

UCH-FC  
B. Ambiental  
B 858  
C. 1

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO



**“Estudio de la variabilidad genética de tres genes funcionales en poblaciones del pejerrey chileno *Basilichthys microlepidotus* presentes en zonas contaminadas y no contaminadas de la cuenca del Río Maipo”**

**Matias Briones Osorio**

Director del Seminario de Título: Dr. David Véliz

Co-directora: Dra. Caren Vega-Retter

Mayo 2016

Santiago, Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

**MATIAS FELIPE BRIONES OSORIO**

**“Estudio de la variabilidad genética de tres genes funcionales en poblaciones del pejerrey chileno *Basilichthys microlepidotus* presentes en zonas contaminadas y no contaminadas de la cuenca del Río Maipo”**

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial para optar al título profesional de Bióloga con mención en Medio Ambiente.

Dr. David Veliz Baeza  
**Director Seminario de Título**

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal, con un sello circular de la Facultad de Ciencias y Biblioteca Central de la Universidad de Chile.

Dra. Caren Vega-Retter  
**Co-Directora Seminario de título**

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

**Comisión Revisora y Evaluadora**

Dr. Elie Poulin Charmolue  
**Presidente**

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Dra. Alejandra González Vásquez  
**Evaluador**

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, Julio 2016

## **BIOGRAFIA.**



Matias Felipe Briones Osorio, nació el 26 de abril de 1991 en la ciudad de Santiago de Chile. Cursó la enseñanza básica en el colegio católico Nuestra Señora de Andacollo, luego en el año 2003 ingresó al Instituto Nacional donde curso la enseñanza media completa. Desde joven Matías presentaba un fuerte gusto por las ciencias optando el electivo de biología y química en el Instituto Nacional. Posteriormente, siguiendo su vocacion en el año 2009 ingresó a estudiar la carrera de Ciencias Ambientales con mención en Biología en la Universidad de Chile, obteniendo el grado de licenciado el año 2014, este mismo año Matias ingresó al laborotario de Ecología y Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para realizar su tesis bajo la tutoria del Dr. David Veliz y la Dra. Caren Vega-Retter. En el laboratorio ha podido acercarse al mundo de la ciencia, adquiriendo conocimientos y experiencia. Actualmente Matías se encuentra cursando un magíster en Ciencias Biológicas en la misma casa de estudio y en el mismo laboratorio.

## **DEDICATORIA.**

**Dedicado a mis padres, familia y amigos, y a mi amada Jessa.**

## **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco a mis amigos por su paciencia, por estar ahí a pesar de no vernos en mucho tiempo, gente a la cual considero mis hermanos de vida.

Agradezco a mis tutores Caren y David, por su apoyo incondicional en la realización de esta tesis, por su constancia y paciencia, y por permitirme ingresar al laboratorio donde la gente es realmente muy buena y todos muy competentes en lo que hacen, así que he aprendido mucho.

Agradezco a mi familia primos y tíos, que están expectantes y mandando ánimos para que al fin pueda cumplir mi meta con mi carrera.

Agradezco a mi shirial mega amada quien se ha convertido en un pilar fundamental en mi vida, quien esta presente en todo momento para apoyarme y que está ahí para recordarme lo bella que es la vida.

Finalmente agradezco a mis padres que sin ellos simplemente no habría conseguido nada de lo que soy, por su esfuerzo y por su entrega. Mención especial para la Nicolasa, la mejor mascota que pudo existir.

Los quiero a todos.

## INDICE DE CONTENIDO

INDICE DETABLAS. ....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
ABSTRACT.....	xi
INTRODUCCION. ....	1
HIPOTESIS.....	6
OBJETIVOS. ....	7
Objetivo general. ....	7
Objetivos específicos.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS. ....	7
Número de individuos por población y dilución de las muestras de DNA stock.....	7
Preparación partidores Gen COI, ND5 y ODC. ....	8
PCR de secuenciación y obtención de las secuencias. ....	9
Alineamiento, secuencias consenso y determinación de SNPs.....	9
Análisis de datos genes mitocondriales.....	10
Análisis de datos gen nuclear (ODC). ....	11
RESULTADOS.....	12
Gen Citocromo c oxidasa subunidad I (COI).....	12

Gen Nadh deshidrogenasa subunidad V (ND5) .....	16
Gen Ornitina descarboxilasa (ODC). .....	20
DISCUSION. ....	28
Genes mitocondriales (COI y ND5). ....	28
Ornitina descarboxilasa (ODC). ....	30
CONCLUSION. ....	32
REFERENCIAS. ....	33

## INDICE DETABLAS.

Tabla 1. Número de individuos (n) de <i>B. microlepidotus</i> analizados desde cada sitio de muestreo. Además, se muestra el largo de la secuencia obtenida para cada uno de los genes estudiados.....	12
Tabla 2. Resumen de las características genéticas del gen COI obtenidas por sitio. n: número de muestra; h: número de haplotipos; S: número de sitios polimórficos; Hd: diversidad haplotípica; K: número promedio de diferencias nucleotídicas; Pi: diversidad nucleotídica. ....	13
Tabla 3. Análisis de la Varianza Molecular realizado para el gen COI.....	15
Tabla 4. Valores de $F_{ST}$ pareados (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de P (bajo la diagonal), obtenidos para el gen COI. (* $P < 0,05$ ).....	16
Tabla 5. Resumen de las características genéticas del gen ND5 obtenidas por sitio. n: número de muestras; h: número de haplotipos; S: número de sitios polimórficos; Hd: diversidad haplotípica; K: número promedio de diferencias nucleotídicas; Pi: diversidad nucleotídica. ....	17
Tabla 6. Análisis de la Varianza Molecular para el gen ND5.....	19
Tabla 7. Valores de $F_{ST}$ pareados (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de P (bajo la diagonal), obtenidos para el gen ND5. (* $P < 0,05$ ).....	20
Tabla 8. Resumen de las características genéticas del gen COI obtenidas por sitio. n: número de muestras; h: número de haplotipos; S: número de sitios polimórficos; Hd: diversidad haplotípica (genética); K: número promedio de diferencias nucleotídica; Pi: diversidad nucleotídica.....	21

Tabla 9. Análisis de la Varianza Molecular para el gen ODC. ....	23
Tabla 10. Valores de $F_{ST}$ pareados (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de P (bajo la diagonal), obtenidos para el gen ODC. (* $P < 0,05$ ). ....	24
Tabla 11. Resultados $F_{IS}$ para cada población. Donde, n: número de muestras, NA: número de alelos observados, $H_o$ : frecuencia heterocigotos observada; $H_e$ : frecuencia heterocigotos esperada. ....	25

## INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Red de haplotipos realizada con secuencias del gen COI. Se observan 3 haplotipos (H1, H2 y H3). El haplotipo H1 fue común en los cuatro sitios muestrales. El haplotipo H2 se observó solo en el sitio MEL (contaminado), mientras que el haplotipo H3 estuvo presente en ambos grupos en SFM (no contaminado) y MEL (contaminado). Los números en rojo entre los haplotipos indican la posición de la mutación que diferencia a los haplotipos.....	14
Figura 2. Red de haplotipos para el gen ND5. Se observan 9 haplotipos. Los haplotipos H1, H3 y H4 fueron comunes en los cuatro sitios muestrales. Los haplotipos H6, H7 y H8 fueron únicos para el sitio MEL (contaminado). El haplotipo H5 fue único para el sitio IM (no contaminado). El haplotipo H2 se observa únicamente en IM y SFM (ambos no contaminados), y el haplotipo H9 se observa únicamente en MEL y SFM (contaminado y no contaminando respectivamente).....	18
Figura 3. Red de alelos realizada para el gen ODC.....	22
Figura 4. Gráfica de burbujas de los genotipos heterocigotos del gen ODC para las 4 poblaciones. El tamaño de la burbuja es una ilustración del número de individuos que tiene cada genotipo, por este motivo los genotipos menos frecuentes no se observan en la gráfica ya que las burbujas más grandes se superponen. Las frecuencias de este gráfico se complementan con aquellas de la Figura 5.....	26
Figura 5. Gráfico de burbujas de los genotipos homocigotos del gen ODC para los cuatro sitios estudiados. El tamaño de la burbuja es proporcional al número de individuos por sitio.....	27

## RESUMEN.

El estudio de la variabilidad de genes funcionales es fundamental para entender la interacción de los organismos con su medio ambiente, en este sentido, se ha descrito que poblaciones que habitan ambientes contaminados pueden presentar una sobre expresión de algunos genes. Sin embargo, es escasa la evidencia que relacione la variabilidad de la secuencia de los genes sobre expresados en los diferentes ambientes. Un estudio previo realizado en poblaciones del pejerrey *Basilichthys microlepidotus* dentro de la cuenca del río Maipo, mostró evidencia de “polimorfismos de simple nucleótido” (SNPs) asociado a ambientes contaminados en dos genes mitocondriales (COI y NADH) y 4 genes sobre expresados en dichos ambientes. Uno de estos genes sobre expresados fue Ornitina descarboxilasa (ODC), cuya expresión se asocia con una mayor proliferación celular y también a la progresión del cáncer, considerándose como un “oncogen”. En este contexto, el objetivo de este trabajo es detectar diferencias en la variabilidad genética, en la frecuencia haplotípica (en los genes mitocondriales) y alélica (en el gen nuclear) entre individuos provenientes desde poblaciones que habitan lugares contaminados y no contaminados en la cuenca del río Maipo. Se secuenciaron 21 individuos de SFM, 22 de IM (lugares no contaminados); 22 de MEL y 21 de PEL (lugares contaminados). Los resultados no mostraron diferencias en el número ni en la frecuencia de haplotipos de los genes mitocondriales (COI y NADH). En el caso de ODC, se observó un total de 6 alelos, los cuales mostraron diferencias en sus frecuencias en casi todas las localidades estudiadas. Los cálculos de  $F_{IS}$  mostraron un déficit estadísticamente significativo de heterocigotos en ambos sitios contaminados. Al

analizar los genotipos, se detectó que el homocigoto GTCGC, GTCGC estuvo presente en mayor frecuencia en lugares contaminados (MEL y PEL) a diferencia de los lugares no contaminados (IM y SFM). Como conclusión, este estudio muestra que el gen OCD presenta una selección de genotipos, la cual podría estar asociada con la expresión diferencial detectada previamente. Estudios experimentales futuros podrán indicar si esta es finalmente una relación de causalidad.

#### ABSTRACT.

The study of the variability of functional genes is a central issue in the understanding of the interaction between organisms and environment, in this sense has been described that populations living in contaminated environments could present gene over-expression. However there is little evidence linking sequence variability over-expressed genes in different environments. A previous study performed on populations of the silverside fish *Basilichthys microlepidotus* within the Maipo River basin reached evidence of two single nucleotide polymorphism (SNPs) in two mitochondrial genes (COI and NADH) associated with polluted environments and 4 genes over-expressed in those environments. One of these over-expressed genes was the Ornithine decarboxylase (ODC). The over-expression of this gene has been associated with an increased cell proliferation and also with cancer progression, considered as an "oncogene". In this context, this study aims to detect differences in genetic variability, haplotype frequency (in mitochondrial genes) and alleles (in the nuclear gene) between individuals collected from populations inhabiting contaminated and uncontaminated sites in the Maipo River

basin. 21 individuals from SFM, 22 from IM (both non-contaminated sites), 22 from MEL and 21 from PEL (both contaminated sites) were sequenced. The results showed no difference in the number or frequency of haplotypes of the mitochondrial genes (COI and NADH). On the other hand, a total of 6 alleles were observed in the ODC gene. The paired  $F_{ST}$  showed statistical differences in 5 out of the 6 possible comparisons. The  $F_{IS}$  showed no departures to the Hardy Weinberg expectation for fish collected in the non-polluted areas however significant deficit of heterozygotes were observed in the contaminated sites. When analyzing the genotypes, the homozygote GTCGC, GTCGC was present in most individuals collected in the polluted sites (MEL and PEL) conversely to the low frequency observed in non-polluted sites (IM and SFM). In conclusion, this study shows that the ODC gene present a possible case of genotype selection which could be associated with the differential expression previously detected. Future experimental analysis will be conclusive about this causal relationship.

## INTRODUCCION.

Los ecosistemas naturales están siendo intensamente degradados por la actividad del hombre, siendo algunos de los factores más importantes la incorporación de especies invasoras, la fragmentación y destrucción de hábitats, la caza y pesca desmedida y la incorporación de contaminantes (Lande 1998). Estos estresores afectan la dinámica de crecimiento poblacional, aumentando la tasa de mortalidad y disminuyendo la fertilidad de las especies autóctonas (Fracacio et al. 2003; Pandey et al. 2008). La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) mostró que hasta el 2014 un 1,2% de las especies terrestres y de agua dulce se han extinto, mientras que un 30% fueron amenazadas, y un 6% se considera en peligro crítico de extinción. En el caso de las especies dulceacuícolas, los niveles de amenaza llegan al 23% cuando se consideran solo mamíferos y peces (IUCN 2014; Pimm et al. 2014). Dentro del contexto actual de cambios en las condiciones ambientales y del hábitat, entender como las poblaciones sobreviven y se adaptan es un tema relevante para la biología y la conservación de especies (Dudgeon et al. 2006).

Uno de los procesos fundamentales que permiten entender la supervivencia y adaptación de las poblaciones es la selección natural, la cual, a diferencia de la deriva, es un proceso no aleatorio permitiendo la supervivencia de individuos que posean los caracteres que tengan un mejor fitness en el hábitat en el cual habitan (Kingsolver & Pfenning 2007). En este contexto, se espera que en hábitats altamente contaminados se seleccione alelos que presenten mejor adecuación biológica en esa condición. Uno de los tipos de selección más reconocibles y estudiados es la selección direccional, en el cual rasgos

extremos son aquellos que poseen mayor adecuación biológica (Herron & Freeman 2014).

Si bien el inicio del estudio de la asociación alélica con la selección se realizó con genes conocidos, principalmente dentro de la ruta metabólica, el desarrollo de la secuenciación paralela del ADN ha permitido el estudio del conjunto de genes funcionales en organismos no modelos (Ekblom & Galindo 2011). Una de las formas para estudiar genes funcionales es el estudio de la expresión de la totalidad de los genes, la cual se ha transformado en una aproximación fundamental para entender el efecto del entorno sobre los organismos (Ungerer et al. 2008). La variación en expresión génica es un importante mecanismo evolutivo para la selección natural, estos estudios representan una exitosa forma de determinar genes involucrados en la adaptación (Oleksiak et al. 2002, Fay & Wittkopp 2008).

Considerando que los ecosistemas de agua dulce han sido impactados por las actividades del hombre (Jackson et al. 2001), los organismos que habitan estos sistemas, en particular los peces, se han convertido en modelos de estudio para evaluar la respuesta genética de las poblaciones a la variabilidad ambiental y a la fuerte presión de selección impuesta por el hombre (Powers 1989). En Chile, el Río Maipo es una de las cuencas más contaminadas la cual recibe desechos provenientes de la minería en La Cordillera de los Andes y de las fábricas que rodean la cuenca (Dirección General de Aguas 2004). Además el río Maipo abastece de agua a 6,7 millones de habitantes según el censo más reciente en 2012 (40% de la población de Chile) y también recibe las aguas residuales domiciliarias. Por lo tanto, esta cuenca ha experimentado un deterioro en su calidad del

agua, generado principalmente por la eutrofización por materia orgánica, además de acumulación de metales pesados, desechos domésticos y agrícolas (Pardo et al. 2008). Esta degradación ha tenido un fuerte impacto en la fauna del río Maipo, durante los últimos 30 años se ha demostrado una reducción significativa de la riqueza y abundancia de especies de peces en esta cuenca (Muñoz 2007). Una de las especie que ha mostrado una importante disminución de su abundancia es el pejerrey *Basilichthys microlepidotus* (Jenyns 1841), un aterínido endémico de Chile, que actualmente se considera como especie vulnerable (Ministerio de Medio Ambiente Chile 2016). Esta especie habita en lagos y ríos desde los 28° a los 39°S (Véliz et al 2012.); se alimentan de larvas de insectos, pequeños invertebrados, algas filamentosas y detritus (Duarte et al. 1971; Bahamondes et al. 1987). Vega-Retter et al. (2014) estudiaron 7 sitios que presentaban individuos de *B. microlepidotus*. Una caracterización fisicoquímica mostró que 5 (PU, IM, PN, SFM, MA) de los 7 sitios presentaron características de no contaminados y los otros 2 sitios (MEL, PEL) presentaron características de contaminados. Asociado a esto, un análisis de estructura poblacional realizado con la variabilidad alélica de microsatélites mostró la presencia de 5 posibles poblaciones, 3 habitando zonas no contaminadas (PU, IM-PN, SFM-MA) y dos habitando las zonas contaminadas (MEL, PEL) (Vega-Retter et al. 2014). Vega-Retter et al. (2015) realizó un escaneo genómico utilizando "Amplified Fragment Length Polymorphism" (AFLP), detectando un total de 8 loci (5,37% del total de loci) candidatos de estar bajo selección posiblemente ligado a la contaminación: 6 loci (4,0%) bajo selección direccional y 2 loci (1,34%) bajo selección balanceada. Es importante tener en cuenta que diferentes loci mostraron estar

bajo selección direccional en cada sitio contaminado lo cual puede ser reflejo de las diferencias en el tipo de contaminación presente en cada sitio contaminado.

Posteriormente, utilizando RNA-seq, Vega-Retter (2014) determinó una expresión diferencial en seis genes, cuatro de ellos sobre-expresados y dos sub-expresados en individuos de *B. microlepidotus* habitando los sitios contaminados de la cuenca del río Maipo. Uno de los genes que presentó una alta sobre expresión fue el gen Ornitina descarboxilasa (ODC), en particular en el sitio contaminado MEL. La enzima ODC es la llave enzimática en la síntesis de poliaminas, catalizando la descarboxilación de la L-ornitina a putrescina, precursor inmediato para la formación de las poliaminas espermidina y espermina (Manen et al 1976). Las poliaminas son una familia de aminas alifáticas que están presentes naturalmente en la mayoría de los organismos. En las células normales, las poliaminas son esenciales para el mantenimiento, proliferación y diferenciación celular y en la apoptosis, también se caracterizan por su papel en la síntesis y estabilización de ADN, ARN y proteínas (Herrera et al. 2014). Sin embargo, se han encontrado elevadas concentraciones de poliaminas en muchos tipos de células cancerosas, y se ha demostrado que son necesarias para la transformación neoplásica y también la angiogénesis, por lo tanto, elevadas concentraciones de poliaminas promueven el crecimiento tumoral y la metástasis (Brown et al. 2009; Zell et al. 2009). Estudios en ratones, han demostrado que la sobre expresión del gen ODC es suficiente para la promoción de tumores y el desarrollo de cáncer en diversos tejidos (Auvinen et al. 1992, O'Brien et al. 1997). Estudios en humanos, han documentado que la sustitución de un solo nucleótido en la base 316 (de guanina a adenina) del gen ODC podría estar

asociada con una mayor expresión y por lo tanto con un importante aumento en el riesgo de cáncer. La variación se ubica en el intrón proximal 1, se encuentra en una región del gen responsable de la activación transcripcional por el producto proto oncogén c-myc (Bello-Fernandez et al. 1993). Estudios funcionales indican que el alelo definido por A es más activo en ensayos de transfección que el alelo que contiene G en esta posición (O'Brian et al. 2004). Visvanathan et al. (2004) indicaron que existe una asociación significativa de los genotipos que poseen el alelo A (AA o AG) de la ODC, con un aumento de riesgo de cáncer de próstata en los hombres que eran fumadores, lo que indica una interacción gen ambiente. Este antecedente es posiblemente el único publicado que relaciona un alelo en particular del gen ODC con una mayor predisposición al cáncer.

El análisis RNA-seq de Vega-Retter (2014) detectó además dos posibles SNPs entre individuos habitando zonas contaminadas y no contaminadas de la cuenca. Uno de los SNPs está ubicado en el gen Citocromo c oxidasa subunidad I (COI), observándose que los individuos habitando zonas no contaminadas poseen una Adenina, mientras que los individuos de los sitios contaminados poseen una Guanina. El otro SNPs se encuentra ubicado en el gen Nadh deshidrogenasa subunidad V (ND5) y presenta una Guanina en los individuos de áreas contaminadas, mientras que los peces de las zonas no contaminadas presentan todos los nucleótidos. COI y ND5 son genes mitocondriales y forman parte de las enzimas de la cadena transportadora de electrones (Bremer et al. 2014). Se ha descrito selección de SNPs en el gen nuclear Ciclina G1 y en el gen mitocondrial Nadh deshidrogenasa subunidad II en la perca amarilla silvestre *Perca*

*flavescens* producto de la contaminación con altas concentraciones de cadmio (Cd) (Bélanger-Deschênes et al. 2013), y en *Fundulus heteroclitus* se observó la selección de un SNP del gen nuclear Receptor de aril hidrocarburos 2 (AHR2) en individuos provenientes de sitios altamente contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) (Rietzel et. al 2014).

Considerando todos los antecedentes expuestos, y dadas las importantes consecuencias biológicas tanto de una sobre-expresión del gen ODC como de la presencia de SNPs en los genes mitocondriales COI y ND5, en este estudio se analiza la variabilidad genética tanto de los genes mitocondriales COI y ND5, como del gen nuclear ODC utilizando un mayor tamaño muestral, con el propósito de validar los SNPs encontrados en el estudio previo en los genes mitocondriales y además observar posibles cambios en la frecuencia de alelos y genotipos en el gen nuclear asociados a la contaminación de la cuenca.

### **HIPOTESIS.**

La contaminación de la cuenca del río Maipo tiene un efecto selectivo sobre la variabilidad de las secuencias de los genes mitocondriales COI y ND5 y el gen nuclear ODC al comparar individuos de *B. microlepidotus* provenientes de sitios contaminados y no contaminados de la cuenca del río. Se espera por lo tanto que los genes mencionados estén involucrados en generar una respuesta adaptativa de *B. microlepidotus* a la contaminación.

## **OBJETIVOS.**

### *Objetivo general.*

Determinar el efecto selectivo de la contaminación sobre los genes mitocondriales COI y ND5 y el gen nuclear ODC en individuos de *B. microlepidotus* que habitan zonas contaminadas de la cuenca del río Maipo.

### *Objetivos específicos.*

- Determinar la variabilidad de los genes COI, ND5 y ODC en individuos de *B. microlepidotus* provenientes de los sitios contaminados y no contaminados del río Maipo.
- Evaluar si existe diferenciación genética entre los grupos contaminados y no contaminados del río Maipo.
- Evaluar si existen haplotipos bajo selección por efecto de la contaminación en los genes mitocondriales COI y ND5
- Identificar alelos bajo selección por efecto de la contaminación en el gen nuclear ODC

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### *Número de individuos por población y dilución de las muestras de DNA stock.*

Se obtuvo DNA de individuos del pejerrey *Basilichthys microlepidotus* provenientes desde cuatro poblaciones habitando la cuenca del río Maipo, dos poblaciones habitando sitios contaminados: Melipilla (MEL) - Puente Pelvin (PEL) y dos poblaciones

habitando sitios no contaminados: Isla de Maipo (IM) - San Francisco de Mostazal (SFM). Mayor información con respecto a la obtención del DNA y de los lugares de muestreo se describe en Vega-Retter et al. (2014). En total se obtuvieron 86 individuos: 22 de MEL, 21 de PEL, 22 de IM y 21 de SFM. Previo a la reacción PCR, el ADN se diluyó a una concentración final aprox. de 65 ng/ $\mu$ L.

*Preparación partidores Gen COI, ND5 y ODC.*

Con el fin de determinar diferencias en las frecuencias de haplotipos y alelos entre las poblaciones del pejerrey, se analizaron dos genes mitocondriales: Citocromo c oxidasa subunidad I (COI) y Nadh deshidrogenasa subunidad V (NADH), los cuales mostraron evidencias de presentar selección de haplotipos en peces colectados en zonas contaminadas, en relación a los peces que habitan zonas no contaminados (ver Vega-Retter 2014). Además se analizó el gen nuclear Ornitina descarboxilasa (ODC), el cual presentó una considerable sobre expresión en peces colectados en zonas contaminadas (ver Vega-Retter 2014).

Los partidores para los tres genes fueron generados a partir de las secuencias de mRNA obtenidos del análisis de RNA-seq (Vega-Retter&Véliz 2014). Se utilizó la herramienta "primer-BLAST" de Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para ubicar dentro de estas secuencias partidores que tuvieran una temperatura de alineamiento de 60°C. Para el gen COI los partidores fueron: Forward: COIF-6523: TCC TAT TTA CAG TGG GCG GC, Reverse: COIR-7168: CCA CAA CTC TGC CTC GAC AA. Para el gen NADH los partidores fueron: Forward: ND5F-12321: ACG CCG ATC CCT TTA TGA ACC, Reverse: ND5R-13070: TGC GGA TAT CTT GCT CGT CA. Ambos genes

mitocondriales fueron secuenciados en una única dirección, forward. Para el gen ODC Las secuencias de los partidores fueron: Forward: Ornithine-3F: CTT TGG CAT CCC TGG GAA CT, Reverse: Ornithine-3R: GAG GGC TGG GTT GAT TAC TG. Por tratarse de un gen nuclear, ODC se secuenció en ambos sentidos como método para corroborar la veracidad de las posibles mutaciones.

*PCR de secuenciación y obtención de las secuencias.*

Se realizaron las PCRs siguiendo el protocolo estándar: Buffer 1x (Invitrogen), 3,2 nM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 U/μL de dNTP, 5 pmol de primers directo e inverso, y 0,1 U/μL de Taq ADN polimerasa (Invitrogen). La reacción de PCR (en 25 μL de volumen final) implicó un paso de desnaturalización de 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30s, 60°C durante 90s y 72°C por 90s, con un paso de elongación final a 72°C durante 10 min. Se comprobó los productos de las PCRs de secuenciación en geles de agarosa. Luego los productos de PCR fueron enviados a Macrogen Inc ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) para la secuenciación.

*Alineamiento, secuencias consenso y determinación de SNPs.*

Se alineó las secuencias de los 3 genes utilizando el software Proseg v. 2.91 (Filatov 2002). En el caso del gen ODC, se construyó las secuencias consenso, a partir de las secuencia reverse y forward, como método para corroborar la veracidad de los SNPs encontrados. En los genes mitocondriales las mutaciones se verificaron manualmente y solo fueron aceptadas en los lugares donde las secuencias no tuvieron ambigüedad de los peaks.

Por tratarse de un gen nuclear, los peaks superpuestos del gen OCD correspondieron a individuos heterocigotos para una determinada posición. Además, se corroboró la existencia de inserciones y deleciones (indel). Se utilizó la nomenclatura IUPAC para denominar las mutaciones en que dos o más bases son posibles para una misma posición. Finalmente la determinación de cada alelo se realizó utilizando el procedimiento Phase implementado en el software DnaSP V.4.9 (Rozas 1999). Para simpleza de la entrega de la información, cada alelo observado se nombró con 5 caracteres representando cada diferencia observada entre alelos. Por ejemplo el alelo G—GT, muestra las mutaciones G, G y T ubicadas dentro de la secuencia del gen OCD y los “—” representan la presencia del indel en este alelo.

#### *Análisis de datos genes mitocondriales.*

A partir de las secuencias alineadas, se identificó y corroboró la veracidad de las mutaciones. Se calculó la diversidad genética, número de mutaciones y número de haplotipos para cada población con el software DnaSP v.4.9. Luego se construyó una red de haplotipos con el software Network v.4.2 (Forster et al. 2007). Para determinar diferencias en las frecuencias haplotípicas entre individuos colectados desde los sitios contaminados y no contaminados, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el software Arlequin v.3.5 (Schneider et al. 2000). Para este análisis, cada sitio estuvo anidado en la condición contaminado vs no contaminado. Luego, se realizó un análisis por pares, para el cual se estimó el índice  $F_{ST}$  y la significancia estadística con 5000 permutaciones. Finalmente se calcularon los test de Tajima

(Tajima1989) y de Fu and Li (Fu & Li 1993) con el software DnaSP v 4.9, para determinar si las mutaciones están bajo neutralidad.

*Análisis de datos gen nuclear (ODC).*

A partir de las secuencias se construyeron los genotipos de cada uno de los individuos. Se estimó el número de alelos observados, los heterocigotos observados y esperados para cada uno de los sitios. Finalmente, se comparó las frecuencias de heterocigotos observados y esperados encada uno de los sitios analizados, esto utilizando el índice  $F_{IS}$ , el cual nos entrega una idea acerca de posibles desviaciones al equilibrio Hardy-Weinberg. Este cálculo se realizó con el programa Arlequin v. 3.5 y su significancia se estimó utilizando 5000 permutaciones. Como método de verificación, se comparó los valores de  $F_{IS}$  observados para OCD con aquellos publicados por Vega-Retter et al. (2014) en las mismas poblaciones pero utilizando microsatelites. Con esta información se construyó además una red de alelos utilizando el software Network v. 4.2. Para determinar diferencias en las frecuencias haplotípicas entre individuos colectados desde los sitios contaminados y no contaminados, se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA) con el software Arlequin v.3.5 (Schneider et al. 2000). Para este análisis, cada sitio estuvo anidado en la condición contaminado vs no contaminado. Luego, se realizó un análisis por pares, para el cual se estimó el índice  $F_{ST}$  y la significancia estadística con 5000 permutaciones.

## RESULTADOS.

### *Gen Citocromo c oxidasa subunidad I (COI).*

Se obtuvo una secuencia de 579 pares de bases sin ambigüedades ni indels, el número de individuos secuenciados con éxito se muestra en la Tabla 1. Para este gen se detectaron tres sitios mutacionales: i) 108, ii) 174 y iii) 432. La mutación 108 (G por A) se observó únicamente en la población de MEL, mientras que las mutaciones 174 (C por T) y 432 (G por A) se observaron en las poblaciones MEL y SFM. En los sitios IM y PEL los individuos no presentaron mutaciones para este gen. Cabe destacar que el sitio MEL presentó las tres mutaciones encontradas para el gen COI.

Tabla 1. Número de individuos (n) de *B. microlepidotus* analizados desde cada sitio de muestreo. Además, se muestra el largo de la secuencia obtenida para cada uno de los genes estudiados.

Condición	Cuenca	COI	ND5	ODC
		(579 pb) n	(655 pb) n	(839 pb) n
No Contaminado	IM	21	21	19
	SFM	20	20	19
Contaminado	MEL	18	21	17
	PEL	21	21	21
TOTAL		80	83	76

Para todos los sitios, se observó un bajo número de haplotipos y sitios polimórficos, siendo MEL el sitio que presentó el mayor número de haplotipos ( $h=3$ ) (Tabla 2). La diversidad haplotípica calculada fue cero en los sitios IM y PEL, debido a la existencia de un único haplotipo en estas poblaciones. Los resultados de los análisis de neutralidad (Tajima y Fu's) no mostraron evidencias estadísticas que permitan rechazar la neutralidad (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de las características genéticas del gen COI obtenidas por sitio. n: número de muestra; h: número de haplotipos; S: número de sitios polimórficos; Hd: diversidad haplotípica; K: número promedio de diferencias nucleotídicas; Pi: diversidad nucleotídica.

	Cuenca	n	h	S	Hd	K	Pi	Tajima	Fu and Li
Contaminados	MEL	18	3	3	0,375	0,502	0,00087	-0,68677	0,92775
	PEL	21	1	0	0,00	0,000	0,0000	0,00000	0,00000
No contaminados	IM	21	1	0	0,00	0,000	0,0000	0,00000	0,00000
	SFM	20	2	2	0,262	0,523	0,00090	0,21236	0,70567



La red de haplotipos (Figura 1) muestra que el haplotipo más frecuente (H1) está presente en todas las poblaciones, además no existe un haplotipo de alta frecuencia asociado a una única población o bien asociado a la condición de contaminado o no contaminado

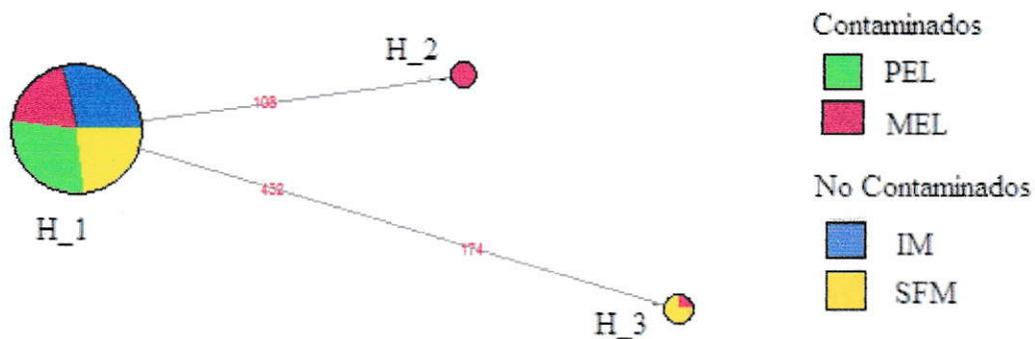


Figura 1. Red de haplotipos realizada con secuencias del gen COI. Se observan 3 haplotipos (H1, H2 y H3). El haplotipo H1 fue común en los cuatro sitios muestrales. El haplotipo H2 se observó solo en el sitio MEL (contaminado), mientras que el haplotipo H3 estuvo presente en ambos grupos en SFM (no contaminado) y MEL (contaminado). Los números en rojo entre los haplotipos indican la posición de la mutación que diferencia a los haplotipos.

El AMOVA nos permitió determinar a qué nivel se particiona de forma significativa la varianza. Este análisis mostró un valor negativo, el cual puede ser considerado como valor cero, entre la condición contaminada y no contaminada. Por otro lado indica que existe un 6.62% de la varianza explicada por las diferencias entre sitios dentro de cada condición. Los índices F mostraron esta diferencia:  $F_{CT} = -0,04016$ ,  $P = 1.00$ ;  $F_{SC} = 0.06364$ ,  $P = 0.03128$  (Tabla 3).

**Tabla 3.** Análisis de la Varianza Molecular realizado para el gen COI.

	Df	% de variación
Entre los grupos	1	-4,02
Entre las poblaciones dentro de los grupos	2	6,62
Dentro de las poblaciones	76	97,40
<b>TOTAL</b>	<b>79</b>	<b>100</b>

El análisis de  $F_{ST}$  por pares (Tabla 4) mostró diferencias estadísticas significativas en la frecuencia de los haplotipos entre IM (sitio no contaminado) y los sitios SFM y MEL (sitio no contaminado y contaminado respectivamente). Este patrón no muestra una clara diferenciación asociada a la condición de contaminación para este gen.

Tabla 4 Valores de  $F_{ST}$  pareados (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de P (bajo la diagonal), obtenidos para el gen COI. (\* $P < 0,05$ )

		Contaminados		No contaminados	
	Sitios	MEL	PEL	IM	SFM
Contaminados	MEL		0,05733	0,10327	-0,00949
	PEL	0,10316		-0,01557	0,01815
No contaminados	IM	0,03356*	0,99990		0,07131
	SFM	0,48847	0,21879	0,04604*	

*Gen Nadh deshidrogenasa subunidad V (ND5)*

Se obtuvo una secuencia de 655 pares de bases sin ambigüedades ni indels, el número de individuos secuenciados con éxito se muestra en la Tabla 1. Para este gen se encontraron nueve sitios mutacionales, de los cuales 3 fueron únicos para los sitios contaminados, en las posiciones: i) 241 la cual ocurre sólo en MEL (C por T); ii) 524 ocurre sólo en MEL (C por T); iii) 538 ocurre sólo en MEL (C por T). En los sitios no contaminados 2 mutaciones fueron únicas, en las posiciones: i) 493 ocurre en IM y SFM (T por C); ii) 583 ocurre en IM y SFM (C por T). Mientras que 4 mutaciones fueron compartidas por ambos grupos: i) 268 ocurre en todas las poblaciones (C por T); ii) 355 ocurre en MEL y SFM (T por C); iii) 532 ocurre en todas las poblaciones (G por T); iv) 571 ocurre en IM y MEL (T por G). En general todas las mutaciones se encontraron en baja frecuencia. El sitio MEL presenta la mayoría de las mutaciones al igual que lo observado para el gen COI.

Un resumen de las características genéticas obtenidas por sitio se muestra en la Tabla 5. El sitio MEL presentó el mayor número de haplotipos ( $h=7$ ) y PEL el menor número ( $h=2$ ) ambos sitios ubicados en la zona contaminada, mientras que ambos sitios contaminados (IM y SFM) presentaron el mismo número de haplotipos ( $h=5$ ). Los test de neutralidad no fueron significativos por lo que no se puede descartar la neutralidad de las mutaciones en todos los sitios (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de las características genéticas del gen ND5 obtenidas por sitio. n: número de muestras; h: número de haplotipos; S: número de sitios polimórficos; Hd: diversidad haplotípica; K: número promedio de diferencias nucleotídicas; Pi: diversidad nucleotídica.

		n	h	S	Hd	K	Pi	Tajima	Fu and Li
Contaminados	MEL	21	7	7	0,827	1,993	0,00306	0,20327	1,30884
	PEL	21	3	2	0,330	0,567	0,00086	0,40901	0,76579
No contaminados	IM	21	5	5	0,534	1,422	0,00217	0,56226	1,11246
	SFM	20	5	5	0,738	1,185	0,00181	0,01975	1,11690

La red de haplotipos (Fig. 2) muestra los 9 haplotipos observados para este gen, tres de estos fueron únicos para MEL (H\_6, H\_7 y H\_8). Sin embargo, los haplotipos de mayor frecuencia (H\_1, H\_3 y H\_4) fueron compartidos por todos los sitios. Esta evidencia muestra que no hay un haplotipo del gen ND5 asociado a la condición de contaminado o no contaminado.

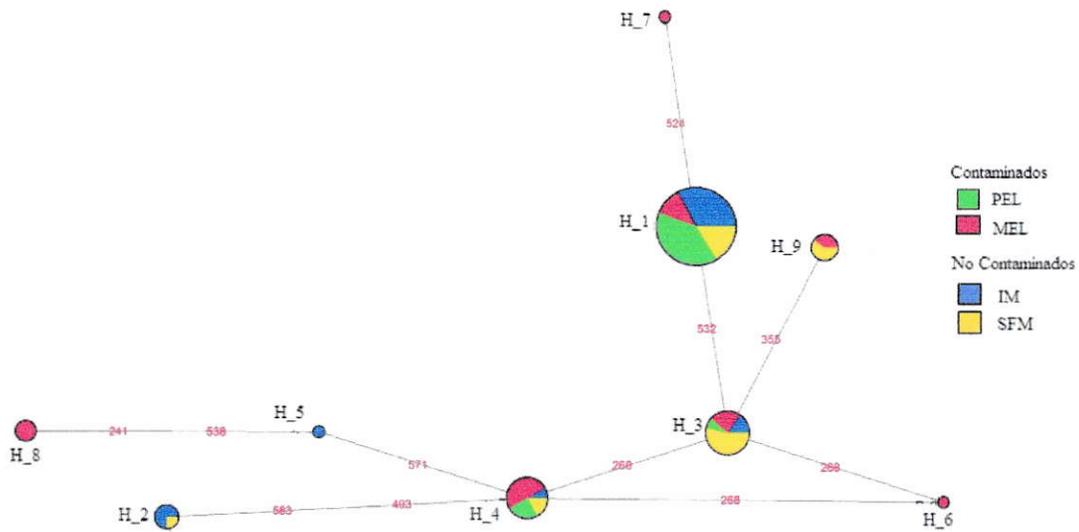


Figura 2. Red de haplotipos para el gen ND5. Se observan 9 haplotipos. Los haplotipos H1, H3 y H4 fueron comunes en los cuatro sitios muestrales. Los haplotipos H6, H7 y H8 fueron únicos para el sitio MEL (contaminado). El haplotipo H5 fue único para el sitio IM (no contaminado). El haplotipo H2 se observa únicamente en IM y SFM (ambos no contaminados), y el haplotipo H9 se observa únicamente en MEL y SFM (contaminado y no contaminando respectivamente).

El AMOVA (Tabla 6) mostró un valor negativo para la varianza explicada por la condición contaminado vs no contaminado. Además mostró que un 17.13% de la varianza era explicada por las diferencias entre sitios dentro de cada condición, los índices F muestran esta diferencia:  $F_{CT} = -0,06937$ ,  $P = 0,70186$ ;  $F_{SC} = 0,16019$ ,  $P < 0,001$ .

Tabla 6. Análisis de la Varianza Molecular para el gen ND5.

	Df	% de variación
Entre los grupos	1	-6,94
Entre las poblaciones dentro de los grupos	2	17.13
Dentro de las poblaciones	79	89.81
TOTAL	82	100

El resultado del análisis de  $F_{ST}$  pareado (Tabla 7) no mostró una diferenciación entre los sitios contaminados y no contaminados. Esta evidencia es clara al no detectarse diferencias significativas entre el sitio MEL (contaminado) y SFM (no contaminado) siendo su valor de  $F_{ST} = 0.0254$  y el valor de  $p = 0.18077$ . Este patrón fue similar a lo encontrado para el gen COI, por lo que, la condición de contaminado de los sitios (PEL y MEL) no estaría afectando la frecuencia haplotípica en ambos genes mitocondriales.

Tabla 7. Valores de  $F_{ST}$  pareados (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de P (bajo la diagonal), obtenidos para el gen ND5. (\* $P < 0,05$ ).

		Contaminados		No contaminados	
	Sitios	MEL	PEL	IM	SFM
Contaminados	MEL		0,21955	0,14304	0,02539
	PEL	0,00069*		0,01364	0,20303
No contaminados	IM	0,00208*	0,28225		0,09587
	SFM	0,18077	0,00218*	0,02534*	

*Gen Ornitina descarboxilasa (ODC).*

Se obtuvo una secuencia de 839 pares de bases sin ambigüedades en los 76 individuos analizados (Tabla 1). En algunos alelos se observó un evento de inserción-delección (Indel) en la posición 360 (Timina) y 361 (Citocina). Por tratarse de un gen nuclear, al analizar las secuencias (en formato Proseq), los peak superpuestos encontrados en el histograma, corresponden a los alelos para ese locus y por lo tanto, corresponden a individuos heterocigotos. Para este gen se encontró cinco sitios mutacionales, dos de ellos correspondientes al Indel y tres sitios que presentaron superposición de bases en el histograma: i) 106 (bases A y G), ii) 374 (bases G y C) y, iii) 585 (bases T y C). Los cinco sitios mutacionales dieron origen a 6 alelos (GTCGC; GTCGT; ATCGC; G—GT; G—GC y GTCCT) y a partir de ellos se encontraron 11 genotipos, 3 homocigotos (GTCGC,GTCG; ATCGC,ATCGC; G—GT,G—GT) y 9 heterocigotos

(GTCGC,GTCGT; GTCGC,ATCGC;G—GT,G—GC;GTCGC,GTCCT; GTCGC,G—GC; GTCGC,G—GT; ATCGC,G—GT; GTCCT,G—GT).

En la Tabla 8 se muestra un resumen de las características alélicas del gen ODC. En general, se observa que los sitios contaminados tienen menor diversidad haplotípica (Hd) y número promedio de diferencias nucleotídicas (K) que los sitios no contaminados. Los test de Tajima y Fu's no mostraron evidencias estadísticas que rechacen la neutralidad (Tabla 8).

Tabla 8. Resumen de las características genéticas del gen COI obtenidas por sitio. n: número de muestras; h: número de haplotipos; S: número de sitios polimórficos; Hd: diversidad haplotípica (genética); K: número promedio de diferencias nucleotídicas; Pi: diversidad nucleotídica.

		n	H	S	Hd	K	Pi	Tajima	Fu and Li
Contaminados	MEL	17	4	3	0,487	0,599	0,00072	-0,41765	0,93449
	PEL	21	3	2	0,222	0,229	0,00027	-0,9647	0,76579
No contaminados	IM	19	3	2	0,586	0,671	0,00080	0,78584	0,77710
	SFM	19	4	3	0,647	0,912	0,00109	0,61172	0,92151

La red de alelos realizada para el gen ODC (Fig. 3) mostró dos alelos únicos para la población PEL (H6 y H7) pero de baja frecuencia, observados en sólo un individuo cada alelo. Se observó además un alelo único en los sitios no contaminados (H5), pero

también de muy baja frecuencia (2 individuos de IM y 7 de SFM). Los alelos más comunes estuvieron presentes en todos los sitios.

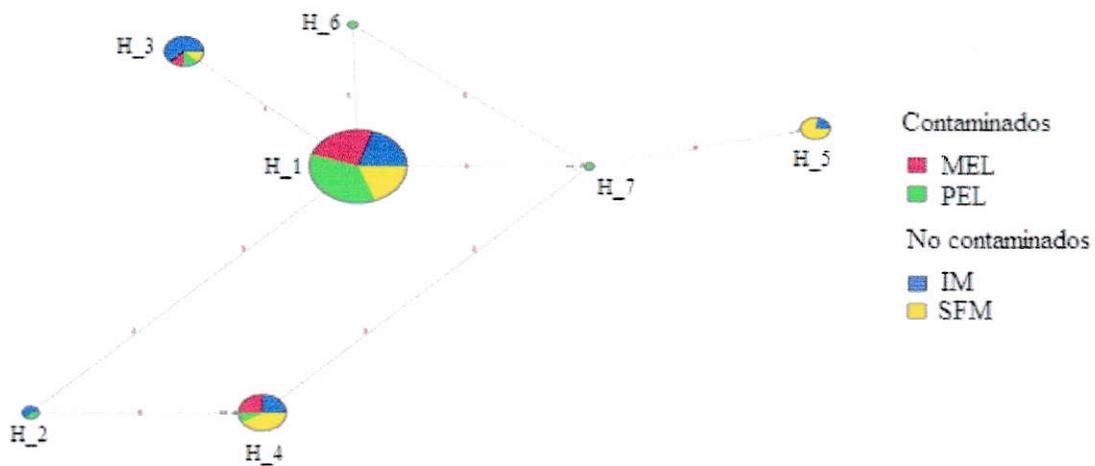


Figura 3. Red de alelos realizada para el gen ODC.

El análisis de AMOVA (Tabla 9) mostró que un 5.71% de la varianza fue explicada por la diferencia entre grupos (contaminado vs no contaminado) y 4.14 % de la varianza fue explicada entre sitios dentro de los grupos. Los valores de F evidencian que no existe una diferencia significativa entre los grupos ni entre los sitios:  $F_{CT}=0.05712$ ,  $p=0.33724$ ;  $F_{SC}=0.04396$ ,  $p=0.0581$ .

Tabla 9. Análisis de la Varianza Molecular para el gen ODC.

	Df	% de variación
Entre los grupos	1	5,71
Entre las poblaciones dentro de los grupos	2	4,14
Dentro de las poblaciones	148	90,14
TOTAL	151	100

En la Tabla 10 se muestra el resultado del análisis de  $F_{ST}$  por pares. Se observa que el sitio contaminado PEL tiene una diferencia significativa en la frecuencia de alelos con respecto a los sitios no contaminados IM y SFM. Además los sitios no contaminados IM y SFM son significativamente distintos entre sí. Estos resultados indican que las diferencias en las frecuencias alélicas no se asocian con la condición del ambiente. En los tres genes analizados, se observa que no hay una diferenciación genética clara (en cuanto a la diversidad de haplotipos y alelos) entre el grupo de sitios catalogado como contaminados y el grupo de sitios no contaminados.

Tabla 10. Valores de  $F_{ST}$  pareados (sobre la diagonal) y sus respectivos valores de P (bajo la diagonal), obtenidos para el gen ODC. (\* $P < 0,05$ ).

		Contaminados		No contaminados	
	Sitios	MEL	PEL	IM	SFM
Contaminados	MEL		0,03355	0,04550	0,02842
	PEL	0,17676		0,13891	0,17043
No contaminados	IM	0,11328	0,00195*		0,04943
	SFM	0,16992	0,00195*	0,03223*	

La tabla 11 muestra el resultado del análisis de  $F_{IS}$ . Si bien se observa un número similar de alelos en todos los sitios, resaltan los valores de heterocigosidad y  $F_{IS}$  observados para cada población. Estos datos muestran que los sitios no contaminados no presentan desviación significativa de lo esperado en equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, los dos sitios contaminados mostraron fuertes déficits de heterocigotos, lo cual sugiere un evento de selección positiva a algún homocigoto o selección en contra de los heterocigotos.



Tabla 11. Resultados  $F_{IS}$  para cada población. Donde, n: número de muestras, NA: número de alelos observados, Ho: frecuencia heterocigotos observada; He: frecuencia heterocigotos esperada.

Condición		n	NA	Ho	He	$F_{IS}$	P
No Contaminado	IM	19	4	0.5789	0.6302	0.10811	0.297
	SFM	19	4	0.6842	0.6440	-0.03540	0.551
Contaminado	MEL	17	4	0.2353	0.4637	0.51515	<0.001
	PEL	21	5	0.1905	0.2596	0.28889	<0.001

Para obtener una mejor descripción de la diferencia observada en el test de  $F_{IS}$ , se realizó un análisis cualitativo de los genotipos. Se detectó la presencia de 11 genotipos de los cuales 9 fueron heterocigotos y 3 homocigotos. En la Fig. 4 se muestra la frecuencia de los genotipos heterocigotos observados en cada una de los cuatro sitios. Se observa que los sitios no contaminados (IM y SFM) presentaron más diversidad y frecuencia de genotipos heterocigotos que los sitios contaminados (MEL y PEL). El sitio IM presentó 5 genotipos heterocigotos de un total de 8 genotipos posibles, el genotipo GTCGC, ATCGC es el más representativo de la población con una frecuencia de 37 %. El sitio SFM presentó 5 genotipos heterocigotos siendo el genotipo GTCGC, GTCCT el más representativo de la población con una frecuencia de 26 %, es importante notar que en

los sitios contaminados no se observó presencia de heterocigotos carentes del alelo GTCGC.

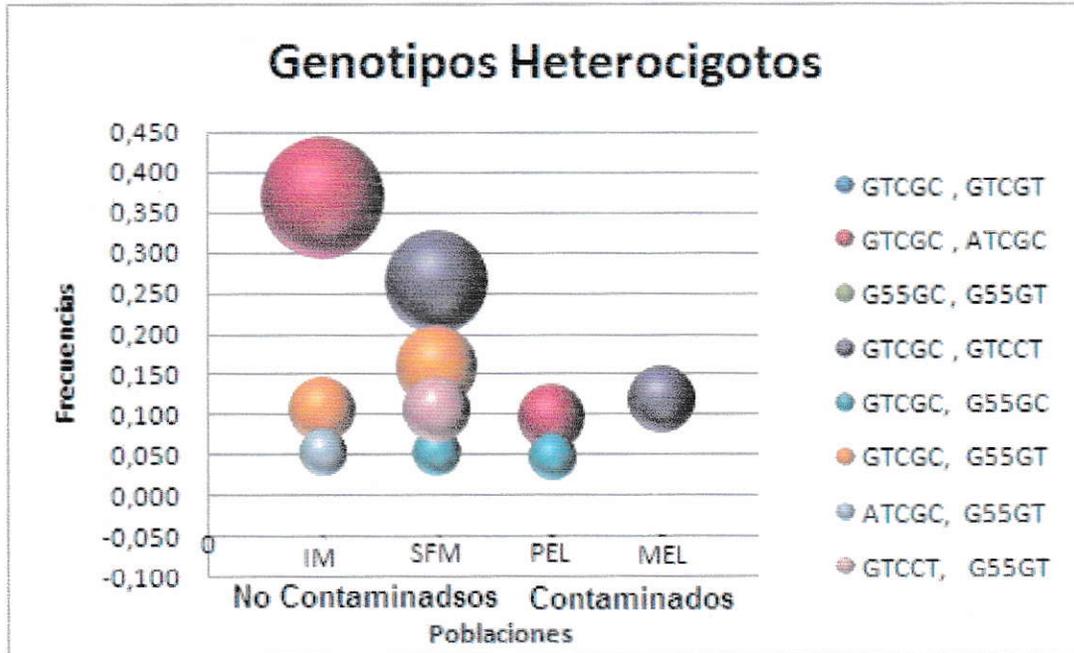


Figura 4. Gráfica de burbujas de los genotipos heterocigotos del gen ODC para las 4 poblaciones. El tamaño de la burbuja es una ilustración del número de individuos que tiene cada genotipo, por este motivo los genotipos menos frecuentes no se observan en la gráfica ya que las burbujas más grandes se superponen. Las frecuencias de este gráfico se complementan con aquellas de la Figura 5.

En la Fig. 5 se muestra un gráfico de burbujas para los genotipos homocigotos presentes en cada una de las poblaciones. Los cuatro sitios muestrales presentaron la misma diversidad de genotipos homocigotos, sin embargo, ambas poblaciones contaminadas

tienen mayor frecuencia de individuos homocigotos que las poblaciones no contaminadas. El genotipo GTCGC,GTCGC es el más frecuente en ambas poblaciones contaminadas, con un 59% y 76% de los individuos de MEL y PEL presentando este genotipo, respectivamente. El genotipo con el Indel (G—GT,G—GT) no mostró variaciones importantes en su frecuencia entre sitios contaminados y no contaminados, variando entre 8 y 20%. EL genotipo ATCGC,ATCGC estuvo presente solo en 1 individuo del sitio IM.

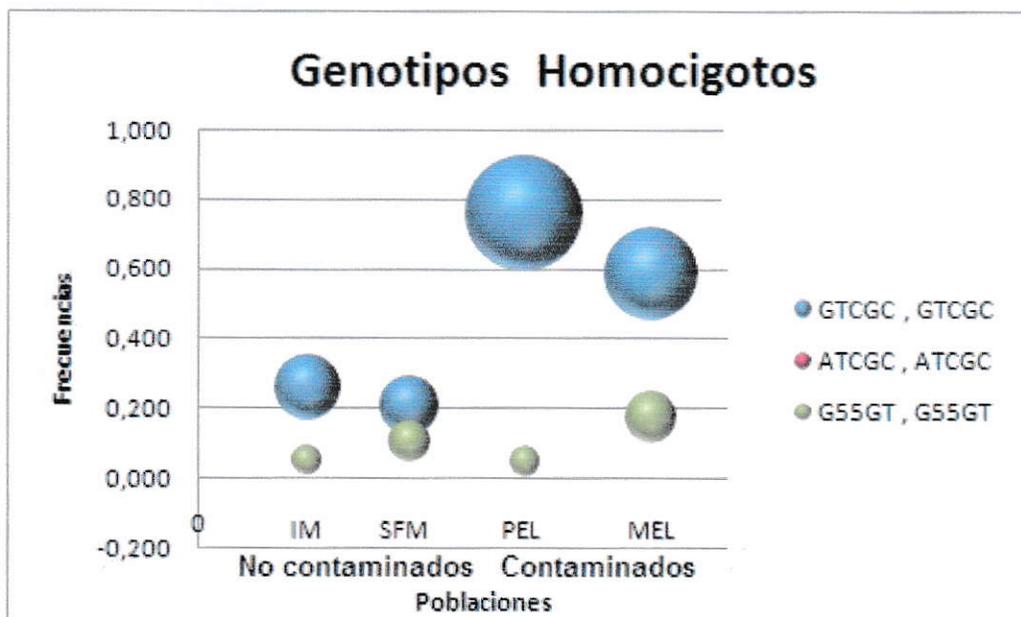


Figura 5. Gráfico de burbujas de los genotipos homocigotos del gen ODC para los cuatro sitios estudiados. El tamaño de la burbuja es proporcional al número de individuos por sitio.

## DISCUSION.

*Genes mitocondriales (COI y ND5).*

Los análisis realizados para evaluar el efecto de la contaminación sobre la variabilidad genética en ambos loci mitocondriales, mostraron que: i) no se detectó diferencias en la frecuencia de haplotipos entre los grupos (contaminado y no contaminado), ni tampoco entre las poblaciones dentro de los grupos, ii) no se encontró haplotipos únicos y de alta frecuencia asociados a algún tipo de contaminación, iii) en general todas las poblaciones mostraron un bajo número de haplotipos o baja diversidad genética con excepción de MEL (contaminado) y iv) las mutaciones no mostraron desviación a lo esperado por neutralidad, por lo tanto, la frecuencia de estas mutaciones varía por efecto del azar y no por selección natural.

Basado en lo anterior, los resultados en esta tesis no permiten aceptar la posible selección de SNPs observados por Vega-Retter (2014) en ambos genes mitocondriales en *B. microlepidotus*. Esta diferencia puede deberse a que los SNPs encontrados por Vega-Retter (2014) fueron falsos positivos, probablemente debido al bajo número de muestras con las que se realizó el RNA-Seq, en el cual se utilizó 6 peces obtenidos en lugares contaminados y 5 desde lugares no contaminados. Por lo tanto, el bajo número de muestras podría sesgar los resultados e influir en la detección de verdaderos SNPs bajo selección.

Por otra parte, este trabajo detectó una baja diversidad genética (en ambos loci mitocondriales) en las poblaciones de *B. microlepidotus* habitando el río Maipo. Este

hecho podría ser explicado por la historia de cambios drásticos en los tamaños poblacionales históricos y/o contemporáneos. En este contexto, el análisis de loci microsatélites realizado por Vega-Retter et al. (2014) en los mismo sitios de estudio, muestran que el tamaño efectivo contemporáneo es significativamente menor que el histórico. Cambios contemporáneos de los tamaños poblacionales fueron descrito para *B. microlepidotus* en los últimos 30 años (Muñoz 2007), llegándose a considerar a esta especie en un estado de conservación vulnerable (Ministerio del Medio Ambiente 2016). La contaminación podría ser señalada como una de las causas en la reducción del tamaño de la población de *B. microlepidotus* y su consecuente pérdida de diversidad genética. Casos similares han sido reportados por Murdoch & Hebert (1994) a través de enzimas de restricción para ADN mitocondrial, quienes detectaron una menor diversidad de haplotipos en individuos de *Ameiurus nebulosus* provenientes de sitios contaminados con hidrocarburos aromáticos en el “Great Lake”, al ser comparados con individuos habitando sitios no contaminados. Los autores proponen que, en el pasado, la contaminación redujo considerablemente el tamaño de la población, resultando en la reducida diversidad genética del presente (“cuello de botella”). En nuestro caso, Vega-Retter et al. (2014) no encontró evidencia del efecto “cuello de botella” en ninguna de las poblaciones estudiadas (las cuales son las mismas utilizadas en esta tesis). Cabe destacar que debido a las características geográficas de los hábitats de agua dulce, en algunos casos las barreras naturales impiden fuertemente la dispersión de individuos, generando poblaciones aisladas y una marcada estructuración genética de las poblaciones (Youngson et al. 2003, Mank & Avise 2006). En estos casos las poblaciones

son más sensibles a las perturbaciones ambientales y están más expuestas a reducir su tamaño poblacional y disminuir su diversidad genética (DeWoody & Avise 2000).

En resumen, los resultados de esta tesis no permiten aceptar parcialmente mi hipótesis inicial en cuanto a que la contaminación tiene un efecto selectivo sobre las mutaciones encontradas en ambos loci mitocondriales.

*Ornitina descarboxilasa (ODC).*

Contrariamente, nuestro estudio de genes nucleares con el gen ODC, sí evidencia diferencia entre ambientes contaminados y no contaminados, así los sitios contaminados mostraron: i) déficit significativo de heterocigotos, ii) una mayor frecuencia del genotipo GTCGC, CTCGC iii) considerable reducción de la frecuencia de heterocigotos con el alelo GTCGC en los sitios contaminados y iv) la total ausencia de heterocigotos sin el alelo GTCGC.

Basado en lo anterior, el gen ODC sí permitiría evidenciar selección en los peces expuestos a contaminación. Los resultados sugieren que el alelo GTCGC podría estar bajo selección direccional positiva por efecto de la contaminación. A pesar de la diferencia en el tipo y grado de contaminación presente en los sitios contaminados, en este caso observamos el mismo patrón de selección en el gen ODC en ambos sitios contaminados. Esto quiere decir que el alelo GTCGC del gen ODC podría estar implicado en generar una respuesta adaptativa a la contaminación en general y no a un contaminante en particular.

Un ejemplo similar a nuestro caso fue reportado por Cross & Revorvinos (2003) a través de loci aloenzimáticos. Estos autores encontraron un déficit significativo de heterocigotos en los loci Leucina aminopeptidasa (Lap) y Malato deshidrogenasa (Mdh1) en individuos del bivalvo *Crassostrea angulata* habitando zonas altamente contaminadas con metales pesados, esto en comparación con individuos habitando sitios no contaminados del mismo lugar. Además, en los sitios contaminados, observaron señales de selección por genotipos homocigotos de algunos alelos de estos loci, mientras los heterocigotos fueron favorecidos en la población control. El autor propone que esta selección podría estar relacionada con un proceso adaptativo de los individuos de *C. angulata* en los sitios contaminados.

Este estudio es un caso controversial, ya que se ha demostrado que la sobre expresión del gen ODC promueve el desarrollo de cáncer. Por lo tanto, si la selección observada en este estudio por el alelo GTCGC del gen ODC en los sitios contaminados estuviera relacionada con la sobre expresión observada por Vega-Retter (2014) en los sitios contaminados, se podría sugerir que de alguna manera el alelo GTCGC del gen ODC está relacionado con la función de la enzima ODC y por lo tanto con una disminución del riesgo de cáncer. Paralelamente, otra opción sería que la selección de este alelo no esté relacionada con la sobre expresión del gen ODC, sino más bien al hecho de que este alelo favorezca la adaptación de los individuos a la contaminación. De manera general se ha observado que poblaciones de peces expuestos a contaminación presentan un mayor frecuencia de tumores en el estómago, el hígado y además en la piel, en comparación con poblaciones habitando sitios no contaminados (Brown et al. 1973).

Lamentablemente en nuestro caso, no existen registros en que se demuestre la frecuencia de tumores en individuos de *B. microlepidotus* expuestos a la contaminación. Por lo tanto, sería relevante en estudios posteriores determinar la frecuencia de tumores en los individuos de las poblaciones de interés habitando el río Maipo.

En resumen, dada la importancia biológica del gen ODC es fundamental determinar en futuro las consecuencias de la selección del alelo GTCGC in *B. microlepidotus*, selección que podría estar relacionada con la sobre expresión encontrada en los sitios contaminados o podría estar asociada con otorgar una mayor resistencia en respuesta a la contaminación.

#### **CONCLUSION.**

En este trabajo, mi hipótesis inicial en parte no fue corroborada debido a que no se encontró evidencia de selección por efecto de la contaminación sobre las mutaciones presentes en ambos genes mitocondriales (COI y ND5). Sin embargo, al estudiar el gen nuclear mi hipótesis sí fue respaldada, ya que los resultados de los análisis genéticos sugieren selección direccional por el alelo GTCGC en los individuos habitando los sitios contaminados del río Maipo. No obstante con los datos que se cuentan no es posible determinar si esta selección estaría relacionada con la sobre expresión del gen ODC observada en los sitios contaminados y/o si estaría asociada con una respuesta adaptativa que permita generar resistencia a la contaminación. Estudios futuros debiesen concentrarse en determinar la frecuencia de tumores en los individuos de las poblaciones de interés habitando el río Maipo y en relación al gen ODC.

En términos generales, este estudio entrega información relevante del efecto de la contaminación sobre la genética del pejerrey endémico *Basilichthys microlepidotus*, y puede ser considerada para futuros planes de conservación de esta especie. Además este trabajo contribuye al entendimiento general de la interacción entre el medio ambiente y la genética de las poblaciones.

#### REFERENCIAS.

**Auvinen M, Paassinen A, Andersson L & Holtta E (1992)** Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 360: 355-359

**Bahamondes I, Soto D & Vila I (1987)** Hábitos alimentarios de las especies de Atherinidae del Embalse Rapel. *Medio Ambiente* 4: 3-18.

**Bello-Fernandez C, Packham G & Cleveland J (1993)** The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc Natl AcadSci USA* 90:7804-7808.

**Bélanger-Deschênes S, Couture P, Campbell P & Bernatchez L (2013)** Evolutionary change driven by metal exposure as revealed by coding SNP genome scan in wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Ecotoxicology* 22: 938-957.

**Bremer K, Kocha K, Snider T & Moyes C (2014)** Energy metabolism and cytochrome oxidase activity: linking metabolism to gene expression. *Canadian Journal of Zoology*. 92: 557-568.



**Brown E, Hazdra J, Keith L, Greenspan I, Kwapinski & Beamer P (1973)** Frequency of fish tumors found in a polluted watershed as compared to nonpolluted Canadian waters. *Cancer Research* 33: 189-198.

**Brown L, Halliday S, Greig H, Heys S, Wallace H & Schofield A (2009)** Genetic polymorphism in ornithine decarboxylase and risk of breast cancer. *Familial Cancer* 8:307-311.

**Cross I & Rebordinos L (2003)** Effect of marine contamination on the population structure of the bivalve *Crassostrea angulata*. *Ciencias Marinas* 29: 239-250.

**DeWoody J & Avise J (2000)** Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J Fish Biol* 56:461-473.

**Dirección general de aguas (2004)** Diagnostico y clasificación de los cursos y cuerpos de agua según objetivos de calidad, cuenca del Río Maipo. Ministerio de Obras Públicas, Gobierno de Chile.

**Duarte W, Feito R, Jara C, Moreno C & Orellana A (1971)** Ictiofauna del sistema hidrográfico del río Maipo. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural Chile* 32: 227-268.

**Dudgeon D, Arthington A, Gessner M, Kawabata Z, Knowler D, Lequeve C, Naiman R, Prieur-Richard A, Soto D, Stiassny M & Sullivan C (2006)** Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol Rev* 81:163-182.

**Ekblom R & Galindo J (2011)** Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* 107: 1–15.

**Fay J & Wittkopp P (2008)** Evaluating the role of natural selection in the evolution of gene regulation. *Heredity* 100: 191-199.

**Fracacio R, Verani N, Gaeta Espindola E, Rocha O, Rigolin-Sa O & Andrade C (2003)** Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Ciprinidae) exposed to the toxic sediments. *Br Arch BiolTechnol* 46:685–695.

**Filatov D (2002).**ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes* 2: 621-624.

**Forster M, Forster P & Watson J (2007)** Network version 4.2.0.1: a software for population genetics data analysis. Fluxus Technology Ltda. ed.pp.1999-2007.

**Fu Y & Li W (1993)** Statistical test of neutrality of mutations. *Genetic* 133: 693-709.

**Herrera C, Chavez J, Ferriz A, De la Torre K, Puente E & Gracia T (2014)** Poliaminas: pequeños gigantes de la regulación metabólica. *REB* 33: 51-57.

**Herron J & Freeman S (2014)** *Evolutionary Analysis*. Pearson USA.

**IUCN (2014)** The World Database on Protected Areas (WDPA) (United Nations Environment Programme World Conservation Monitoring Centre, Cambridge, UK, 2014). <http://www.protectedplanet.net>.

**Jackson R, Carpenter S, Dahm C, McKnight D, Naiman R, Postel S & Running S (2001)** Water in changing world. *Issues in Ecol* 9: 1-16.

**Kingsolver J & Pfennig D (2007)** Patterns and power of phenotypic selection in nature. *BioScience* 57: 561-572.

**Lande R (1998)** Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. *Researches on Population Ecology* 40:259-269.

**Manen C, Shmidt B & Rusell D (1976)** Polyamine synthesis in liver and kidney of flounder in response to methylmercury. *American Journal of Physiology* 231: 560-565.

**Mank J & Avise J (2006)** Supertree analyses of the roles of viviparity and habitat in the evolution of atherinomorph fishes. *Journal of Evolutionary Biology* 19:734.

**Ministerio de Medio Ambiente Chile (2016)** Inventario nacional de especies. <http://www.mma.gob.cl/clasificacionespecies/listado-especies-nativas-segun-estado-2014.htm>

**Muñoz B (2007)** Cambios en la riqueza íctica del río Maipo. Tesis Biología con Mención en Medio Ambiente, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

**Murdoch M & Hebert P (1994)** Mitochondrial DNA diversity of Brown bullhead from contaminated and relatively pristine sites in the Great Lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13:1281-1289.

**O'Brien T, Megosh L, Gilliard G & Peralta A (1997)** Ornithine decarboxylase overexpression is a sufficient condition for tumor promotion in mouse skin. *Cancer Research* 57: 2630-2637.

**O'Brian T, Gou Y, Visvanathan K, Sciulli J, McLaine M, Helzlsouer & Watkins-Bruner D (2004)** Differences in ornithine decarboxylase and androgen receptor allele frequencies among ethnic groups. *Molecular Carcinogenesis* 41: 120-123.

**Oleksiak M, Churchill G & Crawford D (2002)** Variation in gene expression within and among natural population. *Nature Genetics* 32: 261-266.

**Pandey S, Parvez S, Ansari RA, Ali M, Kaur M, Hayat F, Ahmad F & Raisuddin S (2008)** Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channapunctata* Bloch. *ChemBiol Interact* 174:183–192.

**Pardo R, Vila I & Bustamante R (2008)** Demographic response of *Stratiodrillus aeglaphilus* (Anelida, Histiobdellidae) to organic enrichment: experimental assessment. *Hydrobiologia* 598: 11-16.

**Pimm S, Jenkins C, Abell R, Brooks T, Gittleman J, Joppa L, Raven P, Roberts C & Sexton J (2014)** The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution and protection. *Science* 344: 987-998.

**Powers D (1989)** Fishes as model systems. *Science* 246: 352-358.

**Rietzel A, S Karchnel, D Franks, B Evans, D Nacci, D Champlin, V Vieira & Hahn M (2014)** Genetic variation at aryl hydrocarbon receptor (AHR) loci in populations of Atlantic Killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting polluted and reference habitats. *BMC Evolutionary Biology*, 14: 6-23.

**Rozas J & Rozas R (1999)** DnaSP version 3.5: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15:174–175.

**Schneider S, Roessli D & Excoffier L (2000)** Arlequin: A Software for Population Genetics Data Analysis, Version 2.000. Genetics and Biometry Laboratory, Dept. of Anthropology, University of Geneva, Switzerland.

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

**Ungerer M, Johnson L & Herman M (2008)** Ecological genomics: understanding gene and genome function in the natural environment. *Heredity* 100:178–183.

**Visvanathan K, Helzlsouer K, Boorman D, Strickland P, Hoffman S, Comstock G, O'Brien T & Guo Y (2004)** Association among an ornithine decarboxylase polymorphism, androgen receptor gene (CAG) repeat length and prostate cancer risk. *The Journal of Urology* 171: 652-655.

**Véliz D, Catalán L, Pardo R, Acuña P, Diaz A, Poulin E & Vila I (2012)** The genus *Basilichthys* (Teleostei : Atherinopsidae) revisited along its Chilean distribution range

(21° to 40° S) using variation in morphology and mtDNA. *Revista Chilena de Historia Natural* 85: 49-59.

**Vega-Retter C (2014)** Genetic consequences of living in a highly polluted environment: the case of the silverside *Basilichthys microlepidotus* (Jenyns) (Teleostei: Atherinopsidae) in the Maipo River basin, central Chile. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención en Ecología y Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

**Vega-Retter C, Muñoz-Rojas P, Vila I, Copaja S & Véliz D (2014)** Genetic effects of living in a highly polluted environment: the case of the silverside *Basilichthys microlepidotus* (Jenyns) (Teleostei: Atherinopsidae) in the Maipo River basin, central Chile. *Population Ecology* 56: 569-579.

**Vega-Retter C, Vila I & Véliz D (2015)** Signatures of directional and balancing selection in the silverside *Basilichthys microlepidotus* (Teleostei: Atherinopsidae) inhabiting a polluted river. *Evolutionary Biology* 42: 156-168.

**Youngson A, Jordan W, Verspoor E, McGinnity P, Cross T & Ferguson A (2003)** Management of salmonid fisheries in the British Isles: towards a practical approach based on population genetics. *Fisheries Research* 62:193-209.

**Zell J, Ziogas A, Ignatenko N, Honda J, Qu N, Bobbs A, Neuhausen S, Gerner E & Anton-Culver H (2009)** Associations of a polymorphism in the Ornithine decarboxylase gene with colorectal cancer survival. *Clinical Cancer Res.* 15: 6208-6218.