ESTUDIOS DE DIVERSIDAD CON MARCADORES GENÉTICOS EN ESPECIES DE CLUPEIFORMES Y SILURIFORMES DEL RIO DE LA PLATA Y SU FRENTE MARITIMO.

Graciela García [1], Julia Vergara & Leticia Méndez
Sección Genética Evolutiva, Instituto de Biología. Facultad de la Ciencias Iguá 4225. Montevideo-Uruguay. Tel: 525 86 18.[1] ggarcia@fcien.edu.uy

ABSTRACT

A preliminary population genetic study based on molecular markers in *Lycengraulis grossidens* and *Pimelodus albicans* species from "Río de la Plata" and its "Frente Marítimo" was carried out within FREPLATA Project. The null hypothesis assume an extensive and panmictic population and the present study try to detect subpopulations or stock structure within the taxa analyzed from Río de la Plata, Frente Marítimo and its associated basins. Cytochrome b sequences (≅ 700 bp) showed and important informative content of the genetic diversity and the population structure. The genetic variability was not homogeneous among all collection sites. While both species have migratory habits, they showed structured population among samples belonging to distant distribution localities. The genetic estimates of the population polymorphism and the phylogenetic analyses performed from haplotypes provided valuables tools for fisheries management and conservation purposes concerning these species.

INTRODUCCION

El presente trabajo aborda de manera preliminar, la detección de poblaciones locales y "stocks" en dos especies distribuidas en el Río de la Plata y su Frente Marítimo: *Licengraulis grossidens* (Clupeiformes: Engraulidae) y de *Pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae). Se ha mencionado (Scverlij et al. 1998) que ambas especies realizan migraciones en áreas más o menos extensas del Río de la Plata y su sistema de ríos asociados, pero se desconoce en profundidad aspectos de la dinámica poblacional en ambos taxones. Los marcadores elegidos (secuencias de ADN mitocondrial) permiten inferir los niveles de flujo génico y de divergencia genética entre individuos de las localidades muestreadas permitiendo definir si se trata de una única población suficientemente extensa o de subpoblaciones diferenciadas localmente dentro de estas dos especies que constituyen recursos compartidos.

MATERIAL Y METODOS

Muestras

Este trabajo incluyó 34 ejemplares (juveniles y adultos) de *Licengraulis grossidens* y 34 muestras de hígado correspondientes a *Pimelodus albicans* procedentes de 5 estaciones de muestreo durante la campaña realizada por el proyecto FREPLATA (ver Lasta et al. 2001).

Técnicas de análisis del material

i.- *Experimentos de extracción del ADN total*

Las muestras (trozos de hígado y/o músculo, hasta 20 g) conservadas en alcohol fueron empleadas en la extracción del ADN total siguiendo el protocolo de Medrano et al. (1990) con modificaciones.

ii.- *Experimentos de amplificación del ADN mitocondrial*

Los experimentos de amplificación in vitro (via PCR, Polymerase Chain Reaction) se realizaron con oligonucleótidos específicos, CB3-H y GLUDG-L (Palumbi et al.

1991) que amplifican un fragmento de aproximadamente 800 pb del citocromo b mitocondrial. La secuenciación directa de los productos amplificados y purificados se realizó en el Servicio ATGen de la Facultad de Ciencias, MVD.

iii.- *Análisis de los datos*

Las secuencias obtenidas fueron alineadas en el programa CLUSTAL_X (Thompson et al. 1997). Varios estadísticos y parámetros poblacionales, medidas diversidad estándar a nivel molecular y distancia genética, así como el test de neutralidad de Tajima (1989) y el Análisis de la Varianza Molecular fueron implementados en MEGA Versión 2.0, (Kumar et al. 2001) y Arlequin (Schneider et al. 2000). Los análisis filogenéticos (distancia y parsimonia) entre haplotipos fueron implementados en los programas MEGA 2. Versión 2.0 (Kumar et al. 2001) y PAUP (Swofford 1996). En ambos tipos de reconstrucción la confiabilidad de la topología obtenida fue testada mediante 1000 réplicas del test de "bootstrap".

RESULTADOS Y DISCUSION

Para ambas especies el fragmento de citocromo b utilizado (aproximadamente 700 pb) mostró valioso contenido informativo. En la tabla 1 se muestra el número de sitios variables e informativos (en pares de bases) y los diferentes estimadores de polimorfismo genético utilizados en las comparaciones entre los 15 haplotipos detectados en cada una de las dos especies.

Tabla -1 Estimadores del polimorfismo poblacional

	Pares de bases	Sitios Variables	Sitios Informativos	S	Nº Haplotipos	Diversidad haplotípica	Diversidad nucleotídica	π	Distancia promedio K2P	FST	D
Pimelodus albicans	702	256	66	0,365	15	0,68	0,067	0,022	0,020	0,22 P<0,05	-0,7083 P<0,01
Lycengraulis grossidens	720	140	82	0,198	15	0,71	0,077	0,047	0,032	0,54 P<0,05	- 0,6930 P<0,01

Los estimadores analizados en *Pimelodus albicans* y *Lycengraulis grossidens* a partir del fragmento de citocromo b mitocondrial secuenciado. S= proporción de sitios segregantes. ð= número promedio de diferencias pareadas. Distancia promedio entre estaciones según el modelo de Kimura 2 parámetros (Kimura 1980). Valores promedio de FST obtenidos en el AMOVA. D= valores del test de Neutralidad de Tajima (1989).

En *Pimelodus albicans* la diversidad haplotípica total es alta. En el análisis filogenético el árbol de distancia (Figura 1a) entre haplotipos reveló el agrupamiento de los mismos. La localidad E765 resultó la más diversa con distancia genética promedio de 3,5% resultando el punto de confluencia de los dos grupos de localidades (Figura 2b). Los valores negativos y significativos del test de Neutralidad de Tajima (1989) indicarían la existencia de algún tipo de selección actuando en el caso de la E779 (con baja diversidad genética 1,3%) representando ésta la Estación más distal de las muestras disponibles, entre los ambientes del Río de la Plata y del Frente Marítimo.

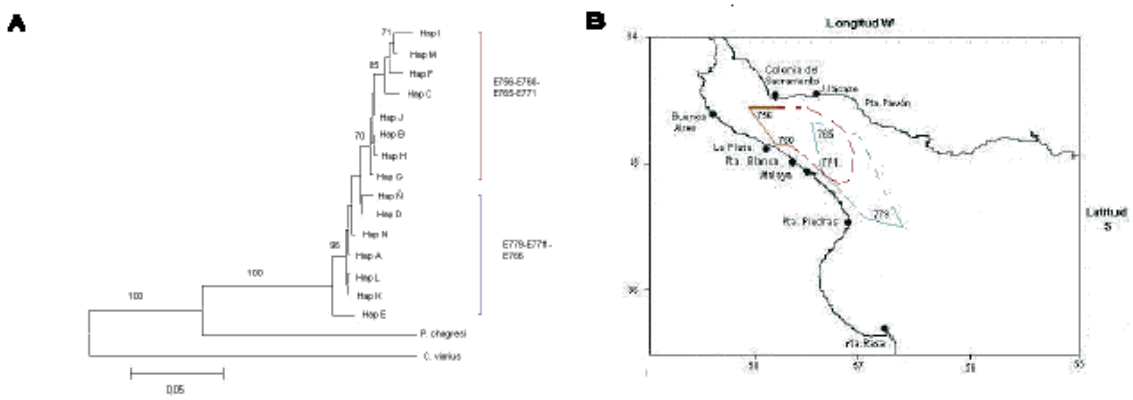

Figura 1. A) Árbol de distancia en base al modelo Kimura 2-parámetros (Kimura 1980) utilizando el algoritmo "Unión de Vecinos" (Saitou & Nei 1987) como método de agrupamiento de 15 haplotipos de citocfromo b mitocondrial en *Pimelodus albicans*. Los grupos externos utilizados: *Pimelodella chagresi* y *Cynolebias viarius*. Los números de los nodos representan el porcentaje de apoyo (sólo valores superiores al 50%) de las ramas mediante el método "bootstrap" con 1000 replicas. Las barras verticales muestran las localidades de los haplotipos agrupados. (E=estación, número de acuerdo a código Lasta et al. 2001). **B)** Agrupamiento de Estaciones y posibles conecciones entre muestras de *Pimelodus albicans* en base a los datos emergentes del presente trabajo. (Tomado y modificado de Lasta et al. 2001).

La árboles filogenéticos construidos en *Lycengraulis grossidens* muestran la existencia de una extensa "politomía en estrella" (Figura 2a) con robusto soporte estadístico.

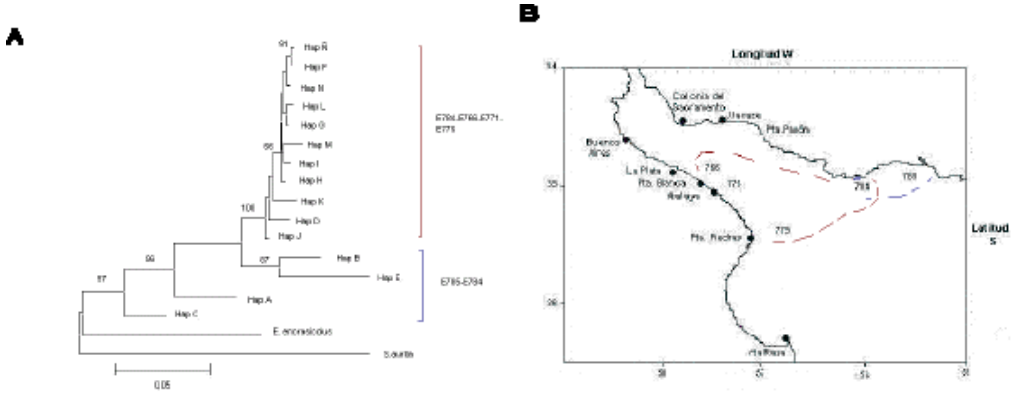

Figura 2. A) Árbol de distancia en base al modelo Kimura 2-parámetros (Kimura 1980) utilizando el algoritmo "Unión de Vecinos" (Saitou & Nei 1987) como método de agrupamiento de 15 haplotipos de citocfromo b mitocondrial en en *Lycengraulis grossidens.* Los grupos externos utilizados: *Sardinella aurita* y *Engraulis encrasicolus*. Los números de los nodos representan el porcentaje de apoyo (sólo valores superiores al 50%) de las ramas mediante el método "bootstrap" con 1000 replicas. Las barras verticales muestran las localidades de los haplotipos agrupados. (E=estación, número de acuerdo a código Lasta et al. 2001). **B)** Agrupamiento de Estaciones y posibles conecciones entre muestras de *Lycengraulis grossidens* en base a los datos emergentes del presente trabajo. (Tomado y modificado de Lasta et al. 2001).

Los haplotipos de E785 y algunos de la E784 resultaron ser los más divergentes colapsando basalmente en la topología del árbol. Las estimaciones indirectas del nivel del flujo génico entre las localidades evidenciaron que la E785 está

prácticamente aislada de las restantes, excepto de la estación más cercana geográficamente E784 (Figura 2b). La diversidad haplotípica relativamente alta y valores de diversidad nucleotídica moderados a bajos, el valor negativo del test de Tajima y el agrupamiento de los haplotipos en una politomía, podrían estar indicando la existencia de expansión poblacional relativamente reciente, permitiendo la retención de nuevas mutaciones sin suficiente tiempo para la acumulación de extensa diferenciación entre los haplotipos. Concluyendo, los datos obtenidos para *Licengraulis grossidens* y *Pimelodus albicans*, especies explotadas en pesquerías artesanales, contribuyen al manejo racional de estos recursos acorde con un conocimiento más profundo de su historia demográfica y de su diversidad genética. La lista de haplotipos configurada constituye un registro importante en el monitoreo periódico de dichas poblaciones. Futuros análisis incluyendo otros marcadores y ampliando el número de Estaciones deberán profundizar las tendencias detectadas en este trabajo a nivel de estructura poblacional.

BIBLIOGRAFÍA

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

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111-120.

Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA 2. Versión 2.0. Molecular Evolutionary Genetics Analysis software.

Lasta C, Acha M, Brazeiro A, Mianzan H, Perdomo A, Gómez M & Calliari D. 2002. Campaña de prospección ambiental del Río de la Plata y su Frente Marítimo. Documento de Trabajo Nº 2. Informe de Avance. Proyecto PNUD/GEF RL/99/G31, FREPLATA, PNUD. 202 p.

Medrano JF, Aasen E, Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. Biotechniques 8: 43.

Palumbi S, Martin A, Romano S, McMillan WO, Stice L, Grabowski G. 1991. The simple fool´s guide to PCR. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, Univ. Hawaii, Honolulu.

Saitou N, Nei M. 1987.The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.

Schneider, S. Roessli, D. & Excoffier, L. 2000. A software for population genetics data analysis. University of Geneva, Switzerland.

Sverlij SB, Delfino Schenke RL López HL & Espinach Ros A. 1998. Peces del Río Uruguay. Guía ilustrada de las espceis más comunes del Río Uruguay Inferior y el Embalse de Salto Grande. CARU. Paysandú.

Swofford, D.L. 1996 “PAUP*. (Phylogenetic Analysis Using Parsimony)”.Version 4.(test version 0). Sinauer, Sunderland, MA.

Tajima F. 1989. Statiscal method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585-595.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acid Research 25 (24):4876