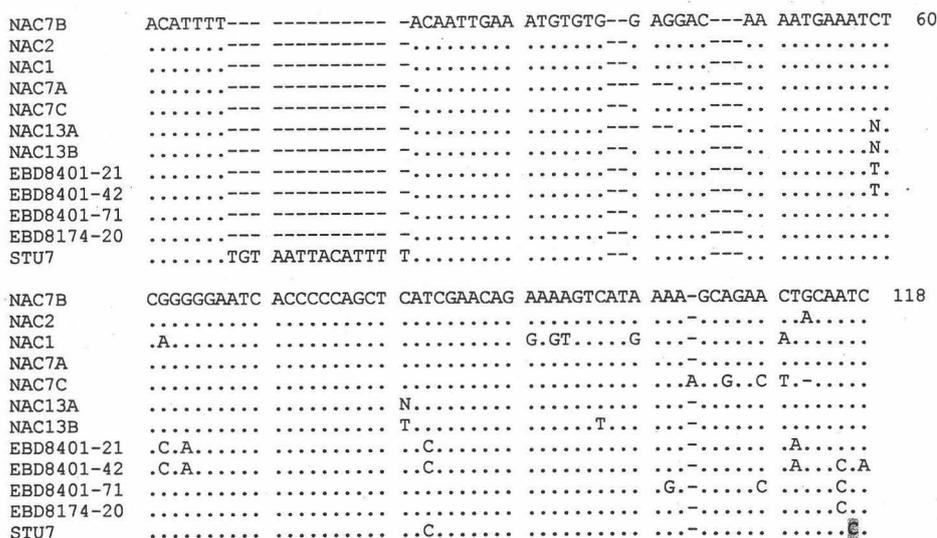


Figura 33 : Alineamiento de las secuencias espaciadoras tipo 2 de las especies *A. naccarii*, *A. sturio* y los tres ejemplares EBDs. El sombreado indica la única posición que diferencia a las dos especies. Para esa variante las secuencias de los especímenes conservados en la Estación Biológica de Doñana, se parecen a la especie *A. naccarii*.

En el árbol de secuencias realizado (Figura 34), aparecen entremezcladas las de los ejemplares EBD8174, EBD8401 y las de la especie *A. naccarii* y permanecen alejadas de la especie *A. sturio*.

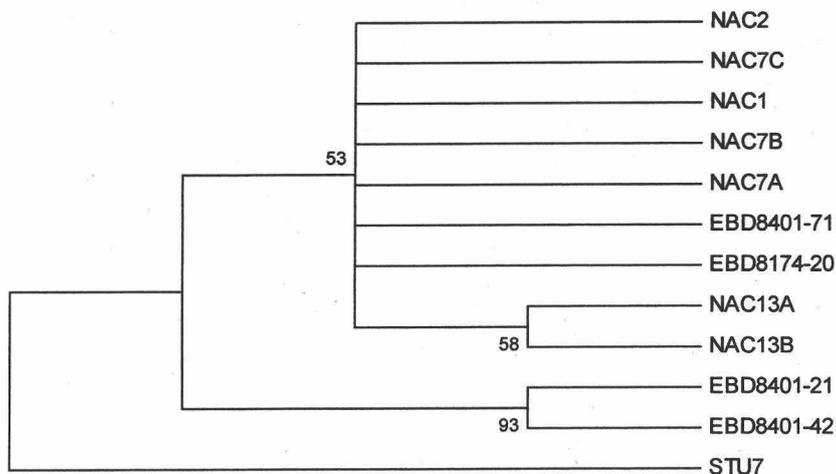


Figura 34: Árbol de secuencias espaciadoras tipo 2 correspondiente a los ejemplares capturados en el río Guadalquivir y a las especies *A. naccarii* y *A. sturio*.

Por tanto, el análisis de los marcadores nucleares demuestra que los ejemplares EBD8173, EBD8401 y EBD8174 no son *A. sturio*. Estos marcadores demuestran que estos ejemplares podrían pertenecer a la especie *A. naccarii* que es la otra especie citada en el río Guadalquivir.

De todas formas, hay que tener en cuenta que, como hemos puesto de manifiesto en apartados anteriores de los resultados, las secuencias monoméricas de las familias de ADN satélite *HindIII* y *PstI*, así como las secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S, se caracterizan por la ausencia de evolución concertada. Como hemos visto en los diferentes apartados correspondientes a cada marcador, las secuencias de las distintas especies únicamente aparecen reunidas siguiendo la agrupación cladística filobiogeográfica descrita en Ludwig *et al.*, (2001). Por ello, para las secuencias correspondientes a los tres marcadores nucleares de los ejemplares EBD8173, EBD8401 y EBD8174, hemos analizado la organización cladística que presentan teniendo en cuenta el conjunto total de especies.

Para cada uno de los marcadores analizados, encontramos que las secuencias pertenecientes a los EBDs, al igual que ocurre al comparar las secuencias de *A. naccarii* con el resto de especies, se entremezclan con las secuencias de las especies englobadas en el clado del Atlántico; es decir, encontramos su agrupación con las secuencias pertenecientes a las especies *A. naccarii*, *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. ruthenus*, *H. huso*, entre otras, permaneciendo perfectamente diferenciadas del clado del Pacífico, del clado *Scaphirhynchus* y del clado *A. sturio*-*A. oxyrinchus*, tal como se muestra, para el caso de las secuencias *PstI* por ejemplo, en el árbol obtenido mediante el método de neighbor-joining de la Figura 35.

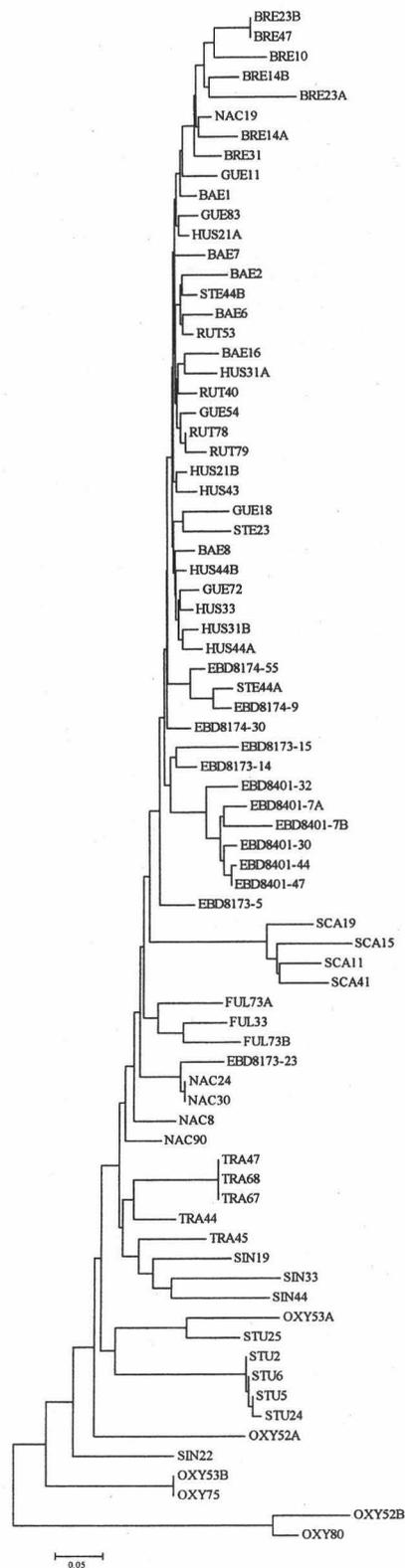


Figura 35 : Árbol filogenético realizado con las unidades monoméricas *PstI* de todas las especies analizadas junto con las obtenidas para los ejemplares EBD.

4.4.2 ANÁLISIS DE LOS MARCADORES MITOCONDRIALES.

En este trabajo, hemos logrado amplificar un fragmento de 212 pares de bases pertenecientes al citocromo b y un fragmento de 139 pares de bases del gen ribosómico 12S de la mitocondria en los tres ejemplares de la Estación Biológica de Doñana objeto de estudio. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

4.4.2.1 Análisis del gen del citocromo b.

Con los cebadores Cytb-2F y Cytb-3R hemos amplificado mediante PCR (Figura 36) un fragmento del citocromo b de 212 pares de bases en los tres ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana y en las especies *A. naccarii* y *A. sturio*

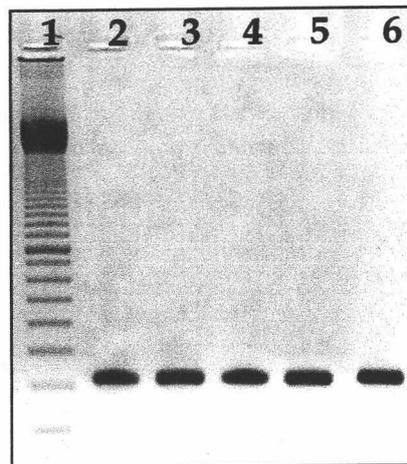


Figura 36: -Electroforesis en gel de agarosa del resultado de la PCR con los cebadores Cytb-2F y Cytb-3R. Se observa el fragmento de 212 pares de bases amplificado en los ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana, EBD8173 (2), EBD8401 (3), EBD8174 (4), y las especies *A. naccarii* (5) y *A. sturio* (6). El número (1) corresponde al marcador molecular de 100 pares de bases.

Este fragmento, una vez purificado, se clonó y obtuvimos las secuencias para cada uno de los casos analizados. La Tabla 24 muestra el número de secuencias obtenidas en cada caso.

Se realizó una búsqueda de secuencias homólogas a las secuencias obtenidas en la base de datos del GenBank y de EMBL mediante el uso del programa BLAST. Pudimos comprobar que el fragmento del citocromo b secuenciado en los ejemplares EBD8173 y EBD8401 y *A. naccarii* presentan una similitud del 100% con secuencias del citocromo b de la especie *A. naccarii* depositadas en la base de datos (AF283730, AF006150); por el contrario la secuencia del ejemplar EBD8174 y la de *A. sturio* presentan una semejanza del 100% con secuencias de la especie *A. sturio* depositadas en la base de datos (AF283742, AF006134).

Como observamos en el alineamiento de la Figura 37, encontramos 11 posiciones (16, 25, 49, 52, 70, 118, 127, 130, 157, 166 y 169) que difieren entre las especies *A. naccarii* y *A. sturio*. Para esas posiciones los ejemplares EBD8173 y EBD8401 se parecen a *A. naccarii* mientras que en el ejemplar EBD8174 las variantes se corresponden con las de *A. sturio*.

<i>A. naccarii</i>	ATTTCTTGCA	ATACACTACA	CAGCTGACAT	TCAACAGCC	TTCTCCTCTG	TGCCCCACAT	60
EBD8173-11	
EBD8401-36	
EBD8174-20	
EBD8174-34	
<i>A. sturio</i>	
<i>A. naccarii</i>	CTGCCGAGAC	GTA AATTACG	GATGACTAAT	CCGAAATATT	CATGCAAACG	GGGCCTCCTT	120
EBD8173-11	
EBD8401-36	
EBD8174-20	
EBD8174-34	
<i>A. sturio</i>	
<i>A. naccarii</i>	CTTCTTTATC	TGCTTG TACC	TTCACGTAGC	ACGAGGTATA	TACTATGGTT	CAT	173
EBD8173-11	
EBD8401-36	
EBD8174-20	
EBD8174-34	
<i>A. sturio</i>	

Figura 37: Alineamiento de los fragmentos de citocromo b obtenidos para los tres ejemplares EBD y *A. naccarii* y *A. sturio*. Los sombreados grises indican las posiciones que hacen diferente la secuencia de *A. naccarii* y *A. sturio* y muestra cómo las variantes encontradas en el ejemplar EBD8174 se corresponden con *A. sturio*, mientras que las que se encuentran en EBD8173 y EBD8401 se corresponden con *A. naccarii*.

Cuando realizamos un árbol de distancias (Figura 38) con el conjunto de secuencias obtenidas del fragmento de 212 pares de bases para cada uno de los casos estudiados, observamos que las secuencias de los ejemplares EBD8173 y EBD8401 se agrupan con las de *A. naccarii*, mientras que las del EBD8174 lo hacen con las de *A. sturio*.

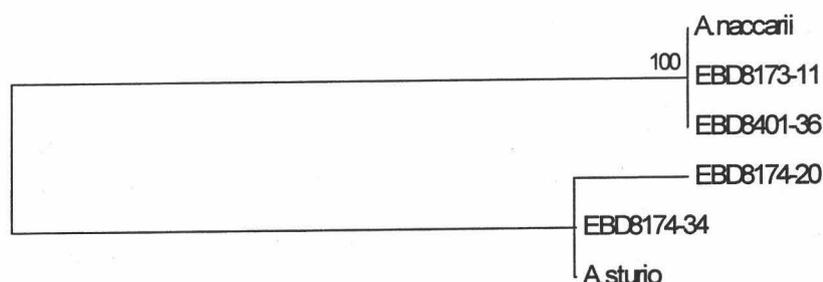


Figura 38: Árbol del citocromo b con los tres ejemplares EBD y las especies *A. naccarii* y *A. sturio*.

4.4.2.2 Análisis del gen ribosómico 12S.

Con los cebadores 12S-2R y 12S-3F logramos amplificar mediante PCR (Figura 39), un fragmento del gen ribosómico 12S de 139 pares de bases.

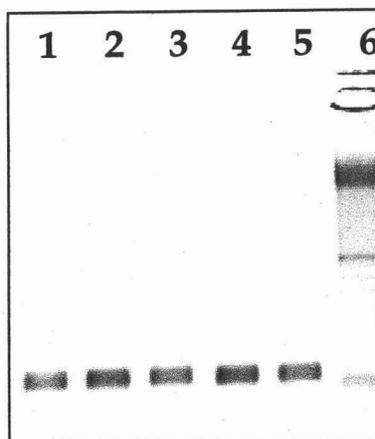


Figura 39: Electroforesis en gel de agarosa del resultado de la PCR con los cebadores 12S-2R y 12S-3F. Se observa el fragmento de 139 pares de bases amplificado en los ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana, EBD8173 (2), EBD8401 (3), EBD8174 (4), y las especies *A. naccarii* (1) y *A. sturio* (5). El número (6) corresponde al marcador molecular de 100 pares de bases.

Posteriormente, hemos seguido el proceso de clonación y secuenciación en cada uno de los ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana, así como en individuos de las especies *A. naccarii* y *A. sturio*. La Tabla 24 recoge el número de secuencias obtenidas en cada caso.

De la misma forma que para el estudio del fragmento del citocromo b, realizamos una búsqueda de secuencias homólogas a las secuencias obtenidas en la base de datos del GenBank y de EMBL mediante el uso del programa BLAST. Pudimos comprobar que los fragmentos del gen 12S secuenciados en los ejemplares EBD8173 y EBD8401 y *A. naccarii* presentan una similitud del 100% con secuencias del gen 12S de la especie *A. naccarii* depositadas en la base de datos (ANY12664, AF004971); por el contrario la secuencia del ejemplar EBD8174 y la de *A. sturio* presentan una semejanza del 100% con secuencias de la especie *A. sturio*.(AF004980, AF004981).

En el alineamiento de las secuencias obtenidas para el gen mitocondrial 12S (Figura 40), encontramos posiciones que diferencian las secuencias de los ejemplares EBD8173, EBD8401 y *A. naccarii* de las del ejemplar EBD8174 y *A. sturio*.

De nuevo, cuando realizamos un árbol de distancias con el conjunto de secuencias obtenidas (Figura 41), observamos la misma agrupación que en el caso anterior: las secuencias de los ejemplares EBD8173 y EBD8401 con las de *A. naccarii*, mientras que las del EBD8174 lo hace con las de *A. sturio*.

```

A.naccarii TTTCTATTTT CTTTTACTG CTAAATCCAC CTTCAACCAC TGGTTTCACA GTGTTATTCG 60
8173-9      .....
8173-12     .....
8401-29     .....
8401-35     .....
8401-30     .....
8174-20     .....
A.sturio    .....

A.naccarii TGTATTTTCT GTGTCAGAAA ATGTAGCCCA TTTCTTTCC 99
8173-9      .....
8173-12     .....
8401-29     .....
8401-35     .....
8401-30     .....
8174-20     .....
A.sturio    .....
    
```

Figura 40: Alineamiento de los fragmentos del gen ribosómico 12S obtenidos en los tres ejemplares EBD, y en *A. naccarii* y *A. sturio*. Los sombreados grises indican las posiciones que hacen diferente la secuencia de *A. naccarii* y *A. sturio* y muestra cómo las variantes encontradas en el ejemplar EBD8174 se corresponden con *A. sturio* y las de los ejemplares EBD8173 y EBD8401 se corresponden con las de *A. naccarii*.

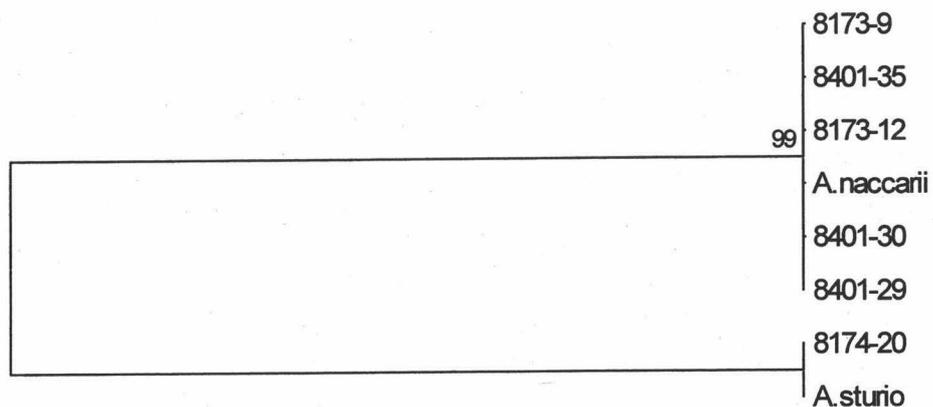
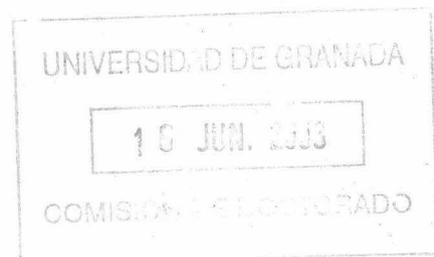


Figura 41: Árbol de los fragmentos del gen 12S de los tres ejemplares EBD y de las especies *A. naccarii* y *A. sturio*.



5 DISCUSIÓN.

5.1 ¿Experimenta el ADN repetido del genoma de los esturiones evolución concertada?

5.1.1 Características generales de las tres familias de ADN repetido analizadas.

En esta memoria, la familia de ADN satélite *HindIII*, previamente obtenida por De la Herrán *et al.* (2001a), se ha estudiado mediante hibridación tipo Southern-blot, dot-blot y PCR (Figuras 9 y 10), en las especies *A. naccarii*, *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. transmontanus*, *A. ruthenus*, *H. huso*, *A. sinensis*, *A. fulvescens*, *A. stellatus*, *A. brevirostrum*, *S. albus*, *A. sturio*, *A. oxyrinchus*, y *P. spathula*. Se ha podido poner de manifiesto su presencia en el genoma de las 11 primeras especies, mientras que por ninguna de las técnicas mencionadas ni por otras, como hibridación *in situ*, hemos podido demostrar su presencia en las especies *A. sturio*, *A. oxyrinchus* y *P. spathula* (De la Herrán *et al.*, 2001a; Lanfredi *et al.*, 2001 y esta memoria). Por tanto, de acuerdo a los datos de Birstein y DeSalle (1998), este ADN satélite podría tener una antigüedad de más de 90 millones de años.

De forma general, las repeticiones *HindIII* (Tabla 5) cuentan con una longitud de aproximadamente 170 pares de bases, existiendo pequeñas oscilaciones en prácticamente todas las especies. Este tamaño de los monómeros (170-190 pares de bases) es la longitud más común en el caso del ADN satélite en animales; sobre todo en el ADN satélite centromérico (Choo, 1997). Cuando presenta longitudes más grandes suele deberse a que las unidades monoméricas son resultado de la duplicación de repeticiones de 170-180 pares de bases, como ocurre, por ejemplo, en el caso del ADN satélite alfa de los

centrómeros humanos (Singer, 1982). Incluso en el ADN satélite que presenta una unidad monomérica de unos 180 pares de bases, es frecuente detectar que el origen se debe a duplicaciones y posterior divergencia de unidades mucho más pequeñas (Garrido-Ramos *et al.*, 1995b; Kato *et al.*, 1999). De la Herrán *et al.* (2001a) analizaron las características de esta familia de ADN satélite y para explicar el origen de la unidad monomérica actual, propusieron varios eventos de duplicación parcial, conduciendo a la amplificación de un monómero inicial de 50 pares de bases hasta la actual unidad de repetición de 170 pares de bases.

La riqueza en AT (Adenina/Timina) de este satélite supera el 64% en la mayoría de los casos y podemos observar que presenta cortas repeticiones de adeninas y timinas a lo largo de la secuencia. Esto, junto con la longitud de las unidades monoméricas, son características comunes a otros ADN satélites centroméricos (Singer, 1982; Garrido-Ramos *et al.* 1995b; Choo, 1997). Su localización centromérica la pusieron de manifiesto Lanfredi *et al.*(2001) en especies como *A. naccarii*, *A. baerii*, *A. ruthenus*, *A. transmontanus*, *H. huso* y *A. gueldenstaedtii*. Sin embargo, este ADN satélite sólo está presente en algunos centrómeros de algunos cromosomas muy dispares en tamaño y forma del cariotipo de estas especies.

En segundo lugar, en esta memoria hemos identificado, aislado y caracterizado por primera vez, la familia de ADN satélite *Pst*I. A diferencia del ADN satélite *Hind*III, está presente en el genoma de todas las especies del Orden Acipenseriformes analizadas aquí: *A. naccarii*, *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. transmontanus*, *A. ruthenus*, *H. huso*, *A. sinensis*, *A. fulvescens*, *A. stellatus*, *A. brevirostrum*, *S. albus*, *A. sturio* y *A. oxyrinchus*, y ausente en la especie *P. spathula*. Encontramos, por tanto, que esta familia de ADN satélite es más antigua que la familia *Hind*III, teniendo así una antigüedad de unos 135 millones de años (Birstein y DeSalle, 1998), ya que se encuentra presente en todas las especies de las familia Acipenseridae, pero no de la Poliodontidae;

mientras que la familia *HindIII* no estaba presente en especies como *A. sturio* y *A. oxyrinchus* (género *Acipenser*).

Las unidades monoméricas *PstI* (Tabla 10) presentan una longitud muy variable, oscilando entre 180 pares de bases los monómeros más cortos y 218 pares de bases los más largos. Y es que las repeticiones *PstI* presentan grandes deleciones/insecciones de hasta 26 pares de bases en algunas de las especies, como por ejemplo, *A. sturio* o *A. oxyrinchus* (Figura 15). El porcentaje de AT (Adenina/Timina) no llega en ningún momento al 50%, por lo que es más bajo que si lo comparamos con los porcentajes obtenidos en otros ADN satélites, como el ADN satélite *HindIII* y otros centroméricos (Fontana, comunicación personal). En cuanto a repeticiones internas, podemos destacar dos repeticiones invertidas cortas y dos repeticiones directas de 15 pares de bases. Las repeticiones inversas no adyacentes parecen estar relacionadas con la amplificación del ADN, ya que serían capaces de formar estructuras secundarias que serían reconocidas como sitios de unión de enzimas implicados en la recombinación (Ohshima *et al.*, 1992).

Por último, el diseño de cebadores a partir de una unidad de repetición de los genes 5S (tanto parte funcional como espaciadora) en la especie *A. sturio* (Tagliavini *et al.*, 1999a), nos ha permitido analizar las secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S en un total de 13 especies de esturión.

Hemos observado que en la mayoría de las especies (Figuras 21 y 23), las secuencias espaciadoras presentan una longitud de 98 y/o 112 pares de bases, consecuencia de una inserción/delección de un fragmento de 14 pares de bases. Las dos variantes en la longitud de las secuencias las hemos encontrado en la mayoría de especies (menos en *A. fulvescens*, *A. oxyrinchus* y *S. albus*, donde sólo encontramos la variante de 98 pares de bases). Al realizar el árbol de distancias (Figura 20), observamos que se establecía una agrupación de secuencias que no correspondía a la diferenciación en tamaños. Y es que esta división en dos tipos

de secuencias espaciadoras no obedece a disparidad en tamaño, sino a diferencias en la secuencia nucleotídica. Un análisis exhaustivo de las mismas reveló la existencia de nueve posiciones (53, 59, 61, 83, 84, 85, 90, 100 y 111, Tabla 15) capaces de separar en dos tipos las secuencias espaciadoras. De esta forma encontramos secuencias espaciadoras de tipo 1 (Figura 21) y tipo 2 (Figura 23), ambas con longitudes de 98 y/o 112 pares de bases.

La separación de secuencias espaciadoras en dos tipos, en función del tamaño, se ha descrito en peces en varias ocasiones. Así, en el género *Leporinus*, Martins y Galetti Jr, (2001a), diferencian dos NTS, I y II, según tenga 80 o 776 pares de bases. Sin embargo, en otros casos, además del tamaño, se ha encontrado una distinción en dos tipos de secuencias, en base a sustituciones nucleotídicas, como ocurre en el género *Brycon* (Wasko *et al.*, 2001), en salmónidos (Pendás *et al.*, 1994) y en especies del género *Coregonus* (Sajdak *et al.*, 1998).

La localización cromosómica de los genes ribosómicos 5S a nivel intercalar se ha descrito en diferentes especies representando a grupos como Anguilliformes, Acipenseriformes, Characiformes, Perciformes, Salmoniformes y Teraodontiformes (Martins y Galetti Jr, 2001b). La misma localización cromosómica se ha encontrado también en mamíferos (Mäkinen *et al.*, 1997, entre otros), y en anfibios (Lucchini *et al.*, 1993, entre otros), lo que sugiere que esta localización no es casual. Esta determinada distribución para los genes 5S podría representar alguna ventaja relacionada con la organización de estos genes en el genoma de los vertebrados.

Tagliavini *et al.* (1999a), estudiaron la localización de los genes ribosómicos 5S en la especie *A. sturio* mediante la técnica de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), y localizaron a los genes ribosómicos 5S en la región intercalar de una pareja de cromosomas pequeños, lo mismo que para la especie *A. ruthenus* (ambas especies del nivel cromosómico I, véase Tabla 2; Fontana *et*

al., 1999). En las especies *A. naccarii* y *A. gueldenstaedtii* (ambas especies de nivel cromosómico II) la localización de los genes 5S es en cuatro cromosomas pequeños, aunque en esta última especie los datos son preliminares (Fontana *et al.*, 1999). En la especie *H. huso* (nivel cromosómico I), la localización ocurre en regiones teloméricas (Fontana *et al.*, 1998b).

5.1.2 Análisis de la evolución concertada.

Por lo tanto, en este trabajo hemos analizado tres regiones nucleares diferentes de los genomas de trece especies de esturión, las dos familias de ADN satélite *HindIII* y *PstI*, y los espaciadores entre los genes ribosómicos 5S.

Como mostraba la Figura 3 del apartado 1.1 de la Introducción, (Ludwig *et al.* 2001), dentro de la familia Acipenseridae, a los esturiones los podemos agrupar en cuatro clados de acuerdo a consideraciones filogenéticas y biogeográficas. El primero está formado por las especies de la Subfamilia Scaphirhynchinae (género *Scaphirhynchus* y *Pseudoscaphirhynchus*), el segundo está compuesto de las especies de esturión *A. sturio* y *A. oxyrinchus*, el tercero lo constituyen especies del Pacífico pertenecientes a los géneros *Acipenser* y *Huso* (*A. medirostris*, *A. mikadoi*, *A. schrenckii*, *A. transmontanus*, *A. sinensis* y *H. dauricus*) y el cuarto clado contiene a las especies del Atlántico incluidas en los géneros *Acipenser* y *Huso* (*A. naccarii*, *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. brevirostrum*, *A. fulvoescens*, *A. persicus*, *A. nudiventris*, *A. stellatus*, *A. ruthenus* y *H. huso*). Los géneros *Acipenser* y *Huso* constituyen la subfamilia Acipenserinae.

De acuerdo a nuestros datos, la ausencia de evolución concertada *sensu stricto* es la norma de las secuencias repetidas en los esturiones. Así, las distancias genéticas intraespecíficas son más grandes que las distancias interespecíficas en la mayoría de los casos. Concretamente, en el estudio de la familia de ADN satélite *HindIII*, De la Herrán *et al.* (2001a) encontraron que la variabilidad intraespecífica de las secuencias analizadas en varias especies de

esturión era mayor que la divergencia interespecífica de las mismas. En esta memoria hemos aumentado el número de especies analizadas para este marcador (un total de 13), y se ha confirmado este resultado (Tabla 6). Así, por ejemplo, hemos encontrado en el análisis realizado, valores de variabilidad intraespecífica de 9.4% en la especie *A. baerii* en comparación con valores de divergencia interespecífica de ésta con *A. naccarii* o *A. fulvescens* de 4.3% y 4.4%.

Con el análisis de una nueva familia de ADN satélite, la familia *PstI*, y las secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S, hemos querido confirmar si la ausencia de evolución concertada se mantenía en otras secuencias repetidas. En el primer caso, tras el análisis de las secuencias obtenidas para cada una de las especies, encontramos que las distancias intraespecíficas son muchas veces mayores que las distancias interespecíficas (Tabla 11), como por ejemplo, para la especie *A. gueldenstaedtii*, en la que mientras la variabilidad intraespecífica es del 7%, la divergencia entre las secuencias de esta especie con las de las especies *A. ruthenus* y *H. huso* es del 5.8% y 6% respectivamente. En el caso de los espaciadores entre los genes ribosómicos 5S, al encontrar dos tipos de secuencias espaciadoras, hemos calculado la variabilidad intraespecífica y la divergencia interespecífica en las secuencias de las especies que presentan cada uno de los tipos. El espaciador tipo 1 se encuentra en un mayor número de especies, por lo que los resultados pueden ser más significativos que en el caso del espaciador tipo 2, que está representado en un número de especies muy bajo y, por tanto, los datos en este caso, debemos tomarlos con más cautela. Para las secuencias espaciadoras de tipo 1 (Tabla 17), podemos observar valores de variabilidad intraespecífica más altos que los valores de divergencia interespecífica al realizar la comparación de especies como *A. gueldenstaedtii* con *A. naccarii*, *A. ruthenus*, *A. baerii*, *A. stellatus* y *H. huso*. En el segundo caso (Tabla 21), encontramos la misma situación cuando realizamos la comparación entre las especies *A. brevirostrum* (3.8%) con *A. fulvescnes* (3.2%) o *A. sinensis* (6.8%) con *A. sturio* (6.4%).

Los análisis filogenéticos realizados con los tres tipos de secuencias repetidas resultan en árboles de secuencias donde quedan reflejados las medias de divergencia, para cada uno de los marcadores. En los tres árboles obtenemos que las secuencias aparecen entremezcladas. Por tanto, las secuencias, en general, no se agrupan por afinidad taxonómica en los correspondientes árboles, excepto en el caso de las secuencias de la especie *S. albus* tanto para las dos familias de ADN satélite (Figuras 12 y 16) como para los espaciadores de los genes 5S (Figura 22). También encontramos una asociación cladística entre las secuencias de las especies *A. sturio* y *A. oxyrinchus* para el caso de la familia de ADN satélite *PstI* y las secuencias espaciadoras. En el caso de la familia de ADN satélite *HindIII*, este marcador no está presente en el genoma de estas especies. Podemos observar, en el caso del ADN satélite *PstI*, la agrupación de las secuencias de las especies en función de la subdivisión entre el clado Atlántico (*A. naccarii*, *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. brevirostrum*, *A. fulvescens*, *A. stellatus*, *A. ruthenus* y *H. huso*) y clado Pacífico (*A. transmontanus* y *A. sinensis*) encontrada para el citocromo b (Ludwig *et al.*, 2001). En el caso de las secuencias *HindIII* y de los espaciadores intergénicos de los genes 5S, también se observa una tendencia a esta subdivisión, aunque no queda totalmente patente en los árboles obtenidos.

Aunque la ausencia de evolución concertada parece ser el modo general de evolución de las secuencias repetidas en los esturiones, cuando comparamos clados, encontramos divergencia entre clados, como indican además los valores de varianza molecular (AMOVA) calculados para cada uno de los marcadores. En el caso de las dos familias de ADN satélite, *HindIII* y *PstI*, podemos observar que los valores de varianza molecular entre clados es algo menos del doble que entre las especies dentro de cada clado (Tabla 7 y Tabla 12). En el análisis de la AMOVA en las secuencias espaciadoras de tipo 1 es donde encontramos la diferencia más notable (Tabla 18), ya que el valor entre clados es aproximadamente 65 veces mayor que el valor entre las especies dentro de cada

clado. El análisis de la AMOVA realizado por Ludwig *et al.* (2001) para las secuencias del gen del citocromo b de la mitocondria, revela también que la varianza molecular entre clados es algo menos del doble que entre las especies dentro de cada clado (33.2% frente al 23.4%). Esto indica que un tiempo de divergencia largo y el aislamiento geográfico puede conducir, al menos en parte, a la evolución concertada de estas secuencias.

Se han realizado muchos estudios concernientes a la evolución de las secuencias repetidas y la mayoría coinciden en que estas secuencias, por lo general, evolucionan cohesivamente (Ugarković y Plohl, 2002), es decir, las nuevas variantes que surgen por mutación, se propagan a través de los miembros de la familia con una tasa de transferencia horizontal más alta que la tasa con que esos nuevos cambios surgen (Dover, 1982; 1986; Ohta y Dover, 1984).

Sin embargo, existen diversos ejemplos en los que, frente a la norma, se observa ausencia de evolución concertada. Uno de los casos más conocidos es el de una familia de ADN satélite de las moscas tsétsé (Trick and Dover, 1984), para la cual, los autores de este estudio encuentran una variación alta de las secuencias tanto a nivel intra como interespecífico, atribuyendo la ausencia de evolución concertada a la baja tasa de homogenización de las secuencias. En otros casos donde se ha encontrado esta ausencia de evolución concertada, se ha explicado por la compartimentalización cromosómica de las variantes de las secuencias y por procesos poblacionales peculiares que conducirían a bajas tasas de homogenización y fijación de las secuencias. Ésto, junto con altas tasas de mutación, son las causas propuestas para explicar la ausencia de evolución concertada en la familia de ADN satélite PIM357 de las especies del género *Pimelia* de las Islas Canarias (Pons *et al.*, 2002a, 2002b). La compartimentalización cromosómica de las variantes de las secuencias se ha encontrado que es una causa común de la ausencia de evolución concertada en el ADN satélite de primates (Willar y Waye, 1987a, 1987b) y en los espaciadores

entre los genes 5S del algodón poliploide (Cronn *et al.*, 1996). El fallo inherente a los propios mecanismos moleculares implicados en la homogenización de las secuencias repetidas, junto con bajas tasas de mutación, se propusieron como causas para explicar, en un primer momento, la ausencia de evolución concertada en la familia de ADN satélite *HindIII* de los esturiones (De la Herrán *et al.*, 2001a). Así, estos autores sugirieron que la localización centromérica y la existencia de una pronunciada asimetría entre los cromosomas que contienen estas secuencias, podían influir en la falta de intercambio de material dando lugar a la reducida tasa de homogenización observada. En la actualidad, tenemos datos adicionales para explicar la falta de homogenización de las secuencias repetidas. En primer lugar, hemos de tener en cuenta los espaciadores de los genes 5S, un marcador para el que los genomas de los esturiones tienen un bajo número de repeticiones y que está localizado en uno o dos loci (Fontana, 2002), dependiendo de que la especie tenga unos 120 cromosomas en el primer caso, y unos 240 en el segundo. Estas secuencias tampoco evolucionan de manera concertada (Figuras 22 y 24). En esta ocasión, la ausencia de evolución concertada no se debe a un excesivo número de copias de la unidad de repetición, ni a la localización de las secuencias en cuestión en zonas asimétricas de los cariotipos de los esturiones.

Por otro lado, aunque no podemos medir la tasa a la que actúan los mecanismos moleculares de homogenización, tales como el entrecruzamiento desigual y la conversión génica, sí podemos poner de manifiesto, al menos, si la conversión génica es activa. Nuestro análisis, sin ninguna duda demuestra que el mecanismo de conversión génica es un mecanismo que está activo en la homogenización de los tres marcadores. Por ejemplo, en el caso de la familia de ADN satélite *HindIII*, encontramos fragmentos de hasta 65 pares de bases resultado de evolución por conversión génica (Tabla 9). O para la familia de ADN satélite *PstI*, donde también encontramos regiones de longitud considerable (de hasta 84 pares de bases) en varios fragmentos de la secuencia

que apoyan este fenómeno (Tabla 14). De hecho, en la familia de ADN satélite *HindIII*, De la Herrán *et al.* (2001a) encontraban dos variantes nucleotídicas localizadas dentro de las primeras veinte posiciones en la unidad de repetición en el conjunto de especies analizadas. Nosotros, ahora podemos hablar, y de hecho se ha venido haciendo durante esta memoria, de dos tipos de secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S. Así, encontramos que existen nueve posiciones en las secuencias espaciadoras de los genes 5S (Tabla 15) capaces de separarlas en dos tipos. Es evidente que el mecanismo de conversión génica está actuando homogenizando estas secuencias hacia una u otra variante en cada caso. Entonces, debemos pensar que la ausencia de evolución concertada de las secuencias repetidas (familias de ADN satélite *HindIII* y *PstI*, secuencias espaciadoras de los genes 5S), no se debe a un factor como éste, al menos, no como único factor.

En el caso de los esturiones se ha demostrado que las tasas de mutación de varias regiones nucleares y mitocondriales son bajas en comparación con las de otras especies de vertebrados (Kedrova *et al.*, 1980; Brown *et al.*, 1996; Birstein y DeSalle, 1998; Krieger *et al.*, 2000; Krieger y Fuerst, 2002b). En el caso de secuencias repetidas, hemos comentado con anterioridad que presentan una tasa de cambio mucho más alta que cualquier otro tipo de secuencias del genoma eucariota porque, ante la falta de funcionalidad, escapan a la acción de la selección natural y porque la tasa de homogenización es mayor que la de mutación. En este estudio, hemos puesto de manifiesto que la tasa de cambio evolutivo es de 0.07% en la familia de ADN satélite *HindIII*, 0.11% para la familia de ADN satélite *PstI* y de 0.07% para las secuencias espaciadoras de los genes 5S. Estas tasas de mutación son bajas si las comparamos con las encontradas para otras especies de peces como los espáridos (hasta cuatro veces más baja, Garrido-Ramos *et al.*, 1999; De la Herrán *et al.*, 2001c). La tasa de evolución de estas secuencias es dos veces más lenta que la tasa de evolución del satélite Común de los cetáceos, ya considerada baja (0.2%; Arnason *et al.*,

1992). La tasa de evolución del ADN satélite se ha estudiado en el grupo de especies de *Drosophila obscura* y es del 3% por millón de años, el doble de la tasa de sustituciones sinónimas en la NADH deshidrogenasa de la mitocondria de algunas especies de *Drosophila* (2%, DeSalle *et al.*, 1987) y 13 veces más que la tasa evolutiva del satélite y los espaciadores 5S de los esturiones. Es evidente, pues, que la escasa divergencia encontrada entre especies tras el análisis de las secuencias repetidas podría ser un factor que influye en la tasa de evolución concertada de los esturiones.

Sin embargo, debemos considerar con cautela las tasas evolutivas de las secuencias repetidas de los esturiones porque hay varios datos que indican una influencia mayor de factores poblacionales que afectan a la fijación de las secuencias, los cuales pueden distorsionar la estima de las tasas de mutación. Así, encontramos que, entre las causas que explican la evolución de los tres tipos de secuencias repetidas analizadas en esta memoria, una influencia importante podría ser el modo evolutivo que ha conducido a la aparición de las especies actuales de esturiones, proceso evolutivo en el que han influido sucesos de poliploidización e hibridación (Vasil'ev, 1999).

Entre las posibles causas para explicar la amplia variabilidad intraespecífica observada en varios organismos (entre ellos los esturiones), la poliploidización es la que se ha mencionado con mayor frecuencia (Krieger y Fuerst, 2002b). En plantas, la poliploidía es la regla general. En muchos casos, la variación intraindividual de los ITS en las unidades ribosómicas, está asociada con la poliploidía, aunque muchas plantas poliploides no poseen variación intraindividual de las secuencias ITS (Campbell *et al.*, 1997). En el caso de los peces, la poliploidía se ha asociado con varios grupos, como los salmónidos. En la especie *Salvelinus namaycush* se ha observado variación en la secuencia del NTS de las repeticiones del ARN ribosómico, aunque de nuevo sin evidencias de la variación de la secuencia del gen 18S ARN ribosómico (Reed y Phillips, 2000).

Las especies de esturiones se pueden agrupar en varios niveles de ploidía: existen especies diploides con unos 120 cromosomas y especies poliploides con aproximadamente 240 (además de un par de especies que tienen unos 500 cromosomas). Varios sucesos independientes de poliploidización han ocurrido durante la historia evolutiva de los esturiones dentro del clado Pacífico y Atlántico (Ludwig *et al.*, 2001). La poliploidía natural del genoma, hace que sea el principal factor que contribuye al origen y mantenimiento de múltiples variaciones en las secuencias del gen 18S del RNA ribosómico (Krieger y Fuerst, 2002a). Las copias extras de ADN ribosómico que existen en el genoma no están sometidas a presión selectiva, ya que todas las copias no son necesarias para una adecuada función celular. Aunque es posible que el alto número de variantes de la secuencia encontrada en los esturiones sean funcionales y necesarias para la supervivencia, no está claro por qué necesita diferentes variantes del gen ribosómico 18S.

Por otro lado, existen evidencias de la existencia de procesos de hibridación en la evolución de los esturiones (Vasil'ev, 1999), así como de fenómenos de hibridación e introgresión en poblaciones naturales (Berg, 1911; Arefjev, 1989, 1997). En este caso, la hibridación podría agrupar diferentes alelos de dos parentales pertenecientes a especies distintas, creando así variación intraindividual en el gen ribosómico 18S (Krieger y Fuerts, 2002a).

Así las cosas, debemos mencionar tres datos relevantes que apoyan el papel de la hibridación seguida de la poliploidía en el proceso evolutivo de las secuencias repetidas de los esturiones. Primero, aunque la media de divergencia entre las secuencias es escasa, en algunos marcadores (familias de ADN satélite *PstI* y *HindIII*), hemos detectado altos valores de diversidad nucleotídica para algunas especies. Así, los valores de diversidad nucleotídica más significativos son los que están próximos al 10% en especies como *A. baerii*, *H. huso* o *A. sinensis* en el caso de la familia de ADN satélite *HindIII* (Tabla 5); mientras que para la familia de ADN satélite *PstI*, encontramos valores aún

mayores, de hasta aproximadamente el 30% en la especie *A. oxyrinchus* (Tabla 10). Observamos también que las distancias intraespecíficas eran mayores que las distancias interespecíficas cuando se comparan especies pertenecientes al mismo clado filogenético/biogeográfico. Esta situación la observamos con toda nitidez en el clado Atlántico, ya que es el que está representado por mayor número de especies en cada uno de los marcadores. Para la familia de ADN satélite *HindIII* encontramos esta situación al realizar la comparación entre las especies *A. baerii* con *A. naccarii*, *A. baerii* con *A. gueldenstaedtii*, *A. gueldenstaedtii* con *A. naccarii* o *A. brevirostrum* con *A. fulvescens* (Tabla 6). En la familia de ADN satélite *PstI* lo podemos ver aún mejor representado si comparamos *A. baerii* con *A. gueldenstaedtii*, *H. huso* y *A. ruthenus* o *A. stellatus* con *A. baerii*, *A. gueldenstaedtii*, *H. huso* y *A. ruthenus* (Tabla 11). Y la misma situación en el caso de las secuencias espaciadoras donde podemos apreciarlo, debido al bajo número de secuencias, en el clado Atlántico del espaciador tipo 1 (Tabla 17). Podemos concluir, por tanto, que el flujo genético entre especies puede, de hecho, reducir las diferencias genéticas entre ellos mientras resulta en un aumento de variación genética dentro de las especies.

En segundo lugar, en cada uno de los marcadores, encontramos un número bajo de posiciones que están totalmente o casi completamente homogenizadas y fijadas (diferenciadas) entre especies. Este número aumenta considerablemente cuando las comparaciones se establecen entre especies pertenecientes a diferentes clados filogenéticos (*S. albus*, *A. oxyrinchus*-*A. sturio* y el resto de especies, con la división de especies pertenecientes a los clados Atlántico y Pacífico para el marcador *PstI*). Como vemos en la Tabla 8, los estados de transición para la familia de ADN satélite *HindIII* corresponden a los niveles inferiores de homogenización (1, 2 y 3) cuando comparamos especies pertenecientes al mismo clado; mientras que en la comparación de especies de diferente clado, ya encontramos porcentajes más altos de posiciones 4, y por supuesto de 5 y de 6. Donde mejor podemos apreciar esto es en la familia de

ADN satélite *Pst*I (Tabla 13), ya que en nuestro árbol (Figura 16) se encuentran representados todos los clados. La mayoría de las comparaciones de las secuencias de las especies *A. baerii*-*A. gueldenstaedtii*, *H. huso*-*A. baerii* o *A. naccarii*-*A. gueldenstaedtii* (Clado Atlántico), muestran un porcentaje más alto en los estados de transición 2 y 3. Sin embargo, el porcentaje de posiciones fijadas (5 y 6) aumenta considerablemente, si comparamos especies de diferente clado, como *A. naccarii*-*A. sturio* (clado Atlántico-clado *A. sturio*-*A. oxyrinchus*), *S. albus*-*A. gueldenstaedtii* (clado Atlántico-clado *Scaphirhynchus*) y *A. transmontanus*-*A. baerii* (clado Pacífico-clado Atlántico). Esto podría indicar que el tiempo de divergencia entre las especies del mismo grupo es muy bajo como para que la divergencia entre las secuencias tenga un valor significativo. Sin embargo, aún en el caso de que las tasas de mutación sean bajas y que el tiempo de generación sea largo en los esturiones, no podemos asumir que el tiempo de divergencia entre algunas de estas especies es lo suficientemente escaso como para evitar valores significativos de divergencia interespecífica.

En tercer lugar, se podría esperar que cuando la tasa de homogenización es más alta que la tasa de especiación, las nuevas variantes en la secuencia llegan a ser fijadas y los polimorfismos intraespecíficos deberían tener valores bajos. Por el contrario, los niveles de polimorfismo deben ser más grandes cuando la tasa de homogenización es equivalente o más baja que la tasa de especiación, de tal forma que los polimorfismos perduraran a través de uno o más sucesos de especiación, con lo que las especies muy relacionadas deben compartir muchos sitios polimórficos (Ohta y Dover, 1984; Dover, 1982, 1984; Cronn *et al.*, 1996). Nosotros hemos comparado todos los sitios polimórficos en las secuencias obtenidas en cada especie y en cada marcador, y hemos encontrado un porcentaje muy elevado. La mayoría, 75-80%, no son polimorfismos compartidos (autapomorfías) o son compartidos entre especies muy alejadas (homoplasias). El otro 20.25% de los sitios polimórficos están compartidos entre especies estrechamente relacionadas. La mayoría de éstos

ocurren entre sólo un par de especies, las cuales se han clasificado como especies hermanas (*A. sturio*-*A. oxyrinchus* o *A. naccarii*-*A. gueldenstaedtii*). Así, para el caso de la familia de ADN satélite *Hind*III, el 11% de los sitios polimórficos están compartidos por *A. naccarii*-*A. gueldenstaedtii*. El hecho de que se encuentren gran cantidad de polimorfismos entre especies que han divergido hace mucho tiempo, indica la existencia de fenómenos de hibridación entre ellas.

Finalmente, otra posibilidad podría ser que las secuencias analizadas estuvieran sometidas a restricciones selectivas. Mravinac *et al.* (2002) han sugerido la posibilidad de un sesgo molecular favoreciendo la propagación de las secuencias ancestrales para explicar la parálisis evolutiva del satélite PRAT en especies de coleópteros. Sin embargo, nosotros no tenemos datos para deducir un papel de nuestras secuencias de ADN satélite. Además, en cualquier caso, su función podría estar más relacionada con la conservación de características estructurales para que estas secuencias pudieran adquirir estructuras secundarias o terciarias que con la conservación de su estructura primaria (Mravinac *et al.*, 2002). Otra situación diferente puede ser la de los espaciadores 5S. Cronn *et al.* (1996) encontraron que la ausencia de evolución concertada para los genes 5S en especies de algodón se podría explicar como una consecuencia de la acción de la selección natural, pero que los espaciadores entre genes, como no son funcionales, evolucionan de manera concertada. Es posible que la selección natural pudiera actuar manteniendo similitudes para los espaciadores de los esturiones entre especies, dado que se ha demostrado en muchas especies que los espaciadores de los genes 5S pueden contener algún tipo de secuencia señal implicada en la regulación de la expresión génica del gen 5S (Suzuki *et al.*, 1996, Sajdak *et al.*, 1998). En este sentido, la longitud extremadamente corta de los espaciadores de los esturiones (98-112 pares de bases) podría constituir la condición mínima necesaria para el mantenimiento de los genes 5S en el genoma (Martins y Galetti Jr., 2001a, 2001b).

Por lo tanto, y en conclusión, hemos demostrado que la ausencia de evolución concertada es la regla general dentro del genoma de los esturiones, y se apunta a que fenómenos como la hibridación y la poliploidización pueden explicar ese fenómeno. Este particular modo de evolución en los esturiones puede también explicar las bajas tasas de evolución observadas en las secuencias repetidas, lo cual añade una nueva visión a la observación de tasas reducidas de mutación en estas especies. Sin embargo, no podemos descartar la influencia de otro factor, tal como la selección natural, en la conservación de las secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S.

5.2 El ADN repetido y las relaciones filogenéticas de los esturiones.

Aunque las secuencias analizadas en esta memoria no evolucionan concertadamente, nuestro trabajo aporta datos que permiten obtener algunas conclusiones acerca de las relaciones entre las especies de la subfamilia Acipenserinae.

Observamos que las secuencias de la especie *H. huso*, independientemente del marcador que estemos analizando (familias de ADN *HindIII*, *PstI* y secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S), se entremezclan con secuencias pertenecientes a especies como *A. naccarii*, *A. gueldenstaedtii*, *A. baerii* o *A. ruthenus* (Figuras 12, 16 y 22). Por tanto, la especie *H. huso* podría incluirse dentro del género *Acipenser*, ya que no tiene identidad suficiente para ser considerada un género independiente. Esto viene a apoyar el punto de vista de Birstein y DeSalle (1998) y Ludwig *et al.*, 2001, así como las dudas de Artyukhin (1995) sobre la posición sistemática del género *Huso*.

Dentro del género *Acipenser* las especies consideradas más antiguas son *A. sturio* y *A. oxyrinchus*, ya que no presentan en sus genomas la familia de

ADN satélite *Hind*III, bien porque la hayan perdido o bien porque su aparición fuera posterior a la divergencia del resto de especies. Además, las secuencias monoméricas de la familia de ADN satélite *Pst*I, así como las secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S, de estas dos especies, se agrupan juntas (Figuras 16, 22 y 24), ampliamente diferenciadas del resto de secuencias pertenecientes a las demás especies. Estos datos sostienen la hipótesis de que las especies *A. sturio* y *A. oxyrinchus* están más relacionadas entre sí y son más diferentes que el resto de especies, teniendo una evolución independiente (Birstein y DeSalle, 1998; Ludwig *et al.*, 2001).

Por tanto, podemos considerar la asociación de las especies *A. sturio* y *A. oxyrinchus* como una asociación cladística. La asociación en clados, de acuerdo a consideraciones filogenéticas y biogeográficas, la encontramos ampliamente descrita en el trabajo de Ludwig *et al.* (2001). De la misma forma que estos autores, no sólo encontramos el clado *A. sturio*-*A. oxyrinchus*, sino que también encontramos el clado *Scaphirhynchus*, ya que con todos los marcadores, encontramos una agrupación de secuencias por afinidad taxonómica en la especie *S. albus* (Figuras 12, 16 y 22). Y también encontramos diferenciadas a las especies pertenecientes a los clados Pacífico y Atlántico. De las especies que engloba el clado del Pacífico, nosotros sólo tenemos representación de dos de ellas, *A. transmontanus* y *A. sinensis*. Como hemos podido comprobar, las secuencias *Pst*I de estas especies se agrupan juntas, diferenciándose de las secuencias correspondientes a las especies del clado Atlántico (Figuras 12, 16, 22 y 24). Dentro del clado Atlántico, es donde encontramos mayor representación de especies. Nosotros hemos estudiado 8 de las 10 que incluye. En el conjunto de marcadores estudiados, observamos que las secuencias pertenecientes a las distintas especies aparecen entremezcladas (Figuras 12, 16, 22 y 24). Sin embargo, podemos encontrar especies como *A. naccarii*, *A. gueldenstaedtii* y *A. baerii* que están estrechamente relacionadas como apuntaban otros autores

(Artyukhin, 1995; Tagliavini *et al.*, 1999b), incluso pudiéndolas considerar como especies hermanas.

5.3 Utilización de los marcadores moleculares para clarificar las especies de esturión del Mediterráneo occidental.

En este trabajo hemos llevado a cabo el análisis de varios especímenes de esturión conservados en museos y capturados en diferentes localidades, desde el Río Guadalquivir (vertiente Atlántica) hasta Chioggia (Italia, región Adriática) pasando por Salerno, Livorno y Génova (Italia, región Mediterránea). Algunos de estos especímenes fueron previamente clasificados como *A. sturio* (EBD8173, EBD8401, EBD8174, MZUF5714, MZUF5716, MNCZ1582 y UGRA1), y otros como *A. naccarii* (MZUF5700, MZUF6472, MZUF5704 y MSNG40364).

La obtención del ADN de estos ejemplares se ha llevado a cabo utilizando técnicas forenses, y hemos obtenido resultados de amplificación mediante la aplicación de la técnica de PCR. La aplicación de técnicas forenses para la extracción de ADN en relación con los esturiones se ha empleado, sobre todo, para la determinación de especies de esturión a partir del caviar que producen ya que la calidad de cada tipo difiere en cuanto a la disponibilidad en el mercado, sabor, y por supuesto, precio. Por estas razones están expuestos a fraudes comerciales (Fontana *et al.*, 2001).

La aplicación de técnicas forenses para la obtención de ADN de los ejemplares conservados en los diferentes museos e instituciones, nos permite afirmar con seguridad, que el ADN extraído de cada uno de los especímenes no es debido a contaminaciones ni artefactos resultado de la conservación y almacenaje de las muestras, sino que el ADN extraído es auténtico. Disponer de ADN en buenas condiciones o en las mejores condiciones posibles, es un paso importante a la hora de trabajar con estos especímenes. Así es posible aplicar la

técnica de amplificación mediante PCR, mucho más sensible y que necesita muy poca cantidad de ADN en comparación con otras técnicas, para cada uno de los marcadores analizados en esta memoria. Este problema lo encontraron Doukakis *et al.* (2000) al tratar de analizar el ADN mitocondrial de los ejemplares EBD8173, EBD8401 y EBD8174. En esa ocasión, tres laboratorios independientes en Nueva York, Berlín y Madrid, utilizando distintas técnicas, no lograron extraer ADN de estos ejemplares, y utilizaron este hecho para argumentar en contra de los resultados obtenidos para los mismos especímenes por otros autores (Garrido-Ramos *et al.*, 1997; Ruiz Rejón *et al.*, 2000).

En esta memoria hemos extraído ADN en buenas condiciones de todos los ejemplares descritos en la Tabla 24, pero nos hemos centrado principalmente en el estudio de los tres especímenes capturados en el Río Guadalquivir a mediados de los años 70 y 80 y que están conservados en la Estación Biológica de Doñana en Sevilla (ejemplares EBD8173, EBD8401 y EBD8174). De este ADN, hemos clonado secuencias para cinco marcadores moleculares (tres nucleares y dos mitocondriales), las cuales fueron a continuación comparadas con secuencias de las especies *A. naccarii* y *A. sturio*, en particular, pero también con otras especies de esturiones analizadas en esta memoria.

Los genomas de los tres especímenes del Guadalquivir presentan la familia de ADN satélite *HindIII* (Figura 25). Este marcador tiene un carácter cladístico fuerte ya que diferencia a la especie *A. naccarii* de *A. sturio*, estando presente en el genoma de la primera especie pero no de la segunda (Garrido-Ramos *et al.*, 1997; De la Herrán, *et al.*, 2001a; Lanfredi *et al.*, 2001). Pero además, esta presencia/ausencia no es aleatoria en diferentes poblaciones de la especie *A. sturio*, sino que la ausencia de las secuencias *HindIII* es cladística, puesto que las secuencias *HindIII* tampoco están presentes en la especie hermana *A. oxyrinchus*, es decir, no están presentes en todo el clado *A. sturio*-*A. oxyrinchus*.

De este análisis de presencia/ausencia de las secuencias *Hind*III, podemos destacar que la especie *A. naccarii* vivió y se reprodujo recientemente en el Río Guadalquivir. En este sentido hemos obtenido más evidencias moleculares que demuestran que esta especie se ha capturado fuera del Mar Adriático. Así, mediante hibridación tipo dot-blot, hemos encontrado esta familia de ADN satélite dentro de los genomas, no sólo de algunos especímenes de museo clasificados como *A. naccarii* y cogidos en la región Adriática (MZUF5700 y MZUF6472), sino también en algunos especímenes de esta especie cogidos fuera de esta región, como Livorno y Génova (región Mediterránea, MZUF5704 y MSNG40364) y en algunos especímenes clasificados como *A. sturio* de la región de Salerno (MZUF5714). Por otro lado, este ADN satélite está ausente en otros ejemplares del Río Guadalquivir (MNCZ1582 y UGRA1) y de la región de Livorno (MZUF5716), por lo que estos últimos ejemplares se pueden atribuir a la especie *A. sturio*.

Para las dos familias de ADN satélite *Hind*III y *Pst*I, y los espaciadores de los genes ribosómicos 5S, los tres especímenes del Río Guadalquivir, tienen secuencias similares a las de la especie *A. naccarii*, y claramente diferenciadas de las secuencias de *A. sturio* (Figuras 26, 28, 31 y 33). En el árbol de secuencias obtenido para la familia de ADN satélite *Pst*I, podemos observar con claridad que las unidades monoméricas de los ejemplares del Guadalquivir se entremezclan con las de la especie *A. naccarii* permaneciendo ampliamente diferenciadas de las de la especie *A. sturio* (Figura 29). Es más, en el árbol de secuencias de la Figura 35 podemos apreciar que las secuencias de los ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana se diferencian, no sólo del clado formado por las especies *A. sturio*-*A. oxyrinchus*, sino también del clado *Scaphirhynchus* y del clado Pacífico, y aparecen entremezcladas con las secuencias monoméricas *Pst*I del conjunto de especies que forman el clado del Atlántico. Una situación idéntica podemos describir en las secuencias espaciadoras de tipo 1 y 2. Aunque hay un número reducido de secuencias, las

unidades espaciadoras de los ejemplares EBD se agrupan con las de la especie *A. naccarii*, diferenciándose de las de la especie *A. sturio*, en el caso del espaciador tipo 1 (Figura 32). Algo similar ocurre para el espaciador tipo 2, donde la única secuencia de *A. sturio* representante de este tipo de espaciador, aparece bien diferenciada de las secuencias de los EBD y *A. naccarii* (Figura 34). El que aparezcan entremezcladas las secuencias de los EBD con las de varias especies del clado Atlántico, es lógico dado que eso es lo que ocurre con las secuencias de *A. naccarii*.

En esta memoria se ha llevado a cabo también el estudio de dos fragmentos de ADN mitocondrial en los tres ejemplares de la Estación Biológica de Doñana, así como en especímenes de las especies *A. naccarii* y *A. sturio*. Los marcadores mitocondriales presentan unas características moleculares y evolutivas que los hacen muy interesantes para estudios taxonómicos y filogenéticos (Harrison, 1989; Brunner *et al.*, 2001; Pastorini *et al.*, 2002; Riesing *et al.*, 2003; Shinohara *et al.*, 2003; Pang *et al.*, 2003;). Así, por ejemplo, se encuentra un número de copias de ADN mitocondrial por célula de 2 ó 3 órdenes de magnitud mayor con respecto al ADN nuclear, por lo que en muestras antiguas y degradadas puede ser la única opción viable. El ADN mitocondrial presenta además herencia materna, por lo que no existen evidencias de que recombine con otras moléculas de ADN, y evoluciona de manera más rápida que el ADN nuclear.

Son varias las regiones del ADN mitocondrial que se han estudiado en el genoma de los esturiones, como: la región control o D-loop, el gen de la NADH deshidrogenasa, los genes ribosómicos 12S y 16S, entre otros (Ludwig y Kirschbaum, 1998; Ludwig *et al.*, 2000; Krieger *et al.*, 2000). Pero la región que se ha usado habitualmente en estudios filogenéticos interespecíficos es la del gen del citocromo b (Ludwig y Kirschbaum, 1998; Birstein y DeSalle, 1998; Ludwig *et al.*, 2001). Estas regiones también se han utilizado para la diferenciación de especies como *A. naccarii* y *A. sturio* (Almodóvar *et al.*, 2000; Gasent-Ramírez *et*

al., 2001) o de especies como *A. sturio* y *A. oxyrinchus* (Ludwig *et al.*, 2002; Birstein y Doukakis, 2000).

Los fragmentos de ADN mitocondrial que hemos estudiado en los ejemplares conservados en la Estación Biológica de Doñana son un fragmento del gen del citocromo b y un fragmento del gen ribosómico 12S. En el fragmento del citocromo b, las 11 posiciones que diferencian a las especies *A. naccarii* y *A. sturio* clasifican a los ejemplares EBD8173 y EBD8401 como *A. naccarii* y al EBD8174 como *A. sturio* (Figura 37 y 38). De igual forma, las 3 variantes que diferencian a *A. naccarii* de *A. sturio* se corresponden con las de la especie *A. naccarii* en los ejemplares EBD8173 y EBD8401; mientras que las del EBD8174 se corresponden con las de *A. sturio* (Figura 40 y 41).

En varios trabajos anteriores, el espécimen EBD8174 se ha clasificado como *A. sturio* de acuerdo a estudios mitocondriales utilizando los mismos marcadores (el mismo fragmento, tanto del citocromo b como del gen 12S), (Almodóvar *et al.*, 2000; Gasent-Ramírez *et al.*, 2001) pero en ningún caso, estos autores han podido determinar el estatus taxonómico de los ejemplares EBD8173 y EBD8401. En nuestro estudio confirmamos el resultado obtenido por estos autores para el ejemplar EBD8174, pero además hemos obtenido resultados para los marcadores mitocondriales de los ejemplares EBD8173 y EBD8401.

Sin embargo, encontramos datos contradictorios para el ejemplar EBD8174 cuando estudiamos marcadores nucleares, ya que tanto para este ejemplar como para los dos anteriores, el estudio de las dos familias de ADN satélite, como las secuencias espaciadoras de los genes 5S, los catalogan como *A. naccarii* (Figuras 25, 26, 28, 29, 31, 32, 33 y 34). Se plantea, por tanto, la necesidad de precaución en estudios genéticos utilizando ADN mitocondrial exclusivamente, ya que los resultados podrían ser engañosos cuando se trata de

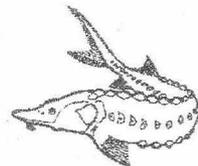
especies, que como en el caso de los esturiones, son propensas a la hibridación interespecífica.

La explicación más evidente para estas diferencias es que el ejemplar EBD8174 es un híbrido entre *A. sturio* y *A. naccarii*. Tales híbridos se han descrito para especies de esturión simpátricas (Arefjev, 1997). Este autor considera que los esturiones presentan una alta frecuencia de hibridación. Los cambios drásticos en las poblaciones naturales (como la contaminación, la sobrepesca, la construcción de embalses, etc) podrían alterar el medio en el que viven y favorecer la creación de híbridos. El único problema que este autor plantea, es en relación con la posible infertilidad de los híbridos. Sin embargo, Vasil'ev, (1999) propone un modelo como la especiación reticular, para explicar la evolución de los esturiones, en el que existirían pasos intermedios en los que estarían implicadas formas híbridas fértiles. En los esturiones, los mecanismos de especiación no actúan separando completamente a los individuos híbridos, de manera que los gametos que producen, perfectamente pueden fecundar y ser fecundados por gametos producidos por la especie de origen. Estos híbridos se han descrito en la naturaleza en varias ocasiones (Legeza, 1971; Birstein *et al.* 1997), e incluso se cultivan estas especies híbridas (Krylova, 1999). También debemos considerar los fenómenos de introgresión como una posibilidad para explicar la aparición de este ejemplar híbrido, porque se han descritos casos en los que se ha encontrado haplotipos mitocondriales correspondientes a una especie en la mitocondria de otra. Este es el caso de introgresión de las especies *A. naccarii* y *A. gueldenstaedtii* (Ludwig, comunicación personal), ocurrida recientemente. La aparición de híbridos generada por el fenómeno de introgresión puede ser explicada mediante alteraciones en el hábitat. Estos cambios drásticos en el hábitat, ya sean por fenómenos naturales como por la acción del hombre, provoca la aparición de híbridos, como por ejemplo se ha descrito en el caso del híbrido *Gila seminuda* (Ciprinidae) (DeMarais *et al.*, 1992).

En términos generales, nuestro estudio demuestra que la especie *A. naccarii*, actualmente endémica del Adriático, pudo colonizar las costas de la Península Ibérica, aunque tampoco podemos descartar la hipótesis alternativa: que en realidad las especies *A. naccarii* y *A. sturio* fueran autóctonas de la Península Ibérica, y el centro de distribución de *A. naccarii* no fuera exclusivamente la región adriática.

Como mencionamos en la Introducción, es más habitual de lo que se creía que las especies de esturión se muevan y cambien sus áreas de distribución (Ludwig *et al.*, 2002; Ludwig, comunicación personal). Por eso, nuestros resultados suponen que el centro de distribución de la especie *A. naccarii* podría ser el Mar Mediterráneo y que su área de distribución histórica alcanzara desde la Península Ibérica hasta el Mar Adriático. Esta gran área de distribución de la especie *A. naccarii* es coherente con la observación general de que la mayoría de especies de esturión habitaban vastas áreas de continentes y cuencas (Choudhury y Dick, 1998).

En el ámbito aplicado, el cultivo de la especie *A. naccarii* está más avanzado que el de *A. sturio* (Williot *et al.*, 2001), por lo que la primera especie podría ser utilizada como una alternativa o como complemento a la especie última, para llevar a cabo programas de recuperación en la naturaleza y, por supuesto, para la producción de esturiones (carne y caviar) en el Mediterráneo occidental.



CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

PRIMERA. Hemos analizado dos familias de ADN satélite en el genoma de 14 especies del Orden Acipenseriformes, las familias *HindIII* y *PstI*. La familia de ADN satélite *HindIII* está localizada a nivel centromérico, tiene una longitud aproximada de 170 pares de bases y presenta un alto contenido en AT. Esta familia de ADN satélite está ausente en el genoma de las especies *P. spathula*, *A. sturio* y *A. oxyrinchus* y presente en el resto de especies analizadas, por lo que se estima su antigüedad en unos 90 millones de años. La familia de ADN satélite *PstI* es más antigua que la anterior, ya que está presente en todas las especies analizadas excepto en la especie *P. spathula*, por lo que se estima su antigüedad en unos 135 millones de años. De unidad monomérica mayor, 230 pares de bases, presenta un contenido en AT inferior al 50%.

SEGUNDA. Hemos analizado las secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S en 13 especies de esturión, encontrando espaciadores diferentes en cuanto a su longitud. Así unos espaciadores tienen 98 pares de bases y otros tienen 112 pares de bases. Por otro lado, hemos detectado 2 subfamilias diferentes de espaciadores de acuerdo a la existencia de una serie de sitios diagnósticos que diferencian dos tipos de secuencias. Sin embargo, esta subdivisión en dos tipos de secuencias no está relacionada con el tamaño de los espaciadores.

TERCERA. Tras el análisis de tres familias de secuencias repetidas podemos concluir que, en sentido estricto, la ausencia de evolución concertada es la regla general de las secuencias repetidas en los esturiones. El análisis filogenético realizado para cada uno de estos marcadores demuestra la existencia de varios clados de secuencias que se corresponden con los cuatro clados filobiogeográficos que están definidos dentro de los Acipenseridos. Así, las secuencias de especies pertenecientes a cada uno de estos clados aparecen agrupadas y, a su vez, diferenciadas de las secuencias de especies del resto de

clados. Sin embargo, dentro de cada clado, las secuencias no se agrupan por afinidad taxonómica, sino que aparecen entremezcladas.

CUARTA. La existencia probada de la actuación de mecanismos como la conversión génica en la evolución de estos tres tipos de secuencias, demuestra que la ausencia de evolución concertada en los esturiones no se debe a fallos en los mecanismos de homogenización. Así lo pone de manifiesto el análisis de estas secuencias mediante el programa GENECONV, que revela la existencia de regiones largas en las que diferentes unidades repetitivas comparten mutaciones en las mismas posiciones. Igualmente, se observa este hecho en la existencia de distintas subfamilias dentro del ADN satélite *HindIII* y de los espaciadores ribosómicos. El hecho de que, a diferencia de las dos familias de ADN satélite, los espaciadores ribosómicos sólo ocupen uno o dos loci en el genoma (dependiendo del nivel de ploidía), apoya la idea de que no existen impedimentos físicos al intercambio genético entre secuencias repetidas en los esturiones.

QUINTA. Las tasas de cambio evolutivo en los esturiones calculadas para varias regiones, tanto nucleares como mitocondriales, son bajas en comparación con las de otras especies de vertebrados. Para las secuencias aquí analizadas, hemos calculado que la tasa de cambio es igualmente baja. Así, la familia de ADN satélite *HindIII* presenta una tasa de cambio del 0.07% por gameto y por año o para la familia *PstI* este valor es de 0.11% por gameto y por año, y finalmente, es de 0.07% por gameto y por año para las secuencias espaciadoras de los genes ribosómicos 5S. La escasa divergencia en las secuencias repetidas entre especies podría ser un factor que influye en la baja tasa de evolución concertada de los esturiones. Sin embargo, también es posible que estas tasas estén influidas por otros factores como los resultantes de las hibridaciones interespecíficas y la poliploidía, que se han propuesto como procesos importantes en la evolución de los esturiones.

SEXTA. Entre los datos que apoyan que la evolución de las secuencias repetidas de esturiones está influenciada por los procesos de hibridación y poliploidización, hay que destacar que los valores de las distancias intraespecíficas son, por lo general, mayores que los valores de distancias interespecíficas. Esta observación se hace más patente cuando se comparan especies pertenecientes al mismo clado filogenético/biogeográfico. Y es que el flujo génico entre especies puede, de hecho, reducir las diferencias genéticas entre ellas mientras resulta en un aumento de variación genética dentro de cada especie.

SÉPTIMA. En cada uno de los marcadores analizados encontramos un número bastante bajo de posiciones que están completamente homogenizadas y fijadas entre especies. Sin embargo, este número aumenta considerablemente cuando esas comparaciones las realizamos entre especies pertenecientes a diferentes clados filogenéticos.

OCTAVA. Asimismo, hemos realizado la comparación de todos los sitios polimórficos en las secuencias de cada especie, para cada marcador, encontrando un porcentaje muy elevado de éstos. Pero en este caso, entre el elevado porcentaje de sitios polimórficos, la mayoría de ellos son sitios no compartidos (autapomorfías) o compartidos entre especies muy alejadas (homoplasias). Esta conclusión y las dos anteriores, apoyan el papel relevante que juega la hibridación interespecífica y la poliploidización en la evolución de las secuencias repetidas de los esturiones.

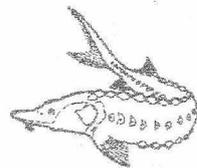
NOVENA. Sin embargo, también es posible que la selección natural pueda actuar manteniendo la similitud interespecífica en las secuencias espaciadoras de los esturiones.

DÉCIMA. Por otro lado, hemos demostrado que entre los ejemplares de esturión del Mediterráneo occidental, conservados en diferentes museos,

existen especímenes que se habían catalogado como *A. sturio*, pero que al presentar la familia de ADN satélite *HindIII* en sus genomas, no se pueden catalogar como tales. De la misma forma, en algunos ejemplares que habían sido catalogados como *A. naccarii* hemos confirmado que presentan esta familia de secuencias repetidas, por lo que podrían ser considerados *A. naccarii* sin problemas.

UNDÉCIMA. Para profundizar en el conocimiento del estatus específico de los esturiones del Guadalquivir, hemos estudiado cinco marcadores moleculares (tres nucleares y dos mitocondriales), en los ejemplares EBD8173, EBD8401 y EBD8174, capturados en dicho río y conservados en la Estación Biológica de Doñana. Dos ejemplares, EBD8173 y EBD8401, se corresponden con la especie *A. naccarii* para todos los marcadores, mientras que el espécimen EBD8174 se corresponde con la especie *A. naccarii* para los marcadores nucleares y con *A. sturio* para los mitocondriales. Esto nos lleva a considerar que este último ejemplar pueda ser un híbrido entre las dos especies en cuestión. Estos datos nos indican además, que debemos tomar con cautela los análisis filogenéticos y taxonómicos realizados con ADN mitocondrial exclusivamente.

DUODÉCIMA. Según nuestros datos, la especie *A. naccarii* habitó y se reprodujo recientemente en el Río Guadalquivir, de manera que la especie autóctona de la Península Ibérica no es sólo *A. sturio*, sino también *A. naccarii* (no pudiéndose considerar ésta endémica del Adriático). Por tanto, el área de distribución de esta última no se puede restringir únicamente a aguas del Adriático, sino que se pudo expandir por las del Mediterráneo, llegando como mínimo, a la desembocadura del Guadalquivir. Tampoco podemos desechar la hipótesis alternativa, según la cual las poblaciones de *A. naccarii* habitaron en todo el Mediterráneo occidental y, tras un continuo retroceso, han quedado restringidas a la región del Adriático.



BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

- ALMAÇA, C. (1988). On the sturgeon, *Acipenser sturio*, in the Portuguese rivers and sea. *Folia Zoologica* **37**: 183-191
- ALMODÓVAR, A.; MACHORDOM, A. and SUÁREZ, J. (2000). Preliminary results from characterization of the Iberian Peninsula sturgeon based on analysis of the mtDNA cytochrome b. In: Symposium on Conservation of the Atlantic sturgeon *Acipenser sturio*. L., 1758 in Europe. *Boletín Instituto Español de Oceanografía* **16**: 17-27.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. and LIPMAN, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- AMARASINGHE, V. and CARLSON, J.E. (1998). Physical mapping and characterization of 5S rRNA genes in douglas-fir. *Amer. Gen. Assoc.* **89**: 495-500.
- ANDERSON, T.D.; ROSS, J.P.; ROBY, R.K.; LEE, D.A. and HOLLAND, M.M. (1999). A validation study for the extraction and analysis of DNA from human nail material and its application to forensic casework. *Journal of Forensic Sciences.* **44**(5): 1053-6.
- AREFJEV, V.A. (1983). Polykaryogram analysis of ship, *Acipenser nudiventris* Lovestsky (Acipenseridae, Chodrostei). *Vopr. Ichthyol.* **23**: 209-216.
- AREFJEV, V.A. (1989). Karyotype variability in successive generations after hybridization between the great sturgeon, *Huso huso* (L.), and the sterlet, *Acipenser ruthenus*. (L). *J. Fish Biol.* **35**: 819-828.

AREFJEV, V.A. (1997). Cytogenetics of interploid hybridization of sturgeons. Proceedings of the 3rd International symposium on sturgeon. Pp 277. Piacenza, Italy. 1997.

ARNASON, U. (1990). Phylogeny of marine mammals: evidence from chromosomes and DNA. **Chromosomes Today** **10**: 267-278.

ARNASON, U.; GRÉTARSDÓTTIR, S. and WIDEGREN, B. (1992). Mysticete (baleen whale) relationships based upon the sequence of the common cetacean DNA satellite. **Mol. Biol. Evol.** **9**: 1018-1028.

ARNASON, U. and GULLBERG, A. (1994). Relationships of baleen whales established by cytochrome *b* gene sequence comparisons. **Nature** **367**: 726-728.

ARTYUKHIN, E.N. (1995). On biogeography and relationships within the genus *Acipenser*. **Sturgeon Quercus** **3**: 6-8.

BACHMANN, L.; SCHIBEL, J.M.; RAAB, M. and SPERLICH, D. (1993). Satellite DNA as a Taxonomic Marker. **Biochem. Syst. Ecol.** **21**: 3-11

BAIN, J.F. and JANSEN, R.K. (1995). A phylogenetic analysis of the aureoid *Senecio* (Asteraceae) complex based on ITS sequence data. **Pl. Syst. Avol.** **195**: 209-219.

BAKKER, F.T.; OLSE, J.L. and STAM, W.T. (1995). Evolution of nuclear rDNA ITS sequences in the *Cladophora albida/sericea* clade (Chlorophyta). **J. Mol. Evol.** **40**: 640-651.

- BARCELÓ Y COMBIS, F. (1868). Catálogo metódico de los peces que habitan o frecuentan las costas de las Islas Baleares. Revista. **Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales de Madrid** 18: 219-234.
- BARSACCHI-PILONE, G.; BATISTONI, R.; ANDRONICO, F.; VITELLI, L. and NARDI, I. (1986). Heterochromatic DNA in *Triturus* (Anphibia, Urodela) I. A. satellite DNA component of the pericentric C-bands. **Chromosoma** 93: 435-446.
- BENA, G.; JUBIER, M.F.; OLIVIERI, I. and LEJEUNE, B. (1998). Ribosomal external and internal transcribed spacers: combined use in the phylogenetic analysis of *Medicago* (Leguminosae). **J. Mol. Evol.** 46: 299-306.
- BERG, L.S. (1911). "Fishes (Marsipobranchii and Pisces). Fauna of Russia and the boundary countries, 1" St. Persburg. (in Russian).
- BIRSTEIN, V.J., and DESALLE, R. (1998). Molecular Phylogeny of Acipenserinae. **Mol. Phyl. Evol.** 9: 141-155
- BIRSTEIN V.J. and DOUKAKIS P. (2000). Molecular analysis of *Acipenser sturio* L., 1758 and *Acipenser oxyrinchus* Mitchill, 1815: A review. **Boletín. Instituto Español de Oceanografía** 16: 61-73.
- BIRSTEIN, V.J.; HANNER, R. and DESALLE, R. (1997). Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches, pp.127-155 in *Sturgeon Biodiversity and Conservation*, edited by V.J. Birstein, J.R. Waldman and W.E. Bemis. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht, The Netherlands.

- BIRSTEIN, V.J.; POLETAEV, A.I. and GONCHAROV, B.F. (1993). The DNA content in Eurasian sturgeon species determined by flow cytometry. **Cytometry 14**: 377-383.
- BIRSTEIN, V.J. and VASIL'EV, V.P. (1987). Tetraploid-octoploid relationships and karyological evolution in the Order Acipenseriformes (Pisces): karyotypes, nucleoli, and nucleolus-organizer regions in four acipenserid species. **Genetica 72**: 3-12.
- BLACKBURN, H. and GREIDER, C.W. (1995). Telomeres. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- BLACKLIDGE, K.H. and BIDWELL, C.A. (1993). Three ploidy levels indicated by genome quantification in Acipenseriformes of North America. **J. Hered. 84**: 427-430.
- BRITTEN, R.J. and KOHNE, D.E. (1968). Repeated sequences in DNA. **Science 161**: 529-540.
- BROWN, J.R.; BECKENBACH, K.; BECKENBACH, A.T. and SMITH, M.J. (1996). Length variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (Acipenser). **Genetics 142**: 525-535.
- BRUNNER, P.C. DOUGLAS, M.R.; OSINOV, A.; WILSON, C.C. and BERNATCHEZ, L. (2001). Holarctic phylogeography of arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.) inferred from mitochondrial DNA sequences. **Evolution 55**: 573-586.

- BURTZEV, J.A.; NIKOLJUKIN, J. and SEREBRYAKOVA, E.V. (1976). Karyology of the Acipenseridae family in relation to the hybridization and taxonomy problems. *Acta Biol. Jugosl. Ser. Ichthyologia* 8: 27-34.
- CABOT, E.L.; DOSHI, P.; WU, M.L. and WU, C.I. (1993). Population genetics of tandem repeats in centromeric heterochromatin: unequal crossing over and chromosomal divergence at the *Responder* locus of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 135: 477-487.
- CAMACHO, J.P. SHARBEL, T.F. and BEUKEBOOM, L.W. (2000). B-chromosome evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355: 163-178.
- CAMPBELL, C.S.; WOJCIECHOWSKI, M.F.; BALDWIN, B.G.; ALICE, L.A. and DONOGHUE, M.J. (1997). Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Mol. Biol. Evol.* 14: 81-90.
- CANTATORE, P.; ROBERTI, M.; PESOLE, G.; LUDOVICO, A.; MILELLA, F.; GADALETA, M.N. and SACCONI, C. (1994). Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *J. Mol. Evol.* 39: 589-97
- CAPELLO, F.B. (1869). Catalogo dos peixes do Portugal que existem no Museu de Lisboa. *Jorn. Sci. Math. Phys. Nat. (1ª sér)* 2: 131-193
- CHARLESWORTH, B.; SINIEGOWSKI P. and STEPHAN, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220.

CHOO K.H.A. (1997). *The Centromere*. Oxford University Press, Oxford, New York, Toyko.

CHOUHDURY, A. and DICK, T.A. (1998). The historical biogeography of sturgeons (Osteichthyes: Acipenseridae): a synthesis of phylogenetics, palaeontology and palaeogeography. **Journal Biogeography** **25**: 623-640.

CILIBERTO, G.; RAUGEI, G.; COSTANZO, F.; DENTE, L. and CORTESE, R. (1983). Common and interchangeable elements in the promoters of genes transcribed by RNA polymerase III. **Cell** **32**: 725-733.

CISTERNAS, R. (1877). Ensayo de un catálogo descriptivo de los peces de agua dulce que habitan en la provincia de Valencia. **Anales. Sociedad Española de Historia Natural** **6**: 69-138.

CLASSEN, T.E.A. (1944). Estudio bio-estadístico del esturión o sollo del Guadalquivir (*Acipenser sturio* L.). **Trabajos. Instituto Español de Oceanografía** **19**: 1-112.

CREMISI, F.; VIGNALI, R.; BATISTONI, R. and BARSACCHI, G. (1988). Heterochromatic DNA in *Triturus* (Amphibia, Urodela) II. A centromeric satellite DNA. **Chromosoma** **97**: 204-211.

CRONN, R.C.; ZHAO, X.; PATERSON, A.H. and WENDEL, J.F. (1996). Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. **J. Mol. Evol** **42**: 685-705.

CSINK, A.K. and HENIKOFF, S. (1998). Something from nothing: the evolution and utility of satellite repeats. **Trends Genet.** **14**: 200-204.

- DE LA HERRÁN, R.; FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CONGIU, L.; LEIS, M.; ROSSI, R.; RUÍZ REJÓN, C.; RUÍZ REJÓN, M. and GARRIDO-RAMOS, M.A. (2001a). Slow rates of evolution and sequence homogenization in an ancient satellite DNA family of sturgeons. *Mol. Biol. Evol.* **18(1)**: 432-436.
- DE LA HERRÁN, R.; GARRIDO-RAMOS, M.A.; NAVAS, J.I.; 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, J.L.; RUIZ REJÓN, M.; GARRIDO-RAMOS, M.A. and RUIZ REJÓN, C. (2001b). A heterochromatic satellite DNA is highly amplified in a single chromosome of *Muscari* (Hyacinthaceae). *Chromosoma* **110**: 197-202.
- DE LA HERRÁN, R.; RUIZ REJÓN, C.; RUIZ REJÓN, M. and GARRIDO-RAMOS, M.A. (2001c). The molecular phylogeny of the Sparidae (Pisces, Perciformes) based on two satellite DNA families. *Heredity* **87**: 691-697.
- DEMARAIS, B.D.; DOWLING, T.E.; DOUGLAS, M.E.; MINCKELY, W.L. and MARSH, P.C. (1992). Origin of *Gila seminuda* (Teleostei: Cyprinidae) through introgressive hybridization: Implications for evolution and conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2747-2751.
- DESALLE, R.; FREEDMAN, T.; PRAGER, E.M. and WILSON, A.C. (1987). Tempo and mode of sequence in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. *J. Mol. Evol* **26**: 157-164.

- DIGERKUS, G. and HOWELL, W.M. (1976). Karyotypic analysis and evidence of tetraploidy in the North American paddlefish, *Poyodon spathula*. **Science** **194**: 842-844.
- DOADRIO, I.; ELVIRA, B. and BERNAT, Y. (1991). Peces continentales españoles. Inventario y clasificación de zonas fluviales. Colección Técnica, ICONA, Madrid.
- DOUKAKIS, P.; BIRSTEIN, V.J.; DESALLE, R.; LUDWIG, A.N.; LUDWIG, A.; MACHORDOM, A.; ALMODÓVAR, A. and ELVIRA, B. (2000). Failure to confirm previous identification of two putative museum specimens of the Atlantic sturgeon *Acipenser sturio*, as the Adriatic sturgeon, *A. naccarii*. **Mar. Biol.** **136**: 373-377.
- DOVER, G. (1982). Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. **Nature** **299**: 111-117.
- DOVER, G. (1986). Molecular drive in multigene families: how biological novelties arise, spread and are assimilated. **Trends Genet.** **2**: 159-165.
- EDELMAN, G.M. and GALLY, J.A. (1970). Arrangement and evolution of eukaryotic genes. Pp. 962-972. In. F. O. Schmitt (ed.), *The Neurosciences: second Study Program*. Rockefeller University Press, New York.
- ELDER Jr, J.F. and TURNER, B.J. (1995). Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. **The Quarterly Review of Biology** **70**: 297-320.
- ELVIRA, B. and ALMODÓVAR, A. (1993). Notice about the survival of sturgeon (*Acipenser sturio* L., 1758) in the Guadalquivir estuary (S.W. Spain). **Archiv für Hydrobiologie** **129**: 253-255.

- ELVIRA, B.; ALMODÓVAR, A. and LOBÓN-CERVIÁ, J. (1991). Sturgeon (*Acipenser sturio* L., 1758) in Spain. The population of the river Guadalquivir: a case history and a claim for a restoration programme. In: Williot P (ed) *Acipenser*. CEMAGREF Publ., Bordeaux, pp 337-347.
- FANNING, T.G; SEUANEZ, H.N. and FORMAN, L. (1989). Satellite DNA sequences in the neotropical marmoset *Callimico goeldii* (Primates, Platyrrhini). **Chromosoma** **98**: 396-401.
- FELSENSTEIN, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** **39**: 783-791.
- FLAVELL, R.B. (1986). Repetitive DNA and chromosome evolution in plants. **Phil. Trans. Roy. Soc.** **312B**: 227-242.
- FONTANA, F. (1994). Chromosomal nucleolar organizer regions in four sturgeon species as markers of karyotype evolution in *Acipenseriformes* (Pisces) **Genome** **37**: 888-892.
- FONTANA, F. (2002). A cytogenetic approach to the study of taxonomy and evolution in sturgeons. **J. Appl. Ichthyol** **18**: 226-233.
- FONTANA, F. and COLOMBO, G. (1974). The chromosomes of Italian sturgeons. **Experientia** **30**: 739-742.
- FONTANA, F.; JANKOVIC, D. and ZIVKOVIC, S. (1975). Somatic chromosome of *Acipenser ruthenus* L. **Arch. Biol. Nauka, Beograd.** **27**: 33-35.
- FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CHICCA, M.; AIELLO, V. and ROSSI, R. (1998b). Localization of the repetitive telomeric sequence (TTAGGG)_n in four sturgeon species. **Chromosome Research** **6**: 303-306.

- FONTANA, F.; LANFREDI, M.; CHICCA, M.; CONGIU, L.; TAGLIAVINI, J. and ROSSI, R. (1999). Fluorescent *in situ* hybridization with rDNA probes on chromosomes of *Acipenser ruthenus* and *Acipenser naccarii* (Osteichthyes Acipenseriformes). **Genome 42**: 1-5.
- FONTANA, F.; LANFREDI, M.; ROSSI, R.; BRONZI, P. and ARLATI, G. (1996). Karyotypic characterization of *Acipenser gueldenstaedtii* with C-AgNO₃, and fluorescence banding techniques. **Ital. J. Zool. 63**: 113-118.
- FONTANA, F.; ROSSI, R.; LANFREDI, M.; ARLATI, G. and BRONZI, P. (1997). Cytogenetic characterization of cell lines from three sturgeon species. **Caryologia 50**: 91-95.
- FONTANA, F.; TAGLIAVINI, J. and CONGIU, L. (2001). Sturgeon genetics and cytogenetics: recent advancement and perspectives. **Genetica 111**: 359-373.
- FONTANA, F.; TAGLIAVINI, J.; CONGIU, L.; LAURENTE, C. and ROSSI, R. (1998a). Karyotypic characterization of the great sturgeon, *Huso huso*, by multiple staining techniques and fluorescent *in situ* hybridization **Mar. Biol. 132**: 495-501.
- FRANCK, J.P.C.; HARRIS, A.S.; BENTZEN, P.; DENOVAN-WRIGHT, E.M. and WRIGHT, J.M. (1991). Organization and evolution of satellite, minisatellite and microsatellite DNAs in teleost fishes. En Oxford surveys on eukaryotic genes 7 (N. Maclean, ed.). Oxford University Press, Oxford: 51-82.
- FRANCK, J.P.C.; WRIGHT, J.M. and McANDREW, B.J. (1992). Genetic variability in a family of satellite DNAs from tilapia (Pisces: Cichlidae). **Genome 35**: 719-725.

- FUJIWARA, A.; ABE, S.; YAMAHA, E.; YAMAZAKI, F. and YOSHIDA, M.C. (1998). Chromosomal localization and heterochromatin association of ribosomal RNA genes loci and silver stained nucleolar organizer regions in salmonid fishes. **Chrom. Res.** 6: 463-471.
- GARDINER, B.G. (1984). Sturgeons as living fossils. pp. 148-152 in "Living Fossils", edited by N. Eldredge and S. M. Stanley. Springer-Verlag, New York.
- GARRIDO-RAMOS, M.A.; DE LA HERRÁN, R.; JAMILÉNA, M.; LOZANO, R.; RUIZ REJÓN, C. and RUIZ REJÓN, M. (1999). Evolution of centromeric satellite DNA and its use in phylogenetic studies of Sparidae family (Pises, Perciformes). **Mol. Phyl. Evol.** 12: 200-204.
- GARRIDO-RAMOS, M.A.; DE LA HERRÁN, R.; RUIZ REJÓN, C. and RUIZ REJÓN, M. (1998). A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. **Cytogenet Cell Genet** 83: 3-9.
- GARRIDO-RAMOS M.A.; JAMILÉNA, M.; LOZANO, R.; CÁRDENAS S.; RUIZ REJÓN, C. and RUIZ REJÓN, M. (1995a). Phylogenetic relationships of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) inferred from satellite-DNA. **Hereditas** 122: 1-6.
- GARRIDO-RAMOS M.A.; JAMILÉNA, M.; LOZANO, R.; RUIZ REJÓN, C. and RUIZ REJÓN, M. (1995b). The *EcoRI* centromeric satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) contains a sequence motive common to other vertebrate centromeric satellite DNAs. **Cytogenet Cell genet** 71: 345-351.

GARRIDO-RAMOS, M.A.; SORIGUER, M.C.; DE LA HERRÁN, R.; JAMILENA, M.; RUÍZ REJÓN, C.; DOMEZIN, A.; HERNANDO, J.A. and RUIZ REJON, M. (1997). Morphometric and genetic analysis as proof of the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir river. **Mar. Biol.** **129**: 33-39.

GASENT-RAMÍREZ, J.M.; GODOY, J.A. and JORDANO, P. (2001). Identificación de esturiones procedentes del Guadalquivir mediante análisis de ADN en especímenes de museo. Medio Ambiente. **Publicaciones de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía** **36**: 44-49

GIBERT, A. (1911). Fauna ictiológica de Catalunya. II. **Boletín de la Institución Catalana de Historia Natural**, 2ª época, **8**: 98-108.

GIBERT, A. (1913). Fauna ictiológica de Catalunya. **Boletín de la Institución Catalana de Historia Natural**, 2ª época, **9**: 1-96.

GONÇALVES, B.C. (1942). Colecção ocnográfica de D. Carlos I . Peixes. **Trav Stn Biol marit Lisb** **46**: 1-108.

GRAUR, D. and LI, W.H. (1999). *Fundamentals of molecular evolution*. 2nd edition, Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.

GREGORY, T.R. and HEBERT, P.D. (1999). The modulation of DNA content: proximate causes and ultimate consequences. **Genome Research** **9**: 317-324.

GRÉTARSDÓTTIR, G. and ARNASON, U. (1992). Evolution of the common cetacean highly repetitive DNA component and the systematic position of *Orcaella brevirostris*. **J. Mol. Evol.** **34**: 201-208.

- GRÉTARSDÓTTIR, G. and ARNASON, U. (1993). Molecular studies on two variant repeat types of the common cetacean DNA satellite of the sperm whale, and the relationship between Physeteridae (sperm whales) and Ziphiidae (beaked whales). *Mol. Biol. Evol.* **10**: 306-318.
- HANSON, R.E.; ISLAM-FARIDI, M.N.; PERCIVAL, E.A.; CRANE, C.F.; JI, Y.; MCKNIGHT, T.D.; STELLY, D.M. and PRICE, H.J. (1996). Distribution of 5s and 18s-28s rDNA loci in a tetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L.) and its putative diploid ancestors. *Chromosoma* **105**: 55-61.
- HARRISON, R.G. (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.* **4**: 6-11.
- HE, L.; ZHU, Z.; FARAS, A.J.; GUISE, K.S.; HACKETT, P.B. and KAPUSCINSKI, A.R. (1992). Characterization of Alu I repeats of zebrafish *Brachydanio rerio*. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* **1**: 125-135.
- HEDRICK, R.P.; MCDOWELL, T.S.; ROSEMARCK, R.; ARONSTEIN, D. and LANNAN, C.N. (1991). Two cell lines from white sturgeon. *Trans. Am. Fish Soc.* **120**: 528-534.
- HOLCIK, J.; KINZELBACK, R.; SOKOLOV, L.L. and VASILEV, V.P. (1989). *Acipenser sturio* Linnaeus, 1758. In Holcik J (ed) *The freshwater fishes of Europe*. Aula-Verlag. Wiesbaden, pp 367-394.
- HÖRZ, W. and ZACHAU, H.G. (1977). Characterization of distinct segments in mouse satellite DNA by restriction nucleases. *Eur. J. Biochem.* **73**: 383-392.
- HOUBEN, A.; WANNER, G.; HANSON, L.; VERLIN, D.; LEACH, C.R. and TIMMIS, J.N. (2000). Cloning and characterisation of polymorphic

heterochromatic segments of *Brachycome dichromosomatica*. **Chromosoma** **109**: 206-213.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM.
(2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature** **409**:
860-921.

JAMILENA, M.; RUIZ REJÓN, C. and RUIZ REJÓN, M. (1993). Repetitive DNA
sequence families in *Crepis capillaris*. **Chromosoma** **102**: 272-278.

JUKES, T.H. and CANTOR, C.R. (1969). evolution of protein molecules. Pp. 21-
132. In H.N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic
Press, New York.

KATO, M. (1999). Structural bistability of repetitive DNA elements featuring
CA/TG dinucleotide steps and mode of evolution of satellite DNA. **Eur.**
J. Biochem. **265**: 204-209.

KEDROVA, O.S.; WLADYTCHENKAYA, N.S. and ANTONOV, A.S. (1980).
Single copy and repeated sequence divergency in the fish genomes. **Mol.**
Biol. (Russ.) **14**: 1001-1012.

KIPPLING, D. (1995). *The telomere*. Oxford University Press Inc., New York.

KRIEGER, J.; FUERST, P.A. and CAVENDER, T. (2000). Phylogenetic
relationships of North American sturgeons (order Acipenseriformes)
based on mitochondrial DNA sequences. **Mol. Phyl. Evol.** **16**: 64-72.

KRIEGER, J. and FUERST, P.A. (2002a). Evidence of multiple alleles of the
nuclear 18S ribosomal RNA gene in sturgeon (Family: Acipenseridae). **J.**
Appl. Ichthyol **18**: 290-297.

- KRIEGER, J. and FUERST, P.A. (2002b). Evidence for a slowed rate of molecular evolution in the Order Acipenseriformes. **Mol. Biol. Evol.** **19**: 891-897.
- KRYLOVA, V.D. (1999). Development of a universal methodology for morphological analysis of sturgeons (Acipenseridae).
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I.B. and NEI, M. (2001). MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA
- LANFREDI, M.; CONGIU, L.; GARRIDO-RAMOS, M.A.; DE LA HERRÁN, R.; LEIS, M.; CHICCA, M.; ROSSI, R.; TAGLIAVINI, J.; RUIZ REJON, C.; RUIZ REJON, M. and FONTANA, F. (2001). Chromosomal location and evolution of satellite DNA family in seven sturgeon species. **Chromosome Research** **9**: 47-52.
- LAURSEN, H.B.; JORGENSEN, A.L.; JONES, C. and BAK, A.L. (1992). Higher rate of evolution of X chromosome alpha-repeat DNA in human than in the great apes. **EMBO J.** **11**: 2367-2372.
- LEGEZA, M.I. (1971). On the hybrids of the Caspian Sea acipenserids. *Trudy TSNIORKH* **3**: 196-206. (in Russian).
- LELEK, A. (1987). *Threatened Fishes of Europe*. Aula-Verlag. Wiesbaden: 343 pp.
- LEWIN, B. (1994). *Genes V*. Oxford University Press Inc., New York.
- LEWIN, B. (1997). *Genes VI*. Oxford University Press Inc., New York.

- LI, M.F.; MARRAYATT, V.; ANNAND, C. and ODENSE, P. (1985). Fish cell culture two newly developed cell lines from Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) and guppy (*Poecilia reticulata*). **Can. J. Zool.** **63**: 2867-2874.
- LI, W. (1997). *Molecular Evolution* (Sinauer, Sunderland, Massachusetts).
- LÓPEZ-FLORES, I.; DE LA HERRÁN, R; GARRIDO-RAMOS, M.A.; NAVAS, J.I.; RUIZ-REJÓN, C. and RUIZ-REJÓN, M. (2002). Molecular diagnosis of *Marteilia refringens* based on IGS sequence. International Meeting of Aquaculture. Trieste, Italy pp: 308-309.
- LOZANO-REY, L. (1919). Los peces de la fauna ibérica en la colección del Museo en 1 de Enero de 1919. Trabajos del Museo Nacional de ciencias Naturales de Madrid, serie zoológica 39: 1-112.
- LUCCHINI, S.; NARDI, I.; BARSACCHI, G.; BATISTONI, R. and ANDRONICO, F. (1993). Molecular cytogenetics of the ribosomal (18S+28S and 5S) DNA loci in prime and advanced urodele amphibians. **Genome** **36**: 762-773.
- LUDWIG, A.; BELFIORE, N.M.; PITRA, C.; SVIRSKY, V. and JENNECKENS, I. (2001). Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*). **Genetics** **158**: 1203-1215.
- LUDWIG, A.; DEBUS, I.; LIECKFELDT, D.; WIRGIN, I.; BENECKE, N.; JENNECKENS, I.; WILLIOT, P.; WALDMAN, J.R. and PITRA, C. (2002). When the American sea sturgeon swam east. **Nature** **419**: 447-448.

- LUDWIG, A. and KIRSCHBAUM, F. (1998). Comparison of mitochondrial DNA sequences between the European and the Adriatic sturgeon. *J. Fish Biol.* **52**: 1289-1291.
- LUDWIG, A.; MAY, B.; DEBUS, L. and JENNECKENS, I. (2000). Heteroplasmy in the mtDNA control region of Sturgeon (Acipenser, Huso and Scaphirhynchus). *Genetics*: **156**: 1933-1947.
- MADSEN, C.S.; de KLOET, D.H.; BROOKS, J.E. and de KLOET, S.W. (1992). Highly repeated DNA sequences in birds: the structure and evolution of an abundant, tandemly repeated 190.bp DNA fragment in parrots. *Genomic*, **14**: 462-469.
- MÄKINEM, A.; ZIJLSTRA, C.; DE HAAN, N.A.; MELLINK, C.H.M. and BOSMA, A.A. (1997). Localization of 18S plus 28S and 5S ribosomal RNA genes in the dog by fuorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **78**: 231-235.
- MARTIN, A.P. (1999). Substitution rates of organelle and nuclear genes in sharks: implicating metabolic rate (again). *Mol. Biol. Evol.* **16**: 996-1002.
- MARTIN, A.P.; NAYLOR, G.J.P. and PALUMBI, S.R. (1992). Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared to mammals. *Nature* **357**: 153-155.
- MARTIN, A.P. and PALUMBI, S.R. (1993). Body size, metabolicrate, generation time, and the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 4087-4091.
- MARTINS, C. and GALETII Jr., P.M. (1999). Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish (Anostomidae, Characiformes). *Chromosome Research* **7**: 363-367.

- MARTINS, C. and GALETII Jr., P.M. (2000). Conservative distribution of 5S rDNA loci in *Schizodon* (Pisces, Anostomidae) chromosomes. **Chromosome Research**. **8**: 353-355.
- MARTINS, C. and GALETII Jr., P.M. (2001a). Organization of 5S in *Leporinus* fish species: two different genomic locations are characterized by distinct non-transcribed spacers (NTSs). **Genome** **44**: 903-910.
- MARTINS, C. and GALETII Jr., P.M. (2001b). Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes?. **Genetica** **111**: 439-446.
- MARTINS, C.; WASKO, A.P.; OLIVEIRA, C. and WRIGHT, J.M. (2000). Nucleotide sequence of 5S rDNA and localization of the ribosomal RNA genes to metaphase chromosomes of the tilapiine cichlid fish, *Oreochromis niloticus*. **Hereditas** **133**: 39-46.
- McCARTHY, C. (1996-1998). School of Health Science, Griffith University, Gold Coast Campus. Southport, Queensland, Australia.
- McGREGOR, H.C. and SESSIONS, S.K. (1986). The biological significance of variation in satellite DNA and heterochromatin in newts of the genus *Triturus*: an evolutionary perspective. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B**, **312**: 243-259.
- McHUGH, K.P.; MADSEN, C.S. and de KLOET, S.R. (1990). A highly repeated retropseudogene-like sequence in DNA of the redbreasted merganser (*Mergus serrator*). **Gene (Amst.)** **87**: 193-197.
- MEREDITH, S.E.O.; LANDO, G.; GBAKIMA, A.A.; ZIMMERMAN, P. and UNNASCH, T.R. (1991). *Onchocerca volvulus*: application of the

- polymerase chain reaction to identification and strain differentiation of the parasite. *Expl. Parasit.* **73**: 335-344.
- MEINKOTH J. and WAHL, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Analytical Biochemistry* **138**: 267-284.
- MIKLOS, G.L. (1985). Localized highly repetitive DNA sequences in vertebrate and invertebrate genomes. Pp 241-321. In: R.J. MacIntyre (ed.), *Molecular Evolutionary Genetics*. Plenum, New York.
- MÓRAN, P.; MARTÍNEZ, J.L.; GARCÍA-VÁZQUEZ, E. and PENDÁS, A.M. (1996). Sex linkage of 5S rDNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Cytogenet. Cell Genet.* **75**: 145-150.
- MRAVINAC, B.; PLOHL, M.; MEŠTROVIĆ, N. and UGARKOVIĆ, Đ (2002). Sequence of PRAT satellite DNA "frozen" in some Coleopteran species. *J. Mol. Evol* **54**: 774-783.
- MURRAY, M.G.; PETERS, D.L. and THOMPSON, W.F. (1981). Ancient repeated sequences in the pea and mung bean genomes and implications for genome evolution. *J. Mol. Evol* **17**: 31-42.
- NAKAHORI, Y.; MITANI, K.; YAMADA, M. and NAKAGOME, Y. (1986). A human Y-chromosome specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucleic Acids Res.* **14**: 7569-7580.
- NEI, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia Press, New York.
- NIJMAN, I.J. and LENSTRA, J.A. (2001). Mutation and recombination in cattle satellite DNA: a feedback model for the evolution of satellite DNA repeats. *J. Mol. Evol* **52**: 361-371.

- NOWRUZFASHKHAMI, M.R. (1996). On the Karyotypes of *Acipenser persicus*, *A. stellatus* and *Huso huso* from the Iranian waters of the Caspian Sea. *Sturg. Quart.* 4: 7.
- NOWRUZFASHKHAMI, M.R. and M. KHOSROSHAHI. (1999). Karyotype study on stellate and great sturgeon by leukocyte culture. *J. Appl. Ichthyol.* 15: 283.
- NOWRUZFASHKHAMI, M.R.; POURKAZEMI, M. and BARADARANNOVEIRI, S. (2000). Chromosome study of Persian sturgeon *Acipenser persicus* B. *Cytologia* 65: 197-202.
- OHNO, S. (1972). So much "Junk" in our genomes. *Brookhaven Symp. Biol.* 23: 366-370.
- OHNO, S.; MURAMOTO, J.; STENIUS, C.; CHRISTIAN, L. and KITTERELL, W.A. (1969). Microchromosomes in holocephalian, chondrosteian and holostean fishes. *Chromosoma* 226: 35-40.
- 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. USA* 89: 1016-1020.
- OHTA, T. (1990). How gene families evolve. *Theor. Pop. Biol.* 37: 213-219.
- OHTA, T. and DOVER, G. (1984). The cohesive population genetics of molecular drive. *Genetics* 108: 501-521.
- ORGEL, L.E. and CRICK, F.H.C. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284: 604-607.

- PANG, J.; WANG, Y.; ZHONG, Y.; RUS HOELZEL, A.; PAPENFUSS, T.J.; ZENG, X.; ANANJEVA, N.B. and ZHANG, Y. (2003). A phylogeny of Chinese species in the genus *Phrynocephalus* (Agamidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. **Mol. Phyl. Evol.** 27: 398-409.
- PARDO, M.B.G. (2001). Estudio citogenético y molecular de los genes ARNr en el Orden Pleuronectiformes. Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.
- PARDUE, M.L. and HENNING, W. (1990). Heterochromatin: junk or collectors item?. **Chromosoma** 100: 3-7.
- PASTORINI, J.; FORSTNER, M.R.J. and MARTIN, R.D. (2002) Phylogenetic relationships among Lemuridae (Primates): evidence from mtDNA. **Journal of Human Evolution** 43: 463-478.
- PENDÁS, A.M.; MÓRAN, P.; FREIJE, J.P. and GARCIA-VÁZQUEZ, E. (1994). Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of the Atlantic salmon 5S rDNA **Cytogenet. Cell Genet.** 67: 31-36.
- PENDÁS, A.M.; MORÁN, P; MARTÍNEZ, J.L. and GARCIA-VÁZQUEZ, E. (1995). Applications of 5S rDNA in Atlantic salmon, brow trout, and in Atlantic salmon x brown trout hybrid identification. **Mol. Ecol.** 4: 275-276.
- PEREIRA, N.C. (1995). The freshwater fishes of the Iberian Peninsula. **Arquivos do Museu Bocage, Nova Série, 2 (30):** 473-538.
- del PINO, E.M.; MURPHY, C.; MASSON, P.H. and GALL, J.G. (1992). 5S rRNA-encoding genes of the marsupial frog *Gastrotheca riobambae*. **Gene** 111: 235-238.

- PONS, J.; BRUVO, B.; JUAN, C.; PETITPIERRE, E.; PLOHL, M. and UGARKOVIĆ, Đ (1997). Conservation of satellite DNA in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Gene** **205**: 183-190.
- PONS, J.; JUAN, C. and PETITPIERRE, E. (2002b). Higher-order organization and compartmentalization of satellite DNA PIM357 in species of the coleopteran genus *Pimelia*. **Chromosome Research** **10**: 597-606.
- PONS, J.; PETITPIERRE, E. and JUAN, C. (2002a). Evolutionary dynamics of satellite DNA family PIM357 in species of the genus *Pimelia* (Tenebrionidae, Coleoptera). **Mol. Biol. Evol.** **19**: 1329-1340.
- PRESA, P.; PARDO, B.G.; MARTINEZ, P. and BERNATCHEZ, L. (2002). Phylogeographic congruence between mtDNA and rDNA ITS markers in brown trout. **Mol. Biol. Evol.** **19**: 2161-2175.
- REED K.M.; HACKETT, J.D. and PHILLIPS R.B. (2000). Comparative analysis of intra-individual and inter-species DNA sequence variation in salmonid ribosomal DNA cistrons. **Gene** **249**:115-125.
- REED, K.M. and PHILLIPS, R.B. (2000). Structure and organization of the rDNA intergenic spacer in lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Chromosome Res.** **8 (1)**: 5-16.
- RICO, C.; RICO, I. and HEWITT, G. (1996). 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. **Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.** **263**: 549-557.
- RIESING, M.J.; KRUCKENHAUSER, L.; GAMAUF, A. and HARING E. (2003). Molecular phylogeny of the genus *Buteo* (Aves: Accipitridae) based on mitochondrial marker sequences. **Mol. Phyl. Evol.** **27**: 328-342.

- ROVIRA, C.; BEERMAN, W. and ADSTROM, J.E. (1993). A repetitive DNA sequence associated with the centromeres of *Chironomus pallidivittatus*. **Nucleic Acids Res.** **21**: 1775-1781.
- ROZAS, J. and ROZAS, R. (1999). DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. **Bioinformatics** **15**: 174-175.
- RUIZ REJÓN, M.; DE LA HERRÁN, R.; RUÍZ REJÓN, C. and GARRIDO-RAMOS, M.A. (2000). Genetic characterization of *Acipenser sturio* L., 1758 in relation to other sturgeon species using satellite DNA. **Boletín Instituto Español de Oceanografía.** **16(1-4)**: 231-236.
- SAITOU, N. and NEI, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Biol. Evol.** **4**: 406-425.
- SAJDAK, S.L.; REED, K.M. and PHILLIPS, R.B. (1998). Intraindividual and interspecies variation in the 5S rDNA of coregonid fish. **J. Mol. Evol.** **46**: 680-688.
- SAMBROOK, J. and RUSSEL, D.W. (2001). Molecular cloning. A laboratory manual. 3th Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SANGER, F.; NICKLEN, S. and COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **74**: 5463-5467.
- SAWYER, S.A. (1999). GENECONV: A computer package for the statistical detection of gene conversion. Distributed by the author, Department of Mathematics, Washington University in St. Louis.

- SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D. and EXCOFFIER, L. (2000). ARLEQUIN version 2.000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SCOTT, A.F.; HEATH, P.; TRUSKO, S.; BOYER, S.H., PRASS, W.; GOODMAN, M.; CZELUSNIAK, J.; CHANG, L.Y. and SLIGHTOM, J.L. (1984). The sequence of the gorilla fetal globin genes: Evidence for multiple gene conversions in human evolution. **Mol. Biol. Evol.** 1: 371-389.
- SHINOHARA, A.; CAMPBELL, K.L. and SUZUKI, H. (2003). Molecular phylogenetic relationships of moles, shrew moles and desmans from the new and old worlds. **Mol. Phyl. Evol.** 27: 247-258.
- SINGER, M.F. (1982). Highly repeated sequences in mammalian genomes. **Int. Rev. Cytol.** 76: 67-112.
- SINGER, M.F. and BERG, P. (1991). Genes and Genomes: A Changing Perspective. University Science Books, Mill Valley, CA.
- SMITH, G.P. (1976). Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science.** 191: 528-535.
- SOKOLOV, L.I. (1989). *Acipenser*, Linnaeus. In Holcik J. (ed). The freshwater fishes of Europe. Aula-Verlag, Wiesbaden, pp 201-205.
- SOKOLOV, L.I. and VASIL'EV, V.P. (1989). *Acipenser nudiventris* Lovetsky, 1928. In: The freshwater fishes of Europe. Vol 1/II General introduction to fishes Acipenseriformes. J. Holcik (Ed.). Wiesbaden, pp. 206-226.
- STEINDACHNER, F. (1866). Ichthyologischer Bericht über eine nach Spanien und Portugal unternommene Reise. Über die Fische des Ebro und der

- THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. and HIGGINS, D.G. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **24**: 4876-4882.
- TRICK, M. and DOVER, G. (1984). Unexpectedly slow homogenisation within a repetitive DNA family shared between two species of tsetse fly. *J. Mol. Evol* **20**: 322-329.
- TYLER-SMITH, C. and WILLARD, H.F. (1993). Mammalian chromosome structure. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **3**: 390-397.
- UGARKOVIĆ, Đ and PLOHL, M. (2002). Variation in satellite DNA profiles-causes and effects. *The European Molecular Biology Organization Journal* **21**: 5955-5959.
- VAN EENENNAAM, A.L.; MURRAY, J.D. and MEDRANO, J.F. (1998). Mitotic analysis of the North American white sturgeon, *Acipenser transmontanus* Richardson (Pisces, Acipenseridae), a fish with a very chromosome number. *Genome* **41**: 266-271.
- VAN EENENNAAM, A.L.; MURRAY, J.D. and MEDRANO, J.F. (1999). Karyotype of the American green sturgeon. *Trans. Am. Fish. Soc.* **128**: 175-177.
- VASIL'EV, V.P. (1999). Polyploidization by reticular speciation in Acipenseriform evolution: a working hypothesis. *J. Appl. Ichthyol* **15**: 29-31.
- VASIL'EV, V.P.; SOKOLOV, L.I. and SEREBRYAKOVA, E.V. (1980). Karyotype of the siberian sturgeon *Acipenser baerii* Brandt from the Lena River and

- Flüsse bei Bilbao. Sitzungsberichte. Akademie der Wissenschaften in Wien 53: 198-205.
- STEPIEN, C.A. and KOCHER, T.D. (1997). Molecules and morphology in studies of fish evolution. In: Kocher, T.D. and Stepien, S.D. (eds) *Molecular Systematics of Fishes*, pp. 1-11. Academic Press, San Diego.
- STRACHAN, T.; WEBB, D. and DOVER, G. (1985). Transition stages of molecular drive in multiple-copy DNA families in *Drosophila* **The European Molecular Biology Organization Journal** 4: 1701-1708.
- SUZUKI, H.; MORIWAKI, K. and SAKURAI, S. (1994). Sequences and evolutionary analysis of mouse 5S rDNAs. **Mol. Biol. Evol.** 11: 704-710.
- SUZUKI, H.; SAKURAI, S. and MATSUDA, Y. (1996). Rat rDNA spacer sequences and chromosomal assignment of the genes to the extreme terminal region of chromosome 19. **Cytogenet. Cell Genet.** 72: 1-4.
- SVETOVIDOV, A.N. (1989). Acipenseridae. In: P.J.P. Whitehead, M.L.; Bauchot and E. Tortonese, (Eds). *Fishes of north-eastern Atlantic and Mediterranean*. 2nd edn. UNESCO, Paris. Pp 220-225.
- TAGLIAVINI, J.; CONTERIO, G.; GANDOLFI, G. and FONTANA, F. (1999b). Mitochondrial DNA sequences of six sturgeon species and phylogenetic relationships within Acipenseridae. **J. Appl. Ichthyol** 15: 17-22.
- TAGLIAVINI, J.; WILLIOT, P.; CONGIU, L.; CHICCA, M.; LANFREDI, M.; ROSSI, R. and FONTANA, F. (1999a). Molecular cytogenetic analysis of the karyotype of the European Atlantic sturgeon, *Acipenser sturio*. **Heredity** 83: 520-525.

- some questions of the acipenserid karyotypic evolution. **Vopr. Ichthyol.** **23:** 814-822.
- VIEIRA, A.X.L. (1898). Catálogo dos peixes de Portugal em colecção no Museu de Zoologia da Universidade de Coimbra. **Annaes de Sciencias Naturaes 4:** 7-87.
- VIGNALI, R.; FILLIPO, M.R.; BATISTONI, R.; FRATTA, D; CREMISI, F. and BARSACCHI, G. (1990). Two dispersed highly repeated DNA families of *Triturus vulgaris meridionalis* (Amphibia, Urodela) are widely conserved among Salamandridae. **Chromosoma 100:** 87-96.
- WASKO, P.A.; MARTINS, C.; WRIGHT, J.M. and GALETTI Jr, P.M. (2001) Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. **Genome 44:** 893-902.
- WIJERS, E.R.; ZIJLSTRA, C. and LENSTRA, J.A. (1993). Rapid evolution of horse satellite DNA. **Genomics 18:** 113-117.
- WILLARD, H.F. (1991). Evolution of alpha satellite. **Curr. Opin. Gen. Dev. 1:** 509-514.
- WILLARD, H.F. and WAYNE, J.S. (1987a). Chromosome-specific subsets of human alpha satellite DNA: analysis of sequence divergence within and between chromosomal subsets and evidence for an ancestral pentameric repeat. **J. Mol. Evol. 25:** 207-214.
- WILLARD, H.F. and WAYNE, J.S. (1987b). Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. **Trends Genet. 3:** 192-198.

WILLIOT P.; SABEAU, L.; GESSNER, J.; ARLATI, G.; BRONZI, P.; GULYAS, T. and BERNI, P. (2001). Sturgeon farming in Western Europe: Recent developments and perspectives. **Aquatic Living Resources 14**: 367-374.

YU, X.; ZHOU, T.; LI, K.; LI, Y. and ZHOU, M. (1987). On the karyosystematics of cyprinid fishes and a summary of fish chromosome studies in China. **Genetica 72**: 225-236.



Universidad de Granada

Facultad de Ciencias

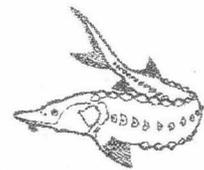
Departamento de Genética



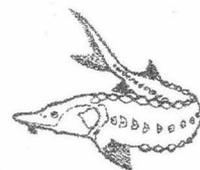
A mis padres

A Juan Jesús

A María



OBJETIVOS



DISCUSIÓN