

1989

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR I

El genoma mitocondrial de la trucha arco iris,
Oncorhynchus mykiss

Memoria presentada por RAFAEL ZARDOYA SAN SEBASTIAN
para optar al Grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

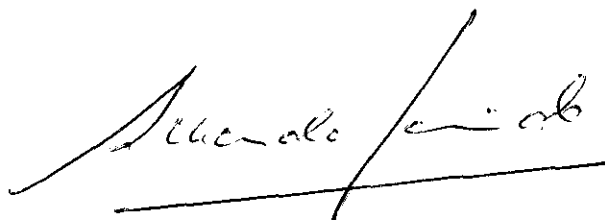
MADRID, MAYO 1994

El trabajo de investigación titulado “ **El genoma mitocondrial de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)**” presentado por D. Rafael Zardoya San Sebastián para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, ha sido realizado en su mayoría en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de los doctores José Manuel Bautista Santacruz y Amando Garrido-Pertierra, con la excepción del análisis del RNA mitocondrial que se realizó en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, bajo la dirección del doctor Julio Montoya.

Directores de la Tesis Doctoral

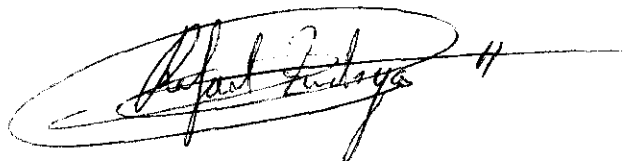


Dr. D. José M. Bautista Santacruz



Dr. D. Amando Garrido-Pertierra

Doctorando



D. Rafael Zardoya San Sebastián

*A mi familia, por su constante apoyo.
A Mónica, por su entusiasmo y estímulo.*

ABREVIATURAS

Se han empleado los códigos aceptados por la IUPAC para designar los distintos nucleótidos y aminoácidos (una y tres letras). Los elementos químicos se han designado con sus respectivos símbolos y las unidades de medida empleadas corresponden al Sistema Internacional. Otras abreviaturas convencionales utilizadas en este trabajo son:

a. a.	Aminoácido
ADP	Adenosina 5'-difosfato
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATPasa 6 y 8	Subunidades 6 y 8 de la ATPasa mitocondrial
BSA	Seroalbúmina bovina
CBS	Bloque de Secuencia Conservada
CO I, II y III	Subunidades I, II y III de la citocromo oxidasa
Cyt b	Citocromo b
ddNTP	Didesoxinucleótido
DHU	Dihidrouridina
D- Loop	Bucle de desplazamiento
DNA	Acido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Acido etilen-diamino-tetracético
FADH₂, FAD	Flavín-adenín dinucleótido (formas oxidada y reducida)
FMN	Flavín mono nucleótido
H	Cadena pesada
HSP	Promotor de la cadena pesada
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
L	Cadena ligera
LSP	Promotor de la cadena ligera
kb	Kilo (pares de) bases
kDa	Kilodaltons
mRNA	RNA mensajero
mtDNA	DNA mitocondrial
Myr	Millones de años

NADH, NAD⁺	Nicotinamida-adenín-dinucleótido(formas oxidada y reducida)
ND ó NADH-1 a 6 y 4L nt	Subunidades de la NADH deshidrogenasa Nucleótido
O_H	Origen de replicación de la cadena pesada
O_L	Origen de replicación de la cadena ligera
ORF	Marco de lectura abierta
OTU	Unidad Taxonómica Operacional
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
RNA	Acido ribonucleico
rRNA	RNA ribosómico
SDS	Dodecilsulfato sódico
TAS	Secuencia asociada a la terminación de la replicación
TEMED	N,N,N',N'- tetrametilen-etilen-diamina
tRNA	RNA de transferencia
X-Gal	5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-galactopiranósido

OBJETIVOS

La secuenciación completa de un genoma suele suponer un considerable avance en la información que se tiene acerca de dicho genoma y los productos que de él se derivan, lo cual contribuye enormemente a la caracterización y comprensión de su estructura y funcionamiento. La idea de secuenciar un genoma en su totalidad es, por lo tanto, muy atractiva desde el punto de vista científico y los genomas mitocondriales, debido a su reducido tamaño y rápida evolución, son a un nivel modesto, los candidatos idóneos para este tipo de proyecto.

Con anterioridad a este trabajo, aunque existía abundante información sobre los genomas mitocondriales de mamíferos, y en especial del hombre, el conocimiento de los genomas mitocondriales de otros vertebrados era muy limitado. Dentro de los vertebrados, los primeros proyectos de secuenciación completa de genomas mitocondriales se centraron en los mamíferos. La secuenciación del DNA mitocondrial de *Xenopus laevis* (Roe y col., 1985), demostró que el genoma mitocondrial de los anfibios presentaba la misma organización encontrada en mamíferos. Sin embargo, en el año 1990, se secuenció en su totalidad el mtDNA del pollo (Desjardins y Morais, 1990), encontrándose ligeras diferencias en el orden de los genes dentro del genoma mitocondrial. Este hecho, nos hizo pensar que los dos grandes grupos de vertebrados que aún quedaban por investigar (peces y reptiles) podían presentar peculiaridades en la organización de su genoma mitocondrial.

En este contexto, nos decidimos a secuenciar el genoma mitocondrial de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con el fin de ampliar el conocimiento que se tiene sobre los genomas mitocondriales a un nuevo grupo de vertebrados, los peces. Se eligió para este trabajo la trucha arco iris por estar considerada un modelo de experimentación en peces, tanto en el aspecto bioquímico como en el genético. Recientemente, y durante el transcurso de este trabajo, se han publicado las secuencias completas de los genomas mitocondriales de dos ciprínidos, *Crossostoma lacustre* (Tzeng y col., 1992) y *Cyprinus carpio* (Chang y Huang, 1994).

El presente trabajo de investigación se ha dirigido hacia la consecución de los siguientes objetivos:

1.- Clonar y secuenciar el DNA mitocondrial de la trucha arco iris con el fin de establecer su organización genómica y determinar las peculiaridades de los genes codificados por él.

2.- Analizar y caracterizar el proceso de transcripción del genoma mitocondrial de la trucha arco iris.

3.- Establecer, a nivel molecular, las relaciones filogenéticas de la trucha arco iris con otros peces y el resto de vertebrados, mediante la elección de los genes más apropiados para este fin.

INDICE

Página

I. INTRODUCCION.

1. LA MITOCONDRIA. ASPECTOS GENERALES.

1.1. Estructura.	1
1.2. Fisiología.	2
1.2.1. Cadena de transporte electrónico.	4
1.2.2. Fosforilación oxidativa.	7
1.3. Endosimbiosis.	8

2. EL DNA MITOCONDRIAL.

2.1. Organización del genoma mitocondrial.	10
2.2. Replicación.	16
2.3. Transcripción.	18
2.3.1. RNAs mensajeros (mRNAs).	23
2.3.2. RNAs ribosómicos (rRNAs).	24
2.3.3. RNAs de transferencia (tRNAs).	24
2.4. El código genético mitocondrial.	25

3. FILOGENIA MOLECULAR.

3.1. Clasificación, evolución y biología molecular.	29
3.2. Árboles filogenéticos.	33
3.2.1. Métodos de matrices de distancia.	34
3.2.2. Método de Máxima Parsimonia.	37
3.2.3. Método de máxima verosimilitud.	38
3.2.4. Eficiencia relativa de los diferentes métodos de construcción de árboles filogenéticos.	39
3.2.5. Margen de confianza estadística de un árbol filogenético.	40
3.3. Estudios evolutivos con DNA mitocondrial. Situación actual.	41

II. MATERIAL Y METODOS.

1. MATERIAL.

1.1. Material biológico.	47
1.2. Productos químicos y bioquímicos.	47
1.3. Vectores y estirpes bacterianas.	48
1.4. Equipo utilizado.	50

2. METODOS.

2.1. Aislamiento de mitocondrias.	51
2.2. Extracción de mtDNA.	51
2.3. Cromatografía en Sephadex G-50 mediante centrifugación.	52
2.4. Extracción de mtRNA.	53
2.5. Cromatografía con oligo(dT) - celulosa.	53
2.6. Determinación analítica de DNA y RNA.	54
2.7. Clonaje.	55
2.8. PCR.	55
2.9. Obtención de células competentes.	56
2.10. Transformación.	56
2.11. Análisis de recombinantes	57
2.12. Extracción de DNA plasmídico.	57
2.13. Marcaje de sondas	59
2.14. Transferencia a membrana e hibridación del RNA.	59
2.15. Síntesis de oligonucleótidos.	60
2.16. Secuenciación manual.	60
2.17. Secuenciación automática.	61
2.18. Análisis de secuencias.	62

III. RESULTADOS.

1. EXTRACCION DEL mtDNA DE TRUCHA ARCO IRIS.	64
2. MAPA DE RESTRICCIÓN DEL mtDNA DE TRUCHA ARCO IRIS.	64
3. GENOTECAS Eco RI, Hind III y Pvu II DEL mtDNA DE TRUCHA ESTRATEGIA DE CLONAJE.	66

4. SECUENCIA DEL mtDNA DE TRUCHA ARCO IRIS.	68
5. ANALISIS DE LA SECUENCIA DE LA REGION DE CONTROL (D-LOOP).	78
6. ORIGEN DE REPLICACION DE LA CADENA L.	82
7. ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS RNAs DE TRANSFERENCIA.	82
8. GENES CODIFICANTES DE PROTEINAS.	
8.1. Código genético y uso de codones.	85
8.2. Análisis de proteínas.	94
9. EXTRACCION DE mtDNA DE TRUCHA ARCO IRIS.	102
10. IDENTIFICACION DE LOS DIFERENTES mtRNAs.	102
11. ANALISIS FILOGENETICO.	107
11.1. Análisis en función del gen rRNA 12S.	108
11.2. Análisis en función del gen del citocromo b.	109
IV. DISCUSION.	114
V. CONCLUSIONES.	128
VI. APENDICES	130
VII. BIBLIOGRAFIA.	133

INTRODUCCION

1. LA MITOCONDRIA. ASPECTOS GENERALES

1.1. Estructura.

La mitocondria es un orgánulo citoplasmático característico de células eucariotas. En general tiene un diámetro aproximado de 0.5μ y una longitud variable entre 1 y 7μ . Su forma más habitual es filamentosa o granular y en el caso concreto de hepatocitos de peces, varía en función del estado nutricional de la célula; así, tras la ingestión de alimentos, las mitocondrias, normalmente filamentosas, adoptan un aspecto vesicular que al cabo de 48 horas revierte a la forma original. Su distribución en el citoplasma es uniforme y su número depende del tipo celular y de la especie. En levaduras sólo se encuentra una mitocondria por célula (Hoffman y Avers, 1973) mientras que en un hígado de rata existen entre 1000 y 1600 mitocondrias por célula (Loud, 1968).

Al microscopio electrónico, mediante técnicas de criofractura, se puede observar que cada mitocondria está formada por una matriz mitocondrial rodeada por dos membranas (interna y externa) de 60 \AA de espesor, separadas entre sí por un espacio intermembranal. La membrana interna se caracteriza por presentar unos pliegues orientados hacia el interior (crestas mitocondriales) de las que sobresalen hacia la matriz mitocondrial unas partículas esféricas de 85 \AA de diámetro denominadas F_1 . (Fig. 1).

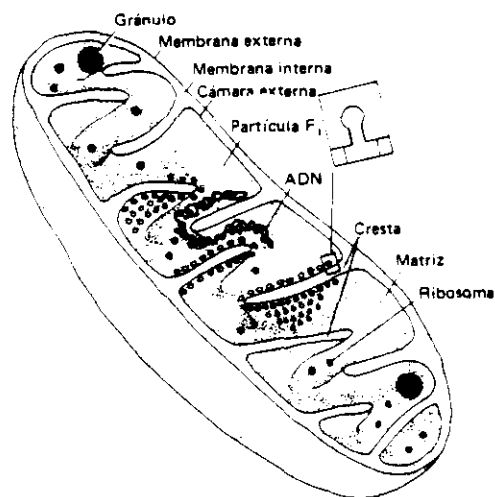


Figura 1. Esquema de la estructura de una mitocondria. (De Robertis y De Robertis, 1984).

La membrana mitocondrial externa contiene un 40% de lípidos (principalmente fosfolípidos con cadenas de ácidos grasos muy insaturados) y un 60% de proteínas, entre las que cabe destacar la acil-CoA sintetasa, la NADH-citocromo c reductasa y la monoamino oxidasa; esta última es exclusiva de esta membrana, por lo que se utiliza a menudo como marcador de la fracción mitocondrial. En general, la composición de la membrana mitocondrial externa es similar a la del retículo endoplásmico.

La membrana mitocondrial interna está constituida por un 20% de lípidos, siendo el 80% restante proteínas. La composición lipídica es muy particular puesto que no contiene colesterol, y el 20% de los fosfolípidos son cardiolípidos. Este tipo de composición es también característica de la membrana plasmática de bacterias y de los tilacoides de los cloroplastos. Las proteínas incluidas en la membrana interna son, esencialmente, todos los complejos enzimáticos que constituyen tanto la cadena respiratoria (NADH-ubiquinona reductasa, succinato-ubiquinona reductasa, ubiquinol-citocromo C reductasa, y citocromo C oxidasa) como el sistema de fosforilación oxidativa (ATP sintetasa F_1F_0), además de la glicerolfosfato deshidrogenasa y varios transportadores (fosfato, malato aspartato, ADP y ATP).

El espacio intermembrana contiene varias enzimas, de las que la más importante es la adenilato quinasa que participa en la síntesis del ADP, coenzima intermediario de la fosforilación oxidativa.

Finalmente, la matriz mitocondrial contiene todas las enzimas solubles del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, las enzimas involucradas en la β -oxidación de los ácidos grasos, así como las enzimas necesarias para la síntesis de proteínas a partir del DNA mitocondrial. Además, también se localizan en la matriz, el DNA mitocondrial, diferentes RNAs y los mitorribosomas.

1.2. Fisiología.

Cada uno de los compartimentos de la mitocondria realiza funciones concretas y coordinadas con otros compartimentos, tanto mitocondriales como citoplasmáticos. La mayor parte de las funciones mitocondriales son

altamente específicas de este orgánulo, siendo las más características aquellas localizadas en la matriz mitocondrial (descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico, ciclo de Krebs, β -oxidación de ácidos grasos) y en la membrana mitocondrial interna (transporte de electrones al oxígeno y fosforilación oxidativa).

La cadena respiratoria utiliza como sustratos donadores de electrones los coenzimas NADH y FADH₂. Estos sustratos son generados por oxidación de compuestos reducidos (sustratos respiratorios) mediante la acción de deshidrogenasas localizadas generalmente en la matriz mitocondrial (Fig. 2).

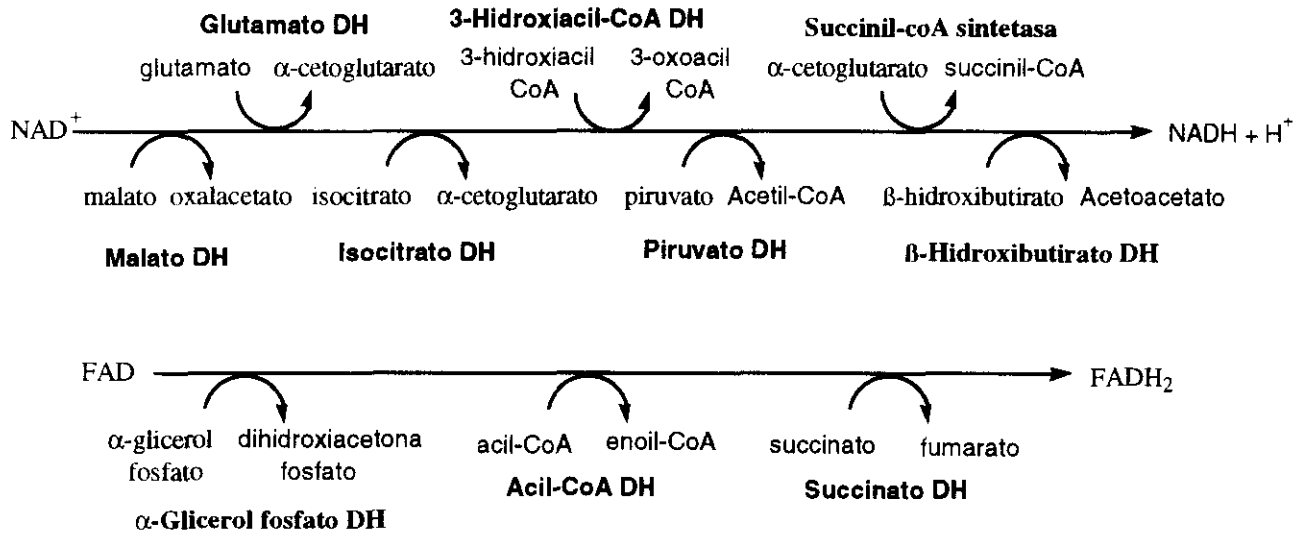


Figura 2. Principales reacciones de deshidrogenación de los sustratos respiratorios.

Adicionalmente, los equivalentes de reducción del NADH de origen citosólico son transportados al interior de la mitocondria para su incorporación a la cadena de transporte electrónico mediante sistemas de

lanzadera. Se han identificado dos tipos de lanzadera específicos de tejido: la lanzadera α -glicerol-fosfato que es activa en mitocondrias de cerebro y músculo esquelético y la lanzadera malato-aspartato (Fig. 3) que es activa en hígado, riñón y corazón. La primera transfiere los equivalentes de reducción del NADH al FAD, mientras que la segunda lo hace al NAD⁺.

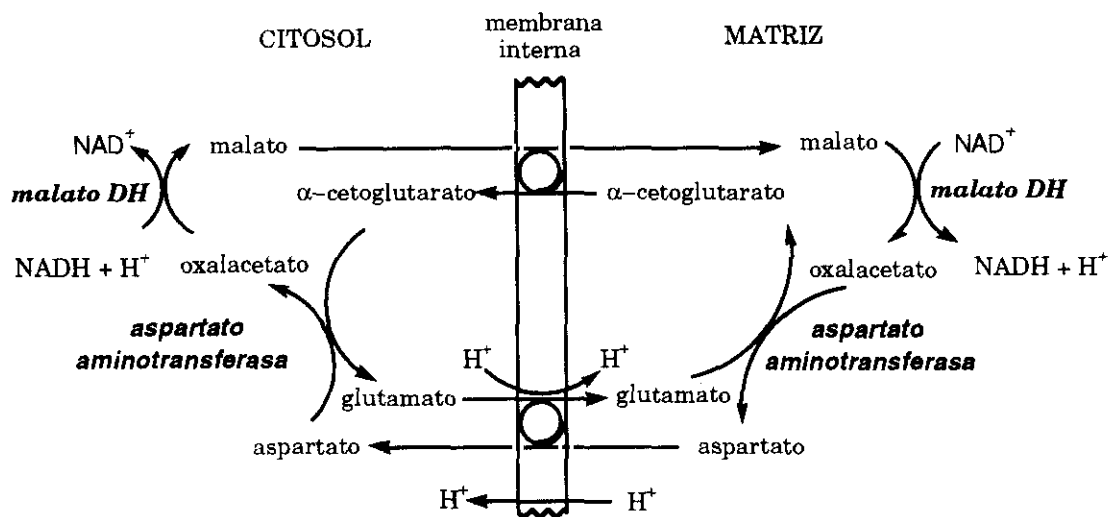


Figura 3. La lanzadera malato-aspartato. El NADH citosólico cede sus equivalentes de reducción al oxalacetato por acción de la malato deshidrogenasa citoplasmática. Se forma así, malato que atraviesa la membrana mitocondrial interna mediante el antiporte α -cetoglutarato / malato. La malato deshidrogenasa mitocondrial convierte el malato de nuevo en oxalacetato formándose en el proceso NADH a partir de NAD⁺. Reacciones de transaminación convierten el oxalacetato en aspartato que puede salir al citosol mediante el antiporte glutamato / aspartato y de nuevo en oxalacetato cerrándose así el ciclo.

1.2.1. Cadena de transporte electrónico.

La energía liberada por la cadena respiratoria puede calcularse con la ecuación $\Delta G^{\circ} = -n \cdot \mathcal{F} \cdot \Delta E_0'$ siendo n el número de electrones transferidos, \mathcal{F} la constante de Faraday (23 kcal/V·mol) y $\Delta E_0'$, la diferencia entre el

potencial estándar del par redox dador de electrones y el aceptor. Por lo tanto, la variación de energía libre estándar entre los pares redox NADH/NAD⁺ ($E_0' = -0.32$ V) y FADH₂/FAD ($E_0' = -0.06$ V) y el par H₂O/O₂ ($E_0' = +0.82$ V) será:

$$\begin{array}{ll} \text{NADH/NAD}^+ & \Delta G^{\circ} = -2 \cdot 23 \cdot (0.82 - (-0.32)) = -52.4 \text{ kcal/mol.} \\ \text{FADH}_2/\text{FAD} & \Delta G^{\circ} = -2 \cdot 23 \cdot (0.82 - (+0.03)) = -36.3 \text{ kcal/mol.} \end{array}$$

Si se tiene en cuenta que la formación de cada molécula de ATP en la fosforilación oxidativa consume 7.3 kcal/mol, es posible predecir la formación de dos moléculas de ATP por cada molécula de FADH₂ que entra en la cadena de transporte electrónico, o bien de tres moléculas de ATP por cada molécula de NADH.

Los componentes de la cadena transportadora de electrones se organizan en cuatro grandes complejos enzimáticos (Fig. 4):

- I. NADH-ubiquinona reductasa (850 kDa). Denominada también NADH deshidrogenasa, transfiere los equivalentes de reducción desde el NADH hasta la ubiquinona o coenzima Q que se reduce a ubiquinol. Este complejo está formado por una fracción proteica hidrofóbica y una hidrofílica. Los polipéptidos hidrofóbicos son codificados por genes mitocondriales y por genes nucleares, mientras que los polipéptidos hidrofílicos son codificados exclusivamente por genes nucleares. Este complejo contiene entre 5 y 7 centros ferro-sulfurados y para el transporte de electrones utiliza como grupo prostético al mononucleótido de flavina (FMN).
- II. Succinato- ubiquinona reductasa (97 kDa). Transfiere electrones desde el succinato hasta la ubiquinona. Para ello, cuenta con un grupo prostético FAD, un citocromo b y 3 centros ferro-sulfurados.
- III. Ubiquinol-citocromo c reductasa (280 kDa). Este complejo sirve de confluencia a los dos anteriores. La oxidación del ubiquinol le permite reducir el citocromo c. Como centros redox contiene el citocromo b, un

centro ferro-sulfurado y el citocromo c1. De los 9 ó 10 polipéptidos que contiene este complejo, sólo el citocromo b es codificado por el genoma mitocondrial.

- IV. Citocromo c oxidasa (600 kDa). Transfiere los electrones desde el citocromo c reducido (Fe^{3+}) hasta el oxígeno. Para ello cuenta con un citocromo específico denominado aa3 que contiene, además de dos grupos hemo, dos átomos de cobre.

Dentro de cada complejo los centros redox presentan valores de potencial estándar similares, por lo que la transferencia de electrones es reversible, y por tanto la liberación de energía es mínima. Sin embargo, en tres puntos de la cadena respiratoria (complejos I, III y IV), la transferencia de electrones entre un grupo isopotencial y otro, supone una variación en la energía libre estándar suficiente como para bombear protones desde la matriz mitocondrial hasta el espacio intermembranal (Hatefi, 1985).

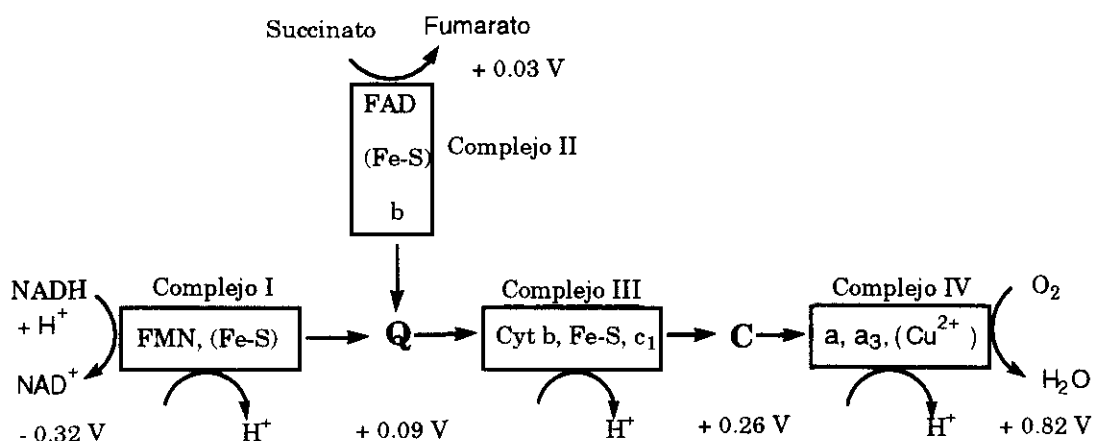


Figura 4. Cadena de transporte electrónico. En la figura se destacan los componentes de cada uno de los cuatro complejos respiratorios, los potenciales redox entre complejos y los sitios de conservación de la energía representados por la traslocación de protones. Mientras la oxidación del NADH es capaz de bombear tres protones al espacio intermembranal, la oxidación del FADH_2 sólo permite la traslocación de dos.

1.2.2. Fosforilación oxidativa.

De acuerdo con la teoría clásica que explica el mecanismo de fosforilación oxidativa, en la membrana mitocondrial interna existen bombas de protones que utilizan la energía libre proporcionada por el flujo electrónico a través de la cadena respiratoria para transportar H^+ hacia el espacio intermembrana generando un gradiente electroquímico de protones. La vuelta de estos iones H^+ a la matriz mitocondrial a través de un canal específico en la ATP sintetasa F_1F_0 provoca la síntesis acoplada de ATP a partir de ADP y fosfato (Mitchell, 1979).

La ATP sintetasa F_1F_0 es una enzima polipeptídica con dos funciones: una hidrolítica (ATPasa) y otra sintética (ATP sintetasa). En su estructura se distinguen dos componentes:

- F_1 . Es una proteína periférica de 5 subunidades con la siguiente estequiometría: $\alpha_3, \beta_3, \gamma, \delta, \xi$. Las tres subunidades α se intercalan entre las tres subunidades β formando el centro activo del complejo enzimático. Sólo las subunidades β o bien las interfases α/β están directamente implicadas en la catálisis de las reacciones de síntesis o degradación de ATP. La subunidad γ forma parte del canal de protones implicado en el acoplamiento energético. Las subunidades δ y ξ participan en la unión adecuada a nivel estructural de los componentes F_1 y F_0 .

- F_0 . Es una proteína integral de la membrana mitocondrial interna con, al menos, 3 subunidades (6, 8 y 9) encargadas de formar el canal de protones. Las subunidades 6 y 8 son codificadas por genes mitocondriales.

La reacción de síntesis o hidrólisis de ATP en el centro catalítico del componente F_1 es independiente de la existencia o no de un gradiente electroquímico de protones. Se supone que la energía libre del gradiente electroquímico de protones es utilizada para liberar los nucleótidos que permanecen fuertemente unidos al centro catalítico tras la reacción. Los

protones, a su paso por el canal de la ATP sintetasa, provocarían un cambio conformacional y de afinidad en el centro catalítico.

1.3. Endosimbiosis.

De acuerdo con la teoría endosimbiótica sobre el origen y evolución de las células eucariotas (Taylor, 1974; Margulis, 1981), al menos tres clases de orgánulos celulares, las mitocondrias, los cilios y los cloroplastos, fueron originalmente bacterias libres que se asociaron de forma estable y secuencial a procariotas hospedadores para dar lugar a los organismos eucariotas primigenios. Estas bacterias libres, ya habían desarrollado, con anterioridad a la cooperación simbiótica, capacidades especiales (respiración aerobia, fotosíntesis o motilidad) que complementaban las adquiridas por las bacterias hospedadoras menos especializadas (resistencia a altas temperaturas y medios ácidos) aumentando así la eficacia de la nueva asociación.

En el caso concreto de la simbiosis núcleo/citoplasma-mitocondria, el primero aportaba un metabolismo fermentativo de los azúcares y unas proteínas, las histonas, que protegían al DNA de las condiciones ambientales de acidez y alta temperatura; la segunda aportaba la capacidad de degradar compuestos de tres átomos de carbono, producto de las fermentaciones, en dióxido de carbono y agua, con el consiguiente aprovechamiento energético. El organismo procariota de vida libre que dió origen a la mitocondria debió ser una eubacteria gram-negativa, aeróbica, que contenía las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos, y el sistema de citocromos necesario para la total oxidación de los carbohidratos, posiblemente muy similar a *Paracoccus denitrificans* (John y Whatley, 1975). Por el contrario, el hospedador debió ser un organismo únicamente capaz de fermentar la glucosa a piruvato de forma anaeróbica a través de la ruta de Embden-Meyerhof, del tipo de *Thermoplasma acidophilum* (Searcy y col., 1978).

El establecimiento de comunidades de procariotas simbiotes que dió origen a las primeras células eucariotas se debió producir a finales del precámbrico (hace 1 billón de años), durante o después de la acumulación

oxígeno en la atmósfera, en condiciones de alta temperatura, medios ácidos y escasez de nutrientes. La temprana simbiosis nucleocitoplasma-mitocondria explicaría la existencia de mitocondrias en todo los phyla eucarióticos protistas, hongos, plantas y animales, mientras que la adquisición posterior por parte de sólo algunos simbioses de protistas fotosintéticos, origen de los plastos, explicaría su adscripción exclusiva a algas y plantas.

Las ventajas resultantes de la asociación oportunista entre procariotas se acrecentaron por la progresiva especialización funcional de cada componente, que culminó en el establecimiento de una simbiosis obligada. De hecho, excepto en algunas levaduras, en ninguna célula eucariota se puede inducir la pérdida de mitocondrias y recíprocamente, las mitocondrias no pueden sobrevivir de forma autónoma debido a que muchos de sus componentes son producto de la expresión de genes nucleares, incluidas las enzimas responsables de la expresión y regulación de los genes mitocondriales (Attardi y Schatz, 1988).

Aunque los simbioses obligados tienden a relegar muchas de sus funciones (sobre todo las dispensables o las redundantes) en el hospedador, la mitocondria aún conserva funciones y rasgos propios que sugieren su origen procariótico. Así, cabe destacar, que su DNA no está unido a histonas, su síntesis proteica es sensible a antibióticos bacterianos (estreptomina, cloranfenicol) pero no eucarióticos (cicloheximida), la síntesis de DNA se realiza a lo largo de todo el ciclo celular y no sólo en la fase S, la herencia no es mendeliana en eucariotas meióticos, y finalmente su membrana interna tiene una composición muy similar a la membrana plasmática bacteriana.

Aunque la teoría endosimbiótica resulta muy atractiva para explicar el origen de las células eucariotas, no es la única. De acuerdo con la teoría de la filiación directa (Cavalier-Smith, 1975; Reijnders, 1975; Taylor, 1976) algunas bacterias fotosintéticas dieron lugar a algas y eventualmente a plantas; algunas algas perdieron sus plastos y evolucionaron para dar lugar a los antepasados de hongos y animales siendo, tanto los plastos como otros orgánulos eucarióticos, originados por diferenciación y especialización dentro de las células.

2. EL DNA MITOCONDRIAL.

2.1 Organización del genoma mitocondrial.

La mitocondria posee un genoma propio que se caracteriza por su replicación autónoma dentro del orgánulo. El genoma mitocondrial está constituido por un DNA de doble cadena, circular y covalentemente cerrado con un tamaño relativamente constante en todas las especies animales estudiadas de alrededor de 16000 pb. El DNA mitocondrial (mtDNA) codifica para 3 subunidades de la citocromo c oxidasa (COI, COII y COIII), 7 subunidades de la NADH deshidrogenasa (ND1 a ND6 y ND4L) el citocromo b de la citocromo c reductasa (Cyt b) y las subunidades 6 y 8 del componente F_0 de la ATP sintetasa (ATPasa 6 y 8). Además, contiene la información necesaria para la síntesis de 22 tRNAs y 2 rRNAs (12S y 16S) implicados en la traducción de los mensajeros expresados por el genoma mitocondrial (Anderson y col., 1981; Chomyn y col. 1985). El resto de las proteínas presentes en la mitocondria (DNA y RNA polimerasas, aminoacil-tRNA sintetetasas, las proteínas ribosomales, y las enzimas de la matriz, las membranas mitocondriales y el espacio intermembranal) son codificadas por el genoma nuclear.

La organización de los genomas mitocondriales de los eucariotas superiores es extremadamente económica (Attardi, 1985). Los genes que codifican para los 22 tRNAs se encuentran intercalados tanto entre los RNA ribosomales como entre los genes que codifican para proteínas, funcionando probablemente como señales para el procesamiento de los transcritos primarios por RNAsas específicas (Ojala y col., 1981 a). Con la excepción de la región de control, que contiene el denominado bucle de desplazamiento (D-loop), existen muy pocos nucleótidos no codificantes y aparentemente ningún intrón (Anderson y col., 1981; Bibb y col., 1981).

Hasta la fecha, dentro de los vertebrados superiores se conocen las secuencias completas del DNA mitocondrial de nueve mamíferos: hombre (Anderson y col., 1981), ratón (Bibb y col., 1981), vaca (Anderson y col., 1982), rata (Gadaleta y col., 1989), rociual común (Arnason y col., 1991), foca común (Arnason y Johnsson, 1992), foca gris (Arnason y y col., 1993),

rorcual azul (Arnason, 1993) y la zarigüeya (Janke y col., 1994); un anfibio, *Xenopus laevis* (Roe y col., 1985); dos teleósteos, *Crossostoma lacustre* (Tzeng y col., 1992) y la carpa (Chang y Huang, 1994) y un ave, el pollo (Desjardins y Morais, 1990). De todas ellas, con excepción de la del pollo, se deduce una organización genómica idéntica (Fig. 5).

El DNA mitocondrial de pollo presenta una organización genómica ligeramente distinta de la descrita para mamíferos, anfibios y peces. La principal diferencia reside en que los genes que codifican para el tRNA^{Glu} y la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa (ND6) se encuentran localizados inmediatamente adyacentes a la región D-loop y no al lado del citocromo b como ocurre en el resto de vertebrados. Además, los genes que codifican para los tRNAs de prolina y treonina y el citocromo b se encuentran inmediatamente después del gen de la subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa (ND5), mientras que en el resto de vertebrados aparecen al lado del D-loop (Fig. 6). Esta organización, aparentemente, es el resultado de una transposición de un segmento de mtDNA que contendría, bien los genes del tRNA^{Glu} y ND6, o bien los genes que codifican para tRNA^{Pro}, tRNA^{Thr} y Cyt b. Aunque no se conocen los mecanismos moleculares implicados en esta reorganización, parece claro por la cotransposición de tRNAs con los genes que codifican para proteínas y la cercanía del segmento transpuesto a la región del D-loop, que los tRNAs podrían funcionar como señales de duplicación acopladas a la replicación, tal como se ha descrito en el DNA mitocondrial de algunos lagartos (Moritz y Brown, 1987).

Dentro de los invertebrados se conocen las secuencias completas del DNA mitocondrial de la mosca de la fruta (Clary y Wolstenholme, 1985), dos especies de erizo de mar (Jacobs y col., 1988; Cantatore y col., 1989), dos nematodos (Okimoto y col., 1992), la abeja (Crozier y Crozier, 1993) y *Artemia franciscana* (Valverde, 1993).

El mtDNA de las dos especies de erizo de mar secuenciadas (*Strongylocentrotus purpuratus* y *Paracentrotus lividus*), presenta una organización genómica más económica, incluso, que la descrita en vertebrados, de la que se deduce la necesidad de procesos de regulación post-transcripcional de los genes (Fig. 7). Sólo una minoría de los tRNAs se

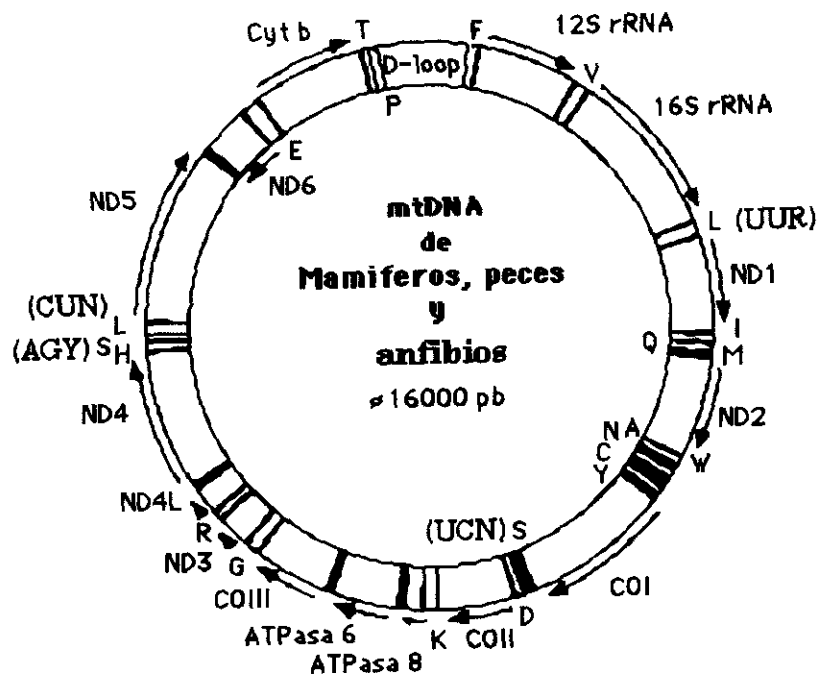


Figura 5. Organización del DNA mitocondrial en mamíferos, peces (carpa y *Crososstoma lacustre*) y anfibios (*Xenopus laevis*). El mtDNA está dibujado con dos líneas, la exterior y la interior, que representan, respectivamente a las cadenas pesada (H) y ligera (L). La dirección de transcripción de cada gen se representa por flechas; los tRNAs se denominan según el aminoácido al que se unen (código de una letra) y se localizan en la banda a partir de la cual se transcriben.

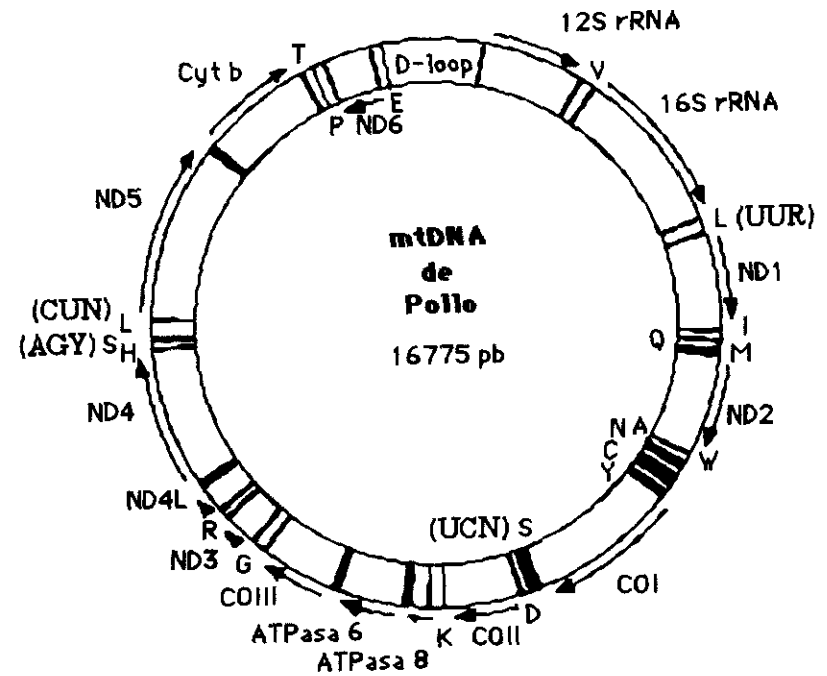


Figura 6. Organización del DNA mitocondrial de pollo. A diferencia de mamíferos, anfibios y peces, los genes ND6 y del tRNA^{Glu} se encuentran localizados al lado de la región D-loop, mientras que los genes que codifican para los tRNAs de prolina y treonina y cyt b se encuentran adyacentes al gen ND5.

encuentra separando genes codificantes de proteína. Los posibles orígenes de replicación y transcripción se encuentran en una región no codificante formada por el agrupamiento de 15 tRNAs. La posición de los genes ND4L y 16S rRNA está alterada con respecto al mtDNA de vertebrados, imponiendo la separación de los genes para rRNA un sistema de transcripción específico.

Los dos nematodos (*Caenorhabditis elegans* y *Ascaris suum*) presentan un mtDNA con un tamaño de, aproximadamente, 14000 pb. Se diferencian únicamente en la posición relativa de una región rica en adeninas y timinas que posiblemente contiene el origen de replicación. Existe una región no codificante entre los genes ND4 y COI, con capacidad de formar un bucle por lo que, potencialmente, podría representar un segundo origen de replicación. Todos los genes son transcritos en la misma dirección a diferencia de lo que ocurre en vertebrados y equinodermos. Otra particularidad de estos genomas es el hecho de que no se ha encontrado ninguna región que codifique para la subunidad 8 de la ATPasa (Fig. 7), lo cual sugiere que, bien este gen codifica para una subunidad que no es indispensable para el funcionamiento de la ATPasa, o bien en nematodos este gen se encuentra localizado en el núcleo.

Los mtDNAs de los dos insectos (*Drosophila yakuba*, *Apis mellifera*) y el crustáceo (*Artemia franciscana*) presentan una organización genómica similar entre ellos diferenciándose únicamente en la posición de algunos tRNAs (*A. franciscana* y *D. yakuba* sólo se diferencian en la posición relativa del tRNA^{Gln} y el tRNA^{Ile}, mientras que entre los dos insectos hay 11 tRNAs en posición diferente). Ha sido identificado un único origen de replicación, localizado dentro de una región rica en adeninas y timinas. Aunque contienen los 22 tRNAs, los dos rRNAs y los 13 genes codificantes de proteínas descritos en vertebrados superiores, su disposición en el genoma mitocondrial es significativamente distinta (Fig. 8).

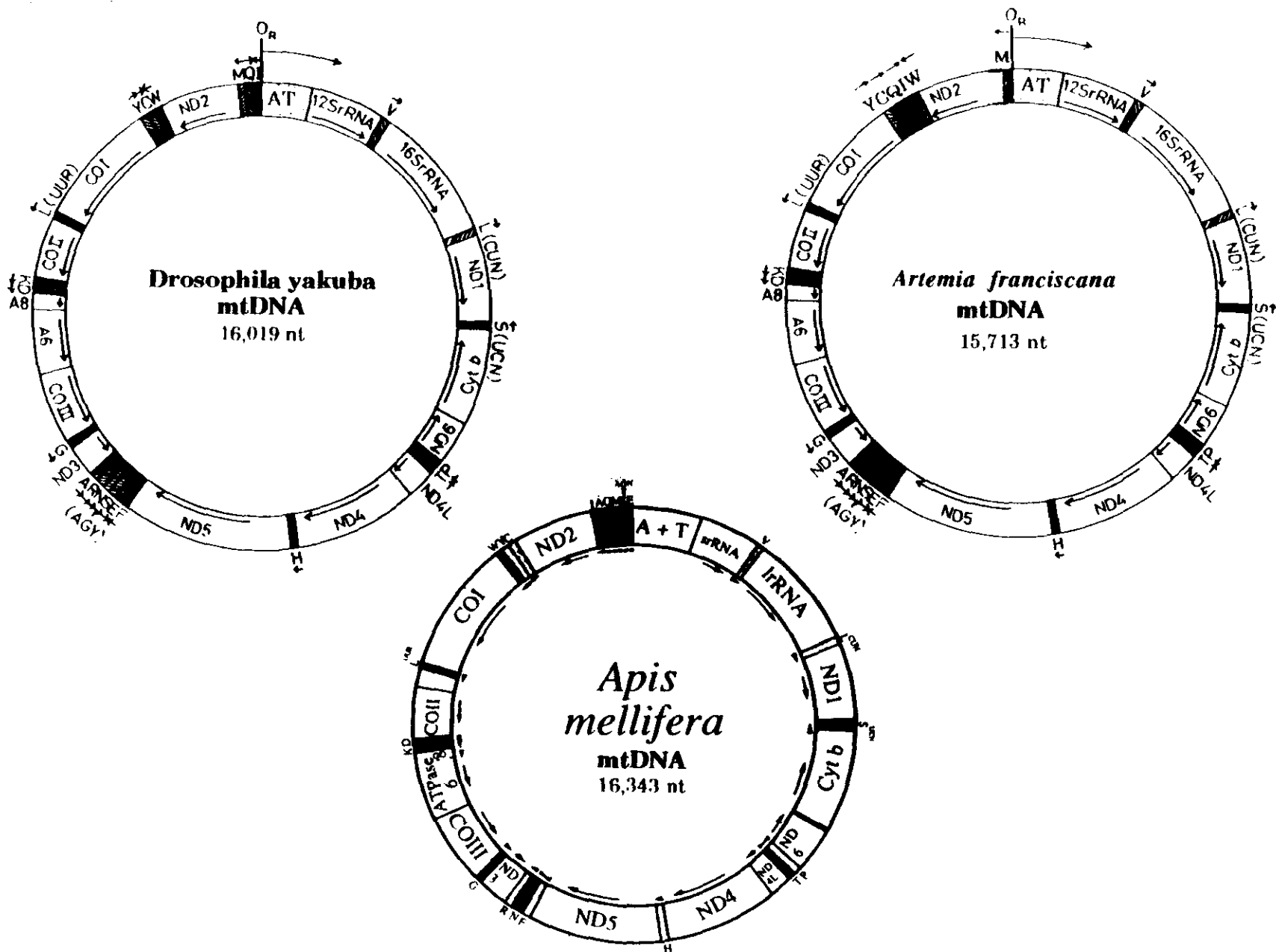


Figura 8. Organización del mtDNA de artrópodos. Se conocen las secuencias completas del mtDNA de dos insectos (abeja y mosca de la fruta) y un crustáceo (*Artemia franciscana*). Únicamente se diferencian en la posición relativa de algunos tRNAs, siendo significativo que *A. franciscana* difiera en la posición de sólo 2 tRNAs con respecto a *D. yakuba*, mientras que la abeja presenta 11 tRNAs en distinta posición. A diferencia de vertebrados, los artrópodos presentan un único origen de replicación contenido en la región rica en AT. La dirección de transcripción de cada gen se representa por flechas.

2.2. Replicación.

Las dos cadenas que constituyen la molécula de mtDNA se denominan pesada (H) y ligera (L) en función de su densidad respectiva en un gradiente de cloruro de cesio. En vertebrados superiores, el origen de replicación de la cadena pesada del DNA mitocondrial (O_H) se localiza dentro de la región D-Loop, que se denomina así, por contener una cadena pesada naciente cuyo extremo 5' está localizado en dicho origen, y su extremo 3' en las regiones TASs que se encuentran asociadas a la terminación prematura del ciclo replicativo (Doda y col., 1981). Esta corta cadena es muy inestable presentando un recambio mucho mayor que el ritmo de replicación (Clayton, 1982). El origen de replicación de la cadena ligera (O_L) está presente en todos los vertebrados excepto en el pollo. Se localiza dentro de un grupo de cinco tRNAs entre los genes ND2 y COI y está constituido por unos 30 nucleótidos con la capacidad de formar un bucle relativamente estable. Esta capacidad está conservada en el mtDNA de todos los vertebrados, aunque varíe la secuencia nucleotídica del origen de replicación. En el caso del mtDNA de pollo, no existe O_L , pero se mantiene la organización de cinco tRNAs en esta región, por lo que se ha sugerido que éstos pueden tener alguna característica estructural (como sería la capacidad de formación de un bucle) que les permitiría sustituir a O_L (Desjardins y Morais, 1990).

La replicación del mtDNA comienza siempre en O_H . La elongación completa de la nueva cadena pesada provoca la exposición de la región O_L en la cadena pesada parental desplazada, lo que permite el comienzo de la replicación de la cadena ligera. El inicio de la replicación en O_H requiere la síntesis de RNA a partir del Promotor de la Cadena Ligera (LSP) para que actúe como cebador del proceso replicativo. La transición de la síntesis de RNA a la síntesis de DNA se produce en una región con varios Bloques de Secuencia Conservada (CSBs) entre especies (Fig. 9). Estos elementos CSB han sido ampliamente estudiados en el hombre y el ratón (Walberg y Clayton, 1981) presentando elementos característicos que son reconocidos por la enzima nuclear RNasa MRP (procesadora de mtRNA) encargada de

generar extremos 3'-OH en el mtRNA que puedan ser extendidos posteriormente por la polimerasa de mtDNA (Chang y Clayton, 1989).

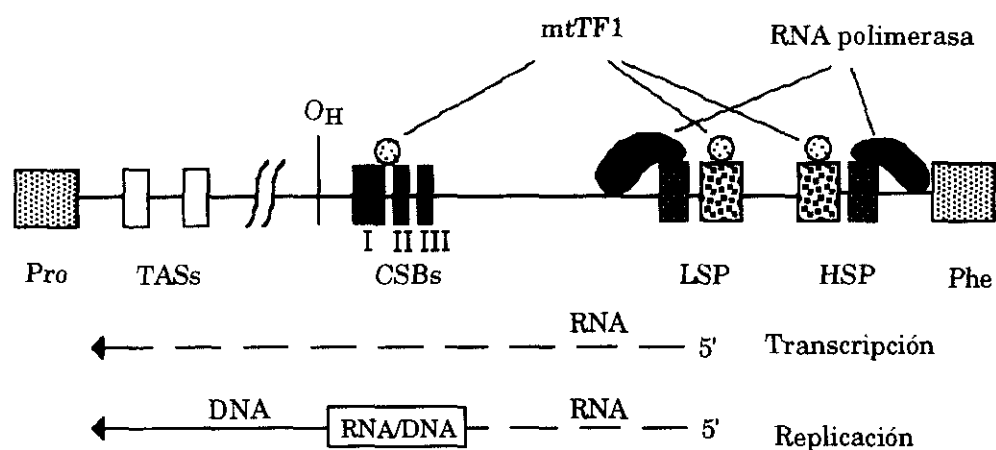


Figura 9. Diagrama general con los componentes esenciales del D-loop del mtDNA de vertebrados. (Clayton, 1991). La línea discontinua representa la síntesis de RNA a partir del promotor de la cadena ligera (LSP) y la línea continua la síntesis de DNA a partir de RNA sintetizado en el mismo promotor. Ambas moléculas tienen como molde la cadena ligera y por lo tanto poseen la secuencia de la cadena pesada. La transición RNA/DNA en la replicación de la cadena pesada se produce a nivel de los tres bloques de secuencia conservada (CSBs). O_H es el origen de replicación de la cadena pesada. La RNA polimerasa mitocondrial se representa unida a los promotores de la cadena pesada y ligera (HSP y LSP). así mismo, se indican los sitios de unión al factor de transcripción mtTF1 y las regiones asociadas con la terminación prematura de la replicación de la cadena pesada (TASs).

De forma similar en O_L también se inicia la replicación a partir de un cebador de RNA. Se ha demostrado la existencia de una primasa de mtDNA capaz de reconocer un bucle rico en timidinas y comenzar la síntesis de RNA (Wong y Clayton, 1985). A continuación, en la base no apareada del bucle, se produce la transición en la síntesis de RNA a DNA en un pentanucleótido (5'-GCCGG-3') situado dentro del gen que codifica para el tRNA^{Cys} (Hixson y col., 1986) (Fig. 10).

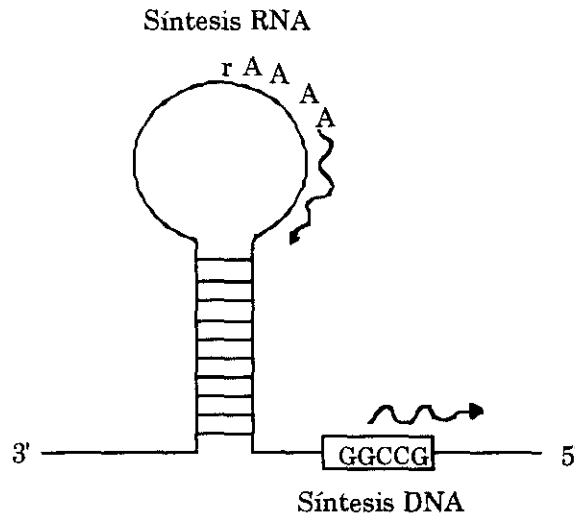


Figura 10. Esquema del inicio de la replicación en O_L . (Clayton, 1991)

Una mtDNA primasa inicia la síntesis de RNA a partir de una región rica en timidinas localizada en un bucle. La transición a DNA se produce en la base del bucle en una región cuya secuencia en el mtDNA humano es 5' GCCCG 3'.

La elongación y maduración de las cadenas H y L es realizada por la polimerasa de mtDNA o DNA polimerasa γ . Esta enzima ha sido purificada en *Drosophila melanogaster* (Wernette y Kaguni, 1986) y *Xenopus laevis* (Insdorf y Bogenhagen, 1989 a y b). El holoenzima consiste en una subunidad catalítica de 125-140 kDa y, al menos, una subunidad de 35 kDa de función aún desconocida. Este enzima presenta asociada una actividad exonucleasa 3'-5' que le confiere capacidad correctora y una fidelidad similar a la de la DNA polimerasa α nuclear (Wernette y col., 1988).

2.3. Transcripción.

En vertebrados superiores, las dos cadenas del mtDNA se transcriben completamente y los precursores policistrónicos formados son procesados dando lugar a las diferentes especies de RNA. La transcripción de los genes que codifican para los tRNAs de fenilalanina, valina, leucina

(UUR y CUN), isoleucina, metionina, triptofano, ácido aspártico, lisina, glicina, arginina, histidina, serina (AGY) y treonina se realiza a partir de la cadena pesada, mientras que la de los que codifican para los tRNAs de glutamina, alanina, asparagina, cisteína, tirosina, serina (UCN), ácido glutámico y prolina se realiza a partir de la cadena ligera. Los dos genes que codifican para RNA ribosomal y todos los genes codificantes de proteínas a excepción de ND6, se transcriben a partir de la cadena pesada. El comienzo del gen ATPasa 6 solapa con el final del gen ATPasa 8, y lo mismo ocurre con los genes ND4L y ND4. En ambos casos, sólo se observa un transcrito a partir del mtDNA (Ojala y col., 1980) por lo que se cree que el procesamiento de cada par de genes se debe realizar por traducción en diferente fase de lectura.

Cada una de las cadenas del mtDNA cuenta en el D-loop con su propio promotor para iniciar la transcripción (Fig. 9), estando el promotor de la cadena pesada (HSP) localizado cercano al extremo 5' del gen 12S y separado 150 nucleótidos del promotor de la cadena ligera (LSP) (Montoya y col., 1982; Chang y Clayton, 1984). Estos promotores consisten en secuencias de, aproximadamente, 50 nucleótidos con, al menos, dos dominios funcionales; uno, en el que la polimerasa de mtRNA iniciaría la transcripción y otro, situado en posición 5' con respecto al primero (-12 a -39), que mejoraría la eficiencia de la iniciación al ser un elemento reconocido por el factor de transcripción denominado mtTF1. Este factor ha sido purificado en el hombre (Fisher y Clayton, 1988) y el ratón (Fisher y col., 1989) y se ha descrito una proteína homóloga en levadura (Fisher y col., 1991). En el hombre, el mtTF1 está formado por 204 aminoácidos, tiene un carácter global básico, y es capaz de desenrollar y curvar el DNA (Parisi y Clayton, 1991). Este factor se une con mayor afinidad a LSP que a HSP, estando las dianas para este factor, invertidas una con respecto a la otra en estos promotores, lo que sugiere que el mtTF1 puede funcionar bidireccionalmente.

Gran parte de los 16S rRNAs analizados presentan un extremo 3' que se localiza dentro del tRNA^{Leu} adyacente (Dubin y col., 1982) y por lo tanto no provienen del procesamiento del RNA policistrónico sino de un proceso transcripcional separado. Parece claro que, la transcripción de la

cadena pesada se realiza en dos unidades de transcripción distintas debido a la existencia de un segundo punto de iniciación en esta cadena (Montoya y col., 1983). Este segundo promotor sería el responsable de la transcripción de los dos rRNAs y se localizaría 16-19 nucleótidos por delante del tRNA^{Phe}. Por otro lado, se ha identificado la secuencia 5'-TGGCAGAGCC CGG-3' como responsable de la terminación de la transcripción de los rRNAs (Christianson y Clayton, 1988; Staub y Castora, 1993) y se ha sugerido que actuaría como diana de un factor que, al unirse, impediría el avance de la polimerasa de mtRNA (Hess y col., 1991).

En cuanto al procesamiento del RNA policistrónico codificado por la cadena pesada, se efectúa mediante cortes endonucleolíticos en los extremos 5' y 3' de los tRNAs por la actividad RNasa P (Doersen y col., 1985). En general, se considera que las enzimas procesadoras de tRNAs reconocerían motivos de estructura secundaria y terciaria, en vez de secuencias primarias específicas. Ello justificaría el procesamiento de los genes ATPasa 6 y COIII, que son los dos únicos no separados por un tRNA, y que, por lo tanto, deben tener en la región de unión, la capacidad de formar un bucle susceptible de ser cortado por RNasas específicas (Bibb y col., 1981). Por otro lado, la transcripción de los genes codificados por la cadena ligera se realiza también a través de la formación de un mensajero policistrónico menos estable que, posteriormente, es procesado (Gelfand y Attardi, 1981).

Los productos de transcripción del genoma mitocondrial fueron inicialmente identificados y caracterizados en células HeLa (Amalric y col., 1978; Montoya y col., 1981; Montoya y col., 1983). Las diferentes clases de RNAs producidos pueden ser separadas mediante cromatografía a través de una columna de oligo(dT)-celulosa en dos fracciones, según sean o no poliadenilados. Las especies que componen cada una de estas fracciones pueden, a su vez, ser separadas por electroforesis en geles de agarosa con hidróxido de metilmercurio como agente desnaturizante (Bailey y Davidson, 1975; Montoya y col., 1983; Fernández-Silva y col., 1992). De esta forma se han identificado en células HeLa hasta 18 especies de RNAs poliadenilados y al menos cinco no poliadenilados (Tabla I). Los productos no poliadenilados son el rRNA 12S, el rRNA 16S, el RNA 4a, el RNA 7S y

los tRNAs. Los 18 productos poliadenilados se numeran en orden decreciente de peso molecular. Los RNAs 1,2,3 y 18 están codificados por la cadena ligera y el resto por la cadena pesada. Su posterior secuenciación (Montoya y col., 1981; Dubin y col., 1982) permitió elaborar un mapa detallado de la transcripción del genoma mitocondrial de células HeLa (Fig. 11).

El RNA 4a es el precursor de los dos RNAs ribosómicos (Montoya y col., 1983). Su extremo 5' está localizado unos 19 nucleótidos por delante del gen para el tRNA^{Phe} y por lo tanto proviene de un acontecimiento de transcripción diferente al del resto de RNAs. Este RNA se acumula solamente en condiciones en las que el procesamiento está disminuido (Montoya y col., 1983). Se ha sugerido que el RNA 7S (al menos en células HeLa) debe actuar como cebador en la iniciación de la replicación de la cadena pesada o iniciador en la transcripción de la cadena ligera, dado que su secuencia se localiza entre LSP y O_H (Ojala y col., 1981 b). El RNA 18 corresponde a una fracción del RNA 7S que está poliadenilada e incluye una pequeña ORF que codificaría en células HeLa para un polipéptido de 23-24 aminoácidos (Ojala y col., 1981 b). Es, además, el único RNA mitocondrial que contiene un extremo 5' no codificante. La ausencia de esta ORF en otros genomas mitocondriales de vertebrados plantea dudas acerca de su significado funcional. Los RNAs 1, 2 y 3 tienen una vida media muy corta y parece probable que actúen como intermediarios en la formación de los tRNAs codificados por la cadena ligera. La secuencia del gen ND6 está incluida en el extremo 5' de estos tres RNAs; ello sugiere que estos RNAs, o algunos derivados suyos, pueden actuar como mensajeros de este gen.

Los RNAs 5, 9, 11, 12, 13, 15, 16 y 17 son los mensajeros de los genes ND5, COI, Cyt b, ND2, ND1, COIII, COII y ND3 respectivamente. Los RNAs 7 y 14 contienen dos marcos de lectura cada uno (genes ND4L y ND4 y ATPasa 8 y 6, respectivamente) solapados entre sí en distinta fase de lectura para su traducción. El RNA 6 es un precursor del RNA 9 que continúa hasta el gen del tRNA^{Trp}. El RNA 10 representa una pequeña fracción del RNA 16S que se encuentra oligoadenilada. El RNA 4 es un precursor de los rRNAs que se encuentra también oligoadenilado y presenta un extremo 5' localizado cerca del extremo 5' del rRNA 12S y, por

ARN	TAMAÑO (NUMERO NUCLEOTIDOS)	FUNCION	CADENA MOLDE DEL ADN
NO UNIDOS A OLIGO (dT)			
ARN 4a	2672	PRECURSORES DE LOS ARN RIBOSOMICOS	PESADA
ARNr 16S	1559	COMPONENTES ESTRUCTURALES DE LOS RIBOSOMAS	PESADA
ARNr 12S	954		
ARNt	59-75	ARN DE TRANSFERENCIA	4ARNt: PESADA 3ARNt: LIGERA
UNIDOS A OLIGO (dT) POLI(A)-ARN			
1	~ 10400	ARNm DE ND 6?	LIGERA
2	~ 7070		LIGERA
3	~ 4155		LIGERA
4	2582	ARNm DE ND 5 PRECURSOR DE ARN 9 ARNm DEL ND 4L - ND 4 ARNm DE CO I ARNm DE CITO CROMO b ARNm DE ND 2 ARNm DE ND 1 ARNm DE ATPasa 8 + ATPasa 6 ARNm DE CO III ARNm DE CO II ARNm DE ND 3	PESADA
5	2410		PESADA
6	1936		PESADA
7	1688		PESADA
9	1617		PESADA
11	1141		PESADA
12	1042		PESADA
13	958		PESADA
14	842		PESADA
15	784		PESADA
16	709		PESADA
17	346		PESADA
18	215		LIGERA

Tabla I. Productos de transcripción del mtDNA humano. (Montoya y Attardi, 1986). Los RNAs son divididos según estén o no poliadenilados. Cada mtRNA está caracterizado con su tamaño, función y cadena a partir de la cual se ha originado.

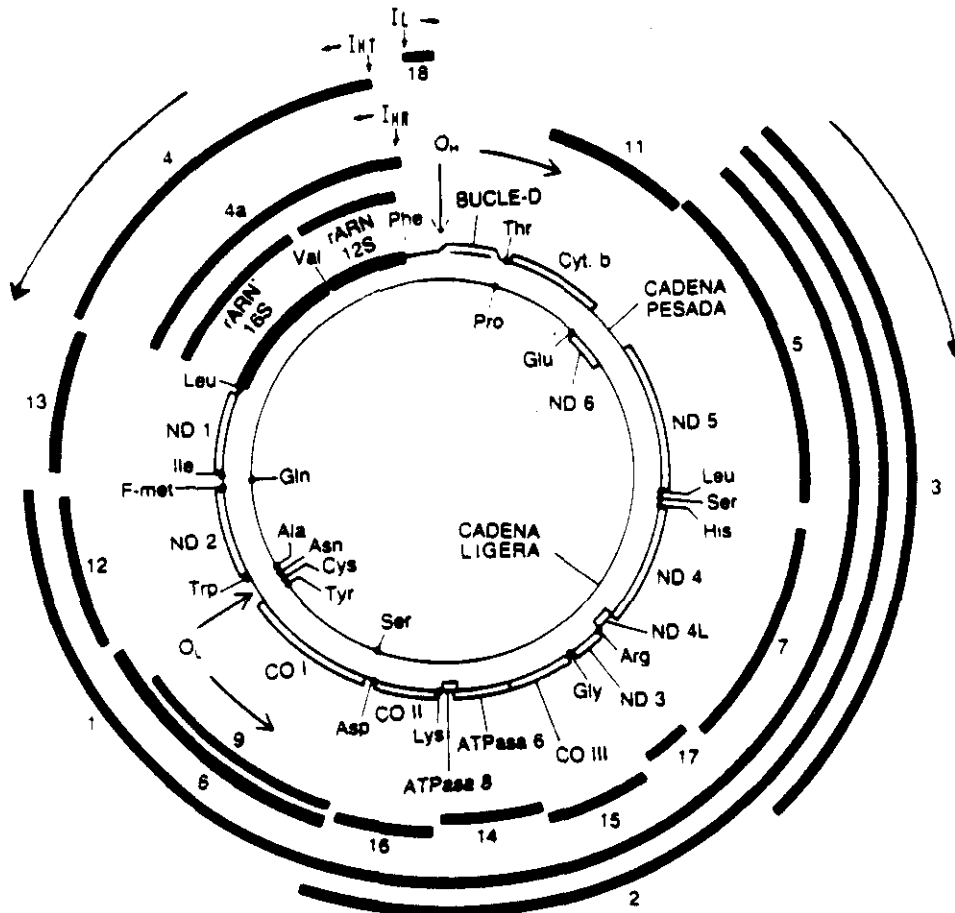


Figura 11. Mapa génico y de transcripción del mtDNA humano. (Montoya y Attardi, 1986). Se representa en el interior el mtDNA con los genes que codifica y en el exterior sus productos de transcripción. Las flechas indican la dirección de la transcripción y de la replicación. Los RNAs 1,2,3 y 18 se transcriben a partir de la cadena ligera, el resto a partir de la pesada. IHT, IHR e IL indican los lugares de iniciación de la cadena pesada, los rRNAs y la cadena ligera respectivamente. OL y OH son los orígenes de replicación de la cadena pesada y ligera respectivamente.

lo tanto forma parte de la misma unidad de transcripción que el resto de poli(A)-RNAs de la cadena pesada. Finalmente, al RNA 8 no se le ha podido asignar función alguna, ya que sólo se ha detectado en células HeLa cuando éstas han sido tratadas con antibióticos para inhibir la síntesis de RNAs nucleares (Montoya y col., 1983).

2.3.1. RNAs mensajeros (mRNAs).

Una característica común a todos los mRNAs mitocondriales de vertebrados es la ausencia de 7-metilguanosa (Grohmann y col., 1978). así mismo, la secuenciación de los mRNAs ha revelado que, con la excepción del RNA 18 (Montoya y col., 1981; Ojala y col., 1981 b), todos los mRNAs mitocondriales de células HeLa carecen de secuencias reguladoras no codificantes en el extremo 5', y por lo tanto de los característicos motivos Shine-Dalgarno de unión al ribosoma (Shine y Dalgarno, 1974). Por otra parte, los mRNAs mitocondriales son todos poliadenilados (Amalric y col., 1978; Montoya y col., 1981) presentando una cola de poli(A) de unos 55 nucleótidos en su extremo 3'. Sin embargo, no se ha podido encontrar en estos mRNAs ninguna secuencia en el extremo 3' o cerca de él que contenga una señal potencial de poliadenilación similar a las encontradas en mRNAs nucleares (Proudfoot y Brownlee, 1976).

Excepcionalmente, cuando hay varias bases espaciando un tRNA y un gen codificante de proteínas, o bien en los casos de solapamiento de genes, los mRNAs transcritos no comienzan con un marco de lectura abierto y, frecuentemente, se encuentra el triplete ATG como codón de iniciación, probablemente porque, en estos casos, se necesita una señal de iniciación fuerte para colocar el mensajero en fase de lectura. Sin embargo, cuando los marcos de lectura abierta comienzan a la vez que el mensajero, cualquier codón ATN y posiblemente GTG funcionan como señal de iniciación.

Con respecto a los codones de terminación, cuando un mensajero lleva una región 3' no codificante o en el caso de solapamiento de genes, los codones utilizados son TAG o TAA. Cuando los mRNAs terminan inmediatamente antes de un tRNA, se pueden encontrar codones de

terminación incompletos de tipo T o TA. En estos casos el transcrito es procesado inmediatamente antes del tRNA y a continuación es poliadenilado, creándose el codón de terminación TAA. Por otro lado, se ha descrito que el extremo 3' de los genes COI en hombre (Anderson y col., 1981) y Cyt b en vaca (Anderson y col., 1982) termina en AGA.

2.3.2. RNAs ribosómicos (rRNAs).

Los rRNAs 12S y 16S, constituyentes típicos de las dos subunidades que forman los ribosomas mitocondriales, presentan una estructura secundaria característica, aparentemente muy conservada en vertebrados (Dunon-Bluteau y Brun, 1986; Gadaleta y col., 1989) aunque su estructura primaria presente mayores divergencias. Estos rRNAs son oligoadenilados post-transcripcionalmente en la mitocondria (Dubin y col., 1982). En el rRNA 12S se localizan tres secuencias diferentes de 12, 17 y 18 pb conservadas en casi todos los vertebrados e incluso en el genoma de *E. coli*, que se corresponden con bucles del rRNA expuestos y que presentan secuencias complementarias a varios genes mitocondriales codificantes de proteínas (cyt b, ATPasa 6 y COIII) por lo que se ha sugerido para ellos un papel regulador en la traducción (Gadaleta y col., 1989). Por otra parte, en el rRNA 16S se encuentra una región de unas 60 pb complementaria al mRNA del gen ND6. Además, parte de esta región es complementaria con la secuencia del promotor de la transcripción de la cadena pesada en la región del D-loop (Chang y Clayton, 1986), por lo que en el caso de que el mRNA del gen ND6 actúe como RNA antisentido se ha sugerido para esta región un papel regulador de la transcripción, tanto de la cadena pesada a nivel del promotor como de la ligera a nivel de los transcritos primarios o en ambas a nivel de la formación de ribosomas activos (Gadaleta y col., 1989).

2.3.3. RNAs de transferencia (tRNAs).

Los tRNAs mitocondriales son más pequeños que los tRNAs citoplasmáticos y procarióticos. Se caracterizan por la posesión del triplete CCA en su extremo 3'. Este triplete no está presente originalmente en

ninguno de los 22 genes de tRNAs por lo que necesariamente debe ser incorporado durante la maduración de los tRNAs. Otro tipo de modificaciones típicas de tRNAs como son la presencia de residuos metilados, pseudouridina., etc., también se producen durante su maduración. Los tRNAs mitocondriales son ricos en adenina y uracilo, presentando con gran frecuencia apareamientos de bases y configuraciones tridimensionales heterodoxas. La región del anticodón es la única que ha conservado las características generales de tRNAs citoplasmáticos y bacterianos; en el hombre, el primer nucleótido del bucle es siempre una pirimidina y los nucleótidos que preceden y siguen al anticodón son siempre U y una purina, respectivamente, excepto en el caso del tRNA *Met* que tiene una C precediendo al anticodón.

En contraste con el resto de sistemas, en los que siempre existe un gen para la especie formil- tRNA *Met*, en la mitocondria no existe más que un gen tRNA *Met*. Sin embargo, la capacidad de los tripletes AUG y AUA para actuar como codones de iniciación, hace suponer la existencia de una familia de tRNAs iniciadores.

2.3.1. El código genético mitocondrial.

Las características que presenta el código genético universal son consecuencia de las propiedades bioquímicas intrínsecas de los nucleótidos. Las dos primeras bases del codón se emparejan con las dos últimas bases del anticodón de las moléculas de tRNA, de acuerdo con el modelo de enlace de Watson-Crick (Watson y Crick, 1953). En cambio, la primera base del anticodón se empareja con la tercera base del codón de acuerdo con las reglas del balanceo: el hecho de que G se empareje, no sólo con C sino también con U, es responsable de la existencia de un código genético degenerado (Crick, 1966).

La existencia de tan sólo 22 tRNAs en la mitocondria (frente a los 55 utilizados en el citoplasma por el código universal) justifica la existencia de un modelo de reconocimiento de codones distinto del propuesto por Crick. En el código mitocondrial se pueden distinguir dos grandes grupos de tRNAs

en relación con el número de codones que reconocen. El primer grupo incluye ocho tRNAs distintos que identifican cada uno un total de cuatro codones. En todos los casos estos tRNAs tienen una U en la primera posición del anticodón (HsuChen y col., 1983; Montoya y Attardi, 1986). Esta es una de las mayores diferencias respecto del código universal, ya que no existe en este último ningún tRNA capaz de reconocer cuatro codones. Esta situación se puede explicar en la mitocondria mediante dos posibles modelos: 1) que el balanceo sea más flexible de tal manera que la U de la primera posición del anticodón sea capaz de reconocer cualquier base en la tercera posición del codón (balanceo U:N; Barrell y col., 1980); 2) que en la interacción entre codón y anticodón solamente estén implicadas únicamente las dos bases localizadas en la primera y segunda posición del codón (Lagerkvist, 1978). El segundo grupo incluye el resto de tRNAs que reconocen solamente dos codones cada uno. De ellos, 8 (tRNAs de Asn, Asp, Cys, His, Ile, Phe, Ser, y Tyr) cumplirían la regla universal del balanceo y 6 (tRNAs de Glu, Gln, Leu, Lys, Trp y Met) que poseen una U modificada en la primera posición del anticodón y reconocerían indistintamente codones con una A o una G en la tercera posición. Además, es de destacar la ausencia, al menos en vertebrados, de tRNAs que reconozcan los codones AGA y AGG, que por lo tanto actúan en el código mitocondrial como codones de terminación.

El DNA mitocondrial (excepto en plantas) se caracteriza por presentar un código genético peculiar, distinto del universal (Fig. 12). La principal diferencia entre el código genético mitocondrial y el universal es el uso del triplete UGA, no como codón de terminación, sino para codificar triptófano (Barrell y col., 1979). Otras variaciones encontradas en el código genético de mitocondria son: uso en vertebrados superiores del codón AUA no para codificar isoleucina, sino metionina; uso del codón AAA (lisina) para codificar asparagina en invertebrados; uso del codón AGR (arginina) para codificar serina en invertebrados y como codón de terminación en vertebrados superiores.

		U			C			A			G				
5'	U	UUU Phe	GAA	UCU Ser	UGA	UAU Tyr	GUA	UGU Cys	GCA	U	UAA Fin	—	UGA Trp	UCA	3'
		UUC Phe		UCC Ser		UAC Tyr		UGC Cys				UGG Trp			
	C	CUU Leu	UAG	CCU Pro	UGG	CAU His	GUG	CGU Arg		C	CAA Gln	UUG	CGC Arg	UCG	A
		CUC Leu		CCC Pro		CAC His		CGA Arg				CCG Arg			
A	AUU Ile	GAU	ACU Thr	UGU	AAU Asn	GUU	AGU Ser	GCU	A	AAA Lys	UUU	AGA Fin	—	G	
	AUC Ile		ACC Thr		AAC Asn		AGC Ser				AGG Fin				
G	A	AUA Met	UAU	ACA Thr		AAG Lys			G	GAA Glu	GUC	GGU Gly		3'	
		AUG Met		ACG Thr		AAG Lys		AGG Fin				GGA Gly	UCC		
	G	GUU Val	UAC	GCU Ala	UGC	GAU Asp	GUC	GGU Gly		G	GAG Glu	UUC	GCC Gly		U
		GUC Val		GCC Ala		GAG Asp		GGA Gly				GGG Gly			

Figura 12. El código genético de mitocondrias de vertebrados superiores. Se indican los codones posibles (5'→3'), su traducción y el anticodón del tRNA correspondiente. Se señalan en negrita, los codones con traducción diferente a la del código genético universal.

Las diferencias del código genético mitocondrial entre especies pueden resumirse en forma de árbol filogenético (Fig. 13). El primer cambio fue el que afectó al codón UGA (terminación → Trp) y ocurrió con posterioridad a la separación entre el reino animal y el vegetal. Ya en la línea animal, el codón AGR (arg) comenzó a codificar para serina en platelmintos (Garey y Wolstenholme, 1989) y continuó en equinodermos (Himeno y col., 1987; Jacobs y col., 1988; Cantatore y col., 1989), moluscos (Shimayama y col., 1990) e insectos (HsuChen y col., 1984; Clary y Wolstenholme, 1985; Crozier y Crozier, 1993) hasta convertirse en codón de terminación en vertebrados (Anderson y col., 1981; Bibb y col., 1981; Anderson y col., 1982; Gadaleta y col., 1989; Arnason y col., 1991; Arnason y Johnsson, 1992; Roe y col., 1985 y Desjardins y Morais, 1990).

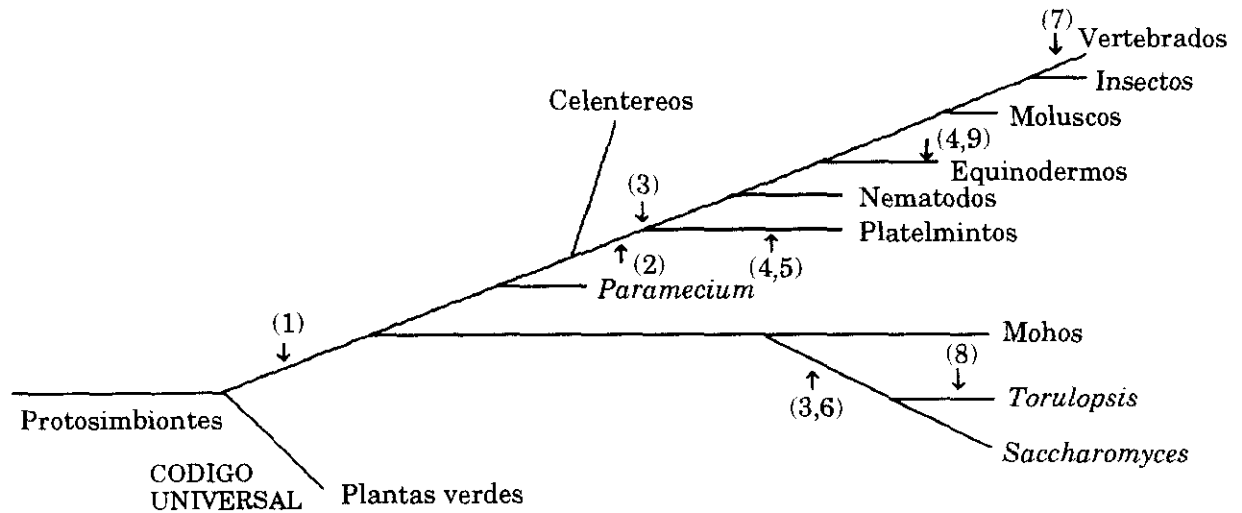


Figura 13. Evolución del código genético mitocondrial. (Jukes y Osawa, 1990). Los protosimbiontes y las plantas verdes mantienen el código universal, mientras que las mitocondrias del resto de eucariotas sufren progresivamente los siguientes cambios: (1) UGA, Trp; (2) AGR, ser; (3) AUA, Met; (4) AAA, Asn; (5) UAA, Tyr; (6) CUN, Thr; (7) AGR, stop; (8) CGN, no codificante; (9) AUA, Met→Ile .

El codón AAA cambió de Lys a Asn en la rama de los platelmintos y como un acontecimiento aislado en equinodermos. A partir de nematodos (Wolstenholme y col., 1987) y, de forma independiente, en levaduras (Hensgens y col., 1979) el codón AUA cambió de Ile a Met, cambio que posteriormente revirtió en equinodermos. El codón CUN se traduce como Thr en vez de Leu en levaduras (Li y Tzagoloff, 1979). El codón UAA parece ser usado para Tyr en vez de codón de terminación en la mitocondria de platelmintos (Bessho y col., 1992). En la mitocondria de *Torulopsis glabatra* (levadura) no se ha encontrado ningún codón AGR, ni un tRNA^{Arg} capaz de traducirlo (Clark-Walker y col., 1985).

En cualquier caso, parece evidente, que todos los códigos genéticos encontrados en mitocondria derivan del código genético universal, que de hecho se mantiene para el DNA mitocondrial de plantas.

Los mecanismos causantes de la evolución del código genético mitocondrial a partir del universal están relacionados con fenómenos de economía genómica. La desaparición de un tRNA conlleva el cambio del correspondiente codón a otro sinónimo sin traducción asignada. El nuevo

codón adquiere sentido, bien por mutación en el anticodón del tRNA, bien por cambio en el aminoácido que se une al mismo tRNA, o bien por cambio en el emparejamiento codón-anticodón. El primer caso es el que ocurre en el cambio de UGA de codón de terminación a codón para el triptófano, en el cambio de CUG de codón para leucina a codón para serina y en el cambio de AAA de codón de lisina a codón de asparagina. El segundo caso ocurre en el cambio del codón CUN de leucina a treonina en el mtDNA de levadura. El tercero se da en el cambio del codón AGR de arginina a serina y posteriormente a codón de terminación y en el anticodón CAU del tRNA^{Met} que pasa, de reconocer sólo el codón AUG, a reconocer también el codón AUA (Osawa y col., 1992).

3. FILOGENIA MOLECULAR.

3.1. Clasificación, evolución y biología molecular.

Tradicionalmente se considera la obra *Systema Naturae* de Linneo (1707-1778) como el comienzo de la taxonomía moderna. En función de sus características morfológicas y funcionales, a cada organismo se le asigna una especie, y ésta se clasifica dentro de un género, familia, orden y clase. Con esta metodología, Cuvier (1769-1832), De Candolle (1778-1841) y otros naturalistas fueron extendiendo la clasificación de Linneo a nuevas especies de plantas y animales hasta que la teoría evolutiva de Darwin (1809-1882), juntamente con las posteriores leyes sobre la herencia genética de Mendel (1822-1884), cambiaron por completo la forma de concebir los sistemas de clasificación de los seres vivos.

De acuerdo con el pensamiento neodarwinista, la biodiversidad existente, es consecuencia del proceso evolutivo resultante de la actuación de la selección natural sobre la variación generada por la mutación genética en una población. Por lo tanto, una sistemática rigurosa debe reflejar, primordialmente, la historia evolutiva de los organismos estudiados, integrando para ello, los conocimientos adquiridos sobre su morfología, fisiología, genética, interacciones ecológicas y registro fósil. Basándose en esta premisa, los sistemas de clasificación básicamente morfológicos, han

ido renovándose mediante la incorporación sucesiva de los descubrimientos realizados en los campos de la paleontología, la sistemática y la biología molecular hasta llegar a la, actualmente aceptada, clasificación en cinco reinos: monera, protista, plantae, fungi y animalia (Whittaker, 1969; Whittaker y Margulis, 1978) (Fig. 14).

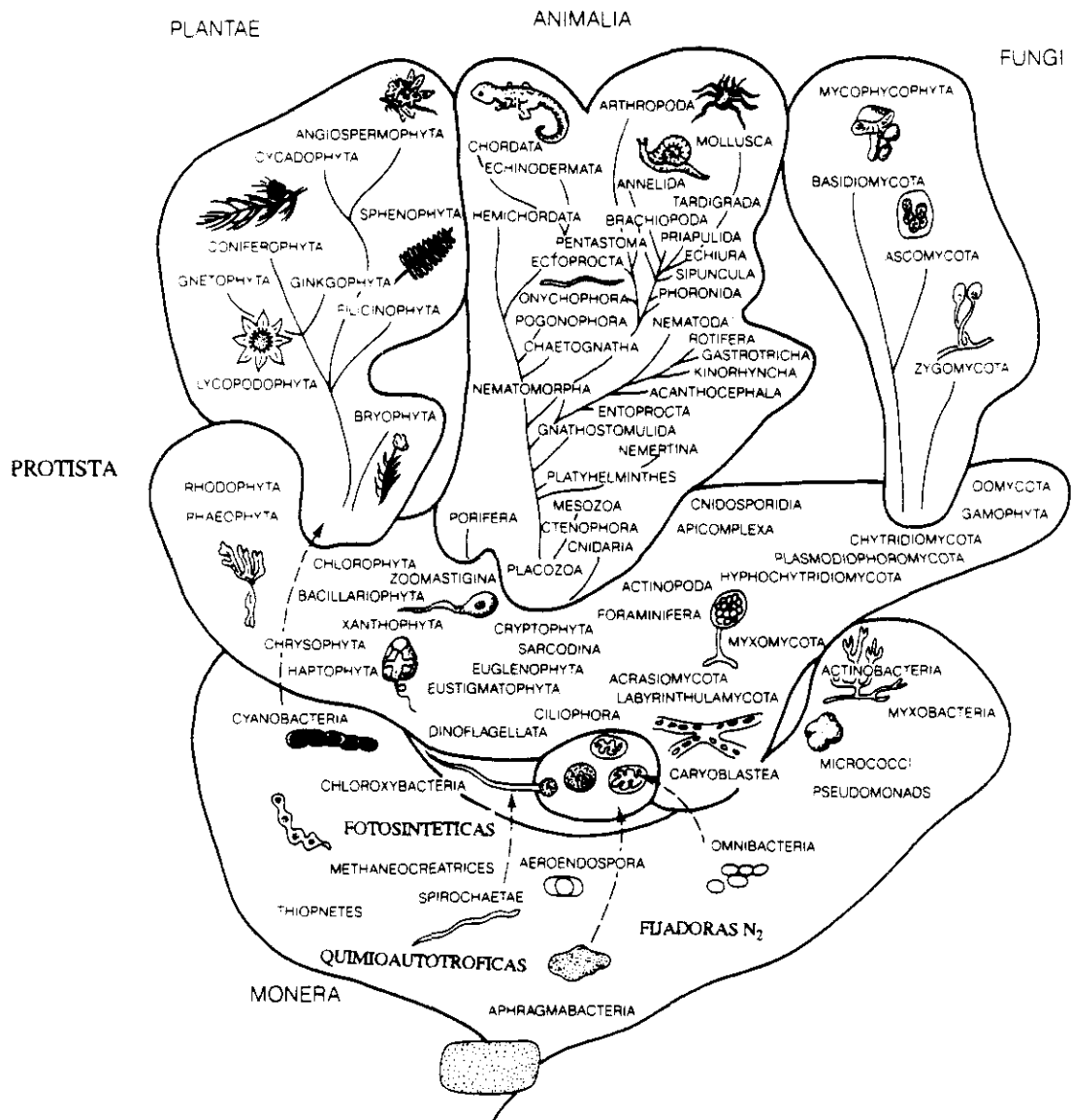


Figura 14. Clasificación en cinco reinos de Whittaker. Se representan todos los phyla incluidos en cada reino: monera (16), protista (27), fungi (5), plantae (9) y animalia (32). El esquema estaría de acuerdo con la teoría endosimbionte para el origen de los eucariotas. Modificado de Margulis (1981).

Esta clasificación es un reflejo de las filogenias entre organismos y por lo tanto representa un razonable acercamiento a los principales aspectos de la historia evolutiva de los seres vivos desde el origen de los procariotas más sencillos hasta el desarrollo de la diversidad actual. Aunque válido, este acercamiento no es definitivo ya que está lleno de conjeturas y muchos detalles son todavía controvertidos.

En este sentido, el gran desarrollo de la biología molecular y su creciente aplicación en los estudios de carácter evolutivo, está contribuyendo, no sólo a resolver los numerosos puntos oscuros existentes aún en las filogenias ya establecidas, sino además a poder comprender los mecanismos evolutivos.

Tan pronto como fueron determinadas las secuencias de proteínas como el citocromo c (Margoliash, 1963) o la hemoglobina (Zuckerlandl y Pauling, 1962) en diversos organismos, se pudo establecer que, entre dos especies, el número de sustituciones aminoacídicas para una proteína dada, aumentaba de forma aproximadamente lineal con respecto al tiempo pasado desde su divergencia. La existencia de un *reloj molecular* tuvo una consecuencia directa en el estudio de la evolución: se podían construir árboles filogenéticos sobre la base de un patrón de cambio evolutivo mucho más regular que el proporcionado por caracteres morfológicos o fisiológicos y, por lo tanto, permitía escalar en el tiempo la historia evolutiva de los organismos (Fitch y Margoliash, 1967).

Puesto que toda la información de un ser vivo está almacenada en su genoma, se pueden establecer filogenias entre diferentes organismos por comparación de sus secuencias de DNA. El clonaje de genes es una labor cara, consume mucho tiempo, no todos los genes son fácilmente clonables y no siempre tienen el mismo interés desde el punto de vista evolutivo. En general, cuanto más imprescindible es un gen, menor es la aparición de variaciones en su secuencia y por lo tanto mejor describe filogenias entre taxones alejados. Por eso, durante muchos años, la mayoría de los estudios sobre filogenia molecular se han centrado, sólo, en unos pocos genes (genes mitocondriales, genes nucleares codificantes de rRNA) de únicamente unas pocas especies.

Pese a ello, el desarrollo de las técnicas de DNA recombinante y la

posibilidad, relativamente reciente, de secuenciar el DNA de forma sencilla y rápida (Sanger, 1981) han permitido obtener, en pocos años, gran cantidad de información sobre muchos genes en una gran variedad de organismos. Así, las bases de datos GenBank y EMBL contaban, el 30 de Febrero de 1992, cada una con 63378 entradas (83.6 millones de nucleótidos) correspondientes a 3000 organismos, y se esperaba duplicar la cifra de secuencias en, tan sólo, 18 meses (Burks y col., 1992; Higgins y col., 1992). La información acumulada es tal, que el manejo y análisis de las secuencias de DNA sólo se puede realizar con potentes computadores a través de programas especialmente desarrollados para este fin (Devereux y col., 1984). Se ha de señalar que, aunque la mayoría de las secuencias de DNA introducidas en los bancos de datos, no provienen de trabajos de investigación relacionados con temas evolutivos, la información que contienen es, casi siempre, aprovechable para confirmar o aclarar cuestiones de esta índole.

En definitiva, el avance conseguido hasta mediados de los años 80, fue espectacular pero, obviamente, limitado por una característica inherente a las técnicas de DNA recombinante, la necesidad de obtener grandes cantidades de DNA de buena calidad de cada organismo objeto de estudio como paso previo para su clonación, así como por la necesidad de construir genotecas y disponer de un método adecuado de selección. La situación cambió de forma sorprendente tras la aparición de una nueva técnica, la reacción de la polimerasa en cadena o PCR (Saiki y col., 1988). Esta técnica permite amplificar cualquier fragmento de DNA, mediante la unión de oligonucleótidos específicos a las secuencias que lo flanquean. Es evidente que la especificidad de la amplificación viene determinada por el diseño de oligonucleótidos adecuados y que éste no hubiera sido posible, de no ser por la información sobre secuencias de DNA acumulada en los años previos a la aparición de la técnica de PCR.

Aunque los productos de PCR normalmente no se corresponden con la secuencia completa de un gen, y por lo tanto no ofrecen tanta información como la derivada del clonaje de uno o varios genes, la técnica ofrece numerosas ventajas para el abordaje de cuestiones evolutivas: es muy rápida y sencilla; requiere cantidades mínimas de DNA (nanogramos)

y en algunos casos basta la rotura celular como único paso previo de purificación del DNA; permite amplificar DNA a partir de tejidos procedentes de, prácticamente, cualquier organismo incluso fosilizados (Pääbo y col., 1989; Cano y col., 1993; Poinar y col., 1993) o guardados en colecciones de museos (Kocher y col., 1989); por otra parte, no requiere la muerte del organismo objeto del análisis y, finalmente, permite analizar simultáneamente un gran número de individuos al mismo tiempo.

3.2. Árboles filogenéticos.

A medida que las técnicas de biología molecular se han ido introduciendo en el campo de la evolución, la cantidad de información disponible se ha ido incrementando considerablemente. Los datos empíricos acumulados y correctamente interpretados permiten, por un lado avanzar en la comprensión del mecanismo evolutivo, y por otro, construir árboles filogenéticos que reflejen la historia evolutiva de los organismos cada vez más precisos. Para lograr ambos objetivos, se ha hecho necesario desarrollar métodos matemáticos y estadísticos capaces de cuantificar los cambios evolutivos (sustituciones de nucleótidos, deleciones e inserciones) observados a nivel del DNA (Jukes y Cantor, 1969).

Para tratar de elucidar el mecanismo molecular de la evolución, en los años 60 se desarrollaron métodos basados en la teoría matemática de la genética de poblaciones (Fisher, 1930; Wright, 1931; Haldane, 1932). Dichos métodos estadísticos se aplicaron a los datos moleculares disponibles en aquella época con el fin de poder determinar la distancia genética entre poblaciones, mediante la estimación del número de sustituciones producidas en una determinada secuencia para diversos organismos (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967; Kimura, 1968; Nei, 1969).

Para construir árboles filogenéticos moleculares, se desarrollaron métodos estadísticos a partir de los ya empleados por la taxonomía numérica en la construcción de árboles evolutivos basados en caracteres morfológicos (Sneath y Sokal, 1973) y, aunque éstos podían ser directamente aplicados a datos moleculares, se desarrollaron nuevos métodos que tuvieran en cuenta las particularidades de la evolución a nivel

molecular (por ejemplo la importancia de los factores estocásticos).

En la taxonomía numérica existen dos tipos de acercamiento teórico a la construcción de un árbol filogenético. Uno es el *fenético*, en el que el árbol se construye considerando únicamente las similitudes fenotípicas entre las especies, sin tratar de entender su historia evolutiva. Este acercamiento se utiliza cuando no se conocen bien las reglas que rigen el cambio evolutivo de los caracteres usados, o cuando el análisis taxonómico se basa únicamente en la semejanza fenotípica. Dado que estos árboles no tienen por qué representar relaciones evolutivas, se les suele denominar fenogramas y son considerados simples agrupamientos de organismos. En el segundo acercamiento, el *cladístico*, el árbol filogenético se construye considerando posibles formas de evolución siguiendo determinadas reglas y escogiendo el árbol que mejor refleje los datos experimentales. Estos árboles se conocen con el nombre de cladogramas. En la práctica, este acercamiento está limitado por la necesidad, en un momento dado, de realizar supuestos no soportados por los datos, al escoger un árbol entre los varios posibles.

Los métodos estadísticos más utilizados par construir árboles filogenéticos a partir de datos moleculares, son los de matrices de distancia (*fenéticos*), el de máxima parsimonia (*cladista*) y el de máxima verosimilitud.

3.2.1. Métodos de matrices de distancia.

- **Distancia media o UPGMA** (Sneath y Sokal, 1973). Se basa en el cálculo de la distancia genética entre pares de unidades taxonómicas operacionales (OTUs). Las OTUs pueden ser especies o poblaciones, y se representan en una matriz. El algoritmo del método consiste en agrupar las OTUs empezando por las dos con menor distancia entre sí. Estas dos OTUs se agrupan con un punto intermedio de ramificación y forman una nueva OTU. Se calculan nuevas distancias entre la OTU combinada y el resto de OTUs y de nuevo se busca el valor de distancia menor, añadiendo así gradualmente, las OTUs más distantes relacionadas. El método UPGMA asume un ritmo constante en el proceso evolutivo, por ello, sólo en

el caso de que la medida de distancias no esté sujeta a errores estocásticos, da árboles con topología y longitud de ramas correctas. La fidelidad de la topología de un árbol filogenético realizado por este método a unos datos experimentales determinados, viene dada por comparación de los errores estándar de cada uno de los puntos de ramificación.

Farris (1977) se dió cuenta de que la topología obtenida por el método UPGMA en el caso de ritmos diferentes de sustitución génica en cada linaje evolutivo, podía ser mejorada si las distancias se calculaban en función de una de las OTUs analizadas. Esta OTU de referencia debía ser claramente distinguible del resto. Este método no permite obtener estimaciones sobre la longitud de las ramas para una topología dada, por lo que tiene que ser usado en combinación con el método de la distancia media o bien con el desarrollado por Fitch y Margoliash.

- Método de **Fitch y Margoliash** (1967). Cuando el ritmo esperado de sustituciones génicas varía sustancialmente según los linajes evolutivos, el método UPGMA da lugar a topologías incorrectas y errores en el cálculo de la longitud de las ramas. El método desarrollado por Fitch y Margoliash permite estimar el número de sustituciones en cada rama y obtener topologías más fiables cuando los ritmos de sustitución para cada rama son diferentes. En este caso, se eligen primero las dos OTUs (A y B) que muestran menor distancia entre sí y el resto se agrupa en una OTU compuesta (C). Se calculan, por separado, las distancias entre las OTUs A y B y la OTU C (media de las distancias entre las OTUs A o B y todas las OTUs de C). Posteriormente, se calcula el número de sustituciones génicas para cada rama. A continuación se unen A y B en una OTU combinada (AB). Se recalculan las distancias entre la OTU AB y todas las demás OTUs que comprendían la OTU C original, y se eligen las dos OTUs que muestran menor distancia entre sí, aunque sean dos en las que no participa la OTU AB. Estas dos OTUs se designan de nuevo A y B y el resto C. El procedimiento se repite hasta que todas las OTUs quedan agrupadas en una única familia. A diferencia del método UPGMA, este algoritmo no permite determinar la raíz del árbol. Para conocerla, se busca una OTU claramente diferente como referencia, o bien se asume un ritmo constante de cambio evolutivo y la raíz se establece al calcular las distancias del

último triplete ABC.

El procedimiento no termina con la construcción del primer árbol; Fitch y Margoliash sugieren comprobar que otras topologías posibles y similares a la obtenida no son mejores. Para ello, se comparan los árboles en función de la desviación estándar (SFM). Sin embargo, se ha demostrado mediante simulaciones por computador, que SFM no es muy eficaz a la hora de identificar la topología correcta entre los diferentes árboles posibles probablemente debido a una baja correlación entre este parámetro y los errores topológicos o de longitud de las ramas acumulados en los diferentes árboles generados (Tateno y col., 1982). A pesar de ello este parámetro se utiliza con frecuencia debido a que no existe ninguna otra manera de poder cuantificar la cercanía de un árbol estimado al real.

- **Distancia Wagner** (Farris, 1972). Como en el método de Fitch y Margoliash, se examinan los posibles árboles que se pueden obtener a partir de los datos empíricos. Sin embargo, en este caso como el proceso de discriminación ya está incluido en el propio método, sólo se obtiene un árbol final.

El algoritmo consiste en producir una matriz de distancias genéticas de las OTUs a estudio. Las dos OTUs más cercanas se combinan. La distancia entre esta OTU combinada y cada una de las restantes se calcula tomando la media de las distancias entre cada una de las OTUs de la OTU combinada y cada una de las OTUs restantes. De nuevo, aquella OTU que permite obtener la distancia menor pasa a formar parte de la OTU combinada. Se calculan la longitud de cada rama. El siguiente paso consiste en añadir una nueva OTU. Para ello, cada una de la OTUs que quedan por agrupar se une al árbol, existiendo tres posibilidades de unión para cada una de ellas (Fig. 15). Se calculan las longitudes de todas las ramas posibles y aquélla que posea la menor se elige como rama del árbol.

La siguiente OTU puede ser añadida y en este caso, las posibilidades de unión son cinco. El proceso continúa hasta que todas las OTUs están agrupadas. Para establecer la raíz del árbol, bien se usa una OTU claramente diferente como referencia, o bien se asume un ritmo constante de cambio evolutivo y la raíz se pone en el punto medio entre las dos OTUs conectadas por la rama mayor.

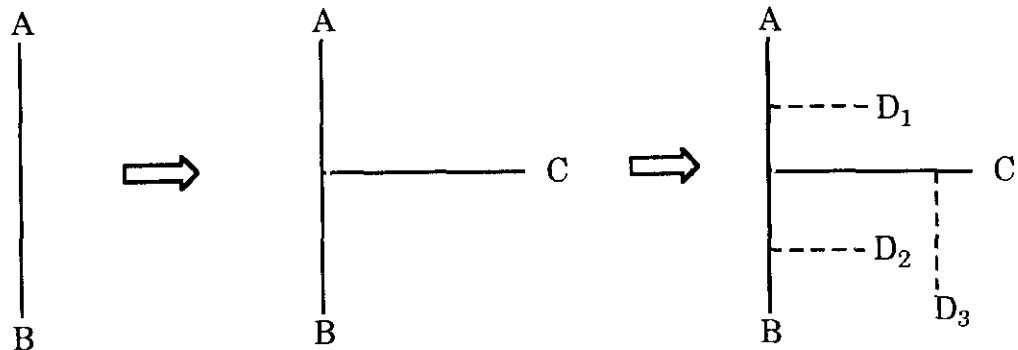


Figura 15. Procedimiento para construir un árbol filogenético por el método de la distancia Wagner.

- **Método de unión por vecindad.** (Saitou y Nei, 1987). Este método está basado en el originalmente descrito por Cavalli-Sforza y Edwards (1967) pero el algoritmo desarrollado simplifica enormemente la computación. Para una topología dada se calcula la suma de la longitud de cada una de sus ramas (L). El procedimiento se repite con todas las topologías posibles y aquella que dé el valor mínimo de L se elige como árbol definitivo. La longitud de cada una de las ramas se calcula según el método de Fitch y Margoliash. La comparación entre las diferentes topologías está incorporada en el algoritmo desarrollado por Saitou y Nei por lo que se obtiene como resultado final un único árbol con topología y longitud de las ramas.

3.2.2. Método de Máxima Parsimonia. (Fitch, 1977).

El algoritmo de este método consiste en considerar una topología particular para un grupo de OTUs e inferir cuales son las secuencias más antiguas para esta topología. A continuación se calcula el número mínimo de sustituciones que son necesarias para explicar los cambios existentes entre las secuencias más antiguas y las más modernas. Una vez obtenido este número, se repite el proceso con una nueva topología. Cuando todas las topologías razonables han sido ensayadas, se elige como árbol final aquella

que requiere el mínimo número de sustituciones. Este método, no permite estimar la longitud de las ramas.

En principio lo más conveniente es obtener la primera topología por el método de la distancia Wagner o mediante la modificación de Farris del método de la distancia media, y producir las topologías alternativas por el método de Fitch y Margoliash (Nei, 1987).

En la construcción de árboles de máxima parsimonia, no todos los sitios de una secuencia son útiles para la determinación de una topología. Sólo son informativos aquellos sitios en los que, a lo largo de su evolución, existen al menos dos clases diferentes de nucleótidos, cada una representada, al menos, dos veces. Esto supone que cuando el número de sustituciones por sitio es pequeño, y el número de OTUs usado también, gran parte de las mutaciones contempladas son únicas, y por lo tanto no informativas para construir un árbol de máxima parsimonia. Esta es su principal desventaja con respecto a los métodos de matrices de distancia, que aprovechan todos los sitios existentes para determinar las distancias genéticas.

3.2.3. Método de máxima verosimilitud.

Este método fue desarrollado originalmente usando como modelo la teoría del movimiento Browniano, asumiendo una distribución de Gauss para la variación evolutiva de los genes (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967). Sin embargo, posteriormente se demostró que este tipo de variación es típicamente no-gaussiana y que podía ser descrita con relativa facilidad mediante una distribución de Poisson. Así, se desarrollaron algoritmos de máxima verosimilitud para estimar únicamente la longitud de las ramas (Langley y Fitch, 1974) o para construir árboles filogenéticos completos (Felsenstein, 1981).

En el método de **Langley y Fitch**, se estima la longitud de las ramas para una topología dada a partir del número conocido de sustituciones de cada rama. Se asume una velocidad de sustitución constante y que el número de sustituciones sigue una distribución de Poisson para cualquier intervalo de tiempo. El método puede ser fácilmente extendido para el caso

de contar con datos sobre varios genes. La velocidad de sustitución puede ser diferente de un gen a otro, pero la distancia evolutiva entre dos OTUs es siempre la misma para todos los genes. La longitud de las ramas así obtenida, es más fiable que la presentada en árboles basados en un único gen.

En el método de **Felsenstein**, se calcula para diferentes topologías la probabilidad de obtener las secuencias observadas para un grupo de OTUs. La topología que presenta la máxima probabilidad se elige como árbol final. Al calcular la probabilidad de que en un sitio, un nucleótido sea sustituido por otro, surge el principal problema de este método, y es que esta probabilidad no es uniforme, sino que depende de su posición en una zona conservada o no conservada de la secuencia de DNA.

3.2.4. Eficiencia relativa de los diferentes métodos de construcción de árboles filogenéticos.

La eficiencia de los diferentes métodos puede ser comparada determinando su fiabilidad a la hora de recuperar la topología correcta y estimar las longitudes de las ramas de un árbol modelo simulado al ordenador (Tateno y col., 1982; Nei y col., 1983; Sourdis y Krimbas; 1987).

En el caso de los métodos de **matrices de distancia**, el de unión por vecindad es el más versátil y eficiente con independencia del número de sustituciones de nucleótidos por sitio de la secuencia. Cuando el ritmo de sustitución génica es constante, y el número de sustituciones por sitio es bajo, la distancia Wagner de Farris es el mejor método para recuperar la topología correcta. Sin embargo, cuando el número de sustituciones es relativamente grande, el método a escoger es el UPGMA. Cuando la velocidad de sustitución varía entre los linajes evolutivos, el método de la distancia Wagner es ligeramente mejor que el de Fitch y Margoliash y el UPGMA en la recuperación del árbol correcto, incluso cuando el número de sustituciones es grande. El mejor método para estimar las longitudes de las ramas es el UPGMA. Ello es debido a que la estimación de las distancias genéticas está sujeta a grandes errores estocásticos, y el procedimiento de hallar distancias medias del UPGMA reduce el efecto de este error en la

estimación de las longitudes de las ramas. En general, el método de Farris tiende a sobreestimar la longitud de las ramas (Tateno y col., 1982).

Al comparar el método de **máxima parsimonia** con los de matrices de distancia, asumiendo un ritmo evolutivo constante y un número pequeño de sustituciones por sitio, se observó que el método que con mayor probabilidad recuperaba la topología correcta, era el de máxima parsimonia. Sin embargo es de destacar, que el método de parsimonia sólo es fiable si se examina un número grande de nucleótidos. Así, cuando se usa DNA mitocondrial como fuente de secuencias y se conoce un organismo claramente distinguible del resto, se necesitan al menos 2600 nucleótidos para determinar el árbol correcto. Cuando se usan genes nucleares, esta cifra es mucho mayor dado que la velocidad de sustitución de nucleótidos es menor. Este método deja de ser fiable cuando las secuencias analizadas son lo suficientemente lejanas como para acumular fenómenos de paralelismo y reversión, siendo entonces más fiables, la distancia Wagner, la modificación de Farris del UPGMA (Saitou y Nei, 1986) o el método de unión por vecindad.

El método de **máxima verosimilitud** es en general más eficiente que el método de máxima parsimonia y, en particular, cuando el ritmo de sustitución es variable. Sin embargo es ligeramente menos eficiente al método de unión por vecindad. La eficiencia de este método depende directamente del modelo de probabilidad escogido (Saitou e Imanishi, 1989).

3.2.5. Margen de confianza estadística de un árbol filogenético.

Los diversos métodos desarrollados para reconstruir filogenias a partir de datos moleculares, rinden como resultado final la topología y la longitud de las ramas de uno o unos pocos árboles, pero no proporcionan información acerca del nivel de confianza estadística de la estimación. Por ello, se han diseñado métodos para evaluar la precisión con la que el árbol obtenido refleja la filogenia verdadera en comparación con otros árboles alternativos (Templeton, 1983; Felsenstein, 1985; Steel y col, 1993). Se trata de un problema complejo ya que, por un lado, el número de árboles alternativos posibles es muy grande incluso cuando se comparan un

número moderado de especies y por otro, el tratamiento estadístico de los datos no suele satisfacer los supuestos utilizados por el método de construcción.

Los métodos estadísticos más utilizados actualmente para establecer el margen de confianza de un árbol filogenético, independientemente del método utilizado para su estimación, son los denominados "*Jackknife*" (Mueller y Ayala, 1982) y "*bootstrap*" (Felsenstein, 1985). Ambos, se basan en la generación al azar, de forma iterativa de sustituciones en el grupo de datos a analizar, la obtención de árboles a partir de estos estimados y en la construcción de un árbol consenso. La idea esencial de estos métodos es que el grupo de estimados generados al azar presenta una distribución estadística que se aproxima a la distribución real. La estimación del número de veces que una rama aparece en el total de árboles generados nos indica el límite de confianza para esta rama. Si un 95% o más de los árboles, muestran la formación de un grupo en ese punto, se puede asumir que el resultado es altamente significativo. Como en todo método estadístico, cuanto mayor sea el número de datos generados, la consistencia de la estimación estadística y, por lo tanto, el grado de significación del árbol obtenido, aumenta.

3.3. Estudios evolutivos con DNA mitocondrial. Situación actual.

El DNA mitocondrial se ha convertido en una herramienta muy útil en los estudios de genética molecular evolutiva debido a su reducido tamaño, alto número de copias por célula, herencia materna y comportamiento evolutivo (en vertebrados, la tasa de sustitución génica es 5-10 veces mayor en los genes mitocondriales que en los genes nucleares) (Brown y col., 1979; Vawter y Brown, 1986). La existencia de genes conservados (12S rRNA, 16S rRNA, Cyt b) en los que las sustituciones se acumulan de forma aproximadamente constante, así como de regiones de evolución rápida (D-loop) permite abordar estudios de tipo comparativo tanto entre grupos distantes como dentro de taxones concretos.

Así, la progresiva acumulación de secuencias completas de mtDNA está permitiendo corroborar las relaciones filogenéticas ya establecidas

entre muchas especies. Además, cualquier gen mitocondrial puede ser amplificado a partir de casi cualquier especie, gracias a la técnica de PCR, lo que permite abordar directamente las cuestiones evolutivas más candentes y aclarar, en parte, las numerosas incógnitas aún existentes en algunos grupos de difícil clasificación.

El DNA mitocondrial ha sido particularmente útil a la hora de estudiar en detalle las relaciones filogenéticas dentro del grupo de los primates (Hixson y Brown, 1986; Hayasaka y col., 1988; Hasegawa y col., 1990). Las secuencias de mtDNA permitieron establecer que la rama de los primates, conducente al hombre, se separó de los prosimios (Lemures, társidos) hace 66 millones de años (Myr). Hace 42 Myr los platirrininos (monos ardilla) se separaron de los catarrinos; por otra parte, los cercopitecos (macacos), el gibón, el orangután, el gorila y el chimpancé se fueron separando sucesivamente hace 30, 17, 13, 5 y 4 Myr (Fig 16).

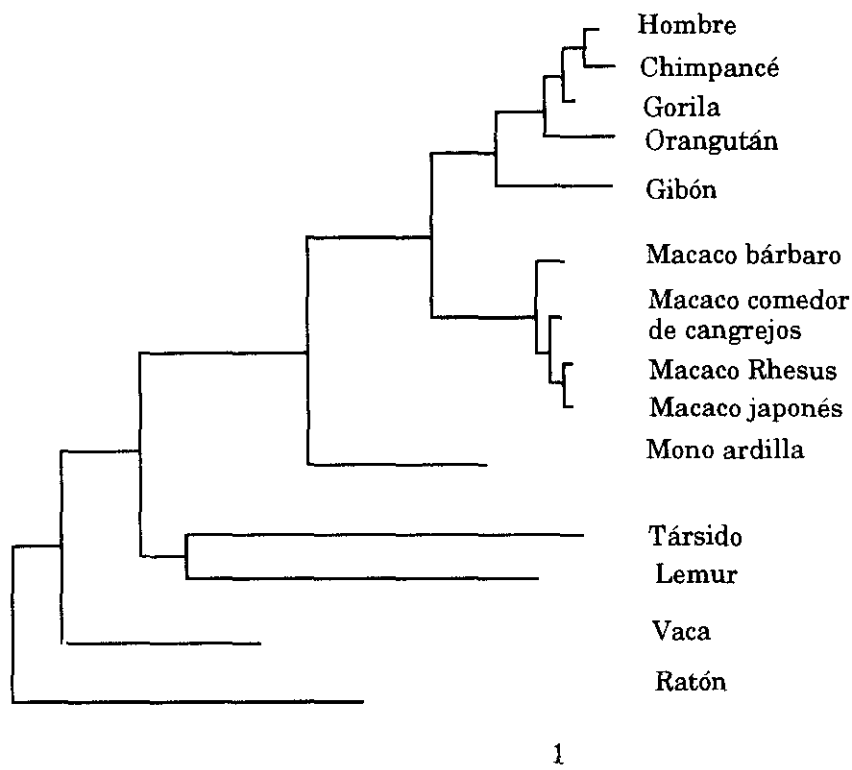


Figura 16. Relaciones filogenéticas de los primates. (Hasegawa y col., 1990). Árbol filogenético obtenido por el método de máxima verosimilitud a partir de los genes ND4, tRNA-His, tRNA-Ser (AGY) y tRNA-Leu (CUN). La longitud de las ramas es proporcional al número estimado de sustituciones por nucleótido.

Dentro de los ungulados, la secuenciación y comparación de los genes mitocondriales que codifican para los RNAs ribosomales en varias especies, ha permitido profundizar en la filogenia del suborden Pecora (Kraus y Miyamoto, 1991) y en especial construir árboles evolutivos de las familias Cervidae (Miyamoto y col., 1990) y Bovidae (Allard y col., 1992). De acuerdo con los estudios realizados, el suborden Pecora (orden Artiodactyla) aparece hace 23-28 Myr, a finales del oligoceno, y es a principios del mioceno (hace 16 Myr) cuando, coincidiendo con la aparición de la sabana como nuevo biotopo en Africa, se produce la rápida diversificación de la familia bovidae.

Por otro lado, la obtención de la secuencia completa del mtDNA de la ballena (Arnason y col., 1991) y su comparación con la secuencia completa de la vaca (Anderson y col., 1982) y las secuencias parciales (citocromo b) de diversos ungulados (Irwin y col., 1991), ha permitido clasificar a los cetáceos como un grupo monofilético, estrechamente relacionado con el orden Artiodactyla, del que se separó hace 10 Myr (Fig 17 a). Además, mediante PCR se han obtenido secuencias parciales de los genes 12S rRNA y 16 S rRNA de 16 especies de cetáceos. La comparación de estas secuencias por los métodos de máxima parsimonia, máxima verosimilitud y unión por vecindad ha permitido realizar un árbol filogenético del taxón (Fig. 17 b). Sorprendentemente, la tradicional división de los cetáceos en los subordenes Odontoceti y Mysticeti, no es corroborada por los datos moleculares obtenidos (Milinkovitch y col., 1993).

Una cuestión evolutiva enormemente discutida, ha sido el origen de los tetrápodos (vertebrados terrestres) a partir de los peces. Los estudios de morfología comparada relacionan a los tetrápodos con los peces del superorden Sarcopterigii. Sin embargo, no permiten aclarar cuál de los dos ordenes incluidos en este superorden, Crosopterigii (celacanto) o Dipnoi (peces pulmonados) está más relacionado con el origen de los tetrápodos. Se ha podido amplificar y secuenciar por PCR parte de los genes 12S rRNA y Cyt b del DNA mitocondrial de un teleósteo (superorden Actinopterygii), un pez pulmonado sudamericano y el celacanto. El alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia completa del DNA mitocondrial de *Xenopus laevis*, y su posterior comparación mediante los métodos de máxima parsimonia, unión por vecindad y distancia Wagner, ha permitido

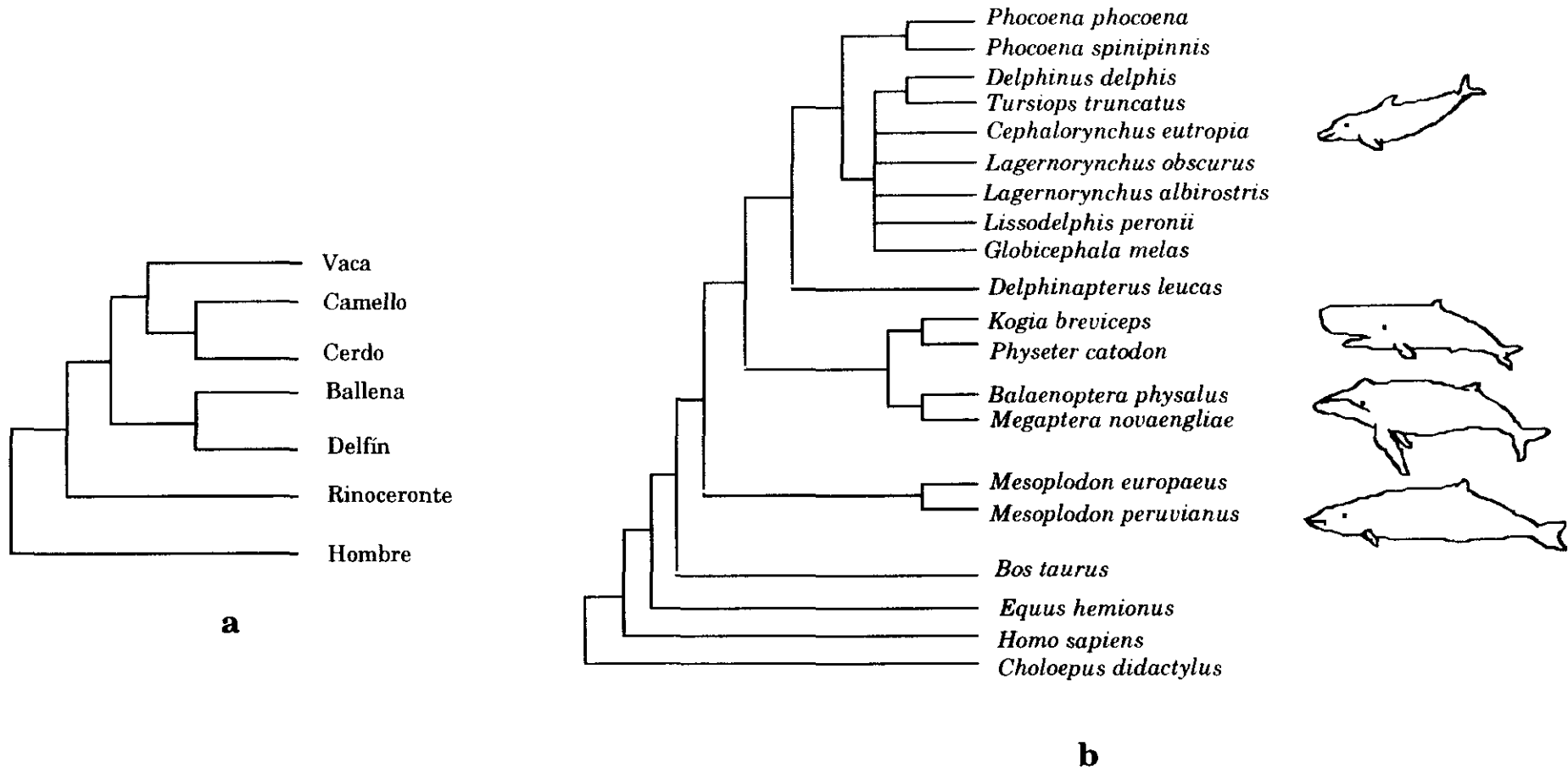


Figura 17. Relaciones filogenéticas de los cetáceos. a) Arbol obtenido por el método de máxima parsimonia, en el que se representan las relaciones de las ballenas y los delfines (cetáceos) con los artiodáctilos (vaca, camello y cerdo) y los perisodáctilos (rinoceronte). Se utiliza como grupo externo al hombre. Modificado de Arnason y col. (1991). b) Arbol consenso obtenido por los métodos de máxima parsimonia, máxima probabilidad y unión por vecindad en el que se representan las relaciones existentes entre 16 especies de cetáceos (delfines, cachalotes y ballenas). *Balaenoptera physalus* y *Megaptera novaengliae* pertenecen al suborden Mysticeti, el resto al suborden odontoceti. Además, como grupos externos, se representan un artiodáctilo (*Bos taurus*), un perisodáctilo (*Equus hemionus*), un primate (*Homo sapiens*) y un desdentado (*Choloepus didactylus*). Modificado de Milinkovitch y col. (1993).

establecer un árbol filogenético (Fig. 18 a) en el que el origen de los tetrápodos se sitúa más cerca de los peces pulmonados que del celacanto (Meyer y Wilson, 1990). Estudios más recientes (Hedges y col., 1993) establecen con mayor precisión el origen de los tetrápodos, al haber clonado el gen para el 16S rRNA en las especies anteriormente citadas, y ampliar el análisis a especies australianas y africanas de peces pulmonados (Fig. 18 b).

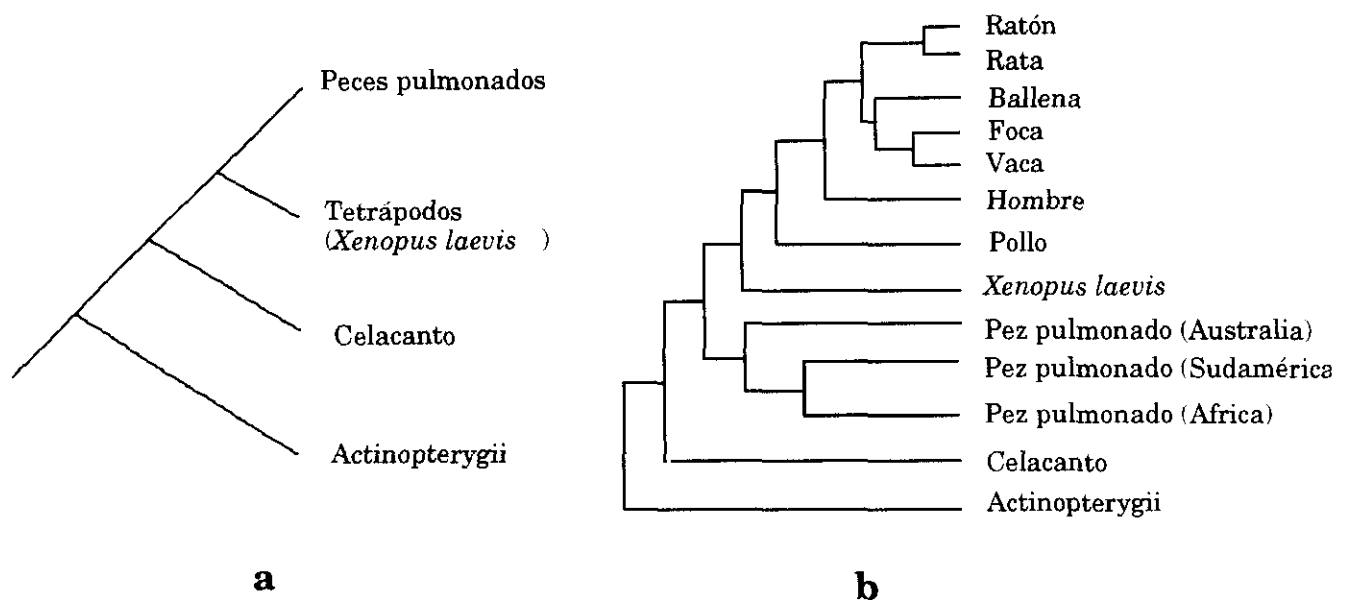


Figura 18. Relaciones filogenéticas entre los peces vivos y los tetrápodos. a) Se representa el árbol filogenético obtenido por el método de máxima parsimonia, resultante de comparar las secuencias de parte de los genes mitocondriales del Citocromo b y 12S rRNA de un pez pulmonado (*Lepidosiren paradoxa*), el celacanto (*Latimeria chalumnae*), un tetrápodo (*Xenopus laevis*) y un teleósteo (*Cichlasoma citrinellum*). Modificado de Meyer y Wilson (1990). b) Arbol obtenido por el método de unión por vecindad a partir de la comparación de las secuencias de los genes 12S, 16S y parte del cyt b de diversos tetrápodos y peces sarcopterigios. Se analizan especialmente las especies de peces pulmonados africana (*Protopterus sp.*), sudamericana (*Lepidosiren paradoxa*) y australiana (*Neoceratodus forsteri*). (Hedges y col., 1993).

EL mtDNA también se ha utilizado en estudios de divergencia genética y especiación de poblaciones. En estos casos se comparan zonas del DNA mitocondrial de evolución rápida como es el caso de la región del

D-loop. Este tipo de análisis, primeramente, se aplicó en estudios sobre las diferentes razas y poblaciones humanas (Di Rienzo y Wilson, 1991) y sólo recientemente en el estudio de peces. Es de destacar el estudio, aplicando el método UPGMA, de las relaciones filogenéticas entre las especies de los géneros *Oncorhynchus* y *Salmo* (Thomas y Beckenbach, 1989). Así mismo, se ha estudiado la distribución del celacanto en el mar Indico comprobándose que todos los individuos pertenecen a una misma población (Schliewen y col., 1993). El caso contrario se ha descrito para los peces del género *Tropheus* (Cichlidae) que viven en el Lago Tanganica. Aunque todos los individuos estudiados presentan la misma morfología, el análisis por PCR de parte de la región de control del DNA mitocondrial y del gen del citocromo b revela una sorprendente divergencia genética entre las poblaciones del lago y un fuerte proceso de especiación (Sturmbauer y Meyer, 1992).

Finalmente, merece ser mencionado que, aunque la mayoría de los estudios sobre filogenia molecular basados en el DNA mitocondrial se han centrado en los vertebrados superiores, la tendencia existente es retroceder paulatinamente en la evolución e ir aclarando, progresivamente, la filogenia de los peces (Digby y col., 1992), los vertebrados inferiores (Martin y col., 1992; Martin, 1993) y los invertebrados (Cunningham y col., 1992; Crozier y Crozier, 1993; Valverde, 1993), quedando como reto para el futuro, el abordaje de las relaciones evolutivas en el, aún poco conocido, reino protista.

MATERIAL Y METODOS

1. MATERIAL.

1.1. Material biológico.

Para el desarrollo del presente trabajo se han utilizado truchas arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) procedentes de las piscifactorias que Pizolla S.L tiene en Zorita de los Canes (Guadalajara) y Cimballa (Zaragoza). Los ejemplares empleados eran adultos y su peso oscilaba entre 200 y 400 gr. La extracción de los hígados se realizó mediante incisión en la línea medioventral.

1.2. Productos químicos y bioquímicos.

Los productos utilizados en la elaboración de medios de cultivo: bactotripton, extracto de levadura y agar fueron suministrados por la casa comercial Difco. La ampicilina se obtuvo de Sigma mientras que el X-Gal y el IPTG de Promega.

Las endonucleasas de restricción, principalmente EcoRI, HindIII, BamHI, PstI y PvuII, así como la T4 DNA ligasa, el fragmento Klenow y la polinucleótido quinasa fueron suministradas por Promega, la matriz Sephadex G-50 por Sigma. Los reactivos para electroforesis de DNA: agarosa y bromuro de etidio se obtuvieron de Sigma. Los reactivos utilizados en la reacción de PCR fueron suministrados por Boehringer Mannheim (dNTPs), Sigma (aceite mineral) y Fynnenzyme (DNA polimerasa termoestable). La extracción a gran escala de DNA plasmídico se realizó con las columnas QIAGEN-tip100 suministradas por la casa comercial IZASA. El kit con la T7 DNA polimerasa para la secuenciación es de Pharmacia-Biotech. Los geles de secuenciación se realizaron con acrilamida, N,N-metilenbisacrilamida, TEMED y persulfato amónico de la compañía Bio-Rad. El [α - 35 S] dCTP necesario para la secuenciación, se consiguió a través de NEN Research.

Los reactivos utilizados en la extracción y caracterización del mtRNA estaban libres de RNasa. El hidróxido de metilmercurio es de productos Alfa, Johnson Matthey GmbH (Karlsruhe, Alemania). Las

membranas de nitrocelulosa utilizadas en la transferencia del RNA (Hybond) y el [α - 32 P] dCTP empleado en las hibridaciones proceden de Amersham, así como la película Hyperfilm.

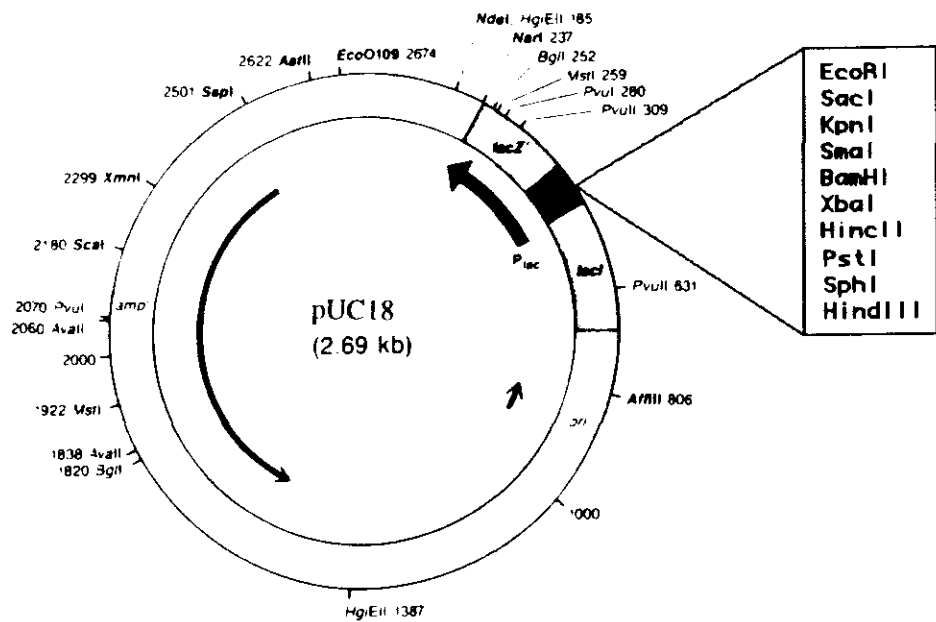
Los disolventes orgánicos, sales y demás reactivos utilizados para este trabajo proceden de las casas Merck, Panreac y Sigma. Las distintas disoluciones y tampones se prepararon con agua destilada o Milli Q (Millipore). Todos los compuestos y sustancias utilizadas presentaban el mayor grado de pureza disponible comercialmente.

1.3. Vectores y estirpes bacterianas.

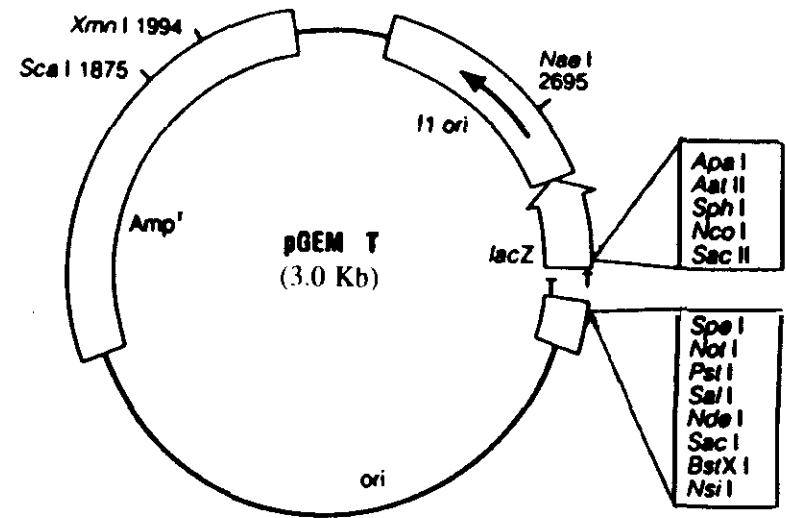
En el clonaje del mtDNA, se utilizó como vector el plásmido pUC18 suministrado por Boehringer-Mannheim. Se trata de un plásmido multicopia (carece del gen *rop* implicado en el control de la replicación) que confiere resistencia a ampicilina. Se caracteriza por poseer un fragmento del gen *lacZ* de *E. coli*, denominado *lacZ'*, que contiene la región del promotor-operador del gen, un polilinker con múltiples sitios de clonaje (Fig. 19 a) y la secuencia codificante del extremo amino-terminal de la β -galactosidasa. La inserción de fragmentos de DNA en cualquiera de los sitios únicos de restricción del polilinker conlleva la pérdida de funcionalidad de *lacZ'* y los clones recombinantes pierden la capacidad de formar colonias de color azul en medios de cultivo sólidos con X-Gal e IPTG (Yanisch-Perron y col., 1985).

El clonaje de los productos de PCR se realizó con el plásmido pGEM-T. Se trata de un vector de características similares al pUC18, pero con diferentes sitios únicos de restricción en el polilinker (Fig. 19 b). El plásmido es suministrado por Promega cortado y con desoxitimidinas en los dos extremos 3' del corte, que son las que se unen a las desoxiadenosinas añadidas inespecíficamente en los extremos 3' de los productos de PCR por algunas DNA polimerasas termoestables, permitiendo el clonaje.

La estirpe bacteriana utilizada como hospedadora fue *E. coli* JM109 cuyo genotipo es: *recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 rel A1 Δ (lac-proAB) [F' tra D36 proAB+ lac Iq lacZ Δ M15]*. Se trata de una cepa no recombinante carente del sistema de restricción, que contiene en el



a



b

Figura 19. Vectores utilizados en el clonaje. Se representan las principales características de los plásmidos pUC18 (a) y pGEM-T (b). Ambos vectores confieren resistencia a la ampicilina y cuentan con sitios de restricción únicos incluidos dentro del gen *Lac Z'*.

cromosoma el gen *lacZ* inactivado por deleción. Este gen también se encuentra en el episoma pero con la deleción M15 que se complementa con el gen *lacZ'* de pUC18 y pGEM-T. Esta cepa se obtuvo de Boehringer Mannheim.

1.4. Equipo utilizado.

Los aparatos más relevantes utilizados en la realización de este trabajo de investigación han sido los siguientes:

- Agitadores orbitales.
- Homogeneizador eléctrico Braun Potter S.
- Baño termostático con agitación Unitronic 320 OR, PSelecta.
- Centrífuga Beckman J2-21 y rotor JA-20.
- Espectrofotómetro PYE-Unicam UV/VIS PU 8800.
- Cubetas y fuente de electroforesis de Pharmacia-Biotech.
- Transiluminador 2011 Macrovue, Pharmacia-Biotech.
- Termociclador automático Minicycler, MJ Research.
- Microcentrífuga Sorvall (Dupont).
- Contador Geiger PUG-1 (Technical associates).
- Cámara instantánea Polaroid DS 34.
- Secuenciador Macrohor 2010, Pharmacia-Biotech.
- Ordenadores VAX-VMS Digital DEC 3000 (Alpha) del Centro de Biología Molecular (CSIC/ Universidad Autónoma de Madrid) y del Centro Nacional de Biotecnología.
- Secuenciador automático ALF, Pharmacia-Biotech.
- Sintetizador de oligonucleótidos Gene Assembler Plus, Pharmacia-Biotech.

2. METODOS.

2.1. Aislamiento de mitocondrias (Lansman y col., 1981).

Una buena extracción de mtDNA se basa en una eficiente separación de los núcleos intactos (con el DNA nuclear) del resto de componentes citoplasmáticos. Por eso, como fuente de mtDNA se eligen tejidos tales como hígado, riñón y corazón en los que la rotura de la membrana citoplasmática no afecta a la integridad de la envoltura nuclear. Así mismo es conveniente utilizar tejidos frescos o conservados a 4°C, ya que la congelación rompe la membrana nuclear, reduciendo hasta un 50% el rendimiento de la extracción.

La separación de los núcleos y la posterior purificación de las mitocondrias se realizó mediante una centrifugación diferencial. Para ello, el hígado de trucha fue cortado en porciones de alrededor de 2 gr y homogeneizado en 10 ml de tampón MSB (Manitol 0.21 M, Sacarosa 0.07 M y Tris-HCl 0.05 M pH 7.5) en presencia de CaCl₂ 3 mM. Posteriormente se añadió EDTA hasta una concentración final de 10mM. La presencia de Ca²⁺ durante la homogeneización reduce la rotura de los núcleos; la adición de EDTA minimiza la agregación de las mitocondrias y además inhibe la actividad de las posibles nucleasas presentes.

Los núcleos y restos celulares fueron eliminados del homogeneizado mediante dos centrifugaciones sucesivas a 700 x g durante 5 min. Las mitocondrias fueron recuperadas del sobrenadante con una centrifugación de 10 min a 10000 x g. El sedimento fue lavado 3 veces con 20 ml de tampón MSB en presencia de EDTA 10 mM y de nuevo recuperado mediante una centrifugación. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4°C.

2.2. Extracción de mtDNA (Palva y Palva, 1985).

El sedimento altamente enriquecido en mitocondrias fue resuspendido en 200 µl de tampón GTE (Glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM) y 7 µl de RNasa A (10 mg/ml). Para lisar las mitocondrias y

desnaturalizar el DNA nuclear contaminante se añadieron 400 μ l de una solución recién preparada de NaOH 0.2 M y 1% de SDS, se mezcló suavemente para evitar la rotura del mtDNA y se incubó 5 min en hielo. Se detuvo la lisis con la adición de 300 μ l de acetato potásico 3M pH 4.8 y tras 2 min a -70°C se centrifugó 10 min a 10000 x g a 4°C .

Se recuperó el sobrenadante con el mtDNA y con el fin de eliminar contaminantes de origen proteico se mezcló con 1 ml de fenol saturado en agua. Una centrifugación de 5 min a 10000 x g permitió separar las fases. Se recuperó la fase acuosa y se repitió la extracción fenólica. Con el objeto de eliminar cualquier resto de fenol en la fase acuosa, se añadió 1 ml de una solución cloroformo:isoamílico, 24:1. Se recuperó de nuevo la fase acuosa y se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol. Una incubación de 5 min a -70°C y una centrifugación de 10 min. a 10000 x g permitieron recuperar el mtDNA en forma de precipitado, que una vez lavado con 200 μ l de etanol 70%, se resuspendió finalmente en 15 μ l de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0 y EDTA 1 mM).

2.3. Cromatografía en Sephadex G-50 mediante centrifugación. (Sambrook y col., 1989).

Los métodos desarrollados para el aislamiento de DNA no permiten conseguir una purificación perfecta y, en muchas ocasiones, los contaminantes arrastrados en el proceso de extracción pueden actuar como inhibidores en reacciones posteriores. Por ello, el mtDNA extraído fue cromatografiado en una columna de Sephadex G-50 con el objeto de eliminar sales, proteínas, fenol, etc.

La resina fue equilibrada en tampón TE y empaquetada en una jeringa de plástico de 1 ml mediante una centrifugación de 1 min a 2000 x g. A continuación, se lavó añadiendo 1 ml de TE y centrifugando 3 min a 2000 x g. Finalmente, se aplicó la muestra en la columna y se centrifugó de nuevo 3 min a 2000 x g con el fin de recuperar el mtDNA limpio en el eluido.

2.4. Extracción de mtRNA (Attardi y Montoya, 1983).

Para evitar la degradación del mtRNA por RNasas, es necesario que todo el material y tampones utilizados en la extracción estén estériles. El sedimento con las mitocondrias lavadas fue resuspendido en 4 ml de tampón pronasa (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM y NaCl 150 mM) e incubado 5 min en hielo en presencia de pronasa a una concentración final de 100 µg/ml. A continuación se añadió SDS hasta una concentración final del 2% y posteriormente se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Tras la incubación se añadieron 4 ml de una solución de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, 25:24:1. Se agitó fuertemente durante 5 min y se centrifugó a 5000 x g durante 5 min. Se recuperó la fase acuosa y se repitió la extracción fenólica. Posteriormente, se recuperó de nuevo la fase acuosa y se añadieron 2 volúmenes de etanol a -20°C. Se incubó 2 horas a -70°C y se centrifugó a 10000 x g durante 30 min para recuperar el mtRNA precipitado, que se resuspendió en 500 µl de TE.

2.5. Cromatografía con oligo(dT) - celulosa (Aviv y Leder, 1972).

A diferencia de los rRNAs y tRNAs mitocondriales, los mRNAs presentan colas poli (A) en sus extremos 3' y por ello pueden ser purificados mediante una cromatografía de afinidad con oligo(dT)-celulosa. Para ello, se resuspendieron 0.1 gr de la matriz en 25 ml de NaOH 0.1 N. Se preparó una columna con 5 ml de la solución y una vez empaquetada se lavó con 10 ml de tampón salino (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM y NaCl 0.15 M).

El mtRNA total se desnaturalizó mediante incubación a 65°C durante 5 min y posterior incubación en agua/ hielo. Se le añadió NaCl hasta una concentración final 0.15 M y se aplicó sobre la columna. A continuación se pasaron 8 ml del tampón salino y se recogió el eluido con las especies de mtRNA no poliadeniladas (A⁻). Las especies poliadeniladas (A⁺) retenidas en la columna fueron eluidas mediante la adición de 8 ml de TE, se desnaturalizaron a 65°C, se les añadió NaCl hasta una concentración final de 0.15 M y de nuevo fueron cargadas en la columna previamente

equilibrada con 8 ml de tampón salino. La adición de 8 ml de TE permitió recuperar los mtRNAs oligo o poliadenilados.

Tanto las especies poliadeniladas como las no poliadeniladas fueron precipitadas mediante la adición de 2 volúmenes de etanol a -20°C y la incubación a -70°C durante 2 horas. En el caso de la fracción poliadenilada, se añadieron previamente 20 μg de tRNA de levadura para favorecer la precipitación. Una centrifugación a $10000 \times g$ de 30 min permitió recuperar las fracciones A⁻ y A⁺ que fueron resuspendidas en 250 μl de TE. Las especies A⁺ fueron de nuevo precipitadas y resuspendidas en 25 μl de TE.

2.6. Determinación analítica de DNA y RNA.

- **Cuantitativa:** La concentración de ácidos nucleicos se valoró midiendo la absorbancia a 260 nm de alícuotas con 2 y 4 μl de DNA o RNA diluídos en 600 μl de agua. 1 Unidad de Absorbancia de DNA a esa longitud de onda equivale a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. 1 unidad de absorbancia de RNA a 260 nm equivale a 42 $\mu\text{g/ml}$ (Brown, 1991).

- **Cualitativa:** Para visualizar el DNA se realizaron geles de agarosa al 0.8 y 1.5 % en tampón TBE (Tris-HCl 89 mM pH 8.2, ácido bórico 89 mM y EDTA 2.5 mM) con bromuro de etidio a una concentración de 0.3 $\mu\text{g/ml}$. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron λ HindIII y ϕ X174 HaeIII. Las electroforesis se realizaron en TBE a un voltaje constante de 80 voltios. El DNA se visualizó con luz ultravioleta y los geles fueron fotografiados para su posterior análisis. (Andrews, 1991).

Para visualizar el RNA se realizaron geles de agarosa al 1.4% en tampón Borato (ácido bórico 50 mM, tetraborato sódico 5 mM, sulfato sódico 10 mM y EDTA 0.1 mM) con hidróxido de metilmercurio (CH_3HgOH) 5mM tratado con amberlita (Fernández-Silva y col., 1992). Las electroforesis se corrieron a un voltaje constante de 120 voltios con recircularización del tampón. El gel fue teñido mediante incubación de 20 min en una solución de acetato amónico 0.2 M con 2 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio y posteriormente lavado 2 ó 3 veces con agua destilada. El RNA se visualizó con luz ultravioleta y los geles fueron fotografiados para su

posterior análisis.

2.7. Clonaje (Thomas y Beckenbach, 1989).

Para clonar el mtDNA de trucha se eligió como vector el plásmido pUC18. Una solución que contenía 1 µg de mtDNA y 0.2 µg de pUC18 fue digerida con 1-3 unidades del enzima de restricción apropiado en un volumen final de 20 µl. Tras una incubación de 2 horas a 37°C, el enzima de restricción fue extraído con fenol. Los restos de fenol, sales y otros contaminantes fueron eliminados pasando la mezcla a través de una columna de Sephadex G-50. Se añadieron 2 µl de acetato sódico 3M pH 6.8 y 40 µl de etanol y se incubó a -70°C durante 5 min para precipitar los fragmentos de DNA resultantes de la digestión. Tras una centrifugación de 10 min a 10000 x g, el DNA fue lavado con una solución de etanol al 70% y resuspendido en 8 µl de tampón de ligamiento (Tris-HCl 30 mM pH 7.8, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM y ATP 1 mM). A continuación, se añadieron 3 unidades de T4 DNA ligasa, se incubó 3 horas a 15°C, de nuevo se añadieron 3 unidades más de T4 DNA ligasa y se dejó toda la noche a 4°C.

2.8. PCR (Saiki y col., 1988).

Las regiones del mtDNA de trucha que no pudieron ser clonadas directamente en el plásmido pUC18 fueron amplificadas mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) y a continuación clonadas en el vector pGEM-T. En cada reacción, a 47 µl de tampón de PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatina, 0.05% Nonidet P40, 0.05% Tween 20, 300 µM de cada dNTP) se añadieron sucesivamente 0.1 µg de mtDNA, 1 unidad de DNA polimerasa termoestable y 150 ng de cada uno de cebadores diseñados a partir de secuencias conocidas del mtDNA de trucha.

Con el fin de evitar la evaporación se añadió una fina capa de aceite mineral y después de un breve calentamiento de 2 min a 94 °C para desnaturalizar completamente el mtDNA, se realizaron 35 ciclos cada uno con las siguientes etapas: 1 min a 94 °C (desnaturalización), 1 min a 50 °C

(anillamiento) y 1 min a 72 °C (elongación). Finalmente se incubó la reacción a 72 °C durante 10 min con el fin de elongar cualquier producto inacabado. Los productos de PCR obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% y aquellos que presentaban el tamaño esperado fueron ligados al vector pGEM-T con el mismo protocolo utilizado en el clonaje del mtDNA.

2.9. Obtención de células competentes (Hanahan, 1983).

Los plásmidos recombinantes obtenidos en el clonaje del mtDNA y los fragmentos de PCR, fueron introducidos en la bacteria *E. coli* JM 109. Para ello, fue necesario previamente, someter a esta bacteria a un tratamiento que le hiciese ser más receptiva a la entrada del vector. Una colonia de *E. coli* JM109 fue inoculada en 5 ml de SOB (Bactotripton 2%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM y MgSO₄ 10 mM) y cultivada durante una noche a 37°C. Una alícuota con 200 µl de este cultivo fue sembrado en 10 ml de medio SOB fresco e incubado a 37°C hasta que la densidad óptica alcanzada a 550 nm fue de 0.45- 0.55 (equivalente a 4 - 7 x 10⁷ células/ ml).

Una vez enfriado el cultivo en hielo, las células fueron recogidas mediante una centrifugación de 10 min a 4500 x g. El sedimento fue resuspendido en 800 µl de tampón TFB (KCl 100 mM, MnCl · 4H₂O 45 mM, CaCl₂ · 2H₂O 10 mM, HAcOCl₃ 3 mM y K-MES 10 mM) e incubado en hielo durante 15 min. Tras una centrifugación de 10 min a 4500 x g, las células fueron resuspendidas en 200 µl de TFB. Se añadieron 7 µl de una solución DnD [90% (v / v) de dimetilsulfóxido, ditiotreitól 1M, acetato potásico 10 mM] y se incubó durante 15 min en hielo. Se repitió el tratamiento con DnD tras el cual, se considera que las bacterias han adquirido el estado de competencia.

2.10. Transformación (Hanahan, 1983).

A cada una de las reacciones de ligamiento se añadieron 50 µl de bacterias competentes y se incubó la mezcla durante 30 min en hielo. Se

sometió a un choque térmico de 90 sg a 42°C. Con el fin de posibilitar la reparación de las paredes celulares de las bacterias, estas fueron incubadas en un medio rico SOC (SOB suplementado con glucosa 20 mM) a 37°C durante 45 min. A continuación fueron sembradas en placas de LB que contenían ampicilina a una concentración final de 50 µg/ ml. Justo antes de la siembra a cada placa se le añadieron 40 µl de una solución de X-gal al 2% en dimetilformamida y 25 µl de IPTG. Las placas fueron cultivadas toda la noche a 37°C.

2.11. Análisis de recombinantes (Sambrook y col., 1989).

Las colonias recombinantes se reconocen por carecer de color azul al no poder metabolizar las bacterias que las componen el X-gal por contener un inserto en el vector pUC18. Estas colonias fueron cultivadas a pequeña escala y su DNA plasmídico extraído. Para poder ratificar la presencia de inserto en los plásmidos, se realizó una digestión de 2 horas a 37°C con el mismo enzima utilizado en el clonaje. Una electroforesis en geles de agarosa al 0.8% permitió identificar aquellos clones que contenían los insertos buscados, así como su tamaño. Estos clones fueron cultivados a gran escala y su DNA plasmídico fue extraído para ser secuenciado.

2.12. Extracción de DNA plasmídico.

- A pequeña escala (miniprep): La extracción de DNA plasmídico de los clones seleccionados se realizó de acuerdo con el método de Birboim y Doly (1979). Cada colonia fue inoculada en 5 ml de Terrific Broth (Tartof y Hobbs, 1987) y cultivada durante toda la noche a 37°C. Las células fueron recogidas mediante una centrifugación a 10000x g de 1 min y resuspendidas en 200 µl de GTE. A continuación se procedió a lisar las bacterias mediante la adición de 200 µl de una solución recién preparada de NaOH 0.2M, SDS 1%. Se mezcló por inversión para evitar la rotura del DNA plasmídico. Tras una incubación de 5 min en hielo, la lisis alcalina fue detenida mediante la adición de 200 µl de acetato potásico 3M pH 4.8. Una incubación de 15 min en hielo, consiguió precipitar los restos celulares, y el DNA cromosómico

desnaturalizado por el NaOH y una centrifugación de 5 min a 10000 x g permitió eliminar este precipitado. El sobrenadante fue sometido a una extracción fenólica para eliminar proteínas y a continuación, el DNA plasmídico fue precipitado mediante la adición de 2 volúmenes de etanol frío (a -20°C) y la incubación en hielo durante 10 min. El DNA fue recuperado mediante una centrifugación de 10 min a 10000 x g. Se lavó con 200 µl de etanol al 70% y se resuspendió en 50 µl de TE. Alícuotas de 5 µl fueron utilizados para el análisis de restricción y la secuenciación manual.

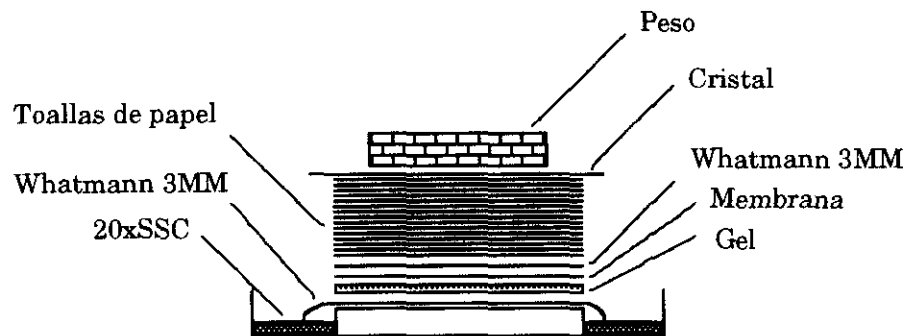
- A gran escala (midi y maxiprep): La secuenciación automática requiere DNA de gran pureza en grandes concentraciones. La forma tradicional de obtener DNA con estas características era someter el DNA extraído de cultivos de hasta 500 ml a una ultracentrifugación durante al menos 16 horas en un gradiente de cloruro de cesio. Este procedimiento altamente tedioso y caro ha sido sustituido recientemente por la aparición de columnas con matrices capaces de purificar el DNA a partir de, tan sólo, 100 ml de cultivo con una calidad similar a la obtenida por el método antiguo. En nuestro caso se utilizaron las columnas Quiagen que permiten obtener 50 µl de DNA plasmídico con concentraciones entre 1 - 4 mg/ ml libre de proteínas, DNA cromosómico, RNA y sales.

2.13. Marcaje de sondas.

Con el fin de identificar las distintas especies de mtRNA que aparecen en los geles de hidróxido de metilmercurio se realizaron hibridaciones utilizando sondas diseñadas para reconocer exclusivamente un único gen. Fragmentos de restricción con un tamaño variable entre 80 y 1500 nucleótidos fueron desnaturalizados y marcados al azar mediante incubación a 37°C con hexanucleótidos, dNTPs y [α -³²P]dCTP (3000 Ci/ mmol), en presencia del fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*. Al cabo de 1 hora, se pasaron los fragmentos marcados a través de una columna de Sephadex G-50 con el fin de eliminar los nucleótidos radioactivos no incorporados. La eficacia del marcaje se comprobó con un contador Geiger.

2.14. Transferencia a membrana e hibridación del RNA (Thomas, 1983).

La transferencia de RNA desde geles a membranas de nitrocelulosa (Northern) se realizó por capilaridad en presencia de 20xSSC (3M NaCl, 0.3M Citrato trisódico) durante 16 horas según el siguiente esquema:



No se realizó ningún tratamiento previo del gel para eliminar el hidróxido de metilmercurio. Terminada la transferencia, la membrana se dejó secar al aire y el RNA fue fijado mediante cocción a 80°C durante 2 horas dentro de una bolsa de plástico que contenía 10 ml de una solución con formamida al 50%, 5xDenharts (100xDenhardtts: 2% ficoll, 2% polivinilpirrolidona y 2% BSA), 5xSSC, 0.1% SDS y 200 µg/ml de DNA de esperma de salmón sonicado y desnaturalizado. Se selló la bolsa y se incubó a 42°C durante al menos 1 hora.

Para la hibridación, se retiró el líquido de la bolsa. Las sondas se desnaturalizaron mediante incubación durante 5 min a 100°C y posterior incubación en agua/hielo y se mezclaron con 2 ml de solución de hibridación (50% formamida, 1xDenharts, 5xSSC, 0.1% SDS y 200µg/ml de DNA de esperma de salmón). Se añadieron a la bolsa con la membrana y se incubó durante 16 horas a 42°C.

Seguidamente, el filtro fue lavado con 2xSSC, 0.1% SDS durante 15 min, primero a temperatura ambiente y después a 65°C. Finalmente, la membrana sin secar fue expuesta a una película de Rayos X a -80°C en presencia de una pantalla intensificadora y se observaron los resultados a las 2-16 horas.

2.15. Síntesis de oligonucleótidos.

La síntesis de los oligonucleótidos utilizados en la secuenciación o el PCR se realizó de manera automática en el aparato Gene Assembler Plus de Pharmacia Biotech. El proceso está basado en la reacción de condensación entre el grupo hidroxilo en posición 5' de un nucleótido y el fosfato en posición 3' de otro. Con el fin de evitar que los grupos hidroxilo del agua compitan con los del azúcar, el acoplamiento se realiza en condiciones de absoluta ausencia de agua en disolventes orgánicos, normalmente acetonitrilo.

Sin embargo, los nucleótidos son extremadamente hidrofílicos y, por tanto, insolubles en acetonitrilo. La protección de los sitios reactivos de los nucleótidos con grupos hidrofóbicos elimina este problema. El hidroxilo en posición 5' es protegido con 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr). Los grupos amino primarios de las bases nitrogenadas son protegidos transformándolos en grupos amida. El hidroxilo del grupo fosfato es protegido usando β -cianoetilo. Un nucleótido completamente protegido se denomina amidita.

La síntesis automática consiste en ciclos de desprotección-condensación de los nucleótidos a partir de la primera amidita que se encuentra unida a un soporte sólido. Una vez sintetizado el oligonucleótido, se produce la desprotección final y la separación del soporte mediante una incubación en amoniaco. Finalmente, el oligonucleótido es purificado mediante cromatografía en Sephadex G-25.

2.16. Secuenciación manual (Tabor y Richardson, 1987).

El método más empleado para secuenciar el DNA se basa en la imposibilidad por parte de las DNA polimerasas de elongar una cadena de DNA en la que se hayan incorporado 2', 3' didesoxinucleótidos (Sanger y col., 1977). La región de DNA que se secuencia viene determinada por el cebador elegido. Todas las cadenas nacientes de DNA se originan a partir de este cebador, generándose fragmentos que difieren en una base y pueden ser separados en un gel e identificados por el ddNTP terminal. Aunque

originalmente se utilizó el fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*, en la actualidad ha sido sustituida por la DNA polimerasa del fago T7 por tener una mayor procesividad y una menor actividad exonucleasa. Dada la capacidad de este enzima por incorporar ddNTPs con la misma facilidad que dNTPs, se hace necesario en la práctica dividir las reacciones de secuenciación en dos etapas, una de marcaje y extensión, sin ddNTPs y otra de terminación en presencia de los ddNTPs.

En la secuenciación manual se puede utilizar indistintamente DNA procedente de "mini" o "midipreps". Normalmente, se parte de 1.5 -2 µg de DNA en un volumen de 10 µl. Se añade NaOH hasta una concentración final de 400 mM y se incuba durante 10 min a temperatura ambiente para desnaturalizar el DNA. Se neutraliza la reacción con 0.1 volúmenes de acetato sódico 3M (pH 4.8) y se precipita el DNA con 2.5 volúmenes de etanol durante 15 min a -70°C. Tras el lavado con etanol al 70% se seca el sedimento al vacío y se resuspende en 10 µl de agua (Hattori y Sakaki, 1985).

A continuación, se añaden 8 ng del cebador apropiado y se realiza su anillamiento al DNA mediante una incubación de 20 min a 37°C y de 10 min a temperatura ambiente. La reacción de marcaje se realiza mediante una incubación de 5 min a temperatura ambiente de la solución de DNA en presencia de dNTPs, T7 DNA polimerasa y 10 µCi de ³⁵S - dCTP. Finalmente, el producto de esta reacción es añadido a cuatro mezclas que contienen los cuatro dNTPs y uno de los ddNTPs. Se incuba 5 min a 37°C y se detiene la reacción adicionando formamida.

2.17. Secuenciación automática (Ansorge y col., 1987)

Al igual que la secuenciación manual, la secuenciación automática está basada en el método de Sanger (1977). En este caso, un oligonucleótido marcado en su extremo 5' con fluoresceína es elongado por la T7 DNA polimerasa en cuatro reacciones independientes cada una en presencia de un 2', 3' didesoxinucleótido diferente (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP). Las reacciones son cargadas en un gel de poliacrilamida al 6%, urea 7M. Durante la electroforesis, las bandas de DNA migran por el gel y emiten

fluorescencia al ser excitadas por un rayo laser colocado en sentido perpendicular al gel. La fluorescencia emitida es detectada por fotodetectores localizados detras del gel y a continuación digitalizada y procesada por un ordenador (Fig. 20).

2.18. Análisis de secuencias.

El análisis de la secuencia correspondiente al mtDNA de trucha fue realizado con el paquete de programas GCG de la Universidad de Wisconsin (Deveraux y col., 1984) en los ordenadores Vax del CNB (Centro Nacional de Biotecnología) y el CBM (Centro de Biología Molecular).

Las secuencias fueron introducidas y editadas con el programa **SeqEd**. La identificación de los genes se realizó con los programa **Map** y **Translate**. Los sitios de restricción fueron localizados con el programa **Map**. La composición en bases y el uso de codones del mtDNA se obtuvieron con los programas **Composition** y **Codon Frequency** respectivamente.

En la búsqueda y obtención de secuencias en los bancos de datos se manejaron los programas **StringSearch** y **Fetch**. El alineamiento de secuencias se realizó con el programa **Gap** que utiliza el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970). El programa **FastA** (Pearson y Lipman, 1988) se utilizó para realizar las búsquedas por similitud de secuencia en los bancos de datos GenBank, EMBL y SwissProt.

Los árboles filogenéticos fueron generados con el programa **PileUp** del paquete GCG y los programas **Phylip** (Felsenstein, 1989) y **Clustal V** (Higgins y Sharp, 1989) que tienen implementados los algoritmos de los métodos de máxima parsimonia, unión por vecindad y máxima probabilidad.

Finalmente, el programa **MacMolly** (Soft Gene, Berlin) fue utilizado para establecer posibles modelos de plegamiento de proteínas.

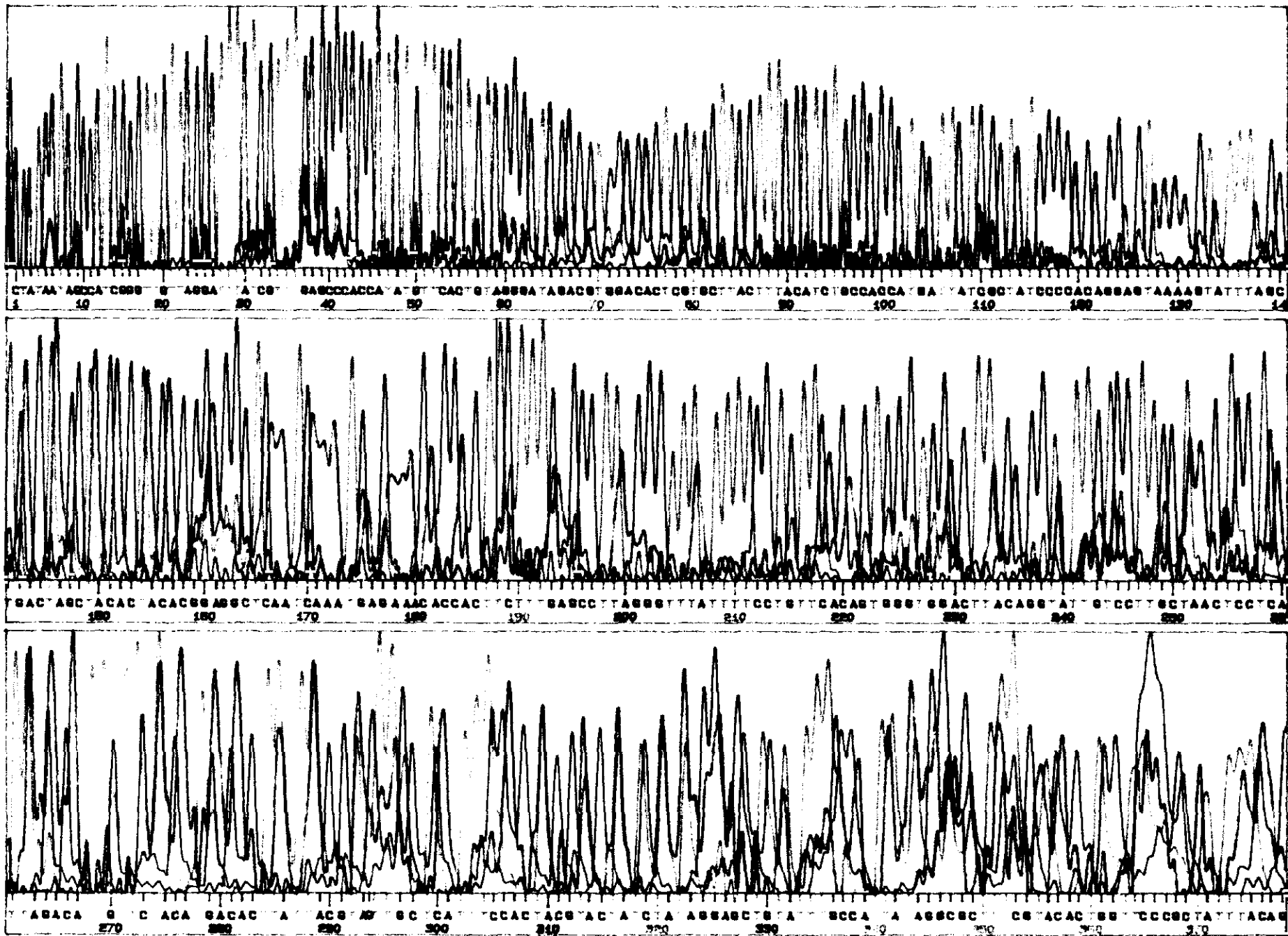


Figura 20. Carta de secuenciación automática. Cada pico equivale a un nucleótido del DNA secuenciado. Las adeninas están dibujadas en color verde, las citosinas en color azul, las guaninas en color rojo y las timinas en color amarillo. La secuencia representada se localiza entre las posiciones 7294 y 7671 del mtDNA de trucha arco iris.

RESULTADOS

1. EXTRACCION DEL mtDNA DE TRUCHA ARCO IRIS.

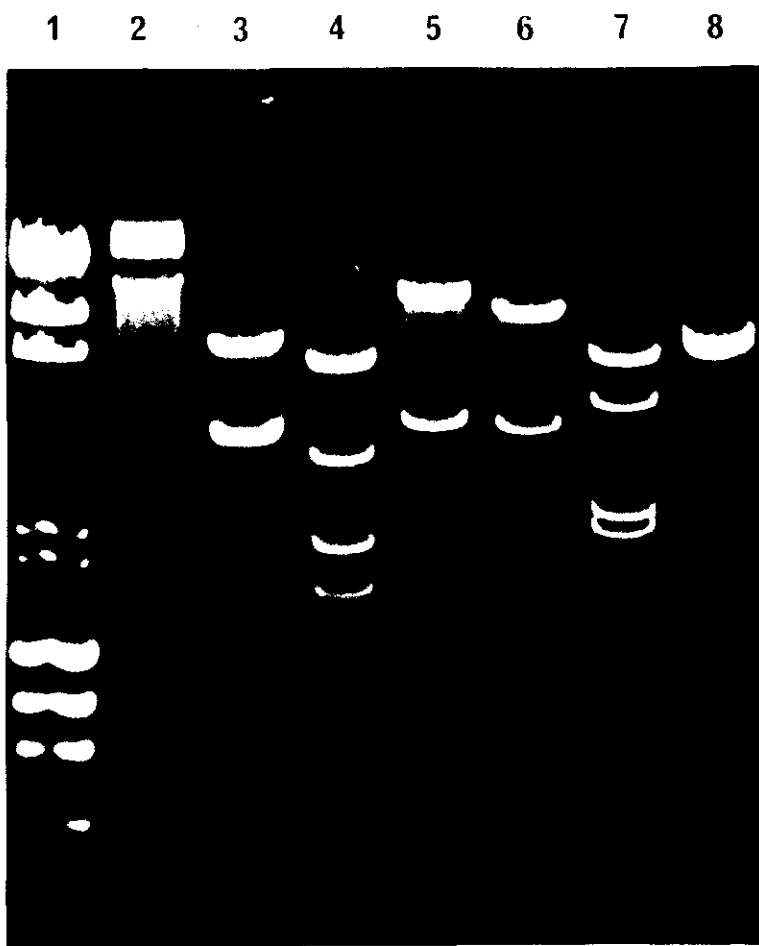
Con el objeto de clonar y secuenciar el mtDNA de la trucha arco iris se extrajeron los hígados de varios ejemplares adultos de esta especie. Debido a lo laborioso del proceso, no se pudo extraer inmediatamente el mtDNA de todos ellos por lo que algunos fueron guardados 16 horas a 4°C antes de ser utilizados. A partir de estos hígados se obtuvieron las mitocondrias por centrifugación diferencial (Lansman y col., 1981) y el mtDNA por el método de lisis alcalina (Palva y Palva, 1985). No se apreciaron diferencias significativas en el rendimiento de extracción, tanto de las mitocondrias como del mtDNA, según el hígado fuese reciente o conservado a 4°C.

Las truchas de 200-400 gr de peso poseían un hígado de aproximadamente 4 gr, del que normalmente se extrajeron entre 5 y 10 µg de mtDNA. Al analizar electroforéticamente sobre geles de agarosa al 0.8% una muestra de este mtDNA, se observó que apenas estaba contaminado con DNA nuclear y que el tratamiento con RNasa había sido efectivo ya que no se observó presencia de RNA (Fig. 21).

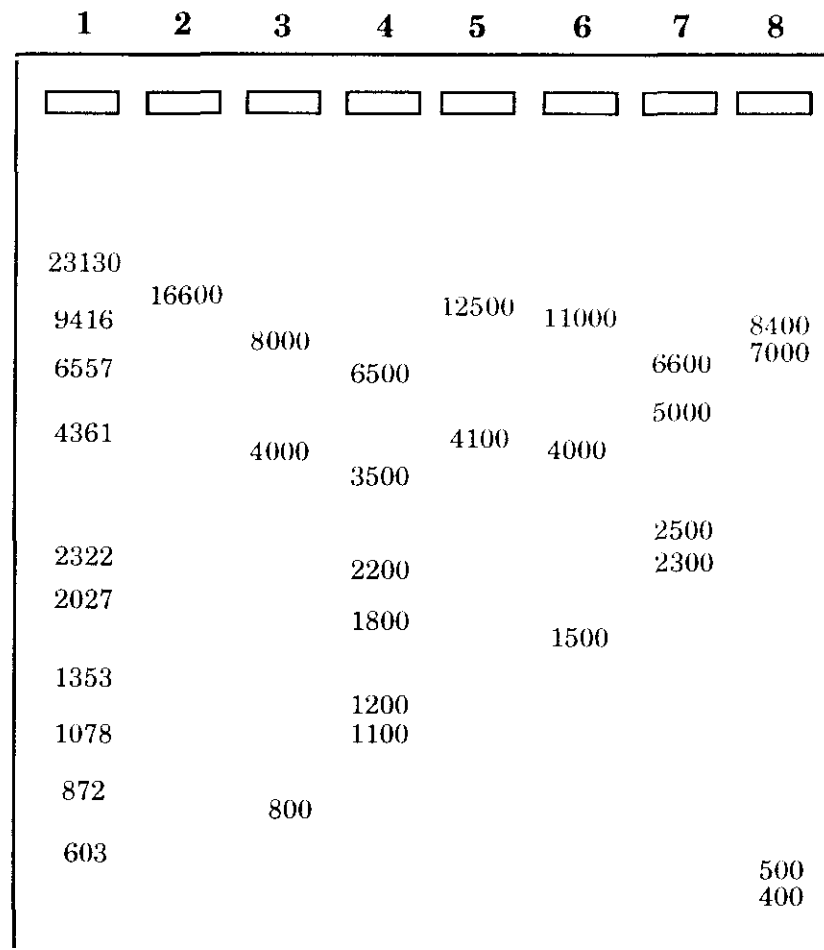
2. MAPA DE RESTRICCION DEL mtDNA DE TRUCHA ARCO IRIS.

El mtDNA de trucha fue digerido con enzimas de restricción (EcoRI, HindIII, PstI, BamHI, ApaI, NruI y PvuII) que reconocen dianas de seis nucleótidos. De esta forma, se obtienen fragmentos de un tamaño adecuado para su posterior clonación y se favorece la elaboración del mapa de restricción. Los fragmentos obtenidos fueron analizados en geles de agarosa al 0.8% (Fig. 21a) y sus tamaños relativos se indican en la Fig 21b. Puesto que la suma de los fragmentos generados por las distintas enzimas era de aproximadamente 16 kb, y sin embargo, la suma de los fragmentos EcoRI era de sólo 12.8 kb, se pensó en la existencia de dos fragmentos de 4 kb en lugar de uno en el corte EcoRI. Este hecho se pudo confirmar, como veremos, posteriormente.

Para completar el análisis de restricción, se realizaron dobles cortes con las mismas enzimas y, con los datos obtenidos, se elaboró un mapa de



a



b

Figura 21. Análisis de restricción del mtDNA de trucha arco iris. a) Migración en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio. b) Tamaño relativo de los fragmentos. Los marcadores utilizados son HindIII y ØX174 Hae III (1). El mtDNA fue digerido con: Nru I (2), EcoRI (3), HindIII (4), BamHI (5), PstI (6), PvuII (7) y ApaI (8).

restricción aproximado del mtDNA de trucha arco iris (Fig. 22).

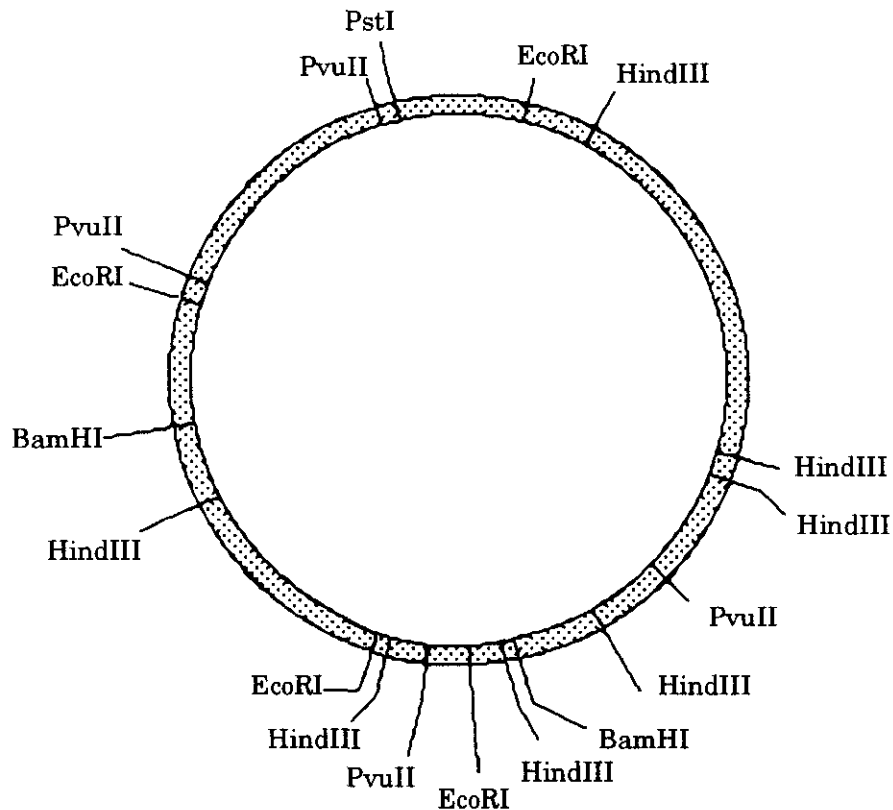


Figura 22. Mapa de restricción del mtDNA de trucha arco iris. Se señala únicamente la posición de las enzimas utilizadas en el clonaje del mtDNA.

3. GENOTECAS EcoRI, HindIII Y PvuII DEL mtDNA DE TRUCHA. ESTRATEGIA DE CLONAJE.

Entre los diferentes patrones de restricción obtenidos se eligieron para realizar la clonación del mtDNA los producidos por EcoRI, HindIII y PvuII, por ser estas enzimas las más eficientes en cuanto a la digestión y por producir fragmentos de restricción con un tamaño más adecuado para su inserción en pUC18 (0.5 - 9 kb).

En el método empleado, la eficiencia de clonaje de los fragmentos pequeños es mucho mayor que la de los grandes y por ello se necesita analizar un gran número de recombinantes. En el caso de la genoteca EcoRI, se analizaron 40 posibles recombinantes. De ellos, 34 contenían

como inserto el fragmento de 0.8 kb, 4 contenían un fragmento de 4 kb y 2 carecían de inserto alguno. Con el fin de conocer cuantos tipos de inserto contenían los clones con un fragmento de 4 kb, se realizó un pequeño análisis de restricción. Los cuatro clones tenían un mismo fragmento, que contenía en su secuencia una diana para PstI, pero no para HindIII o BamHI.

En el caso de la genoteca HindIII, se analizaron 30 posibles recombinantes. Cinco contenían el inserto de 1.1 kb, doce contenían el de 1.2 kb, uno el de 2.2 kb y otro el de 3.5 kb. Además, cinco clones contenían un inserto de 0.25 kb y cuatro no contenían inserto alguno. No se encontraron clones con los fragmentos de 6.5 y 1.7 kb. Dado que el fragmento de 4 kb de la genoteca EcoRI no contenía dianas para HindIII, éste sólo podía estar localizado dentro del fragmento HindIII de 6.5 kb, lo cual implicaba que la combinación de las genotecas HindIII y EcoRI comprendía, aproximadamente, un 75% (12.25 kb) del mtDNA de trucha.

De la genoteca PvuII, se obtuvieron dos clones con los fragmentos de 2.3 y 2.5 kb insertados. El fragmento de 2.3 kb se localizó en el mapa de restricción dentro del fragmento EcoRI de 4 kb ya clonado, por lo que se utilizó como subclon de secuenciación de dicho fragmento. El fragmento de 2.5 kb comprendía el fragmento HindIII de 1.1 kb completo y parte de los fragmentos HindIII de 1.2 y 1.7 kb, lo que, posteriormente, permitió secuenciar parcialmente el fragmento HindIII de 1.7 kb.

El resto del mtDNA de trucha arco iris fue clonado con diferentes estrategias. Primeramente, se realizaron diversas genotecas con cortes de restricción dobles. Aunque la mayoría de los clones procedentes de estas genotecas contenían fragmentos ya clonados, aparecieron dos nuevos clones que contenían un fragmento HindIII-EcoRI de 0.5 kb y un fragmento EcoRI-BamHI de 1 kb. A continuación, se clonó el fragmento HindIII de 1.7 kb mediante electroelución específica del fragmento de un gel de agarosa y posterior ligamiento al vector. Se pudo comprobar que los clones que contenían el fragmento como inserto, tenían un número muy bajo de copias del plásmido, lo cual explicaba la dificultad para clonar el fragmento de 1.7 kb directamente de la genoteca HindIII. Finalmente, el clonaje del mtDNA de trucha arco iris se completó con la amplificación mediante PCR y

posterior clonación en el plásmido pGEM-T de un fragmento HindIII-BamHI de 0.7 kb. El resumen gráfico de la clonación del mtDNA de trucha arco iris se muestra en la Figura 23.

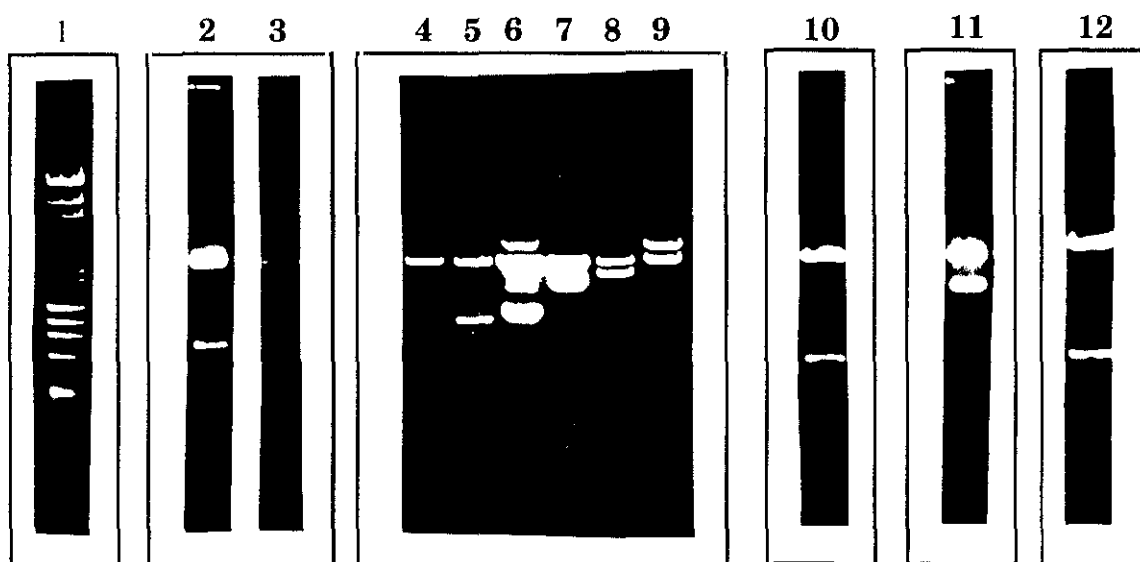


Figura 23. Clonación del mtDNA de trucha arco iris. Electroforesis en geles de agarosa al 0.8% de los clones que contienen el mtDNA de trucha arco iris. La digestión con la enzima apropiada del plásmido recombinante, permite extraer el inserto. Los marcadores utilizados son: λ HindIII y ØX174 haeIII (1). Los fragmentos clonados con EcoRI tienen un tamaño de 0.8 (2) y 4 kb (3). Los fragmentos clonados con HindIII tienen 0.25 (4), 1.1 (5), 1.2 (6), 1.8 (7), 2.2 (8) y 3.5 kb (9). El fragmento HindIII-EcoRI tiene 0.5 kb (10). El fragmento EcoRI-BamHI tiene 1.3 kb (11) y el fragmento HindIII-BamHI tiene 0.7 kb (12). Los vectores pUC18 y pGEM-T tienen un tamaño de 2.8 y 3 kb respectivamente.

4. SECUENCIA DEL mtDNA DE TRUCHA ARCO IRIS.

Para secuenciar por completo el mtDNA de trucha arco iris se utilizaron, en total, 15 clones (Tabla II). Los clones fueron secuenciados en ambas direcciones (Fig. 24). Primeramente, cada clon se secuenció con dos oligonucleótidos universales que reconocían específicamente los extremos

Clon	Vector	Fragmento de restricción	Tamaño (nt)
pTRZ-0	pUC 18	EcoRI-HindIII	643
pTRZ-11	pUC 18	HindIII	244
pTRZ-12	pUC 18	HindIII	1121
pTRZ-13	pUC 18	HindIII	1225
pTRZ-14	pUC 18	HindIII	1792
pTRZ-15	pUC 18	HindIII	2209
pTRZ-16	pUC 18	HindIII	3463
pTRZ-2	pUC 18	EcoRI	4035
pTRZ-2a	pUC 18	EcoRI-PstI	2751
pTRZ-2b	pUC 18	PstI-EcoRI	1284
pTRZ-2c	pUC 18	PvuII	2386
pTRZ- 3	pUC 18	EcoRI	762
pTRZ- 4	pUC 18	PvuII	2596
pTRZ- 5	pUC 18	BamHI-EcoRI	1229
pTRZ- 6	pGEM-T	HindIII-BamHI	699

Tabla II. Clones empleados en la secuenciación del mtDNA de trucha arco iris. Como vector de clonaje se utilizó el pUC 18, excepto en el caso del clon pTRZ-6 que proviene del clonaje de un producto de PCR. De los 15 clones indicados, sólo pTRZ-2a, pTRZ-2b y pTRZ-2c son subclones. El resto de los clones cubren por completo el mtDNA de trucha.

del polilinker de vectores derivados del fago M13 mp18 como son el pUC18 y el pGEM-T. Estos oligonucleótidos permitieron la secuenciación completa de los clones pequeños (< 800 pb), sin embargo, los clones de mayor tamaño (1000 - 3500 pb), necesitaron del diseño y síntesis de oligonucleótidos específicos para poder avanzar en la lectura de su secuencia. En total se utilizaron 31 oligonucleótidos específicos.

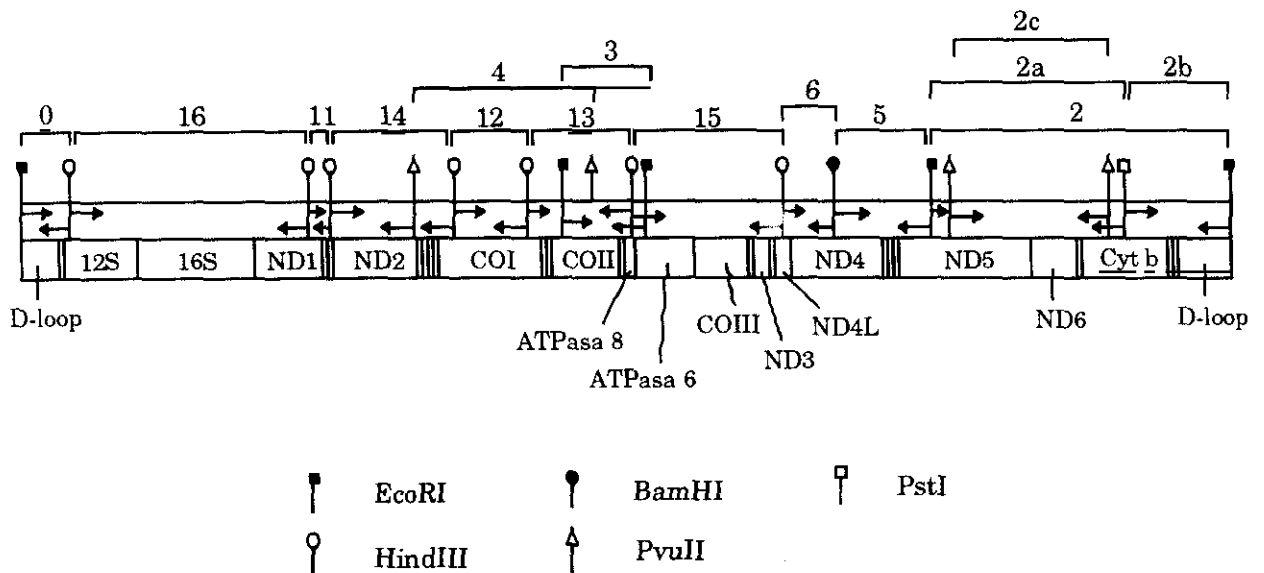


Figura 24. Estrategia de secuenciación del mtDNA de trucha arco iris.

De la parte superior a la inferior de la figura se indican: los clones empleados para obtener la secuencia del mtDNA de trucha arco iris, las dianas de restricción utilizadas en el clonaje y, la posición de la región de control y los diferentes genes mitocondriales. Las flechas muestran el sentido de la secuenciación.

Las secuencias obtenidas a partir de cada clon fueron combinadas para originar una secuencia consenso con una longitud final de 16660 pb, que cubre la totalidad de la molécula del mtDNA de trucha arco iris (Fig. 25). En esta figura, la secuencia presentada, está orientada en sentido 5' - 3' y corresponde a la cadena ligera (L) del mtDNA. La posición 1 de la secuencia se corresponde con el primer nucleótido del D-loop. Los marcos de lectura abierta (ORFs) están traducidos, indicándose los aminoácidos, en código de una letra, encima del primer nucleótido de cada triplete codificante. Los tRNAs se indican mediante una caja. La composición en bases de la cadena L fue: A: 27.9%; C: 28.9%; G: 17% y T: 26.2%.

D-loop -->

1 AC GGCTACAGCTATGTACAACGTAAATGTTATAACTTGTAAACCAATGTTATACTACATCTATGTATAATATTACATATTATGTATTTACCCATATAT 100

101 AATACTGCTGTGAGTAGTACATTATATGTATTATCAACATACGGTGATTTTTAACCCCTCATACATCAGCACAAATCCAAGGTTTACATTAAGCCAAAC 200

201 ACGTGATAATAACCAACTAAGTGTGTTTAACTGATTAATTGCTATATCAATAAACTCCAATTAACACGGGCTCCGCTTTACCCACCAACTTTCAGCA 300

301 TCAGTCCGGCTTAATGTAGTAAGAACCACCAACGATTTATCGGTAGGCATACCTCTATTGATGGTCAGGGGCAGATATCGTATTAGGTCGCATCTCGTG 400

401 AATTATTCCTGGCATTGGTTCTAAGTCAAGGGCTATCCTTAAGAAACCAGCCCCTGAAAGCCGAATGTAAAGCATCTGGTTAATGGTGTCAATCTTAT 500

501 TGCCCGTTACCCACCAAGCCGGGCTTCTCTTATATGCATAGGGTCTCTTTTTTTTTCTTTTCTTTCCAGCTTGCATATACAAGTGAAGCAAAGAAG 600

601 TCTAACAGGTGCAACTAGATCTTGAATCCAGAGAACCATGTATCATGGTGAATGATTTCTATAAAGAATCACATACTTGGATATCAAGTGCATAA 700

701 GGTCAATTATTTTCTTACAGATACCTAAGATCGCTCCCGGCTTTTGC GCGTAAACCCCTACCCCTAAGCTGAAAGATCCTTATGTTCTCTGTAA 800

801 ACCCTAAACCAGGAAGTCTCAAACTCAGCAATATTTTTTATACATTAATAAACTTTTATGCATTTAGCATTGGCACCAGACGCGCTGTAATGCGTA 900

901 CACTTCCATAAATAAGTATACATTAATAAACTTTTCGATCCACTTTGTAGCACCTAGCACCAACAACGCTGTTATCAATGCCATTTCCAGCACAGCCC 1000

1001 GCTGACGTAGCTTAACTAAAGCATAACACTGAAGCTGTTAAGACGGACCCCTAGAAGTCCCGTAGCC 12S rRNA --> CA AAGGCTTGGTCTGACTTTACTATCAG 1100

1101 CTCTAACTGAACTTACACATGCAAGTCTCCGATTCCTGTGAGGATGCCCTTAATCCCTGCCGGGACGAGGAGCCGGCATCAGGCACGCCAGGCAGC 1200

1201 CCACGACGCCCTTGCTAAGCCACACCCCAAGGAACTCAGCAGTGATAAATATTAAGCCATAAGCGAAAGCTTGACTTAGTAAAGTTAAGAGGGCCGGT 1300

1301 AAAACTCGTGCCAGCCACCGCGTTATACGAGAGACCTAGTTGATAACTACCGGCGTAAAGAGTGGTTATGGAATAATTTAATAAAGCCGAACACCC 1400

1401 CTCAGCCGTCATACGCACCTGGGAGCACGAAGACCTACTGCGAAAGCAGCGTTAACTATGCCTGACCCACGACAGCTAAGAAACAACTGGGATTAGA 1500

1501 TACCCACTATGCCTAGCCGTAACCTTGATAGAAATACAATTGATATCCGCGAGGAACTACAAGCGCCAGCTTAAACCCAAAGGACTTGGCGGTGC 1600

1601 CTCAGACCCACCTAGAGGAGCCTGTCTAGAACCGATAACCCCGTTCAACCTCACACCCCTGTTTTACCCGCTATATACCACCGTCGCAGCTTAC 1700

1701 CCTGTGAAGGCCCATAGTAGCAAATGGGCAAAACCAAACGTCAGGTCGAGGTGTAGCGCATGAGGTGGGAAGAAATGGGCTACATCTCTAAATTAG 1800

1801 AGCACTACGAACCACGCTGTGAAATCAGCGTCCGAAGGTGAAATTTAGCAGTAACAGAAACAGAGAGTCTCTTGAACCTGGCTCTGAGGCGCCGACA 1900

1901 CACCGCCCGTCACTCTCCCAAGTTCACCTGTCTTCTAACTAAGAAGTTAACCGAACAAAGGGGAGGCAAGTGTAAACATGGTAAGTGTACCGGAAGG 2000

2001 TGGCCTGGAATAAC CAGAGTGTAGCTAAAATAGGAAAGCACCTCCCTTACACCGAGAAGACATCCGTGCAAAATCGGGTCACCCCTGA 16S rRNA --> AGCTGACTAGCTAG 2100

2101 CCAACATATTTGGTCCAACACCACAACATACATACCCCAATAAACTTAGAATTAAGTCAACAAACCATTTTCCACCTTAGTAGGGGGCAGCCGAAAGG 2200

2201 AGATAATTGAGCAACAGAAAAAGTACCGCAAGGGGAGCTGAAAGAGAATTGAAATAACCCATTTAAGCCTAGAGAAGCAGAGATTAATCTCGTACCTT 2300

2301 TTGCATCATGATTTAGCCAGCACACCTGAGCAAAGAGAAGCTTTAGTTTAGGCCCCGAAACTAGACGAGCTACTCCGGACAGCCTATTGTAGGGCCAAC 2400

2401 CCGTCTCTGTGGCAAAAGAGTGGGACGAGCCCCGAGTAGAGGTGATAACCTATCGAGCCTAGTTATAGCTGGTTGCTTAGGAAATGAATAGAAGTTCAG 2500

2501 CCCCCGGCTTCTTAGGACCTTAAGGTAATAATTTGTCCCAAGAAACCAGGAGAGTTAGTCAAAGGAGGTACAGCTCCTTTGAACAAGGACACA 2600

2601 ACCTTAACAGGCGGCTAAGGATCATAGTTCCAAGTAACTGTTACAGTGGGCTAAGAGCAGCCACCTGCACAGAAAGCCTTAAAGCTCAGACAGATAC 2700

2701 AAACCTCTTATCCTGATAAGAAATCCCACCCCTAACCCTACTAAGCCGTTCCATGCCCCATGGAAGAGATTATGCTAGAATGAGTAATAAGAGAGTA 2800

2801 CAACTCTCTCCAGCACATGTGAAGTGGACCGGACCCCCACCAGCAATAACGAACCCAAACCAAGAGGAACTGTAGGCCAGAACAAACCAAGA 2900

2901 AAAACCTACCAACAAATCGTTACCCACACAGGAGTGCCCAAGGGAAAGACCCAAAGGAAGAGAAGGAACTCGGCAACACAAGCCTCGCCTGTTT 3000

3001 ACCAAAAACATCGCCTCTTGCAAAATCAAACATAGAGGTCGGCTGCCCTGTGACTATGGGTTAACGGCCGGGTATTTGACCGTGCAGAGGTAGCGC 3100

3101 AATCACTTGTCTTTAATGAAGACCTGTATGAATGGCATCACGAGGGCTTAGCTGTCTCTTCCAAGTCAATGAAATTGATCTGCCCGTGCAGAAGC 3200

3201 GGACATAAGCACATAAGACGAGAAGACCTATGGAGCTTAGACACCAGGCAGATCACGTCAAGCAACCTTGAATTAACAAGTAAAAACGCAGTAGACCC 3300

3301 CTAGCCCATATGTCTTTGGTTGGGGCGACCCGGGGGGAAATTAAGCCCACTGTGGACTGGGGGCCTGCCACCAGCCGAGAGCTACAGCTCTA 3400

Figura 25. Secuencia completa del DNA mitocondrial de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). Secuencia correspondiente a la cadena ligera orientada en sentido 5'->3'. La posición 1 de la secuencia se corresponde con el primer nucleótido del D-loop. Los tRNAs se indican mediante una caja. Así mismo, los genes codificantes de proteínas presentan encima del primer nucleótido de cada codón el correspondiente aminoácido. Los codones de terminación son señalados con un asterisco. El sentido de lectura de cada gen es expresado mediante una flecha con su correspondiente nombre, al inicio de su marco de lectura.

T I N T L A T S W T K S P T L A A L T A L V L L S L G G L P P L S
 5701 AACCATCAATACTCTGCAACTTCATGAACAAATCCCCGACCCTGCCGCATTAACCGCTCTGTATTATTGTCCTTGGAGGTCTCCCCCTCTCTCA 5800
 G F M P K W L I L Q E L T K Q G L P L S A T L A A M T A L L S L Y F
 5801 GGCTTTATACCAAATGACTTATTTGCAAGAACTAACGAAACAGGGACTCCCACTATCTGCCACACTAGCTGCTATAACAGCCCTCTAAGCCCTTACT 5900
 Y L R L C Y A L T L T I Y P N T L T A T A P W R L N F T M I T L P
 5901 TTTATCTACGACTCTGCTACGCCCTAACCTCACTATTTATCCCAACACCTAACTGCTACTGCCCATGACGCTCAACTTTACCATAATTACCCTACC 6000
 L S I T T I M A L G L L P L T P A V T A M L A L * tRNA-Trp -->
 6001 CCTTTCATTACTACTATTATAGCCCTAGGACTACTACCCCTCACACCAGCTGTGACTGCGATATTAGCTTTGTAATAAGGGCTTAGGATAGTACTTAGA 6100
 CCAAGAGCCTTCAAAGCTCAAACGGGGTGAAATCCCCAGCCCTTGTAAAGACTTGCAAGACTTTATCCCAACATCTTCTGAATGCAACCCAGACACTTT
 6101 <-- tRNA-Ala <-- tRNA-Asn#----->
 6201 AATTAAGCTAAGCCTTCTAGGTGGGAAGCCCTCGATCTACAACCTCTAGTTAACAGCTAAGCGCTCTATCCAGCGAGCATCCATCTACTTTCCCC 6200
 --- Ori L -----# <-- tRNA-Cys
 6301 GCCCCCGGGGGGGAGCGAGGCGGGGAAGCCCGGCAGGCTATTAGCCTACTTCTTCAGATTGCAATCTAACGTTGGTACACCACAGGGCTTGATA 6300
 CO I -->
 6401 <-- tRNA-Tyr M A I T R W F F S T N
 AGGAGAGGAGTCAAACCTCTGTTTATGGAGCTACAATCCACCGCTTAAGCTCTCAGCCACCCATCTGTGGCAATCACAGGATGATTTTCTCAACCAAC 6400
 H K D I G T L Y L V F G A W A G M V G T A L S L L I R A E L S Q P G
 6501 CACAAAGACATTGGCACCCCTCTATTAGTATTTGGTGCCTGAGCCGGGATAGTAGGCCACCGCCCTGAGTCTACTGATTGCGGCGGAAGTAAAGCCAGCCGG 6600
 A L L G D D Q I Y N V I V T A H A F V M I F F M V M P I M I G G F
 6601 GCGCTCTCTGGGGGATGACCAAATCTATAACGTGATCGTCACAGCCCATGCCTTCGTTATGATTTTCTTTATAGTCATGCCAATTATAATCGGGGGCTT 6700
 G N W L I P L M I G A P D M A F P R M N N M S F W L L P P S F L L
 6701 TGGAAACTGATTAATCCCTAATAATCGGAGCCCTGATATGGCATTCCCTCGAATAAATAACATAAGCTTCTGACTCCTTCTCCATCCTTTCTCCTC 6800
 L L S S S G V E A G A G T G W T V Y P P L A G N L A H A G A S V D L
 6801 CTCTGTCTTCATCAGGAGTTGAAGCCGGCGGGTACTGGATGAACAGTATACCCCCCTAGCCGCAACCTCGCCACCGCAGGAGCCTCTGTTGATT 6900
 T I F S L H L A G I S S I L G A I N F I T T I I N M K P P A I S Q
 6901 TAACATCTCTCCCTTCATTTAGCTGGAATCTCCTCAATTTAGGAGCCATTAATTTTATTACGACCATTATTAACATAAAACCTCCAGCCATCTCTCA 7000
 Y Q T P L F V W A V L V T A V L L L L S L P V L A A G I T M L L T
 7001 GTACCAAAACCCCTATTCGTTTGAGCCGTGCTAGTACTGCTGTCTTCTGTTACTTTCCCTCCCCGCTCCTGGCAGCAGGCATTACTATGTTACTTACA 7100
 D R N L N T T F F D P A G G G D P I L Y Q H L F W F F S H P E V Y I
 7101 GACCGAAATCTAAACACCACTTTCTTTGACCCGGCAGGCGGGGAGATCCAATTTTATACCAACACCTCTTTGATTCTTCAGCCACCCAGAGGTCTATA 7200
 L I L P G F G M I S H I V A Y Y S G K K E P F G Y M G M V W A M M
 7201 TTCTCATCCTCCAGGCTTTGGTATAATTTACACATCGTTCGCTACTCTCCGGCAAAAGGAACCCCTTCGGGTATATAGGAATGGTCTGAGCTATAAT 7300
 A I G L L G F I V W A H H M F T V G M D V D T R A Y F T S A T M I
 7301 AGCCATCGGGTGTAGGATTTATCGTTGAGCCACCATATGTTCACTGTAGGGATAGCCTGGACACTCGTCTTACTTTACATCTGCCACCATGATT 7400
 I A I P T G V K V F S W L A T L H G G S I K W E T P L L W A L G F I
 7401 ATCGCTATCCCCACAGGAGTAAAGTATTTAGCTGACTAGCTACACTACCGGAGGCTCAATCAAATGAGAAACACCACTTCTTTGAGCCTTAGGGTTA 7500
 F L F T V G G L T G I V L A N S S L D I V L H D T Y Y V V A H F H
 7501 TTTTCTGTTACAGTGGGTGGACTTACAGGTATTGCTTGTCACTCCTCATTAGACATTGTTCTACATGACACTATTACGTAGTGTCTCATTTCCA 7600
 Y V L S M G A V F A I M G A F V H W F P L F T G Y T L H S T W T K
 7601 CTACGTAATCTATAGGAGCTGATTTGCCATTATAGCGCTTTCGTACACTGGTCCCGCTATTTACAGGGTACACCCTCCACAGCATGAACCAAA 7700
 I H F G I M F I G V N L T F F P Q H F L G L A G M P R R Y S D Y P D
 7701 ATCCATTTTGAATATATTTATCGGTGTAATTTAACCTTTTTCCACAGCATTTCTAGGCTCGCAGGGATACCACGAGGTACTCTGATTACCCAG 7800
 A Y T L W N T V S S I G S L V S L V A V I M F L F I L W E A F A A
 7801 ACGCCTATACACTGTGAAACACTGTATCCTCAATCGGATCCCTGTATCCCTAGTAGCTGTAATTTATGTTCTATTATTCTTTGAGAAGCTTTTGCTGC 7900
 K R E V A S I E L T S T N V E W L H G C P P P Y H T F E E P A F V
 7901 CAAACGAGAGGTAGCATCAATCGAACTAACTTCAACAAACGTAGAATGACTACACGGATGCCCCCAACCTACCACACATTTGAAGAACCAGCATTTGTC 8000

Figura 25. Secuencia completa del DNA mitocondrial de trucha arco iris (cont.)

Q V Q A N * <-- tRNA-Ser(UCN) tRNA-
 CAAGTACAAGCAAACAACGAGAAAGGGAGGAATTGAACCCCATGTGCTGGTTTCAAGCCAACCGCATAACCACTCTGCCACTTCTTCTATAAGACAC
 8001 COII --> 8100
 Asp --> M A H P S Q L
 8101 TAGTAAACTAGTCTATTACACTGCCTGGTCAAGGCAAAATTGTGGGTTAAACCCCGGTGTCTTAAGCCTTAGCTAGAATGGCACATCCCTCACAAC
 8200 G F Q D A A S P V M E E L L H F H D H A L M I V L L I S T L V L Y . 8200
 AGGATCCAAGACGCGGCTCCCTGTAATAGAAGAACTCTTCATTTCCACGACCACGCTCTTATGATTGTTCTTCTATCAGCACACTAGTCTTTAT
 8300 I I V A M V S T K L T N M Y I L D S Q E I E I V W T V L P A V I L I . 8300
 ATCATCGTAGCAATAGTCTCTACTAACTTACTAATATGTATATCCTTGATTCTCAAGAAATCGAGATCGTTGGACTGTCTCCAGCAGTTATCCCTTA
 8400 L I A L P S L R I L Y L M D E I N D P H L T I K A M G H Q W Y W S . 8400
 TTCTCATCGCTCTCCCTCCGAAATCTCTATCTTATGGACGAAATTAACGACCCCACTTACTATTAAGCAATAGGCCACCAATGATATTGAAG
 8500 Y E Y T D Y E D L G F D S Y M V P T Q D L V P G Q F R L L E T D H . 8500
 CTATGAATATACCGACTACGAAGATTTAGGCTTTGACTCTTACATAGTCCCACTCAAGATTTAGTGCCAGGCAATCCGCTCTTAGAGACAGATCAT
 8600 R M V V P V E S P I R V L V S A E D V L H S W A V P S L G V K M D A . 8600
 CGAATAGTTGCTCCCTGTAGAATCCCAATCCGAGTTCCTGCTCAGCTGAAGACGCTCTTCACTCCTGAGCCGTTCTTCTTAGGTGTAAGATAGAGC
 8700 V P G R L N Q T A F I A S R P G V F Y G Q C S E I C G A N H S F M . 8700
 CAGTCCAGGACGATTAACCAACAGCCTTTATGCTCTCGACCTGGAGTATTCTACGGACAATGTTCTGAGATCTCGGGGCTAACCATAGCTTCAT
 8800 P I V V E A V P L E H F E K W S T M M L E D A tRNA-Lys -->
 8801 ACCTATCGTTGTTGAAGCGGTACCCCTAGAACACTTCGAGAAATGATCCACTATGATACTGAAGATGCCTCACTAAGAAGCTAAATCGGGAATAGCGTT
 ATPasa8 --> 8900
 M P Q L N P A P W F A I L V F S W L
 8901 AGCCTTTAAGCTAAAGATTGGTGGCCCAACCAACCCTAGTGACATGCCCAACTCAACCCGCCCCCTGATTTGCTATTTAGTATTCTCGTGACTG
 9000 V F L T V I P P K V L G H T F T N E P T S Q S T E K A K P E P W N W . 9000
 GTTTCCTAACTGTTATTTCCCAAAAGTCTTGGCCACACTTTCACAAATGAGCCTACCTCACAAGCACTGAAAAGCTAAGCCCGAACCTGAAACT
 9100 ATPasa6 --> 9100
 M T L S F F D Q F M S P T Y L G I P L I A V A L T L P W I L F P
 P W H *
 9101 GACCATGACACTAAGCTTCTTCGACCAATTTATGAGCCCCACATACCTAGGTATCCCCTTATCGCCGTAGCATTAAACCTCCCATGAATCTTTCCCT
 9200 T P S A R W L N N R L I T L Q G W F I N R F T Q Q L L L P L N L G G . 9200
 ACCCCTCTGCCGATGATTAACAACCGCTAATTACCCTGCAAGGGTGGTTCATCAACCGATTACCAGCAACTCTTTTACCCTAAATCTAGGGC
 9300 H K W A A L L T S L M L F L I T L N M L G L L P Y T F T P T T Q L . 9300
 GTCACAAGTGAGCAGCTCTACTAACTCCCTCATACTATTTCTTATTACCCTAAATATACTTGGCTACTTCCATATACATTACCCCGACCACACAGCT
 9400 S L N M G L A V P L W L A T V I I G M R N Q P T A A L G H L L P E . 9400
 CTCCCTAAATATGGGCTCGCAGTCCCACTGTGGCTTGTACAGTAATATCGGCATACGAAACCAACCTACGGCCGCTCGGCCATTTATTGCCTGAA
 9500 G T P V P L I P V L I I I E T I S L F I R P A L G V R L T A N L T A . 9500
 GGAACCCCGTCCACTGATCCAGTACTGATCATTATCGAAACAATTAGCCTTTTTATCCGCCCCGCTTGGGTACGACTACAGCCAATCTCACAG
 9600 G H Q L I A T A A F V L L P M M P T V A I L T S I V L F L L T L L . 9600
 CAGGCCACCAACTAATGCTACAGCAGCCTTGTCTTCTACCTATAATACCTACAGTAGCAATCCTAACTTCTATTGCTCTTTCTACTACCCTTCT
 9700 COIII --> 9700
 E I A V A M I Q A Y V F V L L L S L Y L Q E N V M A H Q A H A Y H
 9701 CGAAATCGCCGTAGCCATGATCAAGCCTACGTTTTGTCTTACTCCTAAGCCTCTATTTACAAGAAAACGTTAATGGCACACCAAGCACACGCATACC
 9800 M V D P S P W P L T G A I A A L L L T S G T A V W F H F H S L T L . 9800
 ACATGGTTGACCAAGCCCTGACCTCTGACCGGCGCAATTGCCGCCCTTTACTTACATCAGGCACTGCAGTCTGATTCCATTTCCACTCGCTCACACT
 9900 L T L G N I L L L L T M Y Q W W R D I I R E G T F Q G H H T P P V . 9900
 TCTTACCTTAGTAACTTCTTACTTCTAACCATATACCAATGATGGCGGATATCATCCGAGAAGTACCTTTCAAGGACACCAACGCCCCAGTC
 10000 Q K G L R Y G M I L F I T S E V F F F L G F F W A F Y H A S L A P T . 10000
 CAAAAGGGCTACGATATGGCATAATCTTATTTATTACCTCCGAGGTATCTTTTTCTTAGGTTCTTCTGAGCCTTCTACCAGCCAGCCTCGCCCCA
 10100 P E L G G C W P P A G I T T L D P F E V P L L N T A V L L A S G V . 10100
 CACCTGAATTAGGAGGTTGCTGACCCCGCAGGTATTACTACTCTAGACCCTTGGAGGTACCCCTTCTAATACTGCAGTCTCTAGCATCTGGTGT
 10200 10200

Figura 25. Secuencia completa del DNA mitocondrial de trucha arco iris (cont.)

T V T W A H H S I M E G E R K Q T I Q A L T L T I L L G F Y F T F
 10201 CACCGTAACATGAGCCACCACAGCATCATAGAAGGTGAACGAAAACAAACCATTCAAGCTCTTACTCTCACTATCTTACTGGGATTTACTTCACTTTC 10300
 L Q G M E Y Y E A P F T I A D G V Y G S T F F V A T G F H G L H V I
 10301 CTACAAGGTATAGAATACTACGAAGCCCATTTACAATCGCTGACGGCGTATACGGCTCTACTTTCTTTGTCGCTACAGGATTCATGGCCTACACGTAA 10400
 I G S T F L A V C L L R Q V Q Y H F T S E H H F G F E A A A W Y W
 10401 TTATTGGCTCTACCTTTCTGGCCGTTGCCCTCTACGACAAGTCAATACCACTTTACATCTGAACATCATTTTGGCTTTGAAGCTGCTGCCTGATATTG 10500
 H F V D V V W L F L Y V S I Y W W G S tRNA-Gly -->
 10501 ACACCTTTGTAGACGTTGTATGGCTCTTCTATACGTCTCTATTTACTGATGAGGCTCATAATCTTTCTAGTATTAATACGTATAAGTGACTTCCAATCAC 10600
 NADH-3 -->
 M N L I T T I I T I T I T I T L S A V L A T I S F W
 10601 CCGGCTTGGTTAAATCCAAGGAAAGATATGAATTTAATCACAAACATCATCACTATTACCATCACATTATCCGCAGTACTAGCCACTATTCTTTCT 10700
 L P Q I S P D A E K L S P Y E C G F D P L G S A R L P F S L R F F
 10701 GATTACCACAAATCTCCCAGACGAGAGAAGTTATCCCCCTACGAATGTGGATTGACCCCTTAGGGTCCGCCCCCTGCCCTTCTCTTACGCTTCTT 10800
 L I A I L F L L F D L E I A L L L P L P W G D Q L H T P T L T L I
 10801 TCTAATCGCGATCTTATCTCTTATTTGATCTAGAAATCGCCCTCTTTTGCCCTACCTTGAGGGGATCAACTCCACACCCCGACCTGACACTCATC 10900
 W S T A V L A L L T L G L I Y E W T Q G G L E W A E tRNA-Arg -->
 10901 TGATCCACTGCCGTTCTAGCCCTTCTTACTCTTGGCTTAATCTATGAATGAACCAAGGAGGCTTAGAATGAGCCGAGTACGGAGTTAGTCCAAAACAAG 11000
 NADH-4L -->
 M T P V H F S F T S A F I L G L M
 11001 ACCTTGATTCGGCTCAAAGACCATGGTTAAGTCCATGACCGCTTATGACACCCAGTACACTTCAGCTTTACCTCAGCCTTTATTTTAGGGCTTATA 11100
 G L A F H R T H L L S A L L C L E G M M L S L F I A L S L W A L Q M
 11101 GGACTCGCGTTTACCCGACCCACCTTCTCTCAGCCCTCTATGCCTAGAAGGAATAACTCTCTCTATTCATCGCCCTCTCCCTCTGAGCCCTCCAAA 11200
 E A T G Y S V A P M L L L A F S A C E A S A G L A L L V A T A R T
 11201 TGGAAGCGACTGGCTACTCAGTGGCCCCGATACTTCTCTAGCGTTCTCAGCCTGTGAAGCCAGCGCAGGGTTAGCCCTACTAGTAGCAACTGCACGAAC 11300
 NADH-4 -->
 M L K I L I P T L M L F P T I W L S P A K
 11301 H G T D R L Q S L N L L Q C * ACACGGCACAGACCGCTCCAAAGCTTAAACCTCTCCAATGTTAAAGATCCTCATCCCCACACTCATGCTTTTTCCAACGATCTGACTCAGCCCCGGA 11400
 W L W T T S I A Q S L I I A L A S L S W L K W S S E T G W S S S N
 11401 AATGATTATGAACATACATCAATCGCCCAAAGTTAATTATTGCCCTAGCAAGTTTATCCTGACTTAAATGATCGTCAGAACCGGATGATCTCTCTCCAA 11500
 L Y L A T D P L S T P L L V L T C W L L P L M I L A S Q S H L S P
 11501 CCTCTATTTAGCAACTGACCCCTATCAACACCCCTGCTAGTATTAACCTGCTGACTACTTCCCTTATAATCTTGGCTAGCCAAAGCCACCTCTCTCT 11600
 E P L N R Q R A Y I S L L V S L Q T F L V L A F G A T E I I M F Y V
 11601 GAACCTTAAATCGCCAGCGAGCCTACATCTCCCTCTGGCTCCCTTCAAACGTTTCTAGTATTAGCATTGGGGCCACTGAAATATCATATTTTACG 11700
 M F E A T L L P T L I I I T R W G N Q T E R L N A G T Y F L F Y T
 11701 TCATATTCGAAGCCAGCCTACTCCCCACCTTATTATTATCACCCGATGAGGAAATCAAACCTGAACGCCTCAATGCCGGTACTACTTCTTATTTTATAC 11800
 L A G S L P L L V A L L L M Q N D N G T L S M F T L Q Y T Q P L H
 11801 CCTAGCTGGCTCCCTACCCCTCTCGTGGCCCTGCTTCTTATACAAAACGACAACGGAAACCTATCTATGTTTACCCTGCAGTATACGCAACCCCTACAC 11900
 L L T W G D K L W W A A C L L A F L V K M P L Y G V H L W L P K A H
 11901 CTTCTAACGTGAGGAGATAAACTGTGATGAGCTGCCTGCCCTTTAGCCTTCTTGTAAAAATACCCTATACGGTGTTCACCTTTGACTCCCAAAGCCC 12000
 V E A P I A G S M I L A A V L L K L G G Y G M M R M M V M L D P L
 12001 ACGTAGAAGCTCCAATCGCCGGATCCATAATCCTAGCGGCTGTTCTCTCAAGCTGGGAGGATACGGCATAATACGTATAATAGTTATACTAGACCCGTT 12100
 T K E L A Y P F I V L A L W G I I M T G S I C L R Q T D L K S L I
 12101 AACCAAAGAACTGGCCTACCCCTTATTTGTTTGGCCTTGTGAGGTATCATTATAACAGGATCTATTTGCCTACGTCAAACAGACCTGAAATCACTAATC 12200
 A Y S S V G H M G L V A G G I L I Q T P W G F T G A I I L M I A H G
 12201 GCATACTCTTCACTCGCCACATAGGATTAGTCGAGGGGATTTTAAATCAAACACCTTGAGGATTTACTGGTCAATATTTCTCATAATCGCACAGC 12300
 L A S S A L F C L A N T S Y E R T H S R T M L L A R G M Q M I L P
 12301 GCCTTGCCTCTCAGCGCTATTCTGCTTAGCCAATACTAGCTACGAACGCCACCCACAGCCGAACCATACTACTTGGCCGAGGAATACAAATAATTTCTCCC 12400
 L M T T W W F V A S L A N L A L P P L P N L M G E L M I I T S M F
 12401 CTTAATAACCACCTTGGTGATTTGTAGTGTAGTGTAGCAAACTGGCCCTCCCCCTCTCCCAACCTAATAGGAGAATAATAATCATCACTTCTATATTT 12500

Figura 25. Secuencia completa del DNA mitocondrial de trucha arco iris (cont.)

N W S Y W T L I L T G L G T L I T A S Y S L Y L F L M T Q R G P L P
 12501 AACTGGTCGATTGAACCCCTATTCTCAGGGGACTAGGCACGTTAATTACAGCAAGCTACTCCCTTTATCTGTTCTTAATAACTCAACGGGGACCCCTAC 12600
 S H I I A L E P T H T R E H L L I I L H L I P I V L L I L K P E L
 12601 CTTCCCATATTATTGCTCTTGAACCCACCCACCCGAGAACACCTACTTATTATTCTGCACCTCATCCAATTGTCCTTCTAATCTAAAGCCTGAGCT 12700
 M W G W C F tRNA-His --> tRNA-Ser
 12701 CATGTGAGGCTGATGTTTCTGTAGATATAGTTAAACCAAGACATTAGATTGTGATTCTAAAAATAGAGGTTAAATCCTCTTATCCACCGAGAGAAATCT 12800
 (AGY) tRNA-Leu(CUN) -->
 12801 GTTGATAACAGAGACTGCTAATCTTCTGCCCCCTCAGTTAAATCTGTGGTTCACCTCGTCTTCTAAAGGATAATAGCTCATCCATTGGTCTTAGGAACC 12900
 NADH-5 -->
 M H P T T L I L S S S L L M I F T L L I Y P L
 12901 AAAACTCTTGGTGCAAAATCCAAGTAGCAGCTATGCACCCGACTACACTCATCTTAAGCTCATCCCTTTAATAATCTTCACACTTCTAATTTATCCCTCT 13000
 I T T L T P T P Q H K N W A L T H V K T A I K M A F L V S L L P L F
 13001 ATTACCACCCTCACCACACCCCAACACAAAACTGGGCCCTTACTCAGTAAAACTGCTATCAAATAGCCTTCTAGTGAGCCTGCTCCCCCTT 13100
 V F L D Q G T E T I V T N W Q W M N T T T F D I N L S F K F D H Y
 13101 TTGCTTCTAGACCAAGGAACCGAAACTATCGTGACTAAGTGAACAATAACACCACACACCTTTGACATTAACCTTAGCTTTAAATTTGACCACTA 13200
 S I I F T P I A L Y V T W S I L E F A S W Y M H A D P N M N R F F
 13201 CTCCATTATTTTACCCTATTGCCCTGTACGTAACCTGATCTATTCTAGAATTCGCATCCTGATATACACGCCGACCCCAACATAACCGATTCTTT 13300
 K Y L L L F L I A M I I L V T A N N M F Q L F I G W E G V G I M S F
 13301 AAGTACCTCCTCCTCTCCTAATCGCCATAATTATTTAGTAACGCCAACAACATGTTCCAACATTTATCGGCTGAGAGGGAGTCGGAATTAATATCAT 13400
 L L I G W W H G R A D A N T A A M Q A V I Y N R V G D I G L I L S
 13401 TTCTCCTCATTGGATGATGACACGGACGAGCTGACGCTAACACAGCTGCTATACAAGCTGTAATTTACAACCGAGTAGGAGACATCGGACTTATCCTAAG 13500
 M A W F A T N L N S W E I Q Q M F A S S K G L D L T L P L M G L I
 13501 TATAGCCTGGTTCGCAACAAACCTAAACTCCTGAGAAATTAACAAATATTTGCCCTCTCAAAGGACTTGACCTCACACTCCCTCTTATAGGCCTCATT 13600
 L A A T G K S A Q F G L H P W L P S A M E G P T P V S A L L H S S T
 13601 CTAGCCGCCACCGGCAAAATCAGCGCAATTTGGACTTCACCCGTGACTTCCCTCCGCGATAGAGGGTCTACGCCGGTATCTGCCCTACTACACTCCAGCA 13700
 M V V A G I F L L I R L H P L M E D N Q T A L T V C L C L G A L T
 13701 CCATGGTCGTGGCGGCATCTTCTATTAATCGACTCCACCCCTAATAGAAGATAACCAACAGCCTTAACCGTATGCTTATGCCTAGGAGCCCTAAC 13800
 T L F T A T G A L T Q N D I K K I V A F S T S S Q L G L M M V T I
 13801 TACCTCTTACCCGCTACCTGCCCTCACCCAAAATGACATCAAAAAATTTGTCGCTTCTTACATCCAGCCAACCTAGGGCTTATAATAGTACCATC 13900
 G L N Q P Q L A F L H I C T H A F F K A M L F L C S G S I I H S L N
 13901 GGACTTAATCAACCAACTAGCCTTCTCCACATCTGCACCCACGCTTCTTAAAGCTATACTTTTCTATGCTCAGGCTCAATATTATCATAGTTAA 14000
 D E Q D I R K M G G M H N L T P S T S S C L T I G S L A L T G T P
 14001 ACGATGAGCAAGACATTCGAAAAATAGGTGGTATACACAACCTCACCCTCTACATCCTTGCCTCACAATCGGAAGCCTTGACTAAGTGGCACCCC 14100
 F L A G F F S K D A I I E A L N T S H L N A W A L T L T L L A T S
 14101 ATTCTTAGCTGGGTCTTCTCCAAGACGCTATTATTGAAGCCTTAACACCTCCACCTCAACGCTGAGCCCTTACTCTTACCTTACTAGCCACCTCA 14200
 F T A I Y S L R V I F F V S M G H P R F T A T A P V N E N N P S V I
 14201 TTTACTGCCATTATAGCCTCCGAGTCATCTTTTTGTCTCCATAGGACACCCCGCTTACGGCAACAGCCCTGTTAATGAAAAAACCATCCGTAA 14300
 N P I K R L A W G S I I A G L L I T S N F L P T N T P V M T M P T
 14301 TTAACCAATCAAGCGACTAGCCTGAGGAAGCATCATTCGGGGCTTCTAATTACCTCAAACCTTCTACCCACCAACACCCCGTAATAACCATGCCAC 14400
 H L K L A A L L V T I S G L L I A L E L A S L T N K Q F K L H P T
 14401 CCACTAAAATAGCCGCTCTCTGTTACTATCTCGGCCCTTCTCATTGCATTAGAAGTTCGCTCACTAACAACAACAAATTAACCTACACCAACCC 14500
 L T L H N F S N M L G F F P A I I H R L T P K L N L T L G Q T I A S
 14501 CTTACACTACATAACTTCTCCAACATACTGGGATTCTTCCCGCATCATCCACCGATTGACCCCAAAGCTAAACTTAACTTAGGACAAACCATCGCCA 14600
 Q M V D H T W F E K V G P K E L F Q L T C L M V T T T S N I Q Q G
 14601 GCCAATGGTAGATCACATGATTTGAGAAAGTAGGTCGAAGGAATTATTTCAACTCACCTGCCTAATAGTACAACAACAAGTAAATATCCAACAAGG 14700
 * V A R L A G R S L G
 M I K T Y L T L F F L S T T L A V L L T L T *
 14701 CATAATTAACATACCTCACCTATTTTCTTCAACAACCTAGCTGTTCTATTAACATTAACCTAACTGCTCGAAGGCGCCCCGACTCAATCCC 14800
 R T L E L V V F L T L L L V W A C A I L M G G G H S Y M L A V G S
 14801 CGTGTAAATCCAACACCACAAAAAGTGTAAATAGGAGTACCCACGGCAGCAATTAATATCCCCCTCCATGAGAGTATATCAATGCCACCCACTGT 14900

Figura 25. Secuencia completa del DNA mitocondrial de trucha arco iris (cont.)

```

T D G R L V S F E K F E D V A V W S T E Y W G G W F L G A V L V V G
14901 TATCCCCACGCAATACAGAAAACCTCCTTAAACTCGTCCACTGCTACCCATGAGGTTTCATACCACCCACCCAGAAATAGACCTGCCACCAACACCACCCC 15000
V T Y V V V Y G L V S R D G L V S R D G W S E P F P E A A L A A S
15001 CACCGTATATACCACCACATACCCCTAAGACCGAACGATCCCTAAGACCGAACGATCCCTCAAGACTCCGGAAAAGGCTCAGCAGCCAAAGCCGCTGAA 15100
Y A F V V L M G G L Y I L F L V L S L F S G G H G V L V G C G V G
15101 TAAGCAAATACCACAAGCATCCCCCAAGTAAATCAAAAATAGTACTAAAGACAAGAAGATCCCCCGTGACCCACCAAAACCCCAACCCACACCTG 15200
A A V V L G L A A F Y P A P N S A V A V L G L V L G L L F L S V L Y
15201 CTGCTACAACCAACCCAAAGCAGCAAAGTAAAGGTGACGGGTTAGATGCAACAGCTACAAGCCCTAAAACCAGCCCTAAAAGAAACAAAGACACAAGATA 15300
NADH-6 Cytb -->
T M <-- tRNA-Glu M A N L R K T H
15301 AGTCATATTCTCTGCTCGGACTCTAACCGAAACTAATGACTTGAAAAACCACCGTGTGTTATTCAACTACAAGAACTAATGGCCAACTCCGAAAAACCC 15400
P L L K I A N D A L V D L P A P S N I S V W W N F G S L L G L C L
15401 ACCCTCTCCTAAAAATCGCTAATGACGCACCTAGTCGACCTCCAGCACCTTCTAATATCTCAGTCTGGTGAAACTTTGGCTCACTACTAGGCCTATGTT 15500
A T Q I L T G L F L A M H Y T S D I S T A F S S V C H I C R D V S
15501 AGCTACCCAAATTCCTACCGGGCTCTTCTAGCCATGCACTATACCTCCGACATTTCAACAGCTTCTCCTCTGTTGCCACATCTGCCGAGATGTTAGT 15600
Y G W L I R N I H A N G A S F F F I C I Y M H I A R G L Y Y G S Y L
15601 TACGGCTGACTCATTGCAACATCCATGCCAACGGAGCATCTTCTTTTTATCTGTATTATATACATATCGCCCGAGGACTTTACTACGGCTCGTACC 15700
Y K E T W N I G V V L L L L T M M T A F V G Y V L P W G Q M S F W
15701 TCTACAAAGAAACCTGGAATATCGGAGTTGACTTTTACTTCTCACTATAATAACTGCCTTGTAGGCTACGTCCTCCGCTGAGGACAAATATCATTCTG 15800
G A T V I T N L L S A V P Y V G G A L V Q W I W G G F S V D N A T
15801 AGGGGCCACTGTAATTACAAACCTCCTCTCAGCTGTACCATACGTAGGAGGCGCCCTAGTACAATGAATTTGAGGGGGCTTCTCCGTTGACAACGCCACT 15900
L T R F F A F H F L F P F V I A A A Y V L H L L F L H E T G S N N P
15901 CTAACAGGATTTTTCGCCCTTCACTTCCTATCCCTTCGTCATTGCAGCCGCTACGGTCCCTCACCTTCTGTTCTTCCATGAAACAGGATCTAATAACC 16000
A G I N S D A D K I S F H P Y F S Y K D L L G F V A M L L G L T S
16001 CTGCGAGGATTAACCTGTATGCTGATAAAATCTCATTCCACCCTTACTTCTCATACAAAGATCTCCTAGGATTGCTAGGCATACTCCTAGGCCTAACATC 16100
L A L F A P N L L G D P D N F T P A M P L V T P P H I K P E W Y F
16101 CTTAGCTCTTTTGCACCAAAATCTCCTAGGGGACCCAGACAATTTACGCCTGCCAACCCCTAGTGACCCACCTCATATTAACCCGAATGATACTTC 16200
L F A Y A I L R S I P N K L G G V L A L L F S I L V L M V V P I L H
16201 CTATTCGCTTACGCAATCCTACGATCCATCCCAACAAGCTGGGAGGAGTACTTGCCCTTTTATTCTCGATCCTTGTCTCATGGTTGTCCTCCATCCTAC 16300
T S K Q R G L T F R P L T Q F L F W A L V A D M L I L T W I G G M
16301 ACACCTCTAAACAACGAGGACTTACCTTTCGACCACTCACCCAATCTTATTTTGGCCCTTAGTAGCAGATATACTCATCCTCACCTGAATCGGAGGCAT 16400
P V E H P F I I I G Q V A S V I Y F T I F L V L S P L A G W A E I
16401 ACCTGTAGAACACCCCTTCATTATTATCGGACAAGTCGCCTCTGTAATTTACTTCACCATCTTCTAGTCTTTCCCCCTTAGCCGGCTGGGCCGAAAT 16500
K A L Q W A tRNA-Thr -->
16501 AAAGCCCTCCAATGAGCCTGCCCTAGTAGCTCAGCGCCAGAGCCCGGCTTGTAAATCCGGAAGTCGGAGGTTAAAACCCCTCCTAGTGCTCAGAGAGAG 16600
GAGATTTTAACTCCCACCTTAACTCCCAAGCTAAGATTCTAAATTAACCTACCCCTCTG <-- tRNA-Pro
16601 16660

```

Figura 25. Secuencia completa del DNA mitocondrial de trucha arco iris (cont.)

El mtDNA de trucha arco iris codifica para 2 rRNAs, 22 tRNAs y 13 cadenas polipeptídicas. Los genes fueron localizados e identificados por comparación con las secuencias de los mtDNAs de *Xenopus laevis* (Roe y col., 1985), *Cyprinus carpio* (Chang y Huang, 1994) y *Crossostoma lacustre* (Tzeng y col., 1992). La organización resultante es la misma descrita en estas especies y en mamíferos (Fig. 25 y Tabla III). Al igual que en el resto de mtDNAs secuenciados, la característica más sobresaliente en el mtDNA de trucha es la casi total ausencia de secuencias no funcionales. Las secuencias intergénicas se reducen en la mayoría de los casos a, tan sólo, 1 a 3 nucleótidos, siendo una excepción la existente entre el gen que codifica para el tRNA^{Asp} y el gen COII con 14 nucleótidos intergénicos no codificantes.

5. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA REGION DE CONTROL (D-LOOP).

La región de control del mtDNA de trucha tiene una longitud total de 1003 pb. Se encuentra flanqueada por el tRNA^{Pro} en su extremo 5' y por el tRNA^{Phe} en su extremo 3'. Al no ser una región codificante, el D-loop presenta una gran variabilidad entre los diversos genomas mitocondriales. No obstante, en el D-loop de la trucha se puede reconocer una región central y ciertos motivos conservados en otras especies (Fig. 26).

Al igual que en la región de control del mtDNA de otros vertebrados, en la región del D-loop de trucha arco iris se pueden identificar tres bloques de secuencia conservada (CSBs I, II y III) y ocho regiones asociadas con la terminación prematura de la replicación de la cadena pesada (TASs). De las tres CSBs identificadas las mejor conservadas, al compararlas con otros teleósteos, *X. laevis* y el hombre, son la CSB-II y la CSB-III (Fig. 27). La CSB-I en trucha está reducida a un pentanucleótido y pudo ser identificada como tal, en función de su posición relativa con respecto a la CSB-II (Fig. 27). En la región comprendida entre CSB-III y el tRNA^{Phe}, donde deben estar los promotores implicados en el inicio de la transcripción de las cadenas pesada (HSP) y ligera (LSP), aparece una repetición directa de 19 nucleótidos. Otra característica significativa, es la presencia de 26 nucleótidos pirimidínicos seguidos, cerca de las CSBs.

Región funcional	Inicio	Fin	Tamaño (pb)
D-Loop	1	1003	1003
tRNA-Phe	1004	1071	68
12S rRNA	1072	2015	944
tRNA-Val	2016	2087	70
16S rRNA	2088	3767	1680
tRNA-Leu (UUR)	3768	3843	76
NADH 1	3844	4815	972
tRNA-Ile	4819	4890	72
tRNA-Gln	4958	4888	71
tRNA-Met	4958	5026	69
NADH 2	5027	6076	1050
tRNA-Trp	6079	6147	69
tRNA-Ala	6217	6149	69
tRNA-Asn	6291	6219	73
Origen de replicación L	6292	6328	37
tRNA-Cys	6395	6329	67
tRNA-Tyr	6466	6396	71
CO I	6468	8018	1551
tRNA-Ser (UCN)	8089	8019	71
tRNA-Asp	8094	8166	73
CO II	8181	8871	691
tRNA-Lys	8872	8945	74
ATPase 8	8947	9114	168
ATPase 6	9105	9774	670
CO III	9776	10559	784
tRNA-Gly	10561	10630	70
NADH 3	10631	10979	349
tRNA-Arg	10981	11049	69
NADH 4L	11050	11346	297
NADH 4	11340	12720	1381
tRNA-His	12721	12789	69
tRNA-Ser (AGY)	12790	12858	69
tRNA-Leu (CUN)	12860	12931	72
NADH 5	12932	14770	1839
NADH 6	15306	14767	540
tRNA-Glu	15375	15307	69
Citocromo b	15379	16519	1141
tRNA-Thr	16520	16591	72
tRNA-Pro	16660	16591	70

Tabla III. Localización de las principales regiones funcionales del genoma mitocondrial de trucha arco iris. Se indica la situación y tamaño de los diferentes genes y regiones mitocondriales.

	CSB-I	Distancia a CSB-II
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	-----CACATA	77
<i>Crossostoma lacustre</i>	-----GACATA	95
<i>Cyprinus carpio</i>	-----GACATA	101
<i>Acipenser transmontanus</i>	-----GACATA	108
<i>Gadus morhua</i>	-----AGCATA	69
<i>Xenopus laevis</i>	-----GACATA	100
<i>Homo sapiens</i>	TAATTAATTAATGCTTGTAGGACATA	70
Consenso	-----gaCATA	
CSB-II		
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	TAAACCCCCC---TACCCCC	
<i>Crossostoma lacustre</i>	CAAACCCCCC---TTACCCCC	
<i>Cyprinus carpio</i>	CAAACCCCCC---TTACCCCC	
<i>Acipenser transmontanus</i>	CAAACCCCCC---TACCCCC	
<i>Gadus morhua</i>	TAAACCCCCC---TCCCCC	
<i>Xenopus laevis</i>	TAAACCCCCC---TACCCCC	
<i>Homo sapiens</i>	CAAACCCCCCCCCCTCCCCC	
Consenso	YAAACCCCCc---TaCCCCC	
CSB-III		
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	TGTTAAACCCC---TAAACCA	
<i>Crossostoma lacustre</i>	GCTCAAACCCC---GAAACCA	
<i>Cyprinus carpio</i>	TGTCAAACCCC---GAAACCA	
<i>Acipenser transmontanus</i>	TGTCAAACCCC---AAAAGCA	
<i>Gadus morhua</i>	TGT-AAACCCCCCGAAACAG	
<i>Xenopus laevis</i>	CGTCAAACCCC---AAAACCG	
<i>Homo sapiens</i>	TGCCAAACCCC---AAAAACA	
Consenso	ygtcAAACCCC---rAAAccR	

Figura 27. Bloques de secuencia conservada. CSBs identificados en las regiones de control de los mtDNAs de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*); *Crossostoma lacustre* (Tzeng y col., 1992); la carpa, *Cyprinus carpio* (Chang y Huang, 1994); el esturión, *Acipenser transmontanus* (Buroker y col., 1990); el bacalao, *Gadus morhua* (Johansen, 1990); *Xenopus laevis* (Roe y col., 1985) y el hombre, *Homo sapiens* (Anderson y col., 1981; Chang y Clayton, 1987). En la figura también se muestran las secuencias consenso para cada CSB y, en el caso de la CSB-I, la distancia en relación con la CSB-II.

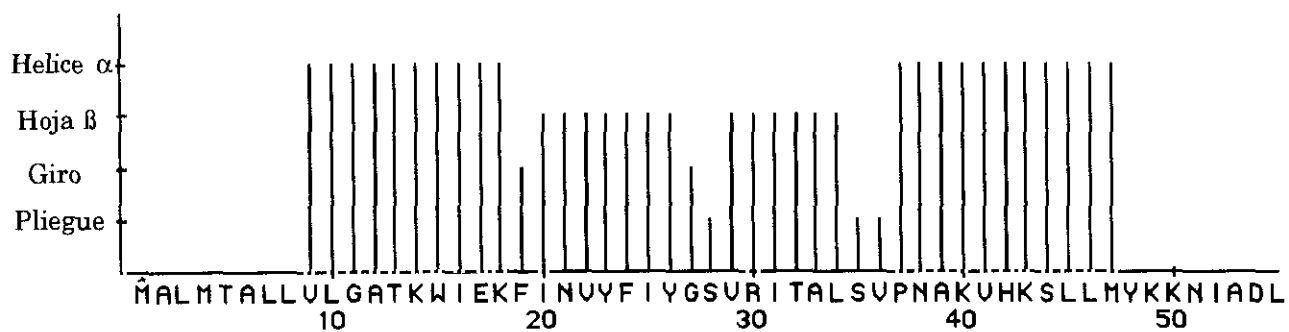
En esta misma región, entre los nucleótidos 820 y 985, se localiza una pequeña ORF de 165 pb con probabilidad de codificar para un polipéptido de 55 aminoácidos, con un peso molecular de 6200 Da y un punto isoelectrico de 8.7. De acuerdo con la orientación de la ORF, este polipéptido estaría codificado por la cadena L y, dependiendo de la localización exacta de LSP, podría ser el primero o el último de sus productos. El modelo del plegamiento deducido para este polipéptido, predice una estructura central de doble hoja plegada flanqueada por dos cadenas con conformación en helice α (Fig. 28).

6. ORIGEN DE REPLICACION DE LA CADENA L.

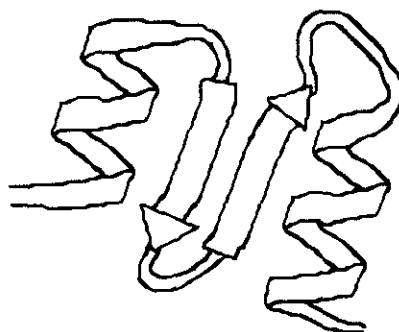
El origen de replicación de la cadena L tiene una longitud total de 52 nucleótidos, se localiza a continuación del tRNA^{Asn} y solapa parcialmente con el tRNA^{Cys} (Fig. 25). Presenta una estructura secundaria que consiste en una base formada por los extremos de los dos tRNAs flanqueantes, que continúa en un tallo constituido por el apareamiento de 22 nucleótidos, de un total de 23, y termina en un bucle de 17 nucleótidos (Fig. 29). Las dos secuencias flanqueantes del O_L son las mismas descritas en el resto de vertebrados y, en el caso del extremo 5', se puede reconocer el motivo 5'-GGCCG-3' en el que se produce la transición RNA/DNA al inicio de la replicación (Hixson y col., 1986). El pie tiene un alto contenido en guaninas y citosinas, y presenta gran homología con los de otros peces, *X. laevis* y mamíferos. El bucle sorprende por su gran tamaño, así como por la presencia de 10 citosinas seguidas y únicamente dos timinas. En este sentido sólo conserva cierta homología con el O_L descrito en el mtDNA del bacalao (*Gadus morhua*).

7. ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS RNAs DE TRANSFERENCIA.

El genoma mitocondrial de la trucha arco iris contiene 22 tRNAs intercalados entre los RNA ribosomales y entre los genes que codifican para proteínas. Por lo tanto, el modelo descrito originalmente en el hombre (Ojala y col., 1981) según el cual los tRNAs funcionarían como señales para el



a



b

Figura 28. Marco de lectura abierta deducido a partir de la secuencia del D-loop entre los nucleótidos 820 y 985. a) Plegamiento deducido para el posible polipéptido codificado basándose en la hidrofobicidad de los distintos aminoácidos que lo componen. b) Representación gráfica de su posible estructura secundaria.

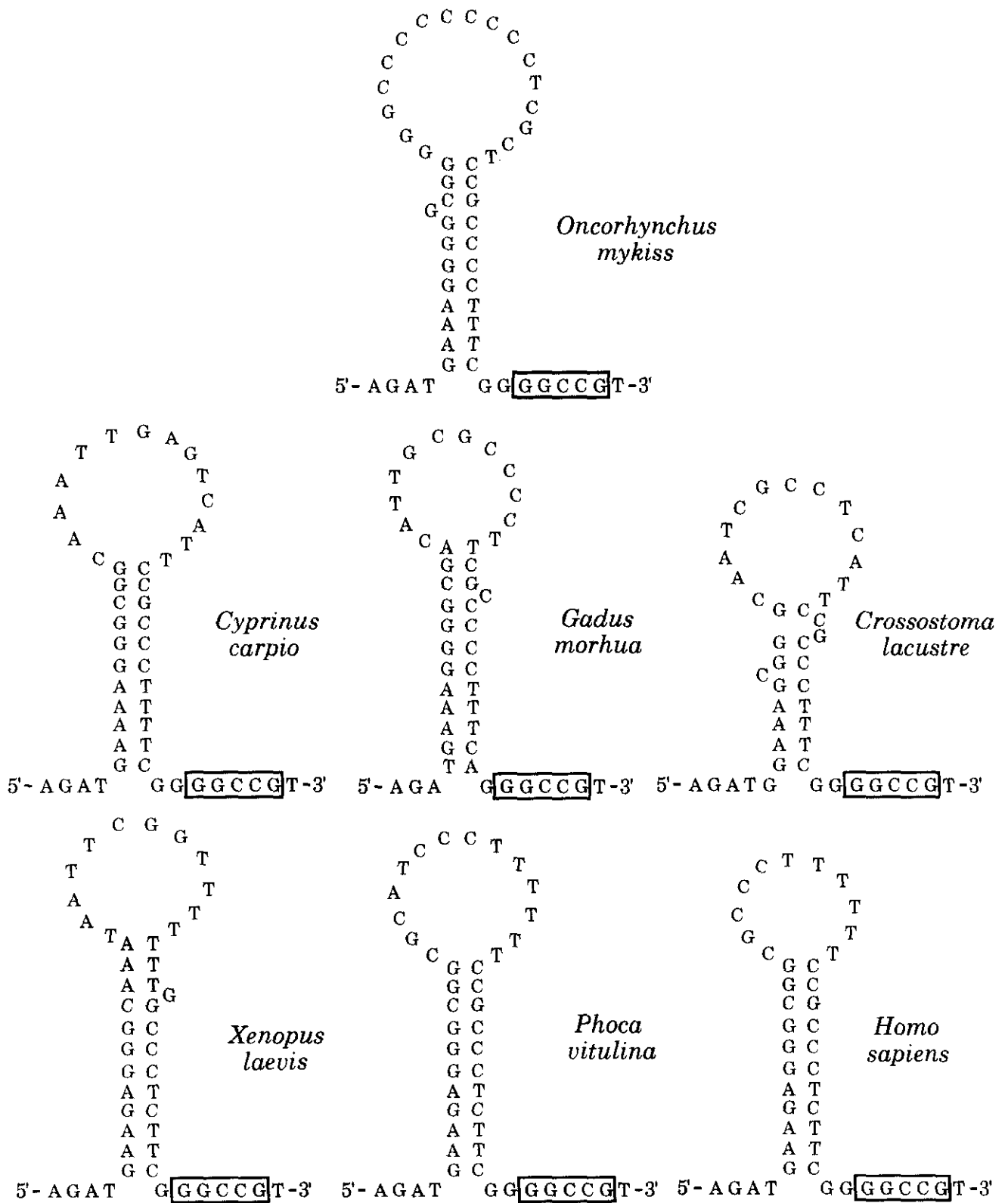


Figura 29. Estructuras secundarias propuestas para los orígenes de replicación de la cadena L del mtDNA de varios vertebrados.

procesamiento de transcritos primarios parece ser también aplicable en el caso de la trucha. Las secuencias obtenidas presentan gran homología con las descritas en *X. laevis* y otros peces (Fig. 30), siendo el tallo y el bucle del anticodón las regiones más conservadas, y el brazo T ψ C el más variable. Las estructuras secundarias en forma de hoja de trébol, propuestas para los 22 tRNAs en función de la secuencia obtenida para sus genes, se representan en la Figura 31. Los tRNAs mitocondriales de trucha son particularmente ricos en adenina y uracilo y presentan, con gran frecuencia, apareamientos de bases atípicos, especialmente G+U, que no corresponden al modelo de Watson y Crick. El bucle DHU es el que muestra mayor variabilidad entre los tRNAs de la trucha arco iris, así por ejemplo, mientras en el tRNA^{Leu} (UUR) está formado por nueve nucleótidos, en el tRNA^{Glu} está reducido, únicamente, a dos.

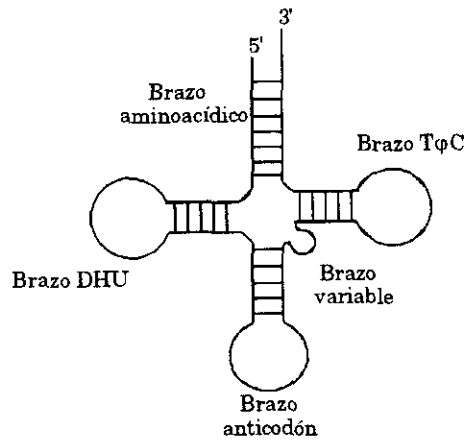
El tRNA^{Ser} (AGY) presenta una estructura secundaria relativamente distinta al resto de tRNAs mitocondriales. En el brazo DHU, el bucle está reducido a tres nucleótidos y, en cambio, el tallo está formado por 10 nucleótidos apareados. Además, el tallo del brazo del anticodón es anormalmente corto.

El tRNA^{Leu}(UUR) cuenta en su brazo DHU con la secuencia 5'-TGGCAGAGCCCGG-3'. Esta secuencia, que en el hombre se ha identificado como responsable de la terminación de la transcripción de los rRNAs (Christianson y Clayton, 1988), está en cambio, menos conservada en otros peces, *X. laevis* y pollo .

8. GENES CODIFICANTES DE PROTEINAS.

8.1. Código genético y uso de codones.

Todos los codones de iniciación identificados en el mtDNA de trucha arco iris, son ATG excepto el del gen COI que es GTG. Por otro lado, cinco genes (ND2, COI, ATPase 8, ND4L y ND5) utilizan TAA como codón de terminación, y dos (ND1 y ND6) terminan con TAG. El resto de genes codificantes de proteínas presentan codones de terminación incompletos, bien acaban en T (COII, ND4 y Cyt b) o bien en TA (ATPasa 6, COIII y



A.A. DHU DHU DHU A.C. A.C. A.C. V TφC TφC TφC A.A.
tallo tallo bucle tallo tallo bucle tallo tallo bucle tallo tallo

tRNA-Phe

Trucha	GCTGACGTAG	CTTAAC---	T-AAAGCATAA	CACT GAA AGCT	GTTAAGACGG	ACCCTA-GAA	AGTCCC	CGCTA	GCA
Carpa	...AG...	...AC--G	...A	...T.A	GT...	AG	ACT...AT
C.lacustre	...AG...	...TAT-G	...A	...T..	G....	-A..	CT...AT
X.laevis	..T.....	...G-C.G	...A	...G..T.A	G....	C...	CT...TA
Pollo	..CCC.A...	...CCACGG	...A	...CC...T..	TA....	CT.T	---.T.TGG
Hombre	.T.T.T....	...C.TCC	C.....	AT.	...AA.	...T.....	G.T.-C-	T	CAC...ATA. A..

tRNA-Val

Trucha	CAGAGTGTAG	CTAAAATAGG	AAAGCACCTC	CCT TAC ACCG	AGAAGACATC	CGTG-CAAAT	CGGTCACCC	TGA
Carpa	...G...G.	...G.GT...T	C....T..	A.....A.-...	T.A.G...	...
C.lacustre	...G.C..G.	...G.G...T	T.....A.-G.GC	T.A.G...	...
X.laevis	..A..A...	...T.C-C	...CTT.	G.....	...A.CA.T...	T.TA-..CC	...A.T..TT	...
Pollo	..AG.C....	...T.CTTC	...TTCA	G.....	T	GA...T.C.	TCAA..G.C	AA...G..T
HombreT.C-C	...CA	A.....	TT	..G...TT..	AACTT-..C.	T.-AC.G.T.

tRNA-Leu(UUR)

Trucha	GCTAAGGTGG	CAGAGCCCGG	TAATTTGCCA	GAGGC TAA G	CCCTCTTTCT	CAGAGTTCA	AACCCTCTCC	TTAGCT
Carpa	TACTG.....	...AT..	...A.....	A.....	...T.A.CT...T.	CC...T.
C.lacustre	A.....A...	...AT.	...A-	A.A.....	...T.CAGC	...G.....	...T...T.	...A..
X.laevis	...GC.....	...T..	CT.A-	A.A.....	T.T..A.	...G.....	...T.C...G	C...A.
Pollo	...GC.....	...T..	C.A-	A.A...T...	...T.A.-CT.....	C.....
Hombre	.T...A...C..AT	A.AA.T...A	A.T.TACAG.TT...T.	...A.A

tRNA-Ile

Trucha	-GGAA TTG TG	CCTGAATGCT	TAAGGACCAC	CTT GAT AGCG	TGGCTAATAG	GGGTTCAAGT	CCCCTCAATT	C-TA
Carpa	A...C.-	...GCA.C	T.....	...AA.T.C..	...A.A.	...G...C..	...
C.lacustre	A...CC...	...C	...T..	T...A.	...T.GA	...AG.AC	...TC..G...	...C..
X.laevis	G.A.-	...C.A.TC	...G..T...	T...A.	...AAAT...T	...AC	...A...TC..	...C.-
Pollo	G.A.GC-	...CAAA	...T..	TA...AA.	...AAC-...	A...AT..CA	A...-TCA	...T.C
Hombre	A.A.-.A..	T...TAA--	...AGTT..	T...A.	AAA.....	A.C.T..AC	...T.-..	TC..

tRNA-Gln

Trucha	TAGAAAGTGG	TGTAGTGG-	AGCACCAAGA	GT TTG ATCT	CTTGAGGATG	GGTTCGAGCC	CCTTCTCTCT	AG
CarpaAA...T...	...A.TT.	...T...	...
C.lacustre	...G.....	...TG.GC...T..	...TT.	...T...	...T...	...
X.laevis	...G.....	...A...G.	...T.GG..GCAG.TGCA	...A.TT.	...TG...T...	...A
Pollo	...A.AA	...A..G.	...T.TG.CT.TG.A	...TT.	...TACT.T...	...
Hombre	...G.T.G.	...GA.A.GT	G...CG...	A...GAT.	...CAG...	...TT.	...T.A.AGTC...	...

tRNA-Met

Trucha	AGTAAGTCA	GCTAATTAAG	CTTTGGGGCC	CAT ACCCCGA	ATATGTTGGT	TAAAATCCTT	CCCTTACTA
Carpa	G.CGG.....	...A...C...AC...	...G...C.	...TCCG.C.	...
C.lacustre	GA.....C...AC...	...C...C.	...GTC.	...
X.laevis	...A.....	...AA...	...T.....	...A.	...C.....	...CC...	...T.....
Pollo	...C.....	...A.....A...A...	...T...CC...	...C.....	...
Hombre	...A.....	...A.....A.....	...T.-C...	...G.....	...

Figura 30. Comparación y alineamiento de las secuencias de los 22 tRNAs codificados por el mtDNA de trucha arco iris y otros genomas mitocondriales de vertebrados. Se señalan aproximadamente las posiciones del tallo y el bucle de los brazos aminoacídico (A.A.), DHU, anticodón (A.C.), variable y TφC. Los anticodones de cada tRNA se representan en negrita.

	A.A. <u>tallo</u>	DHU <u>tallo</u>	DHU <u>bucle</u>	DHU <u>tallo</u>	A.C. <u>tallo</u>	A.C. <u>bucle</u>	A.C. <u>tallo</u>	V	T ϕ C <u>tallo</u>	T ϕ C <u>bucle</u>	T ϕ C <u>tallo</u>	A.A. <u>tallo</u>
tRNA-Trp												
Trucha	AGGG-CTTAG	GATA---GT	ACTTAGACCA	AGAGCCT TC A	AAGCTCTAAA	CGGGGGTGA-	AATCCCCCAG	CCCTT-				
Carpa	...AT...	...A---	CA.....	..A.....	...T...G	TA.AA...A	...TT.T.A	T...C.G				
<i>C. lacustre</i>	...A.....	...A---	CACA.....G	TA.A...G	...T.T...	...C.G				
<i>X. laevis</i>	..A.AT..A	.T.A---	CA---.T.C...G	.A.A.T.G	...T.T.A	T.TC.G				
Pollo	..AAA.....	..TAACT..	CACC.A...	..AG.....	...CT...	TAA.A.T.A	.C.T.TT.	TTTC.G				
Hombre	..AAAT....	.T.AAT.--	-AC.....C.C.G	TA--A.TGC	...A-.TT.A	TTTC.G				
tRNA-Ala												
Trucha	AAGGCTTTAG	CTTAATTAAA	GTGTCTGGGT	TGCAT TC AGA	AGATGTGGGA	TAAAGTCCTG	CAAGTCTTA					
Carpa	...C.....	...A...AT.	...A....-	...CAA.T	...TA..T.	T.G.C...					
<i>C. lacustre</i>	...C.....AT.G.....C	G.G.....					
<i>X. laevis</i>	...C.....	G.....	...T.A...	...AT	T.....T...	...A.....	...C.....					
Pollo	G...C.....C...AT.G	...ACA.T	...T.....	TTG.....					
Hombre	...GC.....G...AT.	..G.....T	T...CA.AG	.GGG..TT..	..GTC....					
tRNA-Asn												
Trucha	TAGATGGATG	CTCGCTGGAT	AGAGCGCTTA	GCT GT AACT	AAGAGTTTGT	AGGATCGAGG	CCCTCCACC	TAG				
CarpaC.T.G	T...T...	...A.....T...					
<i>C. lacustre</i>	...A.....	...C.T...G.....	...C.C..AT.	...CT...	...T.T...					
<i>X. laevis</i>	...AT..A	...T...	T...-T...	...A.TG...C	G.....	...CGT.TTT	...CAT.TGT					
Pollo	...GCA..A	..CAAT...TG	TTG..AT...	...A.T.G.A	G.....A	...CAT.TGT	...					
Hombre	...T..A	..CA.T..AT.	..G.T...	...T.....	G..T.TA..T	..CATTGGT	...					
tRNA-Cys												
Trucha	AAGCCCTGTG	GTGTACCACA	CGTTAGATTG	CAAATCTGAA	GAAGTAGGCT	AATAGCCTGC	CGGGGCTTT					
Carpa	C...T.C...	...A.GA...	..A.G.....	...C.....	...C.C..AT.	...CT...					
<i>C. lacustre</i>	G...T...	..AG.GG.T	..A.....	...A.....	...C.C..AT.	...C.-T...					
<i>X. laevis</i>	...C.....	...TTG...	T.CC.....	...CG.	...C.AA.G	...-G.TT...	...C					
Pollo	-GA.T...A	..A.GTT..	TAA.GAG...	...CTC.TT	..T...CA..	...TG...	...-C.					
Hombre	...T.C.A.	...ATTTT..	TA..GA...	...TC...	...C..CT.	C.-.A.....					
tRNA-Tyr												
Trucha	GGTAGGGTGG	CTGAGAGCTT	AAGCGGTGGA	TT GT AGCTCC	ATAAACAGAG	GTTTGACTCC	TCTCCTTATC	A				
Carpa	...C...A	..C...T...	..G.....G	...C.-	GA.G.....	...G...	...T.C...					
<i>C. lacustre</i>	...A...	..C.A.--	..G.T...G	...C.	GA.G.T...	...A.G...	...T.C...					
<i>X. laevis</i>	...A.....	..C...TAA-	..G...C...	...G.GT...	...CA.G...	...T.....	...					
Pollo	...A.A...	...T.T.G	...T.A.G	C...TC.T	T.TT...	...CA.T...	...T.....					
Hombre	...AAA...	...T---	...AT...	C...AA.T	A.G...G.	...GG...	...TT...C.					
tRNA-Ser (UCN)												
Trucha	AAGAAAGTGG	CAG--AGTGG	TT--ATGCGG	TTGGCT TC AA	ACCAGCACAT	GGGGGTCAA	TTCTCCCTT	TCTCG				
Carpa	...G...A	...T...	...T...	C.....	...T...					
<i>C. lacustre</i>	...G.....	...T.A	C.....	...T.T...C...					
<i>X. laevis</i>	...A...	...G...	AA	C.A.....	..T...AGT..	...G.	...CT.T...					
Pollo	...AA.	..TTA.....	..TG.....	...A.TG.	..A.....G.	...T.....	...T.					
Hombre	T...AA.T	..T--G.A.	CC--..G.	...TT-	...G.	...T...	..T.GT					
tRNA-Asp												
Trucha	AAGACACTAG	TAAACTAGT	CTATTACACT	GCCTG TC AA	GGCAAAATTG	TGGGTFAAAC	CCC-GCGTGT	CTTA				
Carpa	...T.....	...AA.....	TC A..T...	..TG...C.	A.....T	...T.A...	...					
<i>C. lacustre</i>	...T...	...CT.-	AA.....TC	A.T.T...	..TG...A.	A.....T	...T.A.A	...G				
<i>X. laevis</i>	G...TGT...	...-A...	GCAC	...T.....	..G...A	CT...G.	T.G.ACA.	..C.				
Pollo	G...GT...	...C----	-A.....TA	.A.CT.....	.A.T...CA	CA...GC..A	...T.TACA.	..C.				
Hombre	...GT.T...	A.....C--	---.T..TA	A.T.T....	A.TT....A	A..C...T	...TATA.A.	...				
tRNA-Lys												
Trucha	CAC TAAGAAG	CTAAA--TCG	GGAAT-AGCG	TTAGCC TTT T	AAGCTAAAGA	TTGGTGGCCC	CCA-ACCACC	CC-TAGTGA				
Carpa	..G...G...	...TA.T.	..AC.A...	..G.....	...C.....	...ATT.	..G.....	T.....				
<i>C. lacustre</i>	...G.....	...C.A.	..T.AC..A	..G.....	...C.....	...C.T.	...T.....	...				
<i>X. laevis</i>	...T.....	...A.	..C.T...	AC.....	...GT...	...A.T.	...T.A...	...				
Pollo	..T.....	...TGCAC--	-----C..A	C.....G.	GA.G.A.A	...-T.C.	...T.A...	...				
Hombre	...GTA...	...CT---	-----T..A	...A.....	...T.....	...AAGA.AA	..A.C...T.T	TTAC....				

Figura 30. Comparación y alineamiento de las secuencias correspondientes a los 22 tRNAs codificados por el mtDNA de trucha arco iris (Cont.)

	A.A.	DHU	DHU	DHU	A.C.	A.C.	A.C. V	T ϕ C	T ϕ C	T ϕ C	A.A.
	<u>tallo</u>	<u>tallo</u>	<u>bucle</u>	<u>tallo</u>	<u>tallo</u>	<u>bucle</u>	<u>tallo</u>	<u>tallo</u>	<u>bucle</u>	<u>tallo</u>	<u>tallo</u>
tRNA-Gly											
Trucha	ATCTTTCTAG	TATTAATAC-	-GTATAAGTG	ACTTCCAATC	ACCCGGTCTT	GGTTAAAATC	CAAGGAAAGA	TA			
CarpaC..AGTT	A...C.....A.A.....CC.....			
C. lacustreG.T	A...CG.....C.....CC.....			
X. laevis	.CT..CT.....	..C A...C.C.....AAA.....	A...G....	T...AG..AG ..						
Pollo	GCTC.....	..-C-TC	AT..C..C.....	TTTAAAATC.	..ATC..C..	GA...GAG C.					
Hombre	.CTC..T.....	..A.---T	A...CCGT.A	T .A.TA..T..	AC---C..T ..	AA..GAG ..					
tRNA-Arg											
Trucha	CGG-AGTTAG	TCCAAAACAA	GACCCCTIGAT	TTCGGCTCAA	AAGACCATGG	TTTAAGTCCA	TGACCGCCTT				
Carpa	A..G.....TC.....G ..A.T.....T.....C.....			
C. lacustre	A..G.A.....	..T...T.....TC.....G .GA.T.G.....	..A.....	C..T.C.....			
X. laevis	GA.TT.....	..T...-.....AG.....C.A.TT.....	..A..CC.....	..A.TAA.TC.			
Pollo	A.AA.....	..T..C-T..	..AGC..G.....	..A.C..G	C.A.TT..A.	ACCC.CCT-.	..TTT...			
Hombre	T..T.TA.....	..TT...-.....	A..GAA.....	..A...T	T.A.TT...A	AA---T..	..ATTTA..AA			
tRNA-His											
Trucha	GTAGATATAG	TTTAACC-AA	GACATTAGAT	TGTGATCTA	AAAATAGAGG	TTAAAATCCT	CTTATCCACC				
Carpa	...AG.....T.....	A.....C..G..G...CCT.....			
C. lacustre	...AGC.....TTT..	A.....G.....C..CT.....			
X. laevis-T.....	A...C.....	G.GTC.....CC.....A.....			
Pollo	.C.A.C.....C. A.....GA.....	..T..CC.TC	..G.T.G..			
Hombre	...A.....A...C.....A...G	..C..C.....	C.T.CGA..CTT...			
tRNA-Ser (AGY)											
Trucha	GAGAGAAATC	TGTTGATAAC	AGAGACTOCT	AATCTTCTGC	CCCCTCAGTT	AAATTTCTGTG	GTTCACTCG				
Carpa	A..GA.G.A.	A.AAA...GT	.AGC.....	..C.TACA	TT..ATG...	..A..C...C	..C.TC..T.			
C. lacustre	CGAGA..GG.	CCCA.GC..T	.AGC.....	..AC.TATA	A..A.G...	..C..C...C	..C..T...T.			
X. laevis	..ACTTG..-	..-G..CCCT	.AGA.....	..TACT-TA	.G.TGT-...	..C...CAC..	..C.TGT...T.			
Pollo	AG.G..GGC.	CA-A.CC.G.	.AGA.....	..TCCTGCA	T.TGAGCT..	..CCTCA--	..C.C..T-			
Hombre	..---G.--	-A-A.C.C..	.AGA.....	..CTCAT-..	..AT...C	T..CAACA..	..C.TT...A			
tRNA-Leu (CUN)											
Trucha	GCTTCTAAAG	GATAATAGCT	CATCCATIGG	TCTTAGGAAC	CAAAA-CTCT	TGGTGCAAAT	CCAAGTAGCA	-GCT			
Carpa	...TC.....C..T.....G.....A.....G.A.....			
C. lacustreC.....A.....A.....G.A.....			
X. laevisA..C..TC	T...GC.....	..G..A.....GAA..A...			
Pollo	A..T.....G...A	..G.....	..CCTA-..A..TA			
Hombre	A..T.....C.....CC.....A-T.....C.....A..-A	A..TA			
tRNA-Glu											
Trucha	GTTCTTGTAG	TTGAATAACA	ACGGTGGTTT	TTCAAGTCAT	TAGTTTCGGT	TAGAGTCCGA	GCAGGAATT				
CarpaC.....G..C.....	..A...T.....A.....			
C. lacustreC.....C.....GC.....	..G..C.....	..A...G	..TGA.....			
X. laevisC.A.....GA...C	A...CT.....	..TG	..TG.....			
PolloG-.....	..AA...C..C.G.	AGTCC.T..G	GTCTAA..A.	..G...A			
HombreAT.....	..A.....	..TA.....	..G..CGT...	..GT.....T	..GA...A			
tRNA-Thr											
Trucha	GCCCTAGTAG	CTCAGCGCCA	GAGCGCCGGT	CTTOTAATCC	GGAAGTCGGA	GGTTAAAACC	CTCCCTAGTG	CT			
CarpaT...CTA.	A...AT.....	..A.GA.....TT.....C..C			
C. lacustreT..TATG.	A...AT.....	..A.GA.T.....A.....C..C			
X. laevis	..T...GA...	..T.APTT-	A...AT.....	..G...A.GA.T-.	..C.....	..TC.AGA..			
Pollo	A.T...A...	T.T--TGA.	A.A.ATT.....	..A.A.	AA..ACT.A.	AC.CC.-.	..T.T...A..TA			
Hombre	..T...T....	TAT.AACTA.	T.-A.A.A.A.	..GA.-.A.	AACC---TT	T.T..A..GA	A			
tRNA-Pro											
Trucha	C-AGAGGGTA	GTTTAATTTA	GAATCTTAGC	TTTCGGAGTT	AAGGGTGGGA	GTTAAAATCT	CCTCTCTCTG	A-			
Carpa	.G...AAA.....G.....	..TC.G..T..CC	.G.....A..TCT.T.....	GG			
C. lacustre	..AAA.....G.....	..TC.G..CC	.G.....A..G.....	..T.T.T.....	..			
X. laevis	..G.GA.A..	A.....	..G..G..G..C	..TA...AG	..TG.G..C	TTCT.TCTC.	--			
PolloT..G.	A...ACC.....C.	GGA.A...AG	..TG.GC.C	T.CT.T.....	..			
HombreAA.....A.....T.C.	..T.....GA..	-T.T.....	T			

Figura 30. Comparación y alineamiento de las secuencias correspondientes a los 22 tRNAs codificados por el mtDNA de trucha arco iris (Cont.)

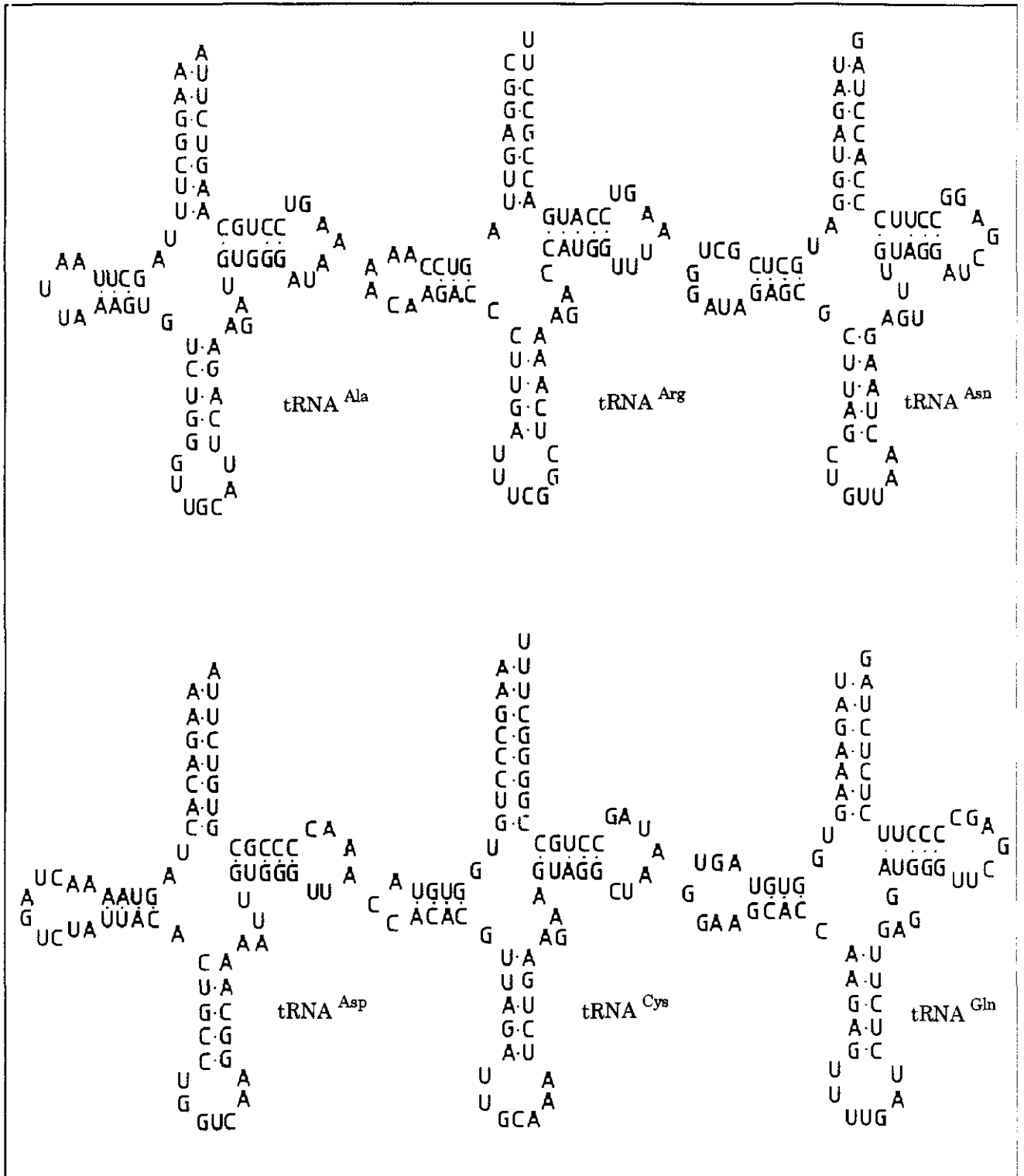


Figura 31. Estructura secundaria en hoja de trébol de los 22 tRNAs codificados por el mtDNA de trucha.

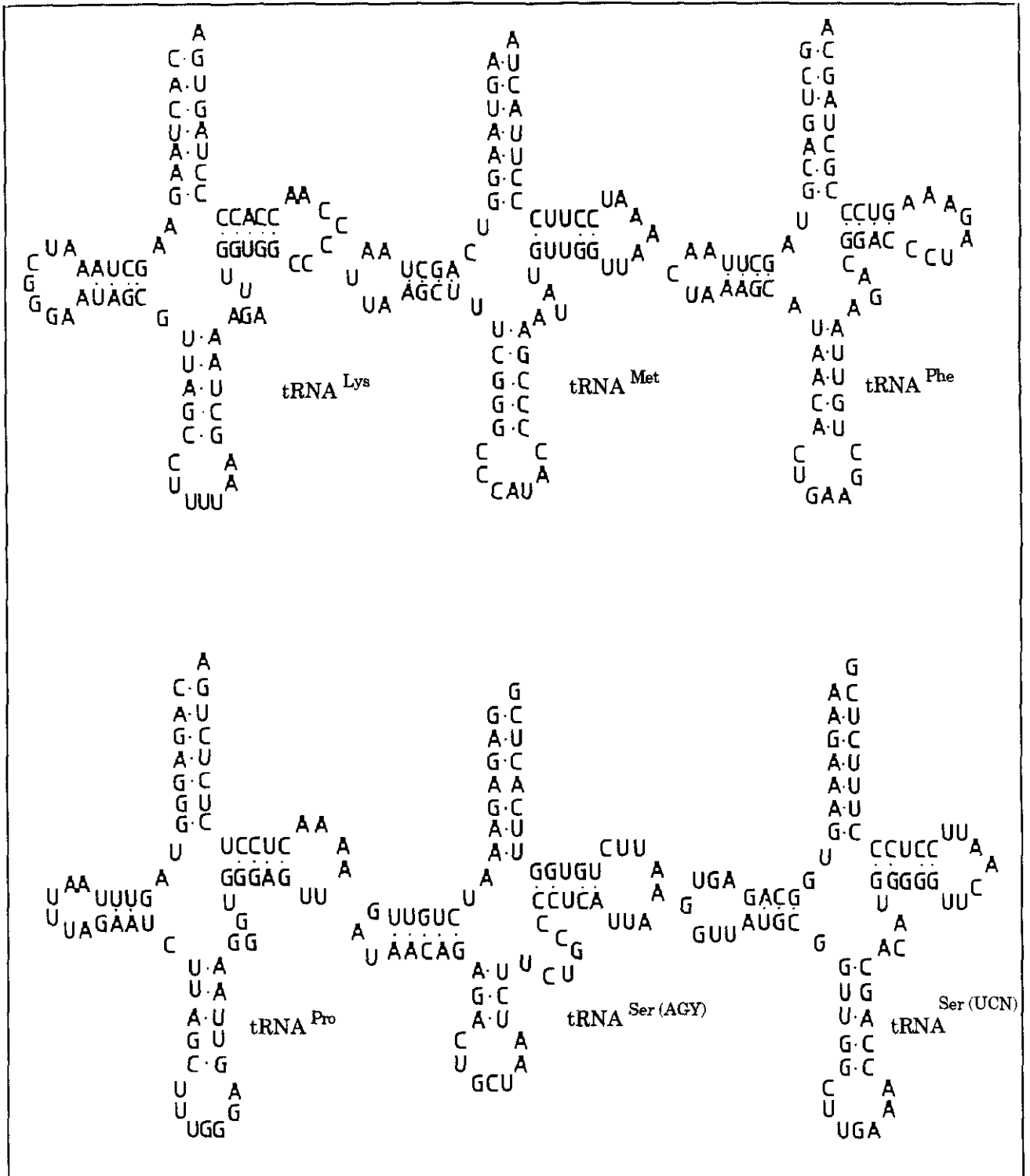


Figura 31. Estructura secundaria de los 22 tRNAs (Cont.)

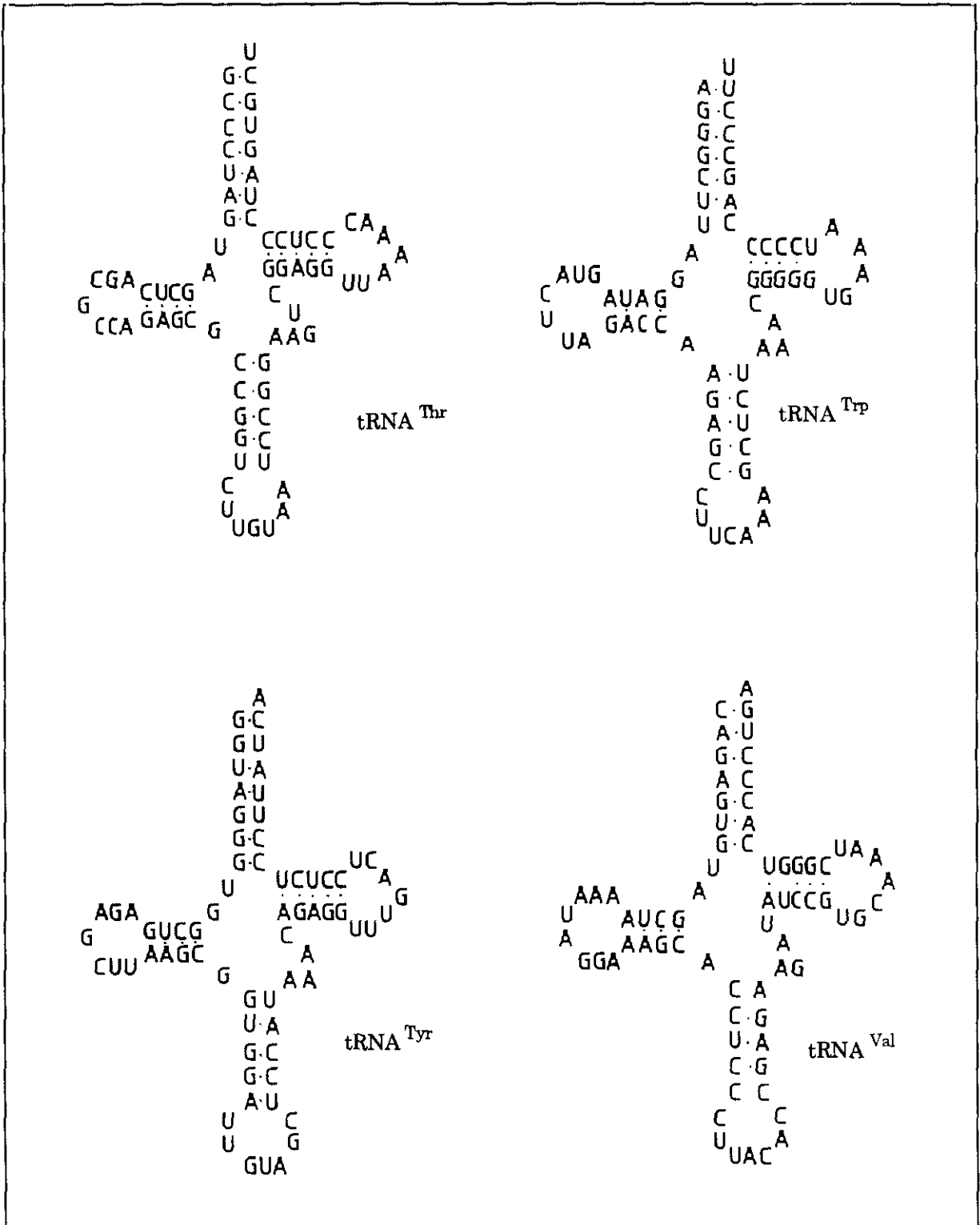


Figura 31. Estructura secundaria de los 22 tRNAs (Cont).

ND3). En ningún caso se encuentran AGA o AGG como codones de terminación, ni tampoco se encuentran dentro de las ORFs, por lo que se puede considerar, que estos codones no existen en el mtDNA de trucha arco iris.

El uso de codones del mtDNA de trucha arco iris fue calculado a partir de las 13 ORFs encontradas, utilizando como referencia el código genético mitocondrial de mamíferos. El uso de codones es muy similar al descrito en *X. laevis* y otros peces y, como se puede observar en la Tabla III, se caracteriza por una clara tendencia a no incluir residuos de guanina en la última posición del codón.

Aa	Codón	Numero	/1000	Fracción	Aa	Codón	Numero	/1000	Fracción
Gly	GGG	49.00	12.86	0.20	Fin	AGG	0.00	0.00	0.00
Gly	GGA	93.00	24.42	0.38	Fin	AGA	0.00	0.00	0.00
Gly	GGT	33.00	8.66	0.13	Ser	AGT	11.00	2.89	0.05
Gly	GGC	72.00	18.90	0.29	Ser	AGC	43.00	11.29	0.18
Glu	GAG	23.00	6.04	0.22	Lys	AAG	15.00	3.94	0.20
Glu	GAA	83.00	21.79	0.78	Lys	AAA	59.00	15.49	0.80
Asp	GAT	27.00	7.09	0.36	Asn	AAT	36.00	9.45	0.32
Asp	GAC	48.00	12.60	0.64	Asn	AAC	76.00	19.95	0.68
Val	GTA	32.00	8.40	0.14	Met	ATG	41.00	10.76	0.28
Val	GTA	90.00	23.63	0.38	Met	ATA	108.00	28.35	0.72
Val	GTT	56.00	14.70	0.24	Ile	ATT	135.00	35.44	0.51
Val	GTC	56.00	14.70	0.24	Ile	ATC	130.00	34.13	0.49
Ala	GCG	24.00	6.30	0.07	Thr	ACG	20.00	5.25	0.06
Ala	GCA	93.00	24.42	0.27	Thr	ACA	96.00	25.20	0.30
Ala	GCT	75.00	19.69	0.22	Thr	ACT	79.00	20.74	0.25
Ala	GCC	150.00	39.38	0.44	Thr	ACC	120.00	31.50	0.38
Trp	TGG	20.00	5.25	0.17	Arg	CGG	8.00	2.10	0.11
Trp	TGA	101.00	26.52	0.83	Arg	CGA	48.00	12.60	0.63
Cys	TGT	8.00	2.10	0.29	Arg	CGT	9.00	2.36	0.12
Cys	TGC	20.00	5.25	0.71	Arg	CGC	11.00	2.89	0.14
Fin	TAG	2.00	0.53	0.29	Gln	CAG	11.00	2.89	0.11
Fin	TAA	5.00	1.31	0.71	Gln	CAA	89.00	23.37	0.89
Tyr	TAT	41.00	10.76	0.37	His	CAT	27.00	7.09	0.24
Tyr	TAC	69.00	18.11	0.63	His	CAC	84.00	22.05	0.76
Leu	TTG	24.00	6.30	0.04	Leu	CTG	42.00	11.03	0.06
Leu	TTA	111.00	29.14	0.17	Leu	CTA	185.00	48.57	0.28
Phe	TPT	114.00	29.93	0.50	Leu	CTT	150.00	39.38	0.23
Phe	TTC	113.00	29.67	0.50	Leu	CTC	146.00	38.33	0.22
Ser	TCG	10.00	2.63	0.04	Pro	CCG	18.00	4.73	0.09
Ser	TCA	55.00	14.44	0.23	Pro	CCA	57.00	14.96	0.27
Ser	TCT	55.00	14.44	0.23	Pro	CCT	49.00	12.86	0.23
Ser	TCC	67.00	17.59	0.28	Pro	CCC	87.00	22.84	0.41

Tabla IV. Código genético y uso de codones del genoma mitocondrial de trucha arco iris. Se muestran el número de codones totales encontrados en los 13 genes codificantes de proteínas del mtDNA de trucha arco iris, la frecuencia de uso de codones, en tanto por mil, y la proporción en que cada codón contribuye a codificar para un determinado aminoácido.

8.2. Análisis de proteínas.

El genoma mitocondrial de trucha arco iris, al igual que el de otros vertebrados, codifica para 13 cadenas polipeptídicas con un tamaño variable entre 55 (ATPasa 8) y 612 (ND5) aminoácidos. Todos los genes, a excepción del ND6, están codificados por la cadena pesada. Al igual que ocurre en los genomas mitocondriales de otros vertebrados, en el mtDNA de trucha arco iris se dan dos casos de solapamiento de ORFs; el final del gen que codifica para la ATPasa 8, solapa en 10 nucleótidos con el principio del gen de la ATPasa 6. Lo mismo ocurre entre los genes ND4L y ND4 estando, en este caso, el solapamiento reducido a 7 nucleótidos. Por otra parte, los codones de terminación de los genes ND5 y ND6 se localizan en la misma posición del genoma mitocondrial, aunque en distinta cadena, llegando a compartir dos nucleótidos. Los genes ATPasa6 y COIII son los únicos que, no estando solapados, carecen de un tRNA entre ellos.

El alineamiento y comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas por el genoma mitocondrial de trucha arco iris con sus homólogas de carpa (Chang y Huang, 1994), *C. lacustre* (Tzeng y col., 1992), *X. laevis* (Roe y col., 1985), pollo (Desjardins y Morais, 1990) y hombre (Anderson y col., 1981) se muestra en la Figura 32. En general, las subunidades de la citocromo oxidasa (COI, COII y COIII) se encuentran mucho más conservadas que las subunidades de la NADH deshidrogenasa y la ATPasa. Ello es debido, probablemente, a que en el primer caso, las subunidades codificadas forman parte del centro catalítico del holoenzima (Cantatore y Saccone, 1987), mientras que en los otros dos casos se trata de subunidades reguladoras, estando las subunidades catalíticas codificadas en el núcleo. Las secuencias aminoacídicas deducidas de los genes COI y ATPasa8 presentan, respectivamente, el mayor y menor grado de homología con carpa (97.7/ 80.0 %), *C. lacustre* (97.1/ 76.8 %), *X. laevis* (95.3/ 80.3 %), Pollo (94.0/ 67.3 %) y hombre (92.8/ 45.3 %).

NADH 1

Trucha	M-IT-LITHV	INPLAYIVFV	LLAVAFLLTL	ERKVLGYMQL	RKGPNIUGPY	GLLQPIADGL	KLFIKETVRP	STSSPFLFLA	TPMLALTLAL	TLWAPMPIPY	PVTDNLGLVL	FVLALSSLAV
Carpa	-LNI M LIVVPAVMMHI
C.lacustre	-LNT L LPIATVMH
X.laervis	-L-TI L LLMIIHTIVPQTMI
Pollo	TLPT.TNLL	MT.S.L.I	I.....V	I.S.AFVVPIIIILI
Hombre	PMAN----	---LLI	I.M.MTIVFAMTPLKA
Trucha	YSILGSCWAS	NSKYALIGEL	RAVAQTISYE	VSLGLILLSV	IIITGGFTLQ	TFNVAQESIW	LLVPAWPLAA	MWYISTLAET	NRAPFDLTEG	ESELVSGFNV	EYAGGPPALF	FLAEYANILL
CarpaLAFSYITI
C.lacustreLARIFWYVTTALLC
X.laervisTSATCMMLAYTLMTQMIIG
PolloLWATAITMLSNYSLAITPY
HombreWNATAITLLMSSNSLITTHL
Trucha	MNTLS-AVLF	LGASHIPAFP	ELTALNLMTK	AALLSVVFLW	VRASYPRFRY	DQLMHLVWKS	FLPLTLALVL	WHLALPIALA	GLPPQL*			
CarpaSVTIIMNFT*			
C.lacustreIMITINTF*		
X.laervisYLISFMNQTISISSIMINIMT
PolloTTNPFLNLPFPIAATLSSILN
HombreTTTITTYDALSYTTYFVTLTSLITALN

NADH 2

Trucha	MNPYVLTILL	SSIGLGTVLT	FASSHWLIW	MGLEINTLAI	IPIMAQQHP	RAIEATTKYF	LTQATAAAMI	LFASPTNAWL	VGWEIHOQS	HPLATTTVML	ALALKLGLAP	VHFWLPEVLQ
CarpaRRAT	C.VTTLHVMSND
C.lacustreMITLRLAATD
X.laervisITFSVW	TASEQAVSLTHKASLL
PolloHAKL	CT	VIMSIISNITLISKSI
HombreLAQFVIY	TIFALIALFFTVMMFVLTKKMNST
Trucha	GLELFTGLIL	STWQKLAPFA	LMIQVAPTIN	SSLLVTIGLL	STLVGGWGGL	NOTQLRKILA	YLPDAHGW	VLILQFAPSL	TLLSLSLYIV	MTSSAFLTLK	TNNSLTINIL	ATSWIKSPTL
CarpaDLITQDPLTLLISSSMIIVI
C.lacustreDMITMNTPMTLISS
X.laervisSMILYIMLTPLLTIFSS
PolloSSIALMPITLLLTSQSL
HombreTPSLLISIYISSLVLLSI
Trucha	AALTALVLLS	LGGLPPLSGF	MPKWILQEL	TKQGLPLSAT	LAAMTALLSL	YFYLRLCYAL	TLTIYPNTLT	ATAPWRINFT	MITLPLSITT	IMALGLLPLT	PAVTAMLAL*	
CarpaTSTTDIIAMLILMST
C.lacustreVSTTTDATIMLASMSSSNSLT
X.laervisTSLTVFISNTILTLLSFT
PolloNTVMTATIEMTPMIITLSFAHS
HombreTPIPSTTLAIEFNNSLIIPIMTITNI

Figura 32. Alineamiento y comparación de las proteínas codificadas por el mtDNA de trucha arco iris y de otros vertebrados. Cuando fue necesario, se introdujeron espacios (guiones) con el fin de mejorar los alineamientos. Los aminoácidos idénticos se indican mediante un punto, los codones de terminación mediante un asterisco.

COI

Trucha	MA-ITRWFFS	TNHRDIGTLY	LVFGAWAGMV	GTALSLLIRA	ELSQPGALLG	DDQIYNVIVT	AHAFVMIFFM	VMPIMIGGFG	NWLIPLMIGA	PDMAPPRMNN	MSFWLLPPSF	LLLLSSSGVE
Carpa	..-.....S..SL.....V.....A.....
C.lacustre	..-.....N.....L.....V.....H.....A.....
X.laevis	M.....L..L..T.....I.....V.....A.....
Pollo	.TF.N..L..I..T...AG...T...V.....A..T..
Hombre	M-FAD..L..L.....VLG...N...	N.H.....V.....L...A.AM..
Trucha	AGAGTGWTVY	PPLAGNLAHA	GASVDLTIFS	LHLAGISSIL	GAINFITITII	NMKPPAISQY	QTPLEFVWAVL	VTAVLLLLSL	PVLAAGITML	LTDRLNNTTF	FDPAGGGDPI	LYQHLEWFFS
CarpaS..V.....T.....S.....G
C.lacustreV.....T.....L.....I.....G
X.laevisT.....M.....S.....I.....V.....G
PolloA..H	-Y..V.....L.....S.....I..I.....G
HombreYS.PV.....MT..S.....I.....G
Trucha	HPEVYILILP	GFGMISHIVA	YYSKKKEPFG	YMGVWAMMA	IGLLGFIVWA	HMMFTVGMDV	DTRAYFTSAT	MIIAIPGVK	VFSWLATLHG	GSIKWETPLL	WALGFIFLFT	VGGLTGIVLA
CarpaI..V..M.....S
C.lacustreI..V..A.....M.....T...DA.M.
X.laevisT.....S.....DLN.....SNM...SAAV.
PolloV.....A.....LS	..F.....R.....T...D..M.S
HombreT.....S.....F.....T...DP.M.I.....
Trucha	NSSLDIVLHD	TYVVVAHFHY	VLSMGAVFAI	MGAFVHWFPPL	FTGYTLHSTW	TKIHFGIMFI	GVNLTFFPQH	FLGLAGMPRR	YSYDPDAYTL	WNTVSSIGSL	VSLVAVIMFL	FILWEAFAAK
CarpaA.....L.....V.....SA.....A.....I.....S
C.lacustreAG.....FS..D..V.....I.....I..S
X.laevisM.....G.I.....E.....	A...V..ASA.....I.....MM	..I.....S
PolloA.....	LAG.T.....F...PS.	..A...V..TL.....	I.MT...LM	..V...S..
HombreG.I.....S.....	DQ.Y A...T...S.....T...IL..V..F	I..T..MLMI	MI...S..
Trucha	REVASIELTS	TNVEWLHGCP	PPYHTFEIPA	FVQVQAN*---
Carpa	...L.V...AY.....I.S.*---
C.lacustre	.Q.M.V...MRS.*---
X.laevis	..TTY....	.ML...Q...	T...LKTS-	L..INHQMIK*
Pollo	.K.LQP...A	..I..I.....E*---
Hombre	.K.LMV.EP.	M.L...Y...V	YMKS*-----

Figura 32. Alineamiento y comparación de las proteínas codificadas por el mtDNA de trucha arco iris y de otros vertebrados (Cont.)

COII

Trucha	MAHPSQLGFQ	DAASPVMEEL	LHFDHALMI	VLLISTLVLY	IIVAMVSTKL	TNMYILDSQE	IEIWTVLP	VILILIALPS	LRILYLMEI	NDEHLTIKAM	GHQWYSY	TDYEDLGFDS
Carpa	...T...K	...M...T...	...K...	...I...	...V...N...
C.lacustre	...T...F...A...	V...ITT...N.S...
X.laervis	...I...	...T...A	...F...	...TI.MT...	...TNLM.A...	...M...IM...	...IS...M...	...V...	...I...N...S...
Pollo	..NH.....	..S...I...	VE.....V	A.A.CS...	LLTL.LME..	SSNTV-A..	V.LI...I...	IV.V.L...	Q...M...	DE.D.L..I	...T...	...FK..S...
Hombre	...AA.V.L.	...T...I...	IT.....	IF...CF...	ALELTLT...	..TN.S.A.	M.T...I...	I.V.....	...MT..V	...S...SI	...T...	...GG.I.N.
Trucha	YMVPTQDLVP	GQFRILETDH	RMVVPVESPI	RVLVSAEDVL	HSWAVPSLGV	KMDAVPGRLN	QTAFIASRPG	VFYGCQSEIC	GANHSFMPIV	VEAVPLEHFE	KWSTMLEDA*	
Carpa	...A...	...M...V	N..SL....*	
C.lacustre	..I...T...M...	...I...	...L.AM...S...	N..L..K..*	
X.laervis	..I..N..T.	...V.N	...M...T	...L..T...T..I...H	...S...T...TD...	N..SS...-*	
Pollo	..T..T..PL	..H...V...	..I..I..M...	..IIT.D...	...A...	...T..I...	...S..TP...Y...	...ST..K...	A..SLLSS*--	
Hombre	..L..PLF..E.	..DL...DV.N	..V.L.I.A..	..MMITSQ...T..L	...T..I...	...T.T.T...	...Y...	...L..LI..KI..	MGPVFT.*---	

ATPasa 8

Trucha	MPQLNPAPWF	AILVFSWLVF	LTVIPPKVLG	HTFTNEPTSQ	STE-KAKPEP	WNWPWH*---	-----
CarpaG...I...	..I..T.I.S	..ISP...PV	..A...H.T.S	..D...*---	-----
C.lacustreT...	...MI...	..AI..T..M.	..SP.DSSPL	...H.T.S	..D...Q*---	-----
X.laervisG...	..L..I...L	..F...K	..KAF...T	..T...S..N.	...T*---	-----
PolloN...	..S.MLLT.FT.	..SLL.Q..L.S	..F.L..N.ANK	..I.T.T..T.	..T...T*---	-----
HombreTTV.P	..TMITPML.TL	..FLITQL.M.N	..TNYHLP.SPK	..PMKM.NYNK.	..EPK.TKICS	..LHSLPPQS*

ATPasa 6

Trucha	MILSFEDQFM	SPTYLGIPLI	AVALTLPWIL	FPTPSARW-L	NNRLITLQGW	FINRFTQQLL	LPLNLGGHKW	AALLTSLMLF	LITLNLGGLL	PYTFPTPTQL	SLNMGLAVPL	WLATVIIGMR
Carpa	..MV.....A	..S.....N.	..IA...V.	Y..P...II...N..M	...V....L	..A...I...	..I.....F.....
C.lacustre	..AM.....A	..S.....	..I..IA...V.	..L..L...VI...	..L...N..M	...T...L	..A...V...	..I.....I.....L
X.laervis	..N.....	..VI.....	..I.MLD.FT.	..ISW.IQSNFS	..LHN..T-IF	YQ.TSP...	..L.....L	..MS..L...MA-S
Pollo	..N.....S	..CL.....	..LPS.L..AL.	..L.S.GN...I	...S.I.L.	..THLI.K..M	..T...KA...	..L.....I.M	..LSI.L...M..A..L...	..LLT.L.
Hombre	..NENL.AS.I	..A..I..L.AA	..VLIILF.PL.	..I--.TSKYLIT.Q.	..L.KLTSK.MM	..TMH.TK.RT.	..SLM.V..II.	..IA.T.L...	..HS.....	..M.LAM.I..	..AG...M.F.
Trucha	NQPTAALGHL	LPEGTPVPLI	PVLIIIEETIS	LFIRP-ALGV	RLTANLTAGH	---QLIATAA	FVLLPMMPTV	AILTSIVLFL	LTLLEIAVAM	IQAYVFLVLL	SPLYQENV*	
Carpa	...I...	...I...L..L...LLI.....VAA...	...V...*	
C.lacustre	...V...D.	...L...L...LLI.....VAT...	...V...*	
X.laervis	KPTNY.....	...T...L...LLI.....SI...*	
Pollo	...S.S...	...T...	..A..M...T.	..L..L...LLI...S..T	..IA.....SI	..SA..ALI...	..I..V...I*	
Hombre	SKIKN..A.F	..Q...T...	..M.V.....	..L.Q.M..A.	...I...	..LLMH..GS.T	..LAMSTINLPS	..TLIIPTI.I.	..I.....L	...T..V	...HD.T*	

Figura 32. Alineamiento y comparación de las proteínas codificadas por el mtDNA de trucha arco iris y de otros vertebrados (Cont.)

COIII

Trucha	MAHQAHAYHM	VDPSPWPLTG	AIAALLLTSG	TAVWFHFHSL	TLLTLGNILL	LLTMYQWWRD	IIREGTFQGH	HTPPVQKGLR	YGMILFITSE	VFFFLGPFWA	FYHASLAPTP	ELGGCWPPAG
CarpaM...	L.I.....T	..M..L...L...S.....T.	
C.lacustreR.F...	L.I.....Q.VL...S.....T.	
X.laervisV.....	L.M.....G.M	I.....L.TM	V.....I.....	V.....I.....NS.....YE.....T.	
PolloS.....	IP.A.....T	LIM...YS.T	..M.LLSM	..V.L.....	VV.S.....	T.....A.....F.S.....Q.....T.	
Hombre	..T.S.....	..K.....	..LS...M...	L.M.....M	..M..LLTN	T.....	VT..S.Y...A.....S.....	Q...H...RT.
Trucha	ITTLDPPEVP	LLNTAVLLAS	GVTVTWAHHS	IMEGERKQTI	QALTLTILLG	FYFTFLQGME	YVEAPFTIAD	GVYGSTFFVA	TGFHGLHVII	GSTFLAVCLL	RQVQYHFTSE	HHFGFEAAAW
Carpa	..P.....A.....	..S.A.....	L...A.A...I.....
C.lacustre	..P.....	L...A.A...	..A...I..	V...A.A...S.....I.....
X.laervis	..P.N.....H.D.EA.	..S.....	L...A.A...L.S.....I.....	..K.....
Pollo	VKP.N.L...I.....T.N...A.	H.....	..A.A...	H..S.S...	S.....S.T.....	..LIKF...PN
Hombre	..P.N.L...S.....	..SI.....	L..NN.N.M.	..LI.....	L...L..AS.	..F.S....S.	..I.....TI.FI	..LMF...K
Trucha	YWHFVDVWVL	FLYVSIYWVG	S*									
Carpa*									
C.lacustre*									
X.laervis*									
PolloII..	..M.M...	..*									
Hombre*-									

NADH 3

Trucha	MNLITTIITI	TITLSAVLAT	ISFWLPQISP	DAEKLSPYEC	GFDPLGSARL	BFSLRFFLIA	ILFLFDLEI	ALLLPLPWGD	QLHPTTLTIL	WSTAVLALLT	LGLIYEWTOG	GLEWAE*
Carpa	..M.L...	..VA..LI...	V.....MN.V.N..G.FF	..A.T..I...*
C.lacustre	..VIS.LA.	..I..SI..V	V.....MN.I..V.A.....	..YSA.G.FF	..A...I...*
X.laervis	..-TA.LM.	AM...TI..I	L.....MT.	..M.....M.	..M.....	..T.....F..AA	..N..SIVIL	..AALI.T...L...	..*
Pollo	..TL.FMLS	SFL...A.T.	MN...A.MA.	..T.....I..V.AI	..AH.MM.T	..A.TII...	..P.....	..*
Hombre	..FAL--LM.	NTL.ALL.MI	..T.....LNG	YM..ST...MSP..V	..MK...V.AL	..TINLP.MVM	S.LLLIII.A	..S.A...L.K	..D.T.*

NADH-4L

Trucha	MTPVHFSFTS	AFILGLMGLA	FHRTHLLSAL	LCLEGMMLSL	FIALSLWALQ	MEATGYSVAP	MLLLAFSACE	ASAGLALLVA	TARTHGTDRL	QSLNLLQC*		
CarpaS.....A.....	..P.S..F.T.T.....N.....*		
C.lacustreY.....A.....	..F.S..F.T.PG.....N.....*		
X.laervis	..LI...C.T...	LN.SPI..I.L.MS	MDGIV.TP.H	LTIYLS.MML	YIM.P.A.P.	..AT..S.NSD	HYT....K.	F.....E.*		
Pollo	..S.L...Y.	..TFSSL...I.....S...M	..P..I.PVE	NOTPSFALV.	I.M.....	..GT...M...	S.....S.H.	HN.....*		
Hombre	..PLIYMNIML	..TIS.L.ML	VY.S..M.S.MAT.MT.N	THSLLANIV.	IAM.V.A...	..AV.....S	ISN.Y.L.YV	HN.....*		

Figura 32. Alineamiento y comparación de las proteínas codificadas por el mtDNA de trucha arco iris y de otros vertebrados (Cont.)

NADH-4

Trucha	MLKILIPTLM	LFPTIWLSPA	KWLWITSIAQ	SLIIALASLS	WLKWSSETGW	SSSNLYLATD	PLSTPLLVLV	CWLLPLMILA	SQSHLSPEPL	NRQRAYISLL	VSLQTFVLVA	FGATEIIMFY
Carpa	...V...I...	...TSP...	...TT.H...	...L...SI...T...	...T...T...	...M...KG...	...L...L...	...L...L...	...N.IN...I...	S.ESL...T...	AL...IM...	...
C.lacustre	...V...I...	...T.P...	...S.TT.H...	G.L...I...T...	...V.S...	AT.S...S...	...G...V...	...N.IT...I...	I...L...T...	A...IM...
X.laevis	...L...I...	I.ST...TNK...	...PSLTS...	...S.L...M...	FFNQ...TH...	F.NY.-MTI...	QI...I...	...LI...N...N...	I.S...TF.TM...	F.LS.IM...	S...L.L...	...
Pollo	...IL...I...	L.AL...SM...	NTTMY...	L.SI...H...	T-P.YYPT...	KTLT.WTGM...	QI...S...	F...M...G.QH...	H.K.K.MF...T...	III.P.II...	S...LML...	...
Hombre	...LIV...I...	L.LT...KK...	HMI.INPTTH...	...SIIP.L...	FFNQINNLF...	C.PTF-SS...	T...M...T...	T.M...R...S...	S.KKL.L.M...	I...IS.IMT...	T...L...	...
Trucha	VMFEATLLPT	LIITRWGNQ	TERLNAGTYF	LFYTLAGSLP	LLVALLMQN	DNGTLSMFTL	QYTQPLHLIT	WGDKLWAAAC	LLAFLVKMPI	YGVHLWLPKA	HVEAPIAGSM	ILAAVLLKLG
Carpa	I...I...	L.Q	ST...LV...	S...Q.NS...	HMF...G...	I...V...	V...V...
C.lacustre	I...I...	L.Q	T...ILLI...	HS...A.TS...	H.I...G...	I...V...	V...V...
X.laevis	I...I...I...	...	A...	...	SLYS	ST...LNL...	LLPNHIPM...	ANYS...L...	M...T...	V...I...
Pollo	IS...I...	L...	P...S...I.L...	IS...	SI.YLHT	NT...HLPII...	KL.H.NLPAS...	TSL.SSL.L...	M...M...A...	L...L...	L...L...	...
Hombre	IF...T...I...	A...	P...	V...	I...IYTH...	TL.S.NILL...	TL.AQELSNS...	ANN.M.L.Y...	TM...M...	L...V...	V...V...	...
Trucha	GYGMMRMVM	LDPLTKELAY	PFIVLALWGI	IMTGSICLRQ	TDLKSLIAYS	SVGHMGLVAG	GILIQTP-WG	FTGAILMIA	HGLASSALFC	LAN-TSYERT	HSRTMLLARG	QMILPLMTT
Carpa	...S...S...	I...	S...	...	S...	V...	A...	I...	L.V.F.TAV	...
C.lacustre	...V...S...	I...	S...	...	S...	V...	A...	I...	L...F.TAV	...
X.laevis	...II.ISIT...	S.SM...	LI.S...	S...	M...	S...IS...	AGNN...MKA...	L...M.NTS...	D...TH...C...	KYQ...	AL...S...	LET...G...
Pollo	...I.VTLL...	ME.VSNF.H...	LT...A...	L.S...	...	S...IA...	ASM...Q.S...	S...M...S...	T...L...	N...	ILI.T...	L.PL...SV
Hombre	...LTLI...	N...HM...	L.S...M...	S...	...	IS...A.VT...	A...S...	V...	T...L...	SN...	I.I.SQ...	L.TL...AF
Trucha	WVFVASLANL	ALPELPNLMG	EIMIIITSMFN	WSYWTLILTG	LQTLITASYS	LYLFLMTQRG	PLPSHIIALE	PHTTREHLI	ILHLIPIVLL	ILKPELMWGW	CF*-	
Carpa	...I.N...	...	TL...	P...IL...	...	G...M...S...	T.N.MG.Q...	F...M...T...	VI...VT...	Y.*		
C.lacustre	...I.N...	...	TL...	PL.I...	T...	S...T.K.VG.P...	F...M...A...	VL...MT...	I...Y.*			
X.laevis	...LISN...M...	S.W...	IT.M.AL...	S...I...D...	L...	M...MT.P.E.LN.IN...	T.M...TM...	IP...MM...	I...L.F.C*			
Pollo	...LL.N.T.M...	TT...A...	T.MVAL...	SP.I...	TA...L...T...	ML.S...T...	T...TTP...	NSN...M...	T...I...MLT...	IS.T...	PL.*	
Hombre	...LL...	TI...L...	SVLVTT.S...	NI...L...	NM.V.L...	M.TT.W...	S.TH.NNMK...	SF...NT.M...	FM...S...L...	S.N.DIIT.F...	S-S*	

Figura 32. Alineamiento y comparación de las proteínas codificadas por el mtDNA de trucha arco iris y de otros vertebrados (Cont.)

NADH-5

Trucha	MHPTTLILSS	SLLMIFTLII	YPLITLTPPT	POHKNWALTH	VRTAIKMAFL	VSLLPLEFVL	DQGTETIVIN	WQWMNITTFD	INLSFKFDHY	SIIFTPIALY	VTWSILEFAS	WYMHADPNMN
Carpa	-----MH	...L...FI.V	...L...N.N	Q.DS.-MAGM	T...VSS..FMI..	NLK..G.I..QA..	V.I.....	..L.V.....L....S...ID
C.lacustreP.....	...LVIII..	...VL.S.N.N	..NPK..TS..	...VSS...IA....H....	...M....	...I.....Y	..LV.....YV..
X.laevis	.N-PP..FN.	.M.ITISI..	L.IL--MSTF	NMNIMNLHHL	I..SV.T...	I..II..II..	...L.S.T...	PH...IN...	..M....I..	..S..I...FT....	...AS..MIS
Pollo	.E-.P.L.NT	LTTLLTLT.L	T.I.--P.L	LNL..SPMSI	T...T...	I..I.TTI.I	HS.A.S.A.H	E.QFIPN.K	PI.L.M.M.	MM.F...FT....	...ASE.FIT
Hombre	.T---MHTT	MTTLTL.S..	P.IL...-VN	.NK..SYPHY	..SIVAST.I	I..F.TTM.M	CLDQ.V.IS	.H.AT.Q.TQ	LS...L.YF	MM.I.V..FM..SL	...NS...I.
Trucha	RFFKYLLLEFL	IAMIILVTAN	NMFQLFIGWE	GVGIMSFLII	GWHGRADAN	TAAMQAVIYN	RVGDIGLILS	MAWFATNLNS	WEIQQMFASS	KGLDLTLPLM	GLILAATGKS	AQFGLHPWLP
CarpaT..VL.....MT	...L.M....	...I..L..	..NF.M.I...	..A.....
C.lacustreT..TY.....	...L.W...M...	...L.M....	...I.FL..	..DF.M....
X.laevisT..V.VF..F...YA..EP..	...L....V.M....	..M..V.MLN	SD-N...L
Pollo	K..T...T..	...LT.TI..	...L.V...Q..E...	...L.M....	...I.....	...L.SS..T	...I--TH	PNQTP...L
Hombre	Q.....I..	..T.L.....	..L.....S..YA...	...I..IL..	...I...F..A	...L..ILHS..	..DP...ALLN	ANPS...-L	..L...A...	..L.....
Trucha	SAMEGPTPVS	ALLHSSTMV	AGIFLLIRLH	PLMEDNQAL	TVCLCLGALT	TLFTATCALT	QNDIKKIVAF	STSSQLGLMM	VTIGLNQPQL	AFLHICTHAF	FKAMLFLCSG	SIHSLNDEQ
Carpa	V.....R.N..L..	..T.....	..S.....
C.lacustre	A.....	AI..N..L..	..T.....	..S...A...
X.laevis	A.....IS	..M.NN...	..I.....M.	...A.....IF-..	..F...NN..	..VYY.F...	QYSSC...
Pollo	A.....T..	..FLSS.K...	..T.....S	...A.....I..DL...	...S....	...L.....	...G...
HombreF..	..A.NSPLIQ	..LT.....I.	...A.V...I...H.M....	...N..N..
Trucha	DIRKMGGMHN	LTPSTSSCLT	IGSLALTGTP	FLAGFFSKDA	IIEALNTSHL	NAWALTTLTL	ATSFTAIYSL	RVIFFVSMGH	PRFTATAPVN	ENNPSVINPI	KRLAWGSIIA	GLLITSNFLP
CarpaLF.	IM.A..TYFY..IV..F	LVY..I..T	...LPLS.I	...L...T.I..Q..P.
PolloCLQK	TL.M.T...	..N..M...Y...L	..N...YI	..T...S...V..F	..V...T	...LPLS.I	...A.....I...L.
C.lacustreLQ.	..L.F..T...M..Y.IF	...A....	..SNPLS.I	...KT....V...	...A..M..
HombreLLK	TM.L..TS..A.M.	..T..Y...H	...TA.M.YT	...SI..IT...	MTLL.QT..	T.TPSNH.I	..T.PA.L.	M...L..M.	...S.LI..
X.laevisLQ.	SL.I.T...QT	..T.....I	...L.SA..T	M.LLTLT.Q	...PTLTNI.	...TLL...	..G..A..LF.	..F...N.IS.
Trucha	TNTPVMTMPT	HLKLAALLVT	ISGLLIALEL	ASLTKQFKL	HPTLTLHNFS	NMLGFFPAII	HRLTPKLNLT	LGQTIASQMV	DHTWFEKVGP	KELFQLTCLM	VTTTSNIQQG	MIRTYLTLFF
Carpa	MK..I...SI	T..M...M..	..A...V.M..	..N..S..V.I	T.MIST.H..Y.M..	...I...K..	...SA.T.L-	..K..L.T...	..G.ALTQMA	AKI.ND.TR.I.L
C.lacustre	SKS.....P	T..M...M..	AI..FT.M..	..T..S..Y.T	N.ITQT.H..SVV	..MK.....	...LA.T...	..Q...AA..	..GASSTQIK	AKI..DT.R.I.L
X.laevis	I.S.I....	LA.Q..II.S	VT..I..MD.	SK..TY-INQ	ESKTNI.S..	..L...T..	..MM..T..N	..A.N..THLI	..LS.Y..S.	QGMVNQQLP	IK..T....	...L.....L
Pollo	PK..P....	IT.T..II..	TL.IIL...	S...SYSLTP	PKHNP.M...	SS..Y.NPLT	..IS.SIL.H	T..K...HLI	..MA.YK.M..	EG..AN.HLT	TKISTTLHT	..L..S..GS.A
Hombre	ASPFQT.I.L	Y...T..A..	FL...T..D.	NY....-L.M	KSP.CTFY..Y.S.T	..TI.Y.G.L	TS.NLPLLL	..L..L..LL.	..TIS.HQIS-	TSIITST.K.	...L.FLS..
Trucha	LSTTLAVLLT	LT*
Carpa	..TLI..TIPV	..L*
C.lacustre	..T.A..TR.A	TI*
X.laevis	MPS--.III.	..F*
Pollo	..TILTPI..I	QK*
Hombre	FPLI.TL..I	T*-

Figura 32. Alineamiento y comparación de las proteínas codificadas por el mtDNA de trucha arco iris y de otros vertebrados (Cont.)

NADH-6

Trucha	MTYLVSFLFL	GLVLGLVAVA	SNPAPYFAAL	GLVVAAGVGC	GVLVGHGGSF	LSLVLFLIYL	GGMLVVPAYS	AALAAEPPPE	SWGDRSVLGD	RSVLGYVVVY	TVGVVLVAGL	-FWGGWYE-T
Carpa	...FMF.L.M	A.V.....	...T.....	A.S.....L..	LL..G...IG
C.lacustre	...L.M	A.IV..I...S.....	A...V.-MI.	LL..G.MV.V	...E...G
X.laevis	.I.M..VSMM	V.....	...S.FY...	...L...A..	L.I.SF.S...	...I.....-R.K.Y..	A..SW..VF-L..	LI..LV----	-----LFL
Pollo	...F.IFLGI	CFM..VL...	...S..YGVV	...SVM...	..W..SL.V..	V..A...V..V..	VS...D.Y..	A...WR.V.-	-YG..F.L.V	WM...GGLV	D....-K.V
Hombre	..ALF.LSV	...M.F.GFS	.K.S.IYGG.	V.I.SGV...	VIIINF..GY	MG.MV.....	...M...G.T	T.M.I.EY..	A..S-----	--GVEVL.SV	L..LAMEV.F	VL.VK--.YD

Trucha	SWAVDEFKE	FS-----	---VLRGDT	GVALMYSHGG	GMLIACAWVL	LLTLFV--VL	ELTRGLSRGA	LRAV*				
Carpa	...V..GL..I..	...V...S...	...VI.....	...L.....*				
C.lacustre	...VI.GL..E...Y..	...VI.....T	I...*				
X.laevis	GG.E..GMNK	S.ELGSY...	...M...WV	...CWW	-VI.VYW..S	IIIN..CGIW	VNSKSMWES	-SC.*				
Pollo	GV.T..G-GG	V.....	...FA.L.F.	...VF..C.V	.LFLVAG.G.	..A.....	...V.....	I...*				
Hombre	GV.V.VN.NS	VGSWMIYEGE	GSGFI.E.PI	.AGAL.DY.R	WLVVVTG.P.	FVGVYI...I	.IA..N*----	----				

Cyt b

Trucha	MA-NLRKTHP	LLKIANDALV	DLPAPSNISV	WNFGSLLGL	CLATQILTGL	FLAMHYTSDI	STAFSSVCHI	CRDVSYGWLI	RNIHANGASF	FFICIYMHIA	RGLYYGSYLY	KETWNIGVVL
Carpa	...S.....	...I.....	...T...AI.....T...	...N....	...V.....
C.lacustre	...S.....	...I.....I.....A...	...N....L.L...
X.laevis	..P.I..S..	.I..I.NSFI	...T...S	L.....V	...IA..I..A.T	..M...A..	..F..N..L..	..L...L..	...L...L.GF..I..
Pollo	..P.I..S..	..MI.NS.IAAV	..M.....	L.....A.T	..L...A.T	..N.Q....	..L.....	...FL..GT..I..
Hombre	..TP-M..IN.	..M.LI.HSFI	...T...AA	..IL..T..SP.AIA..	T...N...I..	..YL.....M	...LFL..GF..	S.....II.

Trucha	LLLTMMTAFV	GVVLPWQMS	FWGATVITNL	LSAVPYVCGA	LVQWIWGGFS	VDNATLTRFF	AFHFLPPFVI	AAATVLHLLF	LHETGSNPA	GINSADKIS	FHPYFSYKDL	IGFVAMLLGL
Carpa	...V.....M.DML....	...II....I	..L...V..I..A.
C.lacustre	F..V.A...DMIV..	..V.I....V....
X.laevis	.F.V.A...K..I.NV	...SL...L..I..	..G.SI....	...T..T	..L...P..VPLI..TA.
Pollo	..TL.A...F..I..I.HT	...E.A...	...P....	..L...L.A.	..GI.II..T.	..S...L..	..S..S..P	...Y.F..I	..LTL..TPF
Hombre	..A..A..MI..I.TDY..	..SP.....	T...IL..I..	..LAT....L	..T.HS...T	...YTI..A	..LLL.F..S.

Trucha	TSLALFAPNL	LGDPLNFTPA	NPLVTPPHIK	PEWYFLFAYA	ILRSIPNKLG	GVLALLFSIL	VLMVVPILHT	SKQRGLTRP	LTQFLFWALV	ADMLILTWIG	GMPVEHPPII	IGQVASVIYF
Carpa	..L...S...	...E.....L.....I.....	I...T...II...L..
C.lacustre	..T...S...	...E.....V.....	A...T...IY...	...I..IL..
X.laevis	..L..M.S...	...I.....M-	...VL...	I.ALM.L...	...S.M...	F..IM....	..T.....	..Q...D.YTM	...L...LS..
Pollo	LT...S...	...E.....AA.V.	I.FLI.F..K	...TM...	..S.T...L..	..NL.....	SQ.....	...M..LS..
Hombre	MT.T..S.D.	...Y.L..	...N.....	...T...	...V.....	...L...	I.AMI...M	...QSMM...	..S.S.Y.L.A	..L.....	..Q..SY..T.	...L...

Trucha	TIFLVLSPLA	GWAEIKALQW	A*
Carpa	AL..IFM...	..L.N...K.	*.
C.lacustre	AL..I.I...	..L.N...E.	V*
X.laevis	S..IIMF..M	..V.N.L.N.	*-
Pollo	..L.I.F.TI	..TL.N.M.NY	*-
Hombre	..TI..I.M.TI	SLI.N.M.K*	--

Figura 32. Alineamiento y comparación de las proteínas codificadas por el mtDNA de trucha arco iris y de otros vertebrados (Cont.)

9. EXTRACCION DE mtRNA.

EL mtRNA representa sólo un 0.5% de la cantidad total del RNA celular, por lo que su aislamiento suele plantear la necesidad de un enriquecimiento previo. Tradicionalmente este enriquecimiento se conseguía manteniendo la contaminación nuclear al mínimo mediante el tratamiento con nucleasa de micrococos o inhibidores de la transcripción nuclear, seguido del aislamiento de las mitocondrias por centrifugación diferencial. En nuestro caso (Métodos, sección 2.4) para reducir al máximo la contaminación nuclear se realizó exclusivamente una rotura celular controlada, seguida de lavados sucesivos de la fracción mitocondrial obtenida por centrifugación diferencial. Con esta técnica, el rendimiento obtenido fue de 30 µg de mtRNA por gramo de hígado, únicamente contaminado con pequeñas cantidades de rRNA nuclear (Fig. 33, calle 1).

Con el objeto de mejorar la purificación, las fracciones poliadeniladas fueron separadas del resto del mtRNA mediante dos pases consecutivos a través de una columna de oligo(dT) - celulosa. Los componentes de cada una de las dos fracciones resultantes de la cromatografía (A⁺ y A⁻) fueron separados mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de hidróxido de metilmercurio (CH₃HgOH) y posteriormente teñidos con bromuro de etidio. De esta forma se pudieron identificar, al menos, 8 bandas discretas, variables en intensidad y tamaño, en la fracción poliadenilada y dos en la no poliadenilada (Fig. 33, calles 2 y 3).

10. IDENTIFICACION DE LOS DIFERENTES mtRNAs.

Aunque el patrón electroforético obtenido para las especies de mtRNA de trucha arco iris recuerda al descrito en células HeLa (Montoya y col., 1983), ciertas diferencias en la movilidad relativa de las bandas impedían la identificación directa de las diferentes bandas. Por ello, el estudio se completó con la realización de hibridaciones entre las diferentes especies de mtRNA obtenidas y las sondas preparadas a partir del mtDNA de trucha arco iris previamente clonado. Para que la identificación fuese inequívoca, las sondas fueron diseñadas de tal manera que cada una de ellas



Figura 33. Patrón electroforético del mtRNA de trucha arco iris. Los componentes de las fracciones resultantes de la cromatografía con oligo(dT)-celulosa fueron separados mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de hidróxido de metilmercurio (CH_3HgOH). La calle 1 corresponde al mtRNA total extraído de las mitocondrias antes de la cromatografía. Se puede apreciar la presencia de cierta contaminación con los rRNAs nucleares (28S, 18S y 5S). Las calles 2 y 3 muestran la fracción no poliadenilada (A^-) y la poliadenilada (A^+) respectivamente.

<u>Clon</u>	<u>Corte</u>	<u>Tamaño (kb)</u>	<u>Gen</u>	<u>RNA</u>
pTRZ-16	HindIII-HincII	0.7	12S	12S
pTRZ-16	HincII-ApaI	1.5	16S	16S
pTRZ-11	HindIII	0.2	ND-1	13
pTRZ-14	PvuII	1.0	ND-2	12
pTRZ-12	HindIII	1.1	COI	6 / 9
pTRZ-3	PvuII	0.4	COII	16
pTRZ-3	HindIII	0.1	ATPasa 8 + ATPasa 6	14
pTRZ-15	PstI	0.3	COIII	15
pTRZ-6	HindIII-BamHI	0.7	ND4L + ND4	7
pTRZ-2a	PvuII	0.4	ND 5	5
pTRZ-2a	PvuII	0.3	Cyt b	11
pTRZ-0	HindIII	0.6	D-loop	18

Tabla V. Sondas utilizadas en la identificación de las diferentes especies de mtRNA. Se representan los sitios de restricción utilizados para generar las diversas sondas, su tamaño, la especie de mtRNA que reconocen y el gen al que corresponden. Todas las sondas reconocen un único RNA excepto la sonda realizada a partir del clon pTRZ-0 que comprende el final del D-loop y el inicio del gen 12S y, por lo tanto, puede reconocer los RNAs 18y 12S.

sólo pudiera reconocer una especie de mtRNA (Tabla V).

La hibridación con las sondas anteriormente descritas permitió asignar claramente cada una de las especies de mtRNA, observadas en los geles teñidos con bromuro de etidio, a un gen determinado. Siguiendo la nomenclatura establecida por el grupo de Attardi (Montoya y col., 1983), en la fracción no adenilada del mtRNA de trucha arco iris, se pudieron identificar los rRNAs 12S y 16S, así como la presencia, en menor cantidad, de su precursor no procesado, el RNA 4a (Fig. 34, a). Por otra parte, la sonda que reconocía el rRNA 12S, hibridaba con una especie de mtRNA no adenilada de menor tamaño, que no ha sido caracterizada hasta ahora. Así mismo, el RNA 18 descrito en células HeLa (Montoya y col., 1983), no ha podido ser detectado entre los RNAs de trucha arco iris directamente en los geles teñidos con bromuro de etidio, ni mediante una hibridación con un fragmento que comprende la zona del D-loop donde teóricamente debería estar codificado.

En la fracción poliadenilada, se identificaron de forma precisa los mtRNAs 5, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15 y 16 que corresponden, respectivamente, a los genes ND5, ND4L y ND4, COI, Cyt b, ND2, ND1, ATPasa 8 y 6, COIII y COII, todos ellos codificados por la cadena pesada (Fig. 34, c). Los RNAs 7 y 9 migraron a la misma altura, y lo mismo ocurrió con los RNAs 11 y 12. La sonda que permitió reconocer el rRNA 16S en la fracción no adenilada, reconoció el mtRNA 10 a la misma altura en la fracción A+. Merece especial mención la detección, mediante sobre-exposiciones, de una especie de mtRNA que migraba entre los RNAs 7 y 9 y que hibridó, tanto con la sonda que reconoce el RNA 14 como con la que reconoce el RNA 15 y que, por lo tanto, se podría sospechar que es un precursor no procesado de ambos (Fig. 35). La hibridación con la sonda que reconoce el RNA 9 no permite detectar el RNA 6. Por otra parte, no se pudo preparar a partir del mtDNA clonado una sonda para detectar el RNA 17, debido a que el gen ND3 no contenía diana alguna para las enzimas de restricción habituales. Se intentaron otras estrategias alternativas, como la hibridación con oligonucleótidos específicos de dicho gen o el marcaje de la cadena pesada del fragmento de restricción que contenía el gen a partir de un oligonucleótido específico, pero ninguna de ellas permitió identificar dicho RNA.

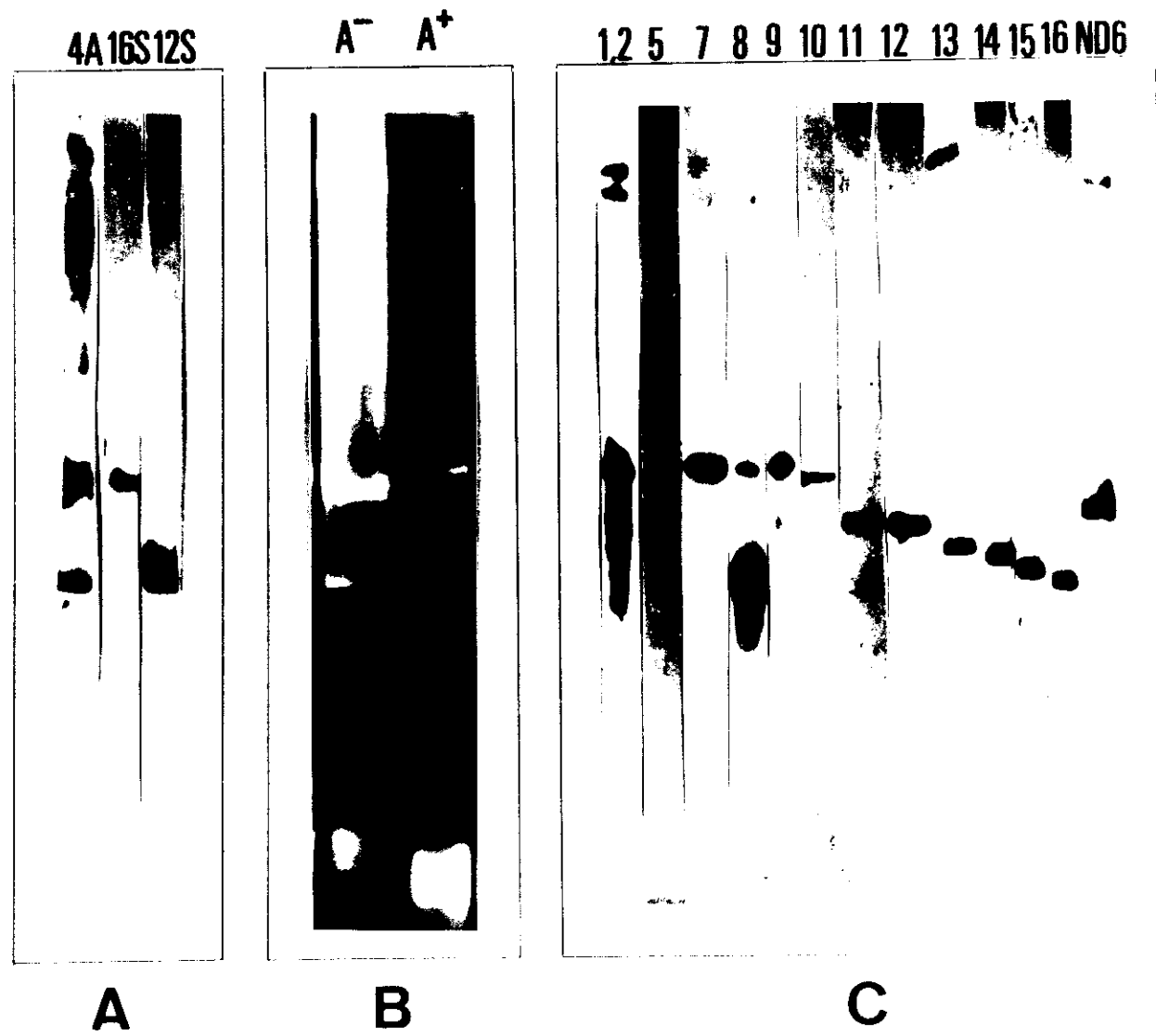


Figura 34. Identificación de los transcritos del mtDNA de trucha arco iris mediante hibridación. a) Detección de los mRNAs no adenilados (A⁻). b) Patron electroforetico de las fracciones no poliadenilada (A⁻) y poliadenilada (A⁺). c) Identificación de los mRNAs poliadenilados (A⁺). La nomenclatura utilizada corresponde a la establecida para los transcritos de células HeLa (Montoya y col., 1983).

Con el fin de poder detectar los transcritos de la cadena ligera y en especial identificar la existencia de un RNA específico del gen ND6 se preparó, utilizando como molde la cadena pesada del clon pTRZ-2a, una sonda marcada al azar a partir de un oligonucleótido que contenía parte de la secuencia de la cadena ligera en la región del gen ND6. Esta sonda hibridó con un RNA que migra en los geles de agarosa a la misma altura que los RNAs 11 y 12.

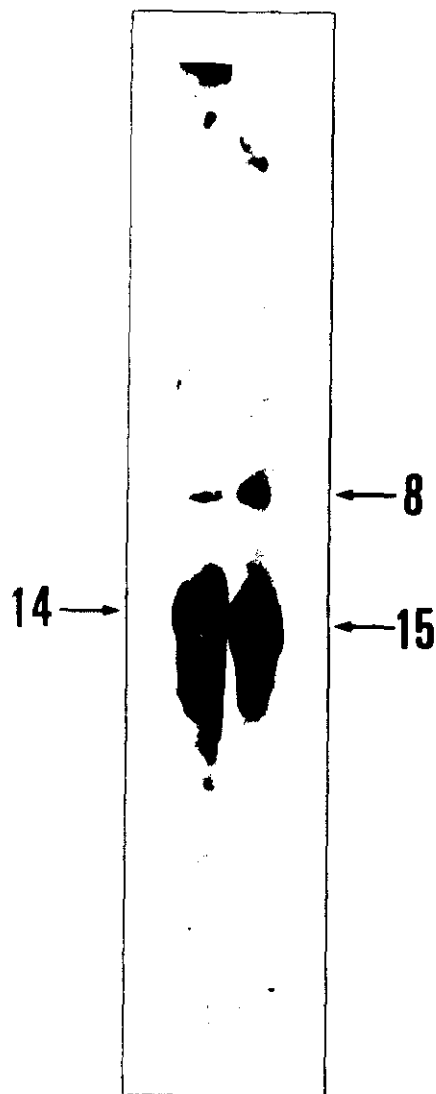


Figura 35. Detección de un mismo RNA con las sondas que reconocen los genes de las ATPasas 8 y 6 y el gen COIII. Es muy probable que este RNA corresponda a un precursor aún no procesado de los RNAs 14 y 15.

Además, una sobreexposición de los filtros hibridados, permitió detectar dos bandas que, por su migración, podrían corresponder a los RNAs 1 y 2 descritos en células HeLa (Montoya y col., 1983). Estas dos bandas también fueron detectadas cuando se hibridó con las sondas para los genes ATPasa 8 y 6, COIII y COII, y la de mayor tamaño incluso con las sondas para los genes 12S y 16S. Por el contrario, ninguna de las sondas utilizadas permitió detectar el RNA 3.

11. ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

Cualquiera de los genes que forman parte del genoma mitocondrial de la trucha arco iris puede utilizarse en un análisis filogenético. Sin embargo, no todos contienen el mismo número de sitios informativos ni poseen el mismo ritmo de sustituciones en sus secuencias. Además, la elección de unos u otros genes depende del tipo de relaciones filogenéticas que se desee investigar. Finalmente, es necesario tener en cuenta, a la hora de elegir un gen concreto, el número y posición evolutiva de los organismos en los que este gen está también secuenciado. El número de organismos en los que se ha secuenciado totalmente el genoma mitocondrial es pequeño y, más concretamente, sólo se conoce la secuencia completa del mtDNA de dos peces (*C. carpio* y *C. lacustre*). La escasez de secuencias impide, por lo tanto, realizar un análisis exhaustivo de las relaciones filogenéticas entre los peces e incluso entre los teleósteos. Tampoco es factible utilizar los genes mitocondriales para establecer las relaciones filogenéticas entre los vertebrados, puesto que no existe aun ningún mtDNA secuenciado de reptil y sólo uno de anfibios (*X. laevis*) y otro de aves (*Gallus gallus*), lo que impide la obtención de árboles filogenéticos con alto margen de confianza

A partir de los datos de secuencia disponibles en la actualidad, las únicas cuestiones filogenéticas abordables a nivel de peces son: 1) el establecimiento de las relaciones evolutivas entre actinopterigios (teleósteos) y sarcopterigios (celacanto y peces pulmonados) y su relación con el origen de los tetrápodos (vertebrados terrestres) y, 2) el establecimiento de las relaciones entre condriictios (peces cartilagosos) y osteictios (peces óseos).

Para resolver este tipo de cuestiones filogenéticas, son especialmente indicados los genes mitocondriales que codifican para el rRNA 12S y para el citocromo b. Ambos presentan un ritmo de sustituciones constante, siendo sus sitios informativos distintos al codificar uno para rRNA y el otro para una proteína. Además tienen una ventaja adicional, y es que son los genes que más se han utilizado en el estudio de cuestiones evolutivas dentro de los peces, por lo que el número de especies que se pueden incorporar al análisis, es mucho mayor.

11.1. Análisis en función del gen rRNA 12S.

La secuencia completa del gen 12S rRNA de trucha arco iris (944 nucleótidos) fue alineada y comparada con todas las secuencias de peces que, para este gen, se encuentran actualmente disponibles en los bancos de datos GenBank y EMBL, así como con las secuencias correspondientes de anfibios. A partir de los alineamientos, se calcularon las matrices de distancias utilizando los métodos de Kimura (1968, 1980) y Jukes-Cantor (1969). En la construcción de árboles se utilizó como especie externa el celacanto (*Latimeria chalumnae*). Los algoritmos de Fitch y Margoliash (1967) y de unión por vecindad (Saitou y Nei, 1987) se aplicaron a las matrices de distancia generadas, dando lugar a los correspondientes árboles. Estos, presentaban todos la misma topología, diferenciándose unos de otros, únicamente, en la longitud de sus ramas (Fig. 36, a y b). Por otro lado, se aplicó directamente a los datos de secuencia, el método de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1981), obteniéndose la misma topología que con los métodos de matrices de distancia, pero con ramas de longitud ligeramente distinta (Fig. 36, c). Finalmente, el algoritmo de máxima parsimonia (Fitch, 1977) fue aplicado directamente a los alineamientos de las secuencias de nucleótidos obteniéndose un árbol con una topología ligeramente distinta, en la que los peces pulmonados dejan de comportarse como un grupo monofilético (Fig. 37, b).

El nivel de confianza estadística de los árboles estimados por los diferentes métodos se evaluó mediante la generación al azar de 100 variantes del grupo de secuencias original [bootstrap (Felsenstein, 1985)].

A continuación, a partir de cada variante se construyó el correspondiente árbol mediante los métodos de máxima parsimonia y unión por vecindad. Finalmente, se realizó un árbol consenso de los 100 árboles generados por el algoritmo de máxima parsimonia (Fig. 37,a) y de los 100 generados por el algoritmo de unión por vecindad (Fig. 37,b). En los árboles consenso obtenidos, cada nodo presenta un valor que corresponde al número de árboles en los que aparece dicho nodo, proporcionando de esta manera, una significación estadística a las ramas que parten del mismo.

11.2. Análisis en función del gen del citocromo b.

La secuencia completa del gen que codifica para el citocromo b de la trucha arco iris (1141 nucleótidos), fue alineada con las secuencias análogas de tres condriictios (*C. plumbeus*; *S. tiburo* y *G. cuvier*), el esturión (*A. transmontanus*) y tres ciprínidos (*C. carpio*; *C. lacustre* y *L. roseipinnis*). El análisis de los alineamientos generados mediante los métodos de unión por vecindad, Fitch-Margoliash, máxima verosimilitud y máxima parsimonia permitió construir los correspondientes árboles filogenéticos, utilizando el erizo de mar (*Strongylocentrotus purpuratus*) como especie externa (Figs. 38 y 39). El nivel de confianza estadística de los árboles fue evaluado mediante el método "bootstrap" (100 réplicas) con los algoritmos de unión por vecindad y máxima parsimonia (Fig. 39). Las topologías obtenidas por los métodos de matrices de distancia y la generada por el método de máxima verosimilitud son iguales, diferenciándose los árboles, únicamente, en la longitud de sus ramas. La topología obtenida por el método de máxima parsimonia, difiere del resto, en la posición relativa del esturión.

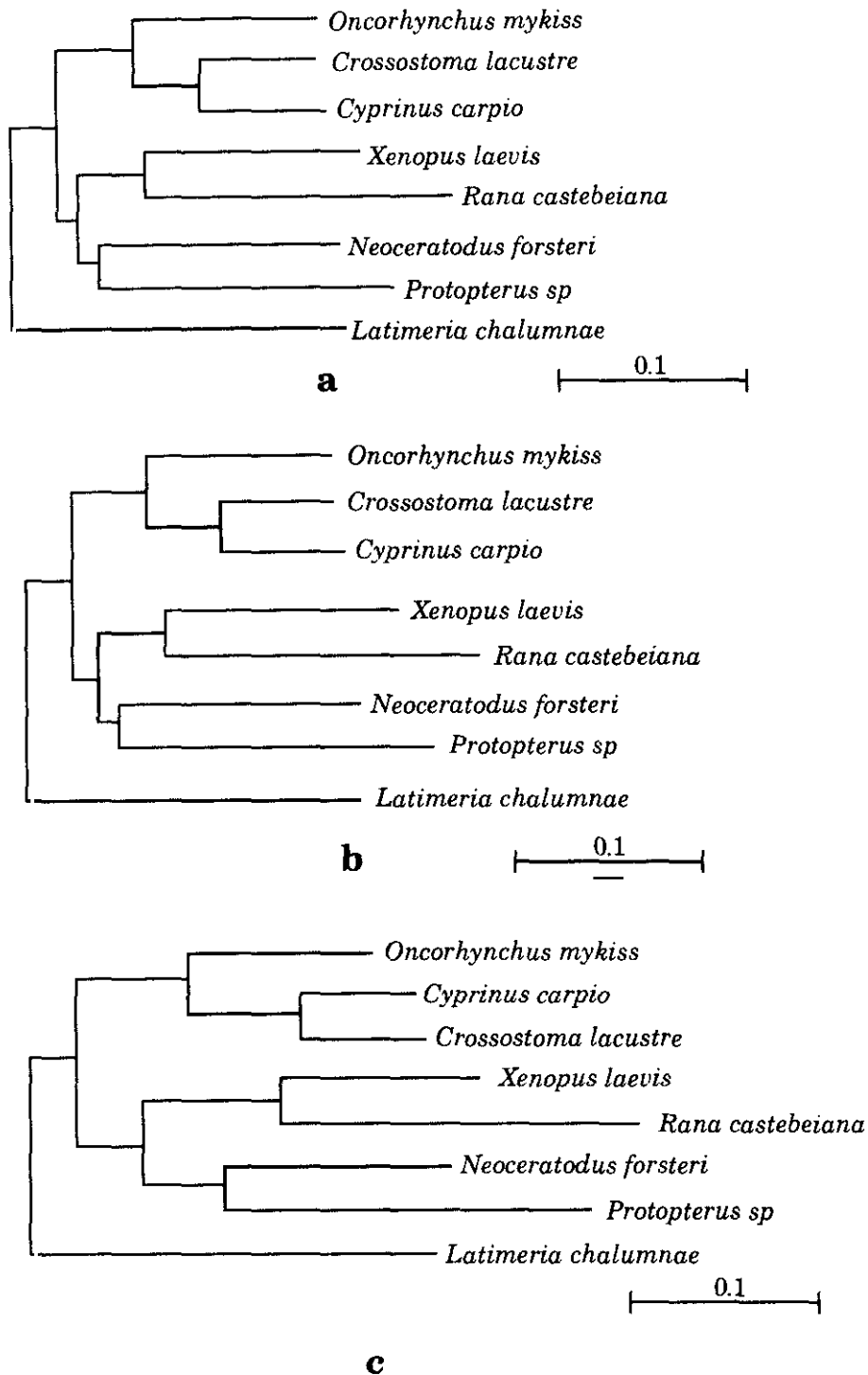
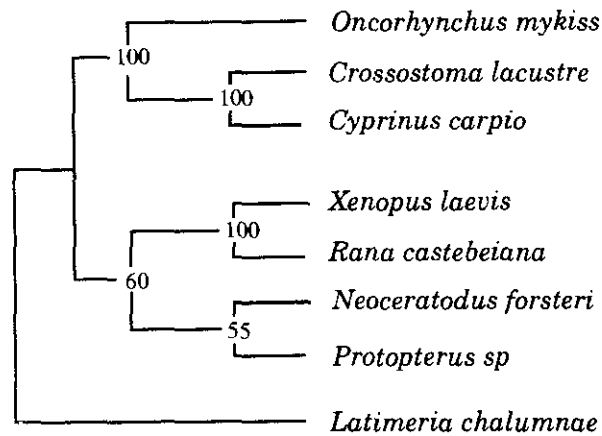
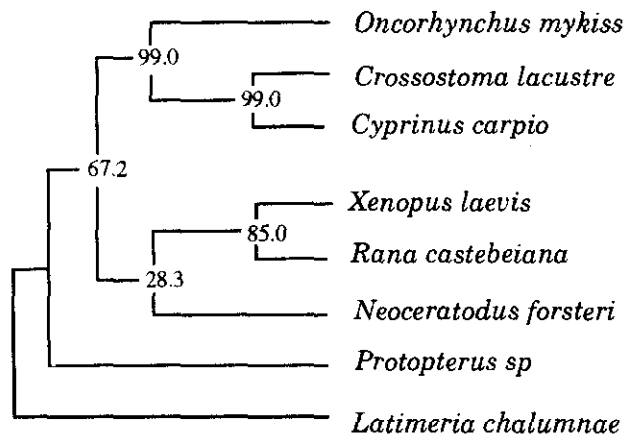


Figura 36. Árboles filogenéticos basándose en la secuencia del gen rRNA 12S. Los árboles han sido generados mediante los algoritmos de a) Unión por vecindad sobre la base de una matriz de distancias calculada por el método de Jukes-Cantor. b) Fitch-Margoliash sobre la base de una matriz de distancias según el método de Kimura y c) Máxima verosimilitud. En todos los casos, la longitud de las ramas es proporcional al número estimado de sustituciones por nucleótido.



a



b

Figura 37. Árboles consenso resultantes del análisis estadístico por “bootstrap”, basándose en la secuencia del gen rRNA 12S. a) utilizando el método de unión por vecindad a partir de una matriz de distancias generada por el método de Kimura y b) utilizando el método de máxima parsimonia. En ambos casos, el número de réplicas generado por “bootstrap” fue 100. Los valores existentes en cada bifurcación indican el porcentaje de veces que aparece el grupo de especies presentes a la derecha de dicha bifurcación (nodo) en todos los árboles examinados.

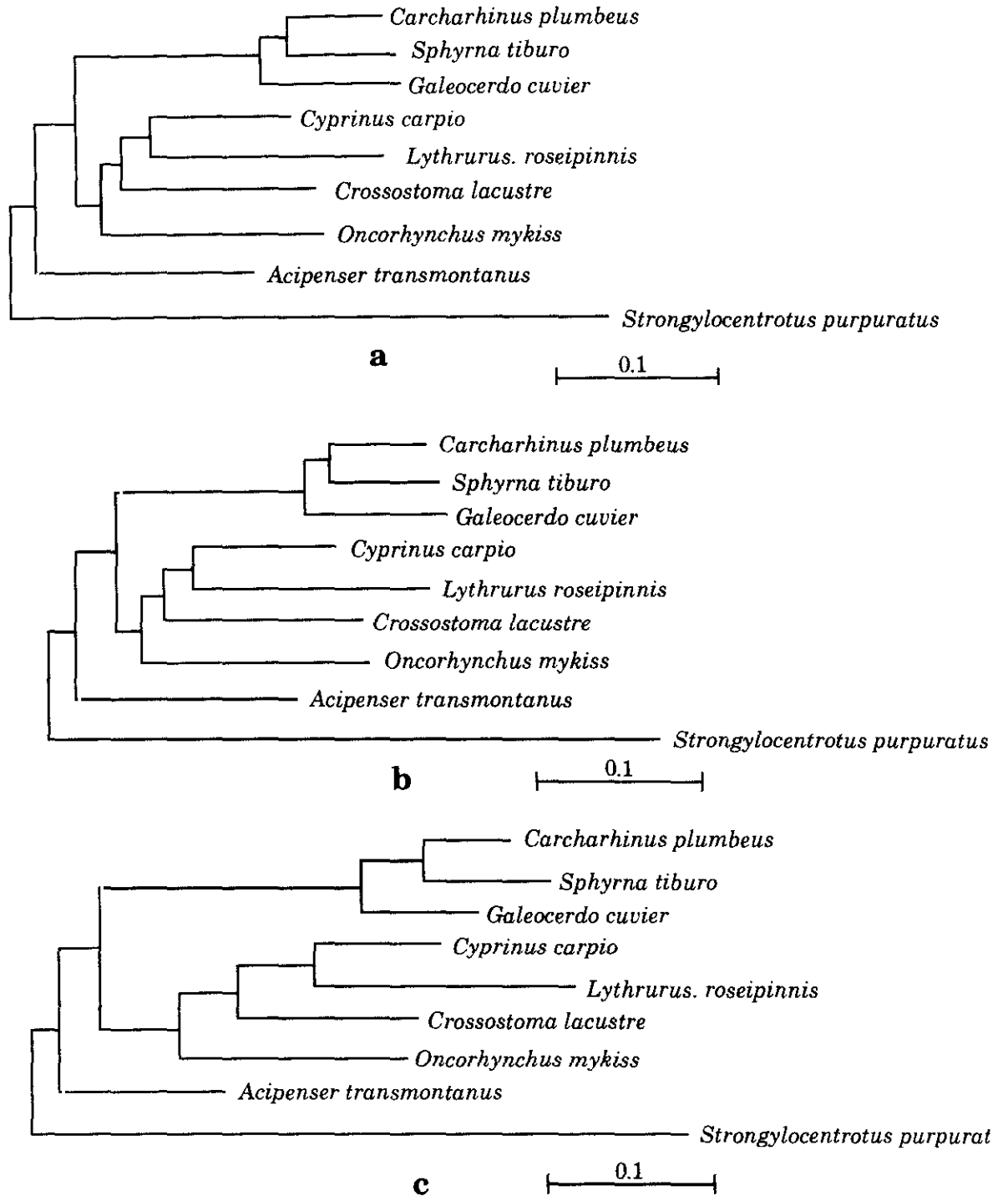
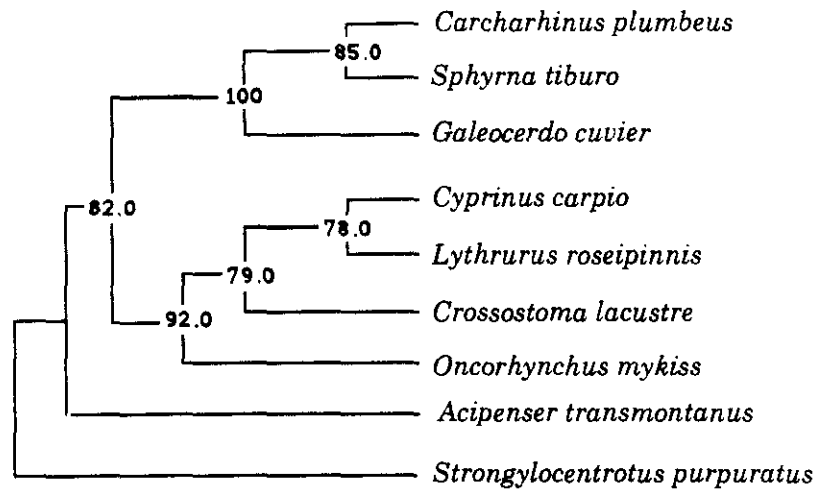
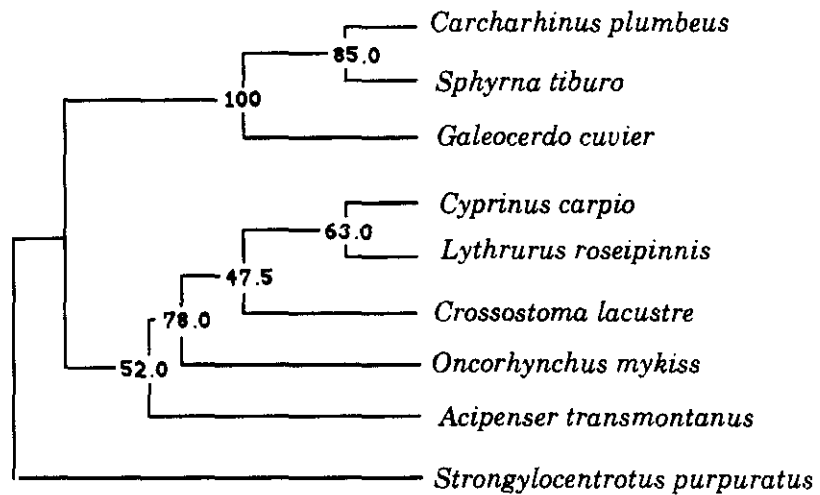


Figura 38. Árboles filogenéticos basados en la secuencia del gen citocromo b. Los distintos árboles fueron generados por los algoritmos de a) Unión por vecindad sobre la base de una matriz de distancias calculada por el método de Jukes-Cantor. b) Fitch-Margoliash sobre la base de una matriz de distancias según el método de Kimura y c) Máxima verosimilitud. En todos los casos, la longitud de las ramas es proporcional al número estimado de sustituciones por nucleótido.



a



b

Figura 39. Árboles consenso resultantes del análisis estadístico por “bootstrap”, basándose en la secuencia del gen citocromo b. a) utilizando el método de unión por vecindad a partir de una matriz de distancias generada por el método de Kimura y b) utilizando el método de máxima parsimonia. En ambos casos, el número de réplicas generado por “bootstrap” fue 100. Los valores existentes en cada bifurcación indican el porcentaje de veces que aparece el grupo de especies presentes a la derecha de dicha bifurcación (nodo) en todos los árboles examinados.

DISCUSSION

El genoma mitocondrial de los animales, debido a su reducido tamaño y peculiares características estructurales (economía organizativa) y funcionales (estrecha interrelación con el genoma nuclear), ha demostrado ser particularmente útil en el estudio de procesos moleculares tan complejos como la replicación o la transcripción. Así mismo, su relativa simplicidad y alta tasa mutacional con respecto al genoma nuclear (Brown y col., 1979) le han convertido en una herramienta muy útil a la hora de establecer relaciones filogenéticas entre diferentes especies. En este sentido, la secuenciación del genoma mitocondrial de la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) realizada en el presente trabajo, pretende contribuir a la caracterización de esta molécula y permitir su utilización en estudios de biología y filogenia molecular.

El método elegido para la extracción del mtDNA de la trucha arco iris (Palva y Palva, 1985) se basa en la lisis alcalina de mitocondrias hepáticas previamente purificadas. Este método, aunque proporciona un mtDNA de menor calidad que el que se obtiene por centrifugación en gradientes de cloruro de cesio (Lansman y col., 1981; Tapper y col., 1983), es relativamente rápido y, como se demuestra en este trabajo, en el caso de las mitocondrias del hígado de trucha arco iris, permite obtener grandes cantidades de mtDNA con calidad suficiente para su utilización en experimentos de clonaje, PCR y secuenciación.

Los patrones de digestión resultantes del corte con HindIII y Bgl II, son los mismos que los denominados HindIII (i) y Bgl II (i) por Palva y Palva (1987). Por lo tanto, se deduce que los ejemplares de trucha arco iris utilizados en nuestro trabajo, corresponderían al stock finlandés denominado **A** por estos autores y que procede de Estados Unidos. Este hecho demuestra que, piscifactorias tan distantes como las norteamericanas, las escandinavas y las españolas, comparten el mismo stock para su producción, y que éste puede ser fácilmente caracterizado mediante el corte con HindIII del mtDNA.

En la construcción de las genotecas de mtDNA se observó que, al margen de su tamaño, la eficiencia de clonaje de algunos de los fragmentos

de restricción, era muy pequeña. Concretamente, se observó que la incorporación de un fragmento EcoRI de 4 kb (clon pTRZ-2)¹ y un fragmento HindIII de 1.7 kb (clon pTRZ-14)¹ por el plásmido pUC18 provocaba una disminución muy evidente en el número de copias del vector. Esta situación no se presentaba en cambio, en los subclones obtenidos por digestión con PstI del clon pTRZ-2 (pTRZ-2a y pTRZ-2b)¹, ni en el clon pTRZ-4¹ que contenía un fragmento PvuII de 2.5 kb que solapaba parcialmente con el clon pTRZ-14. Significativamente, cuando se secuenció el mtDNA se comprobó que, el clon pTRZ-2 y el subclon pTRZ-2b contenían el origen de replicación de la cadena pesada (O_H), y el clon pTRZ-14 contenía el origen de replicación de la cadena ligera (O_L), y no así, los clones pTRZ-2a y pTRZ-4. Todo ello sugiere, que la presencia en los insertos de la secuencia correspondiente a los orígenes de replicación mitocondriales, o bien las estructuras secundarias asociadas a ellos en los insertos, debe afectar a la propia replicación del plásmido utilizado como vector de clonaje. Adicionalmente, este efecto parece depender de la posición de los orígenes de replicación mitocondriales en el inserto, puesto que, por ejemplo, el subclon pTRZ-2b aun conteniendo el O_H , no presentaba disminución en el número de copias.

Los clones pTRZ-0, pTRZ-11, pTRZ-12, pTRZ-13, pTRZ-14, pTRZ-15, pTRZ-16, pTRZ-2, pTRZ-5 y pTRZ-6¹ cubren la totalidad del mtDNA de la trucha arco iris. La secuencia consenso presentada, resultante de la combinación de las secuencias obtenidas a partir de cada uno de estos clones, tiene una longitud final de 16660 pb. Es, por lo tanto, casi igual que la de *C. lacustre* (16558 pb), ligeramente mayor que la de carpa (16575 pb) y mamíferos (16295-16569 pb), ligeramente menor que la del pollo (16775 pb) y considerablemente menor que la de *Xenopus laevis* (17553 pb). Las variaciones encontradas en la longitud total del genoma mitocondrial entre diferentes especies son, principalmente, debidas a variaciones en el tamaño del D-loop y, secundariamente, al tamaño de los genes de los rRNAs 12S y 16S. El contenido G + C del genoma mitocondrial de la trucha arco iris (45.9%) es equiparable al del resto de vertebrados (Tzeng y col., 1992).

¹ Ver Tabla II de Resultados, pág. 69.

Con anterioridad a este trabajo, se han descrito algunas secuencias parciales del mtDNA de trucha arco iris, que en total suponen, aproximadamente, un 24 % del genoma mitocondrial total. En concreto, se conoce la secuencia de un fragmento XbaI de 1.3 kb (Davidson y col., 1988), la secuencia del fragmento HindIII de 2.2 kb (Thomas y Beckenbach, 1989), que solapa casi con la totalidad del fragmento XbaI y, más recientemente, se ha secuenciado el D-loop (Digby y col., 1992). Nuestra secuencia es idéntica a la obtenida por Digby y col., y discrepa en 3 nucleótidos de la obtenida por Thomas y Beckenbach, probablemente debido a variaciones interpoblacionales. Por otra parte, tanto la secuencia de Thomas y Beckenbach en la zona que solapa, como la nuestra en su totalidad, son claramente distintas de la obtenida por Davidson y col.

La organización genómica (tanto el orden de los genes, como la cadena que los codifica) del mtDNA de trucha arco iris es idéntica a la descrita en ciprínidos (*C. lacustre* y carpa) y en todos los vertebrados, excepto el pollo (Desjardins y Morais, 1990) y el pato (Ramírez y col., 1993)². Con respecto a las secuencias intergénicas existentes en el mtDNA de trucha arco iris, cabe destacar que la mayor de ellas (14 nt), situada entre el gen que codifica para el tRNA^{Asp} y el gen COII, presenta la misma longitud en *C. lacustre* y carpa, está reducida a tres y dos nucleótidos en *X. laevis* y pollo respectivamente, a un nucleótido en la rata y no existe en el hombre. Por lo tanto, parece claro que, en consonancia con la línea evolutiva de economía que rige la organización del mtDNA, esta secuencia intergénica se ha perdido en el transcurso de la evolución.

La región que comprende el D-loop ya había sido clonada y secuenciada anteriormente (Digby y col., 1992). La secuencia obtenida en este trabajo, es idéntica a la ya descrita. Sin embargo, en nuestro análisis, encontramos ocho regiones asociadas a la terminación de la replicación (TASs) basándonos en la homología de su secuencia con la de las TASs descritas para hombre y ratón (Doda y col., 1981), frente a las tres identificadas (TAS- 1, TAS-5 y TAS-8) por Digby y col.³. Respecto a los

² Ver Figs 5 y 6 de la Introducción, pág. 12 y Fig. 24 de Resultados, pág. 70 .

³ Ver Fig. 26 de Resultados, pág. 80.

bloques de secuencia conservada, dos de ellos, CSB-II y CSB-III, son claramente identificables y muy parecidos a los descritos en esturión (Buroker y col., 1990), bacalao (Johansen y col., 1990), *C. lacustre* (Tzeng y col., 1992), carpa (Chang y Huang, 1994), *X. laevis* (Roe y col., 1985) y hombre (Chang y Clayton, 1987). Por otra parte, el elemento CSB-I definido como tal, en hombre y ratón (Walberg y Clayton, 1981), está reducido en los peces y *X. laevis*, a un pentanucleótido. Si a este hecho añadimos, que en la vaca (King y Low, 1987), la oveja (Zardoya y col., 1994) y los cetáceos (Dillon y Whright, 1993) no se encuentra el elemento CSB-III, parece probable que, únicamente, el bloque CSB-II pueda tener un papel decisivo en la transición de RNA a DNA en el inicio de la replicación del mtDNA (Zardoya y col., 1994).

Una característica notable de la secuencia del D-loop es la presencia de 26 pirimidinas seguidas en posición 5' con respecto a los CSBs. Se han encontrado dos bloques similares de 17 y 27 pirimidinas en el bacalao (Johansen y col., 1990). Así mismo, se ha descrito una proteína mitocondrial denominada *mtSSB* que reconoce, preferencialmente, motivos de este tipo en DNAs de cadena sencilla (Mignotte y col., 1985) y que parece estar implicada en la regulación del inicio de la replicación.

Por otra parte, en el extremo 3' del D-loop, cerca del gen *tRNA^{Phe}*, se ha identificado una repetición directa de 19 nucleótidos. La presencia de repeticiones en el D-loop del mtDNA de vertebrados es un fenómeno bastante común. Se han descrito repeticiones en el extremo 5' del D-loop de *X. laevis* (Roe y col., 1985), esturión (Buroker y col., 1990), bacalao (Johansen y col., 1990), pollo (Desjardins y Morais, 1990) y oveja (Zardoya y col., 1994). Estas repeticiones están localizadas alrededor de las TASS, y su origen parece estar relacionado con fenómenos de reincorporación de la cadena naciente de replicación (Buroker y col., 1990). La presencia de repeticiones en el extremo 3' es menos común y sólo se ha descrito en el conejo (Mignotte y col., 1990), en el mono verde (Karawya y Martin, 1987) y en la oveja (Zardoya y col., 1994). Las repeticiones que se encuentran en el D-loop de trucha arco iris, se localizan entre las CSBs y el gen *tRNA^{Phe}*, en la misma posición donde aparecen los promotores implicados en el inicio de la transcripción de las cadenas pesada (HSP) y ligera (LSP) en el hombre y

el ratón (Montoya y col., 1982; Chang y Clayton, 1984), por lo que podrían estar relacionados con ellos. De hecho, en el hombre y el ratón, los promotores presentan un dominio que es reconocido por el factor mtTF1 (Fisher y col., 1989), y las dianas para este factor están invertidas una con respecto a la otra en estos promotores, lo que sugiere que los promotores HSP y LSP proceden de la duplicación de un único promotor bidireccional original. En *X. laevis* (Bogehagen y Yoza, 1986) y en el bacalao (Johansen y col., 1990), los promotores se localizan en esta zona y presentan también duplicaciones aunque de menor extensión.

El análisis de la secuencia del D-loop se ha completado con la búsqueda de posibles ORFs. Se ha encontrado una pequeña ORF entre los nucleótidos 820 y 985 que podría codificar para un polipéptido de 55 aminoácidos. De acuerdo con la orientación de la ORF, este polipéptido estaría codificado por la cadena L y su estructura secundaria consistiría en una hoja β plegada central rodeada de dos hélices α . La posición de esta ORF entre el gen tRNA^{Phe} y los CSBs, su tamaño y orientación, recuerdan a la ORF descrita en el RNA 7S de células HeLa (Ojala y col., 1981 b). Sin embargo, la secuencia de aminoácidos de esta ORF, no se corresponde con la encontrada en el D-loop de células HeLa. En cambio, una búsqueda en el banco de datos SwissProt, revela un cierto parecido de este polipéptido (limitado a unos pocos aminoácidos) con un factor de transcripción de levaduras codificado por el núcleo e implicado en el inicio correcto de la transcripción mitocondrial (Haffter y Fox, 1992). Dada su localización en la región donde deben estar los promotores, la idea de que esta ORF esté implicada en la regulación de la transcripción resulta muy atractiva. No obstante, no se ha encontrado en ningún otro pez (bacalao, esturión, carpa y *C. lacustre*), lo que hace poco probable que tenga algún significado funcional en la trucha arco iris.

El origen de replicación de la cadena ligera (O_L) de trucha arco iris se localiza como en el resto de vertebrados, en los que ha sido secuenciado (con la excepción del pollo y el pato, que carecen de él), entre el gen del tRNA^{Asn} y el gen del tRNA^{Cys}, ambos codificados por la cadena L. O_L conserva la

estructura secundaria tallo-bucle descrita en otros vertebrados⁴. El tallo, rico en guaninas y citosinas, presenta gran homología con los tallos encontrados en otros peces (excepto *C. lacustre*), *X. laevis* y mamíferos. Por el contrario, el bucle que proponemos para el O_L de la trucha arco iris sorprende por su gran tamaño (17 nucleótidos) con respecto a otros bucles y por la presencia de 11 pirimidinas seguidas (10 citosinas y 1 timina)⁴. Ningún bucle descrito hasta el momento presenta tal cantidad de citosinas. En los peces, el bucle del O_L del bacalao presenta cuatro citosinas seguidas, el de *C. lacustre* únicamente dos y el de la carpa, ninguna. En *X. laevis* tampoco hay y en mamíferos, la foca y el hombre existen tres. Sin embargo, en *X. laevis* y mamíferos se encuentran cinco y seis timinas seguidas, respectivamente. De acuerdo con el modelo propuesto para la especie humana (Hixson y col., 1986), el inicio de la replicación se produce por la síntesis de un cebador de RNA por una primasa en la región rica en timinas, y la transición a DNA se produce en la secuencia 5'-CGGCC-3', situada en la base del O_L, dentro del tRNA^{Cys}. La secuencia de transición RNA-DNA descrita en el hombre, aparece en todos los orígenes identificados en vertebrados, incluida la trucha arco iris. Sin embargo, la sustitución de timidinas por citosinas en la trucha arco iris permite sugerir que la síntesis del RNA cebador por la primasa, probablemente, requiere una región rica en pirimidinas, y no está restringida, exclusivamente, a la presencia de timinas como se había sugerido previamente (Hixson y col., 1986). Por lo tanto, el modelo de inicio de la replicación en O_L propuesto para el hombre parece ser aplicable a la trucha arco iris con ciertas variaciones, sin embargo, este modelo no puede ser definitivo para peces, puesto que en la carpa y en *C. lacustre*, no existen regiones ricas en citosinas, ni en timinas.

El genoma mitocondrial de la trucha arco iris, contiene 22 tRNAs intercalados entre los genes codificantes de proteínas y rRNAs, ajustándose así al modelo de puntuación propuesto para el hombre (Ojala y col., 1981 a) y que también se cumple para el resto de vertebrados. Así mismo, como ocurre en los demás vertebrados, el triplete CCA del extremo 3' de los

⁴ Ver Fig 29 de Resultados, pág. 84.

tRNAs, no aparece en la secuencia de sus genes, por lo que debe ser añadido en la maduración post-transcripcional de los tRNAs, junto con otras modificaciones típicas de tRNAs (residuos metilados, pseudouridina). A pesar de la existencia de numerosos apareamientos G + U, los 22 tRNAs mitocondriales de la trucha arco iris presentan la capacidad de plegarse en una estructura secundaria en forma de hoja de trébol⁵.

La secuencia correspondiente a los brazos aminoacídico y anticodón, son las más conservadas cuando se comparan los tRNAs mitocondriales de la trucha arco iris con los de carpa, *C. lacustre*, *X. laevis*, pollo y hombre, mientras que las secuencias de los bucles DHU y T ϕ C son las más variables. De esta comparación se deduce que el tRNA^{Met} (probablemente debido a su función como iniciador en la traducción) es el más conservado entre los vertebrados y, en cambio, el tRNA^{Ser(AGY)} es el más variable. Este tRNA se caracteriza, en todos los animales conocidos, por carecer de brazo DHU (De Bruijn y col., 1980). Sin embargo, la estructura secundaria que proponemos para este tRNA en la trucha arco iris, mantiene la forma de hoja de trébol; así, el brazo DHU está formado por un tallo con diez nucleótidos apareados (dos más que en el resto de tRNAs) y un bucle con tres nucleótidos. Por el contrario, el tallo del brazo anticodón en el tRNA^{Ser(AGY)} está reducido a sólo seis nucleótidos, cuando en el resto de tRNAs, presenta diez .

La estructura del brazo DHU del tRNA^{Leu(UUR)} está muy conservada en trucha arco iris, carpa, *C. lacustre*, *X. laevis*, pollo y hombre. De forma manifiesta, la conservación detectada en este brazo, tan variable en otros tRNAs, se centra en la secuencia 5'-TGGCAGAGCCCGG-3' que en el hombre se ha identificado como responsable de la terminación de la transcripción de los rRNAs (Christianson y Clayton, 1988). Esta secuencia, es idéntica en la trucha arco iris y en el hombre, presentando sustituciones en otros peces, en *X.laevis* y en el pollo. En el hombre se ha descrito que la presencia de mutaciones en esta región, produce la enfermedad denominada MELAS, que es una subclase de encefalomiopatía de origen mitocondrial (Hess y col., 1991).

⁵ Ver Fig. 31 de Resultados, págs. 89-92.

En el análisis del uso de codones en el mtDNA de trucha arco iris, en los 13 genes codificantes de proteínas, se contabilizan un total de 108 codones ATA codificantes de metionina frente a, tan sólo, 41 codones ATG; todos los codones de iniciación identificados en el mtDNA de trucha arco iris son ATG, excepto el del gen COI que es GTG, situación que se repite en otros peces (Tzeng y col., 1992) y en el pollo (Desjardins y Morais, 1990). En *X. laevis* todos los codones de iniciación son ATG (Roe y col., 1985), mientras que en mamíferos, ND2, ND3 y ND5 suelen comenzar con ATA, y en roedores ND1 comienza con GTG (Bibb y col., 1981; Gadaleta y col., 1989). Si bien el uso de codones de iniciación, es idéntico en todos los teleósteos, no ocurre así con el uso de codones de terminación. En la trucha arco iris, los genes ND2, COI, ATPasa 8, ND4L y ND5 terminan en TAA; los genes ND1 y ND6 acaban con el codón TAG. El resto de genes terminan en T (COII, ND4 y Cyt b) o en TA (ATPasa 6, COIII y ND3) y, tal como se ha demostrado en el hombre (Ojala y col., 1981 a; Anderson y col., 1981), los codones de terminación, probablemente, se deben completar con la adición post-transcripcional de colas poli-(A) a los mRNAs correspondientes. Sin embargo, en *C. lacustre*, ND2, ND3 y ND4 terminan en TAG; COII y Cyt b acaban en T; COIII termina en TA y el resto en TAA; y en la carpa, ATPasa 8 termina en TAG; ND2, COII, ND4 y Cyt b acaban en T; COIII y ND3 terminan en TA y el resto en TAA.

Al no existir un tRNA que reconozca los codones AGG y AGA, cuando éstos aparecen, actúan como codones de terminación en el código genético mitocondrial de vertebrados (Anderson y col., 1981). En la trucha arco iris, se confirma la inexistencia de estos codones, tanto dentro de los genes como al final de ellos. Sorprendentemente, en la secuencia de carpa (Chang y Huang, 1994), existe un codón AGG dentro del gen ND4 en la posición 11351 y que, según estos autores, codifica para arginina. De forma similar, en la secuencia de *C. lacustre* (Tzeng y col., 1992) existe un codón AGA dentro del gen COIII en la posición 9753 que, según los autores, codifica también para arginina. En trucha arco iris, en las posiciones correspondientes del gen ND4 y del gen COIII, se encuentran el codón CGC, que codifica para arginina y el codón GCC, que codifica para alanina, respectivamente.

El codón TGA, que en el código genético universal es un codón de terminación, en el código genético mitocondrial codifica para triptófano (Barrell y col., 1979), y en el caso de la trucha arco iris es el codón que se usa mayoritariamente para codificar este aminoácido (en los 13 genes codificantes de proteínas se utilizan 101 codones TGA frente a sólo 20 codones TGG para codificar triptófano).

Como ocurre en el resto de mtDNAs de vertebrados, el uso de codones del genoma mitocondrial de trucha arco iris se caracteriza por una clara tendencia a utilizar citosinas y adeninas en la última posición de codón y apenas incluir residuos de guanina.

Del alineamiento y comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas por el genoma mitocondrial de trucha arco iris con sus homólogas de otros vertebrados se deduce que las subunidades de la citocromo oxidasa están altamente conservadas, mientras que las subunidades de la ATPasa y la NADH deshidrogenasa. son de las más variables. Mientras las primeras corresponden a subunidades catalíticas del holoenzima, las segundas corresponden a subunidades reguladoras (Cantatore y Saccone, 1987). Lógicamente, los polipéptidos codificados por el mtDNA de trucha arco iris presentan mayor homología con los codificados por el resto de peces (76.8-97.7%), a continuación con los de *X. laevis* (80.3-95.3%) y en menor medida con los de pollo (67.3-94.0%) y hombre (45.3-92.8%). Una característica común a todos los polipéptidos codificados por el mtDNA, es la variabilidad en el extremo carboxilo. Los dos casos más patentes son el extremo carboxilo de la subunidad 8 de la ATPasa, que en el hombre cuenta con once aminoácidos más que en el resto de vertebrados analizados, y el extremo carboxilo de la subunidad 6 de la NADH deshidrogenasa, que en el hombre tiene ocho aminoácidos menos⁶. En ambos casos, está situación coincide con el hecho de que los genes que codifican para estos polipéptidos solapan con los genes adyacentes. Sin embargo, también solapa el gen ND4L con el gen ND4, y no por ello se observa la presencia de un extremo carboxilo variable.

⁶ Ver Fig. 32 de Resultados, pág. 95-101.

Como se demuestra en el presente trabajo, el tratamiento utilizado para aislar el RNA mitocondrial, consistente en una rotura celular controlada, seguida de repetidos lavados de la fracción mitocondrial obtenida por centrifugación diferencial, es suficiente para obtener una gran cantidad de dicho RNA de los hepatocitos de trucha arco iris. El mtRNA purificado, apenas muestra contaminación con RNA nuclear y, debido al particular metabolismo hepático de la trucha arco iris, está libre de glucógeno, fuente principal de contaminación en los extractos mitocondriales de hepatocitos de mamíferos (Cantatore y col., 1987).

Los mtRNAs tienen una gran tendencia a agregarse, debido a la presencia de secuencias complementarias resultantes de la transcripción simétrica de las dos cadenas del mtDNA. Por ello, la electroforesis, en presencia de formaldehído utilizada normalmente en la desnaturalización de RNAs nucleares, no es suficiente para fraccionar los productos de la transcripción mitocondrial, y es necesario recurrir a agentes desnaturalizantes más fuertes como el hidróxido de metilmercurio (Amalric y col., 1978). Al igual que ocurre en el hombre (Gelfand y Attardi, 1981; Montoya y Attardi, 1986), los rRNAs 12S y 16S de la trucha arco iris, son mayoritarios entre los transcritos mitocondriales (se encuentran en una proporción entre 30 y 60 veces superior a los mRNAs) y son, por lo tanto, fácilmente identificables en geles teñidos con bromuro de etidio tras una electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Por otra parte, los componentes de la fracción poliadenilada del mtRNA de trucha arco iris (obtenida por cromatografía con oligo (dT)-celulosa), fueron separados mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes dando lugar, tras la tinción de los geles con bromuro de etidio, a un patrón de 8 bandas similar al descrito en células HeLa (Montoya y col., 1983). No obstante, los patrones de ambas fracciones presentaban ciertas particularidades, que han quedado de manifiesto al realizar la identificación de cada una de las bandas con sondas específicas de cada gen, construidas a partir del mtDNA clonado. En primer lugar, cabe destacar que, en general, los mRNAs de trucha arco iris migran por encima de los correspondientes mRNAs de células HeLa, como se observa al tomar como referencia los rRNAs. Puesto que el tamaño de los rRNAs en trucha arco iris y en el hombre es

prácticamente igual, la diferencia en la migración de los mRNAs, puede explicarse en función de un mayor tamaño de las colas poli-A en los mRNAs del pez, con respecto a los del hombre.

Las sondas específicas para los genes 12S y 16S, apenas permiten detectar el RNA 4a. De ello se deduce que el procesamiento del RNA 4a para dar lugar a los rRNAs 12S y 16S es muy eficiente en la mitocondria de trucha arco iris. Los RNAs 7 (genes ND4L y ND4) y 9 (gen COI) migran a la misma altura, muy similarmente a lo que ocurre en células HeLa (Amalric y col., 1978; Montoya y col., 1983). De ello se puede deducir que, al igual que ocurre en células HeLa, los genes ND4L y ND4 se transcriben juntos dando lugar al RNA 7. Además, la sonda que debe reconocer el RNA 9 y 6, no permite detectar el RNA 6, por lo que se puede sugerir que este RNA es procesado rápidamente en la mitocondria de trucha arco iris para dar lugar al RNA 9. A diferencia de lo que ocurre en células HeLa, el RNA 11 (cyt b) y el RNA 12 (ND2) migran a la misma altura. El RNA 10 detectado con la sonda para el gen 16S, migra a la misma altura que este RNA y, tal y como sucede en el hombre (Montoya y Attardi, 1986), es muy posible que pueda corresponder a una fracción oligoadenilada del rRNA 16S.

Un hecho hasta cierto punto sorprendente fue la detección de una especie de RNA poliadenilado que es reconocido tanto por la sonda dirigida contra el RNA 14 (ATPasas 8 y 6) como por la sonda dirigida contra el RNA 15 (COIII). Este RNA debe ser un precursor de los RNAs 14 y 15, y al migrar entre los RNAs 7 y 9 permite sugerir que puede ser el mismo RNA que, en células HeLa, fue denominado RNA 8, y sólo se encontraba cuando las células habían sido tratadas con actinomicina D (Montoya y col., 1983). Puesto que no existe ningún tRNA separando los genes ATPasa 6 y COIII, parece probable que el procesamiento de transcritos primarios para dar lugar a los RNAs 14 y 15 sea un proceso más complejo de lo normal, lo que implicaría la acumulación momentánea de un precursor, que en el caso de la trucha arco iris, es posible detectar sin el uso de actinomicina D. En células Hela, normalmente, este precursor se procesaría con más rapidez, y sólo se acumularía en los tratamientos con actinomicina D dando lugar al RNA 8.

Con respecto a los transcritos de la cadena ligera, con la sonda

diseñada para detectar el producto del gen ND6, se identificó una banda que migra a la misma altura que los RNAs 11 y 12. En células HeLa, nunca se ha detectado un transcrito específico para el gen ND6 (Attardi, 1985). Este gen, en trucha arco iris, tiene un tamaño de 540 pb, por lo que el RNA detectado (alrededor de 1100 nucleótidos) debe incluir una región más amplia. Una sobreexposición de las membranas hibridadas con esta sonda permite detectar dos bandas que, por su migración, podrían corresponder a los RNAs 1 y 2, descritos en células HeLa (Montoya y col., 1983). La mayor de las bandas, se detectó también con las sondas para los genes ATPasa 8 y 6, COIII, COII, 12S y 16S, por lo que parece corresponder a un transcrito primario que abarcaría toda la molécula del mtDNA, tal y como se ha sugerido para el RNA 1 de células HeLa (Attardi, 1985). La menor de las bandas se detectó también con las sondas para los genes ATPasa 8 y 6, COIII y COII, por lo que correspondería, perfectamente, al RNA 2 descrito en células HeLa, que comienza en el gen ND6 y termina en el gen COII (Attardi, 1985). Ninguna de las sondas empleadas permitió detectar un equivalente del RNA 3 de células HeLa, y ello puede ser debido a que este RNA en la trucha arco iris, se procesaría rápidamente para dar lugar al RNA detectado con la sonda para ND6, que a su vez, nunca ha sido detectado en células HeLa.

El análisis de los transcritos de la mitocondria de trucha arco iris revela que, con ciertas lógicas diferencias debidas a distintas eficiencias en el procesado de los transcritos primarios, el modelo de transcripción sugerido para las mitocondrias humanas (Montoya y Attardi, 1986) es completamente válido en la trucha arco iris y, posiblemente, en casi todos los vertebrados. Ello supone que, no sólo estaría enormemente conservada la organización genómica del mtDNA en los diferentes grupos de vertebrados, sino que también lo están los mecanismos implicados en su expresión.

El análisis filogenético realizado a partir de los genes que codifican para el 12S rRNA y el citocromo b de la trucha arco iris, confirma la utilidad de estos genes mitocondriales en el establecimiento de relaciones evolutivas entre diferentes especies. De acuerdo con las relaciones establecidas en función de caracteres morfológicos, los primeros peces

aparecerían en el cámbrico (Lovtrup, 1977) y son los agnatos (peces sin mandíbula). A partir de ellos, en el silúrico (Storer y col., 1982), evolucionaron, por un lado, los antepasados de los condriictios actuales (peces cartilagosos) y, por otro, los antepasados de los osteictios actuales (peces óseos). En el devónico, dentro de los osteictios, se produjo la separación de actinopterigios (condrósteos, holósteos y teleósteos) y sarcopterigios (crosopterigios y dipnoos) y, posteriormente, la aparición de los primeros anfibios a partir de los sarcopterigios (Valentine, 1978)⁷.

En función de las especies de vertebrados inferiores en las que se ha secuenciado completamente el gen 12S y el citocromo b, se realizó un análisis filogenético encaminado a confirmar el origen de los tetrápodos (vertebrados terrestres) a partir de los sarcopterigios, y las relaciones entre condriictios, sarcopterigios y actinopterigios. Los árboles filogenéticos construidos en función del gen 12S, establecen claramente que los dipnoos (peces pulmonados) son el grupo de peces actuales más cercano a los anfibios. El método de máxima verosimilitud y los que utilizan matrices de distancia, dan lugar a árboles en los que los teleósteos están claramente separados de anfibios y dipnoos. Estos últimos y los anfibios se comportan como un grupo monofilético y, dentro de los teleósteos, ocurre lo mismo con los ciprínidos (*C. lacustre* y *C. carpio*). El árbol resultante de la aplicación del método de máxima parsimonia a las secuencias del gen 12S, apunta a una temprana separación del pez pulmonado africano (*Protopterus sp*) del resto de los peces, quedando el pez pulmonado australiano (*N. forsteri*) como el pez actual más cercano a los anfibios. Estudios previos basados en la secuencias aminoacídicas de las cadenas α y β de la hemoglobina, sugerían que dentro de los sarcopterigios, el celacanto (*L. chalumnae*), debía ser el pariente más cercano de los anfibios, en detrimento de los peces pulmonados (Gorr y col., 1991). Los dos árboles obtenidos a partir del gen 12S favorecen, sin embargo, una mayor relación entre los anfibios y los peces pulmonados que entre los anfibios y los crosopterigios. Estos árboles concuerdan con los obtenidos en estudios similares (Meyer y Wilson, 1990). La topología de los árboles obtenidos por Hedges y col. (1993), en la que los

⁷ Ver Apéndice II.

dipnoos se comportan como un grupo monofilético apoya los resultados obtenidos con los métodos de máxima verosimilitud y de matrices de distancia, frente a la obtenida por el método de máxima parsimonia.

De los árboles filogenéticos construidos en función del gen del citocromo b, se deduce una separación temprana de condriictios y osteictios. El único punto oscuro es la posición evolutiva del esturión. De acuerdo con el árbol obtenido por máxima parsimonia, el esturión sería claramente un osteictio pero no un teleósteo. Los árboles obtenidos por métodos de matrices de distancia y de máxima probabilidad sugieren una separación de la rama conducente al esturión anterior a la separación de condriictios y osteictios. Curiosamente el esturión, morfológicamente, recuerda a los condriictios, presenta un esqueleto secundariamente cartilaginoso, escamas placoideas y cola heterocerca y, sin embargo, está claramente clasificado como un osteictio (Storer y col., 1982), por lo que, en principio, parece más correcta la topología obtenida mediante el análisis de máxima parsimonia. Con la salvedad del esturión, el resto de osteictios analizados son teleósteos, y forman un grupo monofilético claramente diferenciado en todas las topologías obtenidas, estando los ciprínidos (*L. roseipinnis*, *C. carpio* y *C. lacustre*) perfectamente separados de la trucha arco iris. Dentro de los condriictios, en todas las topologías obtenidas, el tiburón gris (*Carcharinus plumbeus*) está más relacionado con el pez martillo (*Sphyrna tiburo*) que con el tiburón tigre (*Galeocerdo cuvier*). Este resultado es notable, si tenemos en cuenta que el tiburón gris y el tiburón tigre están clasificados dentro de una misma familia (Carcharhinidae), mientras el pez martillo pertenece a otra familia (Sphyrnidae).

Finalmente, es importante resaltar que los análisis filogenéticos realizados vienen determinados por la escasez de secuencias que existen de los genes 12S y citocromo b entre los vertebrados inferiores. Las discrepancias existentes entre los árboles obtenidos por métodos fenéticos y métodos cladísticos son, en gran parte debidas, a esta escasez de datos moleculares. Por idénticas razones, los valores de confianza estadística que se obtienen para algunos nodos no son significativos (< 50%) .

CONCLUSIONES

Del análisis de la secuencia nucleotídica y de los productos de la transcripción del genoma mitocondrial de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) podemos concluir que:

1. El genoma mitocondrial de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) está constituido por 16660 pb y codifica para 13 proteínas, 2 rRNAs y 22 tRNAs presentando la característica organización de la mayoría de vertebrados, en la que los genes de tRNAs se intercalan entre los genes codificantes de proteínas y de rRNAs.
2. En el mtDNA de trucha arco iris, la región de control presenta los mismos elementos implicados en la replicación de la cadena pesada (CSBs, TASs) descritos en otros vertebrados. Por el contrario, aunque el origen de replicación de la cadena ligera está formado por una estructura secundaria tallo-bucle idéntica a la encontrada en otros mtDNAs, se caracteriza por la posesión en el bucle, de una secuencia rica en citosinas. De este resultado se deduce que la RNA primasa encargada de sintetizar el cebador para el inicio de la replicación, debe reconocer un molde de polipirimidinas y no de politiminas, como se había propuesto anteriormente.
3. El tRNA *Ser* (AGY) de la trucha arco iris, a diferencia del resto de especies, presenta una estructura secundaria en hoja de trébol, estando el brazo DHU formado por un tallo con diez nucleótidos apareados y un bucle con tres nucleótidos. Por el contrario, el tallo del brazo anticodón está reducido a seis nucleótidos.
4. Todos los genes codificantes de proteínas del mtDNA de trucha arco iris comienzan con el codón ATG con la excepción del gen COI que comienza con el codón GTG. Por el contrario, los codones de terminación son característicos de esta especie, ya que el patrón encontrado es diferente al descrito en otros vertebrados, incluso en peces. En un total de seis genes los codones de terminación son incompletos. Por otra parte, los codones AGG y AGA no existen dentro de los genes ni al final de ellos.

5. Del alineamiento y comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas por el genoma mitocondrial de trucha arco iris con sus homólogas de otros vertebrados, se deduce que aquellas subunidades que presentan actividad catalítica (citocromo oxidasa) están notablemente conservadas mientras que aquellas con función reguladora (ATPasa y NADH deshidrogenasa) son más variables.

6. La identificación de los transcritos de la mitocondria de trucha arco iris revela que el modelo de transcripción sugerido para las mitocondrias humanas es completamente válido en la trucha arco iris, con ciertas diferencias debidas a distintas eficiencias en el procesado de los transcritos primarios. Así, se ha podido identificar un supuesto precursor de los mRNAs 14 y 15. Por otra parte, se ha detectado por primera vez en preparaciones *in vivo* de mitocondria un transcrito del gen ND6.

7. El análisis filogenético realizado a partir de los genes que codifican para el 12S rRNA y el citocromo b de la trucha arco iris confirma la utilidad de estos genes mitocondriales en el establecimiento de relaciones evolutivas entre diferentes especies, situando a la trucha arco iris dentro de los teleósteos como un grupo monofilético claramente diferenciado de los ciprínidos.

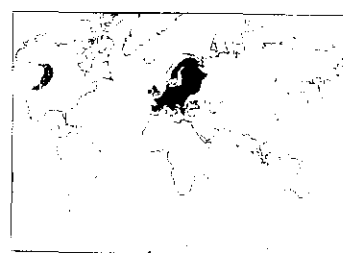
APENDICES

APENDICE I

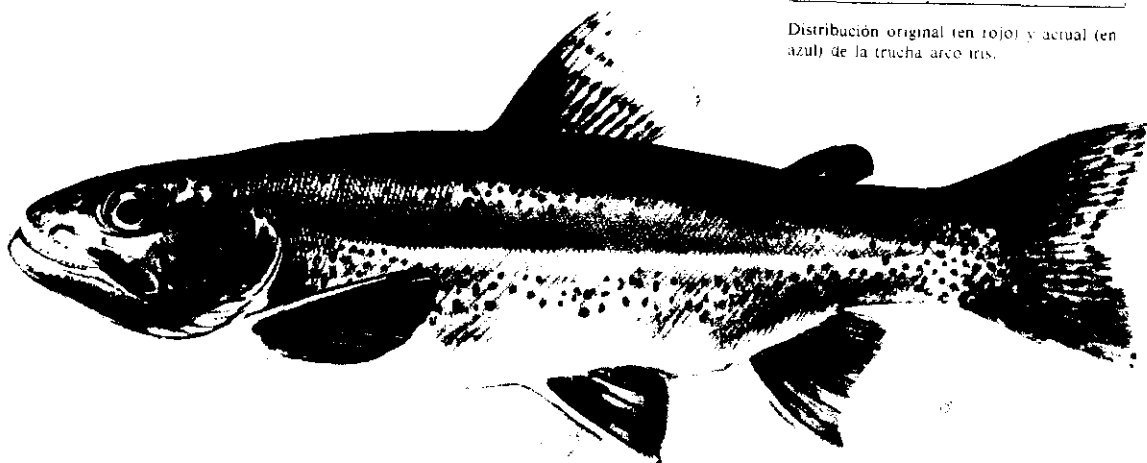
LA TRUCHA ARCO IRIS

La trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) es un teleósteo de la familia Salmonidae oriundo de la costa pacífica de América del Norte. Su distribución geográfica actual abarca también Europa, donde ha sido introducida por el hombre. Al igual que la trucha común, es muy sensible a la polución, pero soporta temperaturas más altas y aguas menos oxigenadas. Se alimenta de insectos acuáticos, zooplancton, moluscos y pequeños peces. A nivel morfológico, se caracteriza por la posesión de una banda central rosada que comienza en la cabeza y termina en la base de la cola. La cabeza, el dorso, los flancos y la aleta dorsal están abundantemente moteadas de negro. El dimorfismo sexual se manifiesta en la coloración más pronunciada de los machos que presentan también una mandíbula inferior ganchuda. Alcanza la madurez sexual hacia los 2 ó 3 años. En Europa el desove tiene lugar de noviembre a mayo. Cada hembra pone de 1500 a 2000 huevos/kg.

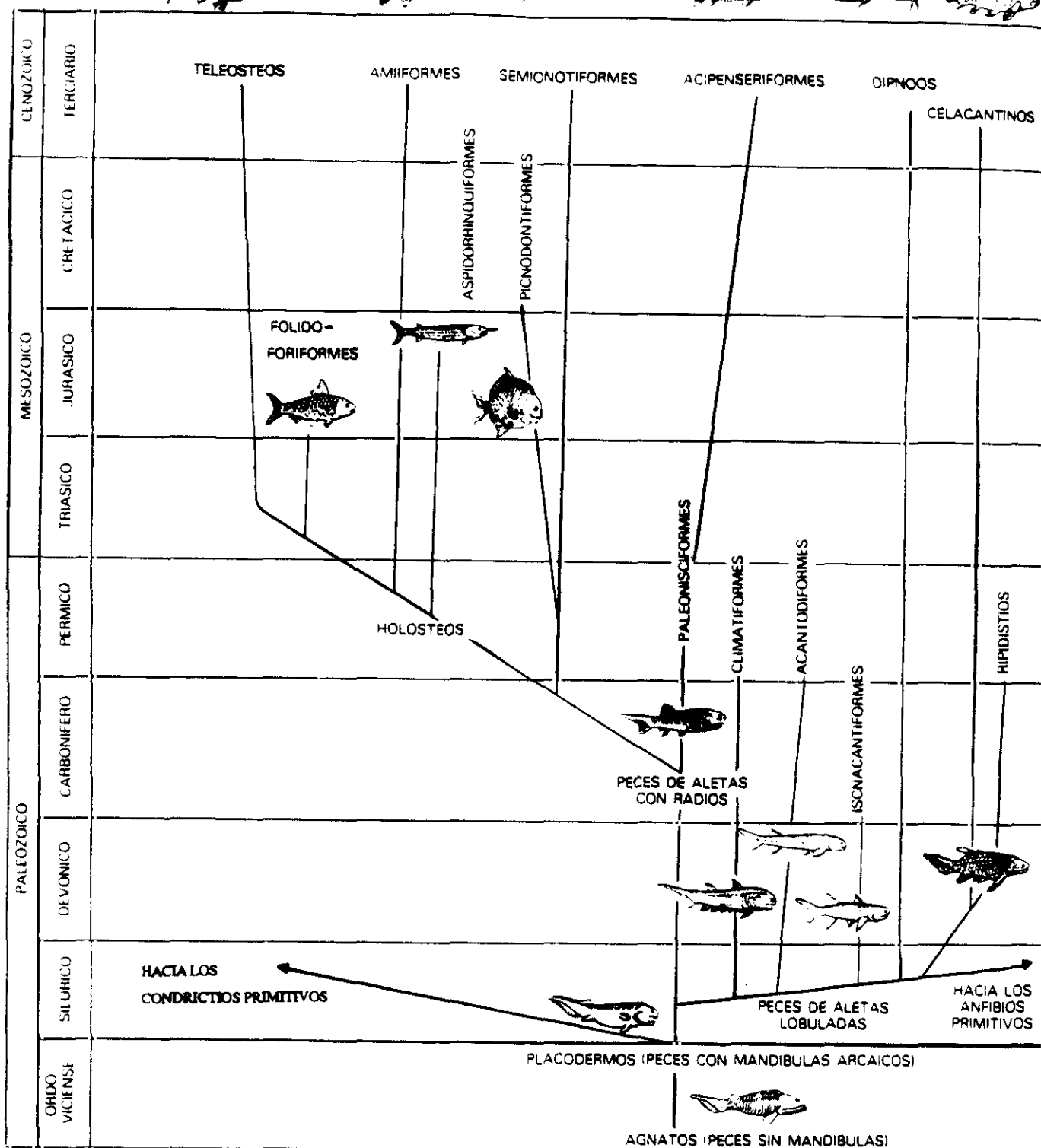
La trucha arco iris presenta grandes aptitudes para la cría intensiva en estanques o viveros artificiales ya que se adapta con facilidad a la cautividad, es resistente a las enfermedades y tolera los piensos comerciales. Sin embargo, rara vez forma poblaciones capaces de autorreproducirse y es preciso proceder constantemente a operaciones de fecundación artificial.



Distribución original (en rojo) y actual (en azul) de la trucha arco iris.



APENDICE II



Evolución de los peces. Empezó en el Cámbrico con la aparición de las especies no mandibuladas (los agnatos). En el Silúrico, surgieron las mandíbulas a partir de un par de orificios branquiales y las aletas se hicieron pares (Placodermos); se produjo la separación de los antepasados de los condriictios y los osteictios. En el Devónico, una línea importante de peces, los provistos de aletas con radios, constituyeron el ancestro de la mayoría de especies actuales (actinopterigios). La otra línea importante, constituida por peces de aletas lobuladas (sarcopterigios) no tuvieron tanto éxito, aunque con el tiempo dieron lugar a los primeros anfibios. Modificado de Valentine, 1978.

APENDICE III

<u>Nº GenBank</u>	<u>Nombre común</u>	<u>Nomenclatura binomial</u>
L29771	Trucha arco iris	<i>Oncorhynchus mykiss</i>
X61010	Carpa	<i>Cyprinus carpio</i>
M91245	-----	<i>Crossostoma lacustre</i>
M10217	-----	<i>Xenopus laevis</i>
X52392	Pollo	<i>Gallus gallus</i>
Z29573	Zarigüeya americana	<i>Didelphis virginiana</i>
V00654	Vaca	<i>Bos taurus</i>
X61145	Rorcual común	<i>Balaenoptera physalus</i>
X72204	Ballena azul	<i>Balaenoptera musculus</i>
X63726	Foca común	<i>Phoca vitulina</i>
X72004	Foca gris	<i>Halichoerus grypus</i>
X14848	Rata	<i>Rattus norvegicus</i>
J01420	Ratón	<i>Mus domesticus</i>
J01415	Hombre	<i>Homo sapiens</i>
J04815	Erizo de mar	<i>Paracentrotus lividus</i>
X12631	Erizo de mar	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
X03240	Mosca de la fruta	<i>Drosophila yakuba</i>
X69067	-----	<i>Artemia franciscana</i>
L06178	Abeja	<i>Apis mellifera</i>
X54252	-----	<i>Caenorhabditis elegans</i>
X52453	Lombriz intestinal	<i>Ascaris Suum</i>

Números de acceso del GenBank . Se indican únicamente las especies cuyo genoma mitocondrial ha sido secuenciado en su totalidad.

BIBLIOGRAFIA

- Allard, M.W., Miyamoto, M.M., Jarecki, L., Kraus, F. y Tennant, M.R. (1992) DNA systematics and evolution of the artiodactyl family Bovidae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 3972-3976.
- Amalric, F., Merkel, C., Geldfand, R. y Attardi, G. (1978) Fractionation of mitochondrial RNA from HeLa cells by high-resolution electrophoresis under strongly denaturing conditions. *J. Mol. Biol.* **118**, 1-25.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R. y Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457-464.
- Anderson, S., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Eperon, I.C., Sanger, F. y Young, I.G. (1982) Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian genome. *J. Mol. Biol.* **156**, 683-717.
- Andrews, A.T. (1991) Electrophoresis of nucleic acids. En *Essential molecular biology. A practical approach*. Ed. por T.A. Brown. IRL Press, Oxford.
- Ansorge, W., Sproat, B., Stegemann, J., Schwager, C. y Zenke, M. (1987) Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **15**, 4593-4602.
- Arnason, U., Gullberg, A. y Widegren, B. (1991) The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the Fin whale, *Balaenoptera physalus*. *J. Mol. Evol.* **33**, 556-568.
- Arnason, U. y Johnsson, E. (1992) The complete mitochondrial DNA sequence of the Harbor seal, *Phoca vitulina*. *J. Mol. Evol.* **34**, 493-505.
- Arnason, U., Gullberg, A., Johnsson, E. y Ledje, C. (1993) The nucleotide sequence of the mitochondrial DNA molecule of the grey seal, *Halichoerus grypus* and a comparison with mitochondrial sequences of other true seals. *J. Mol. Evol.* **37**, 312-322.
- Arnason, U. (1993). Secuencia completa del mtDNA de la ballena azul (*Balaenoptera musculus*) enviada directamente al GenBank. Nº de acceso x72204.
- Attardi, G. y Montoya, J. (1983) Analysis of human mitochondrial RNA. *Methods in Enzimology* **97**, 435-469.
- Attardi, G. (1985) Animal mitochondrial DNA: An extreme example of genetic economy. *Int. Rev. Cytol.* **93**, 93-145.
- Attardi, G. y Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Ann. Rev. Cell Biol.* **4**, 289-333.

- Aviv, H y Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**, 1408-1411.
- Bailey, J.M. y Davidson, N. (1975) Methylmercury as a reversible denaturing agent for agarose gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **70**, 75-85.
- Barrell, B.G., Bankier, T. y Drouin, J. (1979) A different genetic code in human mitochondria. *Nature* **282**, 184-194.
- Barrell, B.G., Anderson, S., Bankier, A.T., de Bruijn, M.H.L., Chen, E., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nerlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R. y Young, I.G. (1980) Different pattern of codon recognition by mammalian mitochondrial tRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3164-3166.
- Bessho, Y., Ohama, T. y Osawa, S. (1992) Planarian mitochondria II. The unique genetic code as deduced from COI gene sequences. *J. Mol. Evol.* **34**, 324-330.
- Bibb, M.J., Van Etten, R.A., Wright, C.T., Walberg, M.W. y Clayton, D.A. (1981) Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* **26**, 167-180.
- Birnboim, H.C. y Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1522.
- Bogenhagen, D.F. y Yoza, B.K. (1986) Accurate in vitro transcription of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA from two bidirectional promoters. *Mol. Cell Biol.* **6**, 2543-2550.
- Brown, T.A. (1991) Molecular biology labfax. BIOS, Oxford.
- Brown, W., George Jr., M. y Wilson, A.C. (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1967-1971.
- Burks, C., Cinkosky, M.J., Fischer, W.M., Gilna, P., Hayden, J.E., Keen, G.M., Kelly, M., Kristofferson, D. y Lawrence, J. (1992) GenBank. *Nucleic Acids Res.* **20**, 2065-2069.
- Buroker, N.E., Brown, J.R., Gilbert, T.A., O'Hara, P.J. Beckenbach, A.T., Thomas, W.K. y Smith, M.J. (1990) Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: an illegitimate elongation model. *Genetics* **124**, 157-163.
- Cano, J., Poinar, H., Pieniazek, N.J., Acra, A. y Poinar, G.O. (1993) Amplification and sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil. *Nature* **363**, 536 - 538.
- Cantatore, P., Flagella, Z., Fracasso, F., Lezza, A.M., Gadaleta, M.N., de Montalvo, A. (1987) Synthesis and Turnover Rates of Four Rat Liver Mitochondrial RNA species. *FEBS* **213**, 144-148.

- Cantatore, P. y Saccone, C. (1987) Organization, structure, and evolution of mammalian mitochondrial genes. *Int. Rev. Cyt.* **108**, 149-208.
- Cantatore, P., Roberti, M., Rainaldi, G., Gadaleta, M.N. y Saccone, C. (1989) The complete nucleotide sequence, gene organization and genetic code of *Paracentrotus lividus*. *J. Biol. Chem.* **264**, 10965-10975.
- Cavalier-Smith, T. (1975) The origin of nuclei and of eucaryotic cells. *Nature* **256**, 463-467.
- Cavalli-Sforza, L.L. y Edwards, A.W. (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Amer. J. Hum. Genet.* **19**, 233-257.
- Chang, D.D. y Clayton, D.A. (1984) Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Cell* **36**, 635-643.
- Chang, D.D. y Clayton, D.A. (1986) Precise assignment of the heavy-strand promoter of mouse mitochondrial DNA: cognate start sites are not required for transcriptional initiation. *Mol. Cell Biol.* **6**, 3262-3267.
- Chang, D.D. y Clayton, D.A. (1987) A novel endoribonuclease cleaves at a priming site of mouse mitochondrial DNA replication. *EMBO J.* **6**, 409-417.
- Chang, D.D. y Clayton, D.A. (1989) Mouse RNAase MRP RNA is encoded by a nuclear gene and contains a decamer sequence complementary to a conserved region of mitochondrial RNA substrate. *Cell* **56**, 131-139.
- Chang, Y.S. y Huang, F.L. (1994) The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* **38**, 138-155.
- Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter W.J., Ragan, C.I, Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y., Doolittle, R.F. y Attardi, G. (1985) Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature* **314**, 592-597.
- Christianson, T.W. y Clayton, D.A. (1988) A tridecamer DNA sequence supports human mitochondrial RNA 3'-end formation in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4502-4509.
- Clark-Walker, G.D., McArthur, C.R. y Spriprakash, K. (1985) Location transcriptional control signals and transfer RNA sequence in *Torulopsis glabrata* mitochondrial DNA. *EMBO J.* **4**, 465-473
- Clary, D.O. y Wolstenholme, D.R. (1985) The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization and genetic code. *J. Mol. Evol.* **22**, 252-271.
- Clayton, D.A. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* **28**, 693-705.

- Clayton, D.A. (1991) Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**, 453-478.
- Crick, F.H. (1966) Codon-anticodon pairing: the wobble hypothesis. *J. Mol. Biol.* **19**, 548-555.
- Crozier, R.H. y Crozier, Y.C. (1993) The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics* **133**, 97-117.
- Cunningham, C.W., Blackstone, N.W. y Buss, L.W. (1992) Evolution of king crabs from hermit crab ancestors. *Nature* **355**, 539-542.
- Davidson, W.S., Bartlett, S.E., Birt, T.P. and Green, J.M. (1988) Cloning and sequence analysis of an XbaI fragment of rainbow trout mitochondrial DNA. *Curr. Genet.* **14**, 483-486.
- De Robertis, E.D. y De Robertis, E. M. (1984) *Biología Celular y Molecular*. Ed. El Ateneo, Barcelona.
- Desjardins, P. y Morais, R. (1990) Sequence and organization of the chicken mitochondrial genome. A novel gene order in higher vertebrates. *J. Mol. Biol.* **212**, 599-634.
- Deveraux, J., Haerberli, P. y Smithies, O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* **12**, 387-395.
- Digby, T.J., Gray, M.W. y Lazier, C.B. (1992) Rainbow trout mitochondrial DNA: sequence and structural characteristics of the non-coding control region and flanking tRNA genes. *Gene* **113**, 197-204.
- Dillon, M.C. y Wright, J.M. (1993) Nucleotide Sequence of the D-Loop Region of the Sperm Whale (*Physeter-Macrocephalus*) Mitochondrial Genome. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 296-305.
- Di Rienzo, A. y Wilson, A.C. (1991) Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 1597-1601.
- Doda, J.N., Wright, C.T. y Clayton, D.A. (1981) Elongation of displacement loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6116-6120.
- Doersen, C.J., Guerrier-Takada, C., Altman, S. y Attardi, G. (1985) Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria: comparison with the cytosol RNase P activity. *J. Biol. Chem.* **260**, 5942-5949.
- Dubin, D.T., Montoya, J., Timko, K.D. y Attardi, G. (1982) Sequence analysis and precise mapping of the 3' ends of HeLa Cell mitochondrial ribosomal RNAs. *J. Mol. Biol.* **157**, 1-19.

- Dunon-Bluteau, D y Brun, G. (1986) The secondary structures of the xenopus laevis and human mitochondrial small ribosomal subunit RNA are similar. *FEBS lett* **198**, 333-338.
- Farris, J.S. (1972) Estimating phylogenetic trees from distance matrices. *Amer. Natur.* **106**, 645-668.
- Farris, J.S. (1977) On the phenetic approach to vertebrate classification. En Major patterns in vertebrate evolution. Ed. por M.K. Hecht, P.C. Goody, y B.M. Hetch. pp 823-850. Plenum press. New York.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* **17**, 368-376.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**, 783-791.
- Felsenstein, J. (1988) Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Ann. Rev. Genet.* **22**, 521-565.
- Felsenstein, J. (1989) PHYLIP- phylogeny inference package (Version 3.4.). *Cladistics* **5**, 164-166.
- Fernández-Silva, P., Enríquez, J.A. y Montoya, J. (1992) A simple procedure for recovering the denaturing effect of methylmercury in agarose gel electrophoresis. *Biotechniques* **12**, 480-482.
- Fisher, R.A. (1930) The genetical theory of of natural selection. Clarendon Press. Oxford.
- Fisher, R.P. y Clayton, D.A. (1988) Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 3496-34509.
- Fisher, R.P., Parisi, M.A. y Clayton, D.A. (1989) Flexible recognition of rapidly evolving promoter sequences by mitochondrial transcription factor 1. *Genes Dev.* **3**, 2202-2217.
- Fisher, R.P., Lisowsky, T., Breen, G.A. y Clayton, D.A. (1991) A rapid efficient method for purifying DNA-binding proteins: Denaturation-renaturation chromatography of human and yeast extracts. *J. Biol. Chem.* **266**, 9153-9160.
- Fitch, W.M y Margoliash, E. (1967) Construction of phylogenetic trees. *Science* **155**, 279-284.
- Fitch, W.M (1977) On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Amer. Natur.* **3**, 223-257.
- Gadaleta, G., Pepe, G., De Candia, G., Quagliariello, C., Sibisa, E. y Saccone, C. (1989) The complete nucleotide sequence of the Rattus norvegicus mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates. *J. Mol. Evol.* **28**, 497-516.

- Garey, J.R. y Wolstenholme, D.R. (1989) Platyhelminth mitochondrial DNA: evidence for early origin of a tRNA^{Ser} AGN that contains a dihydrouridine arm replacement loop, and serine-specifying AGA and AGG codons. *J. Mol. Evol.* **28**, 374-387.
- Gelfand, R. y Attardi, G. (1981) Synthesis and turnover of mitochondrial ribonucleic acid in HeLa cells: the mature ribosomal and messenger ribonucleic acid species are metabolically unstable. *Mol. Cell. Biol.* **1**, 497-511.
- Gorr, T., Kleinschmidt, T. y Fricke, H. (1991) Close tetrapod relationships of the coelacanth *Latimeria* indicated by haemoglobin sequences. *Nature* **351**, 394-397.
- Grohmann, K., Amalric, F., Crews, S. y Attardi, G. (1978) Failure to detect "cap" structures in mitochondrial DNA-coded poly (A)-containing RNA from HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* **5**, 637-651.
- Haldane, J.B. (1932) *The causes of evolution*. Longmans and green. London.
- Haffter, P. y Fox, T.D. (1992) Suppression of carboxy-terminal truncations of the yeast mitochondrial mRNA-specific translational activator PET122 by mutations in two genes, MRP17 and PET127. *Mol. Gen. Genet.* **235**, 64-73.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid DNA. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-561.
- Hasewaga, M., Kishino, H., Hayasaka, K. y Horai, S. (1990) Mitochondrial DNA evolution in primates: transition rate has been extremely low in the lemur. *J. Mol. Evol.* **31**, 113-121.
- Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 1015-1069.
- Hattori, M. y Sakaki, Y. (1985) Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal. Biochem.* **152**, 232-238.
- Hayasaka, K., Gojobori, T. y Horai, S. (1988) Molecular phylogeny and evolution of primate mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.* **5**, 626-644.
- Hedges, S.B., Hass, C.A y Maxson, L.R. (1993) Relations of fish and tetrapods. *Nature* **363**, 501-502.
- Hensgens, L.A., Grivell, L.A., Borst, P. and Bos, J.L. (1979) Nucleotide sequence of the mitochondrial structural gene for subunit 9 of yeast ATPase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 1663-1667.
- Hess, J.F., Parisi, M.A., Bennett, J.L. y Clayton, D.A. (1991) Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* **351**, 236-239.

- Higgins, D.G. and Sharp, P.M. (1989). Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *CABIOS* **5**, 151-153.
- Higgins, D.G., Fuchs, R., Stoehr, P.J. y Cameron, G. (1992) The EMBL Data Library. *Nucleic Acids Res.* **20**, 2071-2074.
- Himeno, H., Masaki, H., Ohta, T., Kumagai, I., Miura, K.I. y Watanabe, K. (1987) Unusual genetic codes and a novel genome structure for tRNA^{Ser} AGY in starfish mitochondrial DNA. *Gene* **56**, 219-230.
- Hixson, J.E. y Brown, W.M. (1986) A comparison of the small ribosomal RNA genes from the mitochondrial DNA of the great apes and humans: sequence, structure, evolution and phylogenetic implications. *Mol. Biol. Evol.* **3**, 1-18.
- Hixson, J.E., Wong, T.W. y Clayton, D.A. (1986) Both the conserved stem-loop and divergent 5'-flanking sequences are required for initiation at the human mitochondrial origin of light-strand DNA replication. *J. Biol. Chem.* **261**, 2384 - 2390.
- Hoffman, H.F. y Avers, C. (1973) Mitochondria of yeast, ultrastructural evidence for one giant branched organelle. *Science* **181**, 749-751.
- HsuChen, C.C., Cleaves, G.R., Dubin, D.T. (1983) A major lysine tRNA with a CUU anticodon in insect mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **11**, 8659-8662.
- HsuChen, C.C., Kotin, R.M. y Dubin, D.T. (1984) Sequences of the coding and flanking regions of the large ribosomal subunit RNA gene of mosquito mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **12**, 7771-7785.
- Insdorf, N.F. y Bogenhagen, D.F. (1989 a) DNA polymerase γ from *Xenopus laevis*. I. The identification of a high molecular weight catalytic subunit by a novel DNA polymerase photolabeling procedure. *J. Biol. Chem.* **264**, 21491-21497.
- Insdorf, N.F. y Bogenhagen, D.F. (1989 b) DNA polymerase γ from *Xenopus laevis*. II. A 3'-5' exonuclease is tightly associated with the DNA polymerase activity. *J. Biol. Chem.* **264**, 21498 -21503.
- Irwin, D. M., Kocher, T.D. y Wilson, A.C. (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J. Mol. Evol.* **32**, 128-144.
- Jacobs, H.T., Elliott, D.J., Math, V.B. y Farquharson, A. (1988) Nucleotide sequence and gene organization of sea-urchin mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* **202**, 185-217.
- Janke, A., Feldmaier-Fuchs, G., Thomas, K., Von Haeseler, A. y Paabo, S. (1994) The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals. Aceptado en Genetics.

- John, P. y Whatley, F.R. (1975) *Paracoccus denitrificans* and the evolution of mitochondrion. *Nature* **254**, 995-998.
- Johansen, S., Guddal, P.H. y Johansen, T. (1990) Organization of the mitochondrial genome of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Nucleic Acids Res.* **18**: 411-419.
- Jukes, T.H. y Cantor, C.R. (1969) Evolution of protein molecules. En H.N. Munro, ed. *Mammalian protein metabolism*, pp 21-132. Academic Press. Nueva York.
- Jukes, T.H. y Osawa, S. (1990) The genetic code in mitochondria and chloroplasts. *Experientia* **46**, 1117-1126.
- Karawya, E.M. y Martin, R.G. (1987) Monkey .CV-1. mitochondrial DNA contains a unique triplication of 108 bp in the origin region. *Biochim. Biophys. Acta* **909**, 30-34.
- Kimura, M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* **217**, 624-626.
- Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**, 111-120.
- King, T.C. y Low, R.L. (1987) Mapping of control elements in th displacement Loop region of Bovine mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* **868**, 6024-6213.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S.V., Pääbo, S., Villablanca, F. X. y Wilson, A.C. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 6196-6200.
- Kraus, F. y Miyamoto, M.M. (1991) Rapid cladogenesis among the pecoran ruminants: evidence from mitochondrial DNA sequences. *Syst. Zool.* **40**, 117-130.
- Lagerkvist, U. (1978) Unorthodox codon reading and the evolution of the genetic code. *Cell* **23**, 305-306.
- Langley, C.H. y Fitch, W.M. (1974) An examination of the constancy of the rate of molecular evolution. *J. Mol. Evol.* **3**, 161-177.
- Lansman, R.A., Shade R.O., Shapira, J.F. y Avise, J.C. (1981) The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequences relatedness in natural populations. III. Techniques and potential applications. *J. Mol. Evol.* **17**, 214-226.
- Li, M. y Tzagoloff, A. (1979) Assembly of the mitochondrial membrane system: sequences of yeast mitochondrial valine and an unusual threonine tRNA gene. *Cell* **18**, 47-53.
- Loud, A.V. (1968) A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymatic cells. *J. Cell Biol.* **37**, 27-46.

- Lovtrup, S. (1977) The phylogeny of vertebrata. Ed. Wiley, London.
- Margoliash, E. (1963) Primary structure and evolution of cytochrome *c*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**, 672-679.
- Margulis, L. (1981) Symbiosis in cell evolution. Ed. W.H. Freeman and Co. San Francisco.
- Martin, A.P., Naylor, G.J. y Palumbi, S.R. (1992) Rates of mitochondrial DNA evolution in sharks are slow compared with mammals. *Nature* **357**, 153-155.
- Martin, A.P. (1993) Hammerhead shark origins. *Nature* **364**, 494.
- Meyer, A. y Wilson, A.C. (1990) Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *J. Mol. Evol.* **31**, 359-364.
- Mignotte, B., Barat, M. y Mounolou, J.C. (1985) Characterization of a mitochondrial protein binding to single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* **13**, 1703-1716.
- Mignotte, B., Gueride, M., Champagne, A.M. y Mounolou, J.C. (1990) Direct repeats in the non-coding region of rabbit mitochondrial DNA. Involvement in the generation of intra- and inter-individual heterogeneity. *Eur. J. Biochem.* **194**, 561-571.
- Milinkovitch, M.C, Orti, G. y Meyer, A. (1993) Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Nature* **361**, 346-348.
- Mitchell, P. (1979) Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* **206**, 1148-1159.
- Miyamoto, M.M., Kraus, F. y Ryder, O.A. (1990) Phylogeny and evolution of antlered deer determined from mitochondrial DNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6127-6131.
- Montoya, J., Ojala, D. y Attardi, G. (1981) Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs. *Nature* **290**, 465-470.
- Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M. y Attardi, G. (1982) Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 7195-7199.
- Montoya, J., Gaines, G. y Attardi, G. (1983) The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* **34**, 157-159.
- Montoya, J. y Attardi, G. (1986) ADN mitocondrial humano. *Investigación y Ciencia* **118**, 60-69.
- Moritz, C. y Brown, W.M. (1987) Tandem duplications in animal mitochondrial DNAs: Variation in incidence and gene content among lizards. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7183-7187.

- Mueller, L.D. y Ayala, F.J. (1982) Estimation and interpretation of genetic distance in empirical studies. *Genet. Res.* **40**, 127-137.
- Needleman, S.B. y Wunsch, C.D. (1970) A general method aplicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* **48**, 443-453.
- Nei, M. (1969) Gene duplication and nucleotide substitution in evolution. *Nature* **221**, 40-42.
- Nei, M., Tajima, F. y Tateno, Y. (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from data. II. Gene frequency data. *J. Mol. Evol.* **19**, 153-170.
- Nei, M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University press. New York.
- Ojala, D., Merkel, C., Gelfand, R. y Attardi, G. (1980) The tRNA genes punctuate the reading of genetic information in human mitochondrial DNA. *Cell* **22**, 393-403.
- Ojala, D., Montoya, J. y Attardi, G. (1981 a) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* **290**, 470-474.
- Ojala, D., Crews, S., Montoya, J., Geldfand, R., Attardi, G. (1981 b) A Small Polyadenylated RNA, Containing a Putative Ribosome Attachment Site, Maps Near the Origin of Human Mitochondrial DNA Replication. *J. Mol. Biol.* **290**, 470-474.
- Okimoto, R., MacFarlane, J.L., Clary, D.O. y Wolstenholme, D.R. (1992) The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*. *Genetics* **130**, 471-498.
- Osawa, S., Jukes, T., Watanabe, K. y Muto, A. (1992) Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiological reviews* **56**, 229-264.
- Pääbo, S., Higuchi, R.G. y Wilson, A.C. (1989) Ancient DNA and the polymerasechain reaction. The emerging field of molecular archaeology. *J. Biol. Chem.* **264**, 9709-9712.
- Palva, T.K. y Palva, E.T. (1985) Rapid isolation of animal mitochondrial DNA by alkaline extraction. *FEBS letters* **192**, 267-270.
- Palva, T.K. y Palva, E.T. (1987) Restriction site polymorphism in mitochondrial DNA of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson stocks in Finland. *Aquaculture* **67**, 283-289.
- Parisi, M.A. y Clayton, D.A. (1991) Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* **252**, 965-969.
- Pearson, W.R. y Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2444-2448.

- Poinar, H.N., Cano, J. y Poinar, G.O. (1993) DNA from an extinct plant. *Nature* **363**, 677.
- Proudfoot, N.J. y Brownlee, G.G. (1976) 3'non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **263**, 211-214.
- Ramírez, V., Savoie, P. y Morais, R. (1993) Molecular characterization and evolution of a duck mitochondrial genome. *J. Mol. Evol.* **37**, 296-310.
- Reijnders, L. (1975) The origin of mitochondria. *J. Mol. Evol.* **5**, 167-176.
- Roe, B.A., Din-Pow, M., Wilson, R.K. y Wong, J.F. (1985) The complete nucleotide sequence of the *Xenopus laevis* mitochondrial genome. *J. Biol. Chem.* **260**, 9759-9774.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermoestable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-49.
- Saitou, N. y Nei, M. (1986) The number of nucleotides required to determine the branching order of three species with special reference to the humen-chimpanzee-gorilla divergence. *J. Mol. Evol.* **24**, 189-204.
- Saitou, N. y Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Saitou, N. e Imanishi, T. (1989) Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum parsimony, maximum likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.* **6**, 514-525.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Ed. C. Nolan. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Sanger, F. (1981) Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* **214**, 1205-1210.
- Schllewen, U., Fricke, H., Scharl, M., Epplen, J.T. y Pääbo, S. (1993) Which home for coelacanth ?. *Nature* **363**, 406.
- Searcy, D.G., Stein, D.B. y Green. G.R. (1978) Phylogenetic affinities between eucaryotic cells and a thermoplastic mycoplasm. *Biosystems* **10**, 19-28.
- Shine, J. y Dalgarno, L. (1974) The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1342-1346.

- Shimayama, T., Himeno, H., Sasuga, J., Yokobori, S., Ueda, T. y Watanabe, K. (1990) The genetic code of a squid mitochondrial gene. *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* **22**, 73-74.
- Sneath, P.H. y Sokal, R.R. (1973) Numerical taxonomy. En A series of books in biology. Ed. por D. Kennedy y R.B. Park. W.H. freeman and company. San Francisco.
- Sourdis, J. y Krimbas, C. (1987) Accuracy of phylogenetic trees estimated from DNA sequence data. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 159-166.
- Staub, J.M. y Castora, F.J. (1993) Mammalian mitochondrial DNA sequences can function as in vivo bacterial transcription terminators. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **192**, 616-626.
- Steel, M.A., Lockhart, P.J. y Penny, D. (1993) Confidence in evolutionary trees from biological sequence data. *Nature* **364**, 440-442.
- Storer, T.I., Usinger, R.L., Stebbins, R.C. y Nybakken, J.W. (1982) Zoología general. Ed. Omega S.A. Barcelona.
- Sturmbauer, C. y Meyer, A. (1992) Genetic divergence, speciation and morphological stasis in a lineage of african cichlid fishes. *Nature* **358**, 578-581.
- Tabor, S. y Richardson, C.C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 4767-4771.
- Tapper, D.P., Van Etten, R.A. y Clayton, D.A. (1983) Isolation of mammalian mitochondrial DNA and RNA and cloning of the mitochondrial genome. *Methods in Enzimology* **97**, 426-434.
- Tartof, K.D. y Hobbs, C.A. (1987) Improved media for growing plasmid and cosmid clones. *Bethesda Res. Lab. Focus* **9**, 12-14.
- Tateno, Y., Nei, M. y Tajima, F. (1982) Accuracy of estimated phylogenetic trees from data. I. Distantly related species. *J. Mol. Evol.* **18**, 387-404.
- Taylor, F.J. (1974) Implications and extensions of the serial endosymbiosis theory of the origin of eukaryotes. *Taxon* **23**, 229-258.
- Taylor, F.J. (1976) Autogenous theories for the origin of eukaryotes. *Taxon* **25**, 377-390.
- Templenton, A.R. (1983) Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. *Evolution* **37**, 221-244.
- Thomas, P.S. (1983) Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Methods Enzimol.* **100**, 255- 266.

- Thomas, W.K. y Beckenbach, A.T. (1989) Variation in salmonid mitochondrial DNA: evolutionary constraints and mechanisms of substitution. *J. Mol. Evol.* **29**, 233-245.
- Tzeng C.S., Hui C.F., Shen S.C. y Huang, P.C. (1992) The complete nucleotide sequence of the *rossostoma lacustre* mitochondrial genome: conservation and variations among vertebrates. *Nucleic Acids Res.* **20**, 4853-4858.
- Valentine, J.W. (1978) En Evolución (Investigación y Ciencia). Ed. labor. Barcelona.
- Valverde, J.R. (1993) Caracterización del genoma mitocondrial de *Artemia franciscana*. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.
- Vawter, L. y Brown, W.M. (1986) Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science* **234**, 194-196.
- Walberg, M.W. y Clayton, D.A. (1981) Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-Loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* **9**, 5411-5421.
- Watson, J.D. y Crick, F.H. (1953) Molecular structure of nucleic acids. *Nature* **171**, 738-740.
- Wernette, C.M. y Kaguni, L.S. (1986) A mitochondrial DNA polymerase from embryos of *Drosophila melanogaster*. Purification, subunit structure, and partial characterization. *J. Biol. Chem.* **261**, 14764 - 14770.
- Wernette, C.M., Conway, M.C. y Kaguni, L.S. (1988) Mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila melanogaster* embryos: Kinetics, processivity, and fidelity of DNA polymerization. *Biochemistry* **27**, 6046-6054.
- Whittaker, R.H. (1969) New concepts of kingdoms of organisms. *Science* **163**, 150-159.
- Whittaker, R.H. y Margulis, L. (1978) Protist classification and the kingdoms of organisms. *Biosystems* **10**, 3-18.
- Wolstenholme, D.R., Macfarlane, J.L., Okimoto, R. Clary, D.O. y Wahleithner, J.A. (1987) Bizarre tRNAs inferred from DNA sequences of mitochondrial genomes of nematode worms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1324-1328.
- Wong, T.W. y Clayton, D.A. (1985) In vitro replication of human mitochondrial DNA: accurate initiation at the origin of light-strand synthesis. *Cell* **42**, 951-958.
- Wright, S. (1931) Evolution in mendelian populations. *Genetics* **16**, 97-159.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. y Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.

- Zardoya, R., Villalta, M., López-Pérez, M.J., Garrido-Pertierra, A., Montoya, J. y Bautista, J.M. (1994). Nucleotide sequence of the sheep mitochondrial DNA D-loop region: an atypical pattern for mammals. Enviado a *Mol. Biol. Evol.*
- Zuckerkindl, E. y Pauling, L. (1962) Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. En *Horizons in Biochemistry*. Ed. por M. Kasha y B. Pullman. pp 189-225. Academic press. New York.

AGRADECIMIENTOS

En las páginas precedentes se resumen el esfuerzo y la ilusión de los últimos cuatro años. Si yo puse entusiasmo de mi parte, la dedicación fue posible en gran parte gracias a la concesión de una beca de investigación por parte de la Universidad Complutense. A continuación, quiero destacar aquellas personas cuyo trabajo ha sido imprescindible para que esta tesis haya finalizado con éxito.

Mis directores de tesis, Amando Garrido Pertierra y José Manuel Bautista me dieron la oportunidad de iniciarme en la investigación científica. Durante el desarrollo de esta tesis he podido comprobar como su esfuerzo día a día transformaba unas instalaciones prácticamente vacías, en el actual laboratorio de bioquímica y biología molecular que permite ya, desarrollar una investigación cada vez más avanzada y competente. Además de los medios, debo estarles agradecido especialmente por la libertad y confianza que me han dado en todo momento.

La ayuda de los doctores Julio Montoya y Acisclo Pérez Martos ha sido también muy importante en este trabajo. Su preocupación continua y gran experiencia junto con su amabilidad hicieron que mi estancia en Zaragoza fuera muy fructífera y entrañable. El poder observar las bandas de RNA mitocondrial de la trucha arco iris en un gel teñido con bromuro de etidio es uno de los resultados de esta tesis que más me satisface personalmente.

I also wish to acknowledge Dr. Phil Mason for my productive appointment at the Hammersmith Hospital. He assumed the hard task of introducing me in the difficult world of cloning and hybridisation techniques. Apart from molecular biology, he also demonstrated to be an expert chap in ales, football and blues.

María Isabel García Saez, como responsable de la unidad de secuenciación automática de la Universidad Complutense, ha participado en el otro gran resultado de esta tesis, la secuenciación completa del DNA mitocondrial de la trucha arco iris. Su labor ha sido eficaz y competente, su amabilidad una suerte.

Por último, agradezco a todas las demás personas que de un modo u otro me han ayudado en la realización de este trabajo.