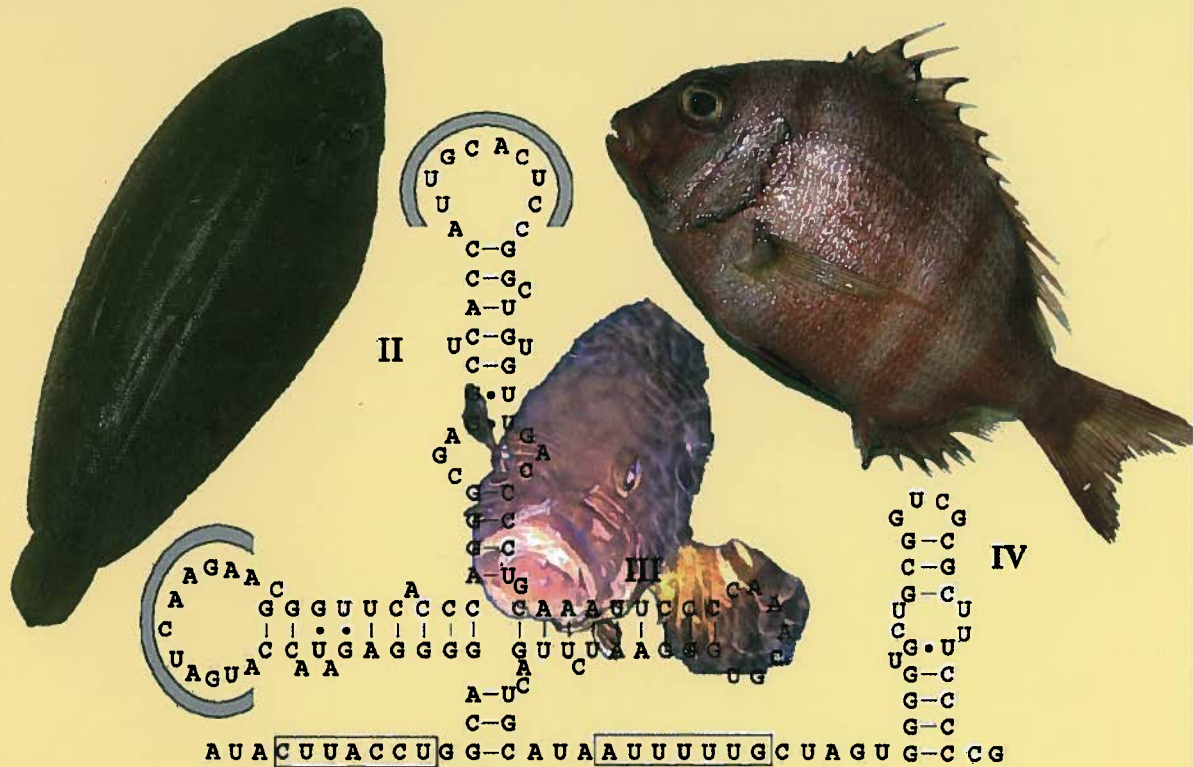


Marcadores moleculares en especies marinas

Bases teóricas, tipos y aplicación al estudio de las relaciones filogenéticas, estructura poblacional y autenticación de melva

Marcadores moleculares em espécies marinhas

Bases teóricas, tipos e aplicação ao estudo das relações filogenéticas, estrutura populacional e autenticação de judeu



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE INNOVACIÓN, CIENCIA Y EMPRESA
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA

MARCADORES MOLECULARES EN ESPECIES MARINAS. BASES TEÓRICAS, TIPOS Y APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS, ESTRUCTURA POBLACIONAL Y AUTENTIFICACIÓN DE MELVA (*Auxis rochei*)

MARCADORES MOLECULARES EM ESPÉCIES MARINHAS. BASES TEÓRICAS, TIPOS E APLICAÇÃO AO ESTUDO DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS, ESTRUTURA POPULACIONAL E AUTENTIFICAÇÃO DE JUDEU (*Auxis rochei*)

IFAPA Centro *El Toruño*. Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa. Junta de Andalucía.

Esta monografía sobre Marcadores Moleculares en Especies Marinas, forma parte del capítulo de transferencia de resultados y divulgación derivada parcialmente de los trabajos realizados en el marco de la Iniciativa Comunitaria INTERREG IIIA, programa España-Portugal por el Instituto Nacional de Investigaçao Agraria e das Pescas (IPI-MAR/ CRIPSul), el Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) y el Centro da Ciências do Mar do Algarve (CCMAR), Universidade do Algarve.

Autores:

Manuel Manchado, Carlos Infante, Gaetano Catanese.

Socios del proyecto:

Parceiros:



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE INNOVACIÓN, CIENCIA Y EMPRESA

Financiación:

Apoio:



Portugal-Espanha
Cooperação Transfronteiriça
INTERREG III A



INTERREG III A
Cooperación Transfronteriza
Espania-Portugal



Unión Europea



Governo da República Portuguesa

Título: MARCADORES MOLECULARES EN ESPECIES MARINAS.
BASES TEÓRICAS, TIPOS Y APLICACIÓN AL ESTUDIO DE LAS RELACIONES
FILOGENÉTICAS, ESTRUCTURA POBLACIONAL Y AUTENTIFICACIÓN DE MELVA
(*Auxis rochei*).

© Edita: Junta de Andalucía. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.
Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa.
Consejería de Agricultura y Pesca.

Publica: Viceconsejería. Servicio de Publicaciones y Divulgación.
Colección: Pesca y Acuicultura.

Serie: Recursos Pesqueros.

© Textos: Autores.

ISBN: 978-84-8474-224-1

Depósito Legal: SE-6575-07

Fotocomposición e impresión: Arcoiris, Diseño y Producción, S.L.

PRESENTACIÓN

En el marco de la Iniciativa Comunitaria INTERREG III programada por la Comisión Europea para el periodo 2000-2008, Andalucía y Algarve vienen sosteniendo una importante cooperación transfronteriza en el eje del desarrollo socioeconómico y promoción de la empleabilidad, siendo uno de los principales objetivos generales promover la innovación y los niveles de desarrollo tecnológico de las empresas y de las organizaciones regionales, así como la cualificación de los recursos humanos, incluyendo como medida principal el desarrollo tecnológico, la investigación y la extensión de la sociedad de la información. Esta medida considera como objetivo específico estimular la creación de ambientes favorables a la cooperación científica y tecnológica. Especialmente, a partir de desarrollar experiencias de trabajo común, de potenciar la producción y la distribución de resultados de los procesos de innovación y desarrollo tecnológico realizados por instituciones de I+D de ambos lados de la frontera, y de apoyar la concepción y desarrollo de acciones conjuntas, con la finalidad de promover la investigación técnica y científica en campos orientados a la valorización de recursos regionales.

Dentro de este objetivo, durante los últimos años se vienen ejecutando diversas acciones de cooperación entre Andalucía y el Algarve para incorporar el conocimiento y la innovación en el desarrollo de los cultivos acuícolas y en la optimización de la gestión y promoción de los recursos pesqueros litorales, realizados por el Instituto de Investigación y Formación

APRESENTAÇÃO

No âmbito da Iniciativa Comunitária INTERREG III programada pela Comissão Europeia para o período de 2000-2008, a Andaluzia e o Algarve vêm mantendo uma importante cooperação transfronteiriça no eixo do desenvolvimento socio-económico e promoção da empregabilidade, sendo um dos principais objetivos gerais a promoção da inovação e dos níveis de desenvolvimento tecnológico das empresas e das organizações regionais, assim como a qualificação dos recursos humanos, incluindo como medida principal o desenvolvimento tecnológico, a investigação e a extensão da sociedade da informação. Esta medida considera como objetivo específico a estimulação da criação de ambientes favoráveis à cooperação científica e tecnológica. Especialmente a partir do desenvolvimento de experiências de trabalho comum, do reforço da produção e da distribuição de resultados dos processos de inovação e desenvolvimento tecnológico realizados por instituições de I+D de ambos os lados da fronteira, e do apoio à concepção e desenvolvimento de ações conjuntas, tendo em vista promover a investigação técnica e científica em campos orientados para a valorização de recursos regionais.

Dentro deste objetivo, durante os últimos anos vêm-se executando diversas ações de cooperação entre a Andaluzia e o Algarve para incorporar o conhecimento e a inovação no desenvolvimento dos cultivos aquícolas e na optimização da gestão e promoção dos recursos pesqueiros litorais, realizados pelo Instituto de Investigação e Formação Agrária e Pesqueira, pelo

Agraria y Pesquera, el Instituto Nacional de Investigaçao Agraria e das Pescas y la Universidad do Algarve. Incluyen distintos proyectos sobre diversificación de la acuicultura (DIVERAQUA, REDAQUA y PROMAR) y sobre las bases científicas para la gestión de los recursos pesqueros de interés común (GESTPESCA I y II, PROMOPESCA). Estos proyectos incorporan estudios conjuntos y cooperaciones científicas y tecnológicas, intercambios de conocimientos y formación de jóvenes investigadores, así como jornadas técnicas y difusión de los resultados mediante catálogos de actuaciones y manuales de divulgación.

La presente monografía sobre Marcadores Moleculares en Especies Marinas, derivada parcialmente de los trabajos de GESTPESCA, forma parte de este capítulo de transferencia de resultados y divulgación sobre los conocimientos científicos actuales, metodologías y aplicaciones de dicha técnica genómica, para una optimización de la gestión de los recursos acuícolas y pesqueros algarvios y andaluces de interés común, que esperamos redunde en una modernización e innovación de los sistemas productivos como instrumento para reforzar la capacidad competitiva y la mejora socioeconómica sectorial en dicho ámbito interregional.

Instituto Nacional de Investigaçao Agrária e das Pescas e pela Universidade do Algarve. Incluem diferentes projectos sobre a diversificação da aquicultura (DIVERAQUA, REDAQUA e PROMAR) e sobre as bases científicas para a gestão dos recursos pesqueiros de interesse comum (GESTPESCA I e II, PROMOPESCA). Estes projectos incorporam estudos conjuntos e cooperações científicas e tecnológicas, intercâmbios de conhecimentos e formação de jovens investigadores, assim como jornadas técnicas e difusão dos resultados mediante catálogos de actuações e manuais de divulgação.

A presente monografia sobre Marcadores Moleculares em Espécies Marinhas, derivada parcialmente dos trabalhos da GESTPESCA, faz parte deste capítulo de transferência de resultados e divulgação dos conhecimentos científicos actuais, metodologias e aplicações de tal técnica genómica, para uma optimização da gestão dos recursos aquícolas e pesqueiros algarvios e andaluzes de interesse comum, que esperamos redunde numa modernização e inovação dos sistemas produtivos como instrumento para o reforço da capacidade competitiva e para a melhoria socio-económica sectorial em tal âmbito interregional.

Índice general

Índice geral

PARTE 1. BASES TEÓRICAS Y TIPOS	
PARTE 1. BASES TEORICAS E TIPOS	9
UNIDAD 1. VARIABILIDAD GENÉTICA: BASES MOLECULARES	
UNIDADE 1. VARIABILIDADE GENÉTICA: BASES MOLECULARES ..	11
1.1 INTRODUCCIÓN	
1.1 INTRODUÇÃO	11
1.2 REPLICACIÓN DEL ADN	
1.2 REPLICAÇÃO DE DNA	12
1.3 MUTACIÓN: TIPOS	
1.3 MUTAÇÃO: TIPOS	13
1.3.1 MUTACIONES POR SUSTITUCIÓN	
1.3.1 MUTAÇÕES POR SUBSTITUIÇÃO	14
1.3.2 RECOMBINACIÓN	
1.3.2 RECOMBINAÇÃO	17
1.3.3 INSERCIONES Y DELECIONES (INDELS)	
1.3.3 INSERÇÕES E DELEÇÕES (INDELS)	18
1.3.4 INVERSIONES	
1.3.4 INVERSÕES	21
1.4 DISTRIBUCIÓN Y FRECUENCIA DE MUTACIONES	
1.4 DISTRIBUIÇÃO E FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES	21
UNIDAD 2. DINÁMICA DE GENES EN LAS POBLACIONES	
UNIDADE 2. DINÂMICA DE GENES NAS POPULAÇÕES	23
2.1 EL PRINCIPIO DE HARDY-WEINBERG	
2.1 O PRINCÍPIO DE HARDY-WEINBERG	23
2.2 DESVIACIONES DEL EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG	
2.2 DESVIOS DO EQUILIBRIO DE HARDY-WEINBERG	24
2.3 TAMAÑO EFECTIVO POBLACIONAL	
2.3 TAMANHO EFECTIVO POPULACIONAL	26

2.4 POLIMORFISMO GENÉTICO	
2.4 POLIMORFISMO GENÉTICO	29

2.5 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA	
2.5 DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA	31

**UNIDAD 3. MARCADORES MOLECULARES:
TIPOS Y APLICACIONES**

**UNIDADE 3. MARCADORES MOLECULARES:
TIPOS E APLICAÇÕES**

34

3.1.- INTRODUCCIÓN	
3.1.- INTRODUÇÃO	34

3.2. POLIMORFISMO DE PROTEÍNAS: ALOENZIMAS	
3.2. POLIMORFISMO DE PROTEÍNAS: ALOENZIMAS	36

3.3. POLIMORFISMOS A NIVEL DE ADN	
3.3. POLIMORFISMOS A NÍVEL DE DNA	39

3.3.1 PCR ("POLYMERASE CHAIN REACTION"): LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	
3.3.1 PCR ("POLYMERASE CHAIN REACTION"): A REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	39

3.3.2 MICROSATÉLITES	
3.3.2 MICROSATÉLITES	44

3.3.3 MINISATÉLITES	
3.3.3 MINISATÉLITES	48

3.3.4 RFLP ("RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM"): POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN	
3.3.4 RFLP ("RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM"): POLIMORFISMO NA LONGITUDE DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO	50

3.3.5 AFLP ("AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM"): POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	
3.3.5 AFLP ("AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM"): POLIMORFISMO NO TAMANHO DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	53

3.3.6 SSCP ("SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM"): POLIMORFISMO EN LA CONFORMACIÓN DE LAS CADENAS SENCILLAS DE ADN	
3.3.6 SSCP ("SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM"): POLIMORFISMO NA CONFIGURAÇÃO DAS CADEIAS SIMPLES DE DNA	58
3.3.7 RAPD ("RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA"): ADN POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AL AZAR	
3.3.7 RAPD ("RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA"): DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO AO ACASO	60
3.3.8 SNPS ("SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM"): POLIMORFISMOS DE UN NUCLEÓTIDO	
3.3.8 SNPS ("SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM"): POLIMORFISMOS DE UM NUCLEÓTIDO	63
3.3.9 PCR A TIEMPO REAL	
3.3.9 PCR EM TEMPO REAL	64
3.3.10 MICROARRAYS DE ADN	
3.3.10 MICROARRAYS DE DNA	68
LECTURAS RECOMENDADAS	
LEITURAS RECOMENDADAS	71

PARTE II: APLICACIÓN EN EL ESTUDIO DE LA ESPECIE *Auxis rochei*

PARTE II: APLICAÇÃO NO ESTUDO

DA ESPÉCIE <i>Auxis rochei</i>	73
4.1 INTRODUCCIÓN	
4.1 INTRODUCÇÃO	75
4.2 CARACTERIZACIÓN DEL ADN MITOCONDRIAL EN EL GÉNERO <i>Auxis</i> Y APLICACIÓN AL ESTABLECIMIENTO DE LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE DISTINTAS ESPECIES DE ESCÓMBRIDOS	
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL NO GÉNERO <i>Auxis</i> E APLICAÇÃO NO ESTABELECIMENTO DAS RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE DIFERENTES ESPÉCIES DE ESCOMBRÍDEOS	77

4.3 APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES AL ESTUDIO DE POBLACIONES DE <i>Auxis rochei</i>	
4.3 APLICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NO ESTUDO DE POPULAÇÕES DE <i>Auxis rochei</i>	94
4.3.1 RESULTADOS EN BASE AL ADN MITOCONDRIAL	
4.3.1 RESULTADOS COM BASE NO DNA MITOCONDRIAL	96
4.3.2 RESULTADOS EN BASE A LOS ESPACIADORES TRANSCRITOS INTERNOS ITS-1 E ITS-2	
4.3.2 RESULTADOS COM BASE NOS ESPAÇADORES TRANSCRITOS INTERNOS ITS-1 E ITS-2	108
4.3.3 RESULTADOS EN BASE A MICROSATÉLITES	
4.3.3 RESULTADOS COM BASE NOS MICROSSATÉLITES	112
4.3.4 CONCLUSIONES	
4.3.4 CONCLUSÕES	123
4.4. APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES EN LA IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE MELVA (<i>Auxis spp.</i>)	
4.4. APLICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE JUDEU (<i>Auxis spp.</i>)	123
4.4.1 LA PROBLEMÁTICA DE LAS CONSERVAS DE PESCADO	
4.4.1 A PROBLEMÁTICA DAS CONSERVAS DE PEIXE	123
4.4.2 IMPORTANCIA COMERCIAL DE LA MELVA	
4.4.2 IMPORTÂNCIA COMERCIAL DO JUDEU	125
4.4.3 DISEÑO DE UN SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN PARA MELVA	
4.4.3 CRIAÇÃO DE UM SISTEMA DE IDENTIFICAÇÃO PARA O JUDEU	126
4.4.4 CARACTERÍSTICAS Y VENTAJAS DEL SISTEMA DISEÑADO	
4.4.4. CARACTERÍSTICAS E VANTAGENS DO SISTEMA CRIADO	133
BIBLIOGRAFÍA	
BIBLIOGRAFIA	139

PARTE I: BASES TEÓRICAS Y TIPOS

PARTE I: BASES TEÓRICAS E TIPOS

UNIDAD 1.

Variabilidad genética: Bases moleculares

1.1 Introducción

A lo largo de la evolución, la constitución genética de los organismos sufre modificaciones que dan lugar a polimorfismos intraespecíficos y a procesos de especiación. Siempre ha existido un enorme interés por la estimación y cuantificación de esta variabilidad. Limitaciones en los hábitats en los que los organismos se desarrollan junto a diferentes estrategias reproductivas contribuyen a generar grandes diferencias en la cantidad y distribución de dicha variabilidad genómica. El actual estado de desarrollo de las técnicas basadas en ADN ha posibilitado la aparición de métodos más potentes para medir la variabilidad genética. Estas medidas nos han permitido estudiar y avanzar en el conocimiento de los mecanismos evolutivos, relaciones de parentesco y de parámetros poblacionales o adaptativos que permiten investigar la historia evolutiva de las poblaciones.

El conocimiento de las relaciones filogenéticas entre individuos de especies próximas es útil para la comprensión de la conducta y de los procesos evolutivos intraespecíficos. Igualmente, los programas de mejora genética y los de regeneración de stocks de especies amenazadas, requieren el conocimiento del grado de parentesco genético entre los individuos para evitar los efectos perjudiciales de la endogamia. Además, los planes de repoblación deben considerar el impacto genético sobre la población

UNIDADE 1.

Variabilidade genética: Bases moleculares

1.1 Introdução

Ao longo da evolução, a constituição genética dos organismos sofre modificações que dão lugar a polimorfismos intraespecíficos e a processos de especiação. Existiu sempre um enorme interesse pela estimativa e quantificação desta variabilidade. Limitações dos habitats onde os organismos se desenvolvem juntamente com diferentes estratégias reprodutivas contribuem para gerar grandes diferenças na quantidade e distribuição da dita variabilidade genómica. O actual estado de desenvolvimento das técnicas baseadas em DNA possibilitou o aparecimento de métodos mais potentes para medir a variabilidade genética. Estas medidas permitiram-nos estudar e avançar no conhecimento dos mecanismos evolutivos, graus de parentesco e de parâmetros populacionais ou adaptativos que permitem investigar a história evolutiva das populações.

O conhecimento das relações filogenéticas entre indivíduos de espécies próximas é útil para a compreensão do comportamento e dos processos evolutivos intraespecíficos. Igualmente, os programas de melhoramento genético e os de regeneração de stocks de espécies ameaçadas, requerem o conhecimento do grau de parentesco genético entre os indivíduos para evitar os efeitos prejudiciais da endogamia. Além disso, os planos de repovoamento devem considerar o impacto genético sobre a população nativa,

nativa, en cuanto a la modificación de la estructura genética y del tamaño efectivo poblacional.

En esta unidad se abordará, desde un punto de vista molecular, los mecanismos que dan origen a la variabilidad y a la diversidad genética. La comprensión de estos mecanismos, con una visión eminentemente práctica, permitirá el análisis e interpretación de los resultados obtenidos al aplicar en especies de origen marino distintas técnicas basadas en marcadores moleculares.

1.2 Replicación del ADN

La transmisión del ADN a la siguiente generación requiere nuevas copias de sus 2 cadenas, proceso conocido como replicación. Sin embargo, este paso crítico implica la existencia de mecanismos que garanticen una alta fidelidad para evitar cambios que puedan alterar la información de las cadenas molde. En eucariotas la replicación es muy compleja, comenzando en diferentes sitios simultáneamente, que son reconocidos por proteínas específicas posibilitando que el proceso dure sólo unas horas.

Generalmente los procesos de replicación del ADN están íntimamente asociados a otros a nivel celular y cromosómico. En la mayoría de eucariotas, las células son diploides, con 2 juegos de cromosomas (células somáticas, 2N), o haploides (gametos, N). Cuando los gametos se unen y forman un cigoto diploide, éste entra en división celular para producir células diploides en un proceso conocido como *mitosis*. Paralelamente, los gametos se originan a partir de células

no que diz respeito à modificação da estrutura genética e do tamanho do efectivo populacional.

Nesta unidade abordar-se-á, do ponto de vista molecular, os mecanismos que dão origem à variabilidade e à diversidade genética. A compreensão destes mecanismos, com uma perspectiva eminentemente prática, permitirá a análise e interpretação dos resultados obtidos ao aplicar em espécies de origem marinha diferentes técnicas baseadas em marcadores moleculares.

1.2 Replicação de DNA

A transmissão do DNA à geração seguinte requer novas cópias das suas duas cadeias, processo conhecido como replicação. No entanto, este passo crítico implica a existência de mecanismos que garantam uma alta fidelidade, para evitar modificações que possam alterar a informação das cadeias molde. Nos eucariotas a replicação é muito complexa, começando em diferentes sítios simultaneamente, que são reconhecidos por proteínas específicas posibilitando que o processo dure somente algumas horas.

Geralmente os processos de replicação de DNA estão intimamente associados a outros a nível celular e cromossómico. Na maioria dos eucariotas, as células são diplóides, com 2 cromossomas por par (células somáticas, 2N), ou haplóides (gâmetas, N). Quando os gâmetas se unem e formam um zigoto diplóide, este entra em divisão celular para produzir células num processo conhecido como *mitose*. Paralelamente, os gâmetas originam-se a partir de células espe-

las especializadas en un proceso similar conocido como *meiosis*. La diferencias básicas entre los procesos de mitosis y meiosis radican en que esta última posee dos divisiones celulares, frente a una división única en mitosis, que dan lugar a gametos haploides. Además, durante la meiosis ocurren emparejamientos y procesos de recombinación entre cromosomas homólogos. No obstante, la mitosis y la meiosis se asemejan en que ambas necesitan una replicación de cada cromosoma antes de que ambos procesos comiencen. Los cromosomas se replican en una cromátida hermana que después se divide en 2 cromosomas hermanos para cada célula hija o bien, en una segunda división, en 4 células haploides hijas durante la meiosis.

1.3 Mutación: tipos

Aunque la replicación del ADN es un sistema muy eficiente y seguro, a veces no funciona correctamente dando lugar a errores o mutaciones. Hay que indicar que mientras muchas mutaciones ocurren durante la replicación, otras pueden ocurrir de forma espontánea y por factores ambientales, tales como la luz ultravioleta o químicos, que dañan el ADN. La mayor velocidad evolutiva del ADN mitocondrial (ADNmt) generalmente se ha asociado a la alta producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las cadenas de transporte electrónico. Las EROs interactúan con el ADNmt provocando mutaciones que no pueden ser corregidas debido a la ausencia de un sistema reparativo específico de este orgánulo. Si estas mutaciones se heredan entre generaciones permitirá la aparición de nue-

cializadas num processo similar conhecido como *meiose*. As diferenças básicas entre os processos de mitose e meiose residem no facto desta última possuir duas divisões celulares, contra apenas uma na mitose, que dão lugar a gâmetas haplóides. Além disso, durante a meiose ocorrem emparelhamentos e processos de recombinação entre cromossomas homólogos. Não obstante, a mitose e a meiose assemelham-se por ambas necessitarem de uma replicação de cada cromossoma antes do início de ambos os processos. Os cromossomas replicam-se numa cromátide irmã que depois se divide em 2 cromossomas irmãos para cada célula filha, ou então, numa segunda divisão, em 4 células haplóides filhas durante a meiose.

1.3 Mutação: tipos

Ainda que a replicação de DNA seja um sistema muito eficaz e seguro, por vez não funciona correctamente dando lugar a erros ou mutações. Há que dizer que apesar de muitas mutações ocorrerem durante a replicação, outras podem ocorrer de forma espontânea e por factores ambientais, tais como luz ultravioleta ou químicos, que danificam o DNA. A maior velocidade evolutiva do DNA mitocondrial (DNAm_t) associa-se geralmente à grande produção de espécies reactivas de oxigénio (EROs) nas cadeias de transporte electrónico. As EROs interagem com o DNAm_t provocando mutações que não podem ser corrigidas devido à ausência de um sistema reparador específico deste organelo. Se estas mutações se herdarem entre gerações, isto permitirá o aparecimento de novas variantes genéticas e

vas variantes genéticas y favorecerá el cambio evolutivo. Por ello, sólo aquellas mutaciones que ocurran en los gametos tendrán la posibilidad de transmitirse. Errores que ocurren en las células somáticas producirán trastornos al individuo pero no se transmitirán a su descendencia.

Las mutaciones pueden clasificarse en función de la longitud de la secuencia de ADN afectada. Así, aquellas mutaciones que afectan a un solo nucleótido se denominan **mutaciones puntuales**, frente a las que afectan a varios nucleótidos adyacentes o **mutaciones de segmento**. Las mutaciones también se clasifican por el tipo de cambio: *i) sustituciones*, cuando se cambia un nucleótido por otro; *ii) recombinaciones*, cuando se intercambia una secuencia con otra; *iii) inserciones o delecciones (Indels)*, cuando se añaden o eliminan 1 o más nucleótidos y *iv) inversiones*, por la rotación de 180° de un segmento de ADN bicatenario que comprende 2 o más bases.

1.3.1.- Mutaciones por sustitución

Las sustituciones se clasifican en **transiciones y transversiones**. Las transiciones son cambios entre las purinas A y G o entre las pirimidinas C y T (Fig. 1). Las transversiones son cambios entre purinas y pirimidinas. Mientras que tan sólo se describen 4 tipos de transiciones, existen 8 tipos de transversiones.

Cuando las sustituciones ocurren en regiones que codifican para proteínas se pueden clasificar según su efecto en la traducción. Una mutación se considera **sinónima** o **silente** si no

favorecerá a la mudança evolutiva. Por isso, apenas aquelas mutações que ocorram nos gametas terão a possibilidade de se transmitir. Os erros que ocorrem nas células somáticas produzirão alterações no indivíduo mas não se transmitirão à sua descendência.

As mutações podem classificar-se em função do tamanho da seqüência de DNA afetada. Assim, aquelas mutações que afetam apenas um nucleótido denominam-se **mutações pontuais**, em comparação com as que afetam vários nucleótidos adjacentes ou **mutações de segmento**. As mutações também se classificam pelo tipo de troca: *i) substituições*, quando se troca um nucleótido por outro; *ii) recombinaciones*, quando se interliga uma seqüência com outra; *iii) inserções ou deleções (Indels)*, quando se adicionam ou eliminam 1 ou mais nucleótidos e *iv) inversiones*, pela rotação de 180° de um segmento de DNA de cadeia dupla que contém 2 ou mais bases.

1.3.1.- Mutações por substituição

As substituições classificam-se em **transições e transversões**. As transições são trocas entre as purinas A e G ou entre as pirimidinas C e T (Fig. 1). As transversões são trocas entre purinas e pirimidinas. Embora só se descrevam 4 tipos de transições, existem 8 tipos de transversões.

Quando as substituições ocorrem em regiões que codificam para proteínas podem-se classificar de acordo com o seu efeito na tradução. Uma mutação considera-se **sinónima** ou **silente** se não provoca trocas nos aminoácidos codificados. Caso contrário, conside-

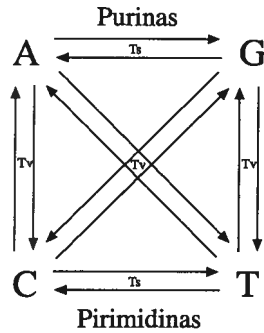


Figura 1: Tipos de sustituciones. Ts: Transiciones; Tv: Transversiones
 Figura 1: Tipos de substituições. Ts: Transições; Tv: Transversões

provoca cambios en los aminoácidos codificados. En caso contrario, se le considera **no sinónima**. A su vez, estas mutaciones no sinónimas se clasifican en *mutaciones con cambio de aminoácido* y *mutaciones sin sentido*, cuando se crea un codón de terminación que finaliza prematuramente la traducción, originando una proteína truncada.

Dada la degeneración del código genético, casi el 70% de los cambios nucleotídicos que ocurren en la tercera posición de los codones son sinónimos. Por el contrario, todos los cambios nucleotídicos de la segunda posición y el 96% de la primera posición de los codones son no sinónimos. Esta situación se quiere representar en la figura 2. Estos datos corresponden a las sustituciones encontradas en el gen mitocondrial citocromo *b* de 10 especies pertenecientes a la familia Soleidae. Al representar la distancia genética frente al número de mutaciones podemos observar como el número de mutaciones de la tercera posición es mucho más abundante. Además, mientras que el número de mutaciones aumenta con la distancia

ra-se **não sinónima**. Por sua vez, estas mutações não sinónimas classificam-se em *mutações com troca de aminoácido* e *mutações sem sentido*, quando se cria um codão de terminação que finaliza prematuramente a tradução, originando uma proteína truncada.

Devido à degeneração do código genético, quase 70% das trocas nucleotídicas que ocorrem na terceira posição dos codões são sinónimas. Pelo contrário, todas as trocas nucleotídicas da segunda posição e 96% da primeira posição dos codões são não sinónimas. Pretende-se representar esta situação na figura 2. Estes dados correspondem às substituições encontradas no gene mitocondrial citocromo *b* de 10 espécies pertencentes à família Soleidae. Ao representar a distância genética em comparação com o número de mutações podemos observar como o número de mutações da terceira posição é muito mais abundante. Além disso, embora o número de mutações aumente com a distância genética de forma linear para as transições e transversões da primeira e segunda posição, as transições da ter-

genética de forma lineal para las transiciones y transversiones de la primera y segunda posición, las transiciones de la tercera posición están saturadas. Este fenómeno nos indica la alta frecuencia de transiciones en esta posición, lo que origina procesos de *homoplasia* o *reversión*. Cuando una posición muta repetidamente pueden ocurrir reversiones hacia la secuencia primigenia. Esto hace que el acúmulo de mutaciones no sea lineal. Como se observa en la gráfica correspondiente a la tercera posición, mientras que las transversiones siguen una tendencia lineal, las transiciones presentan procesos de saturación.

ceira posição estão saturadas. Este fenômeno indica-nos a alta frequência de transições nesta posição, o que origina processos de *homoplasia* ou *reversão*. Quando uma posição muda repetidamente podem ocorrer reversões até à seqüência primogénia. Isto faz com que a acumulação de mutações não seja linear. Como se observa no gráfico correspondente à terceira posição, embora as transversões sigam uma tendência linear, as transições apresentam processos de saturação.

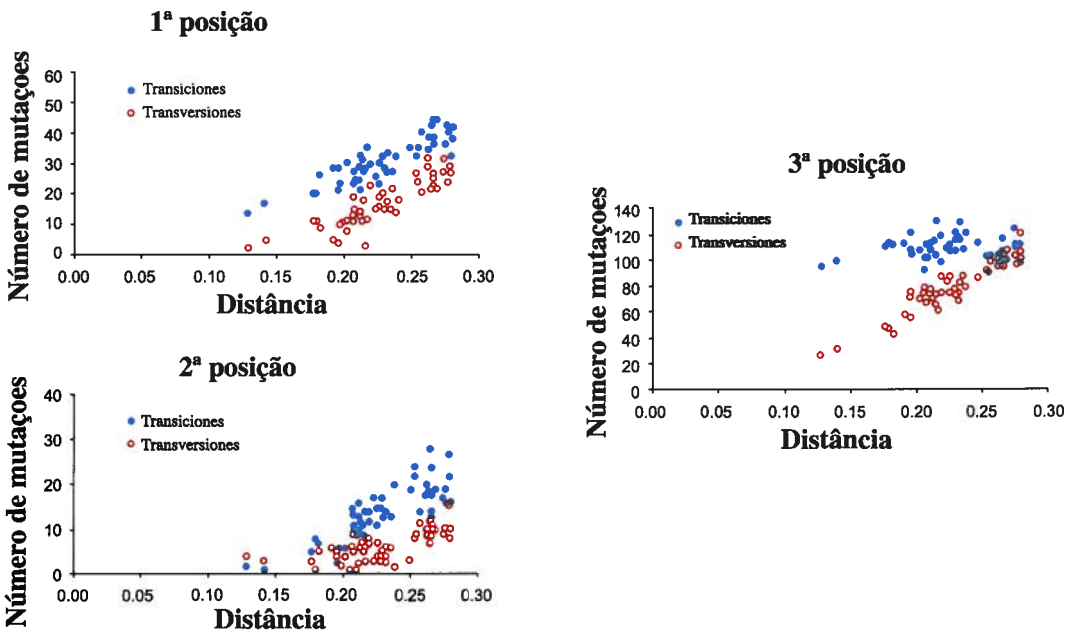


Figura 2: Saturación de sustituciones por posición. Se representa la distancia filogenética (p) frente al número de mutaciones en la 1ª, 2ª y 3ª posición del codón del citocromo *b* en 10 especies de soleidos

Figura 2: Saturação de substituições por posição. Representa-se a distância filogenética (p) em comparação com o número de mutações na 1ª, 2ª e 3ª posição do codão do citocrom *b* em 10 espécies de soleidos

1.3.2.- Recombinación

Existen dos tipos de recombinación homóloga: la recombinación recíproca o **entrecruzamiento** y la recombinación no recíproca o **conversión génica**. La primera implica un intercambio de secuencias homólogas entre cromosomas homólogos, produciendo nuevas combinaciones de secuencias adyacentes al mismo tiempo que se retienen ambas variantes implicadas en la recombinación. La recombinación no recíproca, en cambio, implica la sustitución de una secuencia por otra, lo que determina la pérdida de una de las secuencias implicada en la recombinación (Fig. 3).

Tanto en el entrecruzamiento como en la conversión génica ocurre un intercambio entre secuencias homólogas. Sin embargo, existen recombinaciones específicas de sitios que implican el intercambio de una secuencias generalmente pequeñas por otras más largas y que generalmente no comparten similitud. Esto ocurre, por ejemplo, en la integración de los genomas de los fagos en los bacterianos.

1.3.2.- Recombinação

Existem dois tipos de recombinação homóloga: a recombinação recíproca ou **intercruzamento** e a recombinação não recíproca ou **conversão gênica**. A primeira implica um intercâmbio de seqüências homólogas entre cromossomas homólogos, produzindo novas combinações de seqüências adjacentes ao mesmo tempo que se retêm ambas as variantes implicadas na recombinação. A recombinação não recíproca, por troca, implica a substituição de uma seqüência por outra, o que determina a perda de uma das seqüências implicadas na recombinação (Fig. 3).

Tanto no intercruzamento como na conversão génica ocorre um intercâmbio entre seqüências homólogas. No entanto, existem recombinações específicas de locais que implicam o intercâmbio de seqüências geralmente pequenas por outras mais largas e que geralmente não apresentam semelhanças. Isto ocorre, por exemplo, na integração dos genomas dos fagos nos bacterianos.

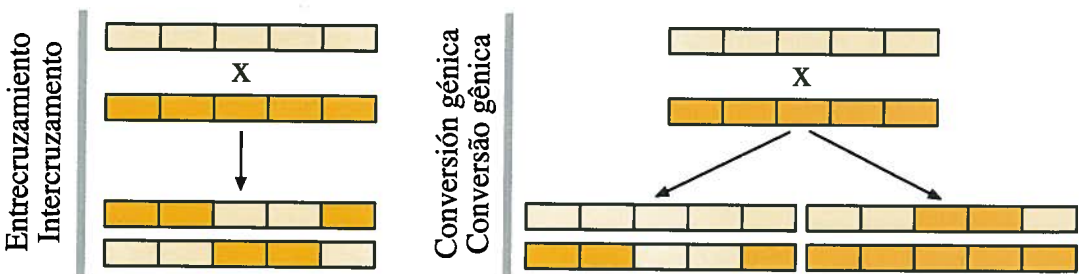


Figura 3: Tipos de mutación por recombinación
Figura 3: Tipos de mutação por recombinação

1.3.3.- Inserciones y deleciones (Indels)

Las inserciones y deleciones pueden ocurrir mediante varios mecanismos.

1.- **Entrecruzamiento desigual.** Este mecanismo determina una deleción en un fragmento de ADN y una adición recíproca en otro fragmento homólogo. La probabilidad aumenta cuando los segmentos de ADN están duplicados en tándem, debido a una mayor probabilidad de alineamiento erróneo (Fig. 4).

1.3.3.- Inserções e Deleções (Indels)

As inserções e deleções podem ocorrer mediante vários mecanismos.

1.- **Intercruzamento desigual.** Este mecanismo determina a deleção de um fragmento de DNA e uma adição recíproca de outro fragmento homólogo. A probabilidade aumenta quando os segmentos de DNA estão duplicados em tandem, devido a uma maior probabilidade de alinhamento errôneo (Fig. 4).

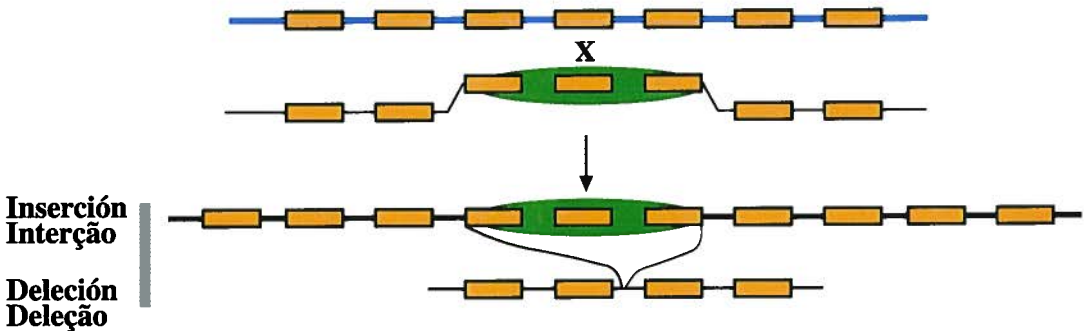


Figura 4: Indels por entrecruzamiento desigual
Figura 4: Indels por inter cruzamento desigual

2.- **Delección intracatenaria.** Consiste en una recombinación específica de sitio que aparece entre secuencias repetidas con la misma orientación y situadas en la misma cromátida por un entrecruzamiento intracromosómico (Fig. 5). Este mecanismo está implicado en la reducción del número de repeticiones de secuencias en tándem, como ocurre en el ADN satélite.

2.- **Deleção intracatenária.** Consiste numa recombinação específica de local que aparece entre seqüências repetidas com a mesma orientação e situadas no mesmo cromátídeo através de um inter cruzamento intracromossómico (Fig. 5). Este mecanismo está implicado na redução do número de repetições de seqüências em tandem, como ocorre no DNA satélite.

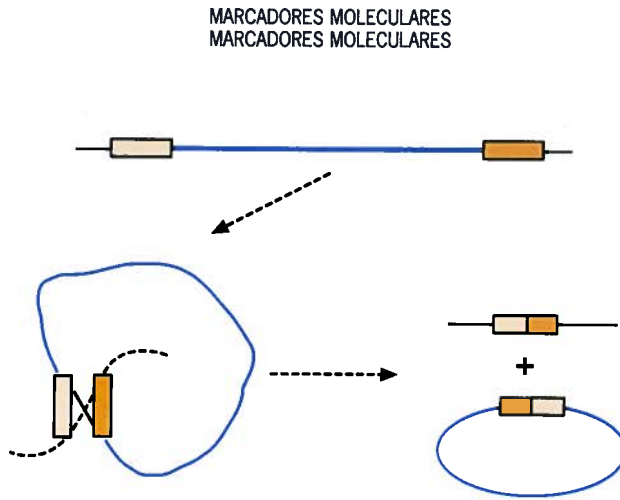


Figura 5: Delección intracatenaria
Figura 5: Deleção intracatenária

3.- Deslizamiento entre cadenas.

Este mecanismo ocurre entre regiones de ADN que contienen repeticiones contiguas. Durante la replicación, un mal apareamiento entre repeticiones adyacentes determina una duplicación o delección del segmento de ADN contiguo (Fig. 6). Asimismo, durante los mecanismos reparativos del ADN ocurren malos apareamientos por deslizamiento en presencia de motivos repetidos que determinan la aparición de inserciones o delecciones.

3.- Deslizamento entre cadeias.

Este mecanismo ocorre entre regiões de DNA que contém repetições contíguas. Durante a replicação, um mau emparelhamento entre repetições adyacentes determina uma duplicação ou deleção do segmento de DNA contíguo (Fig. 6). Por isso mesmo, durante os mecanismos de reparação do DNA ocorrem maus emparelhamentos por deslizamento em presença de sequências repetidas que determinam o aparecimento de inserções ou deleções.

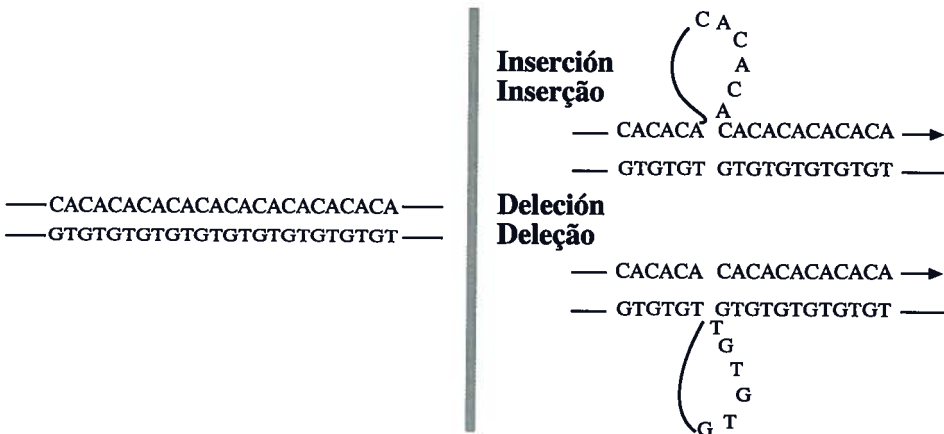


Figura 6: Indels por deslizamiento
Figura 6: Indels por deslizamento

4.- **Transposición de ADN.**

La transposición es el movimiento de material genético desde un sitio donador a un sitio diana. Las secuencias de ADN que poseen una capacidad intrínseca de cambiar su localización genómica se denominan elementos móviles. Se distinguen 2 tipos de transposición: **transposición conservativa** cuando el elemento se mueve de un sitio a otro y **transposición replicativa**, cuando el elemento móvil se duplica permaneciendo el original en el sitio donador y una copia que se inserta en un nuevo sitio (Fig. 7). Además, existe otro tipo denominado **retrotransposición** cuando el elemento móvil es un ARN que es retrotranscrito a ADN para su incorporación en el genoma. Este tipo, que se observa en infecciones por retrovirus, siempre es una transposición replicativa, ya que se transpone una copia retrotranscrita del elemento móvil

4.- **Transposição de DNA.**

A transposição é o movimento de material genético desde um local dador a um local alvo. As seqüências de DNA que possuem uma capacidade intrínseca de trocar a sua localização genómica denominam-se elementos móveis. Distinguem-se 2 tipos de transposição: **transposição conservadora** quando o elemento se move de um local para outro e **transposição replicativa**, quando o elemento móvil se duplica permanecendo o original no local dador e uma cópia que se insere num novo local (Fig. 7). Além destes, existe outro tipo denominado **retrotransposição** quando o elemento móvil é um RNA que é retrotranscrito em DNA para a sua incorporação no genoma. Este tipo, que se observa em infecções por retrovírus, é sempre uma transposição replicativa, já que se transpõe uma cópia retrotranscrita do elemento móvil.

Transposición conservativa
Transposição conservadora

Transposición replicativa
Transposição replicativa

Retrotransposición
Retrotransposição

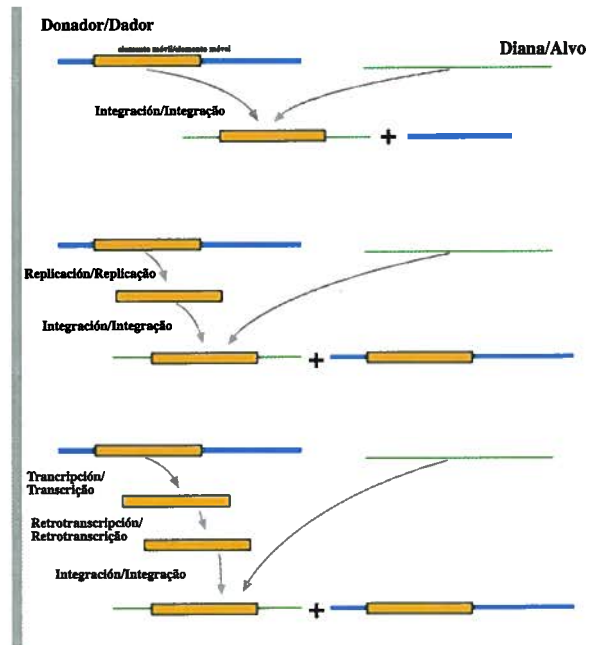


Figura 7: Tipos de transposición
Figura 7: Tipos de transposição.

Las indels tienen un impacto importante cuando afecta a una región codificante y su tamaño no es múltiplo de tres. Esto desencadena un desplazamiento de la fase de lectura y la aparición de una mutación de fase de lectura. Dichas mutaciones determinan importantes cambios en la secuencias de aminoácidos, eliminando o creando codones de parada que producen proteínas de longitud anormal.

1.3.4.- Inversiones

Es un tipo de reordenamiento de ADN que ocurre debido a dos procesos básicamente: i) rotura y unión de cromosomas o ii) entrecruzamientos intracromosómicos entre 2 segmentos homólogos que están orientados en direcciones opuestas. Las inversiones generalmente implican grandes fragmentos de ADN, de cientos a miles de pares de bases.

1.4 Distribución y frecuencia de mutaciones

Las mutaciones no ocurren generalmente al azar a lo largo del genoma. Algunas regiones son más propensas a mutar que otras y se conocen como **puntos calientes**. Uno de estos puntos calientes es el dinucleótido 5'-CG-3', o CpG, en el que la citosina está frecuentemente metilada cambiando a 5'-TG-3'. En eucariotas, las repeticiones pequeñas en tándem son a menudo puntos calientes para deleciones e inserciones, probablemente debido a los malos apareamientos por deslizamiento. Secuencias que incluyen motivos dinucleótidos alternantes de purinas y pirimidinas, como GC, AT y GT son capaces de adoptar una con-

As indels têm um impacto importante quando afetam uma região codificante e o seu tamanho não seja múltiplo de três. Isto desencadeia um deslocamento da fase de leitura e a aparição de uma mutação da fase de leitura. Estas mutações determinam importantes mudanças nas seqüências de aminoácidos, eliminando ou criando codões de paragem que produzem proteínas de longitude anormal.

1.3.4.- Inversões

É um tipo de reordenamento de DNA que ocorre basicamente devido a dois processos: i) quebra e união de cromossomas ou ii) intercruzamentos intracromossómicos entre 2 segmentos homólogos que estão orientados em direcções opostas. As inversões implicam geralmente grandes fragmentos de DNA, de centenas a milhares de pares de bases.

1.4 Distribuição e frequência de mutações

As mutações não ocorrem geralmente de forma aleatória ao longo do genoma. Algumas regiões são mais propensas a mutar que outras e são conhecidas como **hot spots (pontos quentes)**. Um destes hot spots é o dinucleótido 5'-CG-3', ou CpG, no qual a citosina está frequentemente metilada mudando para 5'-TG-3'. Nos eucariotas, as repetições pequenas em tandem são muitas vezes **hot spots** para deleções e inserções, provavelmente devido aos maus emparelhamentos por deslizamento. Seqüências que incluem dímeros alternantes de purina e pirimidinas, como GC, AT e GT são capazes de

formación de tipo ADN-Z que favorece las deleciones.

Además la dirección de las mutaciones no es al azar. Las transiciones ocurren más frecuentemente que las transversiones. En el ADN nuclear, las transiciones suponen sobre un 60-70% de las mutaciones, que se desvía del 33% esperado por azar. Por el contrario, la relación de transiciones a transversiones en el ADN mitocondrial es 15-20. Esto parece asociarse al mecanismo de replicación por desplazamiento de este ADN.

adotar uma composição do tipo DNA-Z que favorece as deleções.

Além disso a direção das mutações não é aleatória. As transições ocorrem com mais frequência que as transversões. No DNA nuclear, as transições implicam 60-70% de mutações, que se desvia 33% do esperado aleatoriamente. Pelo contrário, a relação entre transições e transversões no DNA mitocondrial é 15-20. Isto parece associar-se ao mecanismo de replicação por deslocamento deste DNA.

UNIDAD 2. Dinámica de genes en las poblaciones

2.1 El principio de Hardy-Weinberg

Las frecuencias genotípicas en una población vienen determinadas, en parte, por el tipo de reproducción. Si consideramos un patrón de reproducción sexual al azar (panmixia) sin generaciones solapantes, en el que las frecuencias alélicas debido a las fuerzas evolutivas más importantes tales como mutación, migración y selección natural no cambian de una generación a otra, y que la población es de gran tamaño en número, entonces, y según el modelo de Hardy-Weinberg, la relación matemática entre las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas viene dada por: $AA=p^2$, $Aa=2pq$ y $aa=q^2$, donde las frecuencias alélicas de A y a son p y q y se cumple que $p+q=1$ (Fig. 8).

UNIDADE 2. Dinâmica de genes nas populações

2.1 O princípio de Hardy-Weinberg

As frequências genotípicas numa população são determinadas, em parte, pelo tipo de reprodução. Se considerarmos um padrão de reprodução sexual aleatório (panmixia) sem salto de gerações, no qual as frequências alélicas devido as forças evolutivas mais importantes tais como mutação, migração e seleção natural não mudam de uma geração para outra, e que a população é de grande tamanho em número, então, e segundo o modelo de Hardy-Weinberg, a relação matemática entre as frequências alélicas e as frequências genotípicas pode ser expressa por: $AA=p^2$, $Aa=2pq$ y $aa=q^2$, onde as frequências alélicas de A e a são p e q e se infere que $p+q=1$ (Fig. 8).

	Genotipos/Genótipos		
	AA	Aa	aa
Organismos diploide / Organismos diplóide			
Reproducción sexual / Reprodução sexual			
Generaciones no solapantes / Gerações "discretas"			
Locus en estudio posee dos alelos / Locus em estudo possui 2 alelos			
Frecuencias alélicas idénticas en machos y hembras / Frequências alélicas idénticas em machos e fêmeas			
Reproducción al azar / Reprodução ao acaso			
Tamaño poblacional grande (en teoría infinito) / Tamanho populacional grande (em teoria, infinito)			
No hay migración / Não há migração			
Panmixia	p^2	$2pq$	q^2
Endogamia	$p^2 + pqF$	$2pq - 2pqF$	$q^2 + pqF$

Figura 8: Equilibrio de Hardy-Weinberg. A la izquierda supuestos teóricos del modelo H-W. A la derecha, frecuencias alélicas esperadas para cada genotipo en una población panmíctica y con endogamia.
Figura 8: Equilíbrio de Hardy-Weinberg. À esquerda pressupostos teóricos do modelo H-W. A direita, frequências alélicas esperadas para cada genótipo numa população panmíctica e com endogamia.

Este modelo es muy simplista en sus principios. Sin embargo, ha servido de base para el estudio teórico y experimental en el área de la genética de poblaciones, ya que no considera las fuerzas evolutivas y sólo se basa en aquellas derivadas del proceso de reproducción exclusivamente. No obstante, nos permite comparar con modelos más realistas en los que participen los procesos de mutación, selección o migración.

2.2 Desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg

Según el modelo de Hardy-Weinberg, una población de gran tamaño con apareamiento al azar debe encontrarse en equilibrio con unas frecuencias alélicas y genotípicas constantes de generación a generación. Cuando las proporciones observadas se desvían de las esperadas habría que recurrir a factores externos, como selección o migración, o internos, como la mutación.

La **selección** significa que los animales mejor adaptados a las condiciones del medio son los que logran la reproducción. La *selección natural* se define como la reproducción diferencial de individuos genéticamente diferentes o genotipos dentro de las poblaciones. Esta reproducción está provocada por diferentes características como mortalidad, fertilidad, fecundidad, capacidad para aparearse y la viabilidad de la descendencia.

La mayoría de mutaciones que ocurren en los genes no modifican el fenotipo de un organismo. Cuando esto sí ocurre, algunas afectan a la capacidad de adaptación de los organismos en forma positiva o negativa. Cuando una mutación reduce la adaptación se conoce como deletérea, de tal forma que esos

Este modelo é muito simplista nos seus princípios. No entanto, serviu de base para o estudo teórico e experimental na área da genética de populações, já que não considera as forças evolutivas e só se baseia naquelas derivadas do processo de reprodução, exclusivamente. Não obstante, permite-nos comparar com modelos mais realistas nos quais participem os processos de mutação, selecção ou migração.

2.2 Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg

Segundo o modelo de Hardy-Weinberg, uma população de grande tamanho com emparelhamento aleatório deve encontrar-se em equilíbrio com frequências alélicas e genotípicas constantes de geração em geração. Quando as proporções observadas se desviam das esperadas era necesario recorrer a factores externos, como selecção ou migração, ou internos, como a mutação.

A **selecção** significa que os animais melhor adaptados às condições do meio são os que conseguem a reprodução. A *selecção natural* define-se como a reprodução diferencial de indivíduos genéticamente diferentes ou genótipos dentro das populações. Esta reprodução é provocada por diferentes características como mortalidade, fertilidade, fecundidade, capacidade de emparelhamento e viabilidade da descendência.

A maioria das mutações que ocorrem nos genes não modificam o fenótipo de um organismo. Quando isto ocorre, algumas afectam a capacidade de adaptação dos organismos de forma positiva ou negativa. Quando uma mutação reduz a adaptação designa-se como deletária, de tal forma que esses

organismos serán eliminados de la población. Este tipo de selección se denomina **selección negativa o purificante**. Ocasionalmente, una nueva mutación puede comportarse como el mejor alelo de la población, y se denomina **selectivamente neutra**. Son muy raros los casos de mutaciones que aumentan la adaptación de los portadores, en cuyo caso se le denomina **selección positiva o ventajosa**.

Se distinguen los siguientes tipos de interacción: i) codominancia o selección génica cuando los dos homocigotos tienen diferentes valores de adaptación y el heterocigoto un valor intermedio; ii) recesividad y dominancia completa, cuando los homocigotos tienen distinta adaptación y el heterocigoto es igual a uno de los homocigotos; iii) sobredominancia cuando el heterocigoto expresa un fenotipo más extremo que cualquiera de los progenitores homocigotos. Si el fenotipo del individuo heterocigoto es más deseable, se habla de una ventaja heterocigota y iv) subdominancia, cuando el heterocigoto muestra una menor adaptación que los homocigotos (Fig. 9).

organismos serão eliminados da população. Este tipo de selecção denomina-se **selecção negativa ou purificante**. Ocasionalmente, uma nova mutação pode comportar-se como o melhor alelo da população, e denomina-se **selectivamente neutra**. São muito raros os casos de mutações que aumentam a adaptação dos portadores, as quais se denominam **selecção positiva ou vantajosa**.

Distinguem-se os seguintes tipos de interacção: i) codominância ou selecção génica quando os dois homocigotos têm diferentes valores de adaptação e o heterocigoto um valor intermédio; ii) recessividade e domínio completo, quando os homocigotos têm distinta adaptação e o heterocigoto é igual a um dos homocigotos; iii) sobredominância quando o heterocigoto expressa um fenótipo mais extremo que qualquer dos progenitores homocigotos. Se o fenótipo do indivíduo heterocigoto é mais desejável, fala-se de uma vantagem heterocigótica e iv) subdominância, quando o heterocigoto mostra uma menor adaptação que os homocigotos (Fig. 9).

	AA	Aa	aa
Codominancia/Codominância	1	1+s	1+2s
Dominancia/Domínio A>a	1+s	1+s	1
Recesividad/Recessividade A<a	1+s	1	1
Sobredominancia/Sobredominância 0<s>t	1	1+s	1+t
Subdominancia/Subdominância 0>s<t	1	1+s	1+t

Figura 9: Tipos de selección. s y t denotan diferentes valores de adaptación
Figura 9: Tipos de selecção. s e t denotam diferentes valores de adaptação

La **migración** se refiere al movimiento de organismos o sus gametos entre subpoblaciones. Este representa otro sistema para introducir nueva variabilidad genética en las poblaciones. El flujo génico va a modificar las frecuencias alélicas, homogeneizándolas entre ellas, evitando la especiación y neutralizando las diferencias entre las subpoblaciones.

La **deriva genética** es otro factor que puede provocar cambios en las frecuencias alélicas. Estos cambios son debidos exclusivamente al azar. Los peces producen un alto número de gametos, de los que sólo una parte llegarán a adultos y sólo una fracción se reproducirá en la siguiente generación y dará descendencia viable. Este éxito reproductivo va a generar cambios en las frecuencias alélicas al azar. Según algunos modelos matemáticos, se ha demostrado que las fluctuaciones en las frecuencias alélicas son mucho más pronunciadas cuando las poblaciones son de pequeño tamaño. Mientras que los procesos sistemáticos de mutación, selección o migración son muy lentos, los cambios en poblaciones pequeñas son muy rápidos.

2.3 Tamaño efectivo poblacional

El tamaño efectivo de la población (N_e) es uno de los parámetros más importantes a considerar para la gestión de recursos pesqueros y en acuicultura. Para describir una población desde el punto de vista genético hay que recurrir a N_e , que nos indica los genes que se transmiten a la siguiente generación y en qué proporción.

A **migração** refere-se ao movimento de organismos ou seus gâmetas entre sub-populações. Este representa outro sistema para introduzir nova variedade genética nas populações. O fluxo gênico vai modificar as frequências alélicas, homogeneizando-as entre elas, evitando a especiação e neutralizando as diferenças entre as sub-populações.

A **deriva genética** é outro factor que pode provocar mudanças nas frequências alélicas. Estas mudanças são exclusivamente aleatórias. Os peixes produzem um grande número de gâmetas, dos quais só uma parte chegarão a adultos e só uma fracção se reproduzirá na seguinte geração e dará descendência viável. Este êxito reproductivo vai gerar mudanças aleatórias nas frequências alélicas. Segundo alguns modelos matemáticos, demonstrou-se que as flutuações nas frequências alélicas são muito mais pronunciadas quando as populações são de pequeno tamanho. Embora os processos sistemáticos de mutação, selecção ou migração sejam muito lentos, as mudanças nas populações pequenas são muito rápidas.

2.3 Tamanho efectivo populacional

O tamanho efectivo da população (N_e) é um dos parâmetros mais importantes a considerar para a gestão de recursos pesqueiros e em aqüicultura. Para descrever uma população do ponto de vista genético é necessário recorrer ao N_e que nos indica os genes que se transmitem à geração seguinte e em que proporção.

Son numerosas las aproximaciones para estimar N_e en función de los parámetros considerados (Fig. 10), tales como el número de machos y hembras que producen descendencia viable, la variación en el número de descendientes producidos por cada reproductor o el número de generaciones en las que ha participado.

Si consideramos la proporción de sexos para el cálculo de N_e , y asumimos que la reproducción dentro de una población es al azar y cada reproductor posee capacidad para producir descendencia viable, entonces: $N_e = 4(H)(M)/(H+M)$, donde H y M son el número de machos y hembras (Fig. 10).

Sin embargo, se conoce que no todos los adultos se llegan a reproducir o bien su descendencia no es viable. En cualquiera de estas circunstancias tales reproductores no deberían ser incluidos en el cálculo de N_e , ya que su material genético no se transmite a la siguiente generación.

São numerosas as abordagens para calcular N_e em função dos parâmetros considerados (Fig. 10), tais como o número de machos e fêmeas que produzem descendência viável, a variação no número de descendentes produzidos por cada reprodutor ou o número de gerações em que participou.

Se considerarmos a proporção de sexos para o cálculo de N_e , e assumirmos que a reprodução dentro de uma população é aleatória e que cada reprodutor possui capacidade para produzir descendência viável, então: $N_e = 4(H)(M)/(H+M)$, onde H e M são o número de machos e fêmeas (Fig. 10).

No entanto, sabe-se que nem todos os adultos se chegam a reproduzir ou que a sua descendencia não é viável. Em qualquer destas circunstâncias tais reprodutores não deveriam ser incluídos no cálculo de N_e , já que o seu material genético não se transmite à geração seguinte.

Estimación de N_e
Estimativa de N_e

Efecto de la proporción de sexos/Efeito da proporção de sexos

$$N_e = 4 (M * H) / (M + H)$$

Efecto de las fluctuaciones de la población/Efeito das flutuações da população

$$N_e = 1/t (1/N_1 + 1/N_2 + \dots + 1/N_n)$$

Efecto del tamaño de las familias/Efeito do tamanho das famílias

$$N_e = 4 (N - 2) / (K_m + V_m / K_m) + (K_h + V_h / K_h)$$

Figura 10. Aproximaciones para la estimación de N_e
Figura 10. Abordagens para o cálculo de N_e

Para estimar N_e tras n generaciones se utiliza una media armónica: $1/N_e = 1/n (1/N_{e1} + 1/N_{e2} + 1/N_{e3} + \dots + 1/N_{en})$, donde N_{e1} , N_{e2} , N_{e3} y N_{en} representan el número efectivo en la 1ª, 2ª, 3ª y n generaciones. Como característica particular de la media armónica tenemos que el valor más pequeño de N_e es el que tendrá mayor peso sobre el N_e promedio. Esto significa que si en cualquier momento hay una reducción importante en el número de reproductores por enfermedad, muerte o reposición, tendrá gran repercusión sobre el valor N_e con independencia de que posteriormente se recuperen los valores esperados.

El desarrollo matemático para la estimación de N_e considerando las diferencias en la contribución de descendencia para cada reproductor es más complejo:

$$N_e = 4(N-2) / ((K_m + V_m/K_m) + (K_h + V_h/K_h))$$
 donde K_m y K_h son el número medio de descendientes por macho y hembra, V_m y V_h las varianzas de los tamaños familiares de machos y hembras, y N el número total de la descendencia.

El tamaño efectivo de la población está inversamente relacionado con el valor medio de endogamia (F) de un colectivo a través de la relación $F = 1/(2N_e)$. La razón de esta relación se basa en que la probabilidad de encontrar parientes próximos aumenta a medida que las poblaciones son más pequeñas. Esta relación entre F y N_e demuestra la importancia de estimar N_e y aplicarlo al manejo de poblaciones en cautividad.

Uno de los cambios de tamaño poblacional que más influencia la evolución

Para calcular N_e sobre n gerações utiliza-se uma média harmônica: $1/N_e = 1/n (1/N_{e1} + 1/N_{e2} + 1/N_{e3} + \dots + 1/N_{en})$, onde N_{e1} , N_{e2} , N_{e3} e N_{en} representam o número efetivo na 1ª, 2ª, 3ª e n gerações. Como característica particular da média harmoniosa temos que o valor mais pequeno de N_e é o que terá maior pesos sobre o N_e médio. Isto significa que se em qualquer momento houver uma redução importante no número de reprodutores por doença, morte ou reposição, terá grande repercursão sobre o valor N_e independentemente de depois se recuperarem os valores esperados.

O desenvolvimento matemático para o cálculo de N_e considerando as diferentes na contribuição de descendência para cada reprodutor é mais complexo:

$$N_e = 4(N-2) / ((K_m + V_m/K_m) + (K_h + V_h/K_h))$$
 onde K_m e K_h são o número médio de descendentes por macho e fêmea, V_m e V_h as variações familiares de machos e fêmeas, e N o número total da descendência.

O tamanho efectivo da população está inversamente relacionado com o valor médio de endogamia (F) de um colectivo a través da relação $F = 1/(2N_e)$. A razão desta relação baseia-se na probabilidade de que encontrar parentes próximos aumenta à medida que as populações são mais pequenas. Esta relação entre F e N_e demonstra a importância de calcular N_e e aplicá-lo à manipulação de populações em cativo.

Uma das mudanças de tamanho populacional que mais influência a evolução molecular de uma população ocorrem quando existe um decréscimo

molecular de una población ocurre cuando existe un descenso rápido y severo en el número de individuos, quizás por desastres naturales o enfermedades. Esto se conoce como **cuello de botella** poblacional. Dichos cuellos de botella reducen la variación genética de las poblaciones debido a que sólo un pequeño número de genes, presentes en unos huéspedes afortunados, permanecerán tras la reducción de tamaño. Dicha reducción provocará un aumento de la endogamia y un incremento en la homocigosidad.

Los tamaños poblacionales también cambian cuando un pequeño grupo de individuos se queda aislado del grupo principal, tal como ocurre al constituir stocks cultivados de reproductores. Dado que dichos individuos sólo portan una pequeña proporción de la variación genética de la población más grande, la deriva genética y la selección natural modificarán radicalmente su estructura genética, conduciendo, en casos extremos, a procesos de especiación. Esto se le conoce como **efecto fundacional**. De igual forma a lo mencionado con los cuellos de botella, estos procesos determinarán un aumento de la endogamia y la fijación de alelos raros, incluso de alelos deletéreos.

2.4 Polimorfismo genético

Para determinar el grado de polimorfismo se puede usar una medida del número de loci polimórficos del total muestreado. Sin embargo, esta medida es dependiente del número de individuos estudiados, de tal forma que a menor muestra, más difícil de identificar los loci polimórficos.

rápido e grave no número de indivíduos, seja por desastres naturais ou doenças. Isto é conhecido como **bottleneck** populacional. Os ditos bottlenecks reduzem a variação genética das populações devido a que só um pequeno número de genes, presentes nalguns hospedeiros afortunados, permanecerão depois da redução de tamanho. A dita redução provocará um aumento da endogamia e um incremento na homozigocidade.

Os tamanhos populacionais também mudam quando um pequeno grupo de indivíduos se mantém à parte do grupo principal, como ocorre ao constituir stocks em colheitas de reprodutores. Dado que os ditos indivíduos apenas transportam uma pequena proporção da variação genética da população maior, a deriva genética e a seleção natural modificarão radicalmente a sua estrutura genética, conduzindo, em casos extremos, a processos de especiação. Isto é conhecido como **efeito fundador**. De igual forma ao mencionado com os bottlenecks, estes processos determinarão um aumento da endogamia e a fixação de alelos raros, inclusivamente de alelos deletéreas.

2.4 Polimorfismo genético

Para determinar o grau de polimorfismo pode usar-se uma medida do número de loci polimórficos do total da amostra. No entanto, esta medida está dependente do número de indivíduos estudados, de tal forma que na amostra menor, é mais difícil de identificar os loci polimórficos.

Por eso se utilizan otras medidas como la heterocigosidad media esperada o **diversidad génica** (H). Esta se define como la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de una población sean diferentes. Si conocemos las frecuencias alélicas, ésta se puede representar como $H=1-\sum x_i^2$. (1 menos la probabilidad de que sean homocigotos). Esto es útil cuando el marcador molecular que se utiliza son perfiles electroforéticos o técnicas que incluyen enzimas de restricción.

Cuando utilizamos secuencias de ADN, bien nucleares o mitocondriales, es necesario recurrir a medidas que determinen los polimorfismos a nivel de nucleótido. Un índice es la **diversidad nucleotídica** o π , que es la proporción de diferencias de nucleótidos entre todos los posibles pares de secuencias en estudio y que matemáticamente se indica como:

$$\frac{n}{n-1} \sum_{ab} x_a x_b \Pi_{ab}$$

$x_a^y x_b$ frecuencia de secuencias de tipo a y b / frequência de sequências de tipo a e b
 Π_{ab} proporción de nucleótidos diferentes entre los tipos a y b / proporção de nucleótidos diferentes entre os tipos a e b
 n número de secuencias / número de sequências

Otro parámetro muy útil es el **polimorfismo de nucleótido** o θ , que es la proporción de sitios segregantes normalizada al número de secuencias analizadas y que se calcula:

$$\frac{S}{\sum_{i=1}^{n-1} (1/i)}$$

S sitios segregantes / sítios segregantes
 i número de secuencias en la muestra / número de sequências na amostra

Ambos parámetros están relacionados si asumimos que los alelos en estudio no están ajenos a fenómenos de selección natural en una población

Por isso se utilizam outras medidas como a heterozigocidade média esperada ou **diversidade gênica** (H). Esta define-se como a probabilidade de que dois alelos escolhidos aleatoriamente de uma população sejam diferentes. Se conhecermos as frequências alélicas, esta pode-se representar como $H=1-\sum x_i^2$. (1 menos a probabilidade de que sejam homocigotos). Isto é útil quando o marcador molecular que se utiliza são perfis electroforéticos ou técnicas que incluem enzimas de restrição.

Quando utilizamos seqüências de DNA, sejam nucleares ou mitocondriais, é necessário recorrer a medidas que determinem os polimorfismos a nível do nucleótido. Um índice é a **diversidade nucleotídica** ou π , que é a proporcão de diferenças de nucleótidos entre todos os possíveis pares de seqüências em estudo e que matematicamente se indica como:

Otro parâmetro muito util é o **polimorfismo de nucleótido** ou θ , que é a proporcão de locais segregantes normalizados ao número de seqüências analisadas e que se calcula:

Ambos os parâmetros estão relacionados se assumirmos que os alelos em estudo não são estranhos a fenómenos de seleção natural numa população

grande de tamaño constante. De esta forma según la teoría neutral evolutiva, $\pi=\theta$. Dicha relación se puede analizar con el test de Tajima cuya hipótesis nula es $H_0=\pi-\theta=0$.

θ también está relacionado con el tamaño efectivo poblacional. Según el modelo infinito de alelos, se ha definido que $\theta=4N_e\mu$ donde N_e es el tamaño efectivo y μ la tasa de mutación para el locus analizado por generación. En lugar de usar el número de alelos también se puede utilizar la heterocigosidad para la que $N_e=(H/1-H)4\mu$. Estas aproximaciones se basan en los supuestos de neutralidad. Por lo tanto requerirá la aplicación del test de Tajima previamente a su aplicación.

Dicho desarrollo es de aplicación práctica. A modo de ejemplo y usando las aproximaciones anteriormente mencionadas, el tamaño efectivo de las subpoblaciones mediterráneas de lubina (*Dicentrarchus labrax*) se sitúan entre 10.000 y 60.000 reproductores. Basado en capturas, el tamaño de estas subpoblaciones se estimó en 1.4 millones de animales, unas 40 veces superior. Sin embargo, si atendemos a lo anteriormente expuesto, estas diferencias son esperables ya que N_e siempre es menor o igual que el censo poblacional.

2.5 Diferenciación genética

La existencia de estructura genética en poblaciones naturales es un proceso que ocurre de forma natural dada la tendencia de los organismos a formar cardúmenes, un comportamiento reproductivo con cortejo o la existencia de barreras geográficas que limi-

ção grande de tamanho constante. Desta forma segunda a teoria neutra evolutiva, $\pi=\theta$. Esta relação pode analisar-se com o teste de Tajima cuja hipótese nula é $H_0=\pi-\theta=0$.

θ também está relacionado com o tamanho efectivo da população. Segundo o modelo infinito de alelos, definiu-se que $\theta=4N_e\mu$ onde N_e é o tamanho efectivo e μ a taxa de mutação para o locus analisado por geração. Em vez de usar o número de alelos também se pode utilizar a heterozigocidade para a qual $N_e=(H/1-H)4\mu$. Estas abordagens baseiam-se nos pressupostos de neutralidade. Portanto requerem a aplicação do teste de Tajima previamente à sua aplicação.

Este desenvolvimento é de aplicação prática. Como exemplo e usando as abordagens anteriormente mencionadas, o tamanho efectivo das subpopulações mediterráneas de robalo (*Dicentrarchus labrax*) situam-se entre 10.000 e 60.000 reprodutores. Baseado em capturas, o tamanho destas subpopulações estimou-se em 1.4 milhões de animais, umas 40 vezes superior. No entanto, se atendermos ao exposto anteriormente, estas diferenças são expectáveis já que N_e é sempre menor ou igual do que o censo populacional.

2.5 Diferenciação genética

A existência de estrutura genética em populações naturais é um processo que ocorre de forma natural dada a tendência dos organismos a formar cardumes, um comportamento reprodutivo com corte ou a existência de

tan la dispersión de los organismos. Cuando una población se separa, es inevitable la aparición de diferenciación genética entre las subpoblaciones. Por diferenciación genética se entiende la adquisición de frecuencias alélicas que difieren entre las subpoblaciones. Tal diferenciación genética será consecuencia de la selección natural, si se favorecen diferentes genotipos en diferentes subpoblaciones, y de procesos al azar en la transmisión de alelos de una generación a otra o por diferencias en las frecuencias alélicas tras un efecto fundacional.

Quando dos poblaciones comienzan a divergir se observa una reducción en la proporción de heterocigotos observados respecto a los esperados por una reproducción al azar. Esta reducción disminuye el tamaño efectivo poblacional y potencia los procesos de deriva genética. Si consideramos una población panmíctica, de acuerdo con los principios de Hardy-Weinberg, se esperaría que AA, Aa y aa estuviesen presentes con unas frecuencias p^2 , $2pq$ y q^2 respectivamente. Sin embargo, cuando existe subdivisión poblacional los homocigotos aumentan de tal forma que las frecuencias esperadas serían p^2+pqF y q^2+pqF para AA y aa respectivamente, mientras que para los heterocigotos Aa serían $2pq-2pqF$, siendo F la endogamia (Fig. 8).

Para cuantificar el efecto de la endogamia, o la reducción de heterocigosidad esperada con apareamiento al azar a cualquier nivel de una jerarquía poblacional en relación a otro nivel más inclusivo de la misma, se utilizan los estadísticos tipo F o índices de fijación (Fig. 11). Los niveles más usados son las subpoblaciones y población

barreiras geográficas que limitam a dispersão dos organismos. Quando uma população se separa, é inevitável a aparição de diferenciação genética entre as sub-populações. Por diferenciação genética entende-se a aquisição de frequências alélicas que dife-rem entre as sub-populações. Tal diferenciação genética será consequência da selecção natural, se se favorecem diferentes genótipos em diferentes sub-populações, e de processos aleatórios na transmissão de alelos de uma geração a outra ou por diferenças nas frequências alélicas depois de um efeito fundacional.

Quando duas populações começam a divergir observa-se uma redução na proporción de heterozigotos observados em relação aos esperados por uma reprodução aleatória. Esta redução diminui o tamanho efetivo populacional e potencia os processos de deriva genética. Se considerar-mos uma população panmíctica, de acordo con os princípios de Hardy-Weinberg, esperaria-se que AA, Aa e aa estivessem presentes com as frequências p^2 , $2pq$ e q^2 respectivamente. No entanto, quando existe subdivisão populacional os homozigotos aumentam de tal forma que as frequências esperadas seriam p^2+pqF e q^2+pqF para AA e aa respectivamente, embora para os heterozigotos Aa seriam $2pq-2pqF$, sendo F a endogamia (Fig. 8).

Para quantificar o efeito da endogamia, ou a redução da heterozigocidade esperada com emparelhamento aleatório a qualquer nível de uma hierarquia populacional em relação a outro nível mais inclusivo da mesma, utilizam-se as estatísticas tipo F ou índices de fixação (Fig. 11). Os níveis mais usados são as sub-populações e

total, y los índices más utilizados son F_{IS} , que mide la subdivisión intrapoblacional, F_{ST} , para subdivisión geográfica y F_{IT} , para la endogamia total. Si nos centramos en F_{ST} , oscila entre 0 (panmixia) y 1 (fijación de alelos alternativos) con valores de diferenciación que si están entre 0-0'05 se considera que existe poca diferenciación genética, moderada si está en el rango 0'05-0'15, grande si está entre 0'15-0'25 y muy grande si es mayor de 0'25.

população total, e os índices mais utilizados são F_{IS} , que mede a subdivisão populacional, F_{ST} , para subdivisão geográfica e F_{IT} , para a endogamia total. Se nos centrarmos em F_{ST} , oscila entre 0 (panmixia) e 1 (fixação de alelos alternativos) com valores de diferenciação que se estão entre 0-0'05 considera-se que existe pouca diferenciação genética, moderada se está no intervalo 0'05-0'15, grande se está entre 0'15-0,25 e muito grande se é maior que 0'25.

H_i Heterogocidad observada en subpoblaciones
Heterozigosidade observada em subpopulações

H_s Heterogocidad observada en subpoblaciones
Heterozigosidade observada em subpopulações

H_T Heterogocidad observada en la población total
Heterozigosidade observada na população total

$$F_{IS} = \frac{H_s - H_i}{H_s}$$

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_s}{H_T}$$

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_i}{H_T}$$

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{ST})(1 - F_{IS})$$

-1 < F_{IS} < 1	$F_{IS} = -1$ Exogamia $F_{IS} = 1$ Endogamia
0 < F_{ST} < 1	$F_{ST} = 0$ Panmixia $F_{ST} = 1$ Diferenciación genética máxima/Diferenciação genética máxima
-1 < F_{IT} < 1	Nivel máximo de inclusión/Máximo nível de inclusão

Figura 11. Índices de Fijación. Arriba, fórmulas para la estimación de F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} . Abajo, relación entre los índices de fijación y rango de valores e interpretación.

Figura 11. Índices de Fixação. Em cima, fórmulas para o cálculo de F_{IS} , F_{ST} y F_{IT} . Em baixo, relação entre os índices de fixação e intervalo de valores e interpretação.

UNIDAD 3.

Marcadores moleculares: Tipos y aplicaciones

3.1.- Introducción

Todos los organismos son susceptibles de sufrir mutaciones como consecuencia de su metabolismo celular normal tal como se ha descrito en la unidad 1. Tales mutaciones conducen a la aparición de variabilidad genética (polimorfismos) entre los individuos, especies y grupos taxonómicos de orden superior. El número y grado de variación de cada tipo de mutación va a definir la variabilidad genética que se pone de manifiesto mediante el análisis de marcadores moleculares.

El desarrollo de la biología molecular de las últimas décadas ha permitido la aparición de herramientas de gran utilidad para la realización, entre otros, de estudios encaminados a determinar las características genéticas de todo tipo de poblaciones, así como la determinación de las relaciones filogenéticas entre organismos. Previamente a dicho desarrollo, tales estudios se basaban en el análisis de las características morfológicas, muy influenciadas por el entorno. Los marcadores moleculares aparecen así como la herramienta más idónea por:

- Ser caracteres *transmitidos genéticamente*, que no se ven influenciados por variaciones de las condiciones ambientales y se transmiten entre generaciones.
- Ser *ubícuos*, es decir, están presentes en un gran número de organismos diferentes.

UNIDADE 3.

Marcadores moleculares: Tipos e aplicações

3.1.- Introdução

Todos os organismos são susceptíveis de sofrer mutações como consequência do seu metabolismo celular normal tal como se descreveu na unidade 1. Tais mutações conduzem ao aparecimento de variabilidade genética (polimorfismos) entre os indivíduos, espécies e grupos taxonómicos de ordem superior. O número e grau de variação de cada tipo de mutação vai definir a variabilidade genética que se pode constatar mediante a análise de marcadores moleculares.

O desenvolvimento da biologia molecular das últimas décadas permitiu o aparecimento de ferramentas de grande utilidade para a realização, entre outros, de estudos destinados a determinar as características genéticas de todo o tipo de populações, assim como a determinar as relações filogenéticas entre organismos. Antes do referido desenvolvimento, tais estudos baseavam-se na análise das características morfológicas, muito influenciáveis pelo ambiente. Os marcadores moleculares aparecem assim como a ferramenta mais idónea por:

- Serem caracteres *transmitidos geneticamente*, que não são influenciados pelas variações das condições ambientais e se transmitem entre gerações.
- Serem *ubíquos*, isto é, estão presentes num grande número de organismos diferentes.

- Constituir una *fente ilimitada* de caracteres, dada la gran diversidad de marcadores moleculares existentes.
 - Permitir *comparaciones a cualquier nivel de diferenciación genética*. Se pueden definir marcadores específicos para cualquier nivel taxonómico, desde el más general hasta el más particular. Incluso dentro de un mismo individuo se pueden determinar marcadores específicos de órganos, tejidos o tipos celulares.
 - Discriminar homología de analogía, en cuanto que permiten conocer el origen común o no de un determinado carácter.
- Constituírem uma *fente ilimitada* de caracteres, dada a grande diversidade de marcadores moleculares existentes.
 - Permitirem *comparações a qualquer nível de diferenciação genética*. Se poderem definir marcadores específicos para qualquer nível taxonómico, desde o mais geral até ao mais particular. Inclusive dentro de um mesmo indivíduo se poderem determinar marcadores específicos de órgãos, tecidos ou tipos celulares.
 - Discriminarem homologia de analogia, enquanto que permitem conhecer a origem comum ou não de um determinado carácter.

Los marcadores moleculares se pueden clasificar en dos categorías en función del tipo de secuencia: **tipo I**, asociados con genes de función conocida, y **tipo II**, asociados con secuencias genómicas anónimas. Los marcadores de tipo I se han empleado clásicamente en estudios de genómica comparativa, evolución de los genomas e identificación de genes. Además, la información obtenida con este tipo de marcadores en especies muy estudiadas se ha podido aplicar en muchos casos en otras especies menos conocidas. En general, los marcadores de tipo II se consideran no codificantes, y por tanto son neutros desde el punto de vista evolutivo. Este tipo de marcadores ha sido muy útil en la elaboración de estudios poblacionales y de mapas genéticos.

Os marcadores moleculares podem ser classificados em duas categorias em função do tipo de seqüência: **tipo I**, associados com genes de função conhecida, e **tipo II**, associados com seqüências genômicas anônimas. Os marcadores de tipo I foram utilizados classicamente em estudos de genômica comparativa, evolução dos genomas e identificação de genes. Além disso, a informação obtida com este tipo de marcadores em espécies muito estudadas pôde ser aplicada em muitos casos noutras espécies menos conhecidas. Em geral, os marcadores de tipo II consideram-se não codificantes, e portanto são neutros do ponto de vista evolutivo. Este tipo de marcadores foi muito útil na elaboração de estudos populacionais e de mapas genéticos.

Si atendemos a la naturaleza química de la molécula se distinguen dos tipos de marcadores moleculares:

Se atendemos à natureza química da molécula, distinguem-se dois tipos de marcadores moleculares:

- Basados en el polimorfismo de **proteínas**: aloenzimas.
- Basados en polimorfismos a nivel de **ADN**: microsátélites, minisátélites, RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism"), SSCP ("Single Strand Conformation Polymorphism"), RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), SNPs ("Single Nucleotide Polymorphism").

- Baseados no polimorfismo de **proteínas**: aloenzimas.
- Baseados em polimorfismos a nível de **DNA**: microsátélites, minisátélites, RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"), AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism"), SSCP ("Single Strand Conformation Polymorphism"), RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), SNPs ("Single Nucleotide Polymorphism").

3.2. Polimorfismo de proteínas: Aloenzimas

Las aloenzimas se definen como las variantes alélicas de proteínas que están determinadas por un mismo locus genómico. Al ser el producto de la expresión de los genes se les considera marcadores de tipo I. Los cambios en la secuencia de nucleótidos a nivel de ADN se pueden traducir en cambios en la secuencia de aminoácidos de las proteínas que codifican, alterando su carga eléctrica total y su movilidad electroforética cuando se las somete a un campo eléctrico. Las diferencias en los tipos y frecuencia alélicas sirven para cuantificar la variación genética a nivel de poblaciones, especies y taxa superiores.

El procedimiento de análisis se puede resumir en tres etapas principales: homogeneización del tejido que se quiere analizar, electroforesis de la muestra en un determinado sustrato (acetato de celulosa, agarosa, acrilamida), y finalmente tinción y revelado con un sustrato específico de la enzima. En el ejemplo teórico que se muestra en la figura 12 se han analizado ocho muestras distintas para una

3.2. Polimorfismo de proteínas: Aloenzimas

As aloenzimas definem-se como as variantes alélicas de proteínas que são determinadas por um mesmo locus genómico. Sendo o produto da expressão dos genes, são considerados marcadores de tipo I. As alterações na seqüência de nucleótidos a nível de DNA podem ser traduzidas em alterações na seqüência de aminoácidos das proteínas que codificam, alterando a sua carga eléctrica total e a sua mobilidade electroforética quando são submetidas a um campo eléctrico. As diferenças nos tipos e frequência alélicas servem para quantificar a variação genética a nível de populações, espécies e taxa superiores.

O procedimento da análise pode ser resumido a três etapas principais: homogeneização do tecido que se quer analisar, electroforese da amostra num determinado substrato (acetato de celulosa, agarose, acrilamida), e finalmente coloração e revelação com um substrato específico da enzima. No exemplo teórico que se mostra na figura 12, foram analisadas oito amostras distintas para uma enzima

enzima monomérica con tres formas alélicas distintas (denominadas 1, 2 y 3). Tras efectuar la carga en el sustrato, cada uno de los monómeros migra de forma diferente en la electroforesis, obteniendo un patrón diferencial para cada muestra.

monomérica com três formas alélicas distintas (denominadas 1, 2 e 3). Depois de efetuar a carga no substrato, cada um dos monómeros migra de forma diferente na electroforese, obtendo um padrão diferencial para cada amostra.

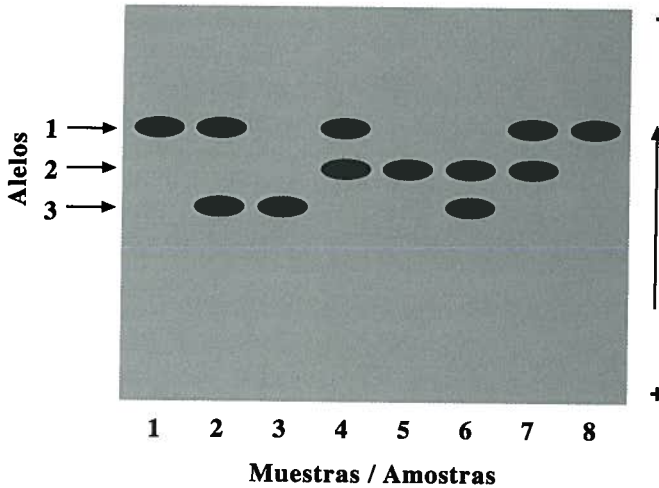


Figura 12. Análisis de las variantes aloenzimáticas en un conjunto teórico de muestras
Figura 12. Análise das variantes aloenzimáticas num conjunto teórico de amostras

Las ventajas del análisis de aloenzimas son:

As vantagens da análise de aloenzimas são:

- *Facilidad de ejecución.* No requiere de prodimientos complejos ni de equipamientos sofisticados, de forma que puede llevarse a cabo con unos mínimos requerimientos.
- *Coste económico relativamente bajo.*
- *Herencia mendeliana.*
- *Evaluación simultánea de multitud de loci* que segreguen de forma independiente.

- *Facilidade de execução.* Não requer procedimentos complexos nem equipamentos sofisticados, de forma que pode ser levada a cabo com uns requerimentos mínimos.
- *Custo económico relativamente baixo.*
- *Herança mendeliana.*
- *Avaliação simultânea* de vários loci que segreguem de forma independente.

Sin embargo, en este tipo de estudios también podemos encontrar una serie de desventajas como:

- *Conservación de las muestras.* Puesto que tras la electroforesis de una muestra la presencia de una determinada aloenzima se pone de manifiesto mediante el revelado con un sustrato específico, las enzimas deben presentar, en la medida de lo posible, su actividad metabólica intacta. Esto significa que las extracciones deben llevarse a cabo en condiciones óptimas y a partir de tejidos que se encuentren en el mejor estado posible de conservación.
- *Interpretación de sistemas multi-locus y poliméricos.* Supongamos por ejemplo que una enzima es monomérica y puede existir en dos formas distintas localizadas en un mismo locus: A y B. En este caso el análisis resulta sencillo puesto que solamente observaríamos dos patrones electroforéticos distintos, correspondientes a cada uno de los monómeros. Sin embargo, en el caso de que la enzima fuera dimérica, detectaríamos tres patrones distintos: AA, AB y BB. Si fuese trimérica, cuatro patrones diferentes: AAA, AAB, ABB y BBB. Y si la enzima fuera tetramérica, podrían encontrarse cinco patrones distintos: AAAA, AAAB, AABB, ABBB y BBBB. Resulta obvio que los resultados se complicarían enormemente conforme aumentase el número de unidades monoméricas, y aún más si dichas unidades estuviesen localizadas en locus distintos.

No entanto, neste tipo de estudos também podemos encontrar uma série de desvantagens como:

- *Conservação das amostras.* Dado que após a electroforese de uma amostra a presença de uma determinada aloenzima se manifesta mediante o revelado com um substrato específico, as enzimas devem apresentar, na medida do possível, a sua actividade metabólica intacta. Isto significa que as extracções devem ser levadas a cabo em condições óptimas e a partir de tecidos que se encontrem no melhor estado possível de conservação.
- *Interpretação de sistemas multi-locus e poliméricos.* Suponhamos por exemplo que uma enzima é monomérica e pode existir em duas formas distintas localizadas num mesmo locus: A e B. Neste caso, a análise seria simples, dado que só observaríamos dois padrões electroforéticos distintos, correspondentes a cada um dos monómeros. No entanto, no caso de a enzima ser dimérica, detectaríamos três padrões distintos: AA, AB e AB. Se fosse trimérica, quatro padrões diferentes: AAA, AAB, ABB e BBB. E se a enzima fosse tetramérica, poderíamos encontrar cinco padrões distintos: AAAA, AAAB, AABB, ABBB e BBBB. É óbvio que os resultados se complicariam enormemente conforme aumentasse o número de unidades monoméricas, e ainda mais se as ditas unidades estivessem localizadas em locus distintos.

- El análisis conlleva la *destrucción de la muestra*, impidiéndose su repetición en los casos necesarios.
- *No son marcadores neutros* en cuanto que pueden estar sujetas a selección.
- Detección de *moderada variación genética*. Debido a la degeneración del código genético, no todos los cambios a nivel de nucleótido se traducen en cambios de aminoácidos. Igualmente, no todas las variaciones de aminoácidos dan lugar a modificaciones de la movilidad electroforética de las proteínas. Por tanto, existe una pérdida de información que puede enmascarar muchas mutaciones a nivel de ADN.
- A análise implica a *destruição da amostra*, impedindo-se a sua repetição nos casos necessários.
- *Não são marcadores neutros* podendo estar sujeitos a selecção.
- Detecção de *moderada variação genética*. Devido à degeneração do código genético, nem todas as alterações a nível de nucleótido se traduzem em alterações de aminoácidos. De igual modo, nem todas as variações de aminoácidos dão origem a modificações da mobilidade electroforética das proteínas. Portanto, existe uma perda de informação que pode mascarar muitas mutações a nível de DNA.

3.3. Polimorfismos a nivel de ADN

Gran parte de los marcadores moleculares empleados en la actualidad se basan en la utilización de la técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa, o PCR ("Polymerase Chain Reaction"). Por ello resulta interesante llevar a cabo una pequeña descripción del funcionamiento de la técnica y de los factores que permiten optimizarla.

3.3.1 PCR ("Polymerase Chain Reaction"): La reacción en cadena de la polimerasa

La PCR fue ideada por Kary Mullis consiguiendo por primera vez la síntesis *in vitro* de ADN a partir de un ADN diana. La estrategia de amplificación destaca por su simplicidad, tal como se recoge

3.3. Polimorfismos a nivel de DNA

Grande parte dos marcadores moleculares utilizados actualmente baseiam-se na utilização da técnica conhecida como reacção em cadeia da polimerase, o PCR ("Polymerase Chain Reaction"). Por isso é interessante levar a cabo uma pequena descrição do funcionamento da técnica e dos factores que permitem optimizá-la.

3.3.1 PCR ("Polymerase Chain Reaction"): A reacção em cadeia da polimerase

A PCR foi idealizada por Kary Mullis que conseguiu pela primeira vez a síntese *in vitro* de DNA a partir de um DNA alvo. A estratégia de amplificação destaca-se pela sua simplicidade, tal como se observa na figura 13. Para ser realizada, utilizam-se dois inicia-

en la figura 13. Para llevarla a cabo se emplean dos cebadores sintéticos, denominados *directo* y *reverso*, complementarios de cada una de las cadenas del ADN diana y con sus extremos 3' enfrentados entre sí.

Una vez aislado el ADN total que contiene el segmento que se desea amplificar, se realiza un proceso cíclico con un primer paso de desnaturalización por calor (normalmente 94-96°C durante 2-5 minutos) con objeto de separar las dos cadenas del ADN diana. A continuación tiene lugar el alineamiento de los cebadores, que se lleva a cabo a una temperatura inferior (entre 50-60 °C) y por último un paso de extensión para la creación de una cadena copia del ADN diana (Fig. 13).

Cada ciclo de desnaturalización, alineamiento y extensión se repite 25-30 veces de forma automática, amplificando así la secuencia de ADN deseada, flanqueada en sus extremos por los cebadores (amplicón). En el tercer ciclo aparecen ya dos amplicones del tamaño esperado, que se multiplican hasta ocho en el cuarto ciclo. De esta forma, al cabo de unos 30 ciclos se consigue amplificar la secuencia aproximadamente 10^9 veces. La técnica es tan sensible que puede llegar a detectar y amplificar una única molécula de ADN en cualquier tipo de muestra.

Para este proceso se utilizan ADN polimerasas termoestables, que resisten las altas temperaturas que implica el proceso. En la actualidad se puede encontrar una amplia variedad de enzimas distintas, si bien se pueden dividir básicamente en dos grupos:

dores sintéticos (primers), denominados *directo* e *reverso*, complementarios de cada una de las cadenas del DNA alvo e com os seus extremos 3' confrontados entre si.

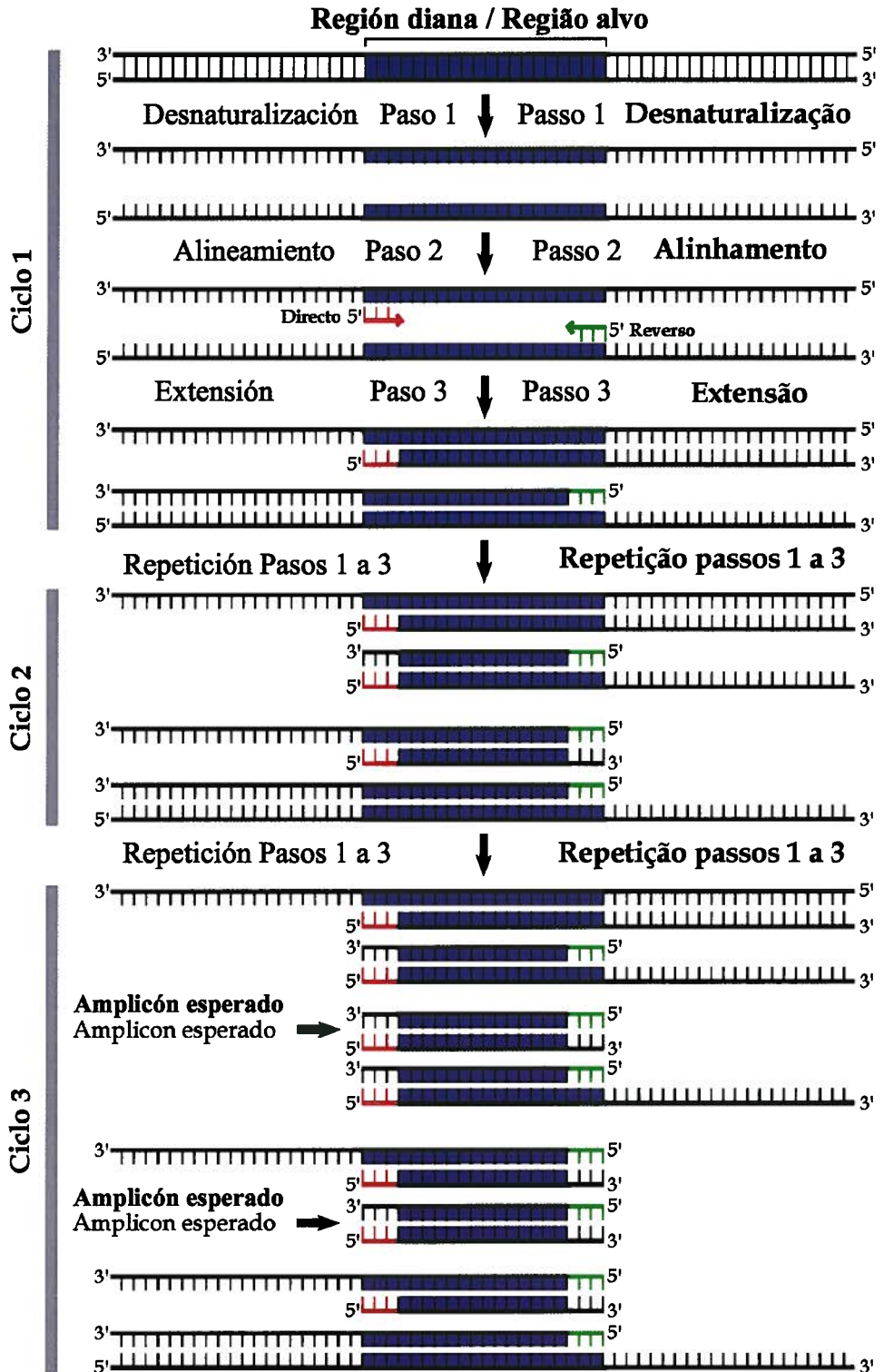
Uma vez isolado o DNA total que contém o segmento que se deseja amplificar, realiza-se um processo cíclico com um primeiro passo de desnaturação por calor (normalmente 94-96°C durante 2-5 minutos) com o objectivo de separar as duas cadeias do DNA alvo. Em seguida, realiza-se o alinhamento dos primers, que se efetua a uma temperatura inferior (entre 50-60 °C) e por último um passo de extensão para a criação de uma cadeia cópia do DNA alvo (Fig. 13).

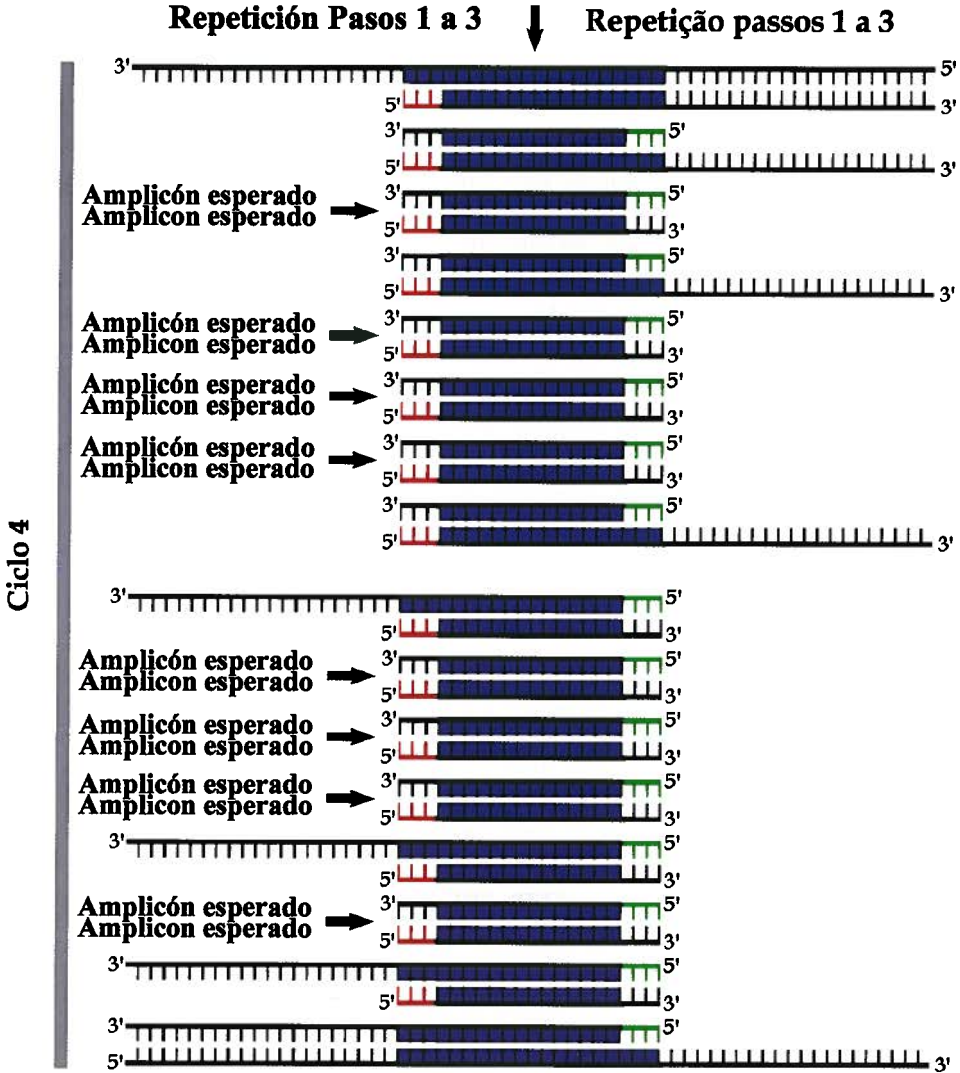
Cada ciclo de desnaturalização, alinhamento e extensão repete-se 25-30 vezes de forma automática, amplificando assim a seqüência de DNA desejada, flanqueada nos seus extremos pelos primers (fragmentos amplificados). No terceiro ciclo aparecem já dois fragmentos amplificados do tamanho esperado, que se multiplicam até oito no quarto ciclo. Desta forma, ao cabo de uns 30 ciclos consegue-se amplificar a seqüência aproximadamente 10^9 vezes. A técnica é tão sensível que pode chegar a detectar e amplificar uma única molécula de DNA em qualquer tipo de amostra.

Para este processo utilizam-se DNA polimerasas termoestáveis, que resistem às altas temperaturas que o processo implica. Actualmente, pode-se encontrar uma ampla variedade de enzimas distintas, se bem que possam ser divididas basicamente em dois grupos:

- Sem actividade exonuclease 3'-5',

- Sin actividad exonucleasa 3'-5', y que por lo tanto no tienen capacidad de corregir los errores durante la síntesis del ADN. La más usada es la Taq polimerasa, aislada originalmente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. Su tasa de error se sitúa en torno a 1 nucleótido por cada 1000 (10^{-3}).
 - Con actividad exonucleasa 3'-5' o "proofreading". La más conocida es la Pfu, aislada de la bacteria termófila *Pyrococcus furiosus*. También existen formas recombinantes disponibles en el mercado. A diferencia de la Taq, la Pfu es una enzima de gran fiabilidad, con una tasa de error unas mil veces menor, situándose en torno a 10^{-6} . Por el contrario, es una enzima menos procesiva, requiriendo tiempos de extensión de 1-2 minutos por cada kb de ADN a amplificar.
- e que portanto não têm capacidade de corrigir os erros durante a síntese do DNA. A mais usada é a Taq polimerase, isolada originalmente da bactéria termófila *Thermus aquaticus*. A sua taxa de erro situa-se à volta de 1 nucleótido por cada 1000 (10^{-3}).
- Com actividade exonuclease 3'-5' ou "proofreading". A mais conhecida é a Pfu, isolada da bactéria termófila *Pyrococcus furiosus*. Também existem formas recombinantes disponíveis no mercado. Ao contrário da Taq, a Pfu é uma enzima de grande fiabilidade, com uma taxa de erro umas mil vezes inferior, situando-se à volta de 10^{-6} . Em contrapartida, é uma enzima menos processiva, requerendo tempos de extensão de 1-2 minutos por cada kb de DNA a amplificar.





Número de moléculas del amplicón esperado = $2^n - 2n$ (n = número de ciclos)
 Número de moléculas do amplicon esperado

Ciclo 1: $N = 2^1 - 2 \times 1 = 0$
 Ciclo 2: $N = 2^2 - 2 \times 2 = 0$
 Ciclo 3: $N = 2^3 - 2 \times 3 = 2$
 Ciclo 4: $N = 2^4 - 2 \times 4 = 8$
 ⋮
 Ciclo 30: $N = 2^{30} - 2 \times 30 = 1.073.741.764$

Figura 13. Técnica PCR
Figura 13. Técnica PCR

Desde un punto de vista matemático, la ecuación que define la PCR es:

$$N_C = N_0 (E + 1)^C$$

donde C es el número de ciclos, E es la eficiencia de amplificación ($0 < E < 1$), N_C es el número de amplicones en el ciclo C y N_0 es el número inicial de moléculas de ADN diana. Por tanto, cada ciclo produce un incremento de N_C que es proporcional a la eficiencia de amplificación, de forma que un valor de $E=1$ da lugar a una duplicación en el número de amplicones en cada ciclo.

3.3.2 Microsatélites

Los microsatélites consisten en secuencias de 1-6 nucleótidos repetidas en tándem y que aparecen dispersas por todo el genoma, en todos los cromosomas y en todas las regiones dentro de los cromosomas. De hecho, se pueden encontrar dentro de regiones codificantes, intrones y en secuencias no codificantes. La mayoría de los microsatélites son relativamente pequeños, variando desde unas pocas a cientos de repeticiones. Su pequeño tamaño permite llevar a cabo su análisis mediante PCR. Dichas repeticiones presentan una disposición "cabeza-cola", es decir, se encuentran en la misma orientación 5'-3' una tras otra.

En función del tipo de secuencia podemos diferenciar distintos tipos de microsatélites (Fig. 14). Los microsatélites **ininterrumpidos** son aquellos que se presentan en su forma más pura. Cuando aparece algún nucleótido que rompe la secuencia de las repeticiones, se habla de microsatélite

De um ponto de vista matemático, a equação que define a PCR é:

$$N_C = N_0 (E + 1)^C$$

em que C é o número de ciclos, E é a eficiência de amplificação ($0 < E < 1$), N_C é o número de fragmentos amplificados no ciclo C e N_0 é o número inicial de moléculas de DNA alvo. Portanto, cada ciclo produz um incremento de N_C que é proporcional à eficiência de amplificação, de forma a que um valor de $E=1$ dá lugar a uma duplicação no número de fragmentos amplificados em cada ciclo.

3.3.2 Microsatélites

Os microsatélites consistem em seqüências de 1-6 nucleótidos repetidas em tandem e que aparecem dispersas por todo o genoma, em todos os cromossomas e em todas as regiões dentro dos cromossomas. De facto, podem ser encontrados dentro de regiões codificantes, íntrons e em seqüências não codificantes. A maior parte dos microsatélites são relativamente pequenos, variando de umas poucas a centenas de repetições. O seu pequeno tamanho permite realizar a sua análise mediante PCR. As ditas repetições apresentam uma disposição "cabeça-cauda", isto é, encontram-se na mesma orientação 5'-3' uma atrás da outra.

Em função do tipo de seqüência podemos diferenciar distintos tipos de microsatélites (Fig. 14). Os microsatélites **ininterrumpidos** são aqueles que se apresentam na sua forma mais pura. Quando aparece algum nucleótido que quebra a seqüência das repetições, fala-se de microsatélite **inte-**

interrumpido. En ocasiones el microsatélite está formado por distintos tipos de repeticiones, denominándose **compuesto**. Los microsatélites **crípticos**, en muchas ocasiones, pasan inadvertidos debido a la dificultad de ser detectados.

rrompido. Por vezes o microsatélite é formado por diferentes tipos de repetições, denominando-se **compuesto**. Os microsatélites **crípticos**, em muitas ocasiões, passam despercebidos, devido à dificuldade de serem detectados.

Ininterrumpidos/Ininterrompidos

Interrumpidos/Interrompidos

Compuestos/Compostos

Crípticos

GTGTGTGTGTGTGT

GTGTGTAGTGTGTGT

GTGTGTGTCTCTCT

GAGTGTCTTCTTGTCTGTG

Figura 14. Tipos de microsatélites
Figura 14. Tipos de microsatélites

Tradicionalmente el aislamiento de microsatélites se ha llevado a cabo a partir de librerías de ADN genómico, analizando un número elevado de clones mediante hibridación con sondas de ADN repetitivo marcadas con radioactividad. Este tipo de protocolos son costosos y relativamente lentos, además de presentar el riesgo inherente al propio manejo de sondas radioactivas. Sin embargo, hoy en día existen protocolos alternativos mucho más rápidos y eficientes basados en PCR y librerías enriquecidas con sondas biotiniladas. En cualquier caso e independientemente del protocolo utilizado, una vez aislados los clones, el procedimiento para el análisis de microsatélites se esquematiza en la figura 15.

Los clones obtenidos son secuenciados para confirmar la presencia de un microsatélite. Una vez obtenidas dichas secuencias, se diseñan cebadores a partir de las secuencias flanqueantes para su amplificación por PCR. Los fragmentos son finalmente separados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. El tamaño de

Tradicionalmente o isolamento de microsatélites era efetuado a partir de livrarias de DNA genómico, analisando um número elevado de clones mediante hibridação com sondas de DNA repetitivo marcadas com radioactividade. Este tipo de protocolos é caro e relativamente lento, além de apresentar o risco inerente ao manuseamento de sondas radioactivas. No entanto, hoje em dia existem protocolos alternativos muito mais rápidos e eficientes baseados em PCR e livrarias enriquecidas com sondas biotiniladas. Em qualquer caso e independentemente do protocolo utilizado, uma vez isolados os clones, o procedimento para a análise de microsatélites é esquematizado na figura 15.

Os clones obtidos são seqüenciados para confirmar a presença de um microsatélite. Uma vez obtidas as ditas seqüências, desenham-se iniciadores a partir das seqüências flanqueantes para a sua amplificação por PCR. Os fragmentos são finalmente separados mediante electroforese em géis de poliacrilamida. O tamanho dos

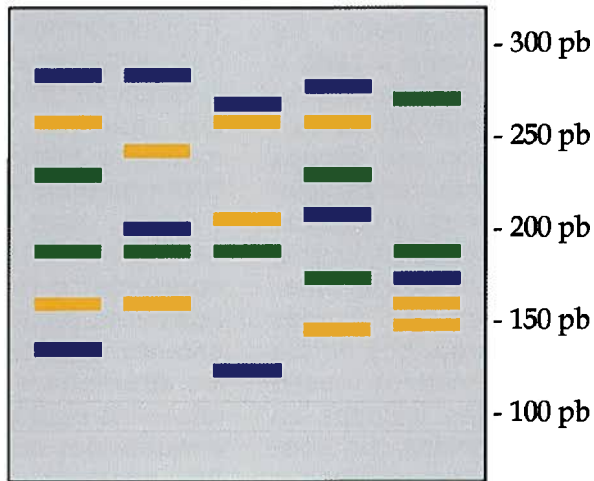
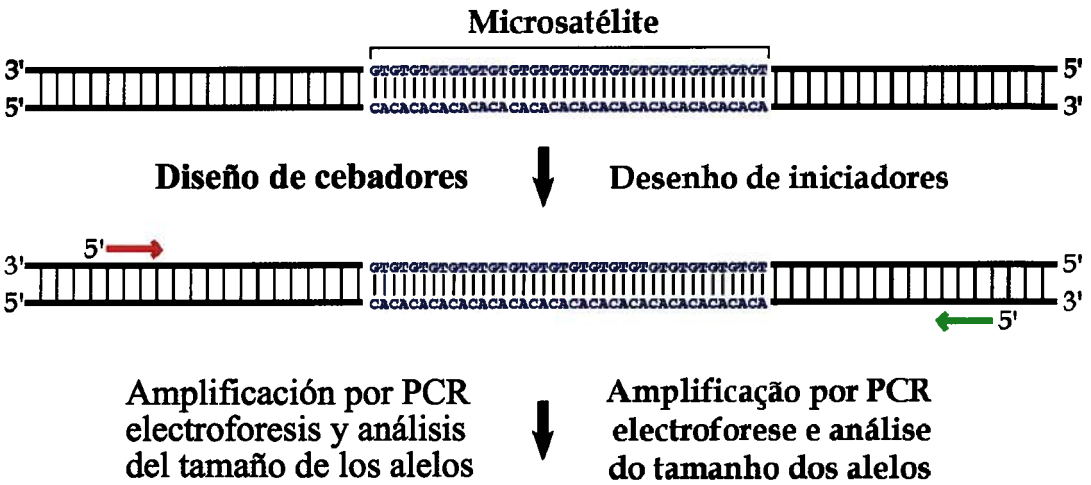


Figura 15. Aislamiento y análisis de microsatélites
 Figura 15. Isolamento e análise de microsatélites

los fragmentos variará dependiendo del número de repeticiones que presente el microsatélite. Existen diversos métodos de visualización de los geles: tinción con plata, autorradiografía, o detección por fluorescencia.

fragmentos variará dependendo do número de repetições que o microsatélite apresenta. Existem diversos métodos de visualização dos géis: coloração com prata, autorradiografia, ou detecção por fluorescência.

Los microsatélites como marcadores moleculares presentan una serie de ventajas:

Os microsatélites como marcadores moleculares apresentam uma série de vantagens:

- *Alta variabilidad alélica.* De cada locus pueden existir multitud de alelos, facilitando así los estudios en los que se pretenda determinar el grado de variabilidad genética entre poblaciones e individuos.
- Requiere muy *poca cantidad de tejido.*
- Permite el análisis de *muestras antiguas.*
- *Herencia mendeliana y codominancia.*
- *Marcador neutro,* no sujetos a selección.
- *Número de loci* potenciales muy *elevado.*
- Permite *amplificación cruzada* con especies filogenéticamente próximas.

A pesar de todas estas ventajas, el uso de microsatélites también presenta una serie de desventajas:

- Requiere la caracterización previa de las secuencias flanqueantes.
- Existencia de alelos nulos no amplificables. Tales alelos pueden deberse bien a modificaciones de las secuencias flanqueantes o bien a que los fragmentos son de un tamaño tan grande que escapan a la resolución del gel.
- Homoplasias, es decir, alelos que presentan un mismo tamaño y que son tratados como el mismo alelo, y sin embargo tienen un origen evolutivo diferente.

- *Alta variabilidade alélica.* De cada locus pode existir uma multiplicidade de alelos, facilitando assim os estudos nos quais se pretenda determinar o grau de variabilidade genética entre populações e indivíduos.
- Requer muito *pouca quantidade de tecido.*
- Permite a análise de *amostras antigas.*
- *Herança mendeliana e codominância.*
- *Marcador neutro,* não sujeitos a seleção.
- *Número de loci* potenciales muito *elevado.*
- Permite *amplificação cruzada* com espécies filogeneticamente próximas.

Apesar de todas estas vantagens, o uso de microsatélites também apresenta uma série de inconvenientes:

- Requer a caracterização prévia das seqüências flanqueantes.
- Existência de alelos nulos não amplificáveis. Tais alelos podem resultar de modificações das seqüências flanqueantes ou do facto de os fragmentos serem de um tamanho tão grande que escapan à resolução do gel.
- Homoplasias, isto é, alelos que apresentam um mesmo tamanho e que são tratados como sendo o mesmo alelo, quando no entanto têm uma origem evolutiva diferente.

Las principales aplicaciones de los microsatélites son:

- *Genética de poblaciones*, facilitada por la enorme variabilidad alélica existente. Estos estudios pueden ir dirigidos bien a la diferenciación geográfica de poblaciones naturales, bien a la determinación de los niveles de endogamia en cultivos.
- *Asignación de parentesco e identificación forense*. La probabilidad de que dos individuos muestren el mismo patrón alélico para un número variable de microsatélites es prácticamente nula.
- *Mapeo cromosómico*. Al ser marcadores distribuidos por prácticamente todo el genoma, pueden aparecer ligados a otros marcadores de interés, como por ejemplo genes causantes o que confieren resistencia a ciertas enfermedades.

3.3.3 Minisatélites

Los minisatélites son repeticiones de secuencia de entre 15-100 nucleótidos que, al igual que los microsatélites, aparecen repetidas en tándem en número variable y dispersas por todo el genoma, pudiendo llegar a alcanzar hasta 20 kb. Presentan también una disposición "cabeza-cola" de las repeticiones.

Para su análisis (Fig. 16), el ADN genómico se digiere con enzimas de restricción que no presentan dianas dentro de las repeticiones. Mediante electroforesis, se separan los fragmentos de distintos tamaño generados, que se ponen de manifiesto de

As principais aplicações dos microsatélites são:

- *Genética de populações*, facilitada pela enorme variabilidade alélica existente. Estes estudos podem ser dirigidos quer à diferenciação geográfica de populações naturais, quer à determinação dos níveis de endogamia em cultivos.
- *Designação de parentesco e identificação forense*. A probabilidade de dois indivíduos mostrarem o mesmo padrão alélico para um número variável de microsatélites é praticamente nula.
- *Mapa cromossómico*. Sendo marcadores distribuídos por praticamente todo o genoma, podem aparecer ligados a outros marcadores de interesse, como por exemplo genes causadores ou que conferem resistência a certas doenças.

3.3.3 Minisatélites

Os minisatélites são repetições de sequência de entre 15-100 nucleótidos que, tal como os microsatélites, aparecem repetidas em tandem em número variável e dispersas por todo o genoma, podendo chegar a alcançar até 20 kb. Apresentam também uma disposição "cabeça-cauda" das repetições.

Para sua análise (Fig. 16), o DNA genómico digere-se com enzimas de restrição que não apresentam alvos dentro das repetições. Mediante electroforeses, separam-se os fragmentos de diferentes tamanhos gerados, que se manifestam de forma indirecta

forma indirecta mediante la transferencia a un filtro de nylon y posterior hibridación con una sonda específica de la repetición (Southern blot).

Las principales ventajas que presenta este tipo de marcador molecular son:

- *Hipervariabilidad* en el número de repeticiones entre individuos.
- *Marcador multilocus*, puesto que un mismo tipo de repetición puede aparecer en localizaciones genómicas distintas.

Por el contrario, también aparecen una serie de desventajas que es preciso tener en consideración:

- Requiere ADN de muy alta calidad.
- Dificultad en la identificación de los alelos al tratarse de un método de detección indirecto.
- Presencia de alelos nulos en los casos en los que la enzima de restricción usada presente una diana dentro de la secuencia de las repeticiones.

Los minisatélites, al igual que los microsatélites, presentan principalmente aplicaciones forenses, en la identificación de individuos y en el establecimiento de relaciones de parentesco.

mediante a transferência a um filtro de nylon e posterior hibridação com uma sonda específica da repetição (Southern blot).

As principais vantagens que apresenta este tipo de marcador molecular são:

- *Hipervariabilidade* no número de repetições entre indivíduos.
- *Marcador multilocus*, dado que um mesmo tipo de repetição pode aparecer em localizações genômicas distintas.

Em contrapartida, também existe uma série de inconvenientes que é preciso ter em consideração:

- Requer DNA de muito alta qualidade.
- Dificuldade na identificação dos alelos por se tratar de um método de detecção indirecto.
- Presença de alelos nulos nos casos em que a enzima de restrição usada apresente um alvo dentro da seqüência das repetições.

Os minisatélites, tal como os microsatélites, apresentam principalmente aplicações forenses, na identificação de indivíduos e no estabelecimento de relações de parentesco.

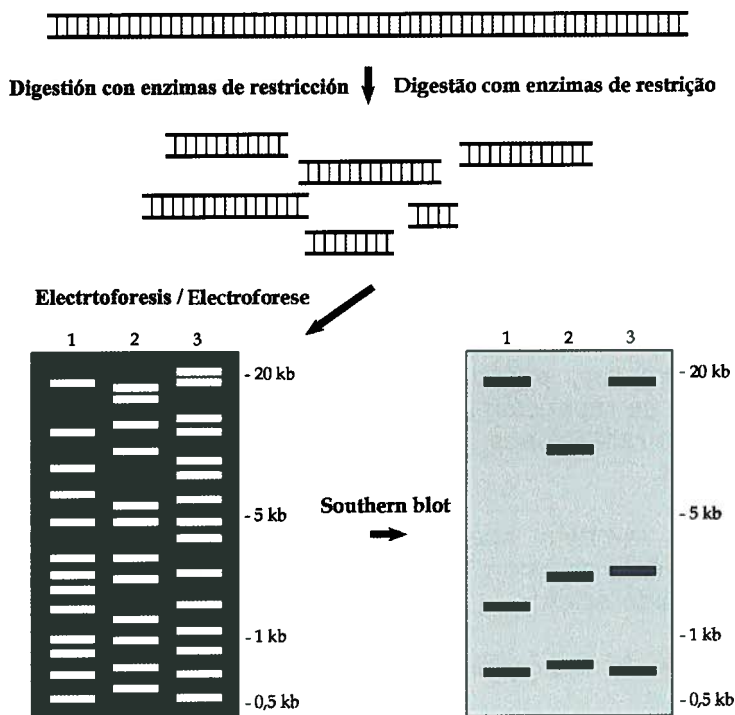


Figura 16. Detección de minisatélites mediante Southern blot
 Figura 16. Detecção de minisatélites mediante Southern blot

3.3.4 RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"): Polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción

Se denomina RFLP al patrón de bandas de tamaños variables que se obtiene mediante electroforesis tras la digestión del ADN con diferentes enzimas de restricción. Esta digestión se efectúa a partir de ADN genómico, ADN mitocondrial, o bien fragmentos amplificados previamente mediante PCR, denominándose entonces PCR-RFLP. En el ejemplo mostrado en la figura 17, un fragmento de ADN de aproximadamente 180 pb es amplificado mediante PCR en dos muestras distintas (1 y 2), y tras la digestión

3.3.4 RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism"): Polimorfismo na longitude dos fragmentos de restrição

Dá-se o nome de RFLP ao padrão de bandas de tamanhos variáveis que se obtém mediante electroforese após a digestão do DNA com diferentes enzimas de restrição. Esta digestão efetua-se a partir de DNA genómico, DNA mitocondrial, ou de fragmentos amplificados previamente mediante PCR, denominando-se então PCR-RFLP. No exemplo ilustrado na figura 17, um fragmento de DNA de aproximadamente 180 pb é amplificado mediante PCR em duas amostras diferentes (1 e 2), e após a digestão com uma enzi-

con una enzima de restricción la primera de ellas produce dos fragmentos de 120 y 60 pb, mientras que la segunda no es digerida.

ma de restrição a primeira delas produz dois fragmentos de 120 e 60 pb, enquanto que a segunda não é digerida.

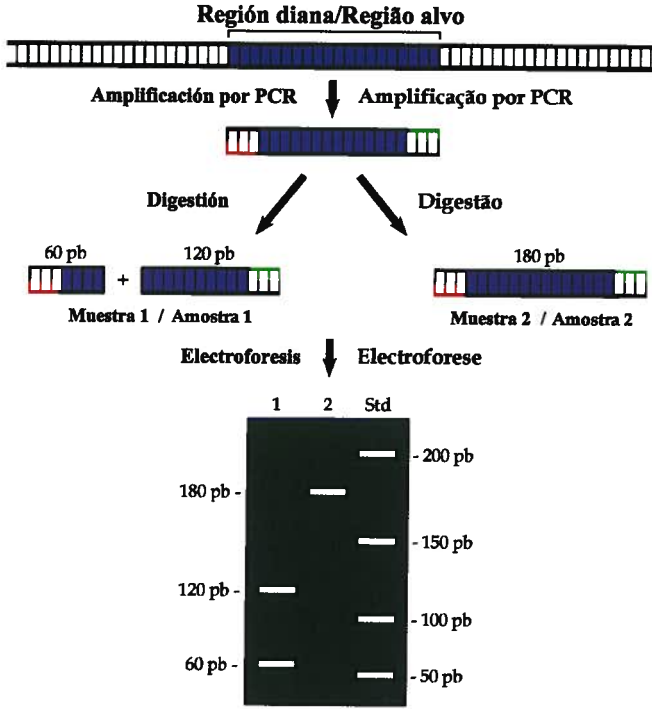


Figura 17. Técnica PCR-RFLP
Figura 17. Técnica PCR-RFLP

La variabilidad en el tamaño de las bandas con RFLP puede originarse por distintas causas: cambios en la secuencia de nucleótidos localizados dentro de las dianas de restricción, indels que provocan la aparición o desaparición de dianas de restricción, o por los reordenamientos de secuencias que puedan ocurrir dentro de un genoma.

A variabilidade no tamanho das bandas com RFLP pode ser originada por diferentes causas: alterações na seqüência de nucleótidos localizados dentro dos alvos de restrição, indels que provocam o aparecimento de alvos de restrição, ou pelos reordenamentos de seqüências que possam ocorrer dentro de um genoma.

La separación de los fragmentos de ADN mediante electroforesis puede efectuarse en distintos medios, normalmente agarosa para bandas de entre 0'5-20 kb, o bien acrilamida para fragmentos de entre 10-1.000

A separação dos fragmentos de DNA mediante electroforese pode efetuar-se em diferentes meios, normalmente agarose para bandas de entre 0'5-20 kb, ou então acrilamida para fragmentos de entre 10-1.000 pb. Por outro

pb. Por otro lado, la visualización de las bandas de ADN también puede efectuarse de diversas maneras: tinción de los geles con bromuro de etidio, para bandas que tengan al menos 50 ng; tinción de los geles con plata, que permite detectar bandas con menos de 100 pg; empleo de nucleótidos marcados con ^{32}P o ^{35}S ("end-labeling") para cantidades de ADN muy pequeñas, detectándose las bandas mediante autorradiografía; también puede emplearse un método indirecto como el Southern blot.

Las principales ventajas de la RFLP como marcador molecular son:

- *Reproducibilidad.* Al tratarse simplemente de una digestión enzimática del ADN específica de secuencia, no se ve alterado por pequeños cambios en las condiciones experimentales.
- *No exige conocimiento previo de secuencias.* El patrón de bandas obtenido dependerá de las enzimas de restricción elegidas y de la secuencia de nucleótidos del ADN diana.
- *Herencia mendeliana y codominancia.*

Como principales desventajas de la RFLP destacan:

- Requiere ADN en cantidad y de buena calidad.
- Exige el uso de enzimas de restricción, que en algunos casos pueden alcanzar costos muy elevados.
- A veces requiere la detección indirecta de una determinada banda o bandas mediante Southern blot, lo

lado, a visualização das bandas de DNA também pode efetuar-se de diversas maneiras: coloração dos géis com brometo de etídio, para bandas que tenham ao menos 50 ng; coloração dos géis com prata, que permite detectar bandas com menos de 100 pg; emprego de nucleótidos marcados com ^{32}P o ^{35}S ("end-labeling") para quantidades de DNA muito pequenas, detectando-se as bandas mediante autorradiografia; também pode empregar-se um método indirecto como o Southern blot.

As principais vantagens da RFLP como marcador molecular são:

- *Reprodutibilidade.* Tratando-se simplesmente de uma digestão enzimática do DNA específica de seqüência, não se vê alterado por pequenas alterações nas condições experimentais.
- *Não exige conhecimento prévio de seqüências.* O padrão de bandas obtido dependerá das enzimas de restrição escolhidas e da seqüência de nucleótidos do DNA alvo.
- *Herança mendeliana e codominância.*

Como principais inconvenientes da RFLP destacam-se:

- Requer DNA em quantidade e de boa qualidade.
- Exige o uso de enzimas de restrição, que nalguns casos podem atingir custos muito elevados.
- Por vezes requer a detecção indirecta de uma determinada banda ou bandas mediante Southern blot, o

que implica la transferencia del ADN a un soporte de nylon e hibridación posterior con una sonda marcada, lo que supone un incremento de tiempo y costo.

- Nivel de polimorfismo es relativamente bajo.

que implica a transferência do DNA para um suporte de nylon e hibridação posterior com uma sonda marcada, o que supõe um incremento de tempo e de custo.

- Nível de polimorfismo é relativamente baixo.

La RFLP se utiliza fundamentalmente en:

- *Aplicaciones forenses*, para el establecimiento de relaciones de parentesco.
- En *comercialización*, para la identificación de especies tanto de productos frescos y congelados como procesados térmicamente. En este último caso, y debido a la degradación del ADN en fragmentos de aproximadamente 200 pb como consecuencia del tratamiento térmico, se lleva a cabo una PCR-RFLP de un fragmento menor de 200 pb.

A RFLP utiliza-se fundamentalmente em:

- *Aplicações forenses*, para o estabelecimento de relações de parentesco.
- Em *comercialização*, para a identificação de espécies de produtos frescos, congelados ou processados termicamente. Neste último caso, e devido à degradação do DNA em fragmentos de aproximadamente 200 pb como consequência do tratamento térmico, efetua-se uma PCR-RFLP de um fragmento menor de 200 pb.

3.3.5 AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism"): Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados

La AFLP es una técnica basada en la PCR con cierta similitud a la RFLP en el sentido que precisa de una digestión del ADN con enzimas de restricción. Para su realización se usan normalmente dos enzimas distintas, una de ellas con una diana de 4 nucleótidos, que por tanto corta frecuentemente, como por ejemplo *TaqI*, y otra con una diana de 6 nucleótidos, de menor frecuencia de corte, como *EcoRI*. Las secuencias diana de estas enzimas se muestran en la figura 18, donde las flechas indican los extremos que se generan tras la digestión.

3.3.5 AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism"): Polimorfismo no tamanho dos fragmentos amplificados

A AFLP é uma técnica baseada na PCR com certa similitude com a RFLP no sentido em que precisa de uma digestão do DNA com enzimas de restrição. Para sua realização, usam-se normalmente duas enzimas distintas, uma delas com um alvo de 4 nucleótidos, que portanto corta frequentemente, como por exemplo *TaqI*, e outra com um alvo de 6 nucleótidos, de menor frequência de corte, como *EcoRI*. As seqüências alvo destas enzimas mostram-se na figura 18, onde as setas indicam os extremos que se geram após a digestão.

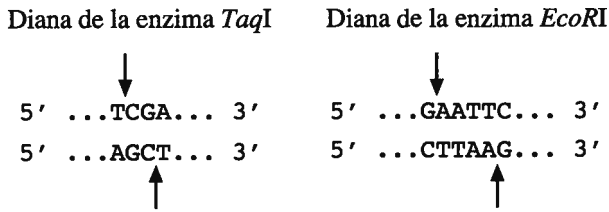


Figura 18. Puntos de corte de la enzimas *TaqI* y *EcoRI*
 Figura 18. Pontos de corte das enzimas *TaqI* e *EcoRI*

Una vez finalizada la digestión aparecerán dos tipos distintos de fragmentos en función de sus extremos: aquellos que tienen los extremos iguales por haber sido digeridos con la misma enzima, ya sea *TaqI* o *EcoRI*, y otros en los que los extremos serán diferentes. Estos últimos fragmentos son los que van a ser seleccionados, puesto que el siguiente paso consiste en la ligación de unos adaptadores de secuencia conocida (Fig. 19).

Uma vez finalizada a digestão, aparecerão dois tipos diferentes de fragmentos em função dos seus extremos: aqueles que têm os extremos iguais por terem sido digeridos com a mesma enzima, quer seja *TaqI* ou *EcoRI*, e outros em que os extremos serão diferentes. Estes últimos fragmentos são os que vão ser seleccionados, dado que o passo seguinte consiste na ligação de uns adaptadores de sequência conhecida (Fig. 19).

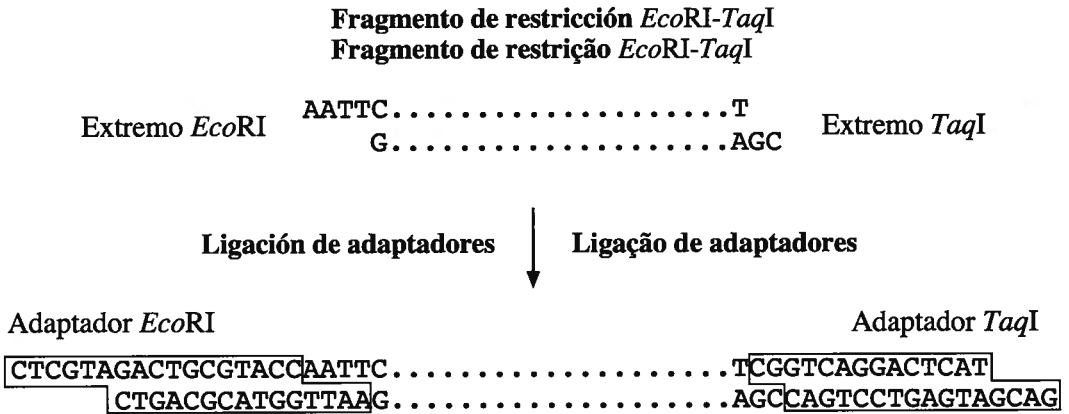


Figura 19. Ligación de adaptadores en cada uno de los extremos de los fragmentos
 Figura 19. Ligação de adaptadores em cada um dos extremos dos fragmentos

Tras la ligación de los adaptadores se llevan a cabo dos amplificaciones consecutivas mediante PCR. En la primera de ellas, denominada "preselectiva", se utilizan cebadores de secuencia complementaria a la de los adap-

Após a ligação dos adaptadores, efetuam-se duas amplificações consecutivas mediante PCR. Na primeira delas, denominada "preseletiva", utilizam-se iniciadores de sequência complementar à dos adaptadores aos

tadores a los que se les añade una base adicional en el extremo 3' (base selectiva) (Fig. 20). Solamente se amplificará una fracción de los fragmentos a los que se hayan unido los adaptadores: los que presenten en su secuencia una C tras la diana original *EcoRI*, y los que presenten una G previa a la diana original *TaqI*.

quais se adiciona uma base adicional no extremo 3' (base selectiva) (Fig. 20). Apenas se amplificará una fracción dos fragmentos aos quais se tenha unido os adaptadores: os que apresentem na sua seqüência uma C após o alvo original *EcoRI*, e os que apresentem uma G antes do alvo original *TaqI*.

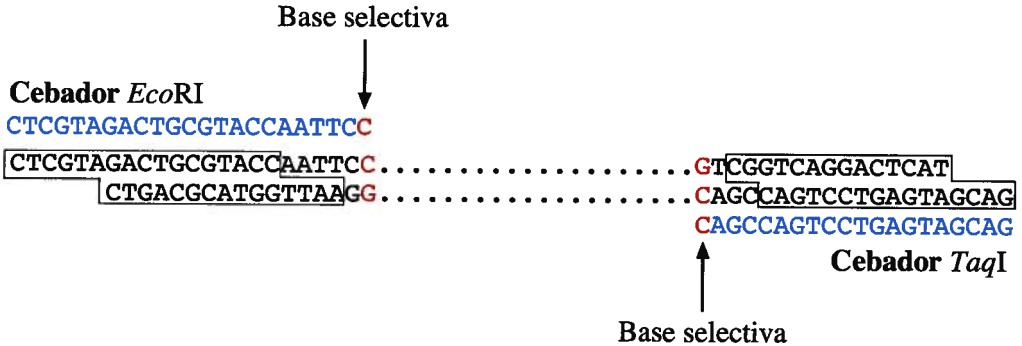


Figura 20. Diseño de la PCR preselección
Figura 20. Desenho da PCR pré-seleção

El producto de esta PCR se amplifica de nuevo utilizando una nueva pareja de cebadores. En el ejemplo que se muestra en la figura 21, en la PCR "selectiva" solamente se amplificarán, de los fragmentos ya amplificados en la PCR preselección, aquellos que tengan la secuencia CA por el extremo *EcoRI*, y TG por el extremo *TaqI*.

O produto desta PCR amplifica-se de novo utilizando um novo par de iniciadores. No exemplo que se apresenta na figura 21, na PCR "selectiva" só se amplificarão, dos fragmentos já amplificados na PCR pré-seleção, aqueles que tenham a seqüência CA pelo extremo *EcoRI*, e TG pelo extremo *TaqI*.

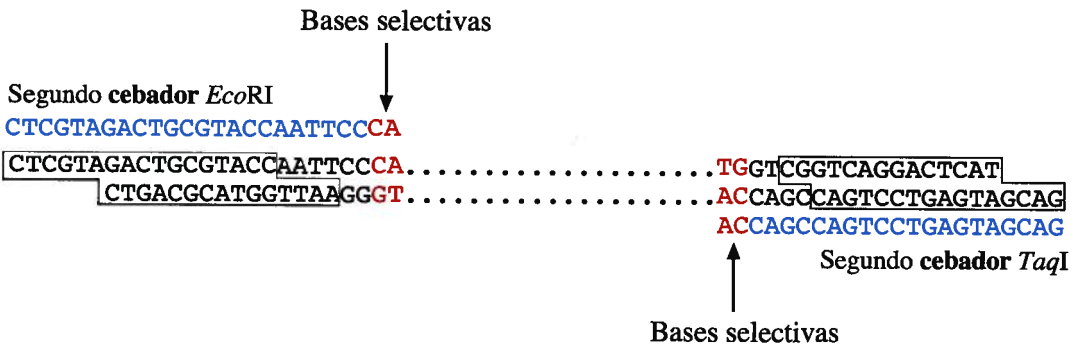


Figura 21. Diseño de la PCR selectiva
Figura 21. Desenho da PCR selectiva

De no llevarse a cabo estas amplificaciones selectivas se originarían millones de fragmentos de PCR. Existen muchas variantes alternativas a esta estrategia igualmente válidas. En cualquier caso, una vez finalizadas las dos amplificaciones sucesivas, las bandas de ADN son separadas mediante electroforesis en geles de secuenciación. La visualización de las bandas puede llevarse a cabo utilizando radioactividad o bien fluorescencia, en el caso de haber usado cebadores marcados con fluoróforos. En este último caso se pueden usar distintas combinaciones de cebadores, cada uno de ellos con un marcaje diferente (FAM y HEX, por ejemplo).

Las principales ventajas de los marcadores obtenidos por AFLP son:

- Requiere de muy *poca cantidad de ADN* de partida.
- *Alto grado de polimorfismo*, puesto que pueden llegar a detectarse cientos de bandas diferentes.
- *Marcadores representativos de todo el genoma*, puesto que los fragmentos pueden haberse amplificado tanto de regiones codificantes como no codificantes.
- *No exige conocimiento previo de secuencias*.
- *Repetitividad*, ya que los resultados no se ven alterados por pequeños cambios en las condiciones experimentales.

Entre las desventajas de la AFLP podemos destacar:

- La interpretación de los resultados puede ser muy compleja, teniendo en cuenta el elevado número de

Se não se efetuassem estas amplificações selectivas, originar-se-iam milhões de fragmentos de PCR. Existem muitas variantes alternativas a esta estratégia igualmente válidas. Em qualquer caso, uma vez finalizadas as duas amplificações sucessivas, as bandas de DNA são separadas mediante electroforese em géis de seqüencição. A visualização das bandas pode ser efetuada utilizando radioactividade ou então fluorescência, no caso de ter usado iniciadores marcados com fluoróforos. Neste último caso podem-se usar diferentes combinações de iniciadores, cada um deles com uma marcação diferente (FAM e HEX, por exemplo).

As principais vantagens dos marcadores obtidos por AFLP são:

- Requerer muito *pouca quantidade de DNA* à partida.
- *Alto grau de polimorfismo*, dado que se podem chegar a detectar centenas de bandas diferentes.
- *Marcadores representativos de todo o genoma*, dado que os fragmentos se podem ter amplificado tanto de regiões codificantes como não codificantes.
- *Não exige conhecimento prévio de seqüências*.
- *Repetitividade*, já que os resultados não se vêm alterados por pequenas alterações nas condições experimentais.

Entre os inconvenientes da AFLP podemos destacar:

- A interpretação dos resultados pode ser muito complexa, tendo

bandas que pueden obtenerse, y que la pérdida de una determinada banda puede dar lugar a la aparición de otras. Además, pueden aparecer alelos nulos cuando el tamaño de la banda se sitúe fuera del rango de resolución (> 600 pb).

- Coste es relativamente elevado.
- Dificultad de detección de herencia mendeliana por la propia complejidad de los resultados que se obtienen.
- El sesgo en la composición de nucleótidos de un genoma puede afectar los resultados, y debe tenerse en cuenta a la hora de elegir las enzimas de restricción y las bases selectivas en los cebadores.

Entre sus principales aplicaciones podemos citar:

- Determinación de la *diversidad genética* entre cepas, poblaciones o especies, dado su elevado polimorfismo.
- Detección de *modificaciones del genoma* tales como reordenamientos cromosómicos, puesto que se trata de un marcador representativo del genoma completo.
- Análisis de la *expresión génica* en diferentes condiciones ambientales o en diferentes estadios de desarrollo.
- *Mapeo genético*.
- Análisis de *ligamiento* a marcadores implicados en mejora genética (QTLs).

em conta o elevado número de bandas que se podem obter, e que a perda de uma determinada banda pode dar lugar ao aparecimento de outras. Além disso, podem aparecer alelos nulos quando o tamanho da banda se situe fora do intervalo de resolução (> 600 pb).

- O custo é relativamente elevado.
- Dificuldade de detecção de herança mendeliana pela própria complexidade dos resultados que se obtêm.
- O sesgo na composição de nucleótidos de um genoma pode afectar os resultados, e deve ser tido em conta na hora de escolher as enzimas de restrição e as bases selectivas nos iniciadores.

Entre as suas principais aplicações podemos citar:

- Determinação da *diversidade genética* entre cepas, populações ou espécies, dado o seu elevado polimorfismo.
- Detecção de *modificações do genoma* tais como reordenamentos cromossómicos, dado que se trata de um marcador representativo do genoma completo.
- Análise da *expressão gênica* em diferentes condições ambientais ou em diferentes estadios de desenvolvimento.
- *Mapeamento genético*.
- Análise de *ligamento* a marcadores implicados em melhoramento genética (QTLs).

3.3.6 SSCP ("Single Strand Conformation Polymorphism"): Polimorfismo en la conformación de las cadenas sencillas de ADN

El análisis SSCP incluye dos pasos principales: amplificación mediante PCR de una secuencia diana (de ahí que se denomina también como PCR-SSCP), y electroforesis de los productos de la PCR (previa desnaturalización con calor y seguida de una rápida renaturalización en frío) en un gel en condiciones nativas. Estos geles permiten que las cadenas sencillas de ADN se plieguen en diferentes conformaciones que se ven estabilizadas por interacciones intracatenarias. Pequeños cambios en la secuencia de ADN alteran dicha conformación, pudiéndose comparar así los diferentes perfiles electroforéticos (Fig. 22).

3.3.6 SSCP ("Single Strand Conformation Polymorphism"): Polimorfismo na configuração das cadeias simples de DNA

A análise SSCP inclui dois passos principais: amplificação mediante PCR de uma seqüência alvo (daí denominar-se também como PCR-SSCP), e electroforese dos produtos da PCR (previa desnaturalização com calor e seguida de uma rápida renaturalização a frio) num gel em condições nativas. Estes géis permitem que as cadeias simples de DNA apresentem diferentes conformações que se vêem estabilizadas por interacções intracatenárias. Pequenas alterações na seqüência de DNA alteram a dita conformação, podendo-se assim comparar os diferentes perfis electroforéticos (Fig. 22).

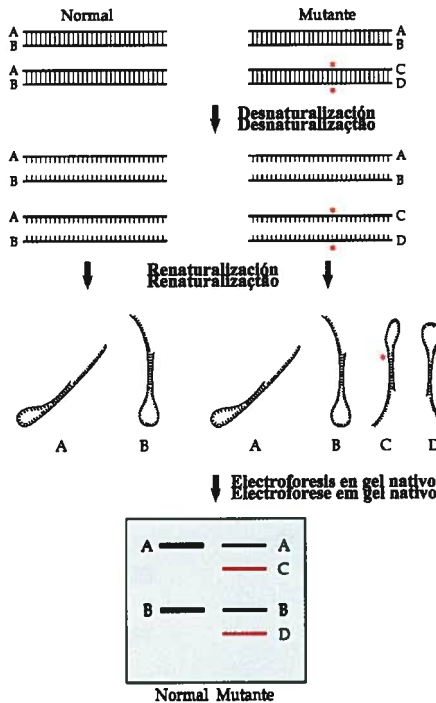


Figura 22. Técnica SSCP
 Figura 22. Técnica SSCP

La eficiencia de la técnica para la detección de mutaciones es máxima cuando el tamaño del ADN analizado se sitúa en torno a 150-200 pb, disminuyendo rápidamente conforme aumenta el tamaño del fragmento. Aunque la movilidad de los fragmentos puede variar considerablemente con el tipo de gel utilizado, con la temperatura del ensayo y con la fuerza iónica proporcionada por el tampón de electroforesis usado, prácticamente el 100% de las mutaciones pueden detectarse en condiciones óptimas de tampón y de temperatura.

A eficiência da técnica para a detecção de mutações é máxima quando o tamanho do DNA analisado se situa à volta de 150-200 pb, diminuindo rapidamente conforme aumenta o tamanho do fragmento. Ainda que a mobilidade dos fragmentos possa variar consideravelmente com o tipo de gel utilizado, com a temperatura do ensaio e com a força iónica proporcionada pelo tampão de electroforese usado, praticamente 100% das mutações podem ser detectadas em condições óptimas de tampão e de temperatura.

La detección de las cadenas sencillas (y plegadas) de ADN se puede llevar a cabo por autorradiografía de los productos de la PCR, o mediante tinción del gel de electroforesis con plata o bromuro de etidio.

A detecção das cadeias simples (e dobradas) de DNA pode ser efetuada por autorradiografia dos produtos da PCR, ou mediante coloração do gel de electroforese com prata ou brometo de etídio.

Entre las ventajas de la SSCP podemos destacar:

Entre as vantagens da SSCP podemos destacar:

- *Método rápido y fiable* de detección de nuevos alelos, que no requiere de un equipamiento especial.
- *Fácil de realizar*, pudiéndose analizar muchas muestras de forma simultánea.
- Pueden emplearse *métodos de detección no radioactivos*.
- *Amplia variedad de condiciones de electroforesis*.

- *Método rápido e fiável* de detecção de novos alelos, que não requer um equipamento especial.
- *Fácil de realizar*, podendo ser analisadas muitas amostras de forma simultânea.
- Podem empregar-se *métodos de detecção não radioativos*.
- *Ampla variedade de condições de electroforese*.

Por el contrario, entre las desventajas se debe citar:

Em contrapartida, entre os inconvenientes há a referir:

- Optimización de la electroforesis. Puesto que no existe ningún algoritmo capaz de predecir de forma

- Optimização da electroforese. Dado que não existe nenhum algoritmo capaz de prever de forma precisa o número de con-

precisa el número de conformaciones que puede adoptar un fragmento de ADN de cadena sencilla, se deben ensayar diferentes condiciones experimentales hasta encontrar aquellas que proporcionen el mejor resultado. Así es posible detectar prácticamente el 100% de las mutaciones.

- Interpretación dificultosa si aparecen múltiples bandas

Las principales aplicaciones de la SSCP son:

- Detección de mutaciones puntuales que alteran la función de los genes.
- Identificación de especies, con aplicación en el campo de la comercialización de todo tipo de productos, especialmente en los procesados.
- Estudios de diferenciación genética entre poblaciones.

3.3.7 RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"): ADN polimórfico amplificado al azar

El análisis de los patrones de bandas de ADN generados mediante RAPD es una técnica muy poderosa para la detección rápida de polimorfismos genómicos. Utilizando cebadores (de entre 7-15 nucleótidos) de secuencia arbitraria, se lleva a cabo una amplificación mediante PCR en condiciones de baja estringencia. De esta forma, se genera un patrón de fragmentos que son posteriormente analizados mediante electroforesis. Dada la naturaleza de la técnica, según las secuencias y tamaños de los cebadores se

formações que pode adoptar um fragmento de DNA de cadeia simples, devem-se ensaiar diferentes condições experimentais até encontrar aquelas que proporcionem o melhor resultado. Assim, é possível detectar praticamente 100% das mutações.

- Interpretação difícil se aparecem múltiplas bandas.

As principais aplicações da SSCP são:

- Detecção de mutações pontuais que alteram a função dos genes.
- Identificação de espécies, com aplicação no campo da comercialização de todo o tipo de produtos, especialmente nos processados.
- Estudos de diferenciação genética entre populações.

3.3.7 RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"): DNA polimórfico amplificado ao acaso

A análise dos padrões de bandas de DNA gerados mediante RAPD é um técnica muito eficaz para a detecção rápida de polimorfismos genómicos. Utilizando iniciadores (de entre 7-15 nucleótidos) de seqüência arbitrária, efetua-se uma amplificação mediante PCR em condições de baixa estringência. Desta forma, gera-se um padrão de fragmentos que são posteriormente analisados mediante electroforese. Dada a natureza da técnica, segundo as seqüências e tamanhos dos iniciadores obter-se-ão diferentes padrões de bandas. A electroforese pode ser realizada em géis de agarose, visuali-

obtendrán diferentes patrones de bandas. La electroforesis se puede realizar bien en geles de agarosa, visualizándose las bandas tras tinción con bromuro de etidio o bien geles de secuenciación, utilizándose en este caso tinción con plata o detección mediante fluorescencia. En la figura 23 se muestra un ejemplo de RAPD utilizando cebadores marcados con fluorescencia para dos muestras diferentes. El análisis de los patrones obtenidos permite detectar bandas compartidas en las dos muestras, así como bandas específicas en cada una de ellas.

zando-se as bandas após coloração com brometo de etídio, ou com géis de seqüencição, utilizando-se neste caso coloração com prata ou detecção mediante fluorescência. Na figura 23 mostra-se um exemplo de RAPD utilizando iniciadores marcados com fluorescência para duas amostras diferentes. A análise dos padrões obtidos permite detectar bandas partilhadas nas duas amostras, assim como bandas específicas em cada uma delas.

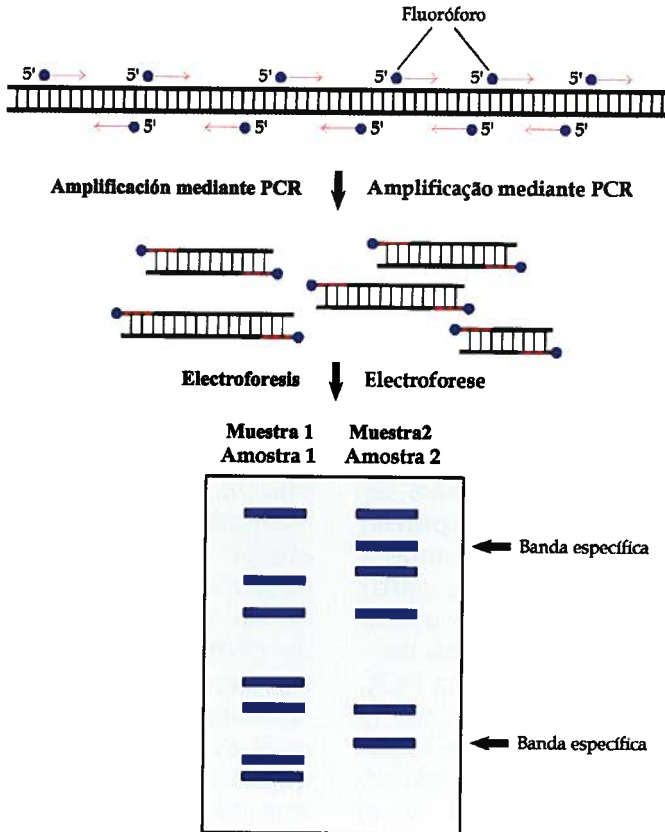


Figura 23. Técnica RAPD
 Figura 23. Técnica RAPD

Este tipo de análisis presenta entre otras ventajas que:

- Es un *método rápido* de detección de polimorfismos, pudiéndose llevar a cabo utilizando ADN genómico de cualquier organismo.
- Es un *marcador representativo de todo el genoma*, puesto que se utilizan cebadores de secuencia corta. De este modo, la probabilidad de encontrar en el genoma secuencias que pueda hibridar con el cebador es muy alta.
- Posee *herencia mendeliana de forma dominante*, es decir, el alelo alternativo de una determinada banda dominante es la ausencia de dicha banda.
- Requiere muy poca cantidad de ADN, variando entre 1-100 ng.
- *No exige conocimiento previo de secuencias* del organismo que se vaya a analizar.

La gran desventaja que ofrece el análisis de RAPD es sin duda alguna la reproducibilidad. Existen multitud de factores que pueden afectar al patrón de bandas de una determinada muestra como la calidad del ADN de partida, la cantidad de ADN que se añada a la reacción, la temperatura de desnaturalización seleccionada en la PCR, el volumen en el que se lleve a cabo la reacción de PCR, la cantidad de cebador empleada, el tipo de ADN polimerasa usada, el termociclador y el material de laboratorio utilizado (tubos, pipetas, puntas, etc).

Las aplicaciones más comunes de la técnica son:

Este tipo de análise apresenta entre outras vantagens que:

- É um *método rápido* de detecção de polimorfismos, podendo efetuar-se utilizando DNA genómico de qualquer organismo.
- É um *marcador representativo de todo o genoma*, dado que se utilizam iniciadores de seqüência curta. Deste modo, a probabilidade de encontrar no genoma seqüências que possam hibridar com o iniciador é muito alta.
- Possui *herança mendeliana de forma dominante*, isto é, o alelo alternativo de uma determinada banda dominante é a ausência da dita banda.
- Requer muito pouca quantidade de DNA, variando entre 1-100 ng.
- *Não exige conhecimento prévio de seqüências* do organismo que se vai analisar.

O grande inconveniente que oferece a análise de RAPD é, sem dúvida alguma, a reprodutibilidade. Existe uma multiplicidade de factores que podem afectar o padrão de bandas de uma determinada amostra como a qualidade do DNA de partida, a quantidade de DNA que se adicione à reacção, a temperatura de desnaturalização seleccionada na PCR, o volume no qual se efetue a reacção de PCR, a quantidade de iniciador empregue, o tipo de DNA polimerase usado, o termociclador e o material de laboratório utilizado (tubos, pipetas, pontas, etc).

As aplicações mais comuns da técnica são:

- Mapeo genético. Bandas específicas obtenidas por RAPD pueden aparecer ligadas a otros tipos de marcadores de interés.
 - Detección de *diversidad genética* de cepas y de poblaciones, dado el elevado carácter polimórfico que posee.
 - *Epidemiología*, para la identificación de variantes víricas y bacterianas que causan patologías.
 - Relaciones *filogenéticas* entre diferentes taxa.
 - *Identificación de especies*, con aplicación en el ámbito comercial.
- Mapeamento genético. Bandas específicas obtidas por RAPD podem aparecer ligadas a outros tipos de marcadores de interesse.
 - Detecção de *diversidade genética* de cepas e de populações, dado o elevado carácter polimórfico que possui.
 - *Epidemiologia*, para a identificação de variantes víricas e bacterianas que causam patologias.
 - *Relações filogenéticas* entre diferentes taxa.
 - *Identificação de espécies*, com aplicação no âmbito comercial.

3.3.8 SNPs ("Single Nucleotide Polymorphism"): Polimorfismos de un nucleótido

Los SNPs describen polimorfismos causados por mutaciones puntuales que dan lugar a la aparición de variantes alélicas que contienen una base diferente en una determinada posición dentro de un locus. Este tipo de marcadores están experimentando en los últimos años un auge creciente puesto que son los polimorfismos más abundantes en cualquier organismo, adaptables a sistemas automáticos de detección, y revelan los polimorfismos más ocultos que no son detectados con otros marcadores ni otros métodos.

Desde un punto de vista teórico, un SNP en un locus puede dar lugar a cuatro alelos, cada uno de los cuales tendría una base diferente (A, T, C y G). Así, aunque la variabilidad no es demasiado alta, su utilidad se ve jus-

3.3.8 SNPs ("Single Nucleotide Polymorphism"): Polimorfismos de um nucleótido

Os SNPs descrevem polimorfismos causados por mutações pontuais que dão lugar ao aparecimento de variantes alélicas que contêm uma base diferente numa determinada posição dentro de um locus. Este tipo de marcadores têm experimentado nos últimos anos um auge crescente, dado que são os polimorfismos mais abundantes em qualquer organismo, adaptáveis a sistemas automáticos de detecção, e revelam os polimorfismos mais ocultos que não são detectados com outros marcadores nem outros métodos.

De um ponto de vista teórico, um SNP num locus pode dar origem a quatro alelos, cada um dos quais teria uma base diferente (A, T, C y G). Assim, ainda que a variabilidade não seja demasiado alta, a sua utilidade vê-se

tificada por su gran abundancia dentro de un genoma. Se heredan de forma mendeliana como marcadores codominantes.

Para la detección de SNPs se pueden utilizar diferentes medios, incluyendo el análisis por SSCP ya comentado anteriormente, el análisis de heterodúplex y la secuenciación directa. Este último es el método más preciso y el más usado.

3.3.9 PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real es una variante de la PCR que se aplica, entre otras finalidades, para la cuantificación de moléculas de ADN y de la expresión génica (ARN mensajero). Para ello se emplean termocicladores acoplados a unidades ópticas capaces de detectar fluorescencia. Puesto que las secuencias diana se amplifican y se detectan en el mismo instrumento, no es necesario analizar alícuotas de cada ciclo de la reacción ni tampoco procesarlas. El mismo instrumento es capaz de representar de forma gráfica la tasa de acumulación del ADN amplificado a lo largo de la reacción de PCR.

Desde un punto de vista matemático, la PCR cuantitativa se base en la siguiente ecuación, derivada de la ecuación básica de la PCR ya descrita anteriormente:

$$N_0 = N_c / (E + 1)^c$$

De este modo, la cuantificación de N_c permite calcular N_0 si se conoce la eficiencia de la amplificación. Cuando la reacción de amplificación alcanza el umbral de fluorescencia, esta ecuación se transforma en:

justificada pela sua grande abundância dentro de um genoma. Herdam-se de forma mendeliana como marcadores codominantes.

Para a detecção de SNPs podem-se utilizar diferentes meios, incluindo a análise por SSCP, já comentada anteriormente, a análise de heterodúplex e a seqüenciação directa. Este último é o método mais preciso e o mais usado.

3.3.9 PCR em tempo real

A PCR em tempo real é uma variante da PCR que se aplica, entre outras finalidades, para a quantificação de moléculas de DNA e da expressão génica (RNA mensageiro). Para isso, empregam-se termocicladores adaptados a unidades ópticas capazes de detectar fluorescência. Dado que as seqüências alvo se amplificam e se detectam no mesmo instrumento, não é necessário analisar alíquotas de cada ciclo da reacção nem processá-las. O mesmo instrumento é capaz de representar de forma gráfica a taxa de acumulação do DNA amplificado ao longo da reacção de PCR.

De um ponto de vista matemático, a PCR quantitativa baseia-se na seguinte equação, derivada da equação básica da PCR já descrita anteriormente:

$$N_0 = N_c / (E + 1)^c$$

Deste modo, a quantificação de N_c permite calcular N_0 se se conhecer a eficiência da amplificação. Quando a reacção de amplificação alcança o limiar de fluorescência, esta equação transforma-se em:

$$N_0 = N_t / (E + 1)^{C_t}$$

donde C_t es el ciclo umbral y N_t es el número de amplicones de la secuencia diana en el umbral de fluorescencia.

Para llevar a cabo el análisis de los datos que se obtienen mediante la PCR a tiempo real existen dos métodos distintos: la cuantificación absoluta sobre una curva estándar y la cuantificación relativa.

El primero de los casos se puede conseguir construyendo una curva estándar. Para ello se representa gráficamente los valores de C_t frente al \log_{10} del número inicial de copias de una serie de cantidades conocidas de ADN estándar. Dicha representación da lugar a una línea recta, de forma que la cantidad de secuencias diana presentes en una muestra desconocida puede determinarse fácilmente a partir de su valor C_t por interpolación sobre la curva estándar.

$$N_0 = N_t / (E + 1)^{C_t}$$

em que C_t é o ciclo limiar e N_t é o número de fragmentos amplificados de la seqüência alvo no limiar de fluorescência.

Para levar a cabo a análise dos dados que se obtêm mediante a PCR em tempo real existem dois métodos diferentes: a quantificação absoluta sobre uma curva standard e a quantificação relativa.

O primeiro dos casos pode-se conseguir construindo uma curva standard. Para isso, representa-se graficamente os valores de C_t frente ao \log_{10} do número inicial de cópias de uma série de quantidades conhecidas de DNA standard. Essa representação dá lugar a uma linha recta, de forma a que a quantidade de seqüências alvo presentes numa amostra desconhecida possa ser facilmente determinada a partir do seu valor C_t por interpolação sobre a curva standard.

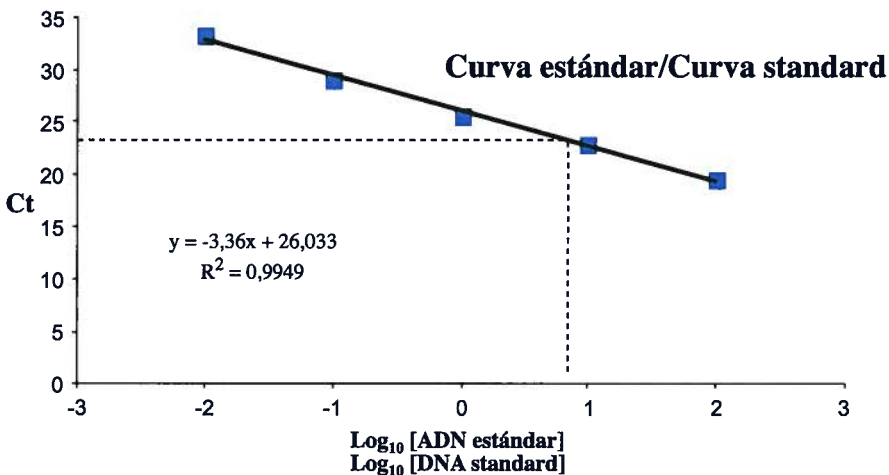


Figura 24. Cuantificación a partir de una curva estándar
Figura 24. Quantificação a partir de uma curva standard

La fórmula matemática de dicha curva estándar se obtiene al tomar logaritmos sobre la ecuación anterior:

$$\begin{aligned} \text{Log}(N_0) &= \text{Log}(N_t) - \text{Log}[(E + 1)^{C_t}] \\ \text{Log}(N_0) &= \text{Log}(N_t) - \text{Log}(E + 1) \times C_t \\ C_t \times \text{Log}(E + 1) &= -\text{Log}(N_0) + \text{Log}(N_t) \\ C_t &= -\text{Log}(N_0)/\text{Log}(E + 1) + \\ &\quad \text{Log}(N_t)/\text{Log}(E + 1) \end{aligned}$$

Assumiendo que E y N_t son constantes, esta ecuación tiene la estructura general de una recta ($y = mx + b$), de forma que cuando se representa C_t frente a $\text{Log}(N_0)$ da lugar a una recta tal como la que se muestra en la figura 24 de pendiente (S):

$$\begin{aligned} S &= -1/\text{Log}(E + 1) \\ \text{Log}(E + 1) &= -1/S \\ E + 1 &= 10^{-1/S} \end{aligned}$$

y por tanto:

$$E_s = 10^{-1/S} - 1$$

donde E_s es la estimación de la eficiencia derivada de la pendiente de la curva. De acuerdo con esta fórmula, una eficiencia de la PCR del 100% se consigue con una pendiente teórica de -3,32.

En la cuantificación relativa se pueden determinar los cambios en los niveles de expresión génica de un gen diana relativos a algún gen de referencia que sirve de control. Dicha cuantificación se realiza calculando la diferencia entre el valor C_t del gen diana y el valor C_t del gen de interés. El valor resultante es el exponente de base 2, que representa la diferencia (en número de veces) de las copias de dichos genes presentes en la muestra.

A fórmula matemática da dita curva standard obtém-se tomando logaritmos sobre a equação anterior:

$$\begin{aligned} \text{Log}(N_0) &= \text{Log}(N_t) - \text{Log}[(E + 1)^{C_t}] \\ \text{Log}(N_0) &= \text{Log}(N_t) - \text{Log}(E + 1) \times C_t \\ C_t \times \text{Log}(E + 1) &= -\text{Log}(N_0) + \text{Log}(N_t) \\ C_t &= -\text{Log}(N_0)/\text{Log}(E + 1) + \\ &\quad \text{Log}(N_t)/\text{Log}(E + 1) \end{aligned}$$

Assumindo que E e N_t são constantes, esta equação tem a estrutura geral de uma recta ($y = mx + b$), de forma que quando se representa C_t frente a $\text{Log}(N_0)$ dá lugar a uma recta tal como a que se mostra na figura 24 de pendiente (S):

$$\begin{aligned} S &= -1/\text{Log}(E + 1) \\ \text{Log}(E + 1) &= -1/S \\ E + 1 &= 10^{-1/S} \end{aligned}$$

e portanto:

$$E_s = 10^{-1/S} - 1$$

em que E_s é a estimativa da eficiência derivada da pendiente da curva. De acordo com esta fórmula, uma eficiência da PCR de 100% consegue-se com uma pendiente teórica de -3,32.

Na quantificação relativa podem-se determinar as alterações nos níveis de expressão génica de um gene alvo relativas a algum gene de referência que serve de controlo. Essa quantificação realiza-se calculando a diferença entre o valor C_t do gene alvo e o valor C_t do gene de interesse. O valor resultante é o exponente de base 2, que representa a diferença (em número de vezes) das cópias dos ditos genes presentes na amostra. Matematicamente, esse valor deriva

Matemáticamente, tal valor se deriva de las ecuaciones que definen la PCR. Para el gen diana sabemos que una vez alcanzado el ciclo umbral C_t :

$$N_D = D_0 \times (1 + E_D)^{C_t,D} = K_D$$

donde N_D es el número de moléculas en el ciclo umbral C_t , D_0 es el número inicial de moléculas, E_D es la eficiencia en la amplificación, y C_t,D es el valor de C_t del gen diana. El valor obtenido es una constante, y lo denominaremos K_D . De la misma manera, para el gen de referencia se obtiene la ecuación:

$$N_R = R_0 \times (1 + E_R)^{C_t,R} = K_R$$

Si se dividen ambas ecuaciones resulta que:

$$\frac{N_D/N_R}{K_D/K_R} = \frac{D_0 \times (1 + E_D)^{C_t,D} / R_0 \times (1 + E_R)^{C_t,R}}{K_D/K_R} = K$$

Assumiendo que las eficiencias de ambos genes son iguales e iguales a E :

$$\left(\frac{D_0}{R_0}\right) \times (1 + E)^{C_t,D-C_t,R} = K, \text{ o}$$

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta Ct} = K,$$

donde X_N es la cantidad normalizada del gen diana (D_0/R_0) y el ΔCt es la diferencia entre los valores del ciclo umbral del gen diana y del gen de referencia ($C_{t,D}-C_{t,R}$). Reordenando la ecuación se obtiene que:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta Ct}$$

Para amplicones de tamaño menores de 150 pb y en condiciones óptimas de concentraciones de $MgCl_2$ y cebadores, la eficiencia de la PCR se encuentra próxima a uno. Por tanto, la

das equações que definem a PCR. Para o gene alvo, sabemos que uma vez atingido o ciclo limiar C_t :

$$N_D = D_0 \times (1 + E_D)^{C_t,D} = K_D$$

em que N_D é o número de moléculas no ciclo umbral C_t , D_0 é o número inicial de moléculas, E_D é a eficiência na amplificação, e C_t,D é o valor de C_t do gene alvo. O valor obtido é uma constante, e denominá-lo-emos K_D . Da mesma forma, para o gene de referência obtém-se a equação:

$$N_R = R_0 \times (1 + E_R)^{C_t,R} = K_R$$

Se se dividirem ambas as equações resulta que:

$$\frac{N_D/N_R}{K_D/K_R} = \frac{D_0 \times (1 + E_D)^{C_t,D} / R_0 \times (1 + E_R)^{C_t,R}}{K_D/K_R} = K$$

Assumindo que as eficiências de ambos os genes são iguais e iguais a E :

$$\left(\frac{D_0}{R_0}\right) \times (1 + E)^{C_t,D-C_t,R} = K, \text{ ou}$$

$$X_N \times (1 + E)^{\Delta Ct} = K,$$

em que X_N é a quantidade normalizada do gene alvo (D_0/R_0) e o ΔCt é a diferença entre os valores do ciclo limiar do gene alvo e do gene de referência ($C_{t,D}-C_{t,R}$). Reordenando a equação, obtém-se que:

$$X_N = K \times (1 + E)^{-\Delta Ct}$$

Para ampliações de tamanho menor de 150 pb e em condições óptimas de concentrações de $MgCl_2$ e iniciadores, a eficiência da PCR é próxima de um. Portanto, a quantidade de gene alvo, normalizada a um gene interno de referência, é dada por $2^{-\Delta Ct}$.

cantidad de gen diana, normalizada a un gen interno de referencia, viene dada por $2^{-\Delta Ct}$.

La comparación con respecto a un gen control tiene aspectos positivos y negativos. Se debe asumir que el gen control no varía en su nivel de expresión entre las muestras estudiadas; si esto es así, los datos que se obtienen entre experimentos diferentes son comparables. Este tipo de cuantificación requiere que la eficiencia de la PCR para todos los genes sea similar, y preferiblemente por encima del 90%. Los factores que más suelen afectar a la eficiencia son la concentración de $MgCl_2$ y de cebadores, siendo siempre preferible mantener la temperatura de alineamiento constante, así como las mismas condiciones en los ciclos de la PCR.

3.3.10 Microarrays de ADN

El desarrollo de microarrays de ADN ha experimentado un auge espectacular en los últimos años en respuesta a la necesidad de analizar de forma simultánea los patrones de expresión de miles de genes al incrementarse el número de genes conocidos en muy distintos organismos, tanto de bacterias, levaduras, plantas y animales. De esta forma, los microarrays representan una enorme ventaja sobre los métodos tradicionales de análisis de expresión génica tales como northern blot, RT-PCR y protección por nucleasas, en los que solamente es posible analizar de forma simultánea un número muy limitado de genes.

En un microarray típico, las muestras de ADN (normalmente ADNc u oligonucleótidos) son depositadas mediante un sistema robotizado en áreas muy pequeñas de un sustrato, normalmen-

A comparação relativamente a um gene controlo tem aspectos positivos e negativos. Deve-se assumir que o gene controlo não varia no seu nível de expressão entre as amostras estudadas; e se é assim, os dados que se obtêm entre ensaios diferentes são comparáveis. Este tipo de quantificação requer que a eficiência da PCR para todos os genes seja similar, e de preferência superior a 90%. Os factores que mais costumam afectar a eficiência são a concentração de $MgCl_2$ e de iniciadores, sendo sempre preferível manter a temperatura de alinhamento constante, assim como as mesmas condições nos ciclos da PCR.

3.3.10 Microarrays de DNA

O desenvolvimento de microarrays de DNA experimentou um auge espectacular nos últimos anos em resposta à necessidade de analisar de forma simultânea os padrões de expressão de milhares de genes ao aumentar o número de genes conhecidos em vários organismos, tanto de bactérias, leveduras, plantas e animais. Desta forma, os microarrays representam uma enorme vantagem sobre os métodos tradicionais de análise de expressão génica tais como northern blot, RT-PCR e protecção por nucleasas, nos quais somente é possível analisar de forma simultânea um número muito limitado de genes.

Num microarray típico, as amostras de DNA (normalmente DNAc ou oligonucleótidos) são depositadas mediante um sistema robotizado em áreas muito pequenas de um substrato, normalmente portas especiais de vidro ou filtros de membrana. As amostras são posteriormente imobilizadas, de forma

te portas especiales de vidrio o filtros de membrana. Las muestras son posteriormente inmovilizadas, de forma que el microarray resultante se hibrida con una mezcla compleja de sondas marcadas con fluorescencia. Tras la hibridación, la fluorescencia se detecta utilizando un escáner láser de alta resolución. De esta manera, el patrón de expresión génica de una determinada condición experimental se puede comparar con un control para detectar posibles diferencias entre las muestras. Los microarrays se utilizan principalmente para:

- *Análisis de expresión génica.* Los patrones de expresión génica contienen mucha información desde el punto de vista biológico, en tanto en cuanto se pueden llegar a correlacionar los cambios en la expresión de los genes con cambios específicos a nivel fisiológico. Los microarrays pueden usarse por ejemplo para la detección simultánea de la expresión de muchos genes en diferentes tejidos o en diferentes estadios de desarrollo; asimismo, pueden emplearse para comparar los genes que se expresan en estados normales frente a estados patológicos; o por ejemplo, para analizar la respuesta celular frente a drogas o condiciones fisiológicas diferentes. La utilidad de los microarrays ha quedado patente en multitud de estudios de expresión génica llevados a cabo en organismos tan diferentes como levaduras, ratones o humanos. En este sentido, en levaduras se han observado cambios evidentes en los patrones de expresión a lo largo del ciclo celular. Actualmente los microarrays se están empleando también en estudios sobre el cáncer para la clasificación molecular de distintos tipos de linfomas y leucemias en el hombre.

a que o microarray resultante se hibrida com uma mistura complexa de sondas marcadas com fluorescência. Depois da hibridação, a fluorescência detecta-se utilizando um scanner laser de alta resolução. Desta maneira, o padrão de expressão gênica de uma determinada condição experimental pode comparar-se com uma amostra de controlo para detectar possíveis diferenças entra as amostras.

Os microarrays utilizam-se principalmente para:

- *Análises de expressão gênica* Os padrões de expressão gênica contém muita informação do ponto de vista biológico, tanto que se podem chegar a correlacionar as mudanças na expressão dos genes com mudanças específicas a nível fisiológico. Os microarrays podem usar-se por exemplo para a detecção simultânea da expressão de muitos genes em tecidos diferentes ou em diferentes estádios de desenvolvimento; por isso mesmo, podem empregar-se para comparar os genes que se expressam em condições normais contra condições patológicas; ou por exemplo, para analisar a resposta celular contra drogas ou condições fisiológicas diferentes. A utilidade dos microarrays ficou patente na multiplicidade de estudos de expressão gênica levados a cabo em organismos tão diferentes como levaduras, ratos ou humanos. Neste sentido, em leveduras observaram-se mudanças evidentes nos padrões de expressão ao longo do ciclo celular. Actualmente os microarrays estão a utilizar-se também em estudos sobre o cancro para a classificação molecular de diferentes tipos de linfomas e leucemias no homem.

- *Cambios a nivel del ADN genómico.* Las células tumorales suelen mostrar una elevada inestabilidad genómica, incluyendo mutaciones que provocan la ganancia de función de los oncogenes por amplificaciones o translocaciones, así como mutaciones de pérdida de función en los genes supresores de tumores debidas normalmente a mutaciones puntuales o deleciones. Tales mutaciones puntuales pueden detectarse puesto que la hibridación con las sondas es lo suficientemente sensible como para detectar SNPs.

- *Mudanças a nível do DNA genómico.* As células tumorais podem mostrar uma elevada instabilidade genómica, incluindo mutações que provocam o ganho de funções dos oncogenes por amplificações ou translocações, assim como mutações de perda de função nos genes supressores de tumores devidas normalmente a mutações pontuais ou deleções. Tais mutações pontuais podem detectar-se visto que a hibridação com sondas é suficientemente sensível para detectar SNPs.

BIBLIOGRAFÍA PARTE I

Fundamentals of Molecular Evolution (1999). Graur D y Li W-H. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, USA.

Principles of population genetics (1997). Hartl D y Clark A. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, USA.

Molecular Evolution (1997). Li W-H. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, Massachusetts, USA.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. **Análisis of relative gene expresión data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.** Methods 25: 402-408.

User Bulletin 2. **ABI PRISM 7700 Sequence detection system. Relative Quantitation of gene expresión.** 2001. Applied Biosystems.

Wilkening S, Bader A. 2004. **Quantitative real-time polymerase chain reaction: methodical analysis and mathematical model.** J. Biomol. Tech. 15: 107-111.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. 2006. **The real-time polymerase chain reaction.** Mol. Aspects Med. 27: 95-125.

Liu ZJ, Cordes JF. 2004. **DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics.** Aquaculture 238: 1-37.

Scheffe JH, Lehmann KE, Buschmann IR, Unger T, Funke-Kaiser H. 2006. **Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expresión's C (T) difference" formula.** J. Mol. Med. 84: 901-910.

**PARTE II: APLICACIÓN EN EL
ESTUDIO DE LA ESPECIE *Auxis
rochei***

**PARTE II: APLICAÇÃO NO ESTUDO
DA ESPÉCIE *Auxis rochei***

... and the ...

... and the ...

4.1. Introducción

Tras haber analizado en una primera parte los aspectos teóricos sobre la diversidad genética y los tipos de marcadores moleculares, sus ventajas e inconvenientes así como sus principales aplicaciones, en esta segunda parte del manual se mostrará cómo dichos marcadores moleculares son útiles para resolver importantes cuestiones a nivel de filogenia y taxonomía, diferenciación poblacional, e identificación de especies. Para ello, nos vamos a centrar en el análisis de los resultados obtenidos para distintos marcadores moleculares en el caso particular de la especie *Auxis rochei* (Fig. 25), conocida comúnmente como melva.

El género *Auxis* es hoy en día uno de los de mayor importancia dentro del sector pesquero mundial. En este sentido, basta decir que en el año 1996 las capturas totales fueron superiores a 172.000 Tm (Estadísticas Pesqueras de la FAO). España, y en particular Andalucía, posee una gran tradición pesquera de melva, con un desembarco de cerca de 8.000 Tm en los puertos pesqueros andaluces entre los años 1995 y 2002 (Estadísticas Pesqueras de la Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía).

4.1. Introdução

Depois de ter analisado numa primeira parte os aspectos teóricos sobre a diversidade genética e os tipos de marcadores moleculares, as suas vantagens e inconvenientes assim como as suas principais aplicações, nesta segunda parte do manual mostrar-se-á como é que tais marcadores moleculares são úteis para resolver importantes questões a nível de filogenia e taxonomia, diferenciação populacional, e identificação de espécies. Para tal, vamos centrar-nos na análise dos resultados obtidos para distintos marcadores moleculares no caso particular da espécie *Auxis rochei* (Fig. 25), conhecida comumente como judeu.

O género *Auxis* é, hoje em dia, um dos mais importantes dentro do sector da pesca mundial. Neste sentido, basta dizer que no ano de 1996 as capturas totais foram superiores a 172000 Tm (Estatísticas de pesca da FAO). Espanha, e em particular a Andaluzia, possui uma grande tradição pesqueira de judeu, com um desembarque de cerca de 8000 Tm nos portos pesqueiros andaluces entre os anos 1995 e 2002 (Estatísticas de Pesca da Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía).

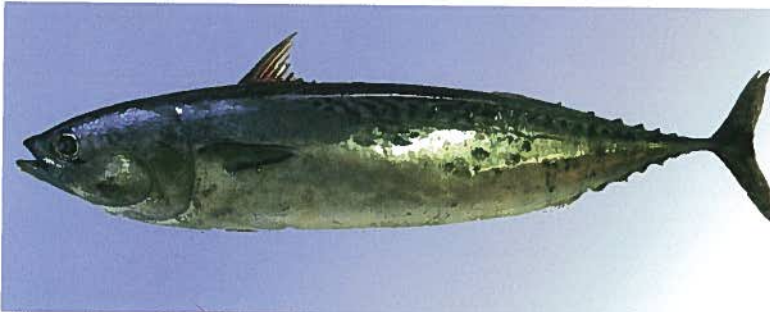


Figura 25: Individuo de *A. rochei*
Figura 25: Individuo de *A. rochei*

Durante años, ha existido una controversia sobre la existencia de dos especies diferentes de melva dentro del género *Auxis*. En la actualidad, la FAO, apoyada por los últimos trabajos científicos (Collette y Aadland, 1996; Collette et al., 2001), acepta la existencia de dos especies distintas: *Auxis thazard* (Lacépède, 1802) y *A. rochei* (Risso, 1810). Ambas especies se diferencian fundamentalmente en la anchura del corselete, más estrecho en *A. thazard*, y en la longitud de la aleta pectoral, que en *A. thazard* alcanza el comienzo de la zona sin escamas por encima del corselete mientras que en *A. rochei* no alcanza este punto (Collette y Aadland, 1996). Asimismo, el estudio detallado de diversos caracteres morfológicos ha servido para diferenciar dos subespecies dentro de *A. rochei*: *A. rochei rochei*, distribuida por los Océanos Atlántico, Índico y Pacífico, incluyendo el Mar Mediterráneo, y *Auxis rochei eudorax*, localizada en la región oriental del Océano Pacífico (Collette y Aadland, 1996). Dentro de la especie *A. thazard* también se han diferenciado dos subespecies distintas: *A. thazard thazard*, distribuida por los Océanos Atlántico, Índico y Pacífico, y *A. thazard brachydorax*, en la región oriental del Océano Pacífico (Collette y Aadland, 1996).

Durante anos, existiu uma controvérsia sobre a existência de duas espécies diferentes de judeu dentro do género *Auxis*. Actualmente, a FAO, apoiada pelos últimos trabalhos científicos (Collette e Aadland, 1996; Collette et al., 2001), aceita a existência de duas espécies diferentes: *Auxis thazard* (Lacépède, 1802) e *A. rochei* (Risso, 1810). Ambas as espécies se diferenciam fundamentalmente na largura do corselete, mais estreito no *A. thazard*, e na longitude da aleta peitoral, que no *A. thazard* alcança o começo da zona sem escamas por cima do corselete, enquanto que no *A. rochei* não alcança este ponto (Collette e Aadland, 1996). Mesmo assim, o estudo detalhado de diversos caracteres morfológicos serviu para diferenciar duas subespécies dentro do *A. rochei*: *A. rochei rochei*, distribuída pelo Oceano Atlântico, Índico e Pacífico, incluindo o Mar Mediterrâneo, e *Auxis rochei eudorax*, localizada na região oriental do Oceano Pacífico (Collette e Aadland, 1996). Dentro da espécie *A. thazard* também se diferenciaram duas subespécies diferentes: *A. thazard thazard*, distribuída pelo Oceano Atlântico, Índico e Pacífico, e *A. thazard brachydorax*, na região oriental do Oceano Pacífico (Collette e Aadland, 1996).

4.2.- Caracterización del ADN mitocondrial en el género *Auxis* y aplicación al establecimiento de las relaciones filogenéticas entre distintas especies de escómbridos.

El ADN mitocondrial (ADNmt) se emplea normalmente en los estudios de evolución molecular debido a su gran abundancia en la célula, su alta tasa de mutación, y a su herencia de tipo materno (Curolle and Kocher, 1999). En los vertebrados, el ADNmt codifica para un conjunto de 13 proteínas, 22 RNA de transferencia (RNAt) y 2 RNA ribosómicos (ARNr). Presenta además una región no codificante de gran tamaño en la que se localizan elementos reguladores implicados en los procesos de replicación y transcripción (Sbisà et al., 1997; Boore, 1999). En los últimos años se han obtenido grandes avances en el conocimiento de la secuencia completa del ADNmt (mitogenoma) de muy diversos organismos. En teleósteos, se puede citar a modo de ejemplo las especies *Gadus morhua* (Johansen y Bakke, 1996), *Danio rerio* (Broughton et al., 2001), *Salmo salar* (Hurst et al., 1999), o *Thunnus thynnus* (Manchado et al., 2004). En todos ellos hay que destacar la conservación del contenido y organización genómica del ADNmt. Las secuencias de los mitogenomas han mostrado tener gran valor para la resolución de controversias existentes sobre el origen filogenético de especies de teleósteos (Inoue et al., 2001; Miya et al., 2001; Lavoue et al., 2005).

Dentro de la especie *A. rochei*, una característica muy interesante es la

4.2.- Caracterização do DNA mitocondrial no género *Auxis* e aplicação no estabelecimento das relações filogenéticas entre diferentes espécies de escombrídeos

O DNA mitocondrial (DNAm_t) emprega-se normalmente nos estudos de evolução molecular devido à sua grande abundância na célula, à sua alta taxa de mutação, e à sua herança de tipo materno (Curolle and Kocher, 1999). Nos vertebrados, o DNAm_t codifica para um conjunto de 13 proteínas, 22 RNA de transferência (RNAt) e 2 RNA ribossómicos (RNAr). Apresenta, além disso, uma região não codificante de grande tamanho na qual se localizam elementos reguladores implicados nos processos de replicação e transcrição (Sbisà et al., 1997; Boore, 1999). Nos últimos anos obtiveram-se grandes avanços no conhecimento da sequência completa do DNAm_t (metagenoma) de organismos muito diversos. Em teleósteos, podem citar-se a título de exemplo as espécies *Gadus morhua* (Johansen e Bakke, 1996), *Danio rerio* (Broughton et al., 2001), *Salmo salar* (Hurst et al., 1999), ou *Thunnus thynnus* (Manchado et al., 2004). Em todos eles há a destacar a conservação do conteúdo e organização genómica do DNAm_t. As sequências dos metagenomas mostraram ter grande valor para a resolução de controversias existentes sobre a origem filogenética de espécies de teleósteos (Inoue et al., 2001; Miya et al., 2001; Lavoue et al., 2005).

Dentro da espécie *A. rochei*, uma característica muito interessante é a existência de duas linhagens mitocon-

existencia de dos linajes mitocondriales distintos: Mitotipo I (Mit I), presente exclusivamente en individuos de las áreas atlántica y mediterránea, y Mitotipo II (Mit II), detectado en animales tanto del Atlántico como del Pacífico (Mit II Pac) (Infante et al., 2004). Recientemente se ha llevado a cabo la caracterización de los genomas mitocondriales completos de *A. thazard* y de los dos mitotipos de *A. rochei* (Catanese et al., 2007a). Los tamaños de estos mitogenomas son de 16.501 pb para el Mitotipo I de *A. rochei* (Número de acceso: AB103467), 16.503 pb para el Mitotipo II de ambas procedencias geográficas (AB103468 y AB105165), y 16.506 pb para *A. thazard* (AB105447). Todos estos valores se ajustan a los ya descritos para los genomas mitocondriales de otros escómbridos y teleósteos (Miya et al., 2001; Manchado et al., 2005). Los cuatro mitogenomas presentan una disposición de genes y regiones no codificantes de acuerdo con el modelo general de vertebrados (Fig. 26). Dichos mitogenomas están compuestos por 13 genes codificantes de la cadena de transporte electrónico y fosforilación oxidativa que incluye el citocromo *b* del complejo de la ubiquinol citocromo *c* oxidoreductasa, las subunidades COI, COII y COIII del complejo de la citocromo *c* oxidasa, las subunidades ATP6 y ATP8 de la ATP sintasa, y 7 subunidades del complejo de la NADH ubiquinona oxidoreductasa (ND1, ND2, ND3, N4, ND4L, ND5, ND6). Además posee dos ARNr, dos regiones no codificantes y 22 ARNt repartidos a lo largo del genoma mitocondrial y que parece que actúan como señales de maduración para los transcritos mitocondriales. Asimismo, se han identificado 5 genes codifican-

driales diferentes: Genótipo I (Mit I), presente exclusivamente en individuos de la área atlántica e mediterránea, e Genótipo II (Mit II), detectado en animales tanto do Atlântico como do Pacífico (Mit II Pac) (Infante et al., 2004). Recientemente levou-se a cabo a caracterização dos genomas mitocondriais completos de *A. thazard* e dos dois genótipos de *A. rochei* (Catanese et al., 2007). Os tamanhos destes metagenomas são de 16501 pb para o Genótipo I de *A. rochei* (Número de acesso: AB103467), 16503 pb para o Genótipo II de ambas procedências geográficas (AB103468 e AB105165), e 16506 pb para o *A. thazard* (AB105447). Todos estes valores se ajustam aos anteriormente descritos para os genomas mitocondriais de outros escombrídeos e teleósteos (Miya et al., 2001; Manchado et al., 2005). Os quatro metagenomas apresentam uma disposição de genes e regiões não codificantes de acordo com o modelo geral de vertebrados (Fig. 26). Tais metagenomas estão compostos por 13 genes codificantes da cadeia de transporte electrónico e fosforilação oxidativa que inclui o citocromo *b* do complexo da ubiquinol citocromo *c* oxidoreductase, as subunidades COI, COII e COIII do complexo do citocromo *c* oxidase, as subunidades ATP6 e ATP8 da ATP sintase, e 7 unidades do complexo da NADH ubiquinona oxidoreductase (ND1, ND2, ND3, N4, ND4L, ND5, ND6). Além disso, possui dois RNAr, duas regiões não codificantes e 22 RNAt repartidos ao longo do genoma mitocondrial e que parece que actuam como sinais de maturação para os transcritos mitocondriais. Mesmo assim, foram identificados 5 genes codificantes com regiões ocultas: a ATPase8 que partilha 10 bases com a

tes con regiones solapantes: la ATPasa8 que comparte 10 bases con la ATPasa6; la ATPasa6, 1 base con la COII; la ND4L, 7 bases con la ND4, y la ND5 4 bases con la ND6.

Entre el mitogenoma de *A. thazard* y los mitotipos de *A. rochei* existen 761 (Mitotipo I), 764 (Mitotipo II) y 773 (Mitotipo II Pac) posiciones polimórficas. Al comparar los Mitotipos I y II de *A. rochei* dicho número se reduce a 293 posiciones polimórficas. Además, la ratio transiciones (Ti) y transversiones (Tv) oscila entre 13'35 para el Mitotipo I y II Pac, y 6'53 entre el Mitotipo I y el mitogenoma de *A. thazard* (Tabla 1).

ATPase6; a ATPase6, 1 base com a COII; a ND4L, 7 bases com a ND4, e a ND5 4 bases com a ND6.

Entre o genótipo de *A. thazard* e os genótipos de *A. rochei* existem 761 (Genótipo I), 764 (Genótipo II) e 773 (Genótipo II Pac) posições polimórficas. Ao comparar os genótipos I e II de *A. rochei* tal número reduz-se a 293 posições polimórficas. Além disso, o rácio transições (Ti) e transversões (Tv) oscila entre 13,35 para o Genótipo I e II Pac, e 6,53 entre o Genótipo I e o metagenoma de *A. thazard* (Tabela I).

	Ti			Tv								Ti/Tv ratio
	AG	CT	AC	AT	CG	GT	AA	CC	GG	TT		
<i>A. rochei</i> mitotipo I vs. <i>A. rochei</i> mitotipo II	105	125	6	10	2	3	4544	4879	2767	4053	10'95	
<i>A. rochei</i> mitotipo I vs. <i>A. rochei</i> mitotipo II Pac	103	124	6	8	2	1	4551	4877	2766	4062	13'35	
<i>A. rochei</i> mitotipo I vs. <i>A. thazard</i>	274	386	36	45	12	8	4424	4730	2681	3900	6'53	
<i>A. rochei</i> mitotipo II vs. <i>A. rochei</i> mitotipo II Pac	36	45	5	4	0	1	4576	4919	2809	4101	8'10	
<i>A. rochei</i> mitotipo II vs. <i>A. thazard</i>	290	378	39	42	8	7	4409	4739	2684	3904	6'96	
<i>A. rochei</i> mitotipo II Pac vs. <i>A. thazard</i>	290	382	43	40	8	10	4410	4728	2679	3908	6'65	

Tabla 1: Número de transiciones (Ti), transversiones (Tv), posiciones coincidentes y ratio Ti/Tv entre los mitogenomas de mitotipo I, II y II Pacífico de *A. rochei* y *A. thazard*.

Tabela 1: Número de transições (Ti), transversões (Tv), posições coincidentes e rácio Ti/Tv entre os metagenomas de genótipo I, II e II Pacífico de *A. rochei* e *A. thazard*.

Todos los genes codificantes de proteínas presentan el codón inicial ATG tanto en *A. rochei* como en *A. thazard*, excepto COI que empieza por GTG. El codón de terminación, en todos los casos, es TAA excepto en ND3 y ND6 (TAG), y los genes COII, ND4 y citocromo *b* que terminan en T. En este último caso, el codón de terminación TAA se forma probablemente mediante poliadenilación post-transcripcional, ya que las regiones flanqueantes, representadas por ARNt, no presentan nucleótidos que puedan codificar un codón de terminación (Clayton, 1984).

En la Tabla 2 se indica la composición de bases de la cadena ligera en los mitogenomas de *Thunnus thynnus* (AB097669), *Thunnus alalunga* (AB101291), *Katsuwonus pelamis* (AB101290), *Euthynnus alletteratus* (AB099716), *Engraulis japonicus* (AB040676), *Salmo salar* (U12143) y *Danio rerio* (AC024175). En todos los casos se observa que la base más abundante es C, y se detecta igualmente un sesgo frente a G, típico de los vertebrados para todos los genes codificantes de proteínas, excepto la ND6. El contenido de G+C en los mitogenomas de *Auxis* oscila entre el 47,9 y 48,2%, siendo así los mayores entre las especies de túnidos aquí representadas. Los valores de contenido G+C se han relacionado con la temperatura del agua en el área de distribución geográfica de cada especie (Wang and Hickey 2002; Nakashima et al. 2003; Manchado et al., 2007). Por ello, los altos valores observados para la melva se podría relacionar con su distribución en áreas cálidas.

Todos os genes codificantes de proteínas apresentam o codão inicial ATG tanto em *A. rochei* como em *A. thazard*, excepto COI que começa por GTG. O codão de terminação, em todos os casos, é TAA excepto em ND3 e ND6 (TAG), e os genes COII, ND4 e citocromo *b* que terminam em T. Neste último caso, o codão de terminação TAA forma—se provavelmente mediante poliadenilação pós-transcripcional, visto que as regiões flanqueantes, representadas por RNAt, não apresentam nucleótidos que possam codificar um codão de terminação (Clayton, 1984).

Na Tabela 2 indica-se a composição de bases da cadeia simples nos metagenomas de *Thunnus thynnus* (AB097669), *Thunnus alalunga* (AB101291), *Katsuwonus pelamis* (AB101290), *Euthynnus alletteratus* (AB099716), *Engraulis japonicus* (AB040676), *Salmo salar* (U12143) e *Danio rerio* (AC024175). Em todos os casos se observa que a base mais abundante é C, e detecta-se igualmente um desvio em relação a G, típico dos vertebrados para todos os genes codificantes de proteínas, excepto a ND6. O conteúdo de G+C nos metagenomas de *Auxis* oscila entre 47,9 e 48,2%, sendo assim os maiores entre as espécies de tunídeos aqui representadas. Os valores de conteúdo G+C foram relacionados com a temperatura da água na área de distribuição geográfica de cada espécie (Wang and Hickey 2002; Nakashima et al. 2003; Manchado et al., 2007). Por este motivo, os altos valores observados no caso do judeu poderiam relacionar-se com a sua distribuição em áreas quentes.

	A	C	G	T
<i>A. rochei</i> mitotipo I	26%	32'1%	15'8%	26'1%
<i>A. rochei</i> mitotipo II	26%	32'1%	15'9%	26%
<i>A. rochei</i> mitotipo II Pac	26%	32%	15'9%	26'1%
<i>A. thazard</i>	25'8%	32'2%	16%	26%
<i>T. thynnus</i>	26'2%	30'5%	16'1%	27'2%
<i>T. alalunga</i>	26'6%	31'4%	15'4%	26'6%
<i>K. pelamis</i>	26'8%	32'6%	15'2%	25'4%
<i>E. alletteratus</i>	26'5%	31'5%	15'6%	26'4%
<i>E. japonicus</i>	24'8%	27'8%	18'2%	29'2%
<i>S. salar</i>	28'5%	29%	16'2%	26'3%
<i>D. rerio</i>	30%	24%	15%	31%

Tabla 2: Composición media de bases de genes codificantes de proteínas. Para comparar se incluyen los datos de *T. thynnus*, *T. alalunga*, *K. pelamis*, *E. alletteratus*, *E. japonicus*, *S. salar* y *D. rerio*.
Tabela 2: Composição média de bases de genes codificantes de proteínas. Para comparar incluem-se os dados de *T. thynnus*, *T. alalunga*, *K. pelamis*, *E. alletteratus*, *E. japonicus*, *S. salar* y *D. rerio*.

Cuando se analiza la composición por genes (Tabla 3), se observa que la base G en la tercera posición presenta valores medios comprendidos entre el 5 y el 12%. El sesgo máximo en la primera base de los genes codificados en la cadena pesada corresponde a un valor de 0'2 para la ATPasa6. La ND6 presenta un sesgo de 0'3, con un contenido mínimo de C y A, y máximo de G (43'7%). La segunda base en todos los genes es rica en T. El valor máximo de sesgo se alcanza también en el gen ATPasa6, con un valor de 0'33. El valor de sesgo mínimo (0'15) se encuentra en este caso en el gen COIII. En la tercera posición cabe destacar el escaso contenido en G (a excepción de la ND6 con un 29'6%). El mayor sesgo se detecta en el gen ATPasa8 (0'4) y el menor (0'22) en el gen COI. El sesgo complementario se mantiene en la ND6, único gen codificado en la cadena ligera, en el cual la base C está presente con una frecuencia del 15'6%.

Quando se analisa a composição por genes (Tabela 3), observa-se que a base G na terceira posição apresenta valores médios compreendidos entre 5 e 12%. O desvio máximo na primeira base dos genes codificados na cadeia pesada corresponde a um valor de 0,2 para a ATPase6. A ND6 apresenta um desvio de 0,3, com um conteúdo mínimo de C e A, e máximo de G (43,7%). A segunda base em todos os genes é rica em T. O valor máximo de desvio alcança-se também no gene ATPase6, com um valor de 0,33. O valor de desvio mínimo (0,15) encontra-se, neste caso, no gene COIII. Na terceira posição cabe destacar o escasso conteúdo em G (à exceção da ND6 com 29,6%). O maior desvio detecta-se no gene ATPase8 (0,4) e o menor (0,22) no gene COI. O desvio complementar mantém-se na ND6, único gene codificado na cadeia simples, no qual a base C está presente com uma frequência de 15,6%.

	TOTAL				1ª BASE				2ª BASE				3ª BASE			
ATPasa6	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	27'5	33'5	25'1	13'9	13'6	36'8	28'5	21'1	47'8	27'2	14	11	21'1	36'4	32'9	9'6
<i>A. rochei</i> mito II	27'6	33'3	25'3	13'7	13'6	36'8	28'5	21'1	47'8	27'2	14	11	21'5	36	33'3	9'2
<i>A. rochei</i> mito II Pac	27'6	33'3	25'4	13'6	13'6	36'8	28'5	21'1	47'8	27'2	14	11	21'5	36	33'8	8'8
<i>A. thazard</i>	27'2	33'2	25'4	14'2	13'2	37'3	28'5	21'1	47'8	27'2	14	11	20'6	35'1	33'8	10'5
Media	27'5	33'3	25'3	13'9	13'5	37	28'5	21'1	47'8	27'2	14	11	21'2	35'9	33'4	9'5
SD	0'058	0'058	0'141	0'082	0'096	0'082	0'050	0'100	0'222	0'287	0'050	0'050	0'171	5'434	0'250	0'222
C		0'1483				0'2055				0'3333				0'2575		
ATPasa8	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	22	35'1	30'4	12'5	21'4	33'9	25	19'6	30'4	32'1	25	12'5	14'3	39'3	41'1	5'4
<i>A. rochei</i> mito II	22	35'1	30'4	12'5	21'4	33'9	25	19'6	30'4	32'1	25	12'5	14'3	39'3	41'1	5'4
<i>A. rochei</i> mito II Pac	22	35'1	30'4	12'5	21'4	33'9	25	19'6	30'4	32'1	25	12'5	14'3	39'3	41'1	5'4
<i>A. thazard</i>	22	35'1	30'4	12'5	21'4	33'9	25	19'6	30'4	32'1	25	12'5	14'3	39'3	41'1	5'4
Media	22	35'1	30'4	12'5	21'4	33'9	25	19'6	30'4	32'1	25	12'5	14'3	39'3	41'1	5'4
SD	0'058	0'058	0'141	0'082	0'096	0'082	0'050	0'100	0'222	0'287	0'050	0'050	0'171	5'434	0'250	0'222
C		0'207				0'119				0'167				0'405		
COI	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	28'4	27'7	25'3	18'6	20'5	22'6	24'8	32'1	40'8	26'3	18	14'9	24	34	33'3	8'7
<i>A. rochei</i> mito II	28'4	27'6	25'4	18'6	20'5	22'6	24'8	32'1	40'8	26'3	18	14'9	24	33'8	33'5	8'7
<i>A. rochei</i> mito II Pac	28'5	27'5	25'3	18'6	20'5	22'6	24'8	32'1	40'8	26'3	18	14'9	24'2	33'7	33'3	8'9
<i>A. thazard</i>	28'2	28	25	18'8	20'3	22'8	24'8	32'1	40'8	26'3	18	14'9	23'6	35	32'1	9'3
Media	28'4	27'7	25'3	18'6	20'5	22'7	24'8	32'1	40'8	26'3	18	14'9	23'9	34'1	33	8'9
SD	0'058	0'058	0'141	0'082	0'096	0'082	0'050	0'100	0'222	0'287	0'050	0'050	0'171	5'434	0'250	0'222
C		0'085				0'095				0'228				0'229		
COII	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	26'8	28'1	28'9	16'2	17'7	28'1	23'4	30'7	37'8	23'5	27'8	10'9	24'8	32'6	35'7	7
<i>A. rochei</i> mito II	26'8	28'1	28'9	16'2	17'7	28'1	23'4	30'7	37'8	23'5	27'8	10'9	24'8	32'6	35'7	7
<i>A. rochei</i> mito II Pac	26'9	27'9	28'9	16'2	17'7	28'1	23'4	30'7	38'3	23	27'8	10'9	24'8	32'6	35'7	7
<i>A. thazard</i>	26'9	27'8	28'7	16'6	17'7	28'1	23'4	30'7	37'8	23'5	27'8	10'9	25'2	31'7	34'8	8'3
Media	26'8	28	28'9	16'3	17'7	28'1	23'4	30'7	37'9	23'4	27'8	10'9	24'9	32'4	35'4	7'3
SD	0'058	0'058	0'141	0'082	0'096	0'082	0'050	0'100	0'222	0'287	0'050	0'050	0'171	5'434	0'250	0'222
C		0'12				0'12				0'21				0'24		
COIII	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	25'7	31'4	25'7	17'2	24'4	26'7	19'5	29'4	35'4	26	21'4	17'2	17'2	41'6	36'3	5
<i>A. rochei</i> mito II	25'2	31'9	25'8	17	24'4	26'7	19'5	29'4	35'4	26	21'4	17'2	15'6	43'1	36'6	4'6
<i>A. rochei</i> mito II Pac	25'2	31'9	25'7	17'2	24'4	26'7	19'5	29'4	35'4	26	21'4	17'2	15'6	43'1	36'3	5
<i>A. thazard</i>	26'1	31'2	25'4	17'3	24'4	26'7	19'5	29'4	35'4	26	21'4	17'2	18'3	40'8	35'5	5'3
Media	25'5	31'6	25'7	17'2	24'4	26'7	19'5	29'4	35'4	26	21'4	17'2	16'7	42'2	36'2	5
SD	0'06	0'06	0'14	0'08	0'10	0'08	0'05	0'10	0'22	0'29	0'05	0'05	0'17	5'43	0'25	0'22
C		0'10				0'08				0'15				0'38		
cytb	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	26'5	33	25	15'6	23'6	26'8	23'1	26'5	40'5	26'6	19'2	13'7	15'3	45'5	32'6	6'6
<i>A. rochei</i> mito II	26'4	33	24'9	15'8	23'9	26'5	23'1	26'5	40'5	26'6	19'5	13'4	14'7	45'8	32'1	7'4
<i>A. rochei</i> mito II Pac	26'7	32'6	24'9	15'8	23'9	26'5	23'1	26'5	40'5	26'6	19'5	13'4	15'8	44'7	32'1	7'4
<i>A. thazard</i>	26'8	32'8	25	15'4	23'6	26'8	23'1	26'5	40'3	26'8	19'5	13'4	16'6	44'7	32'4	6'3
Media	26'6	32'8	24'9	15'6	23'8	26'6	23'1	26'5	40'5	26'6	19'4	13'5	15'6	45'2	32'3	6'9
SD	0'06	0'06	0'14	0'08	0'10	0'08	0'05	0'10	0'22	0'29	0'05	0'05	0'17	5'43	0'25	0'22
C		0'13				0'04				0'23				0'37		
ND1	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	26'8	32'7	24'1	16'4	18'5	30'5	23'7	27'4	41'2	30'2	17'5	11'1	20'6	37'5	31'1	10'8
<i>A. rochei</i> mito II	26'4	33'2	24	16'4	18'2	30'8	23'7	27'4	41'2	30'2	17'5	11'1	19'7	38'8	30'8	10'8
<i>A. rochei</i> mito II Pac	26'5	33	24'3	16'2	18'5	30'5	23'7	27'4	41'2	30'2	17'5	11'1	19'7	38'5	31'7	10'2
<i>A. thazard</i>	25'6	33'7	24'9	15'7	17'8	31'1	24	27'1	41'2	30'2	17'5	11'1	17'8	40	33'2	8'9
Media	26'3	33'2	24'3	16'2	18'2	30'7	23'8	27'3	41'2	30'2	17'5	11'1	19'5	38'7	31'7	10'2
SD	0'06	0'06	0'14	0'08	0'10	0'08	0'05	0'10	0'22	0'29	0'05	0'05	0'17	5'43	0'25	0'22
C		0'13				0'11				0'29				0'27		

MARCADORES MOLECULARES
MARCADORES MOLECULARES

ND2	TOTAL				1ª BASE				2ª BASE				3ª BASE			
	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	24'3	33'7	27'6	14'4	16	32'1	28'9	22'9	38'1	35'2	15'8	10'9	18'6	33'8	38'1	9'5
<i>A. rochei</i> mito II	24	34	27'1	14'9	15'8	32'4	28'9	22'9	38'1	35'2	15'8	10'9	18'1	34'4	36'7	10'9
<i>A. rochei</i> mito II Pac	24	34	27	15	15'8	32'4	28'9	22'9	38'1	35'2	15'8	10'9	18'1	34'4	36'4	11'2
<i>A. thazard</i>	23'6	34'5	26'5	15'5	15'2	33	28'9	22'9	38'1	35'2	15'8	10'9	17'5	35'2	34'7	12'6
Media	23'9	34	27'1	14'9	15'7	32'4	28'9	22'9	38'1	35'2	15'8	10'9	18'1	34'5	36'5	11
SD	0'06	0'06	0'14	0'08	0'10	0'08	0'05	0'10	0'22	0'29	0'05	0'05	0'17	5'43	0'25	0'22
C		0'15				0'15				0'31				0'28		
ND3	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	27'2	34'7	22'1	16	24'8	32'5	16'2	26'5	43'1	29'3	14'7	12'9	13'8	42'2	35'3	8'6
<i>A. rochei</i> mito II	27'2	34'7	21'8	16'3	24'8	32'5	16'2	26'5	43'1	29'3	14'7	12'9	13'8	42'2	34'5	9'5
<i>A. rochei</i> mito II Pac	27'2	34'4	21'8	16'6	24'8	31'6	16'2	27'4	43'1	29'3	14'7	12'9	13'8	42'2	34'5	9'5
<i>A. thazard</i>	26'9	34'4	21'8	16'9	23'9	33'3	17'1	25'6	44	28'4	14'7	12'9	12'9	41'4	33'6	12'1
Media	27'1	34'5	21'8	16'5	24'6	32'5	16'5	26'5	43'3	29'1	14'7	12'9	13'6	42	34'5	9'9
SD	0'06	0'06	0'14	0'08	0'10	0'08	0'05	0'10	0'22	0'29	0'05	0'05	0'17	5'43	0'25	0'22
C		0'16				0'12				0'30				0'35		
ND4	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	25'3	32'7	26	16	17'8	32'5	28'2	21'5	41'1	27'6	15'9	15'4	17'2	37'8	33'9	11'1
<i>A. rochei</i> mito II	25'3	32'6	26'1	15'9	17'4	33	28'2	21'5	41'1	27'6	15'9	15'4	17'6	37'2	34'3	10'9
<i>A. rochei</i> mito II Pac	25'4	32'5	26'1	15'9	17'6	32'8	28'2	21'5	41'1	27'6	15'9	15'4	17'6	37'2	34'3	10'9
<i>A. thazard</i>	25	33'3	25'9	15'8	18'4	32'1	27'8	21'7	41'1	27'6	16'1	15'2	15'4	40'2	33'9	10'4
Media	25'3	32'8	26	15'9	17'8	32'6	28'1	21'5	41'1	27'6	15'9	15'4	17	38'1	34'1	10'8
SD	0'06	0'06	0'14	0'08	0'10	0'08	0'05	0'10	0'22	0'29	0'05	0'05	0'17	5'43	0'25	0'22
C		0'12				0'14				0'25				0'30		
ND4L	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	26'6	35'7	21'5	16'2	25'3	31'3	21'2	22'2	39'4	32'3	14'1	14'1	15'2	43'4	29'3	12'1
<i>A. rochei</i> mito II	26'6	36	21'5	15'8	25'3	31'3	21'2	22'2	39'4	32'3	14'1	14'1	15'2	44'4	29'3	11'1
<i>A. rochei</i> mito II Pac	26'6	36	21'5	15'8	25'3	31'3	21'2	22'2	39'4	32'3	14'1	14'1	15'2	44'4	29'3	11'1
<i>A. thazard</i>	25'9	37	20'2	16'8	24'2	32'3	21'2	22'2	39'4	32'3	14'1	14'1	14'1	46'5	25'3	14'1
Media	26'4	36'2	21'2	16'2	25	31'6	21'2	22'2	39'4	32'3	14'1	14'1	14'9	44'7	28'3	12'1
SD	0'06	0'06	0'14	0'08	0'10	0'08	0'05	0'10	0'22	0'29	0'05	0'05	0'17	5'43	0'25	0'22
C		0'17				0'09				0'29				0'31		
ND5	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	24'7	33'4	27'8	14'1	17'8	26'8	33'1	22'3	39'2	29'2	19'7	11'9	17'1	44'4	30'5	8
<i>A. rochei</i> mito II	24'9	33'2	27'5	14'4	17'5	27'1	33	22'5	39'3	29	19'7	11'9	17'8	43'6	29'9	8'8
<i>A. rochei</i> mito II Pac	25	33'2	27'7	14'1	17'6	26'9	33	22'5	39'3	29	19'7	11'9	18'1	43'7	30'3	7'8
<i>A. thazard</i>	25'4	32'7	27'5	14'4	17'5	27'1	32'5	23	39'2	29'2	19'7	11'9	19'7	41'8	30'2	8'3
Media	25	33'1	27'6	14'2	17'6	27	32'9	22'6	39'2	29'1	19'7	11'9	18'2	43'4	30'2	8'2
SD	0'06	0'06	0'14	0'08	0'10	0'08	0'05	0'10	0'22	0'29	0'05	0'05	0'17	5'43	0'25	0'22
C		0'14				0'13				0'25				0'31		
ND6	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
<i>A. rochei</i> mito I	36'2	15'3	16'9	31'6	29'9	13'2	13'2	43'7	44'8	20'7	12'1	22'4	33'9	12'1	25'3	28'7
<i>A. rochei</i> mito II	36	15'7	16'5	31'8	28'7	14'4	13'2	43'7	44'8	20'7	12'1	22'4	34'5	12'1	24'1	29'3
<i>A. rochei</i> mito II Pac	36'2	15'5	16'9	31'4	29'3	13'8	13'2	43'7	44'8	20'7	12'1	22'4	34'5	12'1	25'3	28'2
<i>A. thazard</i>	35'8	15'7	15'7	32'8	28'7	14'4	13'2	43'7	44'8	20'7	12'1	22'4	33'9	12'1	21'8	32'2
Media	36'1	15'6	16'5	31'9	29'2	13'9	13'2	43'7	44'8	20'7	12'1	22'4	34'2	12'1	24'1	29'6
SD	0'06	0'06	0'14	0'08	0'10	0'08	0'05	0'10	0'22	0'29	0'05	0'05	0'17	5'43	0'25	0'22
C		0'24				0'30				0'26				0'19		

Tabla 3: Composición nucleotídica de los diferentes genes codificantes de proteínas para el gen completo y la primera, segunda y tercera base. Se indica la media, desviación estándar (SD) y sesgo (C).
Tabela 3: Composição nucleotídica dos diferentes genes codificantes de proteínas para o gene completo e a primeira, segunda e terceira base. É indicada a média, o desvio padrão (SD) e o desvio (C).

Si se consideran solamente los genes codificantes de proteínas, el 15% de los sitios polimórficos se localizan en la primera base del codón, el 19% en la segunda y el 65% en la tercera base del codón. Para la 1ª posición del codón, el número de transiciones varía entre 7 y 21 entre los distintos mitotipos de *A. rochei*, y entre 95 y 103 cuando éstos se comparan con *A. thazard* (Fig. 27). Sólo se observan 9 transversiones al comparar *A. thazard* con *A. rochei* los mitotipos I, II y II Pacífico. En la segunda base, el número de transiciones varía entre 13 y 44 entre los mitotipos de *A. rochei*, y 113-114 respecto a *A. thazard*. Las transversiones oscilan entre 1-5 y 13-17, respectivamente. Finalmente, en la tercera base se observan entre 37 y 123 para los mitotipos de *A. rochei*, y entre 387-392 al comparar con *A. thazard*. El número de transversiones varía entre 4-9 y 48-50, respectivamente (Fig. 27A).

Al representar gráficamente el número de mutaciones para la primera, segunda y tercera posición del codón de los genes codificantes de proteínas frente a la distancia p entre 6 especies de túnidos (*A. rochei*, *A. thazard*, *T. thynnus*, *T. alalunga*, *E. alletteratus* y *K. pelamis*), se observa una relación lineal de las transiciones en la 1ª y 2ª posición así como para las transversiones en 1ª, 2ª y 3ª posición de *A. rochei* y *A. thazard*. Por el contrario, se detecta saturación de las transiciones en la 3ª posición, aunque ésta no afecta a las comparaciones entre las especies de melva (Fig. 27B).

En la Tabla 4 se muestran las sustituciones no sinónimas entre los distintos mitogenomas de *Auxis*. El mayor número se observa respecto a *A. thazard* (entre 11 y 14 sustituciones). Sin embargo, también se encuentran susti-

Se se considerarem apenas os genes codificantes de proteínas, 15% dos sítios polimórficos localizam-se na primeira base do codão, 19% na segunda e 65% na terceira base do codão. Para a 1ª posição do codão, o número de transições varia entre 7 e 21 entre os diferentes genótipos de *A. rochei*, e entre 95 e 103 quando estes são comparados com *A. thazard* (Fig. 27). Apenas se observam 9 transversões ao comparar *A. thazard* com *A. rochei* genótipos I, II e II Pacífico. Na segunda base, o número de transições varia entre 13 e 44 entre os genótipos de *A. rochei*, e 113-114 em relação a *A. thazard*. As transversões oscilam entre 1-5 e 13-17, respectivamente. Finalmente, na terceira base observa-se entre 37 e 123 para os genótipos de *A. rochei*, e entre 387-392 ao comparar com *A. thazard*. O número de transversões varia entre 4-9 e 48-50, respectivamente (Fig. 27A).

Ao representar graficamente o número de mutações para a primeira, segunda e terceira posição do codão dos genes codificantes de proteínas em relação à distância p entre 6 espécies de tunídeos (*A. rochei*, *A. thazard*, *T. thynnus*, *T. alalunga*, *E. alletteratus* e *K. pelamis*) observa-se uma relação linear das transições na 1ª e 2ª posições assim como para as transversões na 1ª, 2ª e 3ª posições de *A. rochei* e *A. thazard*. Pelo contrário, detecta-se saturação das transições na 3ª posição, embora esta não afete as comparações entre as espécies de judeus (Fig. 27B).

Na Tabela 4 mostram-se as substituições não sinónimas entre os diferentes metagenomas de *Auxis*. O maior número observa-se em relação a *A. thazard* (entre 11 e 14 substituições). No entanto, também se encontram substituições não sinónimas entre os

tuciones no sinónimas entre los mitotipos de *A. rochei*: 3 cambios entre el mitotipo I y el mitotipo II, 3 entre mitotipo II y mitotipo II Pac, y 5 entre mitotipo I y mitotipo II Pac. El gen ND5 es el que registra el mayor número de mutaciones no sinónimas, aunque también se detectan en los genes ND1, ND3, ND4, citocromo *b* y COII.

genótipos de *A. rochei*: 3 mudanças entre o genótipo I e o genótipo II, 3 entre o genótipo II e o genótipo II Pac, e 5 entre o genótipo I e o genótipo II Pac. O gene ND5 é o que regista maior número de mutações não sinónimas, embora também se detectem nos genes ND1, ND3, ND4, citocromo *b* e COII.

A)

		1ª BASE				
		A. rochei	A. rochei mitotipo I	A. rochei mitotipo II	A. thazard mitotipo II Pac	
<i>A. rochei</i> mitotipo I	*	20/0	21/0	95/9	TI/TV	
<i>A. rochei</i> mitotipo II	---	*	7/0	102/9		
<i>A. rochei</i> mitotipo II Pac	---	---	*	103/9		
<i>A. thazard</i>	10'56	11'33	11'44	*		
Ratio TI/TV						
		2ª BASE				
		A. rochei	A. rochei mitotipo I	A. rochei mitotipo II	A. thazard mitotipo II Pac	
<i>A. rochei</i> mitotipo I	*	44/4	44/5	114/17	TI/TV	
<i>A. rochei</i> mitotipo II	11	*	13/1	113/13		
<i>A. rochei</i> mitotipo II Pac	8'8	13	*	113/14		
<i>A. thazard</i>	6'71	8'69	8'07	*		
Ratio TI/TV						
		3ª BASE				
		A. rochei	A. rochei mitotipo I	A. rochei mitotipo II	A. thazard mitotipo II Pac	
<i>A. rochei</i> mitotipo I	*	123/9	122/9	387/49	TI/TV	
<i>A. rochei</i> mitotipo II	13'67	*	37/4	392/48		
<i>A. rochei</i> mitotipo II Pac	13'56	9'25	*	390/50		
<i>A. thazard</i>	7'9	8'17	7'8	*		
Ratio TI/TV						

B)

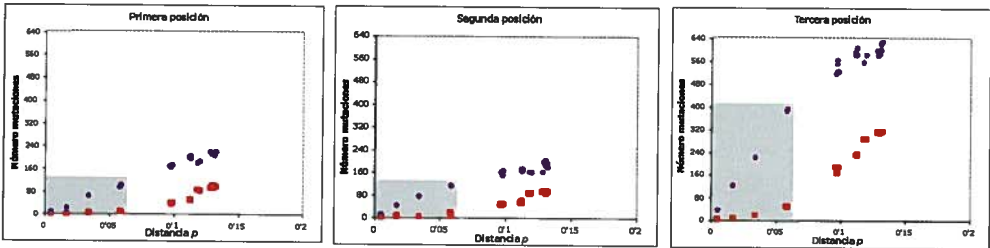


Figura 27: A) Transiciones y transversiones según la posición del codón. Arriba, número de transiciones (TI)/ transversiones (TV). Abajo, ratio TI/TV. B) Representación grafica del número de mutaciones en primera, segunda y tercera posición del codón de los genes codificantes de proteínas frente a la distancia *p* entre 6 especies de túnidos (*A. rochei*, *A. thazard*, *T. thynnus*, *T. alalunga*, *E. alletteratus* y *K. pelamis*). En azul, las transiciones. En rojo, las transversiones. En sombreado se representan las sustituciones correspondientes a las comparaciones entre *A. rochei* y *A. thazard*.

Figura 27: A) Transições e transversões conforme a posição do codão. Em cima, número de transições (TI)/ transversões(TV). Em baixo, rácio TI/TV. B) Representação gráfica do número de mutações primeira, segunda e terceira posição do codão dos genes codificantes proteínas em relação à distância *p* entre 6 espécies de tunídeos (*A. rochei*, *A. thazard*, *T. thynnus*, *T. alalunga*, *E. alletteratus* e *K. Pelamis*). A azul, as transições. A vermelho, as transversões. A sombreado estão representadas as substituições correspondentes às comparações entre *A. rochei* e *A. thazard*.

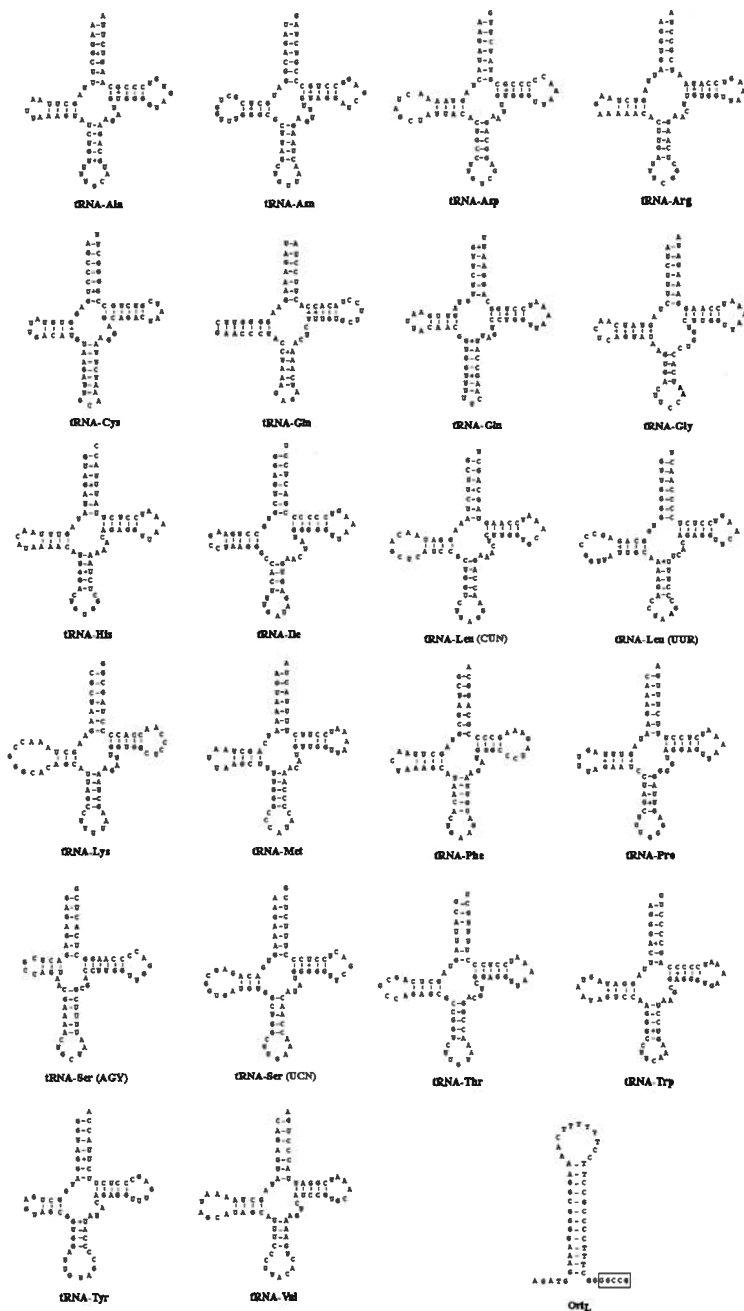


Figura 28: Estrutura secundária de los ARNt y OriL de *A. rochei*. Se representa en un recuadro la región conservada GGCCG en OriL.

Figura 28: Estrutura secundária dos ARNt e OriL de *A. rochei*. Num retângulo estão representada a região conservada GGCCG em OriL.

	<i>A. rochei</i> mitotipo I	<i>A. rochei</i> mitotipo II	<i>A. rochei</i> mitotipo II Pac	<i>A. thazard</i>
<i>A. rochei</i> mitotipo I	*	641 103, 1649	641 229 103, 1649 588	641, 959 544 38, 289 131, 268, 1138 103, 400, 625, 1492, 1649 588
<i>A. rochei</i> mitotipo II	cytb ND5	*	229 103, 1649	959 544 38, 289 131, 268, 1138 400, 625, 1492 588
<i>A. rochei</i> mitotipo II Pac	cytb ND3 ND5 COII	ND3 ND5	*	959 544 38, 229, 289 131, 268, 1138 400, 625, 1492 560, 588
<i>A. thazard</i>	cytb ND1 ND3 ND4 ND5 COII	cytb ND1 ND3 ND4 ND5 COII	cytb ND1 ND3 ND4 ND5 COII	*

Tabla 4: Mutaciones no sinónimas. Abajo, genes donde se han detectado las mutaciones no sinónimas. Arriba, la posición de las mutaciones respecto al 1er nucleótido de cada gen.

Tabela 4: Mutações não sinónimas. Em baixo, genes nos quais foram detectadas as mutações não sinónimas. Em cima, a posição das mutações em relação ao 1º nucleótido de cada gene.

El origen de replicación de la cadena ligera (OriL) tiene en todos los mitogenomas de *Auxis* un tamaño de 49 pb, y se localiza dentro de un grupo de cinco genes que codifican para ARNt conocido como región WANCY. Esta región, según modelos teóricos, forma una estructura secundaria típica con un brazo de 13 pb y un lazo de 11 pb rico en T (Fig. 28). La secuencia conservada 5'-GGCCG-3' se encuentra en la base del brazo dentro del ARNt^{cys}. El tamaño de la región de control oscila entre 843 pb del mitotipo I de *A.*

A origem da replicação da cadeia simples (OriL) tem um tamanho de 49 pb em todos os metagenomas de *Auxis*, e está localizado dentro de um grupo de cinco genes que codificam para RNAt, conhecido como região WANCY. Esta região, de acordo com modelos teóricos, forma uma estrutura secundária típica com um braço de 13 pb e um laço de 11 pb rico em T (Fig. 28). A sequência conservada 5'-GGCCG-3' encontra-se na base do braço dentro do RNAt^{cys}. O tamanho da região de controlo oscila entre 843 pb do genó-

rochei y 847 pb en *A. thazard*. En esta región se identifican las secuencias conservadas CSB-1, CSB-2, CSB-3 y CSB-D. Las secuencias TAS se presentan como un grupo de repeticiones de cuatro unidades, situados al principio de la secuencia, próximas al ARNt^{pro} (Fig. 29).

tipo I de *A. rochei* e 847 pb em *A. thazard*. Nesta região identificam-se as sequências conservadas CSB-1, CSB-2, CSB-3 e CSB-D. As sequências TAS apresentam-se como um grupo de repetições de quatro unidades, situados no princípio da sequência, próximas do RNAt^{pro} (Fig. 29)

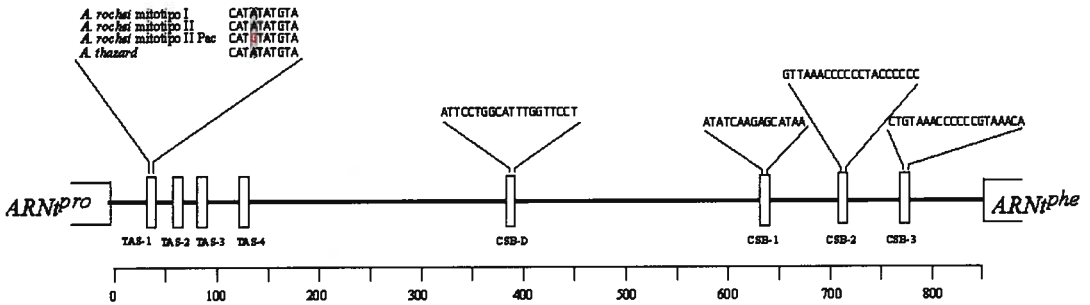


Figura 29: Región de control mitocondrial. Se indica la posición y secuencia de las regiones TAS, CSB-D, CSB-1, CSB-2 y CSB-3. Los polimorfismos se indican en rojo. La escala representa el tamaño en pb.

Figura 29: Região de controlo mitocondrial. É indicada a posição e sequência das regiões TAS, CSB-D, CSB-1, CSB-2, CSB-3. Os polimorfismos estão indicados a vermelho. A escala representa o tamanho em pb.

El tamaño del gen ARNr12S oscila entre 944 pb (mitotipo I), 945 pb (mitotipo II y II Pac) y 946 pb (*A. thazard*). En el caso del gen ARNr16S el tamaño oscila entre 1.690 pb para *A. thazard* y 1.691 pb para ambos mitotipos de *A. rochei*. El análisis comparativo revela la existencia de entre 13 y 16 sustituciones (2 indels en ARNr12S y 1 indel en ARNr16S) entre *A. thazard* y los mitotipos de *A. rochei*. También se detectan 2 y 7 sustituciones (1 indel en ARNr12S) entre el mitotipo I y los mitotipos II y II Pac respectivamente, y 3 sustituciones entre el mitotipo II y II Pac (Tabla 5).

O tamanho do gene RNAr12S oscila entre 944 pb (genótipo I), 945 pb (genótipo II e II Pac) e 946 pb (*A. thazard*). No caso do gene RNAr16S, o tamanho oscila entre 1690 pb para *A. thazard* e 1691 para ambos os genótipos de *A. rochei*. A análise comparativa revela a existência de entre 13 e 16 substituições (2 indels em RNAr12S e 1 indel em RNA16S) entre *A. thazard* e os genótipos de *A. rochei*. Também se detectam 2 e 7 substituições (1 indel em RNAr12S) entre o genótipo I e os genótipos II e II Pac respectivamente, e 3 substituições entre o genótipo II e II Pac (Tabela 5).

Los 22 genes (entre 67 y 74 nucleótidos de tamaño) que codifican para los ARNt se encuentran distribuidos a lo largo del ADNmt. En la figura 28 se

Os 22 genes (entre 67 e 74 nucleótidos de tamanho) que codificam para os RNAt encontram-se distribuidos ao longo do DNAmnt. Na figura 28 apre-

MARCADORES MOLECULARES
MARCADORES MOLECULARES

	<i>A. rochei</i> mitotipo I	<i>A. rochei</i> mitotipo II	<i>A. rochei</i> mitotipo II Pac	<i>A. thazard</i>
<i>A. rochei</i> mitotipo I	*	24 16	392 96, 463, 838, 1348, 1610 16	32, 125, 386, 388, 392 22, 173, 463, 466, 562, 596, 838, 946, 948, 1348 16
<i>A. rochei</i> mitotipo II	ARNt ^{asn} ARNt ^{trp}	*	96, 1610 24	32, 125, 386, 388 22, 173, 463, 466, 562, 596, 946, 948 24
<i>A. rochei</i> mitotipo II Pac	ARNr12S ARNr16S ARNt ^{trp}	ARNr16S ARNt ^{asn}	*	32, 125, 386, 388 22, 96, 173, 463, 466, 562, 596, 946, 948, 1610 24
<i>A. thazard</i>	ARNr12S ARNr16S ARNt ^{trp}	ARNr12S ARNr16S ARNt ^{asn}	ARNr12S ARNr16S ARNt ^{asn}	*

Tabla 5: Mutaciones respecto a los genes ribosómicos y transferentes. Abajo, genes donde se han detectado las mutaciones. Arriba, posición de las mutaciones respecto a cada gen.
Tabela 5: Mutações em relação a os genes ribossômicos e de transferência. Em baixo, genes onde foram detectadas as mutações. Em cima, posição das mutações em relação a cada gene.

	<i>A. rochei</i> mitotipo I	<i>A. rochei</i> mitotipo II	<i>A. rochei</i> mitotipo II Pac	<i>A. thazard</i>
<i>A. rochei</i> mitotipo I				
<i>A. rochei</i> mitotipo II	0'02			
<i>A. rochei</i> mitotipo II Pac	0'02	0'005		
<i>A. thazard</i>	0'10	0'10	0'10	
<i>K. pelamis</i>	0'27	0'26	0'27	
<i>T. thynnus</i>	0'56	0'55	0'55	0'56

Tabla 6: Distancias TVM+G
Tabla 6: Distancias TVM+G

presenta la estructura secundaria más probable según el programa tRNAscan-SE (Lowe y Eddy, 1997). Todos ellos presentan una estructura típica en hoja de trébol (Fig. 28). También se detectan posiciones variables en el RNAt^{trp} de *A. rochei* mitotipo I y en el RNAt^{asn} de *A. rochei* mitotipo II respecto a las demás (Tabla 5). Hay que indicar que mientras que en el RNAt^{trp} la sustitución del nucleótido se sitúa en un lazo de la estructura, en el RNAt^{asn} la sustitución está en un brazo. Sin embargo, aunque en este último caso se pasa de un apareamiento C-G a U-G, esto no supone un cambio de estructura (Fig. 28).

En la Tabla 6 se muestran las distancias genéticas (según el modelo de evolución TVM+G) entre los mitogenomas de *Auxis* con respecto a otras especies de túnidos. Como puede observarse, las distancias entre los mitogenomas de *A. rochei* y *A. thazard* son menores que las observadas con respecto a otros túnidos, lo que refleja su mayor proximidad evolutiva. Las secuencias más próximas son los mitotipos II de *A. rochei*, lo que sugiere una divergencia evolutiva mínima entre ambos mitotipos.

El análisis de las relaciones filogenéticas (usando los métodos de unión por vecindad, máxima parsimonia y máxima verosimilitud) existentes entre todos los mitogenomas de *Auxis* y los pertenecientes a *K. pelamis* y *T. thynnus* refleja un agrupamiento altamente consistente de los mitogenomas de melva (Fig. 30). Asimismo, las secuencias de *A. rochei* forman un linaje claramente diferenciado en relación a *A. thazard*. Además, ambos mitotipos II de *A. rochei* aparecen en una rama muy significativa en relación al Mit I.

senta-se a estrutura secundária mais provável de acordo com o programa tRNAscan-SE (Lowe e Eddy, 1997). Todos eles apresentam uma estrutura típica de folha de trevo (Fig. 28). Também se detectam posições variáveis no RNAt^{trp} de *A. rochei* genótipo I e no RNAt^{asn} de *A. rochei* genótipo II em relação às outras (Tabela 5). É de sublinhar que enquanto no RNAt^{trp} a substituição do nucleótido está situada num laço da estrutura, no RNAt^{asn} a substituição está num braço. No entanto, embora neste último caso se passe de um emparelhamento C-G a U-G, isto não implica uma mudança de estrutura (Fig.28).

Na Tabela 6 mostram-se as distâncias genéticas (de acordo com o modelo de evolução TVM+G) entre os metagenomas de *Auxis* em relação a outras espécies de tunídeos. Como se pode observar, as distâncias entre os metagenomas de *A. rochei* e *A. thazard* são menores do que as observadas em relação a outros tunídeos, o que reflecte a sua proximidade evolutiva. As sequências mais próximas são os genótipos II de *A. rochei*, o que sugere uma divergência evolutiva mínima entre ambos os genótipos.

A análise das relações filogenéticas (usando os métodos de neighbor-joining, máxima parcimónia e máxima verosimilhança) existentes entre todos os metagenomas de *Auxis* e os pertencentes a *K. pelamis* e *T. thynnus* reflecte um agrupamento altamente consistente nos metagenomas de judeu (Fig.30). Mesmo assim, as sequências de *A. rochei* formam uma linhagem claramente diferenciada em relação a *A. thazard*. Além disso, ambos os genótipos II de *A. rochei* aparecem num ramo muito significativa em relação ao Mit I.

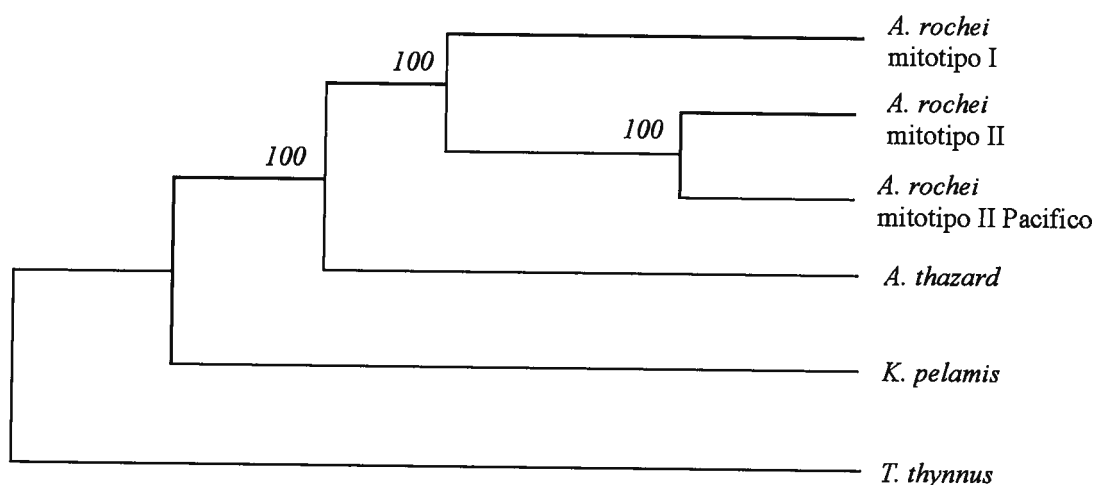


Figura 30: Relaciones filogenéticas entre *A. rochei* y *A. thazard*.
Figura 30: Relações filogenéticas entre *A. rochei* e *A. thazard*.

La existencia de dos mitotipos distintos dentro de una especie no es una característica exclusiva de *A. rochei*. De hecho, así ocurre también en otras especies de la familia Scombridae como *T. thynnus* (Chow y Kishino, 1995; Alvaro Bremer et al., 1997), *Thunnus obesus* (Alvarado Bremen et al., 1998; Chow et al., 2000), *Thunnus alalunga* (Viñas et al., 2004a) y *Sarda sarda* (Viñas et al., 2004b). La presencia de mitotipos divergentes de forma simpátrica dentro de una especie se interpreta como el resultado de un fenómeno de "vicariante" seguido de una reinvasión en especies altamente migratorias (Avice, 2000). Teniendo en cuenta el carácter migratorio de la melva, esta hipótesis podría servir para explicar la presencia de los dos tipos de mitogenomas en la especie *A. rochei*.

A existência de dois genótipos diferentes dentro de uma espécie não é uma característica exclusiva de *A. rochei*. Na verdade, o mesmo acontece em outras espécies da família Scombridae como *T. thynnus* (Chow e Kishino, 1995; Alvaro Bremer et al., 1997), *Thunnus obesus* (Alvarado Bremen et al., 1998; Chow et al., 2000), *Thunnus alalunga* (Viñas et al., 2004a) e *Sarda sarda* (Viñas et al., 2004b).

A presença de genótipos divergentes de forma simpátrica dentro de uma espécie é interpretada como o resultado de um fenômeno "vicariante" seguido de uma reinvasão em espécies altamente migratórias (Avice, 2000). Tendo em conta o carácter migratório do judeu, esta hipótese poderia servir para explicar a presença dos dois tipos de genótipos na espécie *A. rochei*.

4.3. Aplicación de marcadores moleculares al estudio de poblaciones de *Auxis rochei*

En este apartado vamos a describir los resultados obtenidos al estudiar la variabilidad genética, grado de polimorfismo y estructura poblacional en *A. rochei* utilizando distintos marcadores moleculares. Esta aproximación experimental va a permitir comparar el grado de resolución que puede llegar a obtenerse con cada uno de ellos. Así, se han empleado marcadores mitocondriales (citocromo *b* y región de control o D-loop) y dos tipos de marcadores nucleares diferentes (microsatélites y espaciadores internos no transcritos o ITS). Las regiones ITS se localizan entre los genes que codifican los ARNr 18S, 5'8S y 28S, que forman lo que se denomina una unidad ribosómica. En dicha unidad, los ARNr se disponen uno a continuación de otro separados por secuencias espaciadoras denominadas ITS-1 e ITS-2 (Fig. 31). Cientos de unidades ribosómicas se disponen una a continuación de otra en la región ribosómica, separada por otra secuencia espaciadora denominada IGS. Los genes ribosómicos forman un cistrón que se comporta esencialmente como un *locus* simple, a pesar de la presencia de múltiples copias en tándem en el genoma.

Mientras que los genes que codifican los ARNr están altamente conservados, las secuencias espaciadoras (ITS-1, ITS-2 e IGS) siguen una evolución neutral con una alta tasa evolutiva (Arnheim, 1983), de forma que pueden resultar altamente dispares incluso entre individuos. El alto grado de

4.3. Aplicação de marcadores moleculares no estudo de populações de *Auxis rochei*

Neste capítulo vamos descrever os resultados obtidos ao estudar a variabilidade genética, grau de polimorfismo e estrutura populacional em *A. rochei*, utilizando diferentes marcadores moleculares. Esta aproximação experimental vai permitir comparar o grau de resolução que se pode conseguir obter com cada um deles. Assim, foram utilizados marcadores mitocondriais (citocromo *b* e região de controlo ou D-loop) e dois tipos de marcadores nucleares diferentes (microsatélites e espaçadores internos não transcritos ou ITS). As regiões ITS estão localizadas entre os genes que codificam os RNAr 18S, 5,8S e 28S, os quais formam o que se denomina uma unidade ribossómica. Em tal unidade, os RNAr estão dispostos um a seguir ao outro separados por sequências espaçadoras denominadas ITS-1 e ITS-2 (Fig.31). Centenas de unidades ribossómicas estão dispostas uma a seguir à outra na região ribossómica, separada por outra sequência espaçadora denominada IGS. Os genes ribossómicos formam um cistrão que se comporta essencialmente como um locus simples, apesar da presença de múltiplas cópias tandem no genoma.

Enquanto que os genes que codificam os RNAr estão altamente conservados, as sequências espaçadoras (ITS-1, ITS-2 e IGS) seguem uma evolução neutra com uma alta taxa evolutiva (Rnaheim, 1993), de forma que podem resultar altamente dispares, inclusive entre indivíduos. O alto grau de conservação que possuem os RNAr

conservación que poseen los ARNr posibilita el diseño de cebadores para estudiar dichas regiones hipervariables. Además, las copias de la unidad ribosómica dentro un mismo genoma no evolucionan independientemente, sino que siguen lo que se denomina una evolución concertada: los miembros de una familia multigénica se homogenizan rápidamente por entrecruzamiento desigual o conversión genética (Nei, 1987).

possibilita o desenho de iniciadores para estudar tais regiões hipervariáveis. Além disso, as cópias da unidade ribossômica dentro de um mesmo genoma não evoluem independentemente, seguindo o que se denomina de evolução concertada: os membros de uma família multigênica homogeneizam-se rapidamente através de entrecruzamento desigual ou conversão genética (Nei, 1987).

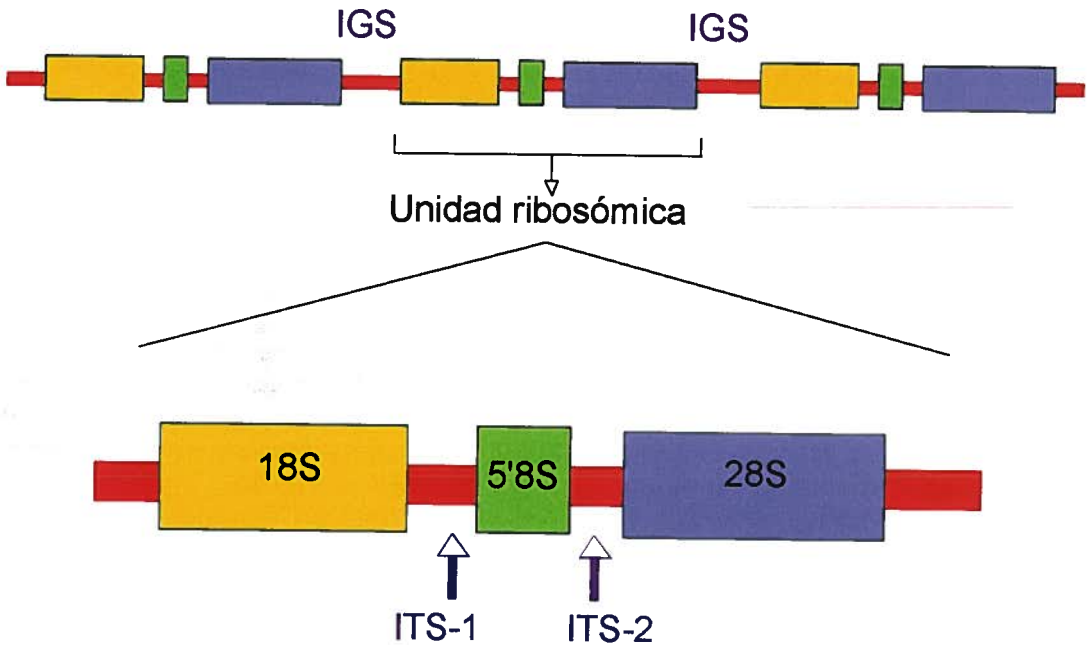


Figura 31: Organización de la unidad ribosómica de eucariotas. Se representan los genes ribosómicos 18S, 5'8S y 28S y las secuencias espaciadoras IGS, ITS-1 e ITS-2.

Figura 31: Organização da unidade ribossômica de eucariotas. Estão representados os genes ribossômicos 18S, 5'8S e 28S e as sequências espaçadoras IGS, ITS-1 e ITS-2.

4.3.1 Resultados en base al ADN mitocondrial

4.3.1.1 Polimorfismo en el gen citocromo *b*

Los resultados que se van a presentar corresponden al análisis de la secuencia de un fragmento parcial de 423 pb en un total de 84 ejemplares de *A. rochei*, 33 del Atlántico, 26 del Mediterráneo y 25 del Pacífico, además de 4 individuos de *A. thazard* procedentes del Indo-Pacífico a efectos comparativos. Entre dichas secuencias se han identificado un total de 51 y 4 haplotipos diferentes para *A. rochei* y *A. thazard* respectivamente (AB106312 al AB106861). Las posiciones polimórficas existentes se representan en la figura 32.

Las relaciones filogenéticas entre los haplotipos de *A. rochei* mediante un análisis de unión por vecindad se presentan en la figura 33. Las especies *T. thynnus* y *A. thazard* aparecen como grupos externos. En dicho árbol se puede observar como los ejemplares de *A. rochei* y *A. thazard* se agrupan en ramas independientes. Dentro de *A. rochei*, los haplotipos pertenecientes al mitotipo I muestran un origen monofilético (valor de bootstrap 83%). Por el contrario, el resto de individuos enmarcados dentro del mitotipo II no presentan un origen común, si bien se observan tres agrupaciones internas ligeramente significativas, con valores de bootstrap del 61, 58 y 55% respectivamente. Dentro del mitotipo I, se incluyen un total de 25 haplotipos que contienen 28 sitios variables con una diversidad haplotípica (H_d) de 0,98, π de 0,018 y θ de 0,031; el mitotipo II incluye 26 haplotipos con 31 sitios variables, H_d

4.3.1 Resultados com base no DNA mitocondrial

4.3.1.1 Polimorfismo no gene citocromo *b*

Os resultados que se vão apresentar correspondem à análise da sequência de um fragmento parcial de 423 pb num total de 84 exemplares de *A. rochei*, 33 do Atlântico, 26 do Mediterrâneo e 25 do Pacífico, além de 4 indivíduos de *A. thazard* procedentes do Indo-Pacífico para efeitos comparativos. Entre tais sequências foram identificados um total de 51 e 4 haplótipos diferentes para *A. rochei* e *A. thazard* respectivamente (AB106312 ao AB106861). As posições polimórficas existentes estão representadas na figura 32.

As relações filogenéticas entre os haplótipos de *A. rochei* mediante uma análise de neighbor-joining estão representadas na figura 33. As espécies *T. thynnus* e *A. thazard* aparecem como grupos externos. Em tal árvore pode observar-se como os exemplares de *A. rochei* e *A. thazard* se agrupam em ramos independentes. Dentro de *A. rochei*, os haplótipos pertencentes ao genótipo I mostram uma origem monofilética (valor de bootstrap 83%). Pelo contrário, os restantes indivíduos enquadrados dentro do genótipo II não apresentam uma origem comum, se bem que se observam três agrupações internas ligeiramente significativas, com valores de bootstrap de 61, 58 e 55% respectivamente. Dentro do genótipo I incluem-se um total de 25 haplótipos que contêm 28 sítios variáveis com uma diversidade haplotípica (H_d) de 0,98, π de 0,018 e θ de 0,031; o genótipo II inclui 26 haplótipos com 31

MARCADORES MOLECULARES
MARCADORES MOLECULARES

	1	1111111111	1111111112	2222222222	2222222233	3333333333	333
	123334444	5556889990	0011123344	4556688990	0014455666	7778899900	0111223333 456
	5402590147	0362062581	4703981406	9581425480	3925847679	2581436925	7148891245 362
ArocytbH1	TCACTGTCCT	AGCACCAAAG	ACATCCTTCA	CATCCAGAGC	CCTCCTAAAC	ACCGCACATC	AATTATCTAC CTC
ArocytbH2G.....A...G...
ArocytbH3	.G.....GA.G...
ArocytbH4
ArocytbH5
ArocytbH6T
ArocytbH7A.T
ArocytbH8	.G.....G...C
ArocytbH9T
ArocytbH10A.A.T
ArocytbH11T.....T.....A.G.C
ArocytbH12A.G
ArocytbH13GA.
ArocytbH14G.....
ArocytbH15G...C
ArocytbH16T.....T.....A.C
ArocytbH18A.....G.G
ArocytbH17A.TA.
ArocytbH19CC
ArocytbH20	.T.....A.T
ArocytbH21A.....A.
ArocytbH22A.....T
ArocytbH23A.....T.A.
ArocytbH24A.....G
ArocytbH25A.....GC
ArocytbH26TA.....G.....A.C.G.C.C
ArocytbH27TA.....G.....A.C.G.C.C
ArocytbH28TA.....G.....A.C.G.A.TC
ArocytbH29TA.....G.....A.C.G.C
ArocytbH30	.T.....TA.....G.....A.C.G.TC
ArocytbH31C.....TA.....G.....A.C.G.C
ArocytbH32TA.....TG.....T.....A.C.CTC
ArocytbH33TA.....G.....T.....A.G.C.G.TC
ArocytbH34TA.....G.....A.....GA.C.G.TC
ArocytbH35T.....G.....G.....A.CTC
ArocytbH36TA.....G.....G.....A.T.C.G.TC
ArocytbH37TA.....G.....G.....A.CTC
ArocytbH38TA.....G.....A.C.G.GGC.C
ArocytbH39TA.....G.....A.C.G.GC.C
ArocytbH40TA.....G.....A.C.G.TC.C
ArocytbH41TA.....TG.....	T.....	T.....A.C.G.T.TC
ArocytbH42TA.....TG.....	T.....A.C.G.TC
ArocytbH43TA.....G.....A.CA.TC
ArocytbH44TA.....TG.....	T.....A.C.G.TC
ArocytbH45TA.....G.....G.....A.CC.TC
ArocytbH46TA.....G.....A.CT.GTC
ArocytbH47TA.....G.....A.T.C.G.TC
ArocytbH48TA.....TG.....	T.....A.C.G.T.TC
ArocytbH49TA.....G.....A.CTC
ArocytbH50TA.....G.....A.C.G.TC.C
ArocytbH51TA.....G.....	T.....A.C.G.TC.C
ATHcytbH1	C...C...TTA	GA.G.T.G.	T...CCT	.GC.....	TTC.C.T.T	C.A.G...T	C...C...CT
ATHcytbH2	C...TC...TTA	GA.G.T.	T...CCT	.GC.....	TTC.C.T.T	C.A.G...T	C...C...C
ATHcytbH3	C...C...TTA	GA.G.T.	T...CCT	.GC.....	TTC.C.T.T	C.A.G...T	C...C...C
ATHcytbH4	C...CA.TTA	GA.G.T.	T...CCT	.GC.....	TTC.C.T.T	C.A.G...T	C...C...C

Figura 32: Haplotipos de *A. rochei* (Arocytb) y *A. thazard* (ATHcytb) para el gen citocromo *b*. Arriba se indica la posición del polimorfismo respecto a la 1ª posición del amplicón analizado. Los puntos denotan similitud en esa posición con la secuencia de referencia.

Figura 32: Haplótipos de *A. rochei* (Arocytb) e *A. thazard* (ATHcytb) para o gene citocromo *b*. Em cima está indicada a posição do polimorfismo em relação à 1ª posição do produto amplificado analisado. Os pontos denotam semelhança nessa posição com a sequência de referência.

de 0,96, π de 0,011 y θ de 0,022 (Tabla 7). En particular, las posiciones 44, 47, 62, 212, 257, 296, 314, al ser altamente conservadas, permiten diferenciar ambos haplotipos.

sítios variáveis, Hd de 0,96, π de 0,011 e θ de 0,022 (Tabela 7). Em particular, as posições 44, 47, 62, 212, 257, 296, 314, por serem altamente conservadas, permitem diferenciar ambos os haplótipos.

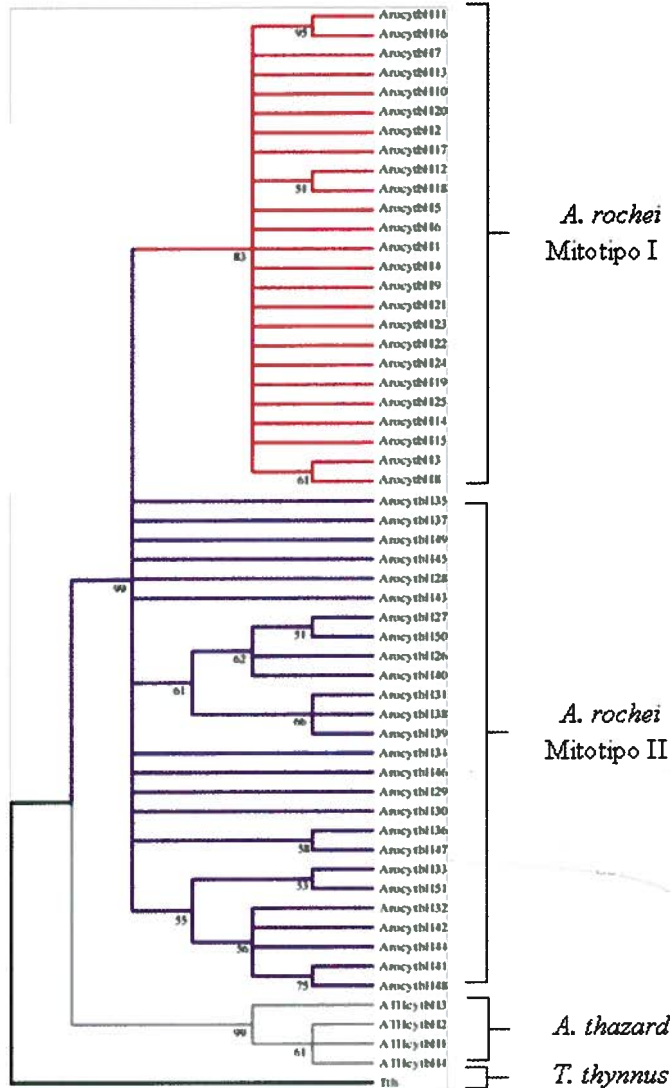


Figura 33: Árbol filogenético realizado con el método de unión por vecindad a partir de los haplotipos del gen citocromo *b* de *A. rochei*. Se indican los valores de bootstrap >50%. Se incluyen *T. thynnus* y *A. thazard* como grupos externos.

Figura 33: Arvore filogenética realizada com o método de neighbor-joining a partir dos haplótipos do gene citocromo *b* de *A. rochei*. Estão indicados os valores de bootstrap >50%. Incluem-se *T. thynnus* e *A. thazard* como grupos externos.

En relación a las poblaciones (Tabla 7), π varía entre 0'011 en los individuos del Pacífico y 0'017 en los individuos del Atlántico, mientras que θ varía entre 0'019 de la población del Pacífico y 0'024 en la del Atlántico. El valor de Hd oscila entre 0'96 (Pacífico) y 0'98 (Atlántico). Los sitios variables detectados oscilan entre 23 en el Pacífico y 28 en el Mediterráneo.

Em relação às populações (Tabela 7), π varia entre 0,011 nos indivíduos do Pacífico e 0,017 nos indivíduos do Atlântico, enquanto que θ varia entre 0,019 na população do Pacífico e 0,024 na do Atlântico. O valor de Hd oscila entre 0,96 (Pacífico) e 0,98 (Atlântico). Os sites variáveis detectados oscilam entre 23 no Pacífico e 28 no Mediterrâneo.

Al estudiar la distribución de ambos mitotipos por población (Fig. 34), se observa que la población del Mediterráneo posee 15 haplotipos diferentes del mitotipo I, mientras que en la del Atlántico sólo aparecen 13 haplotipos. Curiosamente, no se encuentra ningún haplotipo del mitotipo I en la población del Pacífico. Los más frecuentes son los haplotipos ArocytbH1 y ArocytbH7, presentes en el Mediterráneo y en el Atlántico, ArocytbH11, presente sólo en el Mediterráneo, y ArocytbH16 y ArocytbH21, presentes sólo en el Atlántico.

Ao estudar a distribuição de ambos os genótipos por população (Fig.34), observa-se que a população do Mediterrâneo possui 15 haplótipos diferentes do genótipo I, enquanto que na do Atlântico apenas aparecem 13 haplótipos. Curiosamente, não se encontra nenhum haplótipo do genótipo I na população do Pacífico. Os mais frequentes são os haplótipos ArocytbH1 e ArocytbH7, presentes no Mediterrâneo e no Atlântico, ArocytbH11, presente apenas no Mediterrâneo, e ArocytbH16 e ArocytbH21, presentes apenas no Atlântico.

	citocromo <i>b</i>				
	Mitotipo I	Mitotipo II	MED	ATL	PAC
Sitios variables	28	31	28	33	23
Hd	0'98	0'96	0'97	0'98	0'96
π	0'018	0'011	0'014	0'017	0'011
θ	0'031	0'022	0'020	0'024	0'019

Tabla 7: Número de sitios variables, diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), y polimorfismo de nucleótidos (θ) en la secuencia parcial del gen citocromo *b* para los distintos mitotipos y poblaciones.

Tabela 7: Número de sítios variáveis, diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), e polimorfismo de nucleótidos (θ) na sequência parcial do gene citocromo *b* para os diferentes genótipos e populações.

Respecto al mitotipo II se detectan 5, 10 y 15 haplotipos diferentes en las poblaciones del Mediterráneo, Atlántico y Pacífico, respectivamente. Los haplotipos más frecuentes son ArocytbH26 (presente en todas las poblaciones), ArocytbH29 (presente en el Mediterráneo y en el Atlántico), ArocytbH33, ArocytbH36, ArocytbH39, ArocytbH40, ArocytbH44 y ArocytbH46 (presentes en el Pacífico), y ArocytbH48 y ArocytbH51 (presentes en el Atlántico). Al estudiar la distribución por población, el 81% de los individuos del Mediterráneo corresponden al mitotipo I, y sólo el 6% en el caso del Atlántico. Todos los ejemplares del Pacífico se corresponden con el mitotipo II.

Em relação ao genótipo II são detectados 5, 10 e 15 haplótipos diferentes nas populações do Mediterrâneo, Atlântico e Pacífico, respectivamente. Os haplótipos mais frequentes são ArocytbH26 (presente em todas as populações), ArocytbH29 (presente no Mediterrâneo e no Atlântico), ArocytbH33, ArocytbH36, ArocytbH39, ArocytbH40, ArocytbH44 e ArocytbH46 (presentes no Pacífico), e ArocytbH48 e ArocytbH51 (presentes no Atlântico). Ao estudar a distribuição por população, 81% dos indivíduos do Mediterrâneo correspondem ao genótipo I e apenas 6% no caso do Atlântico. Todos os exemplares do Pacífico correspondem ao genótipo II.

	MITOTIPO I				MITOTIPO II		
	MED	ATL	PAC		MED	ATL	PAC
Arocytb H1	2	2	-	AroCytb H26	1	2	4
Arocytb H2	1	-	-	AroCytb H27	1	-	-
AroCytb H3	1	-	-	AroCytb H28	1	1	-
AroCytb H4	1	-	-	AroCytb H29	2	2	-
AroCytb H5	1	-	-	AroCytb H30	1	-	-
AroCytb H6	1	-	-	AroCytb H31	-	1	-
AroCytb H7	3	3	-	AroCytb H32	-	1	-
AroCytb H8	1	-	-	AroCytb H33	-	-	2
AroCytb H9	1	-	-	AroCytb H34	-	-	1
AroCytb H10	1	-	-	AroCytb H35	-	-	1
AroCytb H11	3	-	-	AroCytb H36	-	-	3
AroCytb H12	1	-	-	AroCytb H37	-	-	1
AroCytb H13	1	1	-	AroCytb H38	-	-	1
AroCytb H14	1	-	-	AroCytb H39	-	-	3
AroCytb H15	1	-	-	AroCytb H40	-	2	-
AroCytb H16	-	2	-	AroCytb H41	-	-	1
AroCytb H17	-	1	-	AroCytb H42	-	-	1
AroCytb H18	-	1	-	AroCytb H43	-	-	1
AroCytb H19	-	1	-	AroCytb H44	-	-	2
AroCytb H20	-	1	-	AroCytb H45	-	-	1
AroCytb H21	-	2	-	AroCytb H46	-	-	2
AroCytb H22	-	1	-	AroCytb H47	-	-	1
AroCytb H23	-	1	-	AroCytb H48	-	2	-
AroCytb H24	-	1	-	AroCytb H49	-	1	-
AroCytb H25	-	1	-	AroCytb H50	-	1	-
				AroCytb H51	-	2	-

Figura 34: Número de ejemplares y procedencia geográfica de los diferentes haplotipos de *A. rochei*.

Figura 34: Número de exemplares e proveniência geográfica dos diferentes haplótipos de *A. rochei*.

Los resultados de la red mutacional coinciden con los resultados obtenidos en el análisis filogenético comentado anteriormente. La red mutacional no muestra una asociación filogeográfica clara, distribuyéndose los haplotipos de cada población al azar. Los haplotipos del mitotipo I ArocytbH1 (presente en 4 individuos) y ArocytbH7 (en 6 individuos), 1 y 7 en la Figura 35, presentan una estructura radial con 5 y 6 conexiones directas, respectivamente. Los haplotipos del mitotipo II ArocytbH26 (hallado en 7 individuos) y ArocytbH29 (en 4 individuos), 26 y 29 en la Figura 35, también presentan una estructura radial, conectándose directamente al mitotipo I a través del haplotipo ArocytbH15 (15 en la Fig. 35). Estos haplotipos representan probablemente los haplotipos ancestrales.

4.3.1.2 Polimorfismo en la región de control (D-loop)

En este caso, los resultados que se muestran a continuación se derivan del análisis de un fragmento de aproximadamente 650 pb en un total de 84 individuos de *A. rochei* y 1 ejemplar de *A. thazard* (números de acceso AB107054 al AB107082). En la Figura 36 se muestran los sitios polimórficos existentes entre los 59 haplotipos distintos de *A. rochei* y el haplotipo correspondiente a *A. thazard*.

De igual forma a lo observado para el gen citocromo *b*, los haplotipos se pueden clasificar en dos mitotipos (I y II). Los mitotipos I y II se diferencian principalmente en las posiciones 133, 134, 190, 225, 235, 245, 272, 289, 291, 292, 360, 361, 369, 386, 529 y 544. En el mitotipo I (haplotipos 1-28)

Os resultados da rede mutacional coincidem com os resultados obtidos na análise filogenética comentada anteriormente. A rede mutacional não mostra uma associação filogeográfica clara, distribuindo-se os haplótipos de cada população ao acaso. Os haplótipos do genótipo I ArocytbH1 (presente em 4 indivíduos) e ArocytbH7 (em 6 indivíduos), 1 e 7 na Figura 35, apresentam uma estrutura radial com 5 e 6 conexões directas, respectivamente. Os haplótipos do genótipo II ArocytbH26 (encontrado em 7 indivíduos) e ArocytbH29 (em 4 indivíduos), 26 e 29 na Figura 35, também apresentam uma estrutura radial, unindo-se directamente ao genótipo I através do haplótipo ArocytbH15 (15 na Fig. 35). Estes haplótipos representam provavelmente os haplótipos ancestrais.

4.3.1.2 Polimorfismo na região de controlo (D-loop)

Neste caso, os resultados que se mostram em seguida derivam da análise de um fragmento de aproximadamente 650 pb num total de 84 indivíduos de *A. rochei* e 1 exemplar de *A. thazard* (números de acesso AB107054 ao AB107082). Na Figura 36 mostram-se os sítios polimórficos existentes entre os 59 haplótipos diferentes de *A. rochei* e o haplótipo correspondente a *A. thazard*.

Tal como foi observado no gene citocromo *b*, os haplótipos podem classificar-se em dois genótipos (I e II). Os genótipos I e II diferenciam-se principalmente nas posições 133, 134, 190, 225, 235, 245, 272, 289, 291, 292, 360, 361, 369, 386, 529 e 544. No genótipo I (haplótipos 1-28) são

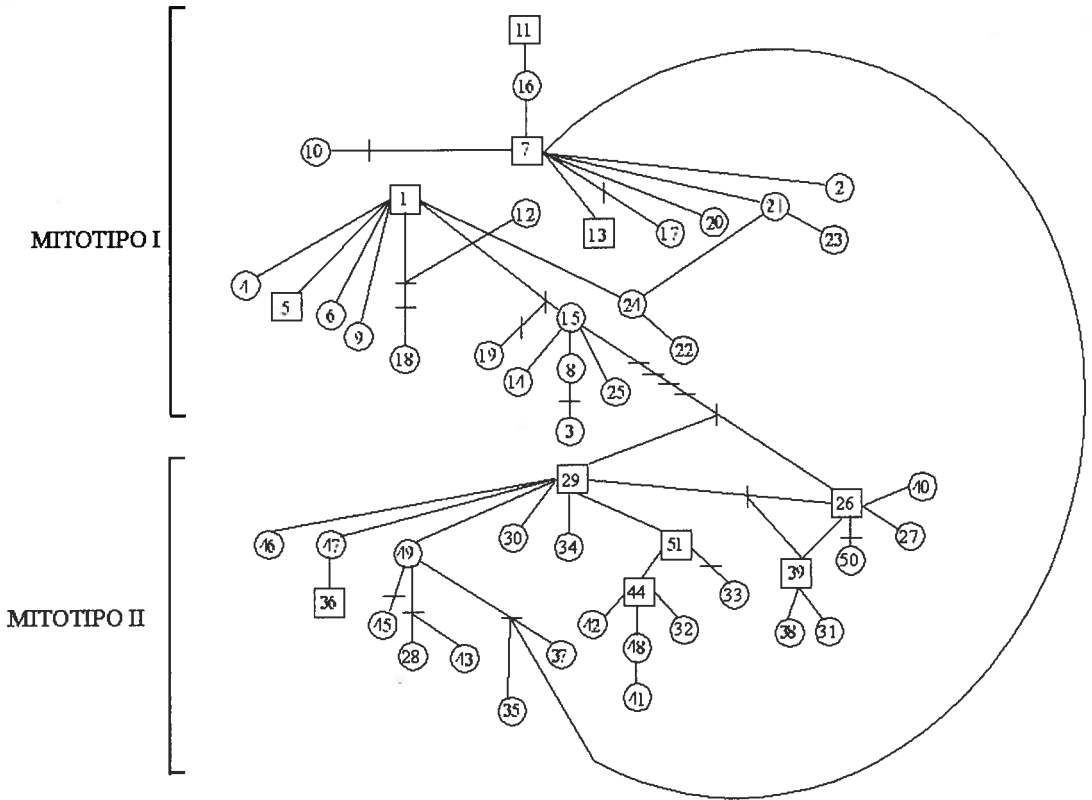


Figura 35: Red mutacional con haplotipos correspondientes al gen citocromo *b*. Los haplotipos se representan en círculos. En cuadrados se indican los más abundantes. Las líneas transversales representan haplotipos intermedios no encontrados.

Figura 35: Rede mutacional com haplótipos correspondentes ao gene citocromo *b*. Os haplótipos estão representados por círculos. Os quadrados indicam os mais abundantes. As linhas transversais representam haplótipos intermédios não encontrados.

se detectan 64 sitios polimórficos, con un valor π de 0'019 y θ de 0'025. Dentro del mitotipo II se encuentran 84 sitios polimórficos, y un valor π de 0'028 y θ de 0'036 (Tabla 8). Dentro de cada población, y en función de la composición haplotípica de cada una de ellas, π oscila entre 0'024 (Pacífico) y 0'032 (Atlántico), θ entre 0'032 (Pacífico) y 0'037 (Mediterráneo y Atlántico), y H_d entre 0'99 y 1. El número de sitios variables encontrados es de 61 en el Pacífico, 76 en el Atlántico y 73 en el Mediterráneo (Tabla 8).

detectados 64 sítios polimórficos, com um valor π de 0,019 e θ de 0,025. Dentro do genótipo II encontram-se 84 sítios polimórficos, e um valor π de 0,028 e θ de 0,036 (Tabela 8). Dentro de cada população, e em função da composição haplotípica de cada uma delas, π oscila entre 0,024 (Pacífico) e 0,032 (Atlântico), θ entre 0,032 (Pacífico) e 0,037 (Mediterrâneo e Atlântico) e H_d entre 0,99 e 1. O número de sítios variáveis encontrados é de 61 no Pacífico, 76 no Atlântico e 73 no Mediterrâneo (Tabela 8).

MARCADORES MOLECULARES
MARCADORES MOLECULARES

	12222222	2223333333	3333333333	3333333333	3344444444	4444444444	4444444444	4444444444	4444444444	5555555555	5555555555	5555555555	6666666666	6666666677	7777777888
AroCRH1	ACGGTCACAT	TTACTCTAAC	TACTGTGTAAT	TGAGACTATA	CGAACCACT	TAAATACCT	-AACAAAGAGA	TAGGTTTA-A	ATCTATCAT	TAACCAAGC	TCCATCTAT	AGTGTAGCC	TGATTTCTGA		
AroCRH2															
AroCRH3															
AroCRH4															
AroCRH5															
AroCRH6															
AroCRH7															
AroCRH8															
AroCRH9															
AroCRH10															
AroCRH11															
AroCRH12															
AroCRH13															
AroCRH14															
AroCRH15															
AroCRH16															
AroCRH17															
AroCRH18															
AroCRH19															
AroCRH20															
AroCRH21															
AroCRH22															
AroCRH23															
AroCRH24															
AroCRH25															
AroCRH26															
AroCRH27															
AroCRH28															
AroCRH29															
AroCRH30															
AroCRH31															
AroCRH32															
AroCRH33															
AroCRH34															
AroCRH35															
AroCRH36															
AroCRH37															
AroCRH38															
AroCRH39															
AroCRH40															
AroCRH41															
AroCRH42															
AroCRH43															
AroCRH44															
AroCRH45															
AroCRH46															
AroCRH47															
AroCRH48															
AroCRH49															
AroCRH50															
AroCRH51															
AroCRH52															
AroCRH53															
AroCRH54															
AroCRH55															
AroCRH56															
AroCRH57															
AroCRH58															
AroCRH59															
AthCRH1															

Figura 36: Haplotipos y posiciones polimórficas encontradas de las secuencias de la región de control obtenidas en *A. rochei* y *A. thazard*.

Figura 36: Haplótipos e posições polimórficas encontradas nas sequências da região de controle obtidas em *A. rochei* e *A. thazard*.

Al estudiar la distribución por población, se observa que hay 12 y 16 haplotipos diferentes del mitotipo I en la población del Mediterráneo y del Atlántico, respectivamente. También en este caso el mitotipo I está ausente en el Pacífico. Respecto al mitotipo II se encuentran 5 haplotipos en el Mediterráneo, 12 en el Atlántico y 15 en el Pacífico (Fig. 37).
Al igual que lo comentado anterior-

Ao estudar a distribuição por população, observamos que existem 12 e 16 haplótipos diferentes do genótipo I na população do Mediterrâneo e do Atlântico, respectivamente. Também neste caso o genótipo I está ausente no Pacífico. Em relação ao genótipo II encontramos 5 haplótipos no Mediterrâneo, 12 no Atlântico e 15 no Pacífico (Fig.37).
Tal como comentado anteriormente

	REGIÓN DE CONTROL				
	Mitotipo I	Mitotipo II	MED	ATL	PAC
Sítos variables	64	84	73	76	61
Hd	1'00	1'00	1'00	0'99	1'00
π	0'019	0'028	0'031	0'032	0'024
θ	0'025	0'036	0'037	0'037	0'032

Tabla 8: Número de sitios variables, diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), y polimorfismo de nucleótidos (θ) en la región de control para los distintos mitotipos y poblaciones.
 Tabela 8: Número de sítos variáveis, diversidade haplotípica (Hd), diversidade nucleotídica (π), e polimorfismo de nucleótidos (θ) na região de controlo para os diferentes génotipos e populações.

	MITOTIPO I			MITOTIPO II			
	MED	ATL	PAC	MED	ATL	PAC	
AroCR H1	1	-	-	AroCR H29	1	1	-
AroCR H2	1	-	-	AroCR H30	1	-	-
AroCR H3	1	-	-	AroCR H31	1	-	-
AroCR H4	1	-	-	AroCR H32	1	-	-
AroCR H5	1	-	-	AroCR H33	1	-	-
AroCR H6	1	-	-	AroCR H34	-	1	-
AroCR H7	1	-	-	AroCR H35	-	-	1
AroCR H8	1	-	-	AroCR H36	-	-	1
AroCR H9	1	-	-	AroCR H37	-	-	1
AroCR H10	1	-	-	AroCR H38	-	-	1
AroCR H11	-	1	-	AroCR H39	-	-	1
AroCR H12	1	-	-	AroCR H40	-	-	1
AroCR H13	1	-	-	AroCR H41	-	1	-
AroCR H14	-	1	-	AroCR H42	-	1	-
AroCR H15	-	1	-	AroCR H43	-	1	-
AroCR H16	-	1	-	AroCR H44	-	2	-
AroCR H17	-	1	-	AroCR H45	-	-	1
AroCR H18	-	1	-	AroCR H46	-	-	1
AroCR H19	-	1	-	AroCR H47	-	-	1
AroCR H20	-	1	-	AroCR H48	-	-	1
AroCR H21	-	1	-	AroCR H49	-	-	1
AroCR H22	-	1	-	AroCR H50	-	-	1
AroCR H23	-	1	-	AroCR H51	-	-	1
AroCR H24	-	1	-	AroCR H52	-	-	1
AroCR H25	-	1	-	AroCR H53	-	-	1
AroCR H26	-	1	-	AroCR H54	-	1	-
AroCR H27	-	1	-	AroCR H55	-	1	-
AroCR H28	-	1	-	AroCR H56	-	1	-
				AroCR H57	-	1	-
				AroCR H58	-	1	-
				AroCR H59	-	1	-

Figura 37: Número de ejemplares y procedencia geográfica de los diferentes haplotipos de la región de control.
 Figura 37: Número de exemplares e procedência geográfica dos diferentes haplótipos da região de controlo.

mente para el gen citocromo *b*, los resultados de la red mutacional (Fig. 38) no muestran asociación filogeográfica entre los haplotipos pertenecientes a los mitotipos I y II. Además, en este caso la estructura es más compleja, existiendo haplotipos que no se pueden unir al resto con una resolución del 95%, debido probablemente a la mayor variabilidad en la secuencia de la región de control con respecto al gen citocromo *b*.

para o gene citocromo *b*, os resultados da rede mutacional (Fig. 38) não mostram associação filogeográfica entre os haplótipos pertencentes aos genótipos I e II. Além disso, neste caso a estrutura é mais complexa, existindo haplótipos que não se podem unir aos restantes com uma resolução de 95%, o que se deve provavelmente à maior variabilidade na sequência da região de controlo em relação ao gene citocromo *b*.

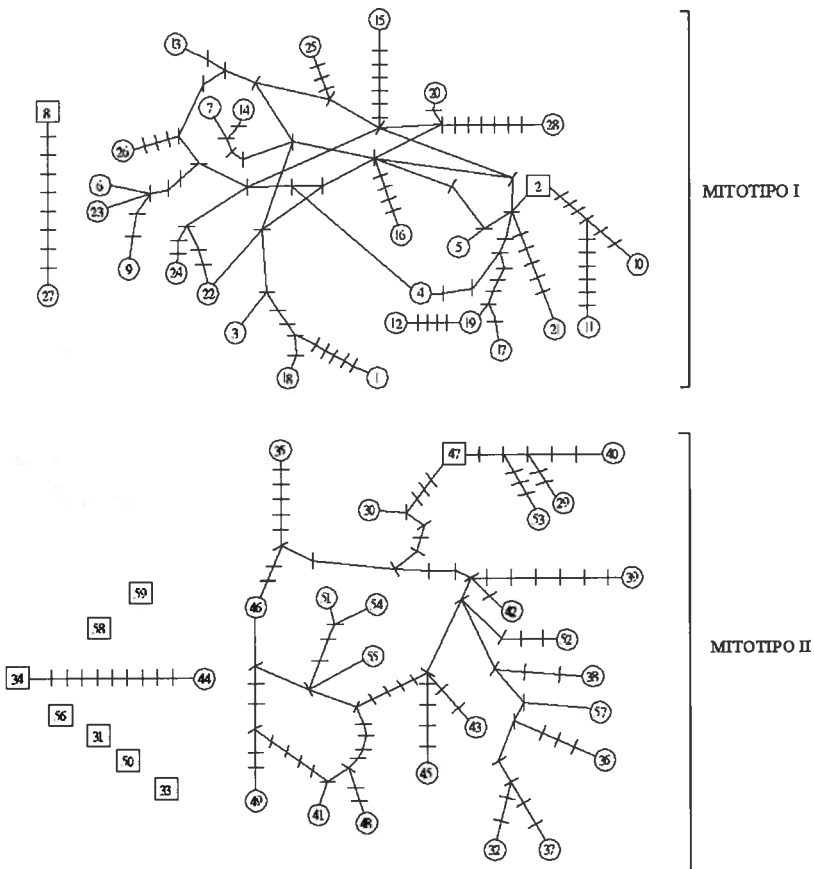


Figura 38: Red mutacional de la región de control. Los haplotipos se representan en círculos, y en cuadrados los más abundantes. Las líneas transversales representan haplotipos intermedios no encontrados.

Figura 38: Rede mutacional da região de controlo. Os haplótipos estão representados por círculos, e os quadrados indicam os mais abundantes. As linhas transversais representam haplótipos intermédios não encontrados.

4.3.1.3 Diferenciación poblacional mediante marcadores mitocondriales

El estudio de la diferenciación genética entre las poblaciones consideradas se ha llevado a cabo mediante un análisis de la varianza molecular o AMOVA (Excoffier et al., 1992) (Fig. 39). Los resultados de la AMOVA muestran claramente que la mayor variación se registra dentro de las poblaciones (98'27% y 99'99% para el gen citocromo *b* y región de control, respectivamente). La variación entre poblaciones es solamente del 1'73% para el gen citocromo *b* y 0'01% para la región de control. Esto determina unos valores de F_{ST} de 0'017 ($P < 0'001$) y 0'0001 (no significativo) para el gen citocromo *b* y región de control, respectivamente. Al comparar los pares de poblaciones, sólo en el caso del gen citocromo *b* se encuentran valores de F_{ST} significativos entre la población del Pacífico con respecto a la del Mediterráneo ($F_{ST} = 0'031$ $P < 0'001$) y Atlántico ($F_{ST} = 0'025$ $P < 0'001$).

El análisis de AMOVA jerárquica considerando dos grupos (Atlántico-Mediterráneo y Pacífico) muestra una variación entre grupos del 2'94% y 0'16% para el gen citocromo *b* y región de control, respectivamente. El valor F_{ST} para el gen citocromo *b* es de 0'027 ($P < 0'01$), indicando una moderada diferenciación genética entre poblaciones. Para la región de control, el valor de F_{ST} no es significativo ($F_{ST} = 0'0008$; n.s.).

4.3.1.3 Diferenciação populacional mediante marcadores mitocondriais

O estudo da diferenciação genética entre as populações consideradas foi levado a cabo mediante uma análise de variância molecular ou AMOVA (Excoffier et al., 1992) (Fig.39). Os resultados da AMOVA mostram claramente que a maior variação se regista dentro das populações (98,27% e 99,99% para o gene citocromo *b* e região de controlo, respectivamente). A variação entre populações é de apenas 1,73% para o gene citocromo *b* e 0,01% para a região de controlo. Isto determina uns valores de F_{ST} de 0,017 ($P < 0,001$) e 0,0001 (não significativo) para o gene citocromo *b* e região de controlo, respectivamente. Ao comparar os pares de populações, apenas no caso do gene citocromo *b* encontramos valores de F_{ST} significativos entre a população do Pacífico em relação à do Mediterrâneo ($F_{ST} = 0,031$ $P < 0,001$) e Atlântico ($F_{ST} = 0,025$ $P < 0,001$).

A análise de AMOVA hierárquica, considerando dois grupos (Atlântico-Mediterrâneo e Pacífico), mostra uma variação entre grupos de 2,94% e 0,16% para o gene citocromo *b* e região de controlo, respectivamente. O valor F_{ST} para o gene citocromo *b* é de 0,027 ($P < 0,01$), indicando uma diferenciação genética moderada entre populações. Para a região de controlo, o valor F_{ST} não é significativo ($F_{ST} = 0'0008$; n.s.).

MARCADORES MOLECULARES
MARCADORES MOLECULARES

A)						
Tipo de variación	df	SS	Varianza	% Variación Total	Índice Variación	Valor p
Entre poblaciones	2	1'443	0'0085	1'73		
Dentro poblaciones	81	39'259	0'4846	98'27	0'017	<0'01
Dos grupos (Atl-Med y Pac)						
Entre grupos	1	0'980	0'014	2'94	0'029 Fct	<0'001
Entre poblaciones dentro de grupos	1	0'463	0	0	0'027 Fst	<0'01
Dentro poblaciones	81	39'259	0'4846	97'21	-0'0015 Fsc	0'5 n.s.
B)						
Tipo de variación	df	SS	Varianza	% Variación Total	Índice Variación	Valor p
Entre poblaciones	2	1'002	0	0'01		
Dentro poblaciones	58	28'966	0'499	99'99	0'0001	0'5 n.s.
Dos grupos (Atl-Med y Pac)						
Entre grupos	1	0'511	0	0'16	0'0016 Fct	0'3 n.s.
Entre poblaciones dentro de grupos	1	0'491	0	0	0'0008 Fst	0'3 n.s.
Dentro poblaciones	58	28'966	0'4994	99'92	-0'0008 Fsc	0'8 n.s.

Figura 39: Análisis de varianza molecular (AMOVA). Arriba (A) con frecuencias haplotípicas de citocromo *b*. Abajo (B) con frecuencias haplotípicas de la región de control. df=grados de libertad; SS= Suma de cuadrados.

Figura 39: Análise de variância molecular (AMOVA). Em cima (A) com frequências haplotípicas de citocromo *b*. Em baixo (B) com frequências haplotípicas de região de controle. df=graus de liberdade; SS= Soma de quadrados.

4.3.2 Resultados en base a los espaciadores transcritos internos ITS-1 e ITS-2

Este estudio se ha llevado a cabo seleccionando individuos de cada uno de los haplotipos mitocondriales caracterizados en base a la homología de secuencias, tal como se describió en el apartado anterior, además de otros individuos procedentes de las diferentes áreas geográficas de muestreo para intentar encontrar un marcador molecular diferenciador de poblaciones. De esta manera, el estudio se ha realizado a partir de 22 individuos de *A. rochei*, 8 del Mediterráneo, 9 del Atlántico y 5 del Pacífico, y 1 individuo de *A. thazard*. Las secuencias obtenidas están accesibles en el GenBank/EMBL/DDBJ con los siguientes números de acceso: *A. thazard* AB193567; *A. rochei* AB193568 y AB193727 - AB193747. El análisis de las secuencias revela la existencia de 51 posiciones variables entre los individuos de *A. rochei* y 102 entre *A. rochei* y *A. thazard*. Las transiciones oscilan entre 1-7, mientras que las transversiones varían entre 1-9, con 11 indels entre los individuos de *A. rochei*. Entre *A. rochei* y *A. thazard* se encuentran entre 26-31 transiciones, 23-29 transversiones y 46 indels (Fig. 40).

El contenido medio de G+C en *A. rochei* es del 66'5% para el fragmento ITS-1 /5'8S /ITS-2, con una frecuencia media de bases de 16'1% (A), 35'7% (C), 30'8% (G) y 17'2% (T). En *A. thazard* el contenido de G+C es del 67%, con una frecuencia de bases del 15'6% (A), 36'1% (C), 30'9% (G) y 17'3% (T).

4.3.2 Resultados com base nos espaçadores transcritos internos ITS-1 e ITS-2

Este estudo foi levado a cabo seleccionando indivíduos de cada um dos haplótipos mitocondriais caracterizados com base na homologia de sequências, tal como se descreveu no capítulo anterior, além de outros indivíduos procedentes das diferentes áreas geográficas de amostra para tentar encontrar um marcador molecular diferenciador de populações. Assim, o estudo foi realizado a partir de 22 indivíduos de *A. rochei*, 8 do Mediterrâneo, 9 do Atlântico e 5 do Pacífico, e 1 indivíduo de *A. thazard*. As sequências obtidas estão acessíveis no GenBank/EMBL/DDBJ com os seguintes números de acesso: *A. thazard* AB193567; *A. rochei* AB193568 e AB193727 - AB193747. A análise das sequências revela a existência de 51 posições variáveis entre os indivíduos de *A. rochei* e 102 entre *A. rochei* e *A. thazard*. As transições oscilam entre 1-7, enquanto que as transversões variam entre 1-9, com 11 indels entre os indivíduos de *A. rochei*. Entre *A. rochei* e *A. thazard* encontram-se entre 26-31 transições, 23-29 transversões e 46 indels (Fig. 40).

O conteúdo médio de G+C em *A. rochei* é de 66,5% no fragmento ITS-1 /5,8S /ITS-2, com uma frequência média de bases de 16,1% (A), 35,7% (C), 30,8% (G) e 17,2% (T). Em *A. thazard* o conteúdo de G+C é de 67%, com uma frequência de bases de 15,6% (A), 36,1% (C), 30,9% (G) e 17,3% (T).

	11111111111222233445	67778899990000000111111
	22447801233577899357956366	900506578822346789156889
	706355353425647169671632527	108416951907965057011593
Med1	G-AGAGGGACTG-GGTC--CCCGTACA	GCA-GGCGCACTCCTCGGGCGGGC
Med2	.-.....G.-.....C....C.....
Med3	.-CACC.CC...-.....GGC....C.....
Med4	TC.....-.....	.TG.....C....C.A.....
Med5	.-.....T.....G..C....C.....
Med6A.....C....C.....
Med7	.-.....G.-.....TC....C.....A
Med8C.....	..AA.TATCTGTCT.-ATAAAA
Atl1	T.....C.....C....C.....
Atl2G.....C....C.....
Atl3C...G.....C....C.....
Atl4	.-C.CC.CC..C-.....C....C.....
Atl5G.....C.....C....C.....
Atl6T.....C....C.....
Atl7T.....GG.....	C.....
Atl8C.....GG.....C....C.....
Atl9CCC.....C....C.....
Pac1C.CC..G.....T....C....C.....
Pac2	T.....C.CC..G.....T....C....C.....
Pac3CGCCT.....T....C....C.....
Pac4	T.....C.CC.....T....C....C.....
Pac5A.....C.CC.....T....C....C.....
	ITS-1	ITS-2

Figura 40: Posiciones variables en *A. rochei* para la ITS-1 e ITS-2. Med se refiere a ejemplares del Mediterráneo, Atl del Atlántico y Pac del Pacífico.

Figura 40: Posições variáveis em *A. rochei* para a ITS-1 e ITS-2. Med refere-se a exemplares do Mediterrâneo, Atl do Atlântico e Pac do Pacífico.

Al estudiar la variabilidad genética por poblaciones se obtiene que π varía entre 0'0018 y 0'0067, y θ entre 0'0018 y 0'0099. Los valores del Pacífico (ambos 0'0018) son ligeramente más bajos que en la población Atlántica (0'0038 y 0'0050) y Mediterránea (0'0067 y 0'0099). El número de sitios polimórficos para el fragmento completo es de 33 para la población del Mediterráneo, 14 para la del Atlántico, y 5 para la del Pacífico (Tabla 9).

Para todos los individuos analizados de *A. rochei*, la región ITS-1 presenta un total de 27 sitios polimórficos. Hay que destacar que todos los individuos

Ao estudar a variabilidade genética por populações obtém-se que π varia entre 0'0018 e 0'0067, e θ entre 0'0018 e 0'0099. Os valores do Pacífico (ambos 0'0018) são ligeiramente mais baixos que na população Atlântica (0'0038 e 0'0050) e Mediterrânica (0'0067 e 0'0099). O número de sítios polimórficos para o fragmento completo é de 33 para a população do Mediterrâneo, 14 para a do Atlântico, e 5 para a do Pacífico (Tabela 9).

Em todos os indivíduos analisados de *A. rochei*, a região ITS-1 apresenta um total de 27 sítios polimórficos. É de destacar que todos os indivíduos

	ITS		
	MED	ATL	PAC
Sítios variables	33	14	5
π	0'0067	0'0038	0'0018
θ	0'0099	0'0050	0'0018

Tabla 9: Número de sitios variables, diversidad nucleotídica (π), y polimorfismo de nucleótido (θ) encontrados para las regiones ITS-1 e ITS-2 en las poblaciones Atlántica (ATL), Mediterránea (MED) y Pacífica (PAC).

Tabela 9: Número de sítios variáveis, diversidade nucleotídica (π), e polimorfismo de nucleótido (θ) encontrados para as regiões ITS-1 e ITS-2 na população Atlântica (ATL), Mediterrânica (MED) e Pacífica (PAC).

procedentes del Pacífico presentan en las posiciones 199 y 236 la inserción de una base C con respecto a los individuos procedentes de las regiones Atlántica y Mediterránea, comportándose de este modo como un excelente marcador molecular poblacional (Fig. 40 y 41). En la región ITS-2, las secuencias de *A. rochei* presentan 24 posiciones polimórficas. En la posición 866 se localiza una base T exclusiva de la población del Pacífico (Fig. 41).

El análisis filogenético de estas secuencias mediante el método de máxima parsimonia, considerando los indels como 5º estado, es capaz de definir una agrupación monofilética bien diferenciada y significativa (bootstrap 68%) para los individuos del Pacífico (Fig. 42).

Para determinar la existencia de diferencias genéticas entre las poblaciones analizadas se han calculado los valores de F_{ST} . El valor global de F_{ST} es de 0'075 ($P < 0'001$). Entre las poblaciones del Atlántico y Mediterráneo, el valor obtenido de F_{ST} (0'062; $P < 0'001$) es menor que entre las poblaciones del Mediterráneo y Pacífico (0'087; $P < 0'001$), o que entre las poblaciones de origen Atlántico y Pacífico (0'083; $P < 0'001$).

procedentes do Pacífico apresentam nas posições 199 e 236 a inserção de uma base C em relação aos indivíduos procedentes das regiões Atlântica e Mediterrânica, comportando-se assim como um excelente marcador molecular populacional (Fig. 40 e 41). Na região ITS-2, as sequências de *A. rochei* apresentam 24 posições polimórficas. Na posição 866 localiza-se uma base T exclusiva da população do Pacífico (Fig. 41).

A análise filogenética destas sequências mediante o método de MP, considerando os indels como 5º estado, é capaz de definir um agrupamento monofilético bem diferenciado e significativo (bootstrap 68%) para os indivíduos do Pacífico (Fig. 42).

Para determinar a existência de diferenças genéticas entre as populações analisadas calcularam-se os valores de F_{ST} . O valor global de F_{ST} é de 0,075 ($P < 0,001$). Entre as populações do Atlântico e Mediterrâneo, o valor obtido de F_{ST} (0,062; $P < 0,001$) é menor que entre as populações do Mediterrâneo e Pacífico (0,087; $P < 0,001$), ou que entre as populações de origem do Atlântico e Pacífico (0,083; $P < 0,001$).

MARCADORES MOLECULARES
MARCADORES MOLECULARES

	190	200	210	220	230	240	250	260	270
A. rochei Med 1	TCCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei Med 2	TCCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei Med 3	TCCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei Med 4	TCCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei Med 5	TCCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei Med 6	TCCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei Med 7	TCCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei Med 8	TCCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei ATL 1	CCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei ATL 2	CCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei ATL 3	CCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei ATL 4	CCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei ATL 5	CCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei ATL 6	CCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei ATL 7	TCCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei ATL 8	TCCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei ATL 9	CCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei PAC 1	CCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei PAC 2	CCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei PAC 3	CCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei PAC 4	CCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG
A. rochei PAC 5	CCCCCGGCCGAGGCAC	GC	CGGGGTAGGGGAA	ACCCG	CCCGCGCGGACCCCC	TC	CTTTTGT	CAGGACCTCG	TCCCGACCGGACGGG

Figura 41: Fragmento de la región ITS-1. Se muestran los dos indels que permiten diferenciar los individuos procedentes del Pacífico, junto a los de origen Atlántico-Mediterráneo. Med se refiere a ejemplares del Mediterráneo, Atl a ejemplares del Atlántico y Pac del Pacífico.

Figura 41: Fragmento da região ITS-1. Mostram-se os dois indels que permitem diferenciar os indivíduos procedentes do Pacífico, junto aos de origem Atlântico-Mediterrânica. Med refere-se a exemplares do Mediterrâneo, Atl a exemplares do Atlântico e Pac do Pacífico.

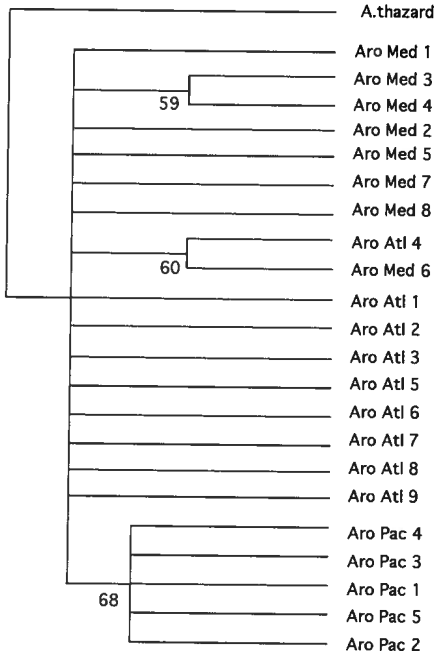


Figura 42: Árbol filogenético y valores de bootstrap obtenidos mediante el método de máxima parsimonia a partir de las secuencias de *A. rochei* correspondientes a la región ITS-1/5'8S/ITS-2. La especie *A. thazard* se incluyó como grupo externo.

Figura 42: Árvore filogenética e valores de bootstrap obtidos mediante o método de máxima parcimônia a partir das seqüências de *A. rochei* correspondentes à região ITS-1/5'8S/ITS-2. A espécie *A. thazard* incluiu-se como grupo externo.

4.3.3 Resultados en base a microsatélites

4.3.3.1 Caracterización de microsatélites

Los microsatélites empleados en este estudio se aislaron mediante un protocolo de enriquecimiento basado en la utilización de sondas específicas biotiniladas (Reddy et al., 2001; Funes et al., 2004). Este método sencillo de hibridación selectiva destaca por su alto rendimiento y eficiencia, ya que aproximadamente el 95% de los fragmentos que se analizan contienen un microsatélite. Del total de clones obtenidos se seleccionaron 6 clones correspondientes a los siguientes *loci*:

- 1- Aspp1-3: microsatélite dinucleótido puro (CA)
- 2- Aspp1-10: microsatélite compuesto: dinucleótido (CA) y tetranucleótido (CTCA)
- 3- Aspp2-38: microsatélite pentanucleótido (TTCTC) interrumpido
- 4- Aspp2-40: microsatélite compuesto: dinucleótido (TC) y dinucleótido (AC)
- 5- Aspp4-13: microsatélite dinucleótido (CT) interrumpido
- 6- Aspp4-17: microsatélite compuesto: dinucleótido (TG) interrumpido por un dinucleótido (TA), y dinucleótido (CG) (Tabla 10).

4.3.3 Resultados com base nos microssatélites

4.3.3.1 Caracterização de microssatélites

Os microssatélites utilizados neste estudo isolaram-se mediante um protocolo de enriquecimento baseado na utilização de sondas específicas biotiniladas (Reddy et al., 2001; Funes et al., 2004). Este método simples de hibridação selectiva destaca-se pelo seu alto rendimento e eficiência, visto que aproximadamente 95% dos fragmentos que se analisam contêm um microssatélite. Do total de clones obtidos seleccionaram-se 6 clones correspondentes aos seguintes *loci*:

- 1- Aspp1-3: microssatélite dinucleótido puro (CA)
- 2- Aspp1-10: microssatélite composto: dinucleótido (CA) e tetranucleótido (CTCA)
- 3- Aspp2-38: microssatélite pentanucleótido (TTCTC) interrumpido
- 4- Aspp2-40: microssatélite composto: dinucleótido (TC) e dinucleótido (AC)
- 5- Aspp4-13: microssatélite dinucleótido (CT) interrumpido
- 6- Aspp4-17: microssatélite composto: dinucleótido (TG) interrumpido por um dinucleótido (TA), e dinucleótido (CG) (Tabela 10).

Locus	Motivo
Aro1-3	(TG) ¹⁵ (TCAC)(TG) ⁴
Aro1-10	(CA) ₄ (CTCA) ₃ (CA) ₂₃
Aro2-38	(TTCTC) ₉ (CTCTC)(TTCTC) ₉
Aro2-40	(TC) ₂₂ (TT)(TC) ₇ (AC) ₅
Aro4-13	(CT) ₄ (CC)(CT) ₁₆
Aro4-17	(TG) ₄ (TA)(TG) ₁₁ (CG) ₃ (TG) ₂

Tabla 10: *Locí* microsatélites caracterizados en melva. Se indica el tipo de repetición
 Tabela 10: *Locí* microsatélites caracterizados en melva. Se indica el tipo de repetición

4.3.3.2 Polimorfismo genético

Los resultados que se van a presentar a continuación se derivan del análisis de un total 78 individuos de *A. rochei* pertenecientes a las poblaciones del Mediterráneo (22), Atlántico (31) y Pacífico (25). Los valores de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) oscilan entre 0'38-0'75 y 0'73-0'96, respectivamente (Tabla 11).

4.3.3.2 Polimorfismo genético

Os resultados que se apresentam em seguida derivam da análise de um total de 78 indivíduos de *A. rochei* pertencentes às populações do Mediterrâneo (22), Atlântico (31) e Pacífico (25). Os valores de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) oscilam entre 0,38-0,75 e 0,73-0,96, respectivamente (Tabela 11).

LOCUS	N	K	Rango alelos (pb)	H_o	H_e
Aspp1-3	78	13	134-160	0'64	0'82
Aspp1-10	78	34	173-273	0'75	0'94
Aspp2-38	78	25	116-256	0'59	0'93
Aspp2-40	78	16	154-196	0'38	0'73
Aspp4-13	78	35	108-190	0'62	0'96
Aspp4-17	78	34	104-276	0'43	0'93

Tabla 11: *Loci* microsatélites, N: nº ejemplares analizados, K: nº de alelos, Rango de alelos , H_o : heterocigosidad observada, H_e : heterocigosidad esperada. Fuente: Catanese et al., 2007b
Tabela 11: *Loci* microsatélites, N: nº exemplares analizados, K: nº de alelos, Tipo de alelos, H_o : heterozigosidade observada, H_e : heterozigosidade esperada. Fonte: Catanese et al., 2007b

El *locus* más variable es Aspp4-13 (35 alelos) y el menos variable Aspp1-3 (13 alelos). Los alelos más frecuentes para el *locus* Aspp1-3 son 148 y 150 pb; para el *locus* Aspp1-10, 185, 187, 191, 193 y 199 pb; para el *locus* Aspp2-38, 160 y 162 pb; para el *locus* Aspp2-40, 181, 196 y 206 pb; para el *locus* Aspp4-13, 122, 124, 132, 144 y 150 pb; y para el *locus* Aspp4-17, 118, 120, 122, 210 y 224 pb (Fig. 43). En la figura 44 se puede observar que en el *locus* Aspp1-3 los alelos más frecuentes (148 y 150) se presentan invertidos entre la población del Pacífico y la del Mediterráneo. Lo mismo ocurre entre el tamaño alélico de 185/187 y 191/193 para el *locus* Aspp1-10. El *locus* Aspp2-40 presenta

O *locus* mais variável é Aspp4-13 (35 alelos) e o menos variável Aspp1-3 (13 alelos). Os alelos mais frequentes para o *locus* Aspp1-3 são 148 e 150 pb; para o *locus* Aspp1-10, 185, 187, 191, 193 e 199 pb; para o *locus* Aspp2-38, 160 e 162 pb; para o *locus* Aspp2-40, 181, 196 e 206 pb; para o *locus* Aspp4-13, 122, 124, 132, 144 e 150 pb; e para o *locus* Aspp4-17, 118, 120, 122, 210 e 224 pb (Fig. 43). Nas figura 44 pode observar-se que no *locus* Aspp-1 os alelos mais frequentes (148 e 150) apresentam-se invertidos entre a população do Pacífico e a do Mediterrâneo. O mesmo acontece entre o tamanho alélico de 185/187 e 191/193 para o *locus* Aspp1-10. O *locus* Aspp2-40

la frecuencia más alta en los alelos de tamaño 160 y 162 pb en las tres poblaciones, aunque cabe destacar la existencia de alelos únicos de tamaño mayor en la población del Mediterráneo y Atlántico. En el *locus* Aspp4-17, los alelos de menor tamaño son más frecuentes en las poblaciones Atlánticas y Mediterránea, mientras que los de tamaño superior se encuentran preferentemente en la población del Pacífico. En los otros dos *loci* la distribución alélica es bastante uniforme entre las tres poblaciones. Dicha figura también muestra la presencia de un cierto número de alelos privados (específicos de población),

apresenta a frequência mais alta nos alelos de tamanho 160 e 162 pb nas três populações, embora se deva destacar a existência de alelos únicos de maior tamanho na população do Mediterrâneo e Atlântico. No *locus* Aspp4-17, os alelos de menor tamanho são mais frequentes na população Atlântica e Mediterrânica, enquanto que os de tamanho superior encontram-se preferencialmente na população do Pacífico. Nos outros dois *loci*, a distribuição alélica é bastante uniforme entre as três populações. Tais figuras mostra também a presença de um certo número de alelos privados (específicos de população), que são

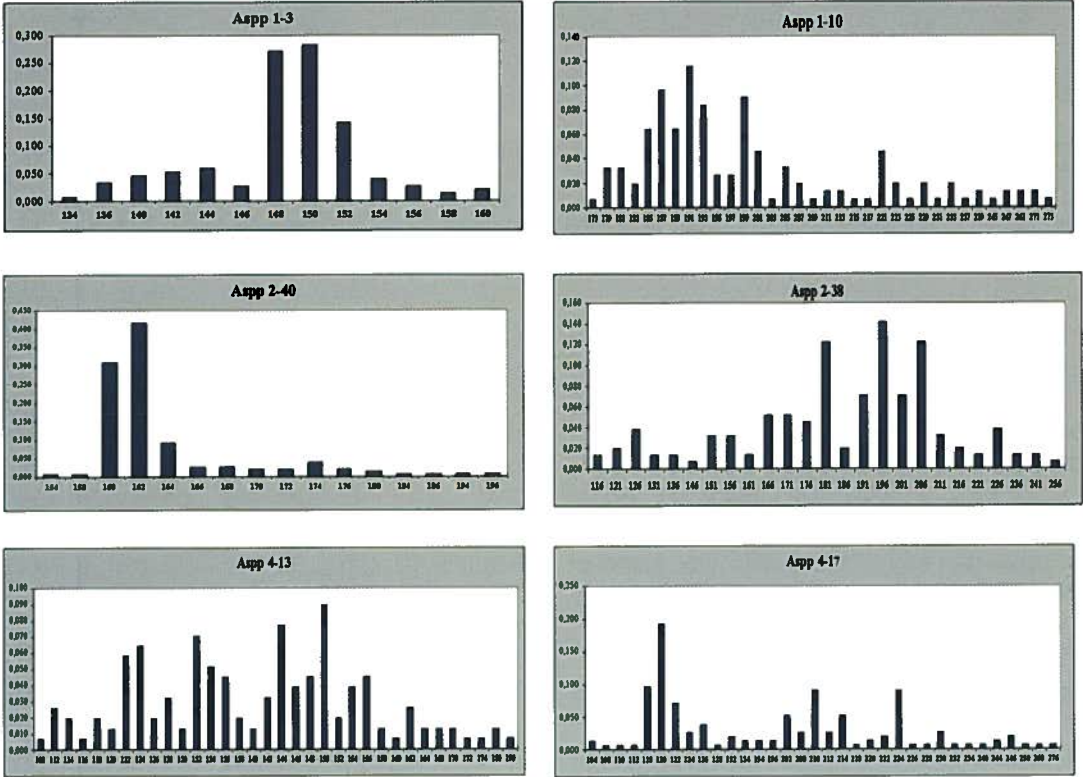


Figura 43: Frecuencia alélica para cada uno de los microsatélites analizados.
 Figura 43: Frequência alélica para cada um dos microssatélites analisados.

que es elevado en el *locus* Aspp1-10 para las muestras del Atlántico, el *locus* Aspp4-17 para la población del Pacífico, y en los *loci* Aspp2-40 y Aspp4-13 en la población Mediterránea. Tanto la población del Mediterráneo como la del Atlántico presentan 25 alelos únicos entre los 6 *loci*, mientras que la población del Pacífico presenta solamente 17. La frecuencia de alelos privados no está relacionada con el número de individuos analizados de cada población.

elevados no *locus* Aspp1-10 nas amostras do Atlântico, no *locus* Aspp4-17 na população do Pacífico, e nos *loci* Aspp2-40 e Aspp4-13 na população Mediterrânica. Tanto a população do Mediterrâneo como a do Atlântico apresentam 25 alelos únicos entre os 6 *loci*, enquanto que a população do Pacífico apresenta apenas 17. A frequência de alelos privados não está relacionada com o número de indivíduos analisados de cada população.

En la población de Mediterráneo los seis *loci* presentan una desviación significativa del equilibrio de H-W. Igual resultado se obtiene en la del Atlántico, excepto para el *locus* Aspp1-3, mientras que en la población del Pacífico solamente se encuentra en equilibrio el *locus* Aspp2-38. En todos los casos se detecta una deficiencia de heterocigotos (Tabla 13). Una de las posibles causas del déficit de heterocigotos en una población es la existencia de alelos nulos. En este caso, la frecuencia de alelos nulos varía entre 0'111 y 0'360 para el *locus* Aspp1-3 y Aspp4-17, respectivamente (Tabla 12). Como se puede observar en dicha Tabla, los *loci* Aspp2-40 y Aspp4-17 presentan un valor de frecuencia de alelos nulos alta (> 0'3) con respecto al resto de *loci*.

Na população do Mediterrâneo os seis *loci* apresentam um desvio significativo do equilíbrio de H-W. Obtém-se o mesmo resultado na do Atlântico, excepto para o *locus* Aspp1-3, enquanto que na população do Pacífico apenas se encontra em equilíbrio o *locus* Aspp2-38. Em todos os casos é detectada uma deficiência de heterozigotos (Tabela 13). Uma das possíveis causas do défice de heterozigotos numa população é a existência de alelos nulos. Neste caso, a frequência de alelos nulos varia entre 0,111 e 0,360 para o *locus* Aspp1-3 e Aspp4-17, respectivamente (Tabela 12). Como se pode observar na tabela, os *loci* Aspp2-40 e Aspp4-17 apresentam um valor de frequência de alelos nulos alta (> 0'3) em relação ao resto de *loci*.

4.3.3.3 Diferenciación poblacional

Los resultados de la AMOVA muestran como el 98% de la variabilidad genética se debe a diferencias entre los individuos dentro de las poblaciones. El valor global de F_{ST} (0'02; $P < 0'01$) indica diferenciación genética moderada aunque significativa entre las poblaciones. Al comparar las poblacio-

4.3.3.3 Diferenciação populacional

Os resultados da AMOVA mostram como 98% da variabilidade genética se deve a diferenças entre os indivíduos dentro das populações. O valor global de F_{ST} (0,02; $P < 0,01$) indica diferenciação genética moderada, embora significativa entre as populações. Ao comparar as populações

LOCUS		POBLACIÓN			LOCUS		POBLACIÓN		
Aspp1-3	Pacífico	Atlántico	Mediterráneo	Aspp2-40	Pacífico	Atlántico	Mediterráneo		
134	0'02*	0'00	0'00	154	0'00	0'00	0'02*		
136	0'04	0'03	0'02	158	0'00	0'02*	0'00		
140	0'04	0'03	0'04	160	0'40	0'31	0'20		
142	0'02	0'05	0'09	162	0'46	0'32	0'48		
144	0'06	0'06	0'04	164	0'06	0'13	0'07		
146	0'04	0'00	0'04	166	0'00	0'06*	0'00		
148	0'14	0'22	0'47	168	0'02	0'02	0'05		
150	0'40	0'32	0'09	170	0'02	0'00	0'05		
152	0'16	0'18	0'06	172	0'02	0'03	0'00		
154	0'00	0'05	0'06	174	0'02	0'08	0'00		
156	0'04	0'02	0'02	176	0'00	0'02	0'05		
158	0'00	0'02	0'02	180	0'00	0'00	0'02*		
160	0'04	0'02	0'00	184	0'00	0'00	0'02*		
				186	0'00	0'00	0'02*		
				194	0'00	0'00	0'02*		
				196	0'00	0'02*	0'00		
Aspp1-10	Pacífico	Atlántico	Mediterráneo	Aspp4-13	Pacífico	Atlántico	Mediterráneo		
173	0'00	0'02*	0'00	108	0'00	0'00	0'02*		
179	0'00	0'02	0'09	112	0'04	0'02	0'02		
181	0'00	0'06	0'02	114	0'04	0'02	0'00		
183	0'04	0'02	0'00	116	0'00	0'00	0'02*		
185	0'02	0'06	0'11	118	0'00	0'02	0'05		
187	0'14	0'11	0'02	120	0'00	0'03*	0'00		
189	0'06	0'05	0'05	122	0'06	0'06	0'05		
191	0'22	0'06	0'07	124	0'10	0'06	0'02		
193	0'06	0'05	0'16	126	0'00	0'05*	0'00		
195	0'04	0'03	0'00	128	0'02	0'05	0'02		
197	0'04	0'02	0'02	130	0'04*	0'00	0'00		
199	0'08	0'05	0'16	132	0'08	0'05	0'09		
201	0'02	0'03	0'09	134	0'10	0'03	0'02		
203	0'00	0'00	0'02*	136	0'10	0'02	0'02		
205	0'02	0'03	0'00	138	0'04	0'00	0'09		
207	0'04	0'00	0'07	140	0'02	0'02	0'00		
209	0'04	0'02	0'00	142	0'04	0'03	0'02		
211	0'00	0'02*	0'00	144	0'02	0'13	0'07		
213	0'00	0'02	0'02	146	0'06	0'03	0'02		
215	0'04*	0'00	0'00	148	0'06	0'05	0'02		
217	0'02*	0'00	0'00	150	0'06	0'15	0'05		
221	0'04	0'06	0'02	152	0'00	0'00	0'07*		
223	0'00	0'05*	0'00	154	0'00	0'10	0'00		
225	0'00	0'02*	0'00	156	0'04	0'05	0'05		
229	0'02	0'03	0'00	158	0'00	0'00	0'05*		
231	0'00	0'00	0'02*	160	0'02*	0'00	0'00		
233	0'00	0'02	0'07	162	0'02	0'00	0'07		
237	0'00	0'02*	0'00	164	0'00	0'02	0'02		
239	0'00	0'03*	0'00	168	0'00	0'00	0'05*		
245	0'00	0'02*	0'00	170	0'00	0'00	0'05*		
247	0'04*	0'00	0'00	172	0'00	0'00	0'02*		
261	0'00	0'03*	0'00	174	0'00	0'00	0'02*		
271	0'00	0'03*	0'00	180	0'02	0'02	0'00		
273	0'02*	0'00	0'00	190	0'00	0'02*	0'00		

MARCADORES MOLECULARES
MARCADORES MOLECULARES

LOCUS		POBLACIÓN			LOCUS		POBLACIÓN		
Aspp2-38	Pacífico	Atlántico	Mediterráneo	Aspp4-17	Pacífico	Atlántico	Mediterráneo		
116	0'00	0'00	0'05*	104	0'00	0'03*	0'00	0'00	
121	0'00	0'03	0'02	108	0'02*	0'00	0'00	0'00	
126	0'00	0'06	0'04	110	0'00	0'02*	0'00	0'00	
131	0'00	0'00	0'05*	112	0'00	0'02*	0'00	0'00	
138	0'00	0'03*	0'00	118	0'00	0'16	0'11	0'11	
148	0'02*	0'00	0,00	120	0'14	0'16	0'30	0'30	
151	0'02	0'06	0,00	122	0'02	0'11	0'07	0'07	
156	0'04	0'02	0'05	124	0'00	0'06*	0'00	0'00	
161	0'02	0'02	0'00	126	0'00	0'10*	0'00	0'00	
166	0'02	0'06	0'07	128	0'00	0'00	0'02*	0'02*	
171	0'06	0'05	0'05	132	0'00	0'03	0'02	0'02	
176	0'06	0'05	0'02	134	0'00	0,00	0'05*	0'05*	
181	0'14	0'10	0'14	154	0'00	0'03*	0'00	0'00	
186	0'02	0'00	0'05	196	0'04*	0'00	0'00	0'00	
191	0'10	0'08	0'05	202	0'04	0'08	0'02	0'02	
196	0'16	0'16	0'09	208	0'06	0'02	0'00	0'00	
201	0'06	0'06	0'09	210	0'12	0'1	0'05	0'05	
206	0'12	0'15	0'09	212	0,00	0'00	0'09*	0'09*	
211	0'02	0'03	0'05	214	0'14*	0'00	0'02	0'02	
216	0'04	0'00	0'02	218	0'02*	0'00	0'00	0'00	
221	0'00	0,00	0'05*	220	0'00	0'00	0'05	0'05	
226	0'04	0'06	0'00	222	0'04	0'02	0'00	0'00	
236	0'04*	0'00	0,00	224	0'22	0'02	0'05	0'05	
241	0'00	0,00	0'05*	226	0'00	0'02*	0'00	0'00	
256	0'00	0'02*	0'00	228	0'00	0'02*	0'00	0'00	
				230	0'00	0'02	0'07	0'07	
				232	0'00	0'02	0'00	0'00	
				234	0'02*	0'00	0'00	0'00	
				240	0'00	0'00	0'02*	0'02*	
				244	0'00	0'00	0'05*	0'05*	
				246	0'06*	0'00	0'00	0'00	
				250	0'02*	0'00	0'00	0'00	
				260	0'00	0'00	0'02*	0'02*	
				276	0'02*	0'00	0'00	0'00	

Figura 44: Frecuencia de alelos por *locus* y población. En negrita se indican los alelos privados de población.

Figura 44: Frequência de alelos por *locus* e população. A bold indicam-se os alelos privados de população.

LOCUS	Frecuencias Alelos nulos
Aspp 1-3	0'111
Aspp 1-10	0'117
Aspp 2-38	0'223
Aspp 2-40	0'327
Aspp 4-13	0'206
Aspp 4-17	0'360

Tabla 12: Frecuencia de alelos nulos por *locus*.

Tabela 12: Frequência de alelos nulos por *locus*.

Loci y parámetros	POBLACIÓN		
	MEDITERRÁNEO	ATLÁNTICO	PACÍFICO
Aspp 1-3			
N	22	31	25
K	11	11	11
Het	14	25	15
Hom	8	6	10
Ho	0'63	0'67	0'60
He	0'77	0'83	0'82
P	0'016*	0'276 ns	0'002**
Aspp 1-10			
N	22	31	25
K	16	27	19
Het	16	25	18
Hom	6	6	7
Ho	0'72	0'77	0'76
He	0'92	0'96	0'92
P	0'034*	0'012*	0'001**
Aspp 2-38			
N	22	31	25
K	18	17	17
Het	14	15	18
Hom	8	16	7
Ho	0'63	0'45	0'72
He	0'95	0'94	0'92
P	0'000***	0'000***	0'085 ns
Aspp 2-40			
N	22	31	25
K	11	10	7
Het	10	15	6
Hom	12	16	19
Ho	0'45	0'45	0'24
He	0'75	0'80	0'63
P	0'000***	0'000***	0'000***
Aspp 4-13			
N	22	31	25
K	25	22	20
Het	17	17	15
Hom	5	14	10
Ho	0'77	0'54	0'60
He	0'97	0'94	0'96
P	0'006**	0'000***	0'000***
Aspp 4-17			
N	22	31	25
K	16	19	15
Het	10	10	13
Hom	12	21	12
Ho	0'45	0'35	0'52
He	0'92	0'92	0'91
P	0'001**	0'000***	0'000***
Media			
Ho	0'60	0'53	0'57
He	0'88	0'89	0'86

Tabla 13: Variabilidad genética de los 6 loci microsatélites para las tres poblaciones.

N número de muestras, K número de alelos, Het número de heterocigotos, Hom número de homocigotos, Ho heterocigosidad observada, He heterocigosidad esperada, P probabilidad del test exacto para el equilibrio de Hardy-Weinberg. Las desviaciones significativas son: * $P < 0'05$, ** $P < 0'01$, *** $P < 0'001$, ns $P > 0'05$.

Tabela 13: Variabilidade genética dos 6 loci microssatélites para as três populações.

N número de amostras, K número de alelos, Het número de heterozigotos, Hom número de homocigotos, Ho heterozigosidade observada, He heterozigosidade esperada, P probabilidade do teste exacto para o equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os desvios significativos são: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, ns

nes entre sí, se observa que los valores de F_{ST} varían entre 0'015 entre Pacífico y Atlántico y 0'027 entre Pacífico y Mediterráneo. En todos los casos el valor de P es significativo ($P < 0'01$)

entre si, observa-se que os valores de F_{ST} variam entre 0,015 entre Pacífico e Atlántico e 0,027 entre Pacífico e Mediterráneo. Em todos os casos o valor de P é significativo ($P < 0,01$).

La distancia genética de Nei entre poblaciones genera una matriz en la que se puede observar cómo las poblaciones resultan genéticamente más divergentes en relación a su lejanía geográfica. Así, la mayor distancia se obtiene al comparar la población del Mediterráneo con la del Pacífico (0'354); por el contrario, la distancia menor aparece entre las poblaciones del Atlántico y Pacífico (0'183). La comparación de las poblaciones Atlántica y Mediterránea resulta en un valor intermedio de 0'285 (Tabla 14).

A distância genética de Nei entre populações gera uma matriz na qual se pode observar como as populações resultam geneticamente mais divergentes em relação à sua distância geográfica. Assim, a maior distância obtém-se ao comparar a população do Mediterráneo com a do Pacífico (0,354); pelo contrário, a distância menor aparece entre as populações do Atlántico e Pacífico (0,0183). A comparação das populações Atlántica e Mediterrânea resulta num valor intermédio de 0,285 (Tabela 14).

	MEDITERRÁNEO	ATLÁNTICO	PACÍFICO
MEDITERRÁNEO	**	0'752	0'702
ATLÁNTICO	0'285	**	0'833
PACÍFICO	0'354	0'183	**

Tabla 14 Abajo, distancia genética de Nei. – Arriba, Identidad genética.
Tabela 14 Em baixo, distância genética de Nei. – Em cima, Identidade genética.

4.3.4 Conclusiones

Las poblaciones de *A. rochei* presentan a nivel mitocondrial dos grupos filogenéticamente separados (mitotipo I y II). El mitotipo I está principalmente representado en el Mediterráneo y ausente en el Pacífico. Teniendo en cuenta que los valores de π y θ tanto para la región de control (0'019 y 0'025, respectivamente) como para el gen citocromo *b* (0'018 y 0'031, respectivamente) son inferiores en el mitotipo II y que la red mutacional del gen citocromo *b* muestra una estructura radial en relación a los dos haplotipos más abundantes (ArocytbH1 y ArocytbH7), podemos considerar este mitotipo de evolución más reciente.

Así, la aparición de estos dos linajes mitocondriales se podría interpretar por una divergencia alopátrica debida a la formación de una barrera geográfica Atlántico-Mediterránea. La desaparición de dicha barrera, explicaría la coexistencia actual de ambos mitotipos en las áreas geográficas Atlántica y Mediterránea. La glaciación ocurrida durante el Cuaternario habría provocado un descenso del nivel del mar entre 100-200 m y el cierre parcial o total del Estrecho (Peres, 1985), causando así grandes restricciones de movimiento y de intercambio genético entre poblaciones del Atlántico y Mediterráneo. La posterior desaparición de esta barrera habría permitido de nuevo el intercambio genético entre dichas áreas. A este respecto hay que indicar que este fenómeno se ha observado en otros túnidos como *T. thynnus*, *S. scombrus* y *S. sarda*, donde el análisis filogenético de la región de control en el área Atlántico-Mediterránea muestra la existencia de dos linajes altamente divergentes

4.3.4 Conclusões

As populações de *A. rochei* apresentam a nível mitocondrial dois grupos filogeneticamente separados (genótipo I e II). O genótipo I está principalmente representado no Mediterrâneo e ausente no Pacífico. Tendo em conta que os valores de π e θ tanto para a região de controlo (0,019 e 0,025, respectivamente) como para o gene citocromo *b* (0,018 e 0,031, respectivamente) são inferiores no genótipo II e que a rede mutacional do gene citocromo *b* mostra uma estrutura radial em relação aos dois haplótipos mais abundantes (ArocytbH1 e ArocytbH7), podemos considerar este genótipo de evolução mais recente.

Assim, o aparecimento destas duas linhagens mitocondriais poderia interpretar-se como uma divergência alopátrica debida à formação de uma barreira geográfica Atlântico-Mediterrânica. O desaparecimento de tal barreira explicaria a coexistência actual de ambos os genótipos nas áreas geográficas Atlântica e Mediterrânica. A glacição ocorrida durante o Quaternário teria provocado uma descida do nível do mar entre 100-200 m e o encerramento parcial ou total do Estreito (Peres, 1985), causando assim grandes restrições de movimento e de fluxo genético entre populações do Atlântico e Mediterrâneo. O posterior desaparecimento desta barreira teria permitido de novo o intercâmbio genético entre tais áreas. A este respeito deve-se indicar que este fenómeno foi observado em outros tunídeos como *T. thynnus*, *S. scombrus* e *S. sarda*, nos quais a análise filogenética da região de controlo na área Atlântico-Mediterrânica mostra a existência de

(Viñas et al., 2003; Nesbø et al., 2000; Viñas et al., 2004b).

La población del Pacífico muestra importantes diferencias con respecto a las poblaciones Atlántica y Mediterránea tanto a nivel mitocondrial como nuclear. Todos los haplotipos del gen citocromo *b* encontrados, a excepción del AroCytbH26, resultan ser exclusivos. Por otro lado, todos los haplotipos de la región de control, a excepción del AroCRH29, son exclusivos y únicos de esta población. En todos los casos los haplotipos del Pacífico pertenecen al mitotipo II. La existencia de un único mitotipo en este área se podría explicar por un aislamiento geográfico entre cuencas oceanográficas. Una reducción del nivel marino, ocurrida hace cerca de 3-3'5 millones de años (Coates et al., 1992), podría haber generado una separación entre estas dos cuencas, determinando así una moderada diferenciación molecular a nivel mitocondrial. Diversos autores han descrito una distribución asimétrica entre océanos y la existencia de subestructuras genéticas en otros escómbridos (Alvarado Bremer et al., 1998; Viñas et al., 2004a).

Debemos considerar además que las secuencias de las regiones ITS-1 e ITS-2 se caracterizan por la existencia de una unidad exclusiva del área del Pacífico. El análisis filogenético permite identificar los individuos procedentes del Pacífico en una rama separada y significativa. Mecanismos de evolución concertada habrían favorecido la homogeneización y fijación de estas unidades en la población. Dicha característica convierte a las regiones ITS-1 e ITS-2 en buenos marcadores moleculares poblacionales.

duas linhagens altamente divergentes (Viñas et al., 2003; Nesbø et al., 2000; Viñas et al., 2004b).

A população do Pacífico mostra diferenças importantes em relação às populações Atlântica e Mediterrânica, tanto a nível mitocondrial como nuclear. Todos os haplótipos do gene citocromo *b* encontrados, com excepção do AroCytbH26, demonstram ser exclusivos. Por outro lado, todos os haplótipos da região de controlo, com excepção do AroCRH29, são exclusivos e únicos desta população. Em todos os casos os haplótipos do Pacífico pertencem ao genótipo II. A existência de um único genótipo nesta área poderia explicar-se por um isolamento geográfico entre bacias geográficas. Uma redução do nível do mar, ocorrida há cerca de 3-3,5 milhões de anos (Coates et al., 1992), poderia ter gerado uma separação entre estas duas bacias, determinando assim uma moderada diferenciação molecular a nível mitocondrial. Diversos autores descreveram uma distribuição assimétrica entre oceanos e a existência de subestruturas genéticas noutros escombrídeos (Alvarado Bremer et al., 1998; Viñas et al., 2004a).

Devemos considerar, além disso, que as sequências das regiões ITS-1 e ITS-2 se caracterizam pela existência de uma unidade exclusiva da área do Pacífico. A análise filogenética permite identificar os indivíduos procedentes do Pacífico num ramo separado e significativo. Mecanismos de evolução concertada teriam favorecido a homogeneização e fixação destas unidades na população. Tal característica converte as regiões ITS-1 e ITS-2 em bons marcadores moleculares populacionais.

Los resultados anteriores vienen avallados por el estudio de microsatélites, que muestran, en el caso de la población del Pacífico, un elevado número de alelos privados.

Collette y Aadland (1996), basándose en criterios morfológicos y merísticos, describen la existencia de la subespecie *A. rochei eudorax* ubicada en la región oriental del Pacífico. Todos los resultados moleculares, demuestran una clara diferenciación tanto a nivel mitocondrial como nuclear de los individuos del Pacífico respecto a las demás poblaciones investigadas, apoyando la hipótesis sobre la existencia de esta subespecie. En este sentido, los resultados muestran que la región ITS-1 podría utilizarse como marcador molecular para la identificación de los individuos incluidos en esta subespecie.

Las poblaciones del Atlántico y del Mediterráneo no presentan diferencias genéticas significativas. Tal ausencia de diferencias se podría explicar por un flujo genético elevado entre poblaciones. Por ello, hay que señalar el carácter altamente migratorio de los túnidos. Este comportamiento está probablemente estimulado por la búsqueda de aguas cálidas para la reproducción, lo que favorece el movimiento de los individuos entre el Océano Atlántico y el Mar Mediterráneo (De la Serna et al., 2004). Además, el flujo genético entre poblaciones puede verse favorecido como resultado del transporte de alevines por las corrientes marinas a través del Estrecho de Gibraltar. Hipótesis similares han sido ya propuestas en estudios de *T. thynnus*, *T. alalunga* y *S. japonicus* (Viñas et al., 2003; Viñas et al., 2004b; Zardoya et al., 2004). Por el

Os resultados anteriores são confirmados pelo estudo de microsatélites, que mostram, no caso da população do Pacífico, um elevado número de alelos específicos.

Collette y Aadland (1996), baseándose em critérios morfológicos e merísticos, descrevem a existência da subespecie *A. rochei eudorax* localizada na região oriental do Pacífico. Todos os resultados moleculares demonstram uma clara diferenciação tanto a nível mitocondrial como nuclear dos indivíduos do Pacífico em relação às restantes populações investigadas, apoiando a hipótese sobre a existência desta subespecie. Neste sentido, os resultados mostram que a região ITS-1 se poderia utilizar como marcador molecular para a identificação dos indivíduos incluídos nesta subespecie.

As populações do Atlântico e do Mediterrâneo não apresentam diferenças genéticas significativas. Tal ausência de diferenças poderia explicar-se por um fluxo genético elevado entre populações. Por este motivo, é de assinalar o carácter altamente migratório dos tunídeos. Este comportamento é provavelmente estimulado pela procura de águas quentes para a reprodução, o que favorece o movimento dos indivíduos entre o Oceano Atlântico e o Mar Mediterrâneo (De la Serna et al., 2004). Além disso, o fluxo genético entre populações pode ver-se favorecido como resultado do transporte de alevins pelas correntes marítimas através do Estreito de Gibraltar. Hipóteses semelhantes foram já propostas em estudos de *T. thynnus*, *T. alalunga* e *S. japonicus* (Viñas et al., 2003; Viñas et al., 2004b; Zardoya et al., 2004). Pelo contrário, existe uma clara diferencia-

contrario, existe una clara diferenciación de la población del Pacífico con respecto a las poblaciones Atlántica y Mediterránea. Las diferencias moleculares existentes se podrían explicar por un efecto de aislamiento por distancia, resultado de la separación de las poblaciones en cuencas oceano-gráficas distintas. Tal hipótesis ha servido de base para explicar las diferencias entre poblaciones en otras especies de escómbridos (Chow y Kishino, 1995; Viñas et al., 2004a).

4.4.- Aplicación de marcadores moleculares en la identificación de las especies de melva (*Auxis* spp.)

4.4.1 La problemática de las conservas de pescado

En los últimos años estamos siendo testigos de un fenómeno de globalización en los mercados. Tal globalización ha supuesto, sin lugar a dudas, una revolución para el consumidor, en tanto en cuanto tiene a su disposición una amplísima variedad de productos de orígenes muy diversos. Paralelamente, el consumidor es cada vez más selectivo en todo lo referente a la calidad del producto que va a adquirir, exigiendo cada vez con más fuerza productos debidamente identificados y etiquetados. Todos estos fenómenos han sido especialmente experimentados en el área de los productos frescos y procesados de pescado, y muy en particular en lo referente a los productos en conserva.

Las conservas de pescado representan un enorme problema cuando se habla de identificación y autenticación de

ção da população do Pacífico em relação às populações Atlântica e Mediterrânea. As diferenças moleculares existentes poderiam explicar-se por um efeito de isolamento por distância, resultado da separação das populações em bacias geográficas diferentes. Tal hipótese serviu de base para explicar as diferenças entre populações noutras espécies de escombrídeos (Chow e Kishino, 1995; Viñas et al., 2004a).

4.4.- Aplicação de marcadores moleculares na identificação das espécies de judeu (*Auxis* spp.)

4.4.1 A problemática das conservas de peixe

Nos últimos anos temos testemunhado um fenómeno de globalização nos mercados. Tal globalização supôs, sem dúvida, uma revolução para o consumidor, pois tem à sua disposição uma amplíssima variedade de produtos de origens muito diversas. Paralelamente, o consumidor é cada vez mais selectivo em tudo o que se refere à qualidade do produto que vai adquirir, exigindo cada vez com mais força produtos devidamente identificados e rotulados. Todos estes fenómenos foram experimentados especialmente na área dos produtos frescos e peixes processados, e muito em particular no que se refere aos produtos de conserva.

As conservas de peixe representam um enorme problema quando se fala de identificação e autenticação de espécies. Devido à ausência das características morfológicas tais como

especies. Debido a la ausencia de las características morfológicas tales como forma, tamaño o apariencia, eliminadas durante el procesamiento, el consumidor no puede identificar la especie de pescado cuando en el producto final se le presenta solamente una pequeña porción del animal. Ante esta situación, los científicos han intentado a lo largo de las dos últimas décadas diseñar técnicas que pudiesen ser aplicadas por parte de los laboratorios implicados en el control de los alimentos. Estas metodologías se basaron, en un primer momento, en el análisis comparativo de los patrones de proteínas hidrosolubles de las muestras problema con los obtenidos a partir de muestras bien identificadas de la especie en cuestión. En caso de coincidir tales patrones, se garantizaba la autenticidad del producto. Sin embargo, este tipo de análisis presentan grandes inconvenientes para poder ser aplicadas de forma rutinaria, puesto que en general tienen un alto coste, requieren de un cierto tiempo para obtener el resultado final, aparte de la propia complejidad técnica. Además, no son apropiadas para las conservas de pescado, puesto que el tratamiento térmico al que se someten las latas para la esterilización del contenido provoca la desnaturalización irreversible de las proteínas, de forma que ya no pueden ser examinadas mediante técnicas que las analizan en su estado nativo.

El desarrollo de la biología molecular ha supuesto un importante hito en el campo de la identificación de especies, permitiendo el diseño de metodologías basadas en el análisis del ADN. Es fácil entender que las diferencias morfológicas entre especies son un reflejo de las diferencias genéticas

forma, tamanho e aparência, eliminadas durante o processamento, o consumidor não pode identificar a espécie de peixe quando no produto final lhe é apresentado apenas uma pequena porção do animal. Perante esta situação, os científicos tentaram ao longo das duas últimas décadas desenvolver técnicas que pudessem ser aplicadas pelos laboratórios envolvidos no controlo dos alimentos. Estas metodologias basearam-se, num primeiro momento, na análise comparativa dos padrões de proteínas hidrossolúveis das amostras problema com os obtidos a partir de amostras bem identificadas da espécie em questão. No caso de que tais padrões coincidissem, garantia-se a autenticidade do produto. No entanto, este tipo de análises apresenta grandes inconvenientes para poderem ser aplicadas de forma rotineira, visto que em geral têm um custo elevado, requerem um certo tempo para obter o resultado final, à parte da própria complexidade técnica. Além disso, não são apropriadas para as conservas de peixe, visto que o tratamento térmico ao qual se submetem as latas para a esterilização do conteúdo provoca a desnaturalização irreversível das proteínas, de forma que já não podem ser examinadas mediante técnicas que as analisem no seu estado nativo.

O desenvolvimento da biologia molecular supôs um grande marco no campo da identificação das espécies, permitindo a criação de metodologias baseadas na análise do DNA. É fácil entender que as diferenças morfológicas entre espécies são um reflexo das diferenças genéticas existentes entre elas, de forma que as técnicas analíticas que servem para realçar tais diferenças devem ser úteis para identifi-

existentes entre ellas, de forma que las técnicas analíticas que sirven para poner de manifiesto tales diferencias deben ser útiles para identificar especies. A diferencia de las proteínas, el ADN es una molécula extremadamente estable, incluso a altas temperaturas, lo que convierte a las técnicas basadas en el análisis del ADN en herramientas idóneas para la autenticación de las conservas de pescado.

4.4.2 Importancia comercial de la melva

En el caso de la melva, los productos en conserva representan un gran porcentaje de la producción total de enlatados de Andalucía, y en los últimos años se ha observado un crecimiento de su consumo. La producción de melva y caballa en Andalucía que se destina a conservas ha sido estimada por la Junta de Andalucía en 7.500 Tm/ anuales, que suponen una facturación de 30'05 millones de euros. Su elaboración artesanal ha contribuido a la mayor demanda. El elevado interés comercial por la melva en Andalucía se puso de manifiesto recientemente con la elaboración de una legislación específica destinada a proteger la denominación comercial de "Melva de Andalucía" para los productos enlatados de *A. thazard* y *A. rochei* (Orden de 16 de julio de 2003, por la que se aprueba el Reglamento de las Denominaciones Específicas de Melva y Caballa de Andalucía y de su Consejo Regulador. BOJA nº 144, de fecha 29 de julio de 2003. Ratificado en la Orden de 2 de febrero de 2005, publicada en el BOE nº 36 del 11 de febrero de 2005). Esta denominación comercial exige asimismo el procesamiento del pescado bajo el modo tra-

car especies. Ao contrário das proteínas, o DNA é uma molécula extremamente estável, inclusive a altas temperaturas, o que converte as técnicas baseadas na análise do DNA em ferramentas idóneas para a autenticação das conservas de peixe.

4.4.2 Importância comercial do judeu

No caso do judeu, os produtos em conserva representam uma grande percentagem da produção total de enlatados da Andaluzia, e nos últimos anos observou-se um crescimento no seu consumo. Na Andaluzia, a produção de judeu e cavala que se destina a conservas foi estimada pela Junta da Andaluzia em 7500 Tm/ anuais, o que supõe uma facturação de 30,05 milhões de euros. A sua elaboração artesanal tem contribuído para uma maior procura. O elevado interesse comercial do judeu na Andaluzia ficou conhecido recentemente com a elaboração de uma legislação específica destinada a proteger a denominação comercial de "Judeu da Andaluzia" para os produtos enlatados de *A. thazard* e *A. rochei* (Decreto de 16 de Julho de 2003), através do qual se aprova o Regulamento das Denominações Específicas do Judeu e da Cavala da Andaluzia e do seu Conselho Regulador. BOJA nº 144, data de 29 de Julho de 2003. Ratificado no Decreto de 2 de Fevereiro de 2005, publicado no BOE nº 36, de 11 de Fevereiro de 2005). Esta denominação comercial exige também o processamento do peixe de modo tradicional, incluindo pelar manualmente e a apresentação do produto final em forma de filetes. No entanto, visto que a aparência e tex-

dicional, incluyendo el pelado manual y la presentación del producto final en forma de filetes. Sin embargo, puesto que la apariencia y textura de la carne es muy similar, pueden ocurrir fraudes por sustitución con otras especies de menor valor comercial tales como listado (*Katsuwonus pelamis*), bacoreta (*Euthynnus alletteratus*) o atún claro (*Thunnus albacares*). De ahí la necesidad de desarrollar un sistema de autenticación fiable para poder llevar a cabo controles rutinarios de los productos enlatados de melva.

4.4.3 Diseño de un sistema de identificación para melva

El análisis minucioso de las secuencias obtenidas de *A. thazard* y *A. rochei* muestra la existencia de numerosas posiciones identificativas de cada una de dichas especies. Tales posiciones han servido para el diseño de un sistema de PCR múltiple aplicable en los ensayos de autenticación de productos enlatados. En la primera fase se ha llevado a cabo un estudio comparativo previo con las secuencias obtenidas de otros túnidos a fin de comprobar la especificidad de dichas posiciones, analizando 12 ejemplares de *K. pelamis*, 2 de *T. thynnus*, 4 de *T. alalunga* y 8 de *E. alletteratus*. Para cada uno de ellos se han obtenido secuencias parciales de los genes citocromo *b*, ATPase6 y ARNr12S. Las secuencias de los haplotipos más representativos para cada una de las especies, y de cada uno de los genes, están depositadas en las bases de datos con los números de acceso indicados en la Tabla 15.

tura da crnae é muito similar, podem ocorrer fraudes por substituição com outras espécies de menor valor comercial tais como o gaiado (*Katsuwonus pelamis*), a merma (*Euthynnus alletteratus*) e o atum-albacora (*Thunnus albacares*). Daí a necessidade de desenvolver um sistema de autenticação fiável para poder levar a cabo controlos de rotina dos produtos enlatados de judeu.

4.4.3 Criação de um sistema de identificação para o judeu

A análise minuciosa das sequências obtidas de *A. thazard* e *A. rochei* mostra a existência de numerosas posições identificativas de cada uma destas espécies. Tais posições serviram para a criação de um sistema de PCR múltiple aplicável em ensaios de autenticação de produtos enlatados. Na primeira fase levou-se a cabo um estudo comparativo prévio com as sequências obtidas de outros tunídeos, de modo a comprovar a especificidade de tais posições, analisando 12 exemplares de *K. pelamis*, 2 de *T. thynnus*, 4 de *T. alalunga* e 8 de *E. alletteratus*. Para cada um deles obtiveram-se sequências parciais dos genes citocromo *b*, ATPase6 e RNAr12S. As sequências dos haplotipos mais representativos para cada uma das espécies e de cada um dos genes estão depositadas nas bases de dados com os números de acesso indicados na Tabela 15.

ESPECIES	HAPLOTIPOS	cytb	ATPasa6	ARN12S
<i>T. alalunga</i>	Tal	AB176812	AB176809	AB176804
<i>T. thynnus</i>	Tth 1	AB176813	AB176820	AB176805
	Tth 2	AB176814	AB176820	AB176805
<i>E. alletteratus</i>	Eal 1	AB176815	AB176821	AB176806
	Eal 2	AB176815	AB176822	AB176807
<i>K. pelamis</i>	Kpe 1	AB176816	AB176823	AB176808
	Kpe 2	AB176817	AB176824	AB176808
	Kpe 3	AB176818	AB176823	AB176808

Tabla 15: Números de acceso GenBank/EMBL/DBJ de secuencias parciales obtenidas de otros túnidos
Tabela 15: Números de acesso GenBank/EMBL/DBJ de sequências parciais obtidas de outros tunídeos.

El sistema de PCR múltiple diseñado incluye un amplicón común a todas las especies, como control positivo de amplificación. Para ello se decidió utilizar un fragmento del gen ARNr12S, que presenta poca variabilidad entre los túnidos considerados. A lo largo del fragmento amplificado de 534 pb (533 pb para *T. alalunga* y *T. thynnus*) existen un total de 21 sitios polimórficos. El cebador directo (ARN12spp•1) alinea entre las posiciones 259 y 287, mientras que el cebador reverso (ARN12spp•2) lo hace entre las posiciones 378 y 404 (Fig. 45). La amplificación con estos cebadores genera un fragmento de 146 pb (145 en *T. thynnus* y *T. alalunga*). En las regiones donde se ubican los cebadores no se observa ninguna posición polimórfica entre las especies consideradas.

O sistema de PCR múltiplo criado inclui um produto amplificado comum a todas as espécies, como controle positivo de amplificação. Para isso, decidiu-se utilizar um fragmento do gene RNAr12S, o qual apresenta pouca variabilidade entre os tunídeos considerados. Ao longo do fragmento amplificado de 534 pb (533 pb para *T. alalunga* e *T. thynnus*) existe um total de 21 sítios polimórficos. O iniciador directo (RNA12spp•1) alinha entre as posições 259 e 287, enquanto que o iniciador inverso (RNA12spp•2) fá-lo entre as posições 378 e 404 (Fig. 45). A amplificação com estes iniciadores gera um fragmento de 146 pb (145 em *T. thynnus* e *T. alalunga*). Nestas regiões onde se encontram os iniciadores não é observada nenhuma posição polimórfica entre as espécies consideradas.

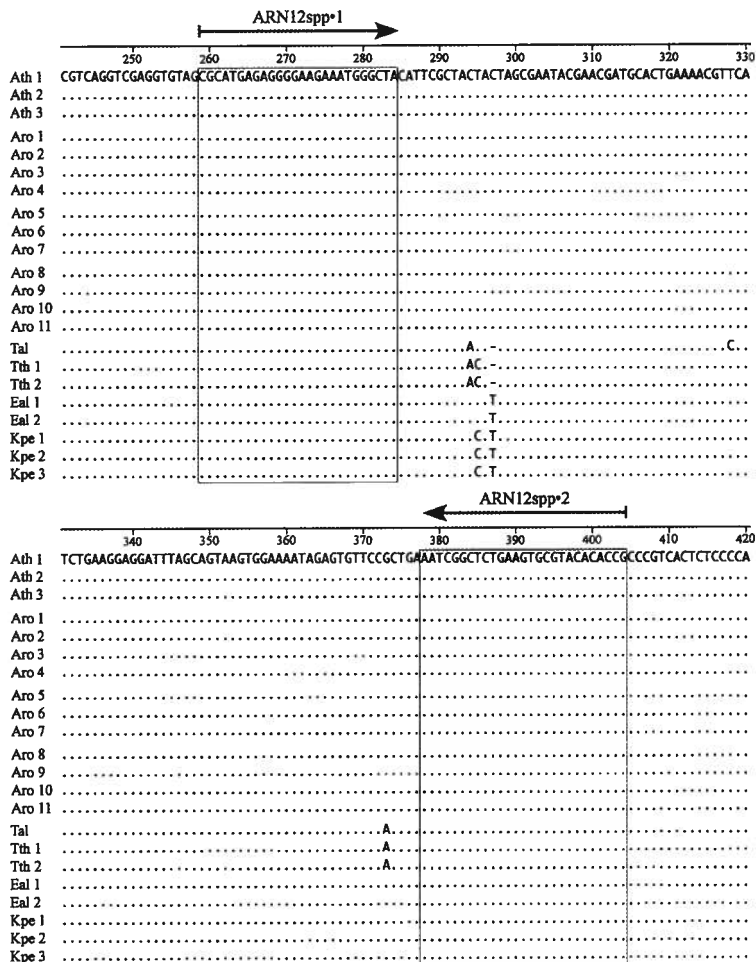


Figura 45: Posición de los cebadores universales ARN12spp*1/ARN12spp*2. Los recuadros indican la identidad de bases en todas las secuencias analizadas para esas posiciones.

Figura 45: Posição dos iniciadores universais ARN12spp*1/ARN12spp*2. Os retângulos indicam a identidade das bases em todas as sequências analisadas para essas posições.

Para la amplificación selectiva de un fragmento específico de *A. rochei* se han diseñado cebadores a partir de las secuencias parciales del gen citocromo *b* (423 pb en todos los casos). De todas las posiciones polimórficas encontradas, se han seleccionado la 56 y la 89 como las más idóneas para la ubicación del extremo 3'-OH de los cebadores por dos razones principales. En primer lugar, deben amplificar sólo y exclusivamente cuando la

Para a amplificação selectiva de um fragmento específico de *A. rochei* foram criados iniciadores a partir das sequências parciais do gene citocromo *b* (423 pb em todos os casos). De todas as posições polimórficas encontradas seleccionaram-se a 56 e a 89 como as mais idóneas para a localização do extremo 3'-OH dos iniciadores por duas razões principais. Em primeiro lugar, devem amplificar apenas e exclusivamente quando a amostra

MARCADORES MOLECULARES
MARCADORES MOLECULARES

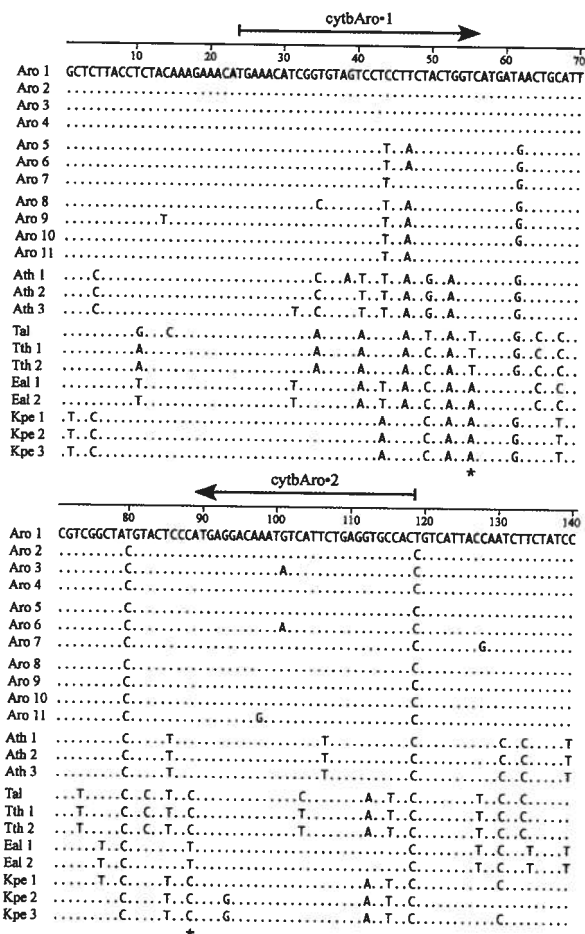


Figura 46: Posición de los cebadores cytbAro*1/cytbAro*2 específicos para *A. rochei* en el gen citocromo *b*. Las posiciones de los extremos 3'-OH de cada cebador aparecen marcadas con un asterisco.

Figura 46: Posição dos iniciadores cytbAro*1/cytbAro*2 específicos para *A. rochei* no gene citocromo *b*. As posições dos extremos 3'-OH de cada iniciador aparecem marcadas com um asterisco.

muestra analizada sea alguna de las especies del género *Auxis*. En la posición 56 las especies de *Auxis* presentan la base C, mientras que en el resto de los túnidos aparece T o A. De igual forma, en la posición 89 las especies de *Auxis* muestran la base A, y por el contrario es C o T en los otros túnidos (Fig. 46). Ya que la coincidencia del nucleótido situado en el extremo 3'-OH de un cebador con respecto al ADN molde es una condición crítica para que tenga lugar la amplificación, se asegura de esta manera la especifici-

analizada seja alguma das espécies de *Auxis*. Na posição 56, as espécies de *Auxis* apresentam a base C, enquanto que no resto dos tunídeos aparece T ou A. Por outro lado, na posição 89 as espécies de *Auxis* mostram a base A, ao contrário dos outros tunídeos, com base C ou T (Fig. 46). Visto que a coincidência do nucleótido situado no extremo 3'-OH de um iniciador em relação ao DNA molde é uma condição crítica para que ocorra a amplificação, assegura-se, deste modo, a especificidade do ensaio. A segunda das razões

De hecho, además de las ya comentadas, dentro de la secuencia parcial del gen citocromo *b* analizada se encuentran otras 4 posiciones específicas del género *Auxis* (68, 170, 302 y 344).

En la región correspondiente al cebador directo cytbAro•1 (posiciones 24 a 56) resulta clara la existencia de polimorfismo genético entre los individuos de *A. thazard* y de *A. rochei* (Fig. 46). Así, *A. rochei* presenta 3 posiciones específicas (41-C; 50-A; 53-G) con respecto a *A. thazard*. De igual forma, en la región correspondiente al cebador reverso cytbAro•2 (posiciones 89 a 118) aparece un polimorfismo específico de *A. rochei* en la posición 107 (C) respecto a *A. thazard* (T). Las diferencias de secuencia entre ambas especies son suficientes para conferir especificidad por *A. rochei* a esta pareja de cebadores. El tamaño del amplión específico de *A. rochei* es de 95 pb.

Para el diseño de los cebadores específicos de *A. thazard* se ha seguido una estrategia similar a la anterior, pero a partir de las secuencias parciales (492 pb) del gen ATPasa6 (Fig. 47). En este caso, existen un total de 14 posiciones nucleotídicas específicas de *Auxis* (17, 51, 53, 92, 107, 134, 164, 194, 218, 287, 299, 329, 356 y 383). De todas ellas, las más idóneas son las posiciones 287 y 356, donde se localizan los extremos 3'-OH de los cebadores ATPath•1 (C en las especies de *Auxis*, A o G en los otros túnidos) y ATPath•2 (T en *A. thazard* y *A. rochei*, C en el resto de los túnidos), respectivamente.

En las regiones en las cuales se ubican los cebadores ATPath•1 (256 a 287) y ATPath•2 (356 a 383) también existen

Na verdade, além das já comentadas, dentro da sequência parcial do gene citocromo *b* analisada encontramos outras 4 posições específicas de *Auxis* (68, 170, 302 e 344).

Na região correspondente ao iniciador directo cytbAro•1 (posições 24 a 56) é evidente a existência de polimorfismo genético entre os indivíduos de *A. thazard* e de *A. rochei* (Fig. 48). Assim, *A. rochei* apresenta 3 posições específicas (41-C; 50-A; 53-G) em relação a *A. thazard*. Do mesmo modo, na região correspondente ao iniciador inverso cytbAro•2 (posições 89 a 118) aparece um polimorfismo específico de *A. rochei* na posição 107 (C) em relação a *A. thazard* (T). As diferenças de sequência entre ambas as espécies são suficientes para conferir especificidade por *A. rochei* a este par de iniciadores. O tamanho do produto amplificado específico de *A. rochei* é de 95 pb.

Para a criação dos iniciadores específicos de *A. thazard* seguiu-se uma estratégia semelhante à anterior, mas a partir de sequências parciais (492 pb) do gene ATPase6 (Fig. 49). Neste caso, existem um total de 14 posições nucleotídicas específicas de *Auxis* (17, 51, 53, 92, 107, 134, 164, 194, 218, 287, 299, 329, 356 e 383). De todas elas, as mais idóneas são as posições 287 e 356, onde se localizam os extremos 3'-OH dos iniciadores ATPath•1 (C nas espécies de *Auxis*, A ou G em outros túnidos) e ATPath•2 (T em *A. thazard* e *A. rochei*, C no resto dos túnidos), respectivamente.

Nas regiões nas quais se localizam os iniciadores ATPath•1 (256 a 287) e ATPath•2 (356 a 383) também existem posições polimórficas específicas

posiciones polimórficas específicas de *A. thazard* con respecto a *A. rochei* (Fig. 47). En el cebador directo ATPath•1 los individuos de *A. thazard* presentan 3 posiciones características de esta especie (260-C; 272-T; 278-G), e igual número se observa en el cebador reverso ATPath•2 (359-G; 368-A; 371-T). De manera similar al gen citocromo *b*, estas diferencias especie-específicas están altamente conservadas en todas las secuencias de melva analizadas del gen ATPasa6. Dichas diferencias son suficientes para conferir especificidad por *A. thazard* a esta pareja de cebadores, que producen un amplicón de 128 pb.

En síntesis, el sistema de MS-PCR desarrollado consiste en un fragmento de 146 pb (145 pb en *T. thynnus* y *T. alalunga*) del gen ARNr12S como control positivo de amplificación válido para todas las especies de túnidos, un fragmento específico de *A. rochei* (95 pb) correspondiente al gen citocromo *b*, y un fragmento específico de *A. thazard* (128 pb) del gen ATPasa6. En el caso de que los filetes que contiene una lata de melva sean realmente de melva, se detectan dos bandas de ADN: la universal de 146 pb, y la de 128 pb si se trata de *A. thazard*, o la de 95 pb para *A. rochei*. Si nos encontramos ante un fraude comercial, únicamente se detectará el fragmento de 146 pb (Fig. 48).

de *A. thazard* em relação a *A. rochei* (Fig. 49). No iniciador directo ATPath•1, os indivíduos de *A. thazard* apresentam 3 posições características desta espécie (260-C; 272-T; 278-G), e igual número se observa no iniciador inverso ATPath•2 (359-G; 368-A; 371-T). De modo semelhante ao gene citocromo *b*, estas diferenças específicas de espécie estão altamente conservadas em todas as sequências de judeu analisadas do gene ATPase6. Tais diferenças são suficientes para conferir especificidade por *A. thazard* a este par de iniciadores, que produzem um produto amplificado de 128 pb.

Resumindo, o sistema de MS-PCR desenvolvido consiste num fragmento de 146 pb (145 pb em *T. thynnus* e *T. alalunga*) do gene RNAr12S como controlo positivo de amplificação válido para todas as espécies de tunídeos, um fragmento específico de *A. rochei* (95 pb) correspondente ao gene citocromo *b*, e um fragmento específico de *A. thazard* (128 pb) do gene ATPase6. No caso de que os filetes contidos numa lata de judeu sejam realmente de judeu, são detectadas duas bandas de DNA: a universal de 146 pb, e a de 128 pb se se trata de *A. thazard*, ou a de 95 pb para *A. rochei*. Se nos encontramos perante uma fraude comercial, unicamente se detectará o fragmento de 146 pb (Fig. 50).

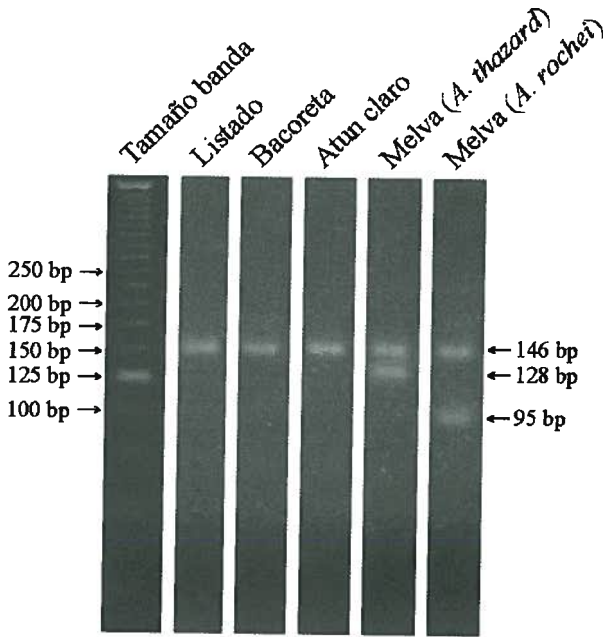


Figura 48: Patrones de bandas obtenidos en el sistema de PCR múltiple para la melva, listado (*Katsuwonus pelamis*), bacoreta (*Euthynnus alletteratus*) y atún claro (*Thunnus albacares*).
Figura 48: Padrões de bandas obtidos com o sistema de PCR múltiple para o judeu, gaiado (*Katsuwonus pelamis*), merma (*Euthynnus alletteratus*) e atum-albacora (*Thunnus albacares*).

4.4.4 Características y ventajas del sistema diseñado

La inclusión de un fragmento "universal" que deba amplificarse en todo caso resulta esencial en un ensayo de este tipo, puesto que es muy común que los productos enlatados contengan sustancias que inhiben la amplificación del ADN. En algunos casos, se ha atribuido la ausencia de un producto de PCR visible al elevado nivel de degradación del ADN como resultado bien del tratamiento térmico de la muestra, bien debido a la presencia de inhibidores de la PCR. Los inhibidores más comunes suelen ser los aditivos que se añaden durante la preparación del producto, aunque también existen otros que se generan en el propio pro-

4.4.4. Características e vantagens do sistema criado

A inclusão de um fragmento "universal" que deva amplificar-se em qualquer caso é essencial num ensaio deste tipo, visto que ser muito comum que os produtos enlatados conttenham substâncias que inibem a amplificação do DNA. Em alguns casos, atribuiu-se a ausência de um produto de PCR visível ao alto nível de degradação do DNA, como resultado tanto do tratamento térmico da amostra, como devido à presença de inibidores de PCR. Os inibidores mais comuns costumam ser os aditivos que se adicionam durante a preparação do produto, embora também existam outros que se geram durante o próprio pro-

ceso de enlatado (Ram et al., 1996). De hecho, la presencia de inhibidores de la PCR es bastante común en muestras degradadas de ADN (Goodyear et al., 1994; Akane et al., 1994). En estas condiciones, se ha demostrado que aumentar la cantidad de ADN en la reacción de PCR no soluciona el problema en tanto en cuanto supone un incremento paralelo en la cantidad de inhibidores presentes (Ram et al., 1996; Pardo y Pérez-Villareal, 2004). De no incluirse, la ausencia de las bandas de ADN específicas de melva al analizar un producto enlatado podría atribuirse a un fraude por sustitución, cuando en realidad podría tratarse sencillamente de un caso de inhibición.

Otro aspecto importante a considerar es que, como consecuencia de la variabilidad genética existente en las especies, pueden existir muestras auténticas de melva en las que no se consiga amplificar los fragmentos específicos de 128 o 95 pb, dando lugar a falsos negativos. En cualquier caso, debe subrayarse que el sistema desarrollado constituye un método rápido de autenticación de melva. Aquellas muestras que dan un resultado negativo deben identificarse empleando otra de las metodologías existentes en la actualidad (secuenciación, PCR-RFLP o PCR-SSCP). Este sistema resulta ser por tanto fiable, rápido, de bajo coste económico, y fácil de llevar a cabo, constituyendo una herramienta válida para el análisis rutinario de conservas de melva.

El sistema de PCR múltiple diseñado presenta dos grandes ventajas en relación a otros sistemas de autenticación. En primer lugar, y puesto que se analizan los productos de PCR

Na verdade, a presença de inibidores da PCR é bastante comum nas amostras degradadas de DNA (Goodyear et al., 1994; Akane et al., 1994). Nestas condições, foi demonstrado que aumentar a quantidade de DNA na reação de PCR não soluciona o problema, visto que supõe um incremento paralelo da quantidade de inibidores presentes (Ram et al., 1996; Pardo y Pérez-Villareal, 2004). Se não se incluírem, a ausência das bandas de DNA específicas de judeu ao analisar um produto enlatado poderia atribuir-se a uma fraude por substituição, quando na verdade poderia tratar-se simplesmente de um caso de inibição.

Outro aspecto importante a considerar é que, como consequência da variabilidade genética existente nas espécies, podem existir amostras autênticas de judeu nas quais não se consiga amplificar os fragmentos específicos de 128 ou 95 pb, dando lugar a falsos negativos. Em qualquer caso, é de sublinhar que o sistema desenvolvido constitui um método rápido de autenticação do judeu. As amostras que têm um resultado negativo devem identificar-se utilizando outra das metodologias existentes na actualidade (sequenciação, PCR-RFLP ou PCR-SSCP). Este sistema é, portanto, fiável, rápido, de baixo custo económico, e fácil de realizar, constituindo uma ferramenta válida para a análise rotineira de conservas de judeu.

O sistema de PCR múltiplo criado apresenta duas grandes vantagens em relação a outros sistemas de autenticação. Em primeiro lugar, e visto que se analisam os produtos de PCR directamente sem nenhum tipo de manipulação posterior, nos casos

directamente sin ningún tipo de manipulación posterior, en aquellos casos en los que se obtiene una amplificación positiva de los productos específicos de *Auxis* no es necesario aplicar otros métodos analíticos talos como RFLP, SSCP o secuenciación. En segundo lugar, si existe fraude comercial y no tiene lugar la amplificación de los fragmentos específicos de *Auxis*, tampoco es necesario llevar a cabo la amplificación y análisis de un nuevo fragmento de ADN para identificar una muestra problema. Esa misma información se puede obtener del análisis del fragmento correspondiente al gen ARNr12S. Esto supone un importante ahorro tanto en tiempo como en coste económico, condiciones ambas cruciales para que un sistema de autenticación resulte realmente útil.

Existe un gran inconveniente que es común a cualquier sistema de autenticación. Técnicas como la PCR-RFLP o PCR-SSCP pueden verse afectada en sus resultados debido a la existencia de variabilidad intraespecífica, ya que puede conducir a la pérdida o ganancia de sitios de restricción (Quinteiro et al., 1998; Sanjuan y Comesaña, 2002) y a cambios en los patrones representativos de las cadenas sencilla de ADN (Rehbein et al., 1999), respectivamente. Sin embargo, en el método analítico aquí desarrollado tal variabilidad genética afectará solamente si la base alterada se localiza en el extremo 3'-OH de los cebadores en relación al ADN molde de *A. thazard* o *A. rochei*.

La variabilidad intraespecífica afecta no sólo a las especies de melva. En las otras especies de túnidos analizados, los fragmentos parciales de los genes cytb e ATPase6 muestran también un

em que se obtém uma amplificação positiva dos produtos de *Auxis* não é necessário aplicar outros métodos analíticos, tais como RFLP, SSCP ou sequenciação. Em segundo lugar, se existe fraude comercial e não se efectua a amplificação dos fragmentos específicos de *Auxis*, também não é necessário levar a cabo a amplificação e análise de um novo fragmento de DNA para identificar uma amostra problema. Esta mesma informação pode ser obtida a partir da análise do fragmento correspondente ao gene RNa12S. Isto supõe uma grande poupança, tanto em tempo como em custo económico, ambas condições cruciais para que um sistema de autenticação seja realmente útil.

Existe um grande inconveniente que é comum a qualquer sistema de autenticação. Técnicas como PCR-RFLP ou PCR-SSCP podem ser afectadas nos seus resultados, devido à existência de variabilidade intraespecífica, pois pode levar à perda ou ganho de sítios de restrição (Quinteiro et al., 1998; Sanjuan e Comesaña, 2002) e a alterações nos padrões representativos das cadeias simples de DNA (Rehbein et al., 1999), respectivamente. No entanto, no método analítico aqui desenvolvido, tal variabilidade genética afectará apenas se a base alterada se localizar no extremo 3'-OH dos iniciadores em relação ao DNA molde de *A. thazard* ou *A. rochei*.

A variabilidade intraespecífica não afecta apenas as espécies de judeu. Nas outras espécies de túnidos analisados, os fragmentos parciais dos genes cytb e ATPase6 mostram também um certo nível de polimorfismo. Inevitavelmente surge a dúvida se esse polimorfismo poderia afectar de

cierto nivel de polimorfismo. Inevitablemente surge la duda de si ese polimorfismo podría afectar de alguna forma a los resultados del método, en el sentido de que se pudiesen amplificar los fragmentos específicos de *Auxis* a partir de ADN molde de otra especie de túnido (falso positivo). Sin embargo, tal posibilidad debe descartarse por dos motivos principales. En primer lugar, debería ocurrir en el ADN molde una doble identidad con respecto a los nucleótidos situados en los extremos 3'-OH de cualquiera de las parejas de cebadores específicos de *Auxis*, y dicha coincidencia, de existir, ocurriría con una probabilidad muy baja. Y en segundo lugar, aceptando que pudiese tener lugar tal coincidencia de nucleótidos, las condiciones de PCR altamente restrictivas del ensayo impedirían la amplificación debido a las diferencias de nucleótidos con respecto a las secuencias de los cebadores específicos de *Auxis*. Debemos aquí destacar que la simplicidad, sensibilidad y fiabilidad en los resultados derivados de la amplificación de fragmentos específicos de ADN, dirigidos a la autenticación de productos comerciales, ha contribuido al desarrollo de sistemas similares aplicables a especies muy diversas (Lockley y Bardsley, 2000; Calvo et al., 2001; Calvo et al., 2002). Se ha establecido que los métodos analíticos a emplear en la autenticación de especies deben cumplir una serie de condiciones básicas (Mackie et al., 1999). Sin lugar a dudas, una de las más importantes es que deben ser procedimientos rápidos. Además de la rapidez, deben ser fáciles de realizar, sin requerir equipamientos sofisticados. Por último, y desde el punto de vista económico, deben poder aplicarse de forma rutinaria sin suponer

alguna forma los resultados del método, no en el sentido de que se pudiesen amplificar los fragmentos específicos de *Auxis* a partir de DNA molde de otra especie de túnido (falso positivo). No obstante, tal posibilidad debe excluirse por dos motivos principales. En primer lugar, debería ocurrir en el DNA molde una dupla identidad en relación a los nucleótidos situados en los extremos 3'-OH de cualquier par de iniciadores específicos de *Auxis*, y tal coincidencia, si existiese, acontecería con una probabilidad muy baja. E, en segundo lugar, aceptando que pudiese tener lugar tal coincidencia de nucleótidos, las condiciones de PCR altamente restrictivas del ensayo impedirían la amplificación, debido a las diferencias de nucleótidos en relación a las secuencias de los iniciadores específicos de *Auxis*. Debemos destacar que la simplicidad, sensibilidad y fiabilidad de los resultados derivados de la amplificación de fragmentos específicos de DNA, dirigidos a la autenticación de productos comerciales, contribuyó para el desarrollo de sistemas semejantes aplicables a especies muy diversas (Lockley y Bardsley, 2000; Calvo et al., 2001; Calvo et al., 2002). Fue establecido que los métodos analíticos a utilizar en la autenticación de especies deben cumplir una serie de condiciones básicas (Mackie et al., 1999). Sin duda, una de las más importantes es que deben ser procedimientos rápidos. Además de la rapidez, deben ser fáciles de realizar, sin requerir equipamientos sofisticados. Por último, y desde el punto de vista económico, deben poder aplicarse de forma rutinaria sin suponer un costo prohibitivo. El ensayo para la autenticación de judeu cumple, sin duda alguna, estos criterios.

un coste prohibitivo. El ensayo para la autenticación de melva cumple sin duda alguna con estos criterios.

Finalmente, y tal como se ha comentado con anterioridad, la existencia de variabilidad intraespecífica en el ADNmt puede suponer un gran inconveniente para la fiabilidad de algunos procedimientos experimentales dirigidos a la identificación de especies. Dada esta posibilidad, se recomienda llevar a cabo los ensayos de autenticación utilizando dos técnicas de análisis de ADN independientes (Mackie et al., 1999). El método aquí descrito es una herramienta molecular muy potente para la detección de sustituciones fraudulentas de melva en los productos enlatados, y constituye indudablemente una valiosa alternativa a la gama de metodologías disponibles en la actualidad aplicables a la identificación de *A. thazard* y *A. rochei*.

Finalmente, e tal como se comentou anteriormente, a existêncía de variabilidade intraespecífica no DNAm_t pode supor um grande inconveniente para a fiabilidade de alguns procedimentos experimentais dirigidos à identificação de espécies. Dada esta possibilidade, recomenda-se levar a cabo os ensaios de autenticação utilizando duas técnicas de análise de DNA independentes (Mackie et al., 1999). O método aqui descrito é uma ferramenta molecular muito potente para a detecção de substituições fraudulentas de judeu nos produtos enlatados, e constitui indubitavelmente uma valiosa alternativa à gama de metodologias disponíveis na actualidade aplicáveis à identificação de *A. thazard* e *A. rochei*.

BIBLIOGRAFÍA PARTE II

- Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. 1994. Purification of highly degraded DNA by gel filtration for PCR. *Biotechniques* 16: 235-238.
- Alvarado Bremer JR, Naseri I, Ely B. 1997. Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *J. Fish Biol.* 50: 540-554.
- Alvarado Bremer JR, Stequert B, Robertson NW, Ely B. 1998. Genetic evidence for inter-oceanic subdivision of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) populations. *Mar. Biol.* 132: 547-557.
- Arnheim N. 1983. Concerted evolution of multigene families. In M. Nei R.K. Koehn, eds. *Evolution of genes and proteins*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. 38-61.
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge.
- Boore JL. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27: 1767-1780.
- Broughton RE, Milam JE, Roe BA. 2001. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA. *Genome Res.* 11: 1958-1967.
- Calvo JH, Rodellar C, Zaragoza P, Osta R. 2002. Beef- and bovine-derived material identification in processed and unprocessed food and feed by PCR amplification. *J. Agric. Food Chem.* 50: 5262-5264.
- Calvo JH, Zaragoza P, Osta R. 2001 Technical note: A quick and more sensitive method to identify pork in processed and unprocessed food by PCR amplification of a new specific DNA fragment. *J. Anim. Sci.* 79: 2108-2112.
- Catanese G, Infante C, Manchado M. 2007a. Complete mitochondrial DNA sequences of the frigate tuna *Auxis thazard* and the bullet tuna *Auxis rochei*. *DNA Seq.* En prensa.
- Catanese G, Infante C, Crespo A, Zuasti E, Ponce M, Funes V, Pérez L, Manchado M. 2007b. Development and characterization of eight microsatellite markers in bullet tuna (*Auxis rochei*). *Mol. Ecol. Notes.* En prensa.
- Chow S, Kishino H. 1995. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae: Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *J. Mol. Evol.* 41: 741-748.

Chow S, Okamoto H, Miyabe N, Hiramatsu K, Barut N. 2000. Genetic divergence between Atlantic and Indo-Pacific stocks of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) and admixture around South Africa. *Mol. Ecol.* 9: 221-227.

Clayton DA. 1984. Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annual Rev. Biochem.* 53: 573-594.

Coates AG, Jackson JB, Collins LS, Cronin TM, Dowsett HJ, Bybell LM, Jung P, Obando JO. 1992. Closure of the Isthmus of Panama: the near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geol. Soc. Am. Bull.* 104: 814-828.

Collette BB, Aadland CR. 1996. Revision of the frigate tunas (Scombridae, *Auxis*), with descriptions of two new subspecies from the eastern Pacific. *Fish Bull* 94: 423-441.

Collette BB, Reeb C, Block B. 2001. Systematics of the tunas and mackerels (Scombridae). *Fish Physiol.* 19: 1-33.

Curole JP, Kocher TD. 1999. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. *Tree* 14: 394-398.

De la Serna JM, Alot E, Majuelos E, Rioja P. 2004. La migración trófica post-reproductiva del atún rojo (*Thunnus thynnus*) a través del estrecho de Gibraltar. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT* 56: 1196-1209.

Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Funes V, Zuasti E, Catanese G, Infante C, Manchado M. 2004. Isolation and characterization of ten microsatellite *loci* for Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Mol. Ecol. Notes* 4: 339-341.

Galtier N, Lobry JR. 1997. Relationships between genomic G+C content, RNA secondary structures and optimal growth temperature in prokaryotes. *J. Mol. Evol.* 44: 632-663.

Goodyear PD, MacLaughlin-Black S, Mason IJ. 1993 A reliable method for the removal of co-purifying PCR inhibitors from ancient DNA. *Biotechniques* 16: 232-235.

Hurst CD, Barlett SE, Davidson WS, Bruce IJ. 1999. The complete mitochondrial DNA sequence of the Atlantic Salmon, *Salmo salar*. *Gene* 239: 237-242.

Infante C, Catanese G, Ponce M, Manchado M. 2004. Novel method for authentication of frigate tunas (*Auxis thazard* and *Auxis rochei*) in commercial canned products. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7435-7443.

Inoue JG, Miya M, Tsukamoto K, Nishida M. 2001. A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 20: 275-285.

Johansen S, Bakke I. 1996. The complete mitochondrial DNA sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*): Relevance to taxonomic studies among codfishes. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 5: 203-214.

Lavoue S, Miya M, Inoue JG, Saitoh K, Ishiguro NB, Nishida M. 2005. Molecular systematics of the gonorynchiform fishes (Teleostei) based on whole mitogenome sequences: implications for higher-level relationships within the Otocephala. *Mol. Phyl. Evol.* 37: 165-177.

Lockley AK, Bardsley RG. 2000. Novel method for the discrimination of tuna (*Thunnus thynnus*) and bonito (*Sarda sarda*) DNA. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4463-4468.

Lowe TM, Eddy SR. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25: 955-964.

Mackie IM, Pryde SE, Gonzales-Sotelo C, Medina I, Pérez-Martín R, Quintero J, Rey-Mendez M, Rehbein H. 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. *Food Sci. Technol.* 10: 9-14.

Manchado M, Catanese G, Infante C. 2004. Complete mitochondrial DNA sequence of the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Fish. Sci.* 70: 68-73.

Manchado M, Catanese G, Infante C. 2005. Estudio comparativo del ADN mitocondrial en miembros de la familia Scombridae. En: Libro de Actas IX Congreso Nacional de Acuicultura. Cádiz 2003. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. 149-153.

Manchado M, Catanese G, Ponce M, Funes V, Infante C. 2007. The complete mitochondrial genome of the Senegal sole, *Solea senegalensis* Kaup. Comparative analysis of tandem repeats in the control region among soles. *DNA Seq.* En prensa.

Miya M, Kawaguchi A, Nishida M. 2001. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1993-2009.

Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press.

Nesbø CL, Rueness EK, Iversen SA, Skagen DW, Jakobsen KS. 2000. Phylogeography and population history of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus* L.): a genealogical approach reveals genetic structuring among the eastern Atlantic stocks. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 267: 281-292.

Pardo MA, Pérez-Villareal B. 2004. Identification of commercial canned tuna species by restriction site analysis of mitochondrial DNA products obtained by nested primer PCR. Food Chem. 86: 143-150.

Peres JM. 1985. History of the Mediterranean biota and the colonization of the depth. In R. Margalef, ed. Western Mediterranean. Pergamon Press, London. 200-234.

Quinteiro J, Sotelo CG, Rehbein H, Pryde SE, Medina I, Pérez-Martín RI, Rey-Méndez M, Mackie IM. 1998. Use of mtDNA direct polymerase chain reaction (PCR) sequencing and PCR-restriction fragment length polymorphism methodologies in species identification of canned tuna. J. Agric. Food Chem. 46: 1662-1669.

Ram JL, Ram ML, Baidoun FF. 1996. Authentication of canned tuna and bonito by sequence and restriction site analysis of polymerase chain reaction products of mitochondrial DNA. J. Agric. Food Chem. 44: 2460-2467.

Reddy OUK, Pepper AE, Abdurakmonov I, Saha S, Jenkins JN, Brooks T, Bolek Y, El-Zik KM. 2001. New dinucleotide and trinucleotide microsatellite marker resources for cotton genome research. J. Cotton Sci. 5: 103-113.

Rehbein H, Mackie IM, Pryde S, Gonzales-Sotelo C, Medina IC, Perez-Martin R, Quinteiro J, Rey-Mendez M. 1999. Fish species identification in canned tuna by PCR-SSCP: validation by a collaborative study and investigation of intra-species variability of the DNA- patterns. Food Chem. 64: 263-268.

Sanjuan A, Comesaña AS. 2002. Molecular identification of nine commercial flatfish species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a segment of the cytochrome *b* region. J. Food Prot. 65: 1016-1023.

Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G, Saccone C. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. Gene 205: 125-140.

Viñas J, Pla C, Tawil MY, Hattour A, Farrugia AF, De La Serna JM. 2003. Mitochondrial genetic characterization of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from three Mediterranean (Libya, Malta, Tunisia) and one Atlantic locations (Gulf of Cádiz).

Viñas J, Pla C, Tawil MY, Hattour A, Farrugia AF, De La Serna JM. 2003. Mitochondrial genetic characterization of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from three Mediterranean (Libya, Malta, Tunisia) and one Atlantic locations (Gulf of Cádiz). Col Vol Sci Pap ICCAT 53: 1282-1288.

Viñas J, Alvarado Bremer J, Pla C. 2004a. Inter-oceanic genetic differentiation among albacore (*Thunnus alalunga*) populations. Mar. Biol. 145: 225-232.

Viñas J, Alvarado Bremer J, Pla C. 2004b. Phylogeography of the Atlantic bonito (*Sarda sarda*) in the northern Mediterranean: the combined effects of historical vicariance, population expansion, secondary invasion, and isolation by distance. Mol. Phyl. Evol. 33: 32-42.

Wang HC, Hickey DA. 2002. Evidence for strong selective constraint acting on nucleotide composition of 16S ribosomal RNA genes. Nucleic Acids Res. 30: 2501-2507.

Zardoya R, Castilho R, Grande C, Favre-Krey L, Caetano S, Marcato S, Krey G, Patarnello T. 2004. Differential population structuring of two closely related fish species, the mackerel (*Scomber scombrus*) and chub mackerel (*Scomber japonicus*), in the Mediterranean Sea. Mol. Ecol. 13: 1785-1798.

AGRICULTURA



GANADERÍA



PESCA Y ACUICULTURA



POLÍTICA, ECONOMÍA Y SOCIOLOGÍA AGRARIA



FORMACIÓN AGRARIA



CONGRESOS Y JORNADAS



R.A.E.A



I.S.B.N: 978-84-8474-224-1



9 788484 742241



JUNTA DE ANDALUCÍA

Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE INNOVACIÓN, CIENCIA Y EMPRESA
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA