

Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas

**Filogeografía de *Micropogonias furnieri* Desmarest 1823
(Perciformes, Sciaenidae) según loci funcionales: el rol
de las acuaporinas en la adaptación a diferentes
regímenes salinos**

Javier Calvelo

Tutor: Alejandro D'Anatro

Resumen:

A pesar de su importancia comercial para nuestro país, nuestro conocimiento sobre la estructura poblacional de *Micropogonias furnieri* en la región y los procesos causantes de esta siguen siendo limitados. Varios estudios, basados tanto en caracteres genéticos como morfológicos, sugieren que el Río de la Plata alberga una unidad poblacional independiente de su frente oceánico, además de cierto grado de diferenciación en los individuos que habitan las lagunas costeras asociadas a éste sistema. Parte de la diferenciación encontrada en estos estudios no es explicada completamente por deriva genética ya que existe evidencia del papel de la selección natural actuando sobre este escenario de diferenciación poblacional. Aunado a lo mencionado con anterioridad, la ausencia de barreras geográficas evidentes entre los sistemas estudiados también sugiere la posibilidad de que la adaptación a las condiciones locales –como puede ser la diferencia de salinidad– tenga un efecto preponderante en el escenario de diferenciación poblacional encontrada. En este trabajo se analizó la estructura poblacional de *Micropogonias furnieri* en base a la variación en uno de los genes codificantes para canales transmembrana de agua –acuaporina AQP-3a–, con el objetivo de testear la hipótesis de que la diferencia de salinidad entre el Río de la Plata, las lagunas costeras y el Océano Atlántico juega un rol en la diferenciación de estas poblaciones. Los análisis efectuados no develaron ningún patrón de estructura poblacional, ya que no se encontraron diferencias significativas entre los individuos de las localidades estudiadas. Sin embargo, los resultados obtenidos contribuirán a formar un punto de inicio para investigar en profundidad los procesos detrás de la estructuración poblacional de *M. furnieri* en la región y para ampliar el set de secuencias de AQP-3 de teleosteos disponible.

1.- Introducción

Las especies de peces que habitan los ambientes estuarinos se ven sometidas a un alto estrés ambiental debido a la alta variación en el tiempo de factores ambientales como la turbidez, disponibilidad de nutrientes, temperatura o salinidad; esta inestabilidad es responsable de la baja biodiversidad presente en los estuarios, aunque éstos presentan una alta productividad (Whitfield 1999). Tanto las especies que se encuentran en su límite de distribución, como las que migran periódicamente por motivos alimenticios y/o reproductivos como las que residen en el estuario de forma permanente, presentan adaptaciones comportamentales y fisiológicas para sobrellevar estas fluctuaciones, con las que son capaces de aprovechar un medio rico en alimento en el que muchos competidores son excluidos por las condiciones físicas (Whitfield 1999)

Debido a la alta productividad de los estuarios y a su fácil acceso para la explotación pesquera, estos ambientes tienen una gran importancia económica, lo que sumado a la actividad comercial y recreacional asociada a la proximidad de sus puertos, los posiciona en grave riesgo de conservación (Houde & Rutherford 1993; Heck et al. 2001). Además, son ambientes estratégicos para la conservación de los "stocks" pesqueros dado que son usados como áreas guardería por muchas especies de importancia económica (Becket al. 2001; Whitfield 1999). A pesar de la gran importancia de estos ambientes, nuestro conocimiento general sobre las dinámicas poblacionales de las especies de peces e invertebrados que los habitan es en general, insuficiente como para desarrollar medidas de manejo ecosistémico efectivas (Beck et al. 2001).

El Río de la Plata es un estuario de influencia fluvial con fuerte influencia mareal; presenta una forma de embudo con una extensión de aproximadamente 300 km y un ancho que va desde los 35 a 230 km, teniendo su origen en la conjunción de los Ríos

Paraná y Uruguay que en conjunto hacen una descarga media de 26.000 m³/s (Piccolo & Perillo 1997). Con las grandes ciudades de Buenos Aires y Montevideo en sus orillas, el impacto ambiental que recibe es importante. Esto implica que determinar la estructura poblacional de las especies que habitan este estuario y regiones aledañas sea una prioridad si se pretende desarrollar medidas de conservación y manejo acertadas.

La corvina rubia *Micropogonias furnieri*, posee una gran tolerancia a las variaciones ambientales en la temperatura y salinidad, lo que se ve reflejado en su amplia distribución a lo largo de la costa Atlántica, la cual abarca desde Veracruz, México (20° N) hasta el Golfo de San Matías, Argentina (41° S) (Isaac 1988; Vazzoler 1991). Durante la época de reproducción migran hacia la costa, llegando a incursionar dentro de las desembocaduras de ríos y lagunas costeras que actúan como sitios de reproducción y refugio para las crías (Acuña et al. 1992; Vizziano et al. 2002)

Existen varios estudios que proponen la existencia de cierta estructuración poblacional en esta especie en el Atlántico Sur. Isaac (1988) propone, en base a caracteres morfológicos, la existencia de cinco unidades reproductivas aisladas parcialmente, distribuidas al sur del paralelo 23° S; Vazzoler (1971) sugiere la existencia de dos poblaciones, una en la costa brasileña, entre los 23° S y 29° S, cuya zona de desove comprende el complejo lagunar de Cananeia (Brasil), y otra entre los 29° S y 33° S, desovando al oeste de la Barra de Río Grande (Brasil). Por otro lado, Cotrina (1986), tomando en cuenta la estructura de tallas y el comportamiento reproductivo, encuentra dos poblaciones separadas más al sur del continente, una en la desembocadura del Río de La Plata hasta el 38°S y otra en lo que correspondería a la zona de El Rincón (Argentina), aunque no descarta de que el patrón sea fruto de una diferencia en la intensidad pesquera. Figueroa & Díaz de Astarloa (1991) también

plantean un esquema similar de estructura poblacional en base a caracteres morfológicos y merísticos.

En contraparte, estudios realizados sobre la variación de loci alozímicos sugieren un intenso flujo génico entre Rio Grande (33° S) y El Rincón (40° S) (Maggioni et al. 1994). Pereira et al. (1990) también apoyan un extenso flujo genético entre el Río de la Plata y su frente oceánico. De igual forma Levy et al. (1998) en la costa del Brasil entre los 20° S y 35° S. Estos resultados apuntan a una gran población panmítica de *M. furnieri* en las costas del Atlántico Sur de Sudamérica. Sin embargo, estos resultados deben tomarse con cautela ya que los marcadores alozímicos son poco variables por naturaleza, ya que no solo se están observando regiones codificantes las que no suelen cumplir con el supuesto de no estar sometidos a selección natural (Karl & Avise 1992), sino que debido a la técnica utilizada solo pueden detectarse variaciones que afecten el tamaño de la proteínas. Por esto no serían apropiados para analizar estructuras poblacionales recientes (Sunnucks 2000).

Un estudio más reciente basado en secuencias del ADN mitocondrial propone que los individuos del Río de la Plata representarían una unidad independiente del Atlántico (Pereira et al. 2009), lo que ha sido apoyado por estudios posteriores basados en microsatélites y morfología geométrica (D'Anatro & Lessa 2011; D'Anatro et al. 2011, respectivamente). Además, existen registros de una reducción de 11 a 12 cm en la talla de primera madurez para los individuos que habitan en la Laguna de Rocha, en relación a los individuos que habitan las aguas del Océano Atlántico (Vizziano et al. 2002). Un fenómeno similar fue reportado en "Lagoa dos Patos" (Brasil) (Castello 1986), así como en otra especie del mismo género, *Micropogonias undulatus*, que también habita en ecosistemas estuarinos (Ross 1988). Se ha propuesto que este fenómeno es una respuesta propia de especies con tasas de mortalidad elevadas, siendo la pesca intensiva la fuerza más invocada, la cual actuaría

como una presión selectiva en contra de los organismos de gran tamaño (Ross 1988). Sin embargo, el esfuerzo pesquero en aguas Uruguayas se concentra en el Río de la Plata, en donde no se ha registrado la maduración sexual temprana en corvina blanca, por lo que es muy probable de que sean otras las causas de este patrón (D'Anatro & Lessa 2011). Estudios más profundos sugieren una diferenciación genética y morfológica leve pero significativa entre los individuos de Laguna de Rocha con respecto a los individuos de Océano Atlántico y el estuario del Río de la Plata (D'Anatro & Lessa 2011; D'Anatro et al. 2011), lo cual estaría a su vez acompañado por diferenciación en los recursos alimenticios utilizados por los individuos que habitan las lagunas (D'Anatro et al. 2013)

Dada la diferencia de salinidad entre ambos ambientes cabe la posibilidad de que sea una diferencia en la capacidad de regular la pérdida o ganancia de agua la responsable de la segregación de las poblaciones del Río de la Plata como ya fue sugerido por D'Anatro (2011). Sumado a esto, existe evidencia de que parte de la variación morfológica encontrada entre las corvinas de la Laguna de Rocha, el Río de la Plata y su frente oceánico, puede ser efecto de la selección natural divergente actuando sobre estas poblaciones (D'Anatro & Lessa 2011). En este sentido, sería esperable que algunos de los genes vinculados con la regulación osmótica mostraran señales de estar bajo selección divergente entre el Río de la Plata, las lagunas costeras y el Océano Atlántico.

Los teleósteos regulan su presión osmótica controlando el flujo de agua en órganos como los riñones, branquias o el tracto intestinal (ver Evans (2008) para una revisión más detallada sobre la osmoregulación en teleósteos). En particular, los que habitan en agua dulce, su interior es hiperosmótico con respecto al medio, y deben compensar la constante entrada de agua y pérdida de iones por difusión pasiva. Esto lo logran principalmente mediante la excreción de orina altamente diluida y por la captación

activa de iones por células especializadas en el epitelio de las branquias, las células clorhídricas. Por otro lado, los teleósteos marinos deben hacer frente al caso contrario, pérdida constante de agua y ganancia de iones, la que compensan produciendo pequeños volúmenes de orina casi isotónica con respecto al medio y secretando activamente iones por las agallas.

Como las especies que habitan de forma permanente los ecosistemas estuarinos se ven forzadas a manejar ambas situaciones es esperable encontrar adaptaciones que les permitan amortiguar esta clase de estrés ambiental.

Unos de los genes más directamente implicados con la osmorregulación son las acuaporinas (AQPs), una superfamilia de pequeñas proteínas integrales de membrana de entre 25–34 kDa (Cerdà & Finn 2010). Se han identificado 13 subfamilias en tetrápodos, denominadas desde AQP0 hasta AQP12, las cuales se subdividen en 2 grupos mayores en base a la homología de sus secuencias y por sus propiedades de permeabilidad: las acuaporinas selectivas a agua y las acuagliceroporinas, permeables además a glicerol, urea y amonio (Agre et al. 2002; Litman et al. 2009; Cerdà & Finn 2010).

Se han aislado secuencias completas o parciales de acuaporinas en numerosos grupos de teleosteos como por ejemplo de representantes de las divisiones Elopomorpha, Ostariophysii, Neognathi, Protacanthopterygii, Paracanthopterygii y Acanthopterygii (Cerdà & Finn 2010). Sin embargo, solo se han realizado estudios exhaustivos de la diversidad de acuaporinas en el pez modelo *Danio rerio* en el que se reveló un repertorio de al menos 18 secuencias codificantes homologas a las AQP0-1, AQP3-5 y AQP7-12 de tetrápodos por duplicado o triplicado, aunque todos los ortólogos conservan generalmente la misma estructura de exones e intrones (Tingaud-Sequeira et al. 2010). La división entre acuaporinas selectivas a agua y acuagliceroporinas de tetrápodos sigue siendo válida, además de dos grupos

divergentes correspondientes a los ortólogos de la AQP-8 y los de las AQP11-12 (Cerdà & Finn 2010).

Varios estudios muestran una compleja dinámica de los diferentes ortólogos de los genes AQPs a lo largo de la diversificación de los teleósteos (Cerdà & Finn 2010). Dicha complejidad es producto, en primera instancia, de un evento de duplicación genética completa (WGD) ocurrido en la base del grupo de los Actinopterigios (Christoffels et al. 2004; Taylor et al. 2003); que ha dejado su huella en otros genes, como los clusters de genes *hox* (Amores et al. 1998) y las hemoglobinas (Opazo et al. 2012). Este evento fue seguido por una pérdida masiva de genes, fruto de varios rearrreglos intra- e intercromosómicos independientes en los distintos linajes (Cerdà & Finn 2010; Jaillon et al. 2004). Estos fenómenos explican porque el número de genes de AQPs presentes en *D. rerio*, aunque mayor al de tetrápodos, es menor al doble. De hecho, *Fugu rubripes* y *Oryzias latipes* solo poseen en sus genomas 14-15 parálogos de AQPs respectivamente (Cerdà & Finn 2010). Por ejemplo, el parálogo AQP-3b parecería haberse perdido en los Acantomorphos, aunque por ejemplo, *Anguilla anguilla*, *Pimephales promelas*, *Oncorhynchus mykiss* y *Gadus morhua*, conservan este gen (Cerdà & Finn 2010). De hecho, solo una fracción de los parálogos producidos por éste evento de duplicación se conservan en la actualidad (Jaillon et al. 2004).

A pesar de lo mencionado líneas arriba, la mayoría de las acuaporinas de teleósteos son consistentes con el evento WGD, aunque se discute la hipótesis que algunos parálogos como los casos de la AQP-1a y la AQP-1b, así como la AQP-0a y la AQP-0b pudieran haber surgido por una duplicación en tándem (Cerdà & Finn 2010). Otro caso de una duplicación en tandem son los parálogos AQP-8aa y AQP-8ab, pero a diferencia de los casos anteriores, el parálogo producto del WGD (AQP-8b) aún se conserva en los genomas de los Acantomorphos, con la excepción de *O. latipes*, en el

que parece haberse perdido junto con el AQP-8aa (Cerdà & Finn 2010). Por otra parte, *F. rubripes* parece haber perdido de manera independiente los genes AQP-8aa y AQP-8ab (Cerdà & Finn 2010).

Particularmente, la AQP-3a es una acuagliceroporina que expresa en branquias, esófago, intestino y en los riñones de especies como *A. anguilla*, *Dicentrarchus labrax*, *D. rerio* y *Oreochromis mossambicus* (e.g: Cutler et al. 2007; Cerdà & Finn 2010). En las branquias se ha visto una mayor expresión en especies adaptadas al agua dulce, aunque en especies de Tilapia no se han observado diferencias significativas entre especies aclimatadas al agua dulce o salada (Cerdà & Finn 2010). A esto se suma que existe una marcada diferencia en los patrones de expresión en el epitelio branquial entre diferentes especies, por lo que su función fisiológica sigue siendo motivo de discusión (Cutler et al. 2007). En el esófago se la ha encontrado en ejemplares de *A. anguilla* aclimatados al agua salada; estudios iniciales sugieren que en estos ejemplares se localiza en células secretoras de moco, mientras que en los aclimatados a agua dulce se encuentra en las células no secretoras solo de la región anterior (Lignot et al. 2002). En el intestino se lo ha detectado en *A. anguilla* y *O. mossambicus*, aunque no así en *Tribolodon hakonensis*; en *A. anguilla* no se observan cambios en los niveles de expresión de la AQP3 en individuos aclimatados a una u otra situación, aunque, mientras en el intestino se expresa en grandes células tipo macrófago en el recto se expresa en las células secretoras de moco (Cutler et al. 2007; Cerdà & Finn 2010). Por último, en *A. anguilla* no hay evidencia de que se exprese en los riñones, sin embargo en especies de Tilapia habría una mínima expresión, siendo mayor en peces aclimatados al agua salada que en agua dulce (Cutler et al. 2007).

Teniendo en cuenta específicamente el rol de la AQP-3a en la osmoregulación en teleósteos, se analizó la variación intra-einterpoblacional espacial de *M. furnieri* mediante el empleo del gen que codifica para esta proteína como estimador de la

variación genética. La hipótesis de trabajo es que, dada las variaciones en la salinidad promedio entre el Río de la Plata, su frente marítimo y las lagunas costeras asociadas, existen variantes alélicas del gen de la AQP-3a directamente asociadas a cada uno de estos ambientes en *M. furnieri*, siendo esto un factor importante detrás de la estructuración poblacional detectada por varios autores en la especie (i.e Pereira et al. 2009; D'Anatro 2011; D'Anatro & Lessa 2011; D'Anatro et al. 2011; D'Anatro et al. 2013). Si bien las secuencias codificantes de los genes nucleares no suelen presentar suficiente variación como para estudiar procesos poblacionales recientes (Sunnucks 2000), la posible diferencia de presiones selectivas entre ambos ambientes podría estar afectando las frecuencias de los diferentes alelos de este gen.

2.- Materiales y Métodos

Obtención de las muestras y área de estudio

Se analizaron un total de 137 individuos muestreados en 5 localidades: en el interior del estuario (Montevideo, n=26), en las cercanías de su frente oceánico (San Luis, n=24), asociadas a lagunas costeras sobre la costa Atlántica (Laguna de Castillos, n=15 y Laguna de Rocha, n=27), sobre la costa Atlántica en Uruguay (La Paloma, n=27) y en aguas territoriales Argentinas del océano Atlántico (Villa Gesell, n=18) (Fig. 1). Todos los individuos estudiados fueron obtenidos por medio de pescadores artesanales locales o mediante campañas del B/I Aldebarán (DINARA, MGAP).

Diseño de oligonucleótidos específicos y análisis de laboratorio

Para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se dispuso de los siguientes oligonucleótidos específicos: AQP3a-EX2-MfF (5'-TGCGWTGTTCCCTTACYGTCAACTTTGC-3'), ubicado en los primeros pares de bases (pb) del exón 2, y AQP3a-EX6-MfR (5'-AAGCCCATRGACAATCCAATGA-3'), ubicado en los primeros pb del exón 6. Dichos oligonucleótidos fueron construidos en base a

las regiones conservadas según el alineamiento de los ortólogos de la AQP3a en trece especies de referencia (Tabla 1).



Figura 1. Puntos de muestreo para los que se cuenta con tejidos de *M. furnieri*. Coordenadas geográficas aproximadas: Laguna de Castillos 34° 18' S, 53° 55' O; Laguna de Rocha 34° 37' S, 54° 15' O; La Paloma 34° 39,5' S 54° 08,5' O; San Luis 34°47'7.33" S; 55°33'46.16" O; Montevideo 34° 38' S, 56° 16' O y Villa Gesell 37° 14' S, 56° 44' O. En rojo se marcan las localidades donde se obtuvieron resultados positivos. La línea punteada indica el límite del Río de la Plata. Modificado de D'Anatro & Lessa (2011).

Las extracciones de ADN se realizaron sobre muestras de tejido siguiendo el protocolo modificado de Miller et al. (1988). El PCR se realizó en un volumen final de 25 µl conteniendo: 12,5 µl de ADN (0,4 µg/ml); 1,0 µl de dNTPs (0,4 µM); 2,0 µl de

cada uno de los dos oligonucleotidos (0,8 μ M); 3,5 μ l de MgCl₂ (3,5mM); 0,3 μ l de Taq (0.06 u/ μ l); 1,5 μ l de buffer (1X) y 1,20 μ l de agua destilada. Se siguió la estrategia de tipo "Touch Down" (Don et al. 1991) con 35 ciclos divididos en 5 etapas, las primeras 4 de 5 ciclos y la última de 15 con las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 45 segundos, asociación a 58, 48, 46, 44 y 42 grados según la etapa durante 45 segundos, y extensión a 72°C por 1 minuto; anteceditos por una desnaturalización inicial de 4 minutos a 94°C y seguidos de una extensión final de siete minutos a 72°C. Los productos de PCR obtenidos fueron enviados para su secuenciación automática, empleando el oligonucleótido AQP3a-EX2-MfF como cebador de la reacción, a Macrogen (Korea).

Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Proseq 3.2 (Filatov 2009). La reconstrucción de los haplotipos de cada individuo se realizó en dos etapas, primero en forma manual, usando como referencia un alineamiento de los individuos homocigotas, y luego con el programa PHASE v 2.1 (Stephens et al. 2001; Li & Stephens 2003; Crawford et al. 2004; Stephens & Scheet 2005). La diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π) fueron estimadas usando el programa DnaSP v 5.10 (Librado & Rozas 2009). Se construyó una red de haplotipos mediante el algoritmo de "*Median-Joining*" con el programa Network 4.6 (Bandelt et al. 1991). Los valores del peso de cada carácter se dejaron en su valor por defecto (i.e. 10) salvo para los gaps en los que se dividió este valor por el tamaño del mismo para considerarlo un único evento, aproximándose al valor entero más cercano, con el fin de evaluarlos como un único evento.

Para confirmar la identidad de la fracción del gen amplificado, se buscaron correspondencias en la base de datos Genbank (Benson et al. 2002) utilizando el algoritmo MegaBLAST (Morgulis et al. 2008). Las correspondencias con mayor

identidad se usaron como referencia para determinar los exones e intrones presentes en el fragmento amplificado mediante una búsqueda por similitud, utilizando el algoritmo BLASTX (Gish & States 1993).

Tabla 1. Secuencias de referencias usadas para la construcción de los oligonucleótidos usados en PCR.

Especie	ID
<i>Carassius auratus</i>	AM928312.1
<i>Cyprinus carpio</i>	EX885773.1
<i>Danio rerio</i>	EU341833.1
<i>Dicentrarchus labrax</i>	DQ647191.1
<i>Gadus morhua</i>	FF416557.1
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	DW597988.1
<i>Haplochromis burtoni</i>	DY630346.1
<i>Ictalurus punctatus</i>	CV987951.1
<i>Oreochromis mossambicus</i>	ES375494.1
	AB126941.1
<i>Ptyochromis</i> sp.	BJ690402.1
<i>Rhabdosargus sarba</i>	DQ333306.1
<i>Salmo salar</i>	EG871914.1
	GE619840.2
<i>Tribolodon hakonensis</i>	AB055465.1

Análisis de estructura poblacional y apartamiento del régimen de evolución neutral

Para evaluar la estructura poblacional se calcularon los coeficientes de endocría F_{ST} empleando el programa Arlequin v 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010). También se utilizó éste programa para evaluar entre diferentes hipótesis de estructura poblacional mediante un análisis de varianza molecular AMOVA (Excoffier et al. 1992), basado también en los coeficientes F_{ST} . Complementariamente a este análisis, se realizaron pruebas de neutralidad a todo el set de datos mediante los tests de Tajima, D_s (Tajima 1989) y F_u , F_s (Fu 1997).

3.- Resultados

Análisis de las secuencias obtenidas

Se secuenciaron exitosamente 22 individuos: 11 de Laguna de Castillos, 6 de San Luis y 5 de La Paloma, obteniéndose un fragmento de 689 pb una vez completada su edición. La búsqueda de secuencias nucleotídicas en la base de datos GenBank identificó homología entre la secuencia obtenida en *M. furnieri* y el gen AQP-3a de *Sparus aurata*, con una identidad del 96%, seguido por la AQP-3 de *D. labrax*, con una identidad del 90%, (códigos de acceso de GenBank: KC788197.1 y DQ647191.1, respectivamente). Por su parte, las búsquedas de exones mediante el algoritmo de BLASTX detectó la existencia de 2 exones en el fragmento amplificado. Usando las secuencias antes mencionadas como referencia, se determinó que el primero comprendía las posiciones 199 a 336, de la secuencia obtenida, con una identidad del 98% para ambas referencias y el segundo las posiciones 468 a 597, con una identidad del 80% para *S. aurata* (AGT57408.1) y del 85% para *D. labrax* (ABG36519.1). Las otras correspondencias identificadas BLASTX incluyen otras especies, que en su mayoría también reconocieron estas regiones, pero algunas presentaron cierta variación, siendo el segundo exón el más variable. Al no disponerse de la secuencia completa del gen de la AQP-3a en *M. furnieri* y sumado al reducido número de ortólogos de AQP-3a secuenciados para teleósteos, es riesgoso hacer asunciones sobre exactamente cuáles de los exones fueron realmente amplificados, pero por las posiciones de los oligonucleótidos podríamos suponer que se trata de los exones 4 y 5.

En total se identificaron 8 haplotipos diferentes (Tabla 2) con $Hd = 0,638$, $\pi = 0,008$. La red de haplotipos revela 2 grupos claramente diferenciados por varios SNP así como 2 deleciones diferentes: 6 nucleótidos en las posiciones 350-355 en el grupo 1, y otra de 3 nucleótidos en el grupo 2, en las posiciones 418-420 (Figura 3). La mayor

cantidad de polimorfismos se detectó en el intron central y no se detectaron InDels en los intrones entre 1-198 y 598-698 (Figura 2) pero es necesario señalar que estos están incompletos por lo que sacar conclusiones sobre su cantidad de polimorfismos es precipitado. También cabe señalar que los haplotipos H7 y H8 se diferenciaron por una única delección de un pb en la región 458-468, sin que sea posible determinar su posición exacta debido a la presencia únicamente de Timinas en dicha región de la secuencia, por lo cual no se descarta que sea producto de un artefacto de secuenciación.

Solo se detectó una única mutación no sinónima en un único individuo de Laguna de Castillos, ubicada en el segundo exón, una treonina por una prolina, en la posición 510 y 2 mutaciones sinónimas en las posiciones 524 y 527, éstas últimas asociadas a los distintos grupos de haplotipos (Figura2). Debido a esto, se tomó en cuenta la variación en los exones como en los intrones en su totalidad para los análisis poblacionales.

Estructura poblacional y apartamiento del régimen de evolución neutral

El mayor valor de F_{ST} fue entre los individuos de La Paloma y Laguna de Castillos, con un valor de= 0,105, mientras que los restantes fueron cercanos a 0 (Tabla 3) Sin embargo, ninguno de estos valores tiene significancia estadística ($p > 0,05$ en todos los casos). Tanto el test de Tajima como el de Fu no detectaron apartamientos significativos de la neutralidad: ($D = 1,741$, con $p = 0,965$ y $F = 8,665$ con $p = 0.985$).

El AMOVA considerando a todas las localidades pertenecientes a un mismo grupo arrojó un $F_{ST} = 0,044$ con un valor asociado de $p = 0.193$ (Tabla 4). Se intentaron otras agrupaciones pero no se obtuvieron mejores resultados (datos no mostrados).

Tabla 2. Frecuencias de los Haplotipos en las poblaciones de La Paloma, San Luis y Laguna de Castillos. El número de individuos secuenciados por localidad se muestra al

Haplotipo	Localidad		
	La Paloma (n=5)	San Luis (n=6)	Laguna de Castillos (n=11)
H1	0,500	0,667	0,318
H2	0,300	0,333	0,5
H3	0,100	0	0
H4	0,100	0	0
H5	0	0	0,045
H6	0	0	0,045
H7	0	0	0,045
H8	0	0	0,045

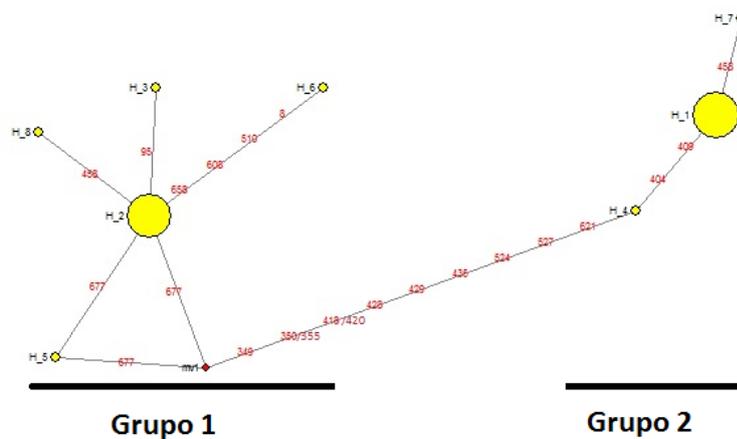


Figura 2. Red de Haplotipos construida con el algoritmo Median-Joining en el programa Network 4.6 (Bandelt et al. 1991). Se identificaron 8 haplotipos (círculos amarillos) diferentes agrupados en 2 grupos diferenciarlos por 8 SNP y 2 InDels de 6 y 3 nucleótidos, dominados por los haplotipos H2 y H1 respectivamente, ambos con una frecuencia de 0,43. El tamaño de los círculos amarillos es proporcional a su frecuencia en los individuos muestreados. Las posiciones de los polimorfismos que diferencian los haplotipos se muestran en rojo.

Tabla 3. Por debajo de la diagonal se muestran los valores de F_{ST} pareados entre individuos de las localidades de La Paloma, San Luis y Laguna de Castillos, por encima de la diagonal se presentan los valores de p asociados a estas estimaciones.

	La Paloma	San Luis	Laguna de Castillos
La Paloma	_____	0,741±0,004	0,240±0.005
San Luis	<0,001	_____	0,129±0,004
Laguna de Castillos	0.0272	0.105	_____

Haplotipo/Posición	8	95	349	350-355	404	409	418-420	428	429	435	¿458/468?	510	524	527	608	621	658	677
H1	T	A	C	-	C	G	ATA	C	G	C	T	A	A	T	A	A	A	A
H2	T	A	T	GATCCA	T	A	-	T	A	A	T	A	C	C	A	G	A	G
H3	T	G	C	GATCCA	T	A	-	T	A	A	T	A	C	C	A	G	A	G
H4	T	A	T	-	T	A	ATA	C	G	C	T	A	A	T	A	A	A	A
H5	T	A	T	GATCCA	T	A	-	T	A	A	T	A	C	C	A	G	A	C
H6	T	A	C	GATCCA	T	A	-	T	A	A	T	C	C	C	C	G	T	G
H7	T	A	T	-	C	G	ATA	C	G	C	-	A	A	T	A	A	A	A
H8	T	A	T	GATCCA	T	A	-	T	A	A	-	A	C	C	A	G	A	G

Figura 3. Posiciones variables de los haplotipos identificados. En azul los polimorfismos que diferencian ambos grupos de haplotipos (posiciones: 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 418, 419, 420, 428, 429, 435, 524, 527, 608, 621, 658 y 677). Resaltadas en amarillo se muestran los polimorfismos en las regiones codificantes (posiciones: 510, 524 y 527). En rojo la única sustitución no-sinonima encontrada (posición 510, H6) presente en un único individuo de Laguna de Castillos. Los haplotipos 7 y 8 se diferencian por una delección de una pb en la región 458-468, sin embargo debido a que en dicha región de la secuencia solo hay timinas es imposible precisar su posición exacta en el alineamiento.

Tabla 4. Resultados del AMOVA obtenidos mediante el software Arlequin v 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	2	15,906	0,223 Va	4,37
Dentro de las poblaciones	41	200,321	4, 885 Va	95,63
Total	43	216,227	5,109	

FST= 0,044

4.- Discusión

En este estudio se consiguió amplificar secuencias del gen AQP-3a de una pequeña fracción de los individuos estudiados, pero por debajo de los necesarios para tener una muestra representativa de las poblaciones de *M. furnieri* en la región comprendida por este trabajo. Aún así, se obtuvieron algunos resultados interesantes que se discutirán a continuación, comenzando con los problemas de diseño experimental, para luego tratar los resultados de las pruebas de estructuración poblacional y de neutralidad, y la posible implicancia biológica de los polimorfismos encontrados.

Problemas del diseño experimental

Debido a la falta de disponibilidad de secuencias de AQP-3a en especies cercanas filogenéticamente a *M.furnieri* para usar como referencia en la construcción de

oligonucleótidos específicos, la afinidad de dichos cebadores de la reacción de PCR a los sitios objetivo dista mucho de ser ideal, siendo quizás uno de los principales causantes de las escasas secuencias recuperadas. Esto significaría que estos resultados están sesgados por la incapacidad de obtener amplificaciones positivas con al menos parte de los haplotipos existentes. Aun así, es poco probable que se deba a variaciones en las secuencias blanco de los primers ya que están ubicados en regiones codificantes del gen y a que por ejemplo, en los exones identificados solo se encontraron 3 SNP, una de ellas presente en un único individuo, lo que denota escasa variación en este tipo de regiones génicas. De todas formas esto debe investigarse más a fondo ya que podría ser indicador de la existencia de variabilidad en los exones blanco de los primers.

Otro problema a considerar es la forma de muestreo que puede no ser la ideal para comprobar si las diferencias de salinidad ejercen alguna presión selectiva diferencial entre las localidades dentro o muy cercanas al Río de la Plata ya que no se tiene información sobre la salinidad en la que se encontraban. Teniendo en cuenta la variabilidad de las condiciones ambientales del estuario (Guerrero 1997) esta presión diferencial, de existir, no sería constante en el tiempo. Otro dato importante sería disponer de la profundidad, teniendo en cuenta la fuerte estratificación de la salinidad existente generalmente en el estuario (Guerrero 1997) los individuos más sensibles a la baja salinidad podrían minimizar el estrés osmótico nadando a aguas más confortables cambiando su posición en la columna de agua, sumado a desplazamientos no demasiados importantes teniendo en cuenta la biología de la especie. Estos movimientos en función del gradiente salino no serían detectados por el muestreo utilizado, reduciendo su efectividad.

La biología de la especie tampoco facilita el abordaje experimental directo. Aunque demuestra ser muy tolerante a los cambios ambientales, su tamaño hace que su cría

en cautiverio para la experimentación tenga varias complicaciones logísticas. Teniendo en cuenta estas dificultades y que en su planteo original este estudio no se limita al estuario sino que además incluye lagunas costeras como la Laguna de Rocha y la Laguna de Castillos, así como el Océano Atlántico, el muestreo es por lo menos apropiado.

Estructura poblacional

No se encontró estructuración poblacional entre las localidades analizadas ni apartamientos de la neutralidad que evidencien selección en el gen AQP3a o una expansión poblacional de la población de *M.furnieri*. Sin embargo esto debe tomarse con cautela por los problemas mencionados antes y por la evidencia existente sobre la estructura poblacional planteada para esta especie (e.g. Pereira et al. 2009; D'Anatro et al. 2011; D'Anatro&Lessa2011;D'Anatro et al. 2013;). De hecho, cabe señalar que el mayor valor de F_{ST} obtenido, fue entre las localidades de San Luis y Laguna de Castillos, aunque no presentó apoyo estadístico.

Por lo expuesto anteriormente, no es sorprendente de que los test de Tajima y Fu no arrojaran resultados significativos. Por desgracia con estos datos no tiene sentido realizar otras pruebas con este set de datos debido a la homogeneidad entre las localidades en las frecuencias de polimorfismos presentes por lo que no tiene sentido realizar pruebas que involucren la comparación entre las localidades

Además, solo se detectó una única sustitución no sinónima en un único individuo heterocigota para este locus adelantando cual será el resultado de los test basados en las comparaciones de las mutaciones sinónimas y no sinónimas; como por ejemplo el test de McDonald-Kreitman (McDonald & Kreitman 1991). Para esclarecer si existen apartamientos de la neutralidad o no en este loci es necesario expandir en primer lugar el set de datos.

Polimorfismos encontrados

El escaso número de individuos que pudieron ser amplificados con éxito es un claro indicador de que estos resultados no son una muestra representativa de los individuos de *M. furnieri* que habitan el área de estudio. Sin embargo la alta predominancia de los haplotipos H1 y 2 sugiere que estos son los más frecuentes, por lo que solo se estarían sub representando los haplotipos más raros.

La variación producto de InDels detectada en los intrones merece cierta atención, particularmente los que contribuyen a diferenciar los grupos 1 y 2 ya que son los más grandes en extensión y uno u otro polimorfismo está presente en todos los individuos amplificados. Teniendo en cuenta que se encontraron 8 polimorfismos de SNP aparte de los InDels, se puede inferir que ambos “grupos” se diferenciaron hace tiempo, pero sin realizarse estudios más detallados no es posible hacer las estimaciones apropiadas. También debe estudiarse más profundamente el hecho de que estos grupos no presenten una estructuración geográfica, al menos no según el escenario poblacional planteado por diferentes autores para la especie (e.g. D'Anatro et al. 2011; D'Anatro & Lessa 2011).

A pesar de ser regiones no codificantes los intrones cumplen diversas funciones cruciales en los organismos eucariotas, como participar en el splicing alternativo y en la regulación de la expresión genética en muchos niveles (Chorev & Carmel 2012). Se ha reportado una correlación negativa entre el largo de los intrones y la frecuencia de recombinación en algunos grupos, asociada a un aumento de la fuerza de la selección natural cuando aumenta la frecuencia de recombinación (Comeron & Kreitman 2002; Schaeffer 2002), aunque hay excepciones (Hong et al. 2009). También se ha reportado un menor tamaño en los intrones en los genes de alta expresión y se ha propuesto que la selección natural actuaría en contra de los intrones largos en estos genes debido al aumento de los costos de la transcripción (Chorev & Carmel 2012). Por otra

parte, se ha propuesto que el largo de algunos intrones sería un mecanismo de regulación, ya que incrementarían los tiempos de transcripción de forma considerable debido a su tamaño (Swinburne & Silver 2008). Sin embargo, no debe olvidarse que la diferencia total entre los intrones de los grupos de haplotipos es de 3 pb mientras que los intrones en los que se ha demostrado su efecto tienen miles de pb (Chorev & Carmel 2012; Swinburne et al. 2008; Swinburne & Silver 2008) por lo que es poco probable que de tener un efecto diferencial en la expresión del gen AQP3a sea mediante este mecanismo. Por el mismo motivo es altamente improbable que el costo de transcribir 3 pb extra sea suficiente como para causar una presión selectiva medible entre ambos grupos de haplotipos. Sin duda se requieren estudios más profundos para comprender en profundidad la significancia biológica de estas variantes.

Conclusión y Perspectivas

Aunque no se pudo cumplir totalmente con los objetivos de este estudio, las secuencias obtenidas serán de ayuda para continuar esta línea de investigación ya que brindan un buen punto de partida para el diseño de primers específicos del gen AQP-3a. Además de esto, otro aporte significativo al disponer de estos primers específicos, es que abren la puerta a obtener la secuencia completa de este gen en *M. furnieri* y otros Sciaenidae, ampliando el reducido conjunto de secuencias de acuaporinas disponibles para teleósteos, algo necesario para realizar estudios profundos de diversa índole que involucren a las acuaporinas de teleósteos, desde análisis evolutivos de la historia de este ortólogo dentro del grupo, hasta estudios de los mecanismos de regulación génica de la AQP-3a.

Para finalizar, dados los problemas que afrontan las pesquerías a nivel mundial, es imprescindible ampliar nuestro conocimiento sobre la estructura poblacional de las especies sometidas a una fuerte explotación como es la corvina rubia, así como los factores que la determinan. Solo con un mayor entendimiento de la biología de estas

especies se podrán diseñar planes de manejo que permitan una explotación sostenible en el tiempo.

5.- Bibliografía

Acuña, A., J. Verocai, et al. (1992). "Aspectos biológicos de *Micropogonias furnieri* (Desmarest 1823) durante dos zafas en una pesquería artesanal al oeste de Montevideo." *Revista de Biología Marina* 27: 113-132.

Agre, P., L.S. King, et al. (2002). "Aquaporin water channels-from atomic structure to clinical medicine." *Journal of Physiology* 542: 3-16.

Amores, A., A. Force, et al. (1998). "Zebrafish hox Clusters and Vertebrate Genome Evolution." *Science* 282: 1711-1714.

Bandelt, H.J., P. Forster, et al. (1991). "Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies." *Molecular Biology and Evolution* 16(1): 37-48.

Beck, M.W., J. Heck, et al. (2001). "The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates." *BioScience* 51(8): 633-641.

Benson, D.A., I. Karsch-Mizrachi, et al. (2002). "GeneBank." *Nucleic Acids Research* 30(1): 17-20.

Castello, J. (1986). "Distribución, crecimiento y maduración sexual de la corvina juvenil (*Micropogonias furnieri*) en el estuario de la 'Lagoa dos Patos', Brasil." *Physis* 44: 21-36.

Cerdà, J. & R. N. Finn (2010). "Piscine aquaporins: an overview of recent advances." *Journal of Experimental Zoology* 313A: 623-650.

Christoffels A., E.G.L Koh, et al.(2004). "Fugugenome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes." *Molecular Biology and Evolution* 21: 1146-1151.

Comeron, J.M. & M. Kreitman (2002). "Population, evolutionary and genomic consequences of interference selection." *Genetics* 161: 389-410.

Cotrina, C. (1986). "Estudios biológicos sobre peces costeros con datos de dos campañas de investigación realizadas en 1981. II. La corvina rubia (*Micropogoniasfurnieri*)." Publicación de la Comisión Técnica Mixta del Frente Marítimo 1: 8-14.

Crawford, D., T. Bhangale, et al. (2004). "Evidence for substantial re-scale variation in recombination rates across the human genome." *Nature Genetics* 36: 700-706.

Cutler, C. P., A. S. Martinez, et al. (2007). "The role of aquaporin 3 in teleost fish Comparative Biochemistry and Physiology." *Molecular & Integrative Physiology* 148(Part A): 82-91.

Chorev, M. & L. Carmel (2012). "The function of introns." *Frontiers in Genetics* 3: 55.

D'Anatro, A. (2011). "Estructura poblacional, caracterización morfológica y análisis trófico de *Micropogoniasfurnieri* Desmarest 1823 (Perciformes: Sciaenidae) en el Río de la Plata y su Frente Marítimo." Montevideo, Universidad de la República: 119.

D'Anatro, A. & E. P. Lessa (2011). "Phenotypic and genetic variation in the white croaker *Micropogoniasfurnieri* Desmarest 1823 (Perciformes: Sciaenidae): testing the relative roles of genetic drift and natural selection on population divergence." *Journal of Zoology* 285: 139-149.

D'Anatro, A., D.E. Naya, et al. (2013). "Contrasting patterns of morphological variation with dietary preferences in *Micropogoniasfurnieri*: insights from stable isotopes and

digestive traits analyzes." *Journal of Fish Biology*. 82: 1641-1658.

D'Anatro, A., A.N. Pereira, et al. (2011). "Genetic structure of the white croaker, *Micropogonias furnieri* Desmarest 1823 (Perciformes: Sciaenidae) along Uruguayan coasts: contrasting marine, estuarine, and lacustrine populations." *Environmental Biology of Fishes* 91: 407-420.

Don, R.H., P.T. Cox, et al. (1991). "'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification." *Nucleic Acids Research* 19(14): 4008.

Evans D.H. (2008). "Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys." *American Journal of Physiology* 295.

Excoffier, L. & H.E.L. Lischer (2010). "Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows." *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

Figuerola, D. & J. Díaz de Astarloa (1991). "Análisis de los caracteres morfométricos y merísticos de la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) entre los 33°S y 40°S (Pisces, Sciaenidae)." *Atlántica* 13: 8-14.

Filatov, D.A. (2009). "Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software." *Bioinformatics* 25(23): 3189-3190.

Fu, Y.X. (1997). "Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection." *Genetics* 147: 915-925.

Guerrero, R.A., E.M.Acha, et al. (1997). "Physical oceanography of the Río de la Plata estuary, Argentina." *Continental Shelf Research* 17: 727-742

Gish W.&D.J. States(1993) "Identification of protein coding regions by database similarity search." *Nature Genetics* 3(3): 266-72.

Hong, L., G. Liu, et al. (2009). "Correlations between recombination rate and intron distributions along chromosomes of *C. elegans*." *Progress in Natural Science*.

Houde, E.D. & E.S. Rutherford (1993). "Recent trends in estuarine fisheries: Predictions of fish production and yield." *Estuaries* 16(2): 161-176.

Isaac, V. J. (1988). "Synopsis of biological data on the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823)." *FAO Fisheries Synopsis* 150: 35.

Jaillon, O., J.M.Aury, et al. (2004). "Genome duplication in the teleost fish *Tetraodon nigroviridis* reveals the early vertebrate proto-karyotype." *Nature* 431: 946-957.

Karl S.A. & J.C. Avise. (1992). "Balancing selection at allozyme loci in Oysters: Implications from nuclear RFLPs." *Science* 256: 100-102.

Levy, J., M. Maggioni, et al. (1998). "Close genetic similarity among populations of the white croaker *Micropogonias furnieri* in the south and south-eastern Brazilian coast. I. Allozyme studies." *Fisheries Research* 39: 87-94.

Li, N. & M. Stephens (2003). "Modelling linkage disequilibrium, and identifying recombination hotspots using snp data." *Genetics* 165: 2213-2233.

Librado, P. & J. Rozas (2009). "DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data." *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Lignot, J. H., C.P. Cutler, et al. (2002). "Immunolocalisation of aquaporin 3 in the gill and the gastrointestinal tract of the European eel *Anguilla anguilla*." *The Journal of experimental biology* 205: 2653-2663.

Litman, T., R. Søgaard, et al. (2009). "Ammonia and urea permeability of mammalian aquaporins." In: E. Beitz (ed.) Handbook of experimental pharmacology, Springer, Berlin.

Maggioni, R., A. Pereira, et al. (1994). "Estudio preliminar de la estructura genética de la corvina *Micropogonias furnieri* entre Rio Grande (Brasil) y el Rincón (Argentina)." Frente Marítimo 15: 127-131.

McDonald, J.H. & M. Kreitman (1991). "Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*." Nature. 351:652-653.

Morgulis A., G. Coulouris et al. (2008) "Database indexing for production MegaBLAST searches." Bioinformatics 15:1757-1764.

Miller, S., D. Dikes, et al. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA for human nucleated cells." Nucleic Acids Research 16: 1215.

Opazo J.C., G.T. Butts, et al. (2012). "Whole-genome duplication and the functional diversification of teleost fish hemoglobins." Molecular Biology and Evolution 30: 140-153.

Pereira, A. (1990). "Estudio de la variación genética en la corvina blanca *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) del Río de La Plata y su frente oceánico." Montevideo, Universidad de la República.

Pereira, A. N., A. Marquez, et al. (2009). "Genetic evidence of two stocks of the whitemouth croaker *Micropogonias furnieri* in the Rio de la Plata and oceanic front in Uruguay." Journal of Fish Biology 75: 321-331.

Piccolo, M. & G. Perillo (1997). "Geomorfología e hidrografía de los estuarios. El Mar Argentino y sus recursos pesqueros: Antecedentes históricos de las exploraciones en

el mar y las características ambientales." E. Boschi. Mar del Plata, Secretaría de Agricultura, Ganadería , Pesca y Alimentación. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero. 1: 133-161.

Rogers, A.R. & H. Harpending (1992). "Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences." *Molecular Biology and Evolution* 9(3):552-569.

Ross, S. (1988). "Age, growth and mortality of the atlantic croaker in north Carolina, with comments on population dynamics." *Transactions of the American Fisheries Society* 117: 461-473.

Schaeffer, S.W. (2002). "Molecular population genetics of sequence length diversity in the Adh region of *Drosophila pseudoobscura*." *Genetics Research* 80: 163-175.

Stephens, M. & P. Scheet (2005). "Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing data imputation." *American Journal of Human Genetics* 76: 449-462.

Stephens, M., M. Smith, et al. (2001). "A new statistical method for haplotype reconstruction from population data." *American Journal of Human Genetics* 68: 978-989.

Sunnucks, P. (2000). "Efficient genetic markers for population biology." *TREE* 15: 199-203.

Swinburne, I.A., D.G. Miguez, et al. (2008). "Intron length increases oscillatory periods of gene expression in animal cells." *Genes & Development* 22: 2342-2346.

Swinburne I.A., P.A. Silver. (2008). "Intron delays and transcriptional timing during development." *Developmental Cell* 14: 324-330.

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

Taylor J.S., I. Braasch, et al. (2003). "Genome duplication, a trait shared by 22,000 species of ray-finned fish." *Genome Research* 13: 382–390

Tingaud-Sequeira, A., M. Calusinska, et al. (2010). "The zebrafish genome encodes the largest vertebrate repertoire of functional aquaporins with dual paralogy and substrate specificities similar to mammals." *BMC Evolutionary Biology* 10: 38.

Vazzoler, A. (1971). "Diversificação fisiológica e morfológica de *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) ao sul de Cabo Frío, Brasil." *Boletim do Instituto Oceanográfico* 20: 1-70.

Vazzoler, A. (1991). "Síntese de conhecimentos sobre a biologia da corvina, *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823), da costa do Brasil." *Atlântica* 13: 55-74.

Vizziano, D., F. Forni, et al. (2002). "Reproduction of *Micropogonias furnieri* in a shallow temperate coastal lagoon in southern Atlantic." *Journal of Fish Biology* 61: 196-206.

Whitfield, A. K. (1999). "Ichthyofaunal assemblages in estuaries: A South African case study." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9: 151-186.