

ESTANDARIZACIÓN DE RAPDs-PCR PARA REVELAR DIFERENCIAS GENÉTICAS ENTRE LOS ECOTIPOS FLUVIAL Y MARINO DEL DELFÍN GRIS *Sotalia fluviatilis*

García J.¹, Hernández J.^{2*}, Caballero S.³, Bernal J.⁴

1. Aspirante a B.Sc. U. de los Andes. Tesista CEBM; 2. Coordinador Centro de Estudios en Biología Molecular;

3. Molecular Ecology and Evolution Research Group. The University of Auckland, Nueva Zelanda;

4. Director Centro de Estudios en Biología Molecular

*Autor para correspondencia: centrobiomol@campestre.edu.co

RESUMEN

Usando marcadores moleculares RAPDs-PCR, se buscan evidencias de flujo genético entre los ecotipos marino y fluvial de el Tucuxi (*Sotalia fluviatilis*), con el fin de proporcionar nueva evidencia que permita esclarecer la taxonomía de esta especie de delfín. Se extrajo ADN de 32 muestras de músculo y piel de Tucuxi, y con estas se estandarizó la reacción RAPDs-PCR para 8 iniciadores de un total de 24 evaluados. Los iniciadores amplifican claramente hasta 12 bandas reveladas en geles de agarosa al 1%.

Palabras Claves: Tucuxi, RAPDs-PCR, Ecotipo, Flujo genético.

ABSTRACT

Evidence of genetic flow between the marine and the freshwater ecotype of the Tucuxi (*Sotalia fluviatilis*), is being searched for by using RAPDs markers, with the objective of giving new information that allows elucidate the taxonomy of this cetacean species. DNA was extracted from 32 samples of tissue and muscle of Tucuxi. The PCR-RAPDs reaction was standardized for 8 primers of 24 tested. The primers amplified 12 fragments, revealed in 1% agarosa gels.

Key Words: Tucuxi, RAPDs-PCR, Ecotype, Genetic Flow.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la cuenca de los ríos Amazonas y Orinoco, se distribuyen las dos únicas especies de cetáceos de agua dulce en América: El Tucuxi o Delfín Gris (*Sotalia fluviatilis*) y el delfín Rosado, también llamado Boto, Bufo, Tonina o Bugeo. (*Inia geoffrensis*).⁷

El Tucuxi (*Sotalia fluviatilis*), se diferencia principalmente de su especie simpátrica (es decir de aquella especie que se distribuye y comparte la misma área geográfica⁶) principalmente por su tamaño, mide aproximadamente 1.50 m, mientras que el Bufo puede alcanzar los 2.80m.^{2,3}

De forma general, el Tucuxi se puede describir como un cetáceo (grupo de mamíferos especializado para la vida acuática al cual pertenecen las ballenas, delfines y marsopas) pequeño, con una aleta dorsal característica de forma triangular, corta, alta y con una curvatura hacia

atrás en forma de gancho³, que si bien sigue un patrón similar en todos los individuos, posee características propias que pueden ser utilizadas para identificar a los miembros de un grupo de forma individual.

La coloración de *Sotalia* es gris oscura en el dorso y en la parte ventral va de un gris pálido a un rosa claro, el cual puede verse intensificado con un incremento en la actividad física.⁴ Estas dos coloraciones, están divididas por una línea de distinta coloración que se origina en el "rostro" y la hendidura de la boca, pasa por debajo del ojo y se extiende hasta el comienzo de las aletas.³

La distribución del Tucuxi no se limita solamente a las cuencas de los ríos Amazonas y Orinoco. El Tucuxi también se distribuye a lo largo de las costas del Océano Atlántico de Centro y Sur América, desde Honduras hasta Florianópolis en Brasil; donde se observa principalmente en aguas poco profundas, estuarios, bahías protegidas y en las desembocaduras de los grandes ríos.²



Figura 1. Distribución de *Sotalia fluviatilis* según: <http://library.thinkquest.org/17963/genus-Sotalia.html>.

El sistema de apareamiento de *Sotalia* consiste en grupos donde la hembra copula con varios machos durante la temporada de apareamiento (poliandria)¹, lo que incluye competencia de esperma por parte de los machos. Como consecuencia de esto, los testículos pueden llegar a conformar el 5% de la masa total de los machos durante la época de apareamiento.^{3,5} La gestación dura aproximadamente 11 meses, y en las poblaciones fluviales, la gestación ocurre durante la temporada de aguas bajas.⁵

Si bien los predadores naturales de *Sotalia* son pocos, las muertes ocasionadas por las actividades humanas son altas, en especial sobre el ecotipo fluvial, donde las interacciones con botes a motor y las redes de pesca causan altas mortalidades al año.

A lo largo de esta distribución marina, *Sotalia* presenta una anatomía ligeramente distinta a la anatomía fluvial (Figura 2), por lo que se pueden diferenciar dos poblaciones distintas de la misma especie con dos formas o morfologías. Estas poblaciones diferenciadas son denominadas ecotipos, es decir, poblaciones con una morfología determinada genéticamente que varía localmente de acuerdo con las condiciones ecológicas específicas en que habita.³ La diferencia más evidente entre los dos ecotipos de *Sotalia*, está en su tamaño, siendo el ecotipo marino más grande que el ecotipo fluvial, puede llegar a tener 1.70 m, mientras que el ecotipo fluvial mide en promedio 1.40 m.^{3,5} Todavía no son totalmente

claros los límites de la distribución geográfica de los dos ecotipos, y hasta donde se solapan los rangos de distribución de las dos poblaciones, ya que los datos disponibles no son claros al respecto del tamaño de los individuos observados.

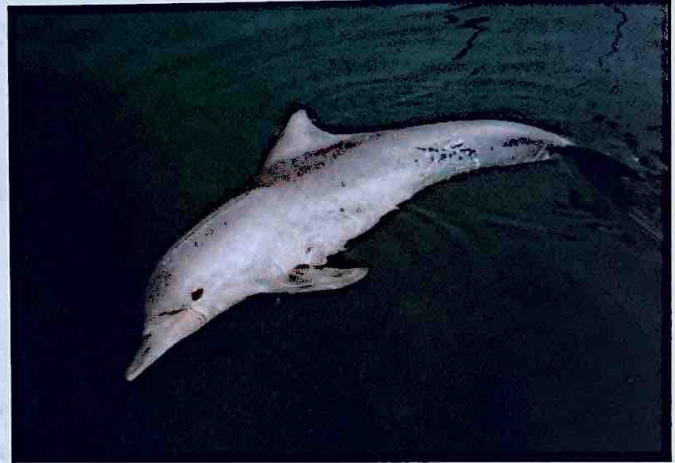


Figura 2. Ecotipo fluvial de *Sotalia fluviatilis*.

La mayor controversia que suscitan estos dos ecotipos ha surgido con respecto al nivel taxonómico al cual pertenecen; algunas investigaciones sugieren basándose en datos de morfometría craneana, que el género *Sotalia* tiene dos subespecies, una que habita en los ríos (*Sotalia fluviatilis fluviatilis*) y la otra que habita en las costas (*Sotalia fluviatilis guianensis*).³

Con el fin de aportar nueva evidencia que ayude a resolver este conflicto, en el Centro de Estudios en Biología Molecular (CEBM) del Gimnasio Campestre de la ciudad de Bogotá, se está realizando una investigación que busca por medio el uso de técnicas moleculares como la “huella genética” (RAPDs) y la aplicación de métodos estadísticos, producir nuevos datos que puedan servir para la resolución del problema de clasificación taxonómica del Tucuxi.

METODOLOGÍA

Material Biológico:

Se obtuvieron 31 muestras de tejido muscular y de piel. Las muestras de músculo fueron obtenidas a partir de disección de individuos muertos y las muestras de epidermis a partir de biopsias realizadas a individuos residentes en el acuario de Santa Marta, Magdalena, Colombia. Se utilizarán como grupos externos comparativos: Ballena Jorobada *Megaptera novaeangliae* y el delfín nariz de Botella *Tursiops truncatus*. El lugar de obtención, el tipo y la cantidad de muestras disponibles se presentan en la Tabla 1.

Localidad	Número Muestras	Tipo Tejido	Observaciones
Lago Maracaibo (Venezuela): Isla Zapara	4	Piel	Isla limítrofe entre el lago y el océano.
Lago Maracaibo (Venezuela): Barraquitas	3	Piel	
Lago Maracaibo (Venezuela)	4	Piel	
Amazonas Colombiano	1	Músculo	
Amazonas Peruano: Lago Caballococha	2	Músculo	
Guyana Francesa	2	Músculo	
Mar Caribe	4	Piel	Extraídas a partir de los especímenes que se encuentran en el acuario de la ciudad de Santa Marta Colombia.
Estuario Amazónico	11	Músculo	
Delfín nariz de Botella (<i>Tursiops truncatus</i>)	3		
Ballena Jorobada (<i>Megaptera novaeangliae</i>)	1		
Total de muestras	31		

Tabla 1. Lugar, número y origen de las muestras del material biológico disponible para la realización del proyecto.

Aislamiento de ADN:

El ADN se obtuvo siguiendo el protocolo descrito previamente (Jackson Laboratory, 1996) ⁸, con algunas modificaciones. Se le adicionó un lavado con fenol-cloroformo-isoamilalcohol (25:24:1), y otro con cloroformo-isoamilalcohol (24:1).

RAPDs

Se utilizaron 18 iniciadores OPA y 6 iniciadores Amersham-Pharmacia para la optimización de la técnica (Tabla 2). La reacción de amplificación incluyó en un volumen final de 25 µl: 2.0 mM de MgCl₂, 1 X PCR buffer, 200 µM de dNTPs, 2,5 U de Taq polimerasa y aproximadamente 20 pM de ADN.

La reacción de PCR se realizó en un termociclador Hybaid Omn-e, UK, con el siguiente programa: un primer ciclo a 96°C durante 5 minutos, 25 ciclos de denaturación de 1 minuto a 96°C, anillaje 1,5 minutos a 37°C y síntesis 2 minutos a 68°C. La tercera fase consistió en un solo ciclo a 68 °C durante 2 minutos. Este programa se repitió dos veces completándose 50 ciclos de reacción. Después de la primera reacción (25 ciclos) se agregaron 2.5 unidades de Taq polimerasa y se sometió a la segunda reacción.

Electroforesis:

Para visualizar los productos amplificados por RAPDs, se realizó una electroforesis en geles de

poliacrilamida. La electroforesis se realizó de acuerdo con lo descrito por la casa comercial fabricante (Electroforesis Mini Protean II BioRad), a 130 V por 3 horas.

OPA	SECUENCIA
1	CAGGCCCTTC
3	AGTCAGCCAC
5	AGGGGTCTTG
6	GGTCCCTGAC
7	GAAACGGGTG
8	GTGACGTAGG
9	GGGTAACGCC
10	GTGATCGCAG
11	CAATCGCCGT
12	TCGGCGATAG
13	CAGCACCCAC
14	TCTGTGCTGG
15	TTCCGAACCC
16	AGCCAGCGAA
17	GACCGCTTGT
18	AGGTGACCGT
19	CAAACGTCGG
20	GTTGCGATCC

Tabla 2. Secuencia de los iniciadores "OPA" utilizados

Revelado:

Los geles revelaron con nitrato de plata. Inicialmente el gel se colocó en solución fijadora (17% de etanol, 1.25% de ácido acético en agua) por 30 minutos con agitación frecuente. Posteriormente el gel se lava dos veces con agua destilada y luego se introduce en solución de nitrato de plata (0.4 g de AgNO_3 , 600 mL de formaldehído en 400 ml de agua destilada y desionizada) durante 20 minutos. Después se remueve la solución de nitrato de plata y se vierte la solución reveladora (1.5 g de NaOH, 150 ml de formaldehído en 50 ml de agua destilada y desionizada) hasta que se observan bandas nítidas (10-15 minutos aproximadamente). Por último, se adiciona solución fijadora durante 10 minutos.

El secado de los geles se realizó cubriéndolo con papel celofán y colocándolo en una plancha a 25°C durante 4 horas aproximadamente.

RESULTADOS PARCIALES

Se evaluaron 18 iniciadores OPA y 6 Amersham-Pharmacia en la reacción RAPDs-PCR de acuerdo con su capacidad para amplificar bandas a partir del genoma completo del Tucuxi. También se tuvo en cuenta que los perfiles electroforéticos producidos por los distintos iniciadores fueran distintos.

De los dieciocho iniciadores OPA evaluados, no se obtuvo amplificación con los OPA 11 y 15. Los 16 oligonucleótidos restantes amplificaron, sin embargo, se detectó una contaminación con ADN foráneo, el cual provocaba que los tubos utilizados como control negativo en las reacciones de PCR (tubos que contienen todos los elementos usados en la reacción excepto ADN), presentaran amplificación. Esto hizo necesario analizar cada iniciador sin incluir ADN en la mezcla de reacción de tal manera que se pudiera detectar los iniciadores contaminados. Este trabajo condujo a la obtención de 13

iniciadores sin contaminación. Con los 6 iniciadores de Amersham-Pharmacia no se tuvo problemas.

Posteriormente, se realizaron reacciones con estos iniciadores con el fin de establecer, cuales amplificaban el ADN del Tucuxi, obteniendo perfiles electroforéticos claros en 8 de los 24 iniciadores analizados. La figura 3 presenta los perfiles electroforéticos obtenidos utilizando el ADN del Tucuxi proveniente del lago Maracaibo, con los iniciadores 1,2,3,4,5 y 6 de Amersham-Pharmacia, OPA 13 y OPA 20 (carriles 1 al 9). Como se observa, el iniciador 2 de Amersham-Pharmacia no produjo ningún producto de amplificación, y el iniciador 3 de la misma referencia apenas produjo una banda que contribuye para el objetivo presente del estudio.

Con estos resultados preliminares esperamos evaluar los 32 individuos de *Sotalia fluviatilis* (Tabla 1), y así obtener resultados concluyentes que nos permitan aportar en la discusión taxonómica de los dos ecotipos de este cetáceo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alcock, J. 1998. *Animal Behavior An Evolutionary Approach, sixth edition*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
2. Borobia, M., Siciliano, S., Lodi, L., Hoel, W. "Distribution of the South American dolphin *Sotalia fluviatilis*". *Canadian Journal of zoology*. 69:1025-1038. 1991.
3. da Silva, V., Best, R.C. 1996 "Sotalia fluviatilis", *Mammalian Species*. 527:1-7.
4. Edwards, H., Schnell, G. 2001. "Body Length, Swimming Speed, Dive Duration, and coloration of the Dolphin *Sotalia fluviatilis* (Tucuxi) in Nicaragua". *Caribbean Journal of Science*. 37:271-272.
5. da Silva, V., Martin, A.R. "The status of the freshwater form of the tucuxi *Sotalia fluviatilis* (Gervais 1853): a review of available information". *International Whaling Commission*, 2000.
6. Futuyma, D. 1998. *Evolutionary Biology, Third Edition*, Sinauer Associates, Sunderland, MA.
7. <http://omacha.org> - http://www.jax.org/resources/documents/imr/protocols/tail_DNA_PCR_Phenol.html