

INFORME TÉCNICO

Variabilidad genética de la especie Capitán de la Sabana (*Eremophilus mutisii*) en Suesca, Tominé, Fúquene y Copa del altiplano central



INFORME TÉCNICO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA ESPECIE CAPITÁN DE LA SABANA (*Eremophilus mutisii*) EN SUESCA, TOMINÉ, FÚQUENE Y COPA DEL ALTIPLANO CENTRAL

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 mutisii*) 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 de la variabilidad genética de la especie Capitán de la Sabana (*eremophilus mutisii*) en Suesca, Tominé, Fúquene y Copa del altiplano central. Convenio 260 de 2019. Autoridad Nacional de Acuicultura Y Pesca. 10p

®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 de la Variabilidad Genética de *Eremophilus mutisii* en Cuatro Zonas del Altiplano Central

Introducción

El Capitán de la sabana (*Eremophilus mutisii*) pez endémico de las fuentes hídricas del altiplano central colombiano, se caracteriza por ser el bagre nativo de mayor tamaño presente en aguas de baja temperaturas en el país además de ser el símbolo ambiental y cultural para la ciudad de Bogotá y sus alrededores. Su permanencia se encuentra comprometida siendo las causas principales el cambio climático, la caza furtiva y la destrucción de su hábitat (González et al., 2017).

La conservación de una especie implica el conocimiento de la biología y la dinámica genética poblacional de cada una de ellas. La variabilidad genética es muy importante para una especie mantener su vitalidad reproductiva, resistencia a enfermedades y la capacidad de adaptarse a cambios climáticos, por tanto, la determinación de la composición genética de una especie y como está estructurada es sus poblaciones es fundamental para que se puedan implementar acciones de manejo y conservación.

Metodología

A través de pescadores de la región de Fúquene, Suesca, Copa y Tominé se adquirieron ejemplares de Capitán de la Sabana como se describe en la Tabla 1. A partir de los ejemplares adquiridos se tomaron muestras de sangre de cada uno de los individuos en tubos con EDTA y en algunos se tomaron muestras de músculo. Las muestras fueron refrigeradas y transportadas al laboratorio de Genética Animal de la U.D.C. A (Figura 1).

Tabla 1. Población y número de ejemplares obtenidos para la toma de sangre y extracción de ADN.

Población	Número
Suesca	25
Tominé	25
Fúquene	25
Copa	25

Así mismo, se conservaron muestras de tejido muscular de diferentes individuos en PBS a temperatura de refrigeración (4°C), donde también se aplicó el mismo protocolo de extracción (Figura 2).

Figura 1. Colecta y toma de muestras de sangre de ejemplares de *Eremophilus mutissi*



Figura 2. Muestras de músculo correspondiente a ejemplares de *Eremophilus mutissi*



Extracción de ADN

Se realizaron dos métodos de extracción de ADN a partir de tejido muscular blanco del pez Capitán de la Sabana (*Eremophilus mutissi*) y de sangre entera, por medio del *Kit ROCHE High Pure PCR Template Preparation* utilizando los protocolos previamente estandarizados.

Cuantificación de ADN extraído a partir de muestras de tejido/sangre de *Eremophilus mutissi*

Se realizó la cuantificación de las diferentes muestras extraídas, obtenidas a partir del protocolo del kit ROCHE®, la calidad de estas fue confirmada mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%, constituido por 0,6 gramos de agarosa y 50 ml de TBE 1X, teñido con Red Ladder (10mg/mg), a 100V por 20 minutos (Figura 3).

El ADN fue visualizado en un transluminador UV (Figura 4). Asimismo, se realizó la cuantificación por medio de nanodrop, donde se confirma que se cuenta con cantidad suficiente de ácidos nucleicos (DNA) para llevar a cabo los ensayos de PCR en punto final. La principal ventaja de trabajar BioDrop ND1000 es que la medida se lleva a cabo a partir de 1 ó 1,5 μ l de muestra sin ayuda de ningún tipo de cubeta ya que la muestra se pipetea directamente sobre la superficie de medida.

Figura 3. Equipo de Electroforesis del laboratorio de Biología Molecular UDCA

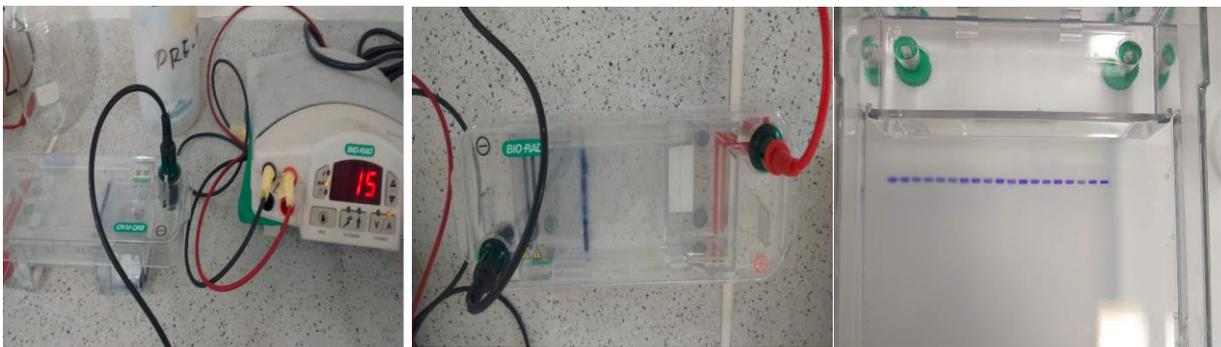
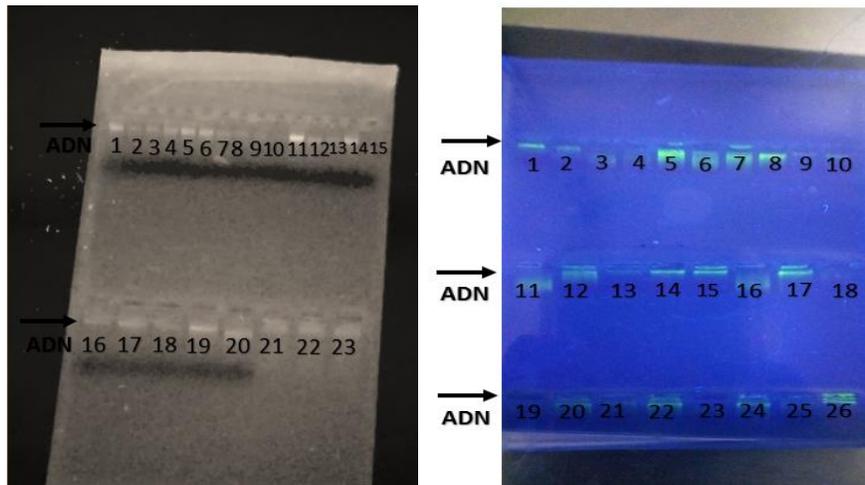


Figura 4. Visualización del corrido en agarosa del ADN extraído de 49 individuos pertenecientes a las 4 diferentes poblaciones.



Amplificación y Purificación de fragmentos

Se amplificó un fragmento de la región D-loop del ADNmt. La secuencia de los primers diseñados fue:

F: 5'-CACCCVTRRCTCCCAAAGCYA-3'

R: 5'-GGTGCGGRKACTTGCATGTRTM -3'

Las condiciones y la PCR de amplificación se presentan en la Tabla 2. La verificación de los tamaños de los productos se realizó en geles de agarosa al 1,5%.

Tabla 2. Programa de amplificación de la PCR

Condiciones termociclador /Temperatura Tiempo		
Denaturación	95°C	1 minuto
Hibridación	57°C	45 segundos
Extensión	72°C	1 minuto
35 Ciclos		

Análisis estadísticos de la diversidad del ADNmt

El cálculo de los diferentes parámetros de diversidad genética se realizó utilizando los software DNAsp (Rozas et al., 2017) y Arlequín 3.0 (Excoffier, Laval, & Schneider, 2005).

Los parámetros de diversidad evaluados por zona y por tipo se presentan a continuación:

- Número de sitios polimórficos (S): Número de posiciones en la secuencia analizada que presenta más de una variante.
- Número de haplotipos: Número de secuencias distintas identificadas en el total de los individuos analizados.
- Diversidad haplotípica: Es la probabilidad de que dos haplotipos elegidos al azar sean idénticos (Nei, 1987).
- Diversidad nucleotídica: es el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar y puede ser utilizada para medir la distancia genética entre poblaciones (Tamura & Nei, 1993).

Análisis de la estructura genética de la población

Con el fin de conocer la estructura genética de la población se realizó en cálculo de los estadísticos FST.

Cálculo de los estadísticos FST

El cálculo de los estadísticos FST se realizó bajo la hipótesis de no diferencia entre las subpoblaciones, el cual se obtiene permutando haplotipos entre poblaciones, donde el valor P es la proporción de permutaciones que dan valor FST igual o mayor al observado (Tamura & Nei, 1993). En el presente trabajo, el cálculo de los valores FST por subpoblaciones se realizó con el MEGAX (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018) para obtener la matriz de distancias entre las cuatro subpoblaciones muestreadas.

Representaciones gráficas

Las representaciones gráficas se obtuvieron a partir de los datos obtenidos en los análisis previos considerando en cada caso las Unidades Taxonómicas Operativas OTUs (Sokal & Michener, 1958). Se realizó el gráfico a partir del algoritmo Neighbor-Joining basados en las distancias FST calculados entre subpoblaciones con el software MEGAX (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018).

La representación gráfica de los haplotipos se realizó con el algoritmo Neighbor-Joining, utilizando el test de filogenia basado en el método Bootstrap con 1000 replicaciones el cuál disminuye el error ya que permite observar la distribución subyacente mediante remuestreo del conjunto de datos original; el modelo de sustitución utilizado fue el de Kimura 2- parámetros el cual asume que las transiciones son más probables que las transversiones (Kimura, 1968).

Resultados:

En las siguientes figuras se muestra un ejemplo de electroferograma como resultado de la secuenciación del marcador D-loop así como diferentes secuencias alineadas del primer Reverse (Figura 5).

Figura 5. Electroferograma de secuencia del marcador D-loop

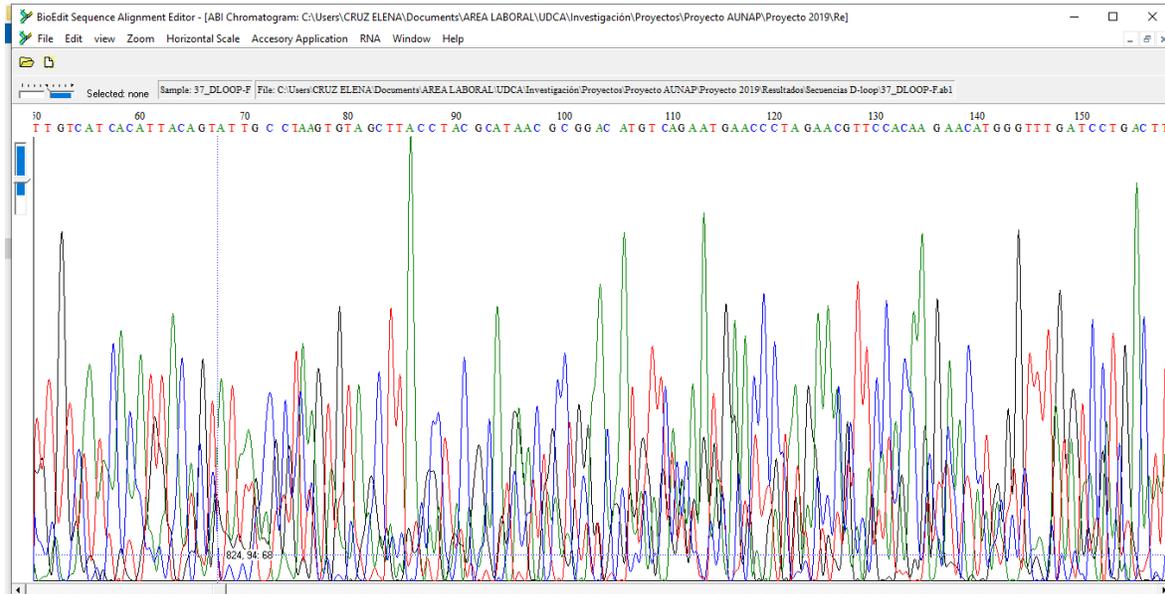
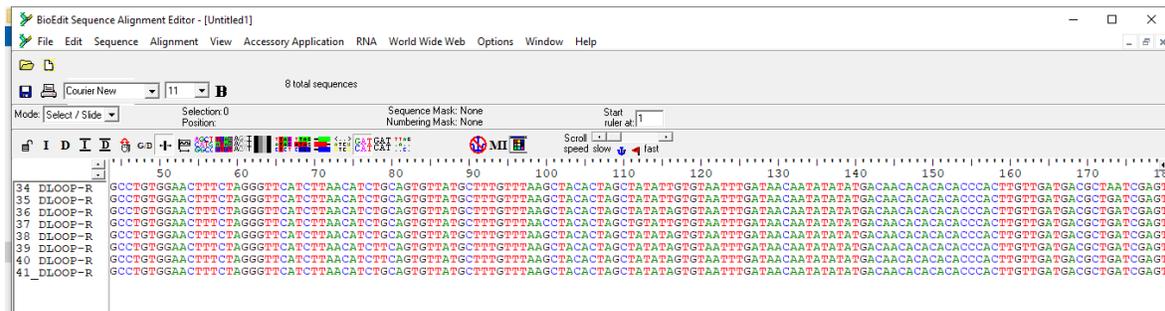


Figura 6. Alineación de secuencias de D-loop



En la Tabla 3, se describen los parámetros de diversidad encontrados en toda la población muestreada a partir de la región D-loop.

Tabla 3. Parámetros de diversidad en la población total

Parámetros de diversidad para toda la población a partir del análisis de la región D-loop.	
Número de Haplotipos	8
Diversidad Haplotípica	1
Varianza Haplotípica	0.003
Desviación estándar	0.063

Los siguientes resultados de la Tabla 4 hacen referencia a los parámetros de diversidad dentro de cada una de las subpoblaciones muestreadas (Copa, Fúquene, Tominé y Suesca).

Tabla 4. Parámetros de diversidad dentro de cada una de las subpoblaciones analizadas.

Subpoblación 1 (Suesca)	
Numero de sitios segregantes	11
Numero de haplotipos	2
Diversidad haplotípica	1
Diversidad nucleotídica	0.05
Subpoblación 2 (Tominé)	
Numero de sitios segregantes	5
Numero de haplotipos	2
Diversidad haplotípica	1
Diversidad nucleotídica	0.02
Subpoblación 3 (Fúquene)	
Numero de sitios segregantes	12
Numero de haplotipos	2
Diversidad haplotípica	1
Diversidad nucleotídica	0.06
Subpoblación 4 (Copa)	
Numero de sitios segregantes	11
Numero de haplotipos	2
Diversidad haplotípica	1
Diversidad nucleotídica	0.05

Los resultados obtenidos muestran las siguientes zonas conservadas de la región amplificada.

- *Región 1: 39pb-116pb*
- *Región 2: 52pb-117pb*
- *Región 3: 53pb-118pb*
- *Región 4: 54pb-121pb*
- *Región 5: 57pb-134pb*
- *Región 6: 70pb-139pb*

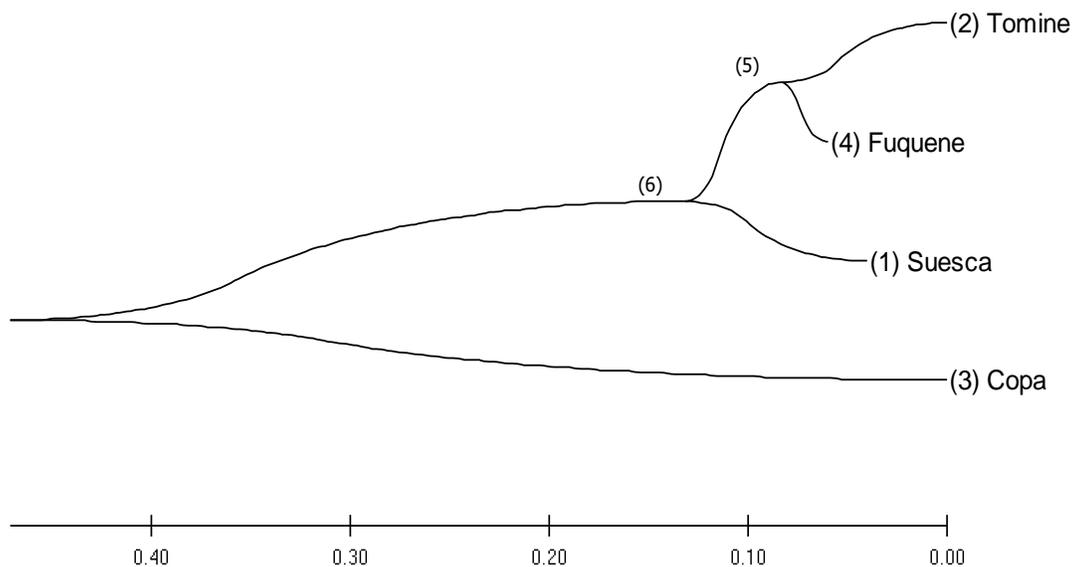
De esta manera se observa que la subpoblación con mayor diversidad genética es la población de peces ubicada en la laguna de Fúquene con altos niveles de diversidad genética, donde autores como la CAR describen la zona como uno de

los principales puntos para el albergue de flora y fauna de la región, donde se destaca la presencia del capitán de la sabana (CAR, 2018).

Distancias FST

Los valores FST calculados entre las secuencias de los peces de las distintas subpoblaciones se utilizaron como medida de distancia genética. La representación gráfica de las distancias genéticas obtenida bajo el algoritmo Neighbour-Joining (Figura 7) muestra una primera división de como se alejan las poblaciones muestreadas.

Figura 7. Dendograma obtenido de la distancia FST entre las subpoblaciones con el método Neighbour Joining, a partir a partir de un fragmento de 200pb de la región D-loop del ADNmt del pez Capitán de la sabana.



El dendrograma permite observar dos grupos principales, uno de ellos conformado por las subpoblaciones de Tominé, Fúquene y Suesca y el otro clado formado por la subpoblación de Copa. Es importante resaltar que geográficamente las subpoblaciones de Suesca y Fúquene donde probablemente pueda existir flujo genético entre estas dos zonas, asimismo, la población de Copa es la más distante ubicada en el departamento de Boyacá. El comportamiento arrojado sugiere algún tipo de relación genética a nivel de ADNmt de las tres regiones del primer grupo (Tominé, Fuquene y Suesca) donde puede presentarse por sus conexiones hidrográficas y/o el traslado de ejemplares de unas a otras subpoblaciones, por parte de nativos de las zonas.

La reducción de las poblaciones del capitán de la sabana en los diferentes cuerpos de agua es atribuido principalmente a razones como la pesca excesiva (Álvarez, 2007), la presencia de predadores como la Trucha Arcoíris *Oncorhynchus mikiss*

(Lemus et al., 2014) y demás factores que ponen en riesgo la subsistencia de esta especie, ha generado la preocupación de expertos en el área, enfocando su esfuerzo en la conservación de este recurso.

Los resultados del presente estudio demuestran que a pesar de los factores anteriormente mencionados, aun existe variabilidad genética aceptable en los individuos pertenecientes a la subpoblación de Fuquene, los cuales cuentan con índices de variabilidad superior a las tres subpoblaciones restantes que de igual forma no demeritan sus resultados frente a este parámetro. Es de suma importancia para posteriores estudios de selección y cruzamiento, la conservación de la diversidad genética que pueda generarse en los descendientes de estos individuos, dado que el impacto sobre diferentes tipos de variables productivas y reproductivas, probablemente puedan ser superiores al resto de subpoblaciones mencionadas.

Conclusión:

A través del estudio de diversidad utilizando el marcador D-loop, se logró observar que aún se observa variabilidad del Capitán de la Sabana, sin embargo, para corroborar estos resultados pioneros para la especie, se debe tener presente para próximos estudios, la posibilidad de un muestreo con un N superior y/o adelantar estudios que involucren tecnologías de genotipificación de alto rendimiento para la identificación de SNP a nivel de una población y estudios de estructura y diversidad genética a nivel de población.

Bibliografía

Álvarez R, Rodríguez A. ¿Cómo Es Y Dónde Vive El Capitán? En: ¿Quién Es El Capitán? Bogotá: Editorial Universidad Del Rosario; 2007. P. 37-50.

Bastidas G, Portillo C. Aporte al Conocimiento de la Biología y Ecología del Pez Capitán de la Sabana (*Eremophilus mutisii*). Humboldt 1805. (Pisces: Trichomycteridae) en el Altiplano Cundiboyacense ISBN: 978-958-58406-5-2

González Acosta Julio Silberto, Zapata Berruecos Beatriz Elena, Rosado Puccine (2017). Desarrollo embrionario del capitán de la sabana, *Eremophilus mutisii* (pisces: trichomycteridae) rev. Med. Vet. Issn 0122-9354 issne 2389-8526: Bogotá (Colombia) n° 35: 137-147, julio-diciembre del 2017.

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>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <http://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.

Pez capitán de la sabana (*Eremophilus mutisii*) 2. Especie endémica 3. Peces 4. Recursos hidrobiológicos 5. Conservación de especies 6. Gestión ambiental. I Tit. II. Corporación Autónoma Regional III. Universidad Manuela Beltrán.

Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512–26. <http://doi.org/10.1093/molbev/msl149>.