

Estudios genético-poblacionales de *Caiman latirostris* (Reptilia, Alligatoridae) en Santa Fe, Argentina: una revisión a través del tiempo

Patricia AMAVET^{1,2}, Esteban ROSSO¹, Rosa MARKARIANI¹ y Alejandro LARRIERA^{1,2}.

Resumen: ESTUDIOS GENÉTICO-POBLACIONALES DE CAIMAN LATIROSTRIS (REPTILIA, ALLIGATORIDAE) EN SANTA FE, ARGENTINA: UNA REVISIÓN A TRAVÉS DEL TIEMPO.- Los estudios genéticos en *Caiman latirostris* (Yacaré overo) en Santa Fe, Argentina, comenzaron con un análisis citogenético en comparación con *Caiman yacare*. El cariotipo en ambas especies consistió de 42 cromosomas, con un patrón de bandas C difuso y un solo par de cromosomas con NOR. Debido a la falta de diferencias claras entre ambos cariotipos, decidimos usar marcadores moleculares en el análisis de esta especie. Cuatro isoenzimas: Esterasas, Isocitrato Dehidrogenasa, Malato Dehidrogenasa, y Superóxido Dismutasa se analizaron en animales provenientes de cuatro poblaciones santafesinas. En todos los casos se encontraron valores nulos de heterocigosis. Se analizaron 7 primers para RAPD y sólo 13.73 % de 233 marcadores analizados resultaron polimórficos. Los resultados para polimorfismos, heterocigosis y número medio de alelos por locus en las poblaciones fueron niveles bajos a intermedios. El análisis de AMOVA indicó que casi toda la variación existe dentro de las poblaciones, significando que varios alelos son compartidos entre las poblaciones. Debido a que los marcadores RAPD pueden ser menos eficaces en detectar variaciones que los microsatélites en poblaciones de cocodrilianos, en estos momentos estamos comenzando a utilizar esta técnica en el análisis poblacional. Hasta el momento se han amplificado positivamente cuatro primers, y detectamos indicios de la existencia de más de un padre en tres familias. Los datos genéticos de especies nativas son fundamentales para establecer y evaluar planes de manejo, y el análisis de variabilidad es básico para el conocimiento biológico de las especies, aportando a la sistemática, la ecología y la biodiversidad.

Palabras clave: caimán, genética, variabilidad

Abstract: GENETIC STUDIES ON CAIMAN LATIROSTRIS (REPTILIA, ALLIGATORIDAE) IN SANTA FE, ARGENTINA: A REVIEW THROUGH TIME.- Genetic studies in *Caiman latirostris* (Broad-Snouted Caiman) in Santa Fe, Argentina, started with a cytogenetic analysis in contrast with *Caiman yacare*. Obtained karyotype in both species was of 42 chromosomes, a pale C-banding pattern and only one NOR bearing chromosome pair. Due to the lack of relevant differences between both karyotypes, we decided to use molecular markers in the analysis of this species. Four isozymes: Esterase, Isocitrate Dehydrogenase, Malate Dehydrogenase, and Superoxide Dismutase were studied in animals from 4 populations of Santa Fe province. In all cases were found heterozygosity values of 0, in agreement with other authors. We analyzed a set of 7 RAPD primers. Only 13.73 % of 233 RAPD markers that were analyzed, were polymorphic. Results suggest low to intermediate levels of polymorphism, heterozygosity and mean number of alleles per locus for each population. AMOVA indicated that nearly all variation exists within rather than among them, implying that several alleles are shared among populations. Due to RAPD markers may not be as effective at detecting variation as microsatellite amplification in populations of crocodylians, in this moment we start an analysis with this molecular technique. Up to the moment four primers have been amplified with positive results. Our results appear to reveal indications of more of one father in three families. Obtained data about genetic aspects of native species are fundamental for establishing and evaluating management plans, because the variability analysis is basic in the biologic knowledge of the species and their systematic, ecology and biodiversity.

Key words: caiman, genetics, variability

¹Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad Universitaria Paraje El Pozo (3000) Santa Fe, Argentina, pamavet@fhuc.unl.edu.ar.

²Proyecto Yacaré, Aristóbulo del Valle 8700, (3000) Santa Fe, Argentina.

Introducción

Caiman latirostris (yacaré overo) es una de las dos especies de cocodrilianos que habitan en Argentina. Sus poblaciones silvestres santafesinas son objeto de manejo en el marco de las actividades del Proyecto Yacaré, programa de monitoreo y autorreplanteamiento que utiliza el sistema de *ranching*, cuyo objetivo es el uso sustentable de esta especie, junto con la conservación del hábitat que la aloja (Larriera, 1992).

Desde 1997, *C. latirostris*, en Argentina, se encuentra listado en el Apéndice II de CITES, debido a su franca recuperación numérica, por lo cual se permite su comercio estrictamente regulado (Larriera, 1998) y se ha convertido en una especie de gran importancia comercial, a nivel nacional e internacional.

Existen escasos antecedentes de estudios a nivel genético de esta especie en nuestro país. El análisis de la diversidad genética es un área clave para el manejo de poblaciones silvestres saludables (Thorbjarnarson, 1992; Haig, 1998). Los investigadores acuerdan que una variación genética considerable puede aumentar la capacidad de una especie para adaptarse a cambios en las condiciones ambientales (Mayr, 1963). Desde la perspectiva de la conservación, un conocimiento profundo de las características genéticas de una especie y de sus poblaciones es clave para desarrollar planes de manejo, ya que la plasticidad genética de una población define su comportamiento ecológico a futuro y su respuesta a la aplicación de estrategias de manejo (Frankham *et al.*, 2002).

Métodos y Análisis

Análisis citogenéticos

Los estudios genéticos en *C. latirostris* en Santa Fe, Argentina, comenzaron con un análisis citogenético en comparación con la otra especie de yacaré argentina, *C. yacare*. (Amavet *et al.*, 2003). El trabajo se realizó cultivando sangre entera obtenida por punción a partir del seno postoccipital supravertebral a nivel de las vértebras cervicales (Tourn, *et al.*, 1993). (Fig. 1).



Figura 1: Extracción de sangre en un juvenil de *C. latirostris*.

Mediante tinción tradicional con Giemsa se obtuvo un cariotipo muy similar en las dos especies, constituido por 42 cromosomas: 12 pares de cromosomas telocéntricos grandes y medianos, 7 pares de metacéntricos-submetacéntricos medianos y dos pares de microcromosomas (Fig. 2).

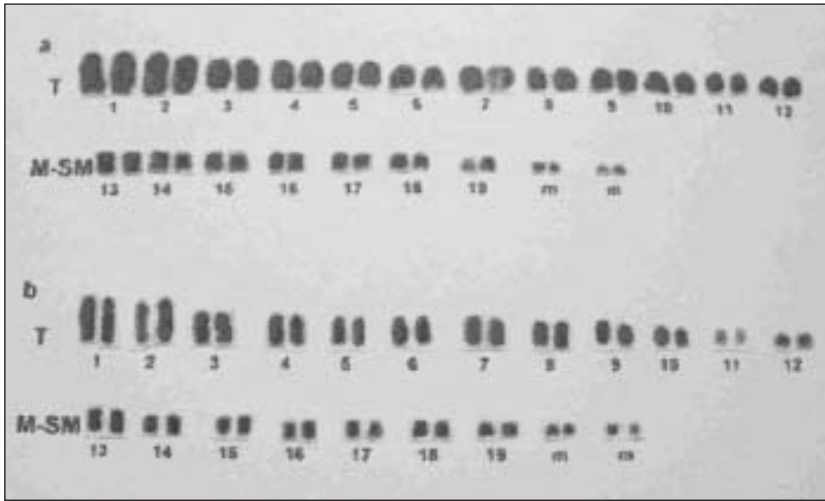


Figura 2: Cariotipos con tinción convencional de Giemsa: (a) *C. yacare*, (b) *C. latirostris*.

Luego se aplicaron bandeos diferenciales para identificar regiones funcionales en los cromosomas. Se utilizó bandeo C (Sumner, 1972) que determina regiones de heterocromatina constitutiva (Fig. 3) y bandeo NOR (Howell y Black, 1980) que localiza los organizadores nucleolares.

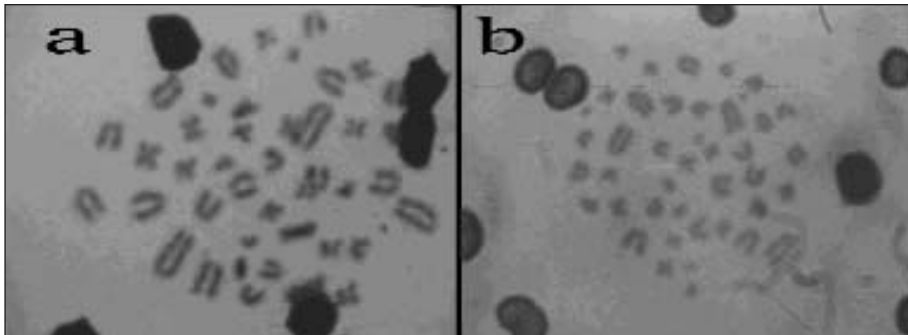


Figura 3: Metafasas con bandeo C: (a) *C. yacare*, (b) *C. latirostris*. (Microfotografías obtenidas con diferentes aumentos).

De modo similar a lo observado en otros reptiles, la obtención de bandas fue dificultosa, y se obtuvo un patrón difuso de bandas C teloméricas, centroméricas e intersticiales y un par de cromosomas portador de NOR.

Debido a la carencia de diferencias relevantes entre los cariotipos de estas espe-

cies, se decidió el uso de marcadores bioquímicos y moleculares para profundizar el análisis genético, tomando como objetivo el análisis de *C. latirostris* por su amplia distribución en la provincia de Santa Fe y su inclusión en programas de manejo y uso sustentable.

Estudios poblacionales: Determinación de sitios de muestreo

Para realizar un análisis poblacional dentro de la provincia de Santa Fe, se determinaron cuatro zonas de muestreo (Fig. 4), a partir de las cuales se pudieran obtener muestras de individuos que no estén emparentados, y que probablemente integraran distintas poblaciones de la especie. Esta planificación se basa en la observación de que las hembras de *C. latirostris* nidifican todos los años en el mismo sitio (Larriera, obs. pers.), por lo cual, aparentemente, esta especie tendría escasa vagilidad, es decir que los traslados de individuos a lo largo de cuerpos de agua interconectados no estarían vinculados con la reproducción. Por este motivo, muestreando en zonas suficientemente alejadas entre sí, se pueden obtener datos de poblaciones diferentes.

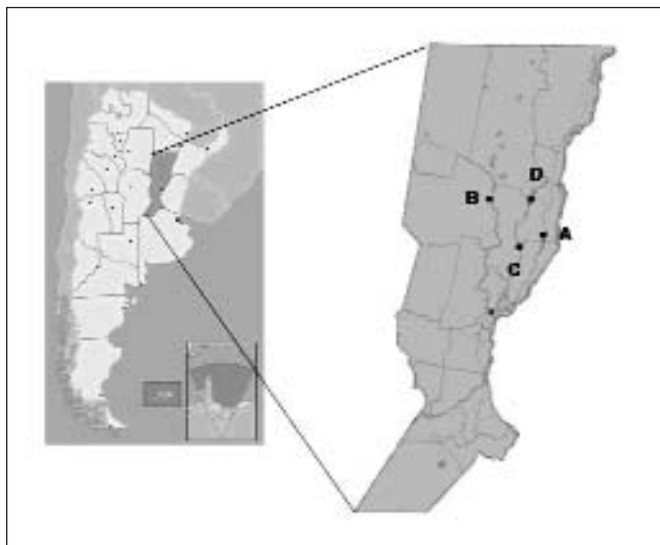


Figura 4: Sitios de muestreo (A): Estancia El Estero, (B): Costa del río Salado, (C): Estero del potrero 114, (D) Arroyo El Espín.

Análisis bioquímicos: isoenzimas

Las isoenzimas son enzimas analizadas en diferentes individuos, que debido a diferencias en el gen que las codifica, pueden tener distinta estructura, sin dejar de cumplir su función enzimática principal. Se analizaron 4 sistemas isoenzimáticos: Esterasas (EST), Isocitrato Dehidrogenasa (IDH), Malato Dehidrogenasa (MDH) y Superóxido Dismutasa (SOD) en animales provenientes de las cuatro poblaciones mencionadas. Las muestras utilizadas fueron porciones de hígado, riñón y corazón obtenidas por biopsia, resuspendidas en agua y analizadas mediante electroforesis en geles de almidón al 12.5% utilizando los protocolos de Murphy *et al.* (1996) y Flint *et al.* (2000). En todos los casos se hallaron bandas coincidentes en todos los individuos, lo que sig-

nifica que todos los individuos poseen la misma estructura isoenzimática y por lo tanto, el mismo alelo en homocigosis (Amavet *et al.*, 2006). Los valores nulos de heterocigosis observados, coinciden con lo analizado por otros autores que realizaron análisis isoenzimáticos en otros cocodrilianos: Menzies *et al.* (1979); Gartside *et al.* (1976); Lawson *et al.* (1989) y Flint *et al.* (2000).

Análisis de marcadores moleculares:

Debido a los resultados obtenidos mediante métodos bioquímicos se inició un análisis de marcadores moleculares, los cuales implican estudios específicos del ADN. La primera técnica aplicada fue un análisis de RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar). Esta técnica consiste en analizar mediante amplificación con *primers* arbitrarios, diferentes segmentos al azar del ADN. Si estos segmentos son distintos en diferentes individuos significa que estos individuos son variables entre sí y poseen genotipos distintos en estos loci. Esta metodología molecular tiene la ventaja de poder analizar muchos loci por vez, por lo que permite realizar un rápido *screening* del genoma (Hadrys *et al.*, 1992).

Para este estudio se utilizó sangre entera de 10 individuos provenientes de cada una de las poblaciones mencionadas. El ADN se extrajo utilizando la técnica de Murray y Thompson (1980) y se emplearon 7 *primers* arbitrarios. Los segmentos amplificados se analizaron en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con nitrato de plata (Bassam *et al.*, 1991).

Como resultado se analizaron 233 loci génicos de los cuales sólo el 32% fueron variables. A partir del análisis de las bandas obtenidas se estimaron las tasas de migración y valores de subdivisión poblacionales que resultaron en bajos niveles de flujo génico y cierta subdivisión en distintas poblaciones. Se calcularon valores de heterocigosis, número medio de alelos por locus, y distancias genéticas que resultaron de intermedios a bajos. Aplicando un análisis de AMOVA se observó que la mayor parte de la variación existe dentro de las poblaciones antes que entre ellas, indicando que muchos alelos son compartidos entre las poblaciones. Esto sugiere cierta homogeneidad entre las poblaciones y que éstas podrían formar parte de una única unidad de conservación a tener en cuenta en los planes de uso sustentable (Amavet *et al.*, 2007).

Para profundizar el análisis genético se inició un estudio de marcadores microsatélites que consisten en secuencias específicas muy cortas de ADN, altamente variables entre individuos. Esta herramienta molecular permite aumentar el poder del análisis genético-poblacional ya que posibilita establecer relaciones de parentesco entre individuos (Tautz y Schlötterer, 1994).

Para realizar el estudio se obtuvo ADN a partir de sangre extraída a hembras de *C. latirostris* que se hallaban al cuidado de nidos en los sitios de muestreo. Los huevos contenidos en esos nidos fueron incubados artificialmente en instalaciones del Proyecto Yacaré. Luego de 5 días de nacidos, se tomaron al azar 15 pichones de cada nido para obtener muestras de sangre y realizar la correspondiente extracción de ADN. Se utilizaron cuatro marcadores microsatélites, y los productos amplificados fueron analizados en geles de poliacrilamida al 10% teñidos con nitrato de plata. Hasta el momento, los resultados obtenidos denotan valores de variabilidad mucho más altos que los detectados con RAPD y ciertos indicios de multipaternidad en las familias, lo cual, de comprobarse, sería una fuente importante de variabilidad intrafamiliar.

Conclusiones

Los niveles de variabilidad en esta especie autóctona, como en otros cocodrilianos, se revela como baja a moderada dependiendo de la técnica utilizada en el análisis. Muchos autores relacionaron estos valores a eventos de “cuello de botella” (deriva génica), adaptación a nichos angostos en ambientes relativamente estables, sistemas genéticos que limitan la variabilidad o selección direccional (Gartside *et al.*, 1977; Lawson *et al.*, 1989). Dever *et al.* (2002) rechazaron estas hipótesis y sugirieron que los bajos valores de variabilidad observados fueron debidos a la baja sensibilidad de las técnicas empleadas. La herramienta molecular más ampliamente aceptada en la actualidad para análisis de variabilidad poblacional en cocodrilianos, es la amplificación de loci microsatélites, técnica que ha sido eficazmente aplicada en este trabajo y que se vislumbra como la más apropiada para profundizar en el análisis genético familiar y poblacional.

Se considera necesaria la implementación de nuevos y más profundos estudios genéticos que exploren las características poblacionales de nuestras especies regionales en toda su área de distribución, ya que éstos datos son fundamentales para evaluar e implementar nuevos planes de acción integrales y de uso sustentable en el futuro. El aporte de los estudios genéticos que analizan variabilidad, a diferentes niveles, se ha convertido en una herramienta básica para el conocimiento biológico de las especies y en consecuencia, para la sistemática, la ecología y la biodiversidad.

Agradecimientos

Estos trabajos fueron realizados con aportes del Proyecto CAI+D 2002 de la UNL (PI 102- PACT 14), del Proyecto CAI+D 2006 de la UNL (PI 119- PACT 20), del PIP 6375 de CONICET, y del Proyecto Yacaré (Min. Prod./MUPCN), Santa Fe, Argentina. Agradecemos a todos los miembros del Proyecto Yacaré, especialmente a Pablo Siroski y Gisela Poletta por su asistencia en la provisión de muestras y a los pasantes de los proyectos CAI+D por su colaboración en las extracciones de ADN.

Bibliografía

- Amavet, P.; Markariani, R. y Fenocchio, A. 2003. Comparative cytogenetic analysis of the South American Alligators *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Reptilia, Alligatoridae) from Argentina. *Caryologia*. Vol. 56, n° 4: 489-493.
- Amavet, P.; Rosso, E.; Markariani, R.; Poletta, G. y Larriera, A. 2006. Genetic characterization of *Caiman latirostris* populations, applying RAPD and Isozymes techniques. Crocodiles. Proceedings of 18th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group (IUCN/SSC). Junio, 2006, Montélimar, Francia. p: 365.
- Amavet, P.S.; Rosso, E.L.; Markariani, R.M.; y Larriera, A. 2007. Analysis of the population structure of Broad-Snouted Caiman (*Caiman latirostris*) in Santa Fe, Argentina, using the RAPD technique. *Journal of Herpetology*, Vol. 41, No.2: 285-295.
- Bassam, B. J.; Caetano- Anolles, G. y Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196: 80-83.
- Dever, J. A.; Strauss, R. E.; Rainwater, T. R.; McMurry, S. T. y Densmore, L. D. 2002. Genetic diversity, population subdivision, and gene flow in Morelet's Crocodile (*Crocodylus moreletii*) from Belize, Central America. *Copeia*: 1078-1091.
- Flint, N.S.; van der Bank, F.H. y Grobler, J.P. 2000. A lack of genetic variation in commercially bred Nile Crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in the North-West Province of South Africa. *Water SA*. Vol. 26. No. 1: 105-110.
- Frankham, R.; Ballou, J.D. y Briscoe, J.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press.
- Gartside, D. F.; Dessauer, H.C. y Joanen, T. 1977. Genic Homozygosity in an ancient reptile (*Alligator mississippiensis*). *Biochemical Genetics* 15: 655-663.
- Hadrys, H.; Balick, M. y Schierwater, B. 1992. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in *molecular ecology*. *Molecular Ecology* 1: 55-63.

- Haig, S. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79: 413-425.
- Howell, W. M. y Black, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions whit protective colloidal developer: a 1- step method. *Experientia*, 36:1014-1015.
- Larriera, A. 1992. La conservación y el manejo de *Caiman latirostris* en la Argentina. En: Proceedings of the II Workshop sobre Conservação e Manejo do jacare-de-papo-amarelo (*Caiman latirostris*). 1992. pp: 8-17.
- Larriera A. 1998. The *Caiman latirostris* ranching program in Santa Fe, Argentina: The first commercial rearing 1998. En: Crocodiles. Proceedings of the 14th Working Meeting of the Crocodile Specialist Group, IUCN - The World Conservation Union. Gland, Switzerland and Cambridge UK. pp: 379-385.
- Lawson, R.; Kofron, C.P. y Dessauer, H.C. 1989. Allozyme variation in a natural population of the Nile Crocodile. *American Zoologist* 29: 863-871.
- Mayr, E. 1963. Animal species and evolution. Belknap Press of Harvard Univ. Press, Cambridge, M.A.
- Menzies, R. A.; Kushlan, J. y Dessauer, H.C. 1979. Low degree of genetic variability in the American alligator. *Isozyme Bulletin* 12: 61.
- Murphy, R. W.; Sites, J.W.; Buth, D.G y Haufler, C.H..1996. *Molecular Systematics*. 2nd. Ed. Chapter 4. Ed. By Hillis, D.M., Moritz, C. y Mable, B.K. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts. USA: 51-120.
- Murray, M. G. y Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin (Preliminary notes). *Expl. Cell Res.* , 75 : 304-306.
- Tautz, D.C. y Schlötterer, C. 1994. Simple sequences. *Curr Opin Genet Dev* 4:832-837.
- Thorbjarnarson, J. 1992. En: H. Messel, F.W. King, y J. P. Ross (eds.). Crocodiles: An action plan for their survival. IUCN/SSC Crocodile Specialist Group: Gland, Switzerland.
- Tourn, S; Imhof, A.; Costa, A.L.; von Finck, M.C. y Larriera, A.1993. Colecta de sangre y procesamiento de muestras en *Caiman latirostris* (Informe de avance). pp. 25-30 En Memorias del IV Workshop sobre Conservación y Manejo del yacaré overo (*Caiman latirostris*). Octubre 1993. Santa Fe, Argentina.

Recibido: 25 de noviembre de 2007

Aprobado: 14 de marzo de 2008