

El objetivo de este trabajo fue evaluar las fluctuaciones en tres estaciones del año (otoño, invierno y primavera) de distintas variables hematológicas: hematocrito, glóbulos blancos, glucosa, estrógeno y progesterona en hembras juveniles de yacaré overo (*Caiman latirostris*) criados en condiciones de cautiverio. Se partió de una población inicial de 16 individuos pertenecientes a 4 nidos diferentes (4 ejemplares por cada nido), cuya longitud mínima fue de 80 cm. Los nidos fueron cosechados en la naturaleza e incubados artificialmente según las técnicas rutinarias del Proyecto yacaré (Larriera, 1993). Las variables morfométricas fueron registradas cada 30 días aproximadamente, al mismo tiempo que se realizaba la extracción de sangre para la realización de los análisis correspondientes a cada uno de los animales; el alimento fue suministrado 6 veces por semana. Los datos fueron analizados estadísticamente con INFostat, mediante ANOVA de medidas repetidas. No hubo diferencias entre los meses en la glucemia y el hematocrito, pero los valores plasmáticos de progesterona y estrógeno, y los glóbulos blancos variaron en el tiempo.

## **TÉCNICAS MOLECULARES PARA DETECTAR VARIABILIDAD APLICADAS A POBLACIONES DE CAIMAN LATIROSTRIS EN SANTA FE, ARGENTINA**

**Amavet, P.<sup>1,2</sup>; Rosso, E.<sup>2</sup>; Piña, C.<sup>1</sup> y Markariani, R.<sup>2</sup>**

**<sup>1</sup>Proyecto Yacaré, Bv. Pellegrini 3100, Santa Fe, Argentina**

**<sup>2</sup>Facultad de Humanidades y Cs., Univ. Nac. del Litoral, Ciudad Universitaria,  
Pje. El Pozo, Santa Fe, Argentina. E-mail: pamavet@arnet.com.ar**

### **INTRODUCCIÓN**

En la caracterización de poblaciones naturales es fundamental el conocimiento y medida de la variabilidad genética existente ya que ésta se relaciona con la dinámica de variables ecológicas y etológicas (Burke, 1991). Los datos de variación genética permiten predecir el comportamiento de las poblaciones locales a través del tiempo, ya que un nivel considerable de variación aumenta la capacidad de la especie para adaptarse a cambios ambientales (Mayr, 1963), y esto es determinante en la aplicación de estrategias de manejo y conservación. Para el análisis de variabilidad se utilizan frecuentemente marcadores bioquímicos o moleculares, entendiéndose como marcador a cualquier característica o rasgo cuantitativo que tenga base genética, y que pueda determinarse inequívocamente en un individuo. Los marcadores moleculares pueden tratarse de genes o segmentos no codificantes de ADN cuya existencia en el individuo de interés se verifica por la presencia de una banda coloreada en un gel.

Las características deseables en un marcador utilizado para detectar variabilidad son:

- Eficacia en la detección de todos los genotipos posibles en la población.
- Distribución frecuente en el genoma de los individuos.

- Alta reproducibilidad.
- Sencillez en su aplicación e interpretación.
- Posibilidad de intercambiar datos obtenidos entre laboratorios.

Actualmente, las poblaciones santafesinas de *Caiman latirostris* son analizadas mediante una técnica denominada RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) que consiste en el análisis de segmentos al azar en el ADN cuya variación permita identificar individuos y/o poblaciones.

### **MATERIALES Y MÉTODOS:**

La técnica utilizada incluye los siguientes pasos:

**Aislamiento de ADN:** Se obtiene a partir de sangre (glóbulos blancos) utilizando un protocolo no convencional a base de CTAB que no involucra el uso de fenol, producto altamente tóxico y cáustico, ni de proteinasa K, de alto costo.

**Amplificación:** Se aumenta la concentración de un segmento de ADN al azar, produciendo muchos ciclos de replicación de ese segmento mediante la denominada *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR).

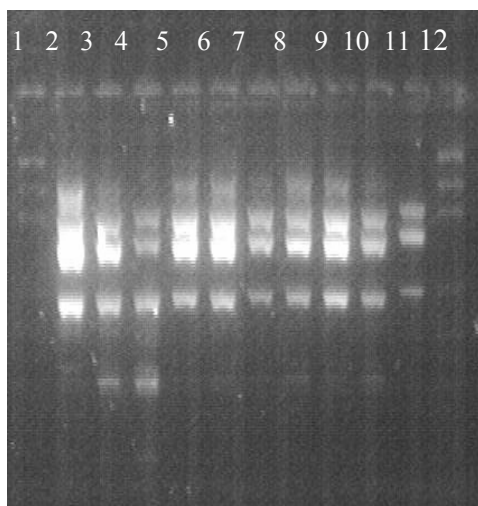
**Corrida en geles:** Las muestras se siembran en geles que son sometidos a electroforesis, por lo cual se produce la separación de los segmentos obtenidos, y mediante procesos de tinción, se observan bandas. En muchas especies los geles confeccionados con agarosa permiten la observación de muchas bandas por individuo y una buena diferenciación intra e interpoblacional. En las poblaciones de *C. latirostris* bajo análisis, este tipo de geles resuelve poca cantidad de bandas, por lo cual se implementó recientemente el uso de geles de poliacrilamida.

**Análisis de datos:** Se analiza la presencia o ausencia de cada banda (que corresponde a un locus génico) en cada individuo dentro de cada población. Luego se hacen comparaciones interpoblacionales mediante programas de análisis específicos para la técnica.

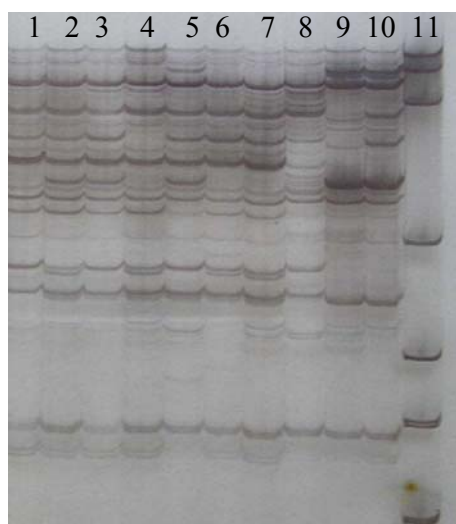
### **RESULTADOS**

Hasta el momento los resultados obtenidos mediante la aplicación de la técnica revelada en geles de poliacrilamida son satisfactorios, ya que éstos permiten aumentar el poder de resolución de bandas y análisis de las mismas. En las figuras 1 y 2 se observan muestras donde fueron amplificados los mismos segmentos, utilizando el mismo primer (B05 de Promega para RAPD). Se visualiza que el número de bandas por individuo hallado con geles de poliacrilamida (Fig. 2) es mucho mayor que el número de bandas resueltas en geles de agarosa. (Fig.1)

Es de destacar también que en la Fig. 2 se identifican claramente patrones de bandas diferentes entre las muestras de *C. latirostris* y *C. yacare*.



**Fig. 1: Gel de agarosa.** Calles 1 y 12: marcador de peso molecular PGem; Calles 2 a 11: muestras de 10 ejemplares de *C. latirostris*



**Fig. 2: Gel de poliacrilamida.** Calles 1 a 8: muestras de 8 ejemplares de *C. latirostris*. Calles 9 y 10: muestras de *C. yacare*; Calle 11: marcador de peso molecular PGem.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONE

La técnica empleada tiene varias ventajas, tales como no requerir información previa del sistema genético porque se utilizan segmentos al azar; revela alto número de bandas, se necesita moderada calidad y cantidad de ADN y permite distinguir especies. (Saiki *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1990). Además es rápida ya que se puede analizar muchos loci por vez, porque cada banda representa un locus; es de fácil implementación, y económica. Todas estas características la convierten una herramienta valiosa para realizar, fundamentalmente, análisis intraespecíficos y poblacionales. Sin embargo, el análisis de RAPD presenta algunas desventajas, tales como no permitir la diferenciación de estados heterocigotas, ya que los individuos diploides, que posean uno o los dos alelos bajo análisis van a producir una banda en el gel; tiene baja reproducibilidad, por lo que se necesita mucha

pericia por parte del operador; y en algunos casos, dos bandas que migran juntas en el gel pueden no tener el mismo alelo de origen (Hillis y Moritz, 1990).

Debido a estas dificultades, sumadas al hecho de que la variabilidad hallada en esta especie por RAPD es de moderada a baja (Amavet *et al.*, 2004), se plantea como paso próximo a seguir, el análisis de loci microsatélites o STR (*Short Tandem Repeat*). Estos consisten en secuencias muy cortas de ADN (de 2 a 4 pb) que se encuentran repetidas y distribuidas al azar por el genoma (Goldstein y Schlötterer, 1999). Es una de las técnicas más utilizada para profundizar análisis genéticos debido a su alto poder en la detección de variabilidad (Davis *et al.*, 2001a; Verdade *et al.*, 2002) dado que permiten diferenciar individuos heterocigotas, e identificar individuos de manera similar a una huella dactilar. Debido a que poseen herencia mendeliana los microsatélites también son aplicados para estudios de paternidad y sistemas de apareamiento (Davis *et al.*, 2001b), que aún no han sido realizados en *C. latirostris*.

En una próxima etapa se aplicará el análisis de microsatélites desarrollados por Zucoloto *et al.* (2002) en esta especie, de los cuales 10 han demostrado ser polimórficos, para profundizar el análisis intra e interpoblacional incluyendo sistemas de apareamiento.

## BIBLIOGRAFÍA

- Amavet P.S., Rosso, E., Markariani, R. y Saidman, B.O. 2004. Caracterización de poblaciones santafesinas de *Caiman latirostris* (Reptilia, Alligatoridae) por la técnica de RAPD. Rev.BAG (Basic and Applied Genetics) -33° Congreso Argentino de Genética. Septiembre, 2004. Malargüe, Mendoza, Argentina. p.137.
- Burke, T., Hanotte, O., Bruford, M.W. y Cairns, E. 1991. Multilocus and single locus minisatellite analysis in population biological studies. En: Burke, T., Dolf, G, Jeffreys, A.J., Wolff, R., editors. DNA fingerprinting: Approaches and applications. Basel, The Netherlands. Birkhauser Verlag: 154-168.
- Davis, L.M., Glenn, T.C., Elsey, R.M., Brisbin, I.L. Jr., Rhodes, W.E., Dessauer, H.C. y Sawyer, R.H. 2001a. Genetic structure of six populations of American alligators: A microsatellite analysis. En: Grigg GC, Seebacher F, Franklin CE, editors. Crocodilian Biology and Evolution. Chipping Norton: Surrey Beatty and Sons. p 38-50.
- Davis, L.M., Glenn, T.C., Elsey, R.M., Dessauer, H.C. y Sawyer, R.H. 2001b. Multiple paternity and mating patterns in the American alligator *Alligator mississippiensis*. Mol Ecol 10:1011-1024.
- Goldstein, D.B. y Schlötterer, C. 1999. Microsatellites. Evolution and Applications. Oxford University Press., Inc., New York
- Hillis, D.M. y Moritz, C. 1990. Molecular Systematics. Sinauer, Sunderland, M.A.
- Mayr, 1963. Animal species and evolution. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A. 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

- Verdade, L.M., Zucoloto, R.B. y Coutinho, L.L. 2002. Microgeographic variation in *Caiman latirostris*. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 294:387–395.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18: 653-6535.
- Zucoloto, R.B., Verdade, L.M. y Coutinho, L.L. 2002. Microsatellite DNA library for *Caiman latirostris*. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 294:346–351.

## **DORSUM OF CAIMAN CROCODILUS NEEDS WORK**

**Franklin D. Ross**

**Department of Vertebrates, Nationaal Natuurhistorisch Museum (Naturalis),  
PO Box 9517, 2300-RA Leiden, the Netherlands**

It is argued that some of the new data in a peer-reviewed journal is wrong. The need for a repeat study is obvious. An example of how Dr. Gregory Mayer and I counted some *Caiman yacare* is given. Parts 1 and 2 cover southern South America without big surprises; but, part 3 raises some serious questions about northern South America and Central American *Caiman*.

### **Part 1: Harvard versus Herpetologica: a minor correction to Ross & Mayer (1983) about neck scales in *Caiman*, and an all-out attack on the dorsal armor data in Busack & Pandya (2001).**

Postulating that the transverse rows of contiguous dorsal armor on the bodies and tails of all crocodylians are related directly to individual bony vertebrae essentially underneath them (Ross & Mayer 1983, utilized x-rays and dissections to prove it, and describe the off-set and one-to-one relation in detail), it becomes possible to divide the continuous series of dorsal rows into two parts. One, a caudal series ("C"); and, two: a pre-caudal ("PC") series. In their paper, Ross & Mayer did that, and then counted anteriorly away from the sacro-caudal juncture and found that the maximum number of contiguous-rows on the long-axis midline, in a continuous and unbroken series towards the head, is to PC-24; and, it occurs (infrequently and often asymmetrically) in the caymans group only.

The most common and normal condition is 23 Pre-Caudal (PC) rows in the caymans and gators and crocodiles including *Osteolaemus* and *Mecistops cataphractus*; but, *Tomistoma schlegelii* can exhibit 23 or 22; and, *Gavialis* has 22 only. This is an over-simplification based on comparisons of many individual and taxonomic variations; and, it includes some assumptions about how many missing scale-rows have to be counted to get to PC-23 in *Crocodylus acutus*, for example.

In all of their sample of *Caiman latirostris*, and also in some *Caiman crocodilus* including *yacare* as a subspecies, the authors Ross & Mayer (1983: table 1, etc.) found rows which had been completely dissolved in the PC-18 (anterior thoracic) to