

EL GENOMA DE LOS PECES. ASPECTOS BÁSICOS Y APLICADOS

Manuel Ruiz Rejón

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias

Universidad de Granada

1. INTRODUCCIÓN

Aunque algunos peces como los salmónidos se han utilizado ocasionalmente por los biólogos moleculares como material de estudio, en realidad este grupo de vertebrados ha sido poco analizado desde el punto de vista molecular. En los últimos años el panorama ha variado, y ya son muchos los biólogos moleculares que utilizan los peces para sus experiencias. En concreto, son tres los campos de la Biología Molecular en los que los peces han hecho irrupción. En primer lugar, el pez japonés fugu está siendo objeto de un proyecto genoma por cuanto, debido a su bajo contenido en DNA, presenta ventajas para este tipo de estudios, y puede servir de modelo comparativo para el genoma humano (Brenner y col., 1993; Elgar y col., 1996). En segundo lugar, los salmónidos sobre todo, pero también otros grupos de peces, están siendo objeto de experiencias de ingeniería genética que pretenden mejorar sus prestaciones a la hora de cultivarlos (Devlin y col., 1994). Finalmente, los peces, y el pez cebrá concretamente, son objeto de estudio por parte de los genéticos que tratan de determinar el control genético de un aspecto tan importante de los seres vivos como es el desarrollo (Granato & Nüsslein-Volhard, 1996).

Nuestro grupo viene desarrollando desde la mitad de la década de los años ochenta una línea de investigación en Genética de peces. En este trabajo se exponen los resultados y conclusiones obtenidas por nuestro grupo en el análisis del DNA satélite de espáridos, sobre todo, pero también de esturiones. Se destacarán las implicaciones que presentan nuestros trabajos desde los puntos de vista básico (conceptual) y aplicado. Las investigaciones a las que nos referiremos a continuación han sido publicadas previamente en Garrido-Ramos y col. (1994, 1995a, 1995b y en prensa).

2. CARACTERIZACION Y FUNCION DEL DNA SATELITE DEL CENTROMERO DE LOS ESPARIDOS

El contenido de DNA de los peces Teleósteos oscila entre 0.4 y 4.4 pg, aunque los valores altos corresponden a aquellos linajes que en su evolución han sufrido procesos de poliploidización. Excluidas estas especies, los valores de C en los teleósteos oscilan entre 0.4 y 1.5 pg (Hinegardner, 1980), lo que corresponde aproximadamente a la décima parte del genoma de los mamíferos. Este bajo contenido en DNA es debido al menor contenido en DNA repetido, DNA satélite sobre todo, de este grupo de vertebrados de sangre fría, con respecto a otros vertebrados de sangre caliente (Bernardi y Bernardi, 1990a, 1990b). Con estas características, los peces constituyen un material adecuado para llevar a cabo estudios sobre el DNA satélite en general, y sobre el DNA satélite presente en los centrómeros en particular.

El DNA satélite está constituido por familias de secuencias cortas que se repiten en tándem cientos de miles de veces e incluso millones de veces, formando clusters o loci cromosómicos en los genomas eucarióticos (Singer, 1982). Estas regiones se corresponden con la heterocromatina constitutiva, la cual se puede poner de manifiesto citológicamente en los cromosomas mediante técnicas como el bandeado C o las de tinción con fluorocromos. Además, se sabe que la heterocromatina- y por ende el DNA satélite- se acumula preferentemente en los centrómeros y telómeros. En principio las secuencias que forman parte de este tipo de DNA no contienen información genética conocida, no siendo transcritas, aunque existen excepciones. Sin embargo, en el DNA satélite que forma parte de los centrómeros se ha sostenido por algunos autores que habría otro tipo de "información estructural" que permitiría que esta parte específica de los cromosomas cumpliera su función (véase más adelante).

Y es que si bien no está demostrado que el DNA satélite que suele existir en los telómeros juegue papel funcional alguno, no ocurre lo mismo con el ADN satélite presente en los centrómeros. De hecho, el único organismo en el que la función centromérica no está asociada a secuencias de DNA repetido es *Saccharomyces cerevisiae*. En esta levadura, la función centromérica está contenida enteramente en una secuencia única de unos 125 pb (Clarke y Carbon, 1980, 1985). Sin embargo, ya el centrómero de *Schizosacharomyces pombe* contiene varias clases de secuencias de DNA repetido que son necesarias para la función centromérica (Clarke y col. 1986). La explicación de esta diferencia puede estar en que *S. pombe* tiene un ciclo celular más complejo y similar al resto de los eucariotas con la formación de un cinetocoro, existencia de huso multitubular, de condensación cromosómica y de fases G1, S, G2 y M discretas. Estas características no se dan en levaduras que como *S. cerevisiae* no tienen un proceso ecuatorial en la división celular, en las que sólo interviene un huso unitubular en la segregación cromosómica, y en las que no parece patente la existencia de un cinetocoro característico de eucariotas (Rieder, 1982).

Se sabe menos sobre el centrómero de eucariotas. Ello es debido a la complejidad de los cromosomas eucarióticos, y, sobre todo, a que los centrómeros están inmersos en regiones cromosómicas de grandes clusters (loci)

de secuencias de DNA repetido que representan un inmenso obstáculo al análisis molecular. Los organismos más estudiados para esta zona de los cromosomas son los vertebrados, y dentro de ellos los mamíferos, el hombre sobre todo. En mamíferos, se pueden definir distintas zonas o dominios del cromosoma metafásico a nivel centromérico : 1) un dominio apareante que supone el punto de contacto que mantiene unidas las cromátidas hermanas tras la replicación, 2) un dominio central , y 3) un dominio superficial que comprende el cinetocoro . El cinetocoro es el sitio al que se unen las fibras del huso y donde es posible que se encuentre el "motor" mecánico-químico necesario para la segregación anafásica de las cromátidas hermanas o de los cromosomas homólogos. Para aclarar el funcionamiento del centrómero en general es muy importante conocer qué tipo de secuencias se hallan en estos dominios, cuáles son las proteínas que están relacionadas con dichas secuencias, y cuál es el papel de unas y otras en las diversas funciones asociadas al centrómero. Y, sobre todo, es necesario conocer cómo ocurre la unión de las cromátidas hermanas hasta anafase y la segregación de las mismas, es decir es muy importante aclarar la composición y estructura del cinetocoro.

En base a los datos de que se disponen, Zinkowsky y col. (1991) han diseñado un modelo del complejo cinetocoro-centrómero para mamíferos, basado en la unión del cinetocoro a la cromatina centromérica a través del plegamiento de una fibra de DNA consistente en unidades repetitivas en tandem. De todas las familias de DNA repetitivo existentes en el centrómero de los cromosomas humanos, las secuencias candidatas para llevar a cabo este papel serían las del DNA satélite alfa (Tyler-Smith y Willard, 1993), y en ratones las del satélite menor del centrómero (Wong y Rattner, 1988). Ambos satélites parecen jugar un papel importante en la organización del cinetocoro y ambos, que no presentan relaciones de parentesco en su secuencia, presentan una secuencia motivo muy conservada de 17pb, llamada CENP-B (Masumoto y col., 1989a,b): CT(A/T)C/T)G(T/G)TGAAA(C/A)GG(G/A)A en el satélite alfa y CATTCTGGAAACGGGA en el satélite del ratón. Esta secuencia es reconocida específicamente por la proteína CENP-B tanto *in vitro* como *in vivo* (Muro y col. 1992). CENP-B pertenece al grupo de proteínas de unión al DNA que contienen un dominio hélice-lazo-hélice (Sullivan y Glass, 1991). A este grupo de proteínas pertenecen diversas proteínas relacionadas con la regulación de la transcripción y una proteína, la CBF1, que se une específicamente a una región, la llamada CDE-I, del centrómero de *S. cerevisiae*. Se ha confirmado que la proteína CENP-B aparece distribuida por la heterocromatina donde están localizados los satélites mencionados y concretamente en el dominio central del centrómero (Cooke y col., 1990). Todas las características mencionadas aportan datos a favor de que el DNA satélite centromérico, y concretamente el motivo CENP-B, desempeña un papel importante en la estructura y función del centrómero en estos organismos. El hecho de que el DNA satélite alfa sea muy variable, o que el alfa humano y el satélite menor del ratón no se parezcan excepto en el motivo mencionado no presentaría dificultades para esta hipótesis, por cuanto lo importante es que el centrómero posea estos motivos o dominios que sirven como señal para la unión de proteínas, independientemente de las secuencias aledañas, y que estos dominios estén adecuadamente espaciados y

estabilizados en una ordenación concreta, la cual serviría como punto de nucleación para la formación del cinetocoro.

Todo esto es lo investigado en el centrómero de mamíferos, y las preguntas que surgen a continuación son si el centrómero de los otros vertebrados y de los demás seres vivos en general tendrá una estructura y una composición similar, y en concreto si estarán basados en motivos similares a los mencionados. Los datos sobre el centrómero en otros vertebrados son escasos. De hecho, solo se conocen algunas secuencias de DNA satélite centroméricas de anfibios (tritones), presentando estas secuencias características comunes a los satélites de mamíferos, tales como su riqueza en AT, la existencia de series de adeninas y la posibilidad de adquirir curvaturas estables (Cremisi y col., 1988).

Así las cosas, nosotros iniciamos nuestra investigación del DNA satélite presente en una familia de peces como es la de los Espáridos. La familia Sparidae constituye un grupo de peces en el que se incluyen peces tan interesantes desde el punto de vista comercial como la dorada, la breca, la herrera, el pargo, la urta, los sargos etc. La mayoría de los peces que forman parte de este grupo poseen el número cromosómico ($2n=48$) que se cree que es el ancestral de Teleosteos, oscilando su contenido en DNA (valor C) entre 0.52 y 0.65 pg (Cano y col., 1981, 1982). Iniciamos la clonación de los DNA satélites existentes en el genoma de estos peces en la dorada, y posteriormente, utilizando como sonda los clones obtenidos en esta especie, hemos extendido el análisis al resto de las especies. Así hemos encontrado una familia de DNA satélite, a la que hemos llamado familia Eco-RI, que está presente en el genoma de todas las especies analizadas hasta ahora, y en todas ellas en los centrómeros. El tamaño de las unidades monoméricas de la familia EcoRI de todas las especies (10 especies analizadas hasta el momento y 46 clones) tiene una longitud consenso de 187 pb, excepto en el caso de la breca, y debe de constituir algo así como el 2% del total del genoma de estos peces, según hemos estimado en la dorada. La secuencia de DNA satélite centromérico de los espáridos destaca por su alto contenido en AT (62-67%, según las especies), y por contener una gran cantidad de series cortas de adeninas y/o timidinas consecutivas. Estas dos características, junto con la de la longitud de las unidades monoméricas (187 pb), son comunes a otros DNA satélites centroméricos como los ya mencionados del hombre, del ratón e incluso de los anfibios (tritones).

Pero lo que es más interesante, es que en la familia EcoRI centromérica de los Espáridos existe una secuencia corta o motivo de 9 pb ((A/T)CTGAAA(A/C)(G/C)) que se repite de forma directa de tres a cuatro veces (según la especie) y en las mismas posiciones de unas especies a otras: en las posiciones 11-19, 47-55, 68-76 y 147-155. La única excepción la constituye la breca, en la que este motivo está presente una sola vez pero coincidiendo en posición con las demás especies (de la base 11 a la 19). La existencia de este motivo repetido en la familia EcoRI, además de hacer pensar en un mecanismo de origen de la familia mediante amplificación de esta secuencia, hace pensar también en su posible papel funcional. Para investigar este aspecto hemos seguido dos rutas. Por un lado, hemos profundizado en las características estructurales de este DNA satélite y, por otro, hemos realizado una búsqueda en la base de datos para ver si existen motivos similares en otras secuencias.

En el primer sentido, hemos comprobado, centrándonos en la dorada, que el monómero de la familia EcoRI tiene una zona de máxima curvatura alrededor de la posición 30 de la secuencia, y que dicha zona está comprendida precisamente entre los dos motivos más conservados en las distintas especies: los situados en las posiciones 11 y 47. Y además hemos demostrado que, como ocurre por ejemplo en el ADN centromérico del ratón, con sustancias como la Distamicina A que se une a regiones ricas en AT, se provoca el "enderazamiento" de la curvatura de los monómeros, al menos *in vitro*. Estos tres datos sugieren que el DNA satélite EcoRI juega un papel importante en el proceso de organización de la cromatina a nivel centromérico, posiblemente a través de la unión de proteínas que se unen a zonas ricas en AT, como son las proteínas no histónicas HMG. Una de estas proteínas, la proteína HMG-1, reconoce y se une a series de adeninas consecutivas (Radic y col., 1992), habiéndose comprobado que en el centrómero del ratón esta proteína se dispone de tal forma que queda comprendida en la zona de máxima curvatura de DNA satélite menor. En el caso de los espáridos, esas dianas ricas en AT pueden servir igualmente de diana para tales proteínas-de hecho estas proteínas están conservadas en todos los vertebrados-. En todo caso, según algunos autores (Reeves y Nissen, 1990 y Radic, 1992), cuando este tipo de dianas para proteínas están dispuestas en un DNA curvado, los efectos pueden ser aditivos, de tal forma que resulten en interacciones proteína-proteína muy importantes para la organización cromosómica.

Por otro lado, tras una búsqueda efectuada en las bases de datos del GenBank y de la EMBL, hemos podido comprobar que existen motivos similares a los detectados en la familia EcoRI de espáridos en diversos DNA satélites, y no sólo de peces (tilapia: Wright, 1989; *Pollachius virens*: Denovan y Wright, 1990)-aunque en estos casos no se conoce la localización cromosómica-sino también, y esto es lo más sorprendente, en los DNAs satélites centroméricos anteriormente mencionados. Es decir, que tanto en el DNA centromérico del tritón, *Triturus vulgaris*, como en el del ratón e incluso en el del hombre se encuentran motivos similares a los existentes en el centrómero de los espáridos. En el caso de los centrómeros humanos concretamente, se ha comprobado que una secuencia motivo similar a la existente en espáridos (GTGAAAAAG en el caso humano) se encuentra presente dos veces en la zona de unión entre el ADN satélite alfa y el satélite III en los centrómeros de al menos tres cromosomas, el 13, el 14 y el 21 (Vissel y col., 1992). La existencia de este motivo cobra importancia desde el momento en que estos mismos autores han aislado una nueva proteína (pJ-alfa) que se une a este motivo y que parece unirse también a una parte importante del satélite alfa (Gaff y col., 1994).

En conclusión, nosotros hemos podido poner de manifiesto que en el centrómero de un grupo de peces, los espáridos, existe también un DNA satélite que puede jugar un papel estructural semejante a los DNAs encontrados en otros vertebrados. Pero no hemos detectado en el interior de este DNA el único motivo que hasta ahora se ha demostrado que puede estar relacionado con la función centromérica, la caja CENP-B. En cambio, hemos puesto de manifiesto la existencia de otro motivo del cual existen homólogos en otros DNAs satélites, incluyendo los existentes en los centrómeros de ratón y de humanos. Por lo

tanto, nuestros hallazgos abrirían la posibilidad de que otros motivos diferentes a la mencionada CENP-B pudieran estar conservados en los DNAs satélites centrómericos de los vertebrados, al menos, y que ,por ello, quizás constituyan elementos estructurales y/o funcionales de una parte tan importante de los cromosomas como son los centrómeros. Cabe también la posibilidad, apuntada por C.E. Sunkel (com. pers.), de que el motivo encontrado en el DNA satélite EcoRI sea un elemento ancestral esencial para el funcionamiento del centrómero en muchas especies, puesto que se parece mucho a las partes centrales no sólo de la caja CENP-B sino del elemento CDEIII presente en el centrómero de *S.cerevisiae*. En estos momentos estamos llevando a cabo diversas investigaciones para confirmar estas posibilidades.

3. USO DEL DNA SATELITE DE ESPARIDOS COMO MARCADOR FILOGENETICO

A continuación, hemos tratado de utilizar los DNAs satélites que tenemos caracterizados en los espáridos como marcadores filogenéticos, intentando sobre todo aclarar algunos problemas taxonómicos existentes en esta familia. En concreto, en los Espáridos hay planteado desde antiguo un problema taxonómico de establecimiento de géneros, que afecta a la dorada. Así, Linneo en 1758 al publicar el *Systema Naturae* estableció dentro de los espáridos un gran género, *Sparus*, que incluía 22 especies y agrupaba por ejemplo a la dorada junto al pargo y la urta. Posteriormente, Cuvier en 1817 separó el género *Pagrus* (del que formarían parte al pargo y la urta) como un género diferente de *Sparus*, donde sólo quedaría la dorada, *S. aurata*. Sin embargo, esta separación fue muy discutida por diversos autores posteriores, manteniéndose una controversia entre los defensores de la separación en dos géneros y los defensores del mantenimiento de un sólo género. De hecho, hasta el año 1984 la versión mas aceptada era la de Tortonese quién en el año 1975 agrupó especies como la dorada, el pargo, la urta, el pargo zapata y el pargo africano en el género *Sparus*, basándose sobre todo en el número y tipo de dientes. Pero en el año 1984, Bianchi basándose en distintas características morfológicas ,y especialmente osteológicas, desempolvó el género *Pagrus* que agruparía a las cuatro especies mencionadas, quedando *Sparus* como género monotípico con la dorada como único representante. Este criterio es el que actualmente se acepta, según consta en el listado de especies de peces realizado por Bauchot y Hureau (1986). A pesar de ello no se ha zanjado la cuestión totalmente. De hecho, la irrupción posterior de los datos de la genética (de las isoenzimas concretamente) en unos casos (Basaglia, 1991) parecen apoyar la cercanía de la dorada y el pargo, y en otros casos no (Reina y col. 1994). Y ahora nosotros añadimos los datos del DNA satélite como marcadores filogenéticos.

El DNA satélite no se considera en general como un buen marcador filogenético por cuanto evoluciona muy rápidamente, de hecho demasiado rápidamente, siendo a veces algunos DNA satélite especie-específicos, de forma que están presentes en una especie determinada y ausentes en otra/s, y esto aún estando estrechamente emparentadas las especies. Esto dificulta su utilización a

la hora de efectuar filogenias, por cuanto no se pueden comparar adecuadamente diversas especies al faltar en algunas de ellas el marcador filogenético. Sin embargo, no existe esta dificultad para DNAs satélites que como el alfa humano o el EcoRI de la dorada se encuentran presentes en todo un grupo de especies que constituyen una familia e incluso un orden. Aquí no habría problemas puesto que el ADN satélite está presente en todas las especies, y de hecho se pueden efectuar árboles filogenéticos de los Primates, por ejemplo, basándose en las secuencias del satélite alfa (Laursen y col., 1992). Además, en estos casos, una vez que se tiene un DNA satélite que sirve de marcador para todo el grupo, los datos procedentes de otras familias de DNA satélites más variables (y que incluso pueden estar ausentes en algunas de las especies) incrementan el poder de resolución de los estudios filogenéticos, por cuanto permiten establecer linajes claramente diferenciados.

El establecimiento de las relaciones filogenéticas de los espáridos lo hemos iniciado a partir de los datos de hibridación en Southern-blot de dos familias de DNA distintas, la familia EcoRI de la que ya hemos hablado y la familia DraI (esta familia tiene una secuencia y una localización diferente a la EcoRI). Para la familia EcoRI hemos utilizado como sonda la secuencia monomérica de este DNA satélite presente en un clon, el pSa19, obtenido a partir de la dorada. Para la familia DraI, se utilizó directamente como sonda los fragmentos monoméricos del DNA satélite de la urta, fragmentos que fueron aislados a partir de la banda que aparece al digerir el DNA de esta especie con DraI. Los resultados de la hibridación muestran que el DNA satélite EcoRI clonado a partir del genoma de la dorada (*Sparus aurata*) está conservado en las especies del género *Diplodus* (sargo, sargo picudo, mojarra rubia y mojarra fina), en la herrera, en la chopa y en la breca (*Pagellus erythrinus*). Este DNA no hibrida, en cambio, con las especies del género *Pagrus* (pargo y urta). Posteriormente se ha comprobado que en estas dos especies existe la familia de DNA satélite EcoRI, aunque ha debido de divergir mucho pues solo hibrida con clones de esta familia procedentes de la breca, la cual, a su vez, muestra señal de hibridación débil con los monómeros de la dorada. Por otro lado, los monómeros aislados a partir del DNA satélite DraI de la urta (*Pagrus auriga*) probados en Southern-blot con el DNA del resto de las especies, muestran hibridación solo con el DNA de la propia urta y con el pargo (*Pagrus pagrus*) y la breca.

Por lo tanto, en los espáridos además de una familia de DNA satélite presente en todo el grupo, la EcoRI, existe otra familia, la DraI, que sólo está presente en algunos géneros y especies. Por ello, los datos de presencia/ausencia de una de estas familias en algunas especies del grupo nos llevan a pensar en la existencia de dos linajes separados en los espáridos. Tenemos así un grupo monofilético de especies (constituido por las especies de los géneros *Pagrus*, pargo y urta, y *Pagellus*, la breca) que comparten una familia de DNA satélite, la familia DraI, que no está presente en el otro linaje (constituido por el resto de las especies). Pero es que, además, el hecho de que en los dos linajes exista la familia EcoRI indicaría que los dos linajes comparten un ancestral común.

Estos resultados iniciales tienen ya importantes implicaciones para aclarar el problema taxonómico más importante que hay planteado en los espáridos, y

que como se dice más arriba es el de la delimitación de los géneros *Sparus* y *Pagrus*. Nuestros datos apoyan más el criterio "separador" de *Pagrus* de *Sparus*. Concretamente, para EcoRI la dorada y el pargo están muy diferenciados, y la familia DraI que está presente en el pargo no lo está en la dorada. Teniendo en cuenta esta última diferencia estas dos especies estarían filogenéticamente más alejadas de lo que se pensaba en principio: estarían no sólo en dos géneros diferentes, sino ¡en dos linajes distintos!.

Estos datos pueden ser útiles, además, para un posible programa de obtención de híbridos interespecíficos con la dorada. Y es que, además de poner de manifiesto la gran separación filogenética que existiría entre la dorada y el pargo y la urta-e incluso la breca-, estos datos indican que las especies del género *Diplodus* (sargos y mojarras) son las más emparentadas con dorada, y que por lo tanto sería aconsejable utilizarlas para la hibridación con dorada. Esta similitud entre dorada y *Diplodus* para EcoRI se observa no solo en los patrones de restricción, sino en que cuando las condiciones de hibridación con sondas de dorada son poco favorables (alta astringencia) las especies de *Diplodus* son las que "más resisten" a la hibridación cruzada.

En estos momentos estamos tratando de utilizar la comparación de las secuencias de la familia EcoRI como marcador filogenético. Así, por ejemplo, del análisis de las secuencias se deduce que la breca es la especie que presenta una mayor divergencia con respecto a la dorada, confirmando los datos del Southern-blot. Desafortunadamente, inicialmente hemos tenido problemas para clonar y secuenciar la familia EcoRI en las dos especies-el pargo y la urta-que están colocadas junto con la breca en un linaje diferente al resto de las especies. En la actualidad, lo hemos conseguido mediante PCR y aunque no tenemos los datos totalmente elaborados se deduce que, aunque en las dos especies mencionadas se conserva la familia EcoRI, en ellas está mucho más diferenciada con respecto a la dorada que en el caso de la breca. La comparación de las secuencias de la familia EcoRI en el caso de las especies que constituyen el otro linaje confirma la proximidad filogenética entre la dorada y las distintas especies de *Diplodus*, sargos y mojarras.

Hay algo que indica que nuestros resultados no van muy desencaminados. Y ello es que hasta ahora los únicos híbridos interespecíficos viables que nosotros sepamos que se han obtenido corresponden a la dorada con el sargo (*Diplodus puntazzo*) y con otra especie de *Diplodus* (Dujakovic y Glazumina, 1990). Otros híbridos de la dorada con el pargo, por ejemplo, que sabemos que se están tratando de obtener en Grecia, parecen tener más problemas.

4. LA IDENTIFICACION DE ESTURIONES MEDIANTE EL DNA SATELITE

Finalmente, mencionaremos el uso que estamos haciendo del DNA satélite para la identificación de las especies de esturión capturadas en la Península Ibérica. En este caso, el objetivo es aclarar qué especie o especies son

autóctonas de nuestra región, con el fin de iniciar programas de recuperación de estos peces en la naturaleza.

Los esturiones constituyen un grupo de peces muy interesantes desde el punto de vista evolutivo y comercial (producen caviar, pero también carne). Aunque eran relativamente abundantes hasta inicios de este siglo, en la actualidad se pueden considerar en peligro de extinción. Hasta ahora el criterio sistemático más aceptado (Svetovidov, 1989) ha considerado: 1) que los esturiones europeos pertenecen a dos géneros (*Huso* y sobre todo a *Acipenser*); y 2) que de las siete especies incluidas en estos géneros, 5 viven sólo en el este de Europa, mientras que *A. naccarii* sería endémica de la región adriática y, finalmente, *A. sturio* estaría distribuido por la parte occidental de Europa desde Portugal a Escandinavia, pero también en el Mediterráneo y en el Mar Negro. De acuerdo con este criterio, los esturiones de la P. Ibérica pertenecen a *A. sturio*. Sin embargo, algunos autores (Capello, 1869; Gonçalves, 1942) han citado la presencia de *A. naccarii*, la especie que ahora se considera endémica de la región adriática, en algunos ríos de Portugal. Por lo tanto, en estos momentos en que por diversas circunstancias (problemas con la pesca en general, problemas con la producción de caviar en Rusia, auge de los movimientos de conservación de las especies etc) se plantea en la P. Ibérica la posibilidad de comenzar a recuperar los esturiones en nuestros ríos, se hace necesario aclarar el estatus específico de los esturiones ibéricos, utilizando para ello las modernas herramientas de que dispone la biología. Y aquí es donde nosotros hemos pensado en utilizar el DNA satélite como marcador molecular que sirve para identificar las especies.

Teniendo en cuenta que, como decimos más arriba, solo se encuentran dos especies involucradas, *A. sturio* y *A. naccarii*, hemos tratado de buscar familias de DNA satélite que estuvieran presentes en una de ellas y ausentes en la otra. Para encontrar tales satélites, hemos analizado ejemplares de *A. sturio* procedentes del río Garona (Francia) y ejemplares de piscifactoría pertenecientes a *A. naccarii*. Tras diversas pruebas, hemos identificado una familia de DNA satélite que reúne las características deseadas. Se trata de una familia de DNA satélite que se ha aislado del genoma de *A. naccarii* utilizando la enzima Hind-III y cuyos monómeros tienen unos 170 pb. Mediante Southern-blot hemos probado que este DNA satélite está ausente en el genoma de *A. sturio*. Por lo tanto, la presencia o ausencia de este DNA satélite sirve para diferenciar las dos especies de esturiones en cuestión.

Provistos de este DNA satélite como herramienta molecular, hemos procedido a analizar diversos especímenes capturados en la Península Ibérica y depositados en museos, habida cuenta de las pocas capturas de esturiones que se están efectuando en nuestros ríos en la actualidad. Concretamente, utilizando como sonda el ADN satélite HindIII de *A. naccarii*, hemos analizado mediante dot-blot 4 esturiones capturados en el Guadalquivir. Y hemos comprobado que dos de ellos dan reacción positiva. Se trata de dos ejemplares capturados en la década de los 70 y que se encuentran depositados en el Museo de la Estación Biológica de Doñana en Sevilla. En uno de ellos que se encuentra preservado en alcohol (especimen EBD-8173), hemos sido capaces además de clonar un monómero de la familia Hind-III. La secuencia de este monómero muestra una gran similitud con la secuencia consenso de los 11 clones que hemos

caracterizado de esta familia a partir de ejemplares vivos de *A. naccarii*. Un estudio morfométrico paralelo ha demostrado que estos dos ejemplares que muestran reacción positiva frente al DNA satélite de *A. naccarii*, presentan las características morfológicas de esta última especie y no las de *A. sturio*. Todo hace pensar que se trata por lo tanto de *A. naccarii*. Analizados en detalle desde el punto de vista morfológico un buen número de ejemplares de esturiones capturados en diversos ríos de la P. Ibérica se confirma que varios de ellos corresponden a *A. naccarii*.

En conclusión, tanto los datos morfológicos como los genéticos demuestran que en algunos de los ríos más importantes de la P.Ibérica, incluido el Guadalquivir, se han capturado tanto *A. sturio* como *A. naccarii*. Por lo tanto, esta última especie no sería endémica sólo de la región adriática sino que sería también autóctona de nuestra Península. Esta conclusión constituye una buena noticia para los proyectos de recuperación y repoblación de los esturiones ibéricos. Con la idea que se tenía hasta ahora de que *A. sturio* era la única especie autóctona de la Península se hacía muy difícil la recuperación de los esturiones porque dicha especie no se reproduce en cautividad. Sí se ha conseguido en cambio cultivar *A. naccarii* y si ahora se demuestra que es endémica de nuestra Península se puede iniciar con ella la recuperación en la naturaleza de este grupo de peces.

5. REFERENCIAS

- Basaglia, F. 1991. Malate dehydrogenase isozymes in fifteen Sparidae species (Perciformes, Teleostei). *Comp. Biochem. Physiol.* 98B: 9-19.
- Bauchot, M.L.; Hureau, J.C. 1986. Sparidae. En: *Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean*. (P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen, E. Tortonese, eds.). UNESCO.
- Bernardi, G.; Bernardi, G. 1990a. Compositional patterns in the nuclear genome of cold-blooded vertebrates. *J. Mol. Evol.* 31: 265-281.
- Bernardi, G.; Bernardi, G. 1990b. Compositional transitions in the nuclear genome of cold-blooded vertebrates. *J. Mol. Evol.* 31: 282-293.
- Bianchi, G. 1984. Study on the morphology of five Mediterranean and Atlantic sparid fishes with a reinstatement of the genus *Pagrus* Cuvier, 1817. *Cybium* 8: 31-56.
- Brenner, S.; Elgar, G.; Sandford, R.; Macrae, A.; Venkatesh, B.; Aparicio, S. 1993. Characterization of the pufferfish (Fugu) genome as a compact model vertebrate genome. *Nature* 366: 265-268.
- Cano, J.; Thode, G.; Alvarez, M.C. 1981. Análisis cariológico de seis especies de espáridos del Mediterráneo. *Genét. Ibér.* 33: 181-188.

- Cano, J.; Thode, G.; Alvarez, M.C.. 1982. Karyoevolutive considerations in 29 mediterranean teleost fishes. *Vie Milieu* 32: 21-24.
- Capello, F.B. 1869. Catalogo dos peixes do Portugal que existem no Museu de Lisboa. *Jorn. Sc. Math. Phys. Nat.* 1ª série, 2: 131-193.
- Clarke, L.; Amstutz, H.; Fishell, B.; Carbon, J. 1986. Analysis of centromeric DNA in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 8253-8257.
- Clarke, L.; Carbon, J. 1980. Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature*, 287: 504-509.
- Clarke, L.; Carbon, J. 1985. The structure and function of yeast centromeres. *Ann. Rev. Genet.* 19: 29-56.
- Cooke, C.A.; Bernat, R.L.; Earnshaw, W.C. 1990. CENP-B: a major human centromere protein located beneath the kinetochore. *J. Cell Biol.* 110: 1475-1488.
- Cremisi, F.; Vignali, R.; Batistoni, R.; Barsacchi, G. 1988. Heterochromatic DNA in *Triturus* (Amphibia, Urodela) II. A centromeric satellite DNA. *Chromosoma*, 97: 204-211.
- Denovan, E.M.; Wright, J.M. 1990. A satellite DNA family from pollock (*Pollachius virens*). *Gene*, 87: 279-283.
- Devlin, R.H.; T.Y. Yesaki; C.A. Biagi; E.M. Donalson; P. Swanson & W.-K. Chan. 1994. Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371: 209-210.
- Dujakovic, J.J.; Glamuzina, B. 1990. Intergeneric hybridization in Sparidae 1. *Sparus aurata* o X *Diplodus puntazzo* o and *Sparus aurata* o X *Diplodus vulgaris* o. *Aquaculture* 86: 369-378.
- Elgar, G.; Sandford, R.; Aparicio, S.; Macrae, A.; Venkatesh, B.; Brenner, S. 1996. Small is beautiful: comparative genomics with the pufferfish (*Fugu rubripes*). *TIG*, 12: 145-149.
- Gaff, C.; Dusart, D.; Kalitsis, P.; Iannello, R.; Nagy, A.; Choo, K.H.A. 1994. A novel nuclear protein binds centromeric alpha satellite DNA. *Human Mol. Genet.* 3: 711-716.
- Garrido-Ramos, M.; M. JAMILENA; R. LOZANO; C. RUIZ REJÓN & M. RUIZ REJÓN. 1994. Cloning and characterization of a fish centromeric satellite DNA. *Cytogenet. Cell. Genet.*, 65: 233-237.
- Garrido-Ramos, M.; M. JAMILENA; R. LOZANO; S. CÁRDENAS; C. RUIZ REJÓN & M. RUIZ REJÓN. 1995a. Phylogenetic relationships of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) inferred from satellite-DNA. *Hereditas*, 122: 1-6.

- Garrido-Ramos, M.; M. Jamilena; R. Lozano; C. Ruiz Rejón & M. Ruiz Rejón. 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.; M.C.Soriguer; R. de la Herrán; M. Jamilena; C. Ruiz Rejón; A. Domezain; J.A. Hernando & M. Ruiz Rejón. En prensa. *Morphometric and Genetic Analysis as proof for the existence of two sturgeon species in the Guadalquivir River*. Marine Biology.
- Gonçalves, B.C. 1942. Coleccao oceanográfica de D. Carlos I.- *Peixes Trav. Stat. Biol. Mar. Lisbonne*, 46: 1-108.
- Granato, M. & C. Nüsslein-Volhard. 1996. Fishing for genes controlling development. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 6: 461-468.
- Hinegardner, R. 1980. Evolución del tamaño del genoma. En: *Evolución molecular* (F. Ayala, ed.). Editorial Omega, Barcelona. pp. 185-206.
- Laursen, H.B.; Jorgensen, A.L.; Jones, C.; 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.
- Masumoto, H.; Masukata, H.; Muro, Y.; Nozaki, N.; Okazaki, T. 1989a. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J. Cell Biol.*, 109: 1963-1973.
- Masumoto, H.; Sugimoto, K.; Okazaki, T. 1989b. Alphoid satellite DNA is tightly associated with centromere antigens in human chromosomes throughout the cell cycle. *Exp. Cell Res.* 181: 181-196.
- Muro, Y.; Masumoto, H.; Yoda, K.; Nozaki, N.; Ohashi, M.; Okazaki, T. 1992. Centromere protein B assembles human centromeric alpha-satellite DNA at the 17-bp sequence, CENP-B box. *J. Cell Biol.* 116: 585-596.
- Radic, M.Z.; Saghbini, M; Elton, T.S.; Reeves, R.; Hamkalo, B.A. 1992. Hoechst 33258, distamycin A, and high mobility group protein I (HMG-I) compete for binding to mouse satellite DNA. *Chromosoma* 101: 602-608.
- Reeves, R.; Nissen, M.S. 1990. The AT-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. *J. Biol. Chemistry* 265: 8573-8582.
- Reina, J.; Martínez, G.; Amores, A.; Alvarez, MC. 1994. Interspecific genetic differentiation in Western Mediterranean sparid fish. *Aquaculture*, 125: 47-57.

- Rieder, C.L. 1982. The formation, structure and composition of the mammalian kinetochore fiber. *Int. Rev. Cytol.* 79: 1-58.
- Singer, M.F. 1982. Highly repeated sequences in mammalian genomes. *Int. Rev. Cytol.*, 76: 67-112.
- Sullivan, K.F.; Glass, C.A. 1991. CENP-B is a highly conserved mammalian centromere protein with homology to the helix-loop-helix family of proteins. *Chromosoma* 100: 360-370.
- Svetovidov, A.N. 1989. Acipenseridae. En: *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Whitehead, PJP, ML BAuchot, JC Hureau, J. Nielsen, E. Tortonese (eds.). UNESCO. Paris, 2ª edición: 220-225.
- Tortonese, E. 1975. *Fauna de Italia "Osteichthyes"*. Pesci Ossei, Vol. XI, pp. 82-122. Calderini, Bologna.
- Tyler-Smith, C.; Willard, H.F. 1993. Mammalian chromosome structure. *Curr. Opin. Gen. Dev.* 3: 390-397.
- Vissel, B.; Nagy, A.; Choo, K.H.A. 1992. A satellite III sequence shared by human chromosomes 13, 14 and 21 that is contiguous with alpha satellite DNA. *Cytogenet. Cell Genet.* 61: 81-86.
- Wong, A.K.C.; Rattner, J.B. 1988. Sequence organization and cytological localization of the minor satellite of mouse. *Nucleic Acids Res.* 16: 11645-11661.
- Wright, J.M. 1989. Nucleotide sequence, genomic organization and evolution of a major repetitive DNA family in tilapia (*Oreochromis mossambicus/hornorum*). *Nucleic Acids Res.*, 17: 5071-5079.
- Zinkowski, R.P.; Meyne, J.; Brinkley, B.R. 1991. The centromere-kinetochore complex: a repeat subunit model. *J. Cell. Biol.* 113: 1091-1110.