

Baja diferenciación genética entre poblaciones de sardina, *Sardinella aurita*, del oriente venezolano

Low genetic differentiation among sardine populations, *Sardinella aurita*, from eastern Venezuela

Marcos De Donato^{1*}
Isabel Mimbela de Loroño²
Isidra Ramírez³
Baumar Marín⁴

¹ Laboratorio de Genética Molecular, Departamento de Biomedicina, IIBCA

² Departamento de Biología, Escuela de Ciencias

³ Departamento de Biología Marina, IOV

⁴ Departamento de Biología Pesquera, IOV
Universidad de Oriente

Cerro del Medio, Cumaná, Venezuela

* E-mail: marcosdedonato@yahoo.com

Recibido en febrero de 2005; aceptado en mayo de 2005

Resumen

Debido a la gran importancia de *Sardinella aurita* como recurso pesquero de la región del Caribe, se estudió la diferenciación genética entre las poblaciones de Mochima, Golfo de Cariaco y Morro de Puerto Santo, en el oriente de Venezuela, y se compararon los niveles de variación y subdivisión poblacional con las poblaciones del Mediterráneo y la costa Atlántica de África, anteriormente reportadas. Para esto, se obtuvieron 15 individuos de cada una de tres poblaciones, utilizando una muestra de músculo para extraer el ADN total. Se amplificó un fragmento que incluye la región de control del ADN mitocondrial y se determinaron los patrones de restricción por medio del análisis por RFLP con las enzimas *Taq* I, *Eco* RI, *Hae* III y *Alu* I. La amplificación de esta región produjo un fragmento de aproximadamente 1000 bp o, rara vez, uno de 1100 pb. El análisis de RFLP demostró la presencia de sólo un haplotipo con las dos variantes de tamaño. El F_{ST} resultante del análisis de las diferencias entre poblaciones venezolanas fue menor de 0.06 y el AMOVA demostró que no existían diferencias significativas entre ellas. Estos resultados concuerdan con la presencia de poca diferenciación genética entre estas poblaciones, por lo que no se puede descartar la presencia de una población panmíctica en esta región. Una comparación de las poblaciones venezolanas con las poblaciones del Mediterráneo y África, reportadas con anterioridad, produjeron valores de F_{ST} muy bajos entre las venezolanas y las del Mediterráneo, mientras que las comparaciones entre las de Mauritania, Senegal, Costa de Marfil y Ghana produjeron valores de F_{ST} diez veces mayores.

Palabras clave: PCR-RFLP, ADN mitocondrial, genética de poblaciones, Clupeidae.

Abstract

In view of the great importance of *Sardinella aurita* as a fisheries resource in the Caribbean region, we studied the genetic differentiation among the populations from Mochima, Gulf of Cariaco and Morro de Puerto Santo, eastern Venezuela, and compared the levels of variation and population subdivision with populations from the Mediterranean and Atlantic coast of Africa (previously reported). For this, we extracted DNA from 15 muscle samples for each population. A fragment containing the control region of the mitochondrial DNA was amplified and the restriction patterns were determined using restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis with the enzymes *Taq* I, *Eco* RI, *Hae* III and *Alu* I. The amplification of this region produced a fragment approximately 1000 bp long or, rarely, one of approximately 1100 bp long. No further difference was found through the RFLP analysis. The comparison of the Venezuelan populations produced F_{ST} values under 0.06 and the analysis of molecular variance showed no significant differences between them. This is an indication of very low genetic differentiation among these populations, so it is not possible to discard the presence of a panmictic population in this region. The comparison of the Venezuelan and Mediterranean populations produced very low F_{ST} values, while the comparison of the former with African populations from Mauritania, Senegal, Ivory Coast and Ghana produced F_{ST} values ten times larger.

Key words: PCR-RFLP, mitochondrial DNA, population genetics, Clupeidae.

Introducción

La distribución de *Sardinella aurita* Valenciennes, se extiende desde Massachusetts, a través del Golfo de México y el Mar Caribe, hasta el sur de Río de Janeiro (Fischer, 1978; Whitehead, 1985), en el continente americano, y desde el Mediterráneo hasta el sur de Angola, en la costa este del Atlántico. La pesca de esta sardina se desarrolla mayormente en la costa oeste del África subsahariana, en el Mediterráneo y en las costas de Venezuela oriental y sur de Brasil, con capturas de más de 480 000 t anuales (FAO, 2002). La pesca tiene particular relevancia en la socioeconomía de las regiones donde se tiene una alta producción, tanto por el beneficio económico que significan los volúmenes de captura, como por representar una fuente muy barata de proteínas para la población (Freon *et al.*, 1997).

Estudios de determinación de la variación genética en especies de sardina, a través del análisis del polimorfismo protéico, han encontrado una muy baja variabilidad poblacional y escasa diferenciación genética (Fujio y Kato, 1979; Hedgecock *et al.*, 1989; Wilson y Alberdi, 1991; Kinsey *et al.*, 1994; Meneses 1994; Chikhi *et al.*, 1998). Esto puede estar afectado en parte por los altos niveles de monomorfismo de las distintas proteínas estudiadas, lo que pudiera disminuir considerablemente la probabilidad de detectar diferenciación genética por esta técnica, especialmente cuando el monomorfismo es producido por selección.

Desde hace mucho se viene argumentando que, en ocasiones, el polimorfismo de alozimas no detecta la variación genética existente entre poblaciones naturales subdivididas. Hoy en día, con la utilización de métodos moleculares más modernos, que son más sensibles al polimorfismo genético (como por ejemplo el ADN mitocondrial), es posible obtener más información de los análisis y de esta forma aumentar la probabilidad de detectar diferencias genéticas entre subpoblaciones divididas y/o especies similares, especialmente si se usan marcadores genéticos neutrales. Por ejemplo, Chikhi *et al.* (1997) encontraron un nivel de magnitud mayor en la variabilidad genética de poblaciones de *S. aurita* de las costas Atlánticas de África utilizando análisis de RFLP (Polimorfismo de Longitud por Restricción de Fragmentos) del ADN mitocondrial comparado con lo encontrado para el análisis de alozimas reportado por ellos mismos (Chikhi *et al.*, 1998).

Por su parte Kinsey *et al.* (1994) encontraron también un bajo nivel de variación alozímica en poblaciones de *S. aurita* de las costas Atlánticas de Carolina del Sur y Florida y del Golfo de México, lo cual no se correlacionó con la variación morfométrica y merística encontrada. Debido a la gran importancia que tiene la pesquería de este recurso natural para las regiones donde es abundante, se planteó este trabajo con el fin de estudiar la diferenciación genética entre las poblaciones de *S. aurita* del oriente de Venezuela y comparar los niveles de variación y subdivisión poblacional con las poblaciones del Mediterráneo y las costas Atlánticas de África.

Introduction

The distribution of *Sardinella aurita* Valenciennes extends along the American continent, from Massachusetts, through the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea, to the south of Rio de Janeiro (Fischer, 1978; Whitehead, 1985), and from the Mediterranean Sea to southern Angola, on the Atlantic coast of Africa. Sardine fisheries are mainly conducted on the west coast of Sub-Saharan Africa, the Mediterranean, eastern Venezuela and southern Brazil, with annual catches over 480 000 tons (FAO, 2002). The fisheries play an important role in the socioeconomy of the high-production regions, both because of the economic benefits resulting from the catch volumes and because sardines represent a low-cost protein source for the population (Freon *et al.*, 1997).

Studies on the determination of genetic variation in sardine species, through the analysis of protein polymorphism, have found very low genetic variability and poor genetic differentiation (Fujio and Kato, 1979; Hedgecock *et al.*, 1989; Wilson and Alberdi, 1991; Kinsey *et al.*, 1994; Meneses 1994; Chikhi *et al.*, 1998). This phenomenon can be affected, in part, by the high levels of monomorphism of the proteins studied, which could considerably reduce the chance of detecting genetic differentiation using this technique, especially when the monomorphism is produced by selection.

It has been argued for some time now that there are instances when the allozymic polymorphism cannot detect the genetic variation among natural, subdivided populations. Nowadays, through the use of more advanced molecular methods, which are more sensitive to genetic polymorphism (such as mitochondrial DNA), it is possible to generate more information from the analyses and thus increase the chance of detecting genetic differences among subdivided populations and/or similar species, especially when neutral genetic markers are used. For example, Chikhi *et al.* (1997) found greater genetic variability in *S. aurita* populations from the Atlantic coast of Africa, based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) analyses of mitochondrial DNA, compared with that found in the allozymic analysis reported by this same group (Chikhi *et al.*, 1998).

Kinsey *et al.* (1994) also recorded a low level of allozymic variability in populations of *S. aurita* from the Atlantic coast of South Carolina and Florida and the Gulf of Mexico, which did not correlate with the morphometric and meristic variation found. In view of the great importance of the fisheries of this natural resource for the regions where it is abundant, we studied the genetic differentiation among *S. aurita* populations from eastern Venezuela and compared their level of variation and population subdivision with those from the Mediterranean and Atlantic coast of Africa.

Materials and methods

Samples of *S. aurita* were obtained from three areas in eastern Venezuela (fig. 1): Tocuchare (Gulf of Cariaco), Santa Fe (Mochima National Park), and Morro de Puerto Santo. At

Materiales y métodos

Se obtuvieron un total de 45 muestras de *S. aurita*, directamente de los pescadores y justo después de su captura, provenientes de tres áreas (fig. 1): Tocuchare (Golfo de Cariaco), Santa Fe (Parque Nacional Mochima) y Morro de Puerto Santo. De cada sardina se tomó una muestra de músculo blanco de 100 a 200 mg, aproximadamente, con navajas estériles. El ADN fue extraído usando el kit de extracción de ADN Wizard Genomic (Promega Corp., Madison, WI, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con modificaciones menores. En síntesis, el tejido fue homogeneizado con 600 μL de lisante de núcleos-EDTA, añadiendo Proteinasa K (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Boehringer Mannheim, IN, USA) e incubado por 3 h a 55°C. Se añadieron 200 μL de solución precipitante de proteínas y se agitó por 20 s. El precipitado de proteínas fue eliminado por centrifugación y el ADN precipitado con isopropanol. El ADN fue luego lavado con etanol al 70%, secado y resuspendido con buffer Tris-EDTA. El ADN total fue corrido electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% y diluido a una concentración de aproximadamente 50 a 100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue llevada a cabo para amplificar un segmento variable de la región de control (el asa D o *D-loop* en inglés) del ADN mitocondrial, usando los oligonucleótidos siguientes como iniciadores (Chikhi *et al.*, 1997):

HN20: 5'-GTG TTA TGC TTT AGT TAA GC-3'
LN20: 5'-ACC ACT AGC ACC CAA AGC TA-3'

La amplificación se realizó en un volumen de 100 μL usando 2 μL de ADN diluido (alrededor de 100 ng), 1 U de *Taq* polimerasa (Promega Corp., Madison, WI, USA), buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% (v/v) Triton X-100), 200 nM de cada primer, 200 μM de cada desoxirribonucleótido (dNTP), 1.5 mM de MgCl_2 . Para el protocolo de amplificación se realizó una desnaturalización del ADN a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de los pasos de desnaturalización, apareamiento de los iniciadores y síntesis del ADN a 94°C por 45 s, 50°C por 60 s y 72°C por 60 s, respectivamente. Se realizó un paso de extensión final a 72°C por 10 min. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis usando un gel de agarosa al 2% y se visualizaron con bromuro de etidio (0.1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$) bajo un transiluminador. Los tamaños de los fragmentos fueron estimados comparándolos con los tamaños de los fragmentos del patrón de peso molecular de 100 pares de bases (Promega Corp., Madison, WI, USA).

Los productos amplificados fueron precipitados usando 100 μL de isopropanol, lavados con etanol al 70%, secados y resuspendidos en agua desionizada estéril. Éstos fueron luego digeridos con las enzimas de restricción *Taq* I, *Eco* RI, *Hae* III y *Alu* I, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega Corp., Madison, WI, USA), con el fin de producir los patrones del Polimorfismo de Longitud por Restricción de Fragmentos (RFLP). Las enzimas se incubaron con el ADN

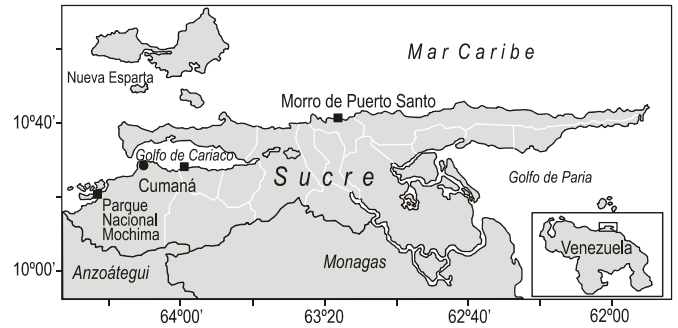


Figura 1. Zonas del estado Sucre (Venezuela) donde fueron recolectadas las muestras de sardina (■), *Sardinella aurita*, utilizadas en este estudio.

Figure 1. Zones in Sucre State (Venezuela) from where the sardine samples (■), *Sardinella aurita*, used in this study were collected.

each locality, 15 specimens were obtained directly from the fishermen right after being caught. A sample of white muscle tissue of approximately 100–200 mg was taken from each sardine using sterilized razor blades. DNA was extracted using the Wizard Genomic DNA extraction kit (Promega Corp., Madison, WI, USA), following the manufacturer's directions with minor modifications. Briefly, the tissue was homogenized with 600 μL of EDTA nucleus lysis solution, adding Proteinase K (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, Boehringer Mannheim, IN, USA), and incubated for 3 h at 55°C; 200 μL of protein precipitation solution was added and vortexed for 20 s. Protein pellet was eliminated by centrifugation and the DNA was precipitated with isopropanol. The DNA was washed with 70% ethanol, dried and hydrated with Tris-EDTA buffer. Total DNA was run electrophoretically on a 1% agarose gel and diluted to approximately 50–100 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Polymerase chain reaction (PCR) was carried out to amplify a variable segment of the control region (D-loop) of the mitochondrial DNA, using the following primers (Chikhi *et al.*, 1997):

HN20: 5'-GTG TTA TGC TTT AGT TAA GC-3'
LN20: 5'-ACC ACT AGC ACC CAA AGC TA-3'

Amplification was carried out in a volume of 100 μL , using 2 μL of diluted DNA (about 100 ng), 1 U of *Taq* polymerase (Promega Corp., Madison, WI, USA), *Taq* polymerase buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% (v/v) Triton X-100), 200 nM of each primer, 200 μM of each deoxynucleotide (dNTP), and 1.5 mM MgCl_2 . For the amplification protocol, an initial denaturation at 94°C for 5 min was followed by 35 cycles of denaturation, annealing and extension steps, at 94°C for 45 s, 50°C for 60 s and 72°C for 60 s, respectively. A final extension at 72°C for 10 min was carried out. The amplification products were separated by electrophoresis using 2% agarose gels and visualized with ethidium bromide. Their size was estimated comparing the distance of the fragments with a molecular weight standard of 100 base pairs (bp) (Promega Corp., Madison, WI, USA).

amplificado a 37°C para todos los casos, excepto para *Taq* I que trabaja en forma óptima a los 65°C, durante 4 h. Los patrones de restricción fueron generados al correr los fragmentos resultantes en geles de agarosa al 3%, visualizados con bromuro de etidio (0.1 µg µL⁻¹), bajo un transiluminador, y los tamaños de las bandas fueron estimados comparándolas con el patrón de peso molecular de 100 pb. Los patrones de digestión y los haplotipos fueron designados según los descritos por Chikhi *et al.* (1997), con el fin de facilitar la comparación.

El análisis de la estructura genética de las poblaciones estudiadas fue realizado a través del cálculo del estadístico de F_{ST} , de acuerdo con la metodología de Weir y Cockerham (1984) y Michalakis y Excoffier (1996). El análisis de varianza molecular (AMOVA) descrito por Excoffier *et al.* (1992), calculado a través del programa Arlequín (Schneider *et al.*, 2000), fue empleado para determinar si los índices entre dos poblaciones eran significativamente diferentes ($P < 0.05$). Con el fin de comparar la distancia genética entre las poblaciones venezolanas con las poblaciones estudiadas por Chikhi *et al.* (1997), se utilizaron las frecuencias de los haplotipos de ese reporte para calcular los valores de F_{ST} entre pares de poblaciones y realizar la prueba del AMOVA.

Resultados y discusión

La amplificación de las muestras produjo dos tipos de fragmentos, uno con un tamaño de aproximadamente 1000 pb y otro de aproximadamente 1100 pb (fig. 2, tabla 1). Los patrones de restricción encontrados fueron iguales para todas las muestras, con excepción de la presencia de un segmento de 100 pb en alguna de las bandas para los fragmentos de 1100 pb. Así, la enzima *Taq* I cortó al fragmento amplificado en tres

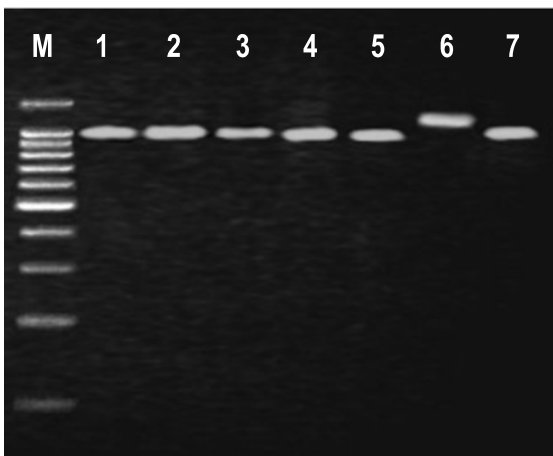


Figura 2. Fragmentos amplificados por PCR de la región de control mitocondrial de sardinas provenientes del Golfo de Cariaco (Venezuela), donde se observan los fragmentos de 1000 y 1100 pares de bases. M: marcador de peso molecular de 100 pb.

Figure 2. PCR amplified fragments of the mitochondrial control region of sardines from the Gulf of Cariaco (Venezuela), where the 1000 and 1100 bp fragments can be observed. M: 100 bp molecular weight standard.

The amplified products were precipitated using 100 µL of isopropanol, washed with 70% ethanol and resuspended in 20 µL of deionized, sterile water. They were then used for the digestion with the restriction enzymes *Taq* I, *Eco* RI, *Hae* III and *Alu* I, according to the manufacturer (Promega Corp., Madison, WI, USA), in order to produce the fragment-length polymorphic patterns. The enzymes were incubated with the amplified DNA at 37°C in all cases, except for *Taq* I whose optimal temperature is 65°C, during 4 h. The restriction patterns were generated running the resulting fragments in 3% agarose gels stained with ethidium bromide (0.1 µg µL⁻¹) and visualized under a UV transilluminator, and the size of the bands was estimated by comparison with the 100-bp molecular weight standard. The restriction patterns and haplotypes were named after those described by Chikhi *et al.* (1997), in order to facilitate the comparison.

The analysis of the genetic structure of the populations was carried out through the calculation of the F_{ST} statistic, according to the methods established by Weir and Cockerham (1984) and Michalakis and Excoffier (1996). The analysis of molecular variance (AMOVA), described by Excoffier *et al.* (1992) and calculated using the Arlequin software (Schneider *et al.* 2000), was used to determine whether the indexes of two populations were significantly different ($P < 0.05$). To be able to compare the genetic distances among the Venezuelan populations and those studied by Chikhi *et al.* (1997), we used the haplotypic frequencies reported by the latter to calculate the F_{ST} values between population pairs and for the AMOVA test.

Tabla 1. Patrones electroforéticos de los fragmentos estudiados de 1000 y 1100 pb (exponente), al ser cortados con las enzimas de restricción. Los números representan tamaños aproximados de los fragmentos en pares de bases de acuerdo al marcador de peso molecular de 100 bp.

Table 1. Electrophoretic patterns of the fragments of 1000 and 1100 bp (exponent) studied, after cutting with restriction enzymes. The numbers represent the approximate sizes of the fragments in base pairs according to the 100 bp molecular weight standard.

<i>Taq</i> I		<i>Eco</i> RI		<i>Hae</i> III		<i>Alu</i> I	
B ¹⁰⁰⁰	B ¹¹⁰⁰	B ¹⁰⁰⁰	B ¹¹⁰⁰	B ¹⁰⁰⁰	B ¹¹⁰⁰	B ¹⁰⁰⁰	B ¹¹⁰⁰
						700	700
			625				
		525			600		
				500*	500		
		475	475				
	420						400
320*	320						
						300	
260	260						
100	100						

* Fragmentos dobles.

Tabla 2. Frecuencia de los haplotipos encontrados a partir de las muestras de las poblaciones venezolanas. Se analizaron 15 muestras por población.
Table 2. Frequency of the haplotypes found in the Venezuelan samples. Fifteen samples per population were analyzed.

Haplotipo	Golfo de Cariaco	Parque Nacional Mochima	Morro de Puerto Santo
BBAB ¹⁰⁰⁰	13	12	11
BBAB ¹¹⁰⁰	2	3	4

sitios distintos, produciendo dos fragmentos de 320 pb, además de fragmentos de 260 y 100 pb; mientras que las enzimas *Eco* RI, *Hae* III y *Alu* I cortaron el fragmento en un sitio. El fragmento mayor se observó en menor proporción que el de 1000 pb, siendo más frecuente para la población de sardinas del Morro de Puerto Santo, que para las muestras de las otras poblaciones (tabla 2).

El análisis de las diferencias entre poblaciones del oriente venezolano produjo valores de F_{ST} aproximadamente de cero y AMOVAs no significativos (tabla 3), lo cual es indicativo de poca diferenciación genética entre estas poblaciones. Esto es muy similar a los valores medios de $F_{ST} = 0.050$ encontrados para las poblaciones africanas (Chicki *et al.*, 1997) y ligeramente mayor al valor de las poblaciones del Mediterráneo de -0.091 (lo cual es matemáticamente cero), cuyas poblaciones en cada grupo estaban separadas por una distancia mayor a la existente entre las poblaciones venezolanas. Esta baja variación genética regional no nos permite concluir que las poblaciones del oriente venezolano sean stocks separados, pudiendo indicar la presencia de una población panmíctica, lo cual se explicaría por el carácter pelágico de la especie y su capacidad de movimiento en una zona geográfica no muy extensa.

La comparación de las poblaciones venezolanas con las estudiadas por Chicki *et al.* (1997) produjo valores de F_{ST} muy bajos entre las poblaciones venezolanas y las de Francia y Argelia (Mediterráneo), mientras que las comparaciones con las poblaciones de Mauritania, Senegal, Costa de Marfil y Ghana produjeron valores de F_{ST} con un orden de magnitud mayor (tabla 4). Esto implica que las poblaciones del Mediterráneo son genéticamente más similares a las de

Tabla 3. Valores de F_{ST} (encima de la diagonal) y valor P del AMOVA (debajo de la diagonal) entre las poblaciones de Venezuela.

Table 3. F_{ST} values (above the diagonal) and the AMOVA P value (below the diagonal) for the Venezuelan populations.

Población	Golfo de Cariaco	Parque Nacional Mochima	Morro de Puerto Santo
Golfo de Cariaco	---	-0.05442	-0.01351
Parque Nacional Mochima	0.99967	---	-0.05820
Morro de Puerto Santo	0.65950	0.99967	---

Results and discussion

The amplification of the samples produced two types of fragments, one with an approximate size of 1000 bp and the other of approximately 1100 bp (fig. 2, table 1). The restriction patterns found were the same for all the samples in all the populations, except for the presence of the 100-bp insert. The enzyme *Taq* I cut the amplified fragment in three different places, producing two 320-bp fragments, as well as fragments of 260 and 100 bp. The enzymes *Eco* RI, *Hae* III and *Alu* I cut the amplified fragment in just one place. The 1100-bp fragment was found to be less frequent than the smaller fragment, being more frequent in the Morro de Puerto Santo population than in the others (table 2).

The analysis of the differences among the Venezuelan populations produced F_{ST} values under 0.06 and nonsignificant AMOVA tests (table 3), which is an indication of low genetic differentiation among these populations. These values are similar to the average F_{ST} values of 0.050 reported for African populations (Chikhi *et al.*, 1997) and slightly higher than those of -0.091 (which is mathematically zero) for the Mediterranean populations; these populations are separated by a larger distance than that separating the Venezuelan populations. The low genetic variation found in this region cannot allow us to conclude that the populations of eastern Venezuela are separate stocks, suggesting the presence of a panmictic population, which would be explained by the pelagic character of this species and its movement capacity within a not very large geographic area.

The comparison of the Venezuelan populations with those studied by Chikhi *et al.* (1997) produced very low F_{ST} values between the former and those from France and Algeria (Mediterranean), while the F_{ST} values between the populations from Venezuela and those from Mauritania, Senegal, Ivory Coast and Ghana were ten times higher (table 4). This implies that the Mediterranean populations are genetically more similar to those from Venezuela than to those from Sub-Saharan Africa, indicating the occurrence of a speciation process that would separate the African populations from the rest. Furthermore, the similarity observed between the Venezuelan and

Tabla 4. Valores de F_{ST} entre las poblaciones de Venezuela, África y el Mediterráneo, según los datos de Chikhi *et al.* (1997).

Table 4. F_{ST} values among the populations from Venezuela, Africa and the Mediterranean, according to Chikhi *et al.*'s (1997) data.

Población	Venezuela
Francia	0.05263 ^{NS}
Argelia	0.02928 ^{NS}
Mauritania	0.64192 ^{***}
Senegal	0.54165 ^{***}
Costa de Marfil	0.52756 ^{***}
Ghana	0.59426 ^{***}

Venezuela que las de las costas de África subsahariana, sugiriendo un proceso de especiación que debe estar operando para separar las poblaciones africanas del resto. Además, la similitud observada entre las poblaciones de Venezuela y el Mediterráneo sugiere la presencia de un flujo de genes importante, pero que tendría que pasar por las Islas Azores y el norte de Estados Unidos y el Caribe. Una explicación alternativa podría ser que el fragmento amplificado y el sistema de enzimas utilizado no es capaz de revelar las diferencias genéticas que existen entre las poblaciones de Venezuela y el Mediterráneo. Con el fin de continuar el estudio de la dinámica de los procesos genéticos entre estas poblaciones, nuestro grupo adelanta investigaciones en las que se comparan secuencias del fragmento de la región de control del ADN mitocondrial y de genes nucleares de las poblaciones de Venezuela, el Mediterráneo y África.

Nuestros análisis de RFLP mitocondriales no concuerdan con los reportados por Chicki *et al.* (1998), quienes estudiaron las poblaciones de *S. aurita* de Venezuela (Isla de Margarita), Costa de Marfil, Ghana y Congo, por medio de electroforesis de proteínas. Estos investigadores reportaron una muy baja variabilidad genética (diversidad alozímica, $H = 0.011$) a pesar de la gran extensión geográfica existente entre las muestras analizadas, donde se observa que 3 de 25 loci fueron polimórficos. Aquí, el valor medio de F_{ST} fue de 0.006; es decir, no encontraron diferencias genéticas significativas entre las poblaciones de Venezuela y Costa de Marfil, Ghana y Congo, mientras que nuestra comparación produjo un valor promedio de $F_{ST} = 0.576$ entre las poblaciones de Venezuela y africanas. Por otro lado, en ese estudio, los valores medios de F_{ST} entre las poblaciones africanas mostraron un promedio de 0.003, mientras que en el estudio del mismo grupo (Chicki *et al.*, 1997) en el que utilizaron ADN mitocondrial para caracterizar las poblaciones de Mauritania, Senegal, Costa de Marfil y Ghana, éstos promediaron 0.050 (más de 10 veces mayor).

Con anterioridad se han reportado bajos niveles de diferenciación genética, usando electroforesis de proteínas, entre grupos de sardina de *S. aurita* provenientes de lugares distantes entre sí. Kinsey *et al.* (1994) estudiaron poblaciones de la costa de Carolina del Sur y las costas Atlántica y del Golfo de México de Florida, encontrando muy baja variabilidad de alozimas y ninguna diferenciación entre poblaciones. Por el contrario, el estudio morfométrico y merístico demostró diferencias importantes entre las poblaciones provenientes de bahías y las de mar abierto, con una alta correlación entre los parámetros cuantitativos con el hábitat del pez. Asimismo, Bowen y Grant (1997), estudiando las relaciones filogeográficas entre las sardinas del género *Sardinops* por medio de la secuencia de la región de control del ADN mitocondrial, encontraron una fuerte estructura geográfica pero sólo una moderada diferenciación genética inter e intraespecífica. Este mismo grupo ya había reportado una muy baja diferenciación genética por medio del análisis alozímico (Grant y Leslie, 1996), de forma similar a lo discutido anteriormente.

Mediterranean populations suggests the presence of an important genetic flow, which would have to pass through the Azores Islands, North America and the Caribbean. An alternative explanation could be that the amplified fragment and the enzymes used were not capable of revealing the genetic differences present between the Venezuelan and Mediterranean populations. In order to continue studying the dynamics of the genetic processes among these populations, our group is working on the comparison of the sequences of the mitochondrial control region and nuclear genes of samples from Venezuela, the Mediterranean and Africa.

The results of our mitochondrial RFLP analyses do not agree with those reported by Chicki *et al.* (1998), who studied *S. aurita* populations from Venezuela (Margarita Island), Ivory Coast, Ghana and Congo, using protein electrophoresis. These authors reported a very low genetic variability (allozymic diversity, $H = 0.011$), despite the great geographic distance of the samples analyzed, and a very low number of polymorphic loci (3 out of 25). Their average F_{ST} value was 0.006, i.e. non-significant genetic differences were found among the populations from Venezuela, Ivory Coast, Ghana and Congo, whereas our comparison produced an average F_{ST} value of 0.576 between the Venezuelan and African populations. On the other hand, in that study, the F_{ST} values among the African populations averaged 0.003, while in another study by the same group of researchers (Chicki *et al.*, 1997), who used mitochondrial DNA to characterize the populations of Mauritania, Senegal, Ivory Coast and Ghana, they averaged 0.050 (ten times higher).

Low levels of genetic differentiation in groups of *S. aurita* sardines from distant locations have been found before using protein electrophoresis. Kinsey *et al.* (1994), who studied populations from South Carolina and the Atlantic and Gulf of Mexico coasts of Florida, found very low allozymic variability and no genetic differentiation among the populations analyzed. On the other hand, their morphometric and meristic study showed important differences between the populations from the bays and open sea, with a high correlation between the quantitative parameters and the fish habitat. Additionally, Bowen and Grant (1997) studied the phylogenetic relationships between sardines of the genus *Sardinops*, using the mitochondrial control region sequences, and found a very strong geographic structuring, but only a moderate inter- and intraspecific genetic differentiation. This same group had already reported a very low genetic differentiation using allozymic analysis (Grant and Leslie, 1996), similar to that discussed above.

We can therefore infer from the comparison between the allozymic and mitochondrial DNA studies reported by Chicki *et al.* (1997, 1998) for *S. aurita*, that the allozymic analysis proved to be inadequate to study the genetic variability and differentiation among populations, since it tends to be very low because of the low degree of electrophoretic polymorphism of the proteins studied. Additionally, since the electrophoretic patterns are the result of changes in their amino acid

De esta manera se puede inferir de la comparación entre los estudios alozímicos y de ADN mitocondrial reportados por este estudio y Chikhi *et al.* (1997, 1998) para esta especie, que el análisis alozímico no ha mostrado ser adecuado para estudiar la variabilidad y diferenciación genética entre poblaciones, ya que ésta tiende a ser muy baja, producto del bajo grado de polimorfismo electroforético que presentan las proteínas estudiadas. Adicionalmente, debido a que los patrones electroforéticos de las proteínas resultan de cambios en la secuencia de sus aminoácidos, éstos pueden estar influenciados por fuerzas biológicas, como la selección natural sobre loci específicos, que podrían no reflejar los patrones de diferenciación genética de todo el genoma.

Los datos aquí reportados son congruentes con la hipótesis de que las poblaciones de sardina del oriente de Venezuela deben ser manejadas como una sola, desde el punto de vista pesquero, dado que no es posible descartar la presencia de una población panmíctica. Es por lo tanto importante que se establezcan regulaciones regionales que tomen en cuenta este hecho a modo de velar por la preservación de este importante recurso pesquero. Por otra parte, los resultados encontrados de la comparación entre las poblaciones venezolanas y africanas no soportan la idea de que estos dos stocks tengan que ser manejados de manera conjunta, ya que parece no existir flujo importante de genes entre ellos.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por el Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, Venezuela, bajo el proyecto número CI-5-1001-0899/99, y por el FONACIT, Venezuela, bajo el proyecto número S1-2000000823. Los autores quieren expresar su agradecimiento a María Alejandra Balza y Ana Rosa Albornoz, por la colaboración prestada para la realización de esta investigación.

Referencias

- Bowen, B.W. and Grant, W.S. (1997). Phylogeography of the sardines (*Sardinops* spp.): Assessing biogeographic models and population histories in temperate upwelling zones. *Evolution*, 51(5): 1601–1610.
- Chicki, L., Agnese, J.F. and Bonhomme, F. (1997). Fortes differences des ADN mitochondriaux de populations de *Sardinella aurita* de la mer Méditerranée et de l'Atlantique Est. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la Vie*, 320: 289–297.
- Chicki, L., Bonhomme, F. and Agnese, J.F. (1998). Low genetic variability in a widely distributed and abundant clupeid, *Sardinella aurita*. New empirical results and interpretations. *J. Fish Biol.*, 52: 861–878.
- Excoffier, L., Smouse, P. and Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Applications to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.
- FAO (2002). Yearbook of Fishery Statistics: Summary tables. 27 January 2005. <http://www.fao.org/fi/statist/statist.asp>.
- Fischer, W. (ed). (1978). Species identification sheets for fishery purposes, western central Atlantic (fishing area 31). Marine Resources Service, Rome, FAO, Vol. II.
- Freon, M., El Khattabi, M., Mendoza, J. and Guzmán, R. (1997). Unexpected reproductive strategy of *Sardinella aurita* off the coast of Venezuela. *Mar. Biol.*, 128: 363–372.
- Fujio, Y. and Kato, Y. (1979). Genetic variation in fish populations. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 45: 1169–1178.
- Grant, W.S. and Leslie, R.W. (1996). Late Pleistocene dispersal of Indian-Pacific sardine populations in an ancient lineage of the genus *Sardinops*. *Mar. Biol.*, 126: 133–142.
- Hedgecock, D., Hutchinson, E.S., Li, G., Sly, F.L. and Nelson, K. (1989). Genetic and morphometric variation in the Pacific sardine, *Sardinops sagax caerulea*: Comparisons and contrasts with historical data and with variability in the northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish. Bull.*, US, 87: 653–671.
- Kinsey, S.T., Orsoy, T., Bert, T.M. and Mahmoudi, B. (1994). Population structure of the Spanish sardine *Sardinella aurita*: Natural morphological variation in a genetically homogeneous population. *Mar. Biol.*, 118: 309–317.
- Meneses, M.R. (1994). Little genetic variation in the oil sardine, *Sardinella longiceps* Va., from the western coast of India. *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 45: 257–264.
- Michalakis, Y. and Excoffier, L. (1996). A genetic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference to microsatellite loci. *Genetics*, 142: 1061–1064.
- Schneider, S., Roessli, D. and Excoffier, L. (2000). Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.
- Whitehead, P.J. (1985). Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei). *FAO Fish. Synop.*, 125: 1–303.
- Wilson, R.R. and Alberdi, P.D. (1991). An electrophoretic study of Spanish sardine suggests a single predominant species in the eastern Gulf of Mexico, *Sardinella aurita*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 792–798.

sequences, these patterns can be influenced by biological forces, such as natural selection upon specific loci, which may not reflect the genetic differentiation patterns of the entire genome.

The data reported here are in agreement with the hypothesis that the sardine populations from eastern Venezuela have to be managed as a single population, from the fisheries point of view, since it is not possible to discard the presence of a panmictic population. Thus, it is very important to establish regional regulations that take this fact into account, in order to preserve this important fisheries resource. On the other hand, the results found from the comparison between the Venezuelan and African populations do not agree with the idea that these stocks have to be managed jointly, since no important genetic flow seems to exist between them.

Acknowledgements

This research was financed by the Research Council of Oriente University, Venezuela, project number CI-5-1001-0899/99, and by FONACIT, Venezuela, project number S1-2000000823. The authors thank María Alejandra Balza and Ana Rosa Albornoz for their assistance during this research.

English translation by the authors.