

Región de control mitocondrial de *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758), *Diplodus vulgaris* (Saint-Hilaire, 1817), *Diplodus bellottii* (Steindachner, 1882) y *Diplodus annularis* (Linnaeus, 1758): elementos reguladores y heteroplasma

L. Pérez, C. Infante y M. Manchado

IFAPA (Instituto de Formación Agraria y Pesquera de Andalucía) Centro El Toruño. Junta de Andalucía. Apdo. 16. E-11500 El Puerto de Santa María (Cádiz), España. Correo electrónico: manuel.manchado.ext@juntadeandalucia.es

Recibido en octubre de 2005. Aceptado en noviembre de 2005.

RESUMEN

El género *Diplodus* incluye algunas especies de notable interés en acuicultura. Sin embargo, existen pocos marcadores moleculares para realizar estudios de genética de poblaciones. En este trabajo se analiza la región de control mitocondrial de las especies *D. sargus* (L., 1758), *D. vulgaris* (Saint-Hilaire, 1817), *D. bellottii* (Steindachner, 1882) y *D. annularis* (L., 1758). En ella se han identificado numerosos elementos reguladores conservados. Además, se ha detectado una secuencia repetida en tándem en *D. annularis*, determinando niveles elevados de heteroplasma. El análisis de la estructura secundaria de esta secuencia repetida sugiere una posible función reguladora.

Palabras clave: *Diplodus*, marcadores mitocondriales, VNTRs, heteroplasma.

ABSTRACT

Mitochondrial control regions in *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758), *Diplodus vulgaris* (Saint-Hilaire, 1817), *Diplodus bellottii* (Steindachner, 1882) and *Diplodus annularis* (Linnaeus, 1758): Regulating elements and heteroplasmy

Several species of the genus *Diplodus* are of high interest to the aquaculture industry. However, a reduced number of molecular markers are available for genetic population studies. In the present study, we investigated the mitochondrial control region in the species *D. sargus* (L., 1758), *D. vulgaris* (Saint-Hilaire, 1817), *D. bellottii* (Steindachner, 1882) and *D. annularis* (L., 1758). Different conserved regulatory elements were identified. Moreover, a tandem repeat sequence was detected in *D. annularis*. High levels of heteroplasmy were also found. Secondary structure analysis of the repeat sequence suggests a possible regulatory function.

Keywords: *Diplodus*, mitochondrial markers, VNTRs, heteroplasmy.

INTRODUCCIÓN

El ADN mitocondrial (ADNmt) se ha usado como marcador molecular en estudios de evolu-

ción y de diferenciación poblacional por su pequeño tamaño, su condición de herencia materna y poseer una tasa de evolución relativamente elevada (Brown, George y Wilson, 1979;

Wilson *et al.*, 1985). La región de control es la más variable del ADNmt debido a que presenta una alta tasa de mutaciones. Esta región contiene el origen de replicación de la cadena pesada, el sitio de inicio de la transcripción y sitios de terminación para ambos procesos (Clayton, 1992). Ocasionalmente, se ha observado en algunas especies la presencia de un número variable de repeticiones en tándem (VNTRs), comunmente asociada con altos niveles de heteroplasmia (coexistencia de dos o más tipos de ADNmt en una célula) (Rand, 1994), que podrían ser del 100 %, como en el caso de *Gadus morhua* Linnaeus, 1758 (Arnason y Rand, 1992) y *Morone americana* (Gmelin, 1789) (Mulligan y Chapman, 1989).

Los espáridos están constituidos por especies ampliamente distribuidas por el océano Atlántico y el mar Mediterráneo (Bauchot y Hureau, 1986). En general, constituyen un importante recurso pesquero a lo largo de todo el litoral y muchas de estas especies están siendo explotadas en acuicultura. En este trabajo se han seleccionado cuatro especies del género *Diplodus*: *D. sargus* (Linnaeus, 1758), *D. vulgaris* (Saint-Hilaire, 1817), *D. bellottii* (Steindachner, 1882) y *D. annularis* (Linnaeus, 1758). Estas especies viven en suelos rocosos y en praderas de *Posidonia oceanica* (L. Delile, 1813), a excepción *D. annularis*, que sólo se desarrolla en estas últimas (Bauchot y Hureau, 1986).

En este trabajo se ha aislado la región de control de estas cuatro especies de *Diplodus*. Las secuencias obtenidas se han analizado para identificar los elementos reguladores y para determinar la existencia de heteroplasmia.

MATERIAL Y MÉTODOS

Captura de ejemplares

Los ejemplares estudiados provienen de poblaciones naturales del golfo de Cádiz, capturados mediante pesca de arrastre a bordo del buque escuela *Regina maris* perteneciente a la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. El periodo de captura estuvo comprendido entre mayo y septiembre de 2003. Los pesos medios de los ejemplares fueron 687, 47,

36 y 27 g para *D. sargus*, *D. vulgaris*, *D. bellottii* y *D. annularis*, respectivamente. La longitud media osciló entre los 33,1 cm de *D. sargus* y los 11,7 cm de *D. annularis*. Para el aislamiento y caracterización de la región de control se analizó un individuo de cada especie, y para evaluar la existencia de heteroplasmia se investigaron dos ejemplares de cada especie. En el caso de *D. annularis* se analizaron cinco individuos para determinar el grado de heteroplasmia encontrado.

Análisis de muestras

De cada individuo se extrajo una pequeña porción de músculo (aproximadamente 1 g) que se conservó a -80°C . El ADN total se aisló usando el kit comercial Fast DNA[®], con unas condiciones de homogeneización de 40 s a una velocidad de 5 m/s en el Fastprep[®] FG120 instrument (Bio 101 Inc). Todo el procedimiento de aislamiento de ADN se realizó siguiendo el protocolo establecido por el fabricante.

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron en un volumen final de 25 μl conteniendo 16,75 μl de agua desionizada y estéril, 2,5 μl de tampón 10X, 1 μl de MgCl_2 , 0,5 μl de cada cebador (10 mM) y 0,25 μl de EcoTaq[™] DNA polimerasa. Como cebador directo se usó DsaPro-1 (GATTTTAACCCCACTATCAGCTCCCAAAG) y como inverso DsaPhe-2 (GGGGCTTTTGGACCATCTTAACAGCTT).

Todos los cebadores se diseñaron usando el software Oligo[®] v. 6.82 (Medprobe). Las condiciones de PCR fueron 94°C , 2 min y 30 ciclos de 30 s a 94°C , 15 s a 56°C y 2 min a 72°C . Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se visualizaron con luz ultravioleta.

Para la secuenciación de estos productos, las muestras se purificaron con el kit PCR Product Purification (Marligen Bioscience) y se secuenciaron con BigDye[®] Terminator (Applied Biosystems). Todas las reacciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Además de los cebadores antes mencionados, se diseñaron unos cebadores más internos para completar la secuencia de la región de control (figura 1) DanRC-4 (GCAGATAGGTATAGCGGGATGGTCCGGTTC) y DanRC-2 (TTACTCGTGCGGGGAATAATACCACCTTT).

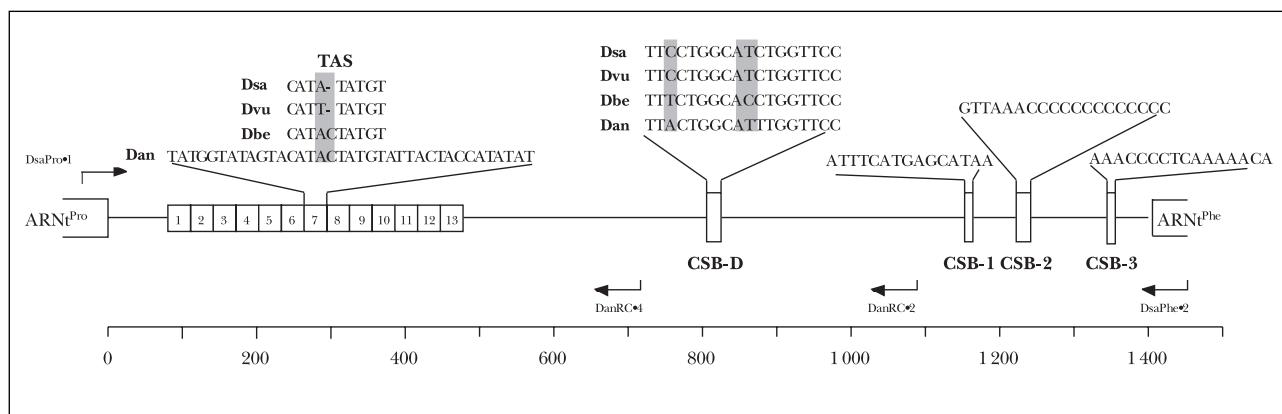


Figura 1. Esquema de la organización de la región de control en *D. annularis*. La región de control está flanqueada por los ARNt que codifican para la prolina (ARNt^{Pro}) y para la fenilalanina (ARNt^{Phe}). Se destacan los elementos conservados TAS, la secuencia CSB-D y los motivos conservados CSB-1, CSB-2 y CSB-3. Para comparar, se han sobreado en gris los polimorfismos de los elementos conservados en *D. sargus* (Dsa), *D. vulgaris* (Dvu), *D. bellottii* (Dbe) y *D. annularis* (Dan). La posición de los cebadores se señala con flechas.

Las secuencias nucleotídicas se analizaron con el programa Sequencing Analysis v. 3.4.1 (Applied Biosystems) y Seqman (DNASTar). Para el plegamiento de las secuencias repetidas en tándem y el cálculo de la energía libre se utilizó el programa GeneQuest (DNASTar).

Con el fin de investigar la presencia de heteroplasmia, los productos de PCR se clonaron utilizando el vector pCR4-TOPO con el kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen). Los productos clonados se amplificaron con los cebadores universales T3 y T7.

RESULTADOS

Caracterización de la región de control mitocondrial

La región de control de las cuatro especies del género *Diplodus* se amplificó mediante PCR utilizando cebadores localizados en las regiones flanqueantes que codifican los ARNt^{Pro} (DsaPro·1) y ARNt^{Phe} (DsaPhe·2) (figura 1). Los tamaños obtenidos fueron 953, 975, 1 204 y 1 404 pb para *D. sargus*, *D. vulgaris*, *D. bellottii* y *D. annularis*, respectivamente. El contenido de AT osciló entre el 58,7 % de *D. bellottii* y el 65 % de *D. annularis*. Al comparar las secuencias, la mayor similitud se observó entre *D. sargus* y *D. vulgaris* (86,2 %), con valores mínimos entre *D. sargus* y *D. bellottii* (54,1 %).

La región de control mitocondrial contiene tres dominios principales.

- El dominio ETAS, adyacente al gen que codifica para el ARNt^{Pro}, que posee las secuencias conservadas TAS (*termination associated sequences*) en número variable. Las secuencias TAS estuvieron muy conservadas entre las cuatro especies de *Diplodus* (figura 1), en número de 3-4 copias, excepto en *D. annularis*. En esta especie, las secuencias TAS se localizaron dentro de una secuencia de 37 nucleótidos repetida en tándem hasta 13 veces para el individuo analizado.
- En el dominio central se localizó la secuencia conservada CSB-D. Sólo se observaron tres sitios polimórficos entre las cuatro especies de *Diplodus*.
- El dominio CSB, situado adyacente al gen que codifica para el ARNt^{Phe}, presentó las pequeñas regiones conservadas CSB1, CSB2 y CSB3.

Heteroplasmia por VNTR

Al comparar las cuatro especies de *Diplodus*, se pudo observar cómo la secuencia repetida en tándem en *D. annularis* estaba muy conservada en las otras especies de *Diplodus* (figura 2). Mientras que *D. vulgaris* sólo se diferenciaba en cinco posiciones, *D. bellottii* presentó hasta siete diferencias.

Consenso	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	W	C	T	A	T	G	T	A	T	T	A	W	A	A	S	C	A	T	A	C	A	T
<i>D. annularis</i>	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	A	C	T	A	T	G	T	A	T	T	A	C	T	A	C	C	A	T	A	T	A	T
<i>D. bellottii</i>	T	A	T	G	G	T	C	T	A	G	T	A	C	A	T	-	T	T	A	T	G	T	A	T	T	A	C	G	A	C	C	A	T	A	A	G	C
<i>D. sargus</i>	T	A	T	G	G	T	A	C	A	A	T	A	C	A	T	-	T	T	A	T	G	T	A	T	A	A	T	A	A	G	C	A	T	A	C	A	T
<i>D. vulgaris</i>	T	A	T	G	G	T	A	T	A	G	T	A	C	A	T	-	C	T	A	T	G	T	A	T	T	A	T	A	A	G	C	A	T	A	C	A	T

Figura 2. Comparación de la secuencia repetida en tándem de *D. annularis*, *D. bellottii*, *D. sargus* y *D. vulgaris*. Sombreados en gris se indican los sitios polimórficos.

Dado que este bloque estuvo muy conservado en las cuatro especies, se analizaron dos nuevos ejemplares para confirmar la presencia de repeticiones y la existencia de heteroplasmia. Para ello, se amplificó, y posteriormente se clonó, la región de control de cada especie. Al analizar 10 clones de cada individuo se pudo observar que *D. annularis* presentaba fragmentos de tamaños diferentes, mientras que *D. bellottii*, *D. sargus* y *D. vulgaris* tuvieron un tamaño idéntico en todos los casos (figura 3). El análisis de las secuencias de dichos productos confirmó que las diferencias de tamaño eran debidas al diferente número de repeticiones en los haplotipos analizados. En las otras tres especies de *Diplodus* sólo se observó un número reducido de sustituciones.

Para profundizar en la heteroplasmia observada en *D. annularis*, se diseñó un cebador adya-

cente a la región que contenía las repeticiones. La región repetida se amplificó en cinco individuos de *D. annularis*. Al realizar una electroforesis con agarosa de alta resolución (2,5 %), se pudo comprobar que para los cinco individuos analizados se observaban múltiples bandas equidistantes. El número de copias varió entre individuos y dentro de un mismo individuo (figura 4).

Para investigar estas bandas, se clonaron los productos de amplificación de un individuo (muestra 1). Al amplificar y secuenciar 20 clones al azar, se pudo comprobar la presencia de fragmentos con un número variable de repeticiones (12-19). Al comparar las repeticiones entre ellas, no se observaron polimorfismos, excepto en la última repetición, con una transición C → T en la posición 34 y otra T → C en la 35. Dichas mutaciones se detectaron en todos los haplotipos estudiados.

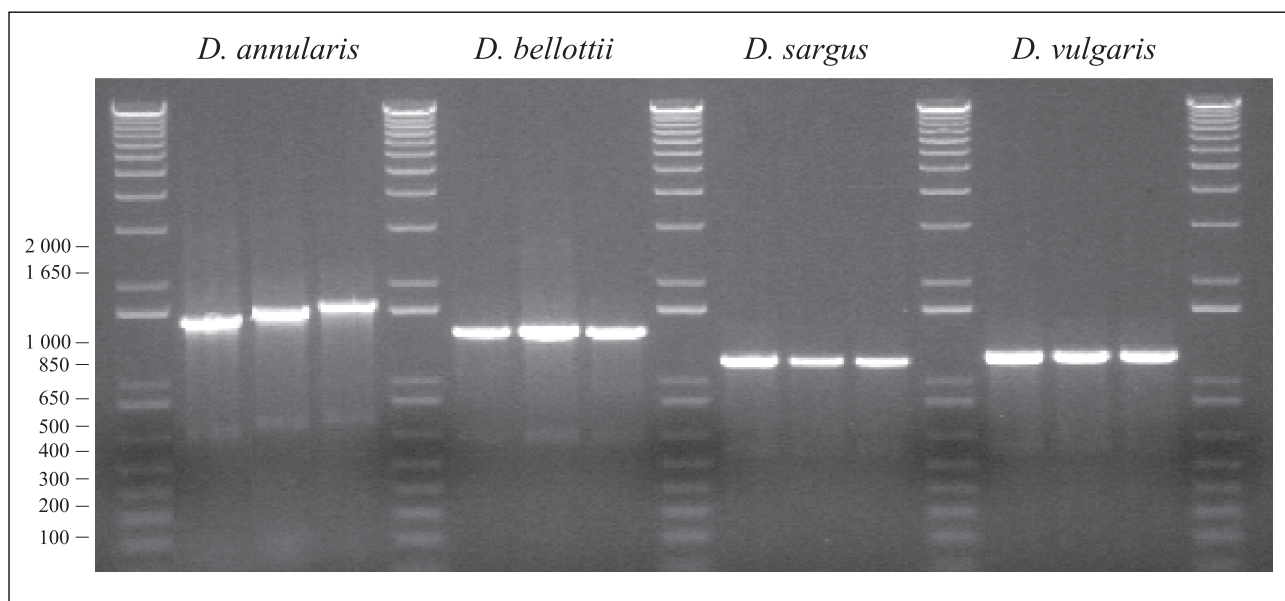


Figura 3. Estudio de la heteroplasmia en las cuatro especies de *Diplodus*. En *D. annularis* se observan bandas de distinto tamaño, mientras que en el resto de especies son de idéntico tamaño. A la izquierda, el marcador de peso molecular.

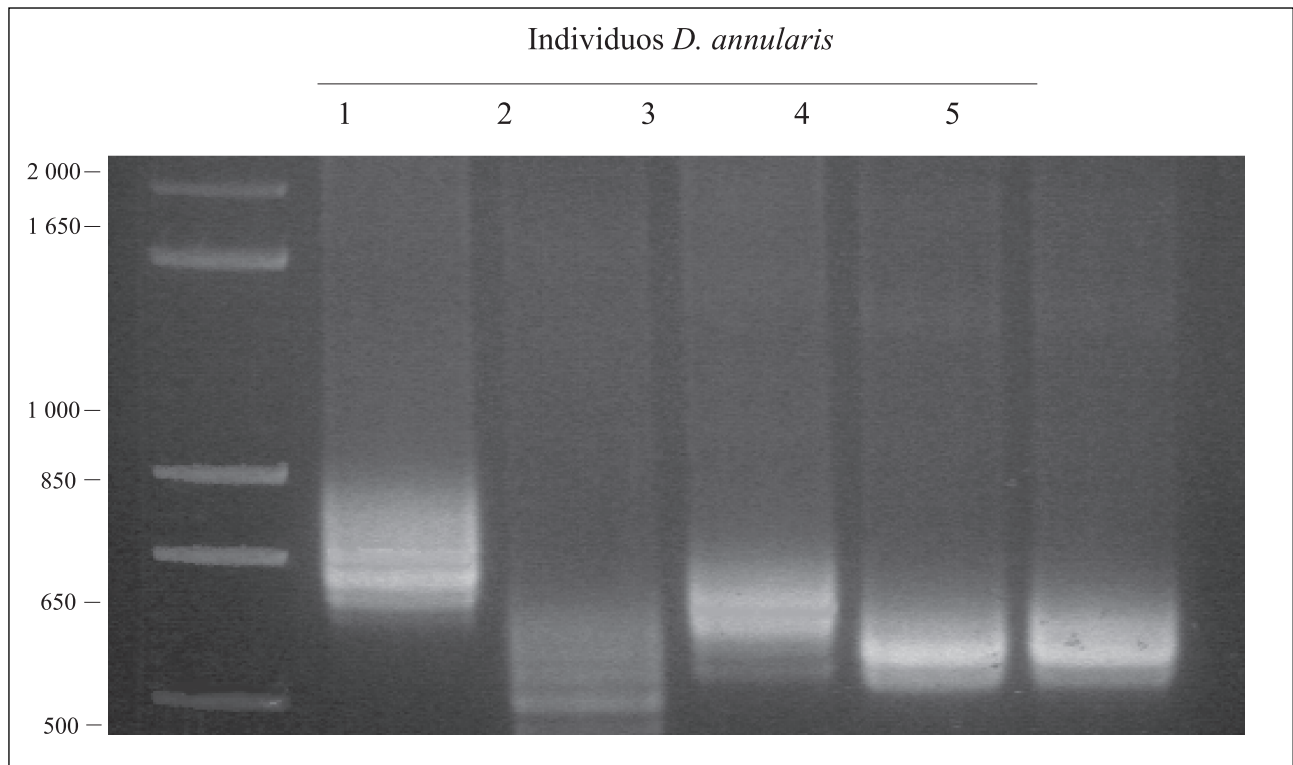


Figura 4. Amplificación de la región repetida en cinco individuos de *D. annularis*. La electroforesis se llevó a cabo en un gel de agarosa al 2,5 %. A la izquierda, el marcador de peso molecular.

Estructura secundaria de la repetición

La secuencia repetida en tándem tenía la capacidad de formar una estructura secundaria muy estable. Al comparar diferentes números de repeticiones, se pudo observar cómo la repetición se plegaba sobre sí para formar un lazo estable de $-11,57$ kcal/mol. A medida que aumentaban las repeticiones, se formaban estructuras más estables en las que participaban dos repeticiones adyacentes. Tales estructuras están muy conservadas, especialmente en la distribución intermedia de tres espaciadores con C. La última repetición en todos los haplotipos analizados presentaba una mutación muy conservada, lo que provocaba un desplazamiento de la región espaciadora con C. Esta modificación podría estar implicada en el reconocimiento del final de la zona repetida.

DISCUSIÓN

La región de control de *D. annularis*, *D. bellottii*, *D. sargus* y *D. vulgaris* tiene una estructura seme-

jante a la encontrada en otras especies de peces y vertebrados. En la parte central de la región de control se identifica el dominio CSB-D, altamente conservado en *Diplodus* y otras especies de peces (Lee *et al.*, 1995). Su función es desconocida, pero se sugiere que tiene una función activa en el metabolismo mitocondrial. Adyacente al gen que codifica para el ARN^t^{Phe}, están otras tres secuencias conservadas en bloque (CSB1, CSB2 y CSB3) (Walberg y Clayton, 1981). Dichas secuencias actúan como señales reguladoras para la replicación de la cadena pesada.

En el extremo 5' se encuentran las secuencias TAS para la terminación de la replicación (figura 1) (Doda, Wright y Clayton, 1981). Esta secuencia tiene gran analogía entre todas las especies de *Diplodus* analizadas, y también con otras especies de teleósteos, como *Chanos chanos* (Forsskål, 1775) (Ravago, Monje, Juino-Menez, 2002), *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758) (Manchado, Catanese e Infante, 2004) o *Dascyllus trimaculatus* (Rüppell, 1829) (Chen *et al.*, 2004).

La región de control en *D. annularis* presentó un tamaño mayor que en el resto de las especies

de *Diplodus* analizadas. Esto se debió a la presencia de una secuencia repetida en tándem de 37 pb (figura 1), cuyo número de copias varió dentro y entre individuos. Esta secuencia repetida se encuentra localizada al principio de la región de control próxima al ARNt^{Pro}. En cada una de las repeticiones se encuentra la secuencia TAS. Al existir más de una TAS en la región de control, como en el caso estudiado, la transcripción de la región de control podría terminar en una TAS más o menos distal, lo que daría como resultado moléculas de ADNmt de distinto tamaño (Doda, Wright y Clayton, 1981).

La variación en el tamaño de esta región osciló entre 1 367 pb y 1 626 pb en los individuos estudiados, con un número de repeticiones entre 12 y 19. La presencia de heteroplasmia debida a repeticiones en tándem se ha descrito también en otros teleósteos. Así, en *Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758 se han observado dos tipos de repeticiones de 17 y 48 pb (Cesaroni *et al.*, 1997), mientras que en *Acipenser transmontanus* Richardson, 1836 (Brown, Beckenbach y Smith, 1992) y *D. trimaculatus* (Chen *et al.*, 2004) la región repetida ha alcanzado los 82 y 105 pb, respectivamente. El rango de repeticiones también es variable, oscilando entre 2 copias en *Hippoglossoides platessoides* (Fabricius, 1780) (Lee *et al.*, 1995) y 19-20 en *D. labrax* (Cesaroni *et al.*, 1997) o *C. chanos* (Ravago, Monje, Juino-Menez, 2002)

La secuencia repetida forma una estructura secundaria muy estable, que aumenta a medida que lo hace el número de repeticiones. Estas repeticiones son perfectas, con independencia del número, excepto la última repetición, que posee dos transiciones. Dicho cambio supone un pequeño desplazamiento de la ubicación de una C, lo que sugiere un posible papel regulador para indicar el final de la zona repetida.

BIBLIOGRAFÍA

Arnason, E. y D. Rand. 1992. Heteroplasmia of short tandem repeats in mitochondrial DNA of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Genetics* 132: 211-220.

- Bauchot, M. L. y J. C. Hureau. 1986. Sparidae. En: *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*. P. J. P. Whitehead, M. L. Bauchot, J. C. Hureau, J. Nielsen y E. Tortonese (eds.): 883-907. Unesco. París.
- Brown, J., A. Beckenbach y M. Smith. 1992. Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmia in populations of white sturgeons (*Acipenser transmontanus*). *Genetics* 132: 221-228.
- Brown, W., M. J. George y A. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 76: 1967-1971.
- Cesaroni, D., F. Venanzetti, G. Allegrucci y V. Sbordoni. 1997. Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmia in natural populations of the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Mol. Biol. Evol.* 14: 560-568.
- Chen, C. A., M. C. Anonuevo Ablan, J. W. McManus, J. Diepernk Bell, V. S. Tuan, A. S. Cabanban y K. T. Shao. 2004. Variable numbers of tandem repeats (VNTRs), heteroplasmia, and sequence variation of the mitochondrial control region in the three-spot Dascyllus, *Dascyllus trimaculatus* (Perciformes:Pomacentridae). *Zoological Studies* 4: 803-812.
- Clayton, D. 1992. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int. Rev. Cytol.* 141: 217-232.
- Doda, J., C. Wright y D. Clayton. 1981. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78: 6116-6120.
- Lee, W., J. Conroy, W. Howell y T. Kocher. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *J. Mol. Evol.* 41: 54-66.
- Manchado, M., G. Catanese y C. Infante. 2004. Complete mitochondrial DNA sequence of the Atlantic Bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). *Fisheries Science* 70 (1): 68-73.
- Mulligan, T. y R. Chapman. 1989. Mitochondrial DNA analysis of Chesapeake Bay white perch, *Morone americana*. *Copeia* 3: 679-688.
- Rand, D. 1994. Concerted evolution and RAPPING in mitochondrial VNTRs and the molecular geography of cricket populations. En: *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. B. Schierwater, B. Streit, G. Wagner y R. DeSalle (eds.) 19: 227-245. Birkhäuser, Experimentia Supplementum Series. Berlín.
- Ravago, R., V. Monje y M. Juino-Menez. 2002. Length and sequence variability in mitochondrial control region of the milkfish, *Chanos chanos*. *Marine Biotechnology* 4(1): 40-50.
- Walberg M. W. y D. A. Clayton. 1981. Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 9: 5411-5421.
- Wilson, A., R. Cann, S. Carr, M. George, U. Gyllensten, K. Helm-Bychowski, R. Higuchi, S. Palumbi, E. Prager, R. Sage y M. Stoneking. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.* 26: 375-400.