



INFORME TÉCNICO

Establecimiento de las relaciones filogenéticas de la especie Capitán de la Sabana (*eremophilus mutisi*).



AUNAP
AUTORIDAD NACIONAL
DE ACUICULTURA Y PESCA

"Acuicultura y Pesca con Responsabilidad"

INFORME TÉCNICO DEL ESTABLECIMIENTO DE LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LA ESPECIE CAPITÁN DE LA SABANA (*Eremophilus mutisii*)

Equipo de autores y colaboradores

® Universidad de Ciencias Aplicadas - UDCA	® Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca
Cruz Elena Enríquez Valencia Luisa Fernanda Triana Lina Rodríguez Hernández Camilo Prieto Mojica	María Rosa Angarita Peñaranda Gustavo Salazar Ariza Javier Plata González Julia del Carmen Palacios Jairo Andrés Saganome

Esta publicación, es un producto resultado del convenio de cooperación No. 260 de 2019 cuyo objeto: "La evaluación del desempeño productivo de alevinos de capitán de la sabana (*Eremophilus mutisi*) y análisis citogenético y genético molecular de la especie en cuatro zonas del altiplano cundiboyacense (Laguna de Fúquene Suesca y embalses de Tominé y la Copa)" suscrito entre la Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca y La Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales – U.D.C.A en el año 2019.

Citación sugerida: Enríquez-Valencia, C.E., Triana, L.F., Rodríguez-Hernández, L., Prieto-Mojica, C. (2019). Informe técnico del establecimiento de las relaciones filogenéticas de la especie Capitán de la Sabana (*eremophilus mutisii*). Convenio 260 de 2019. Autoridad Nacional de Acuicultura y Pesca. 8 p

®Todos los derechos reservados. Se autoriza la reproducción y difusión de material contenido en este documento para fines educativos u otros fines no comerciales, sin previa autorización del titular de los derechos de autor, sí y solo sí, se reconocen los créditos de los autores, editores e instituciones que han elaborado el presente documentos.

Las líneas de delimitación, así como los mapas que pudieran presentarse dentro de la publicación, son una representación gráfica aproximada, con fines ilustrativos y no expresan una posición de carácter oficial, por ende, ni los autores ni las instituciones vinculada, asumen la responsabilidad de las interpretaciones que surjan a partir de estas.

"Se prohíbe la reproducción de este documento para fines comerciales"

Responsabilidad: Las denominaciones empleadas y la presentación del material en esta publicación, no implican la expresión de opinión o juicio alguno por parte de las instituciones participantes. Así mismo, las opiniones expresadas no representan necesariamente las decisiones o políticas de las instituciones participantes, ni la citación de nombres, estadísticas pesqueras o procesos comerciales. Todos los aportes y opiniones expresadas son de la entera responsabilidad de los autores correspondientes. Los documentos que componen este libro han sido editados con previa aprobación de sus autores.

Informe Técnico del Establecimiento de las Relaciones Filogenéticas de *Eremophilus mutisii*

Introducción

La diversidad existente en los Andes tropicales es inmensa, albergando diferentes especies, que se encuentran bajo una presión creciente por diferentes actividades antrópicas. La conservación de la fauna de agua dulce, en especial los peces, ha sido escasamente explorada, por lo que se sabe poco sobre estas especies. Los peces Andinos tropicales se encuentran entre los vertebrados menos estudiados en el mundo. Un alto porcentaje de ellas son especies endémicas, y son vulnerables y/o amenazadas por pérdida de sus hábitats, introducción de especies exóticas, cambios hidrológicos y de temperaturas asociadas al cambio climático. El Capitán de la Sabana es una especie que actualmente se encuentra en el libro rojo de especies amenazadas, en la categoría de Vulnerable (Mojica et al., 2012).

La conservación de estas especies implica el conocimiento de la biología y la dinámica genética poblacional de cada una de ellas. En las últimas décadas, marcadores moleculares han sido ampliamente utilizados en estudios de procesos ecológicos, evolutivos y de estructura y variabilidad genética. Dentro de estos marcadores, el análisis de polimorfismos de ADN mitocondrial (ADNm) ha sido el más popular para estudios de diversidad genética y de relaciones filogenéticas. De acuerdo con lo anterior el objetivo de este trabajo fue estudiar las relaciones filogenéticas del Capitán de la Sabana a través de marcadores mitocondriales.

Materiales y Métodos

Colecta de muestras y extracción de ADN

Se colectaron muestras de tejidos y/o sangre de individuos de Capitán de la Sabana de las Zonas de Suesca, Embalse de Tominé, Embalse de la Copa y laguna de Fúquene. Las muestras obtenidas fueron transportadas en refrigeración hasta el laboratorio de genética animal y molecular de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (U.D.C.A) (Figura 1). La extracción de ADN genómico se realizó utilizando el kit comercial High Pure PCR Template Preparation® de Roche. La cuantificación del ADN extraído se realizó utilizando nanodrop, y la integridad del ADN fue verificada por medio de electroforesis en gel de agarosa (1% p/v).

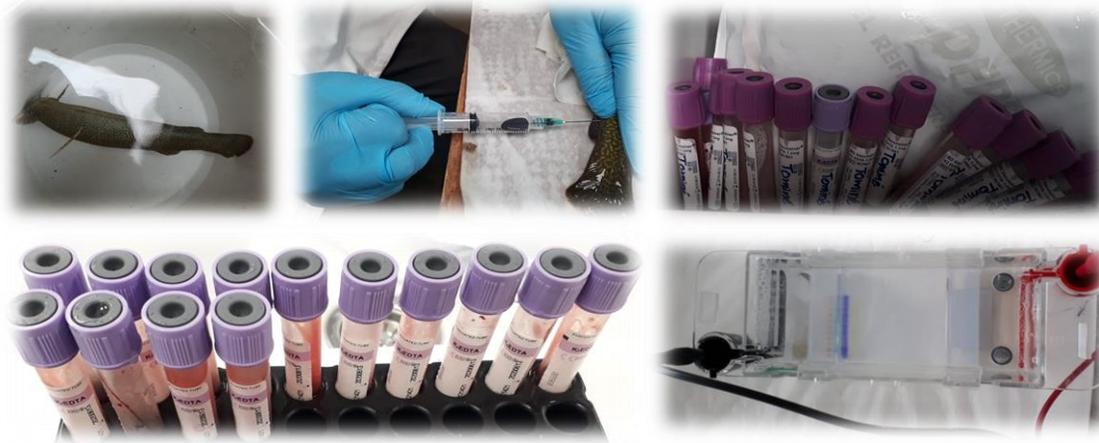


Figura 1. Proceso de colecta de muestras, extracción de ADN y electroforesis de ADN realizados en el laboratorio de Genética Animal y molecular de la U.D.C.A.

Amplificación de los marcadores 16S y COI a través de PCR

La amplificación de los marcadores mitocondriales subunidades 16S del ARN ribosómico y subunidad I del citocromo C oxidasa (COI-I) se realizó a través de PCR utilizando los cebadores que se muestran en la Tabla 1. Las reacciones fueron realizadas en un volumen total de reacción de 25 ul, cada reacción contenía 5ul de ADN genómico, 2.5ul de cada cebador, 5 ul de dNTPs, 2 ul de Mg⁺², 0.5 de Taq polimerasa y agua (Figura 2).

El proceso de PCR para el marcador COI-I se realizó con una desnaturalización inicial a 95 °C x 2 min, seguida por 40 ciclos de desnaturalización a 94°C x 30 seg, hibridación a 54°C x 30 seg y extensión a 72°C x 1 min, con una extensión final a 72°C x 10 min (Figura 2). Mientras que, el proceso de PCR para el marcador 16S se realizó con una desnaturalización inicial de 94 °C x 2 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C x 30 seg, hibridación a 52°C x 40 seg y extensión a 72°C x 1min y extensión final a 72°C x 10 minutos.

Tabla 1. Cebadores utilizados para amplificación de los marcadores COI-I y 16s

Marcador	Forward	Reverse
COI-I 5'-3' (655pb)	TCAACCAACCACAAAGACATTG GCAC	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAG AATCA
16S 5'-3'	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT

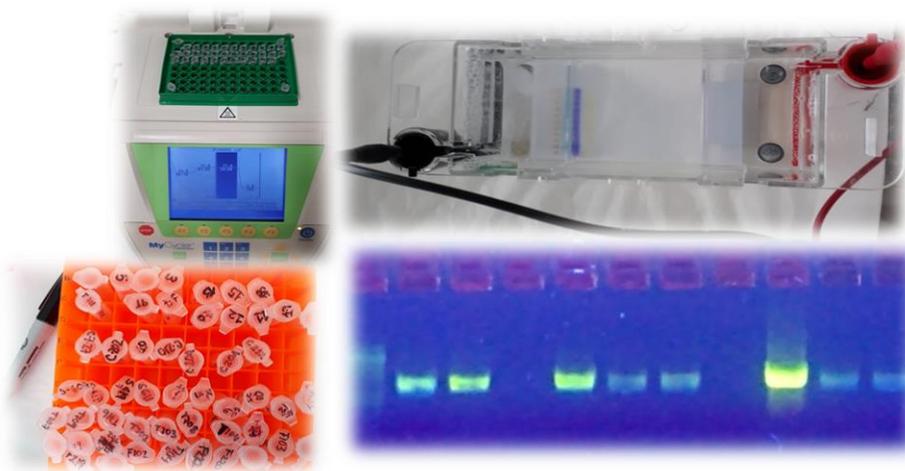


Figura 2. Procesos de PCR y electroforesis realizados en el laboratorio de Biología Molecular de la U.D.C.A.

Electroforesis y secuenciación

Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa (1% p/v) (Figura 3). Una vez verificada la amplificación de los productos de PCR y el tamaño del fragmento amplificado, fueron enviados para purificación y secuenciación a Corpogen.

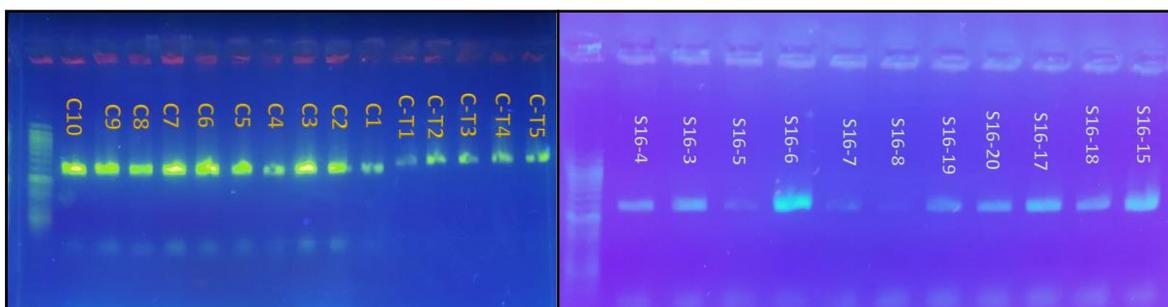


Figura 3. Resultados de electroforesis de agarosa de algunos individuos, cada una de las imágenes tiene la inicial de la región y el ID del individuo.

Análisis de secuencias e inferencia filogenética

La calidad de las secuencias obtenidas fue confirmada por visualización de los cromatogramas de secuenciación usando BioEdit (Hall, 1999). Las secuencias forward y reverse de cada marcador fueron alineadas a través de alineamiento de dos secuencias para generar una secuencia consenso a partir de la cual fueron realizados los diferentes análisis. Posteriormente, estas secuencias fueron analizadas en las bases de datos NCBI y EMBL usando la herramienta BLAST. Dicha búsqueda permitió analizar y obtener las secuencias similares con lo cual se

generó un banco de secuencias con el que se realizó el alineamiento múltiple mediante ClustalX (Thompson, Gibson, Plewniak, Jeanmougin, & Higgins, 1997).

RESULTADOS

Edición y alineamiento de secuencias (COI -1)

En la Figura 4 se muestra electroferograma obtenido a partir del secuenciamiento de COI-I de 1 individuo. Cada una de las secuencias de las 4 regiones fueron editadas y alineadas como se muestra en la Figura 5. Posterior al proceso de edición y alineamiento se obtuvieron secuencias consenso de 400pb.

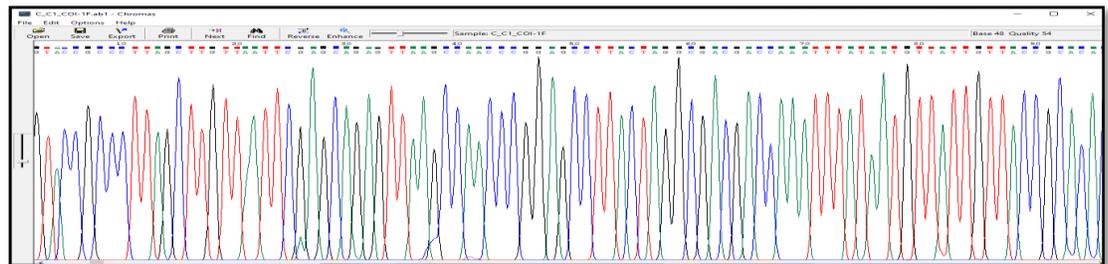


Figura 4. Electroferograma correspondiente a la amplificación de la región mitocondrial (COI-1) de un individuo perteneciente a la subpoblación de Copa

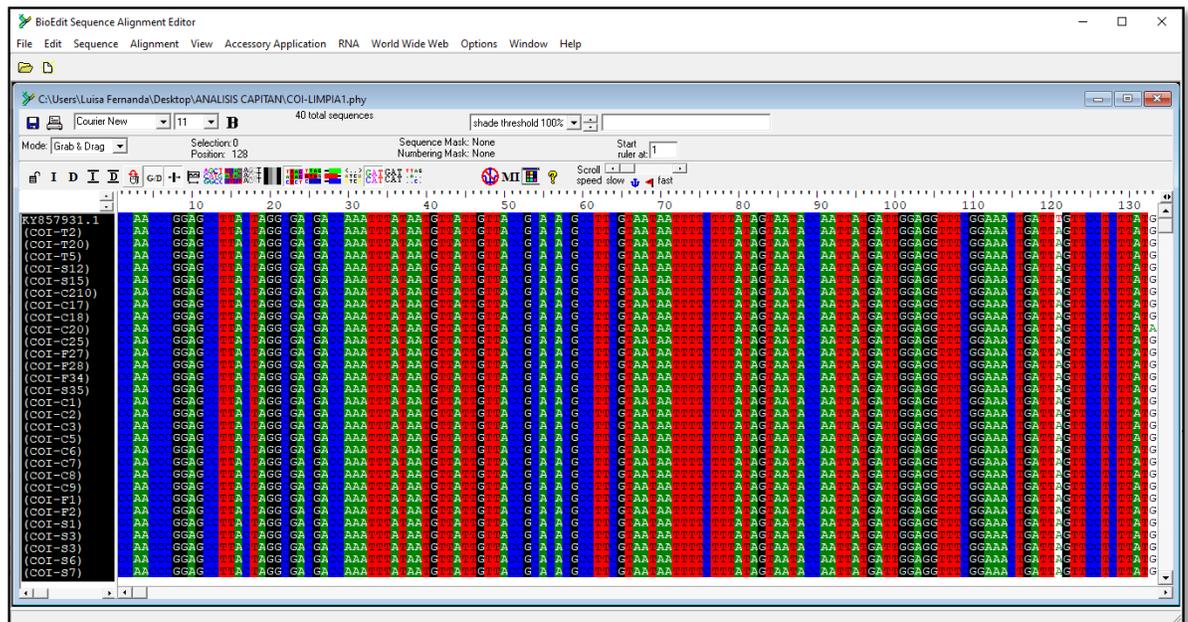


Figura 5. Alineamiento de las secuencias del marcador COI-I generadas por medio del software Bioedit®

Edición y alineamiento de Secuencias 16S

En la Figura 6 se presenta un ejemplo de electroferograma obtenido a partir del secuenciamiento de 16S. Cada una de las secuencias de 16S de las 4 regiones

fueron editadas y alineadas como se muestra en la Figura 7. Posterior al proceso de edición y alineamiento se obtuvieron secuencias consenso de 451pb.

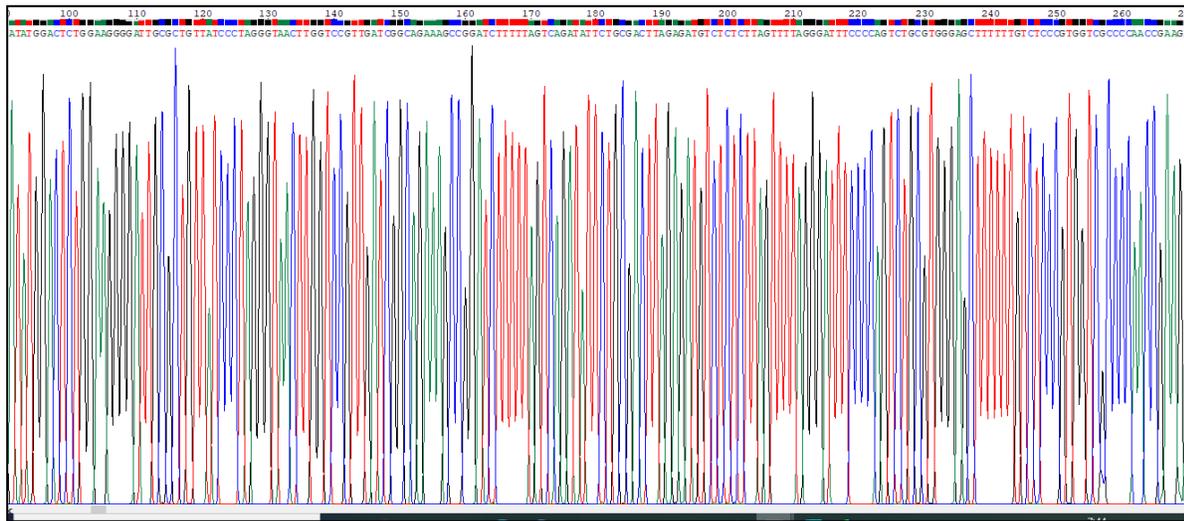


Figura 6. Electroferograma correspondiente a la amplificación del marcador 16S de individuos de Capitán de la Sabana.

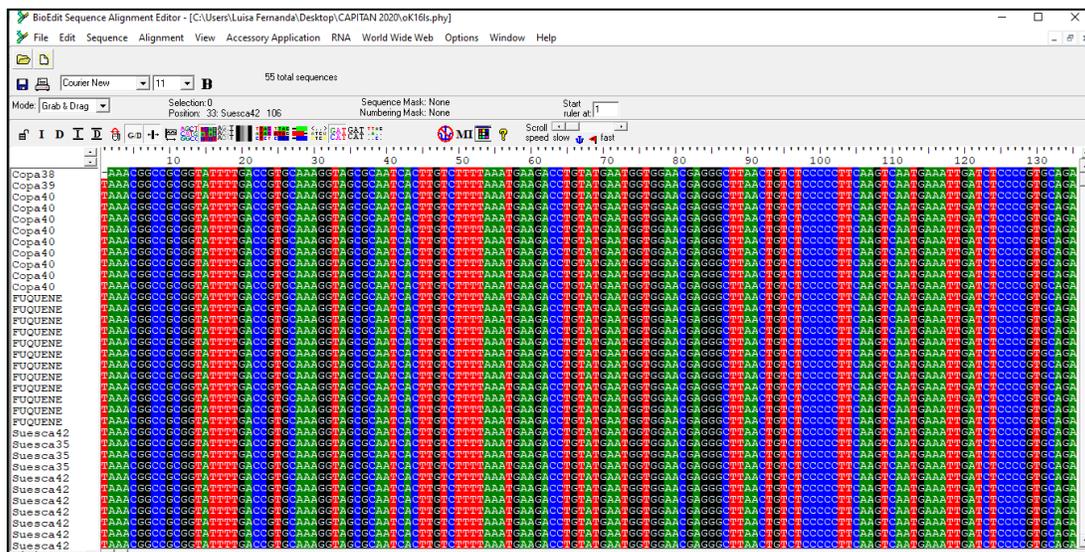


Figura 7. Alineamiento de las secuencias del marcador 16S generadas por medio del software Bioedit®

Diversidad e inferencia filogenética basadas en COI-I y 16S

Las zonas muestreadas correspondientes a los embalses de Copa, laguna de Fúquene, Suesca y Tominé se consideran "laboratorios" naturales de investigación y dada su pequeña dimensión permite aplicar estudios correspondientes a procesos evolutivos y de especiación. En estas fuentes hídricas se encuentra la especie endémica Capitán de la Sabana recurso zoogenético valioso sin referencia alguna

de cambios evolutivos como la selección, deriva y flujo genético y la repercusión de esto en su actual estado genético.

Los estudios genético-moleculares permiten un soporte del estado actual de este recurso y la genotipificación por medio de marcadores mitocondriales son claves para la identificación de especies en estado de conservación (Saad et al., 2011). En este estudio se utilizaron los marcadores COI-I y 16S para evaluar la diversidad y las relaciones filogenéticas del Capitán de la Sabana. En la Tabla 2 se presentan los resultados de diversidad obtenidas en las 4 poblaciones a partir del marcador COI-I y 16S.

Utilizando el marcador COI-I se observaron sitios polimórficos e índices de diversidad genética únicamente en Tominé. En Fúquene se observó un sitio polimórfico y en Copa y Suesca se observó apenas un haplotipo. De los sitios polimórficos observados se encontró un sitio con 121 nucleótidos y otro con 133 nucleótidos (Tabla 3), mientras que, para el caso de 16S, se observó que entre todos los individuos secuenciados existe un solo haplotipo presente (Tabla 2), con cero diversidades nucleotídicas y un porcentaje del 46% de guaninas y citocinas en la secuencia consenso (461pb) por lo que no se evidenció diferencias dentro de las subpoblaciones muestreadas respecto a este marcador dada su alta conservación y escasa variabilidad (Tabla 2).

Tabla 2. Diversidad Genética de las poblaciones basadas en COI-I y 16S

Localidad	COI-I					16S				
	SP	H	DH	DN	K	SP	H	DH	DN	K
Copa	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Suesca	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Fúquene	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Tominé	1	2	0.29	0.001	0.20	0	0	0	0	0
Total	2	3	0.15	0.003	0.14	0	1	0	0	0

SP= Número de sitios polimórficos; H= número de haplotipos; DH=Diversidad haplotípica; DN= diversidad nucleotídica; K= Número promedio de diferencias nucleotídicas.

Tabla 3. Todos los sitios polimórficos encontrados en COI-I

Sitios polimórficos analizados	Nucleótido	Distancia
Sitio 1	121	12 nucleótidos
Sitio 2	133	

En la Figura 8 se presentan las relaciones filogenéticas encontradas para el Capitán de la Sabana, observando que el Capitán de la Sabana aparentemente tiene una

homología con las secuencias reportadas en las bases de datos para el Capitán de la Sabana.

El análisis del fragmento de 404 pb de la región COI-I del ADNmt analizadas permitió identificar tres haplotipos. Así mismo, se pudo observar que la región con mayor número de haplotipos fue la subpoblación de Tominé ya que las demás subpoblaciones solo mostraron un solo haplotipo presente por lo que probablemente en esta zona existe mayor variabilidad de la especie.

De igual manera, los resultados del presente estudio mostraron que todas las secuencias obtenidas para la región 16s no presentan ningún cambio puntual (sin polimorfismos) lo que demuestra su alta tasa de conservación dentro y entre las poblaciones analizadas, todo lo contrario, arrojó el marcador COI-1 mostrando niveles de diversidad y la existencia de tres haplotipos de importancia genética. Adicionalmente, el análisis filogenético mostró cercanía del Capitán de la sabana con el espécimen *Trichomycterus mimonha* especie de peces de la familia *Trichomycteridae* presente en Brasil.

Bibliografía

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and análisis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 95–98. <http://doi.org/citeulike-article-id:691774>

Mesa, L. S., Carlos A. Lasso, Luz E. Ochoa y Carlos Do Nascimento. 2018. *Trichomycterus rosablanca* (*Siluriformes*, *Trichomycteridae*) a new species of hipogean catfish from the Colombian Andes. *Biota Colombiana* 19 (Sup. 1).

Mojica, J. I.; J. S. Usma; R. Álvarez-León y C. A. Lasso (Eds). 2012. Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia 2012. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, WWF Colombia y Universidad de Manizales. Bogotá, D. C., Colombia, 319 pp.

Saad, Y. M., Abou-Shabana, N., El-Ghazaly, M., Fawzy, M. & Mohamed, A., 2011. Conservation of some sea bream (*Sparus aurata*) fish populations. *W.J.F.M.S.* 3, 489-495.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25(24), 4876–4882. <http://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>