

DETERMINACIÓN PARCIAL DEL MAPA DE RESTRICCIÓN DEL DNA MITOCONDRIAL DE LA NUTRIA GIGANTE DE RÍO *Pteronura brasiliensis* Y COMPARACIÓN CON OTROS MUSTÉLIDOS COLOMBIANOS EN CAUTIVERIO

Samper M.¹, Hernández J.², Bernal J.^{3*}

1. Biólogo, CEBM; 2. Coordinador CEBM, 3. Director CEBM.

*Autor para correspondencia: centrobiomol@campestre.edu.co

RESUMEN

Se realizó la amplificación por PCR de un fragmento de 3.200 pares de bases del mtDNA de Nutria Gigante de Río, Taira y Hurón. Luego, se digirió con las enzimas BamH I; Bgl I, EcoR I, Hha I, Hind III, Hinf I, Sal I y Xba I, y a partir de este análisis se obtuvo el mapa físico de esta región que contiene los genes: *cytb*, *tRNA-Pro*, *D-Loop*, *tRNA-Phe* y *12SrRNA*. Con los resultados se obtuvo el mapa físico de restricción parcial del mtDNA de este fragmento en Mustélidos y se compararon con mapas teóricos de diferentes mamíferos. Se construyeron árboles filogenéticos basados en un análisis de parsimonia usando el programa PAUP. La nutria gigante de río posee 85% de homología con la taira, 70% con el hurón y 18% con los mamíferos estudiados.

Palabras Clave: *Pteronura brasiliensis*, DNA mitocondrial, Mustelidos, enzimas de restricción.

ABSTRACT

PCR amplification of a 3.2 kb fragment was made for the mtDNA of the river giant otter, tayra and hurón. Afterwards, the DNA fragment was digested with restriction enzymes BamH I; Bgl I, EcoR I, Hha I, Hind III, Hinf I, Sal I y Xba I, from which a physical map of the region that has the genes *tRNA-Pro*, *D-Loop*, *tRNA-Phe* y *12SrRNA* was obtained. The results led to the mapping of this partial restriction physical map of mtDNA of mustelids which it was compared with other mammalian theoretic maps. Phylogenetic trees were made by the software PAUP based on parsimony analysis. Conclusions suggest that the river giant otter has 85% of homology for Tayra, 70% for huron and 18% with other studied mammals.

Key words: *Pteronura brasiliensis*, mitochondrial DNA, Mustelids, restriction enzyme.

INTRODUCCIÓN

La nutria gigante de río (*Pteronura brasiliensis*) es un mamífero carnívoro, de la familia Mustelidae a la cual pertenecen también las tairas y los hurones¹. La nutria es considerada por el CITES como una especie vulnerable y por la IUCN como especie en peligro de extinción. La *P. brasiliensis* es una especie única en sus adaptaciones semi-acuáticas, lo cual la diferencia del resto de las especies que pertenecen a la familia Mustelidae. Presenta varias características especiales, las cuales deben tenerse en cuenta para la conservación de esta especie. Es considerada una especie "sombrija", la cual se distribuye en amplias áreas a las cuales se asocian una gran cantidad de individuos³. Se podría

utilizar como una especie bioindicadora ya que se encuentra en aguas no contaminadas, en las cuales se encuentran una gran cantidad de peces. Por último, se puede considerar una especie clave, por su capacidad de regular y mejorar las poblaciones de peces que consume y por el aporte de nutrientes a la selva². Estas características llevan a la nutria gigante a asociarse con una gran cantidad de individuos, los cuales se verían beneficiados con su presencia. Todo lo anterior, conlleva a que sea de gran importancia la protección de esta especie. Los estudios moleculares realizados con la nutria gigante de río son escasos. Por esta razón, identificar el mapa de restricción del mtDNA de esta especie sería un gran avance, el cual, unido con los estudios ecológicos que se han realizado, permitirían conocer un poco más a

cerca de la distribución y necesidades que presenta la especie para desarrollar planes de manejo y conservación. A su vez los estudios filogenéticos y de variabilidad que se han realizado con los Mustélidos son escasos, razón por la cual comparar los mapas de restricción del mtDNA permitiría conocer un poco más acerca de la filogenia de esta familia.

El DNA mitocondrial (mtDNA) se ha venido utilizando para realizar varios tipos de análisis, en especial los que tienen que ver con la filogenia de los individuos. El mtDNA presenta replicación semi-conservativa, ausencia de proteínas cromosomales y pocas o ninguna repetición de genes³. Se encuentran de 100 a 1.000 copias por célula y es heredado únicamente por la madre⁴. En especial el mtDNA de los animales muestra un polimorfismo intra-específico muy alto y en la mayoría de los casos presenta una evolución más rápida que la del DNA nuclear⁵. Dada su heredabilidad por parte de la madre, el mtDNA acumula mutaciones en los linajes. La alta tasa mutacional permite distinguir entre poblaciones altamente relacionadas⁶.

El método de comparación de mapa de restricción permite estimar la variabilidad que se presenta entre los genomas de los diferentes animales, los mecanismos de su evolución y por lo tanto de su poder adaptativo⁷. El conocimiento de las secuencias de los genes, la variabilidad que presentan entre las diferentes poblaciones y su filogenia permitiría tener un mayor conocimiento de la nutria gigante y de la familia Mustelidae.

Este proyecto se relaciona con investigación genética molecular conservacionista que se desarrolla en los zoológicos colombianos y se convierte en un valioso aporte para el estudio de las diferentes especies de la familia Mustelidae, y de otros mamíferos colombianos que se encuentran amenazados en nuestro país.

Por esta razón, el Centro de Biología Molecular del Gimnasio Campestre inició un proyecto que pretende proveer información útil para el análisis, tanto de la especie *P. brasiliensis* como de sus familiares más cercanos, y así, proponer planes de manejo de la especie y su hábitat previniendo su extinción. El objetivo del trabajo fue determinar parcialmente el mapa de restricción del DNA mitocondrial de la nutria gigante de río, *Pteronura brasiliensis*, la taira, *Eira barabara* y el hurón, *Galictis vittata*, usando enzimas de restricción, y establecer las relaciones filogenéticas de este grupo con otros mamíferos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron dos poblaciones de nutrias gigantes de río, *Pteronura brasiliensis*, la primera proveniente del Zoológico de Cali en Colombia y la segunda del Zoológico de Quistococha en Iquitos, Perú. Además se utilizaron muestras de nutria neotropical, *Lontra longicaudis* provenientes de dos zoológicos en Colombia, el primero en Medellín y el segundo en Barranquilla, de taira, *Eira barbara* del zoológico de Santa Cruz y de Hurón, *Galictis vittata* del zoológico de Barranquilla (Tabla 1).

Especie	Nombre Común	No. individuos	Sitios de origen de las muestras
<i>Pteronura brasiliensis</i>	Nutria gigante de río	10	Zoológico de Cali y Zoológico de Quistococha, Perú.
<i>Galictis vittata</i>	Hurón	4	Zoológico de Barranquilla
<i>Eira barbara</i>	Tayra o Ulama	4	Zoológico Santa Cruz en Santandersito.
<i>Lontra longicaudis</i>	Nutria neotropical	4	Zoológico Santa fe en Medellín y Zoológico de Barranquilla.

Tabla 1. Animales que se utilizaron para el estudio y origen de las muestras de sangre y/o pelo.

Obtención del DNA

El DNA se obtuvo de acuerdo con el método publicado por Samper *et al.*, (2002)⁸.

Diseño de oligonucleótidos

Se utilizaron oligonucleótidos específicos diseñados en secuencias conservadas del mtDNA de siete mamíferos de acuerdo con lo publicado por Samper *et al.*, (2002)⁹.

Amplificación de fragmentos del mtDNA por PCR

La amplificación por PCR del mtDNA de la nutria gigante de río y los Mustélidos Colombianos se realizó de acuerdo con lo publicado por Samper *et al.*, (2002)¹⁰.

Corte con enzimas de restricción y construcción de árboles

Obtenido por PCR el mtDNA se cortó con ocho enzimas de restricción (*BamH I*, *Bgl I*, *EcoR I*, *Hha I*, *Hind III*, *Hinf I*, *Sal I* y *Xba I*), y luego, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida, revelando cada una de las bandas y determinando su tamaño.

Con estos resultados se construyó el mapa de restricción.

Adicionalmente, se obtuvieron las secuencias completas del mtDNA que se encuentran descritas en Genbank y EMBL para los diferentes mamíferos. Estas secuencias se analizaron utilizando las mismas enzimas de restricción, obteniendo de esta forma los mapas físicos de restricción teóricos de los mamíferos, los cuales se compararon con los obtenidos experimentalmente. Por último, se realizaron árboles filogenéticos basados en un análisis de parsimonia usando el programa PAUP, y así, se establecieron las relaciones filogenéticas entre los diferentes mamíferos estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La reacción de PCR fue exitosa para tres pares de oligonucleótidos: mt01-mt02, mt07-mt08, y mt11-mt12, los cuales amplificaron fragmentos respectivamente de 2900, 2800, y 3200 pb aproximadamente (Figura 1). Esta amplificación representa el 54% del mtDNA de Mustélidos. El fragmento amplificado de 3200 pb de nutria, hurón y taira fue analizado con 8 enzimas de restricción, obteniendo el mapa físico experimental de esta región del genoma mitocondrial (Figura 2).

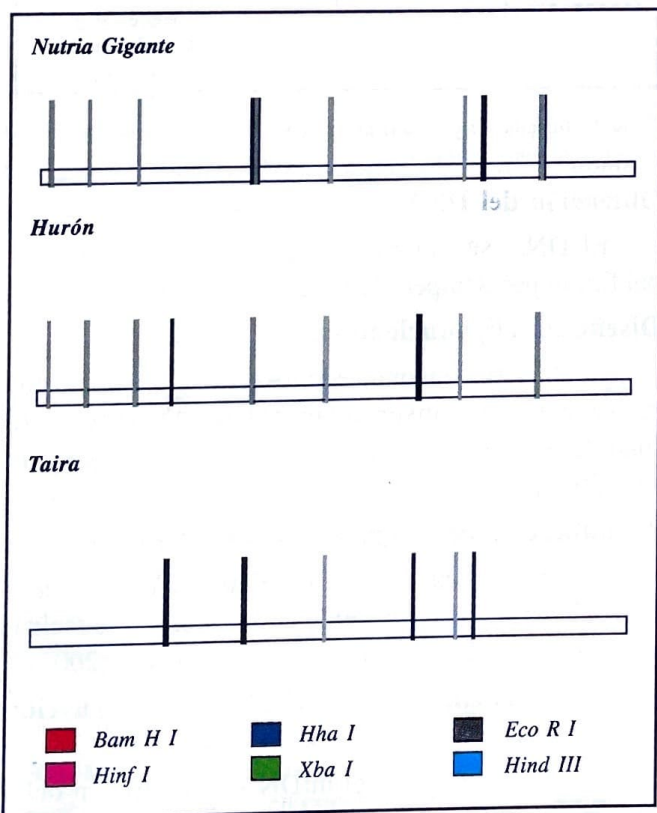
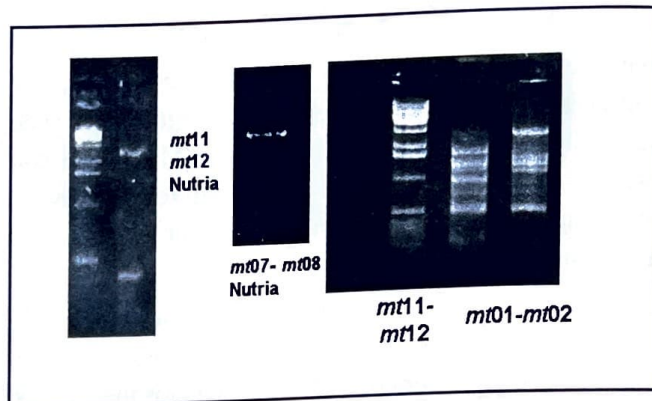


Figura 1. Análisis de restricción del fragmento amplificado con los oligonucleótidos mt11-mt12 del mtDNA de Nutria gigante de río, Hurón y Taira. Se utilizaron 8 enzimas para el análisis de restricción: BamH I (azul oscuro), Hha I (rojo), Hind III (azul claro), Hinf I (verde claro).



	Huma	Nutria	Taira	Hurón
Mt01-mt02	2900	2900	2900	□
Mt07- mt08	2800p	□	2800	□
Mt11- mt12	3200	3200	3200	3200

Figura 2. Productos de amplificación por PCR obtenidos con las tres parejas de oligonucleótidos, mt01-mt02; mt07-mt08 y mt11-mt12.

Además, se realizó el mapa físico de restricción teórico con las mismas endonucleasas para la secuencia del mtDNA descrita para los 7 mamíferos que delimitan los oligonucleótidos mt11-mt12. Esta región comprende los genes: cytb, tRNA-Pro, D-Loop, tRNA-Phe y 12SrRNA.

De los resultados se dedujo que la nutria gigante de río posee 85% de homología con la taira, 70% con el hurón y 18% con los mamíferos estudiados.

Para la elaboración del árbol filogenético se escogieron como datos los 45 lugares de restricción identificados de los cuales 15 fueron informativos para el análisis de parsimonia. El árbol presentó una división en dos grupos: i) humanos y ii) los demás mamíferos (Figura 3). En la división del segundo grupo se observó una politomía, formándose tres subgrupos (mayo 2001): a) la foca; b) perro, ballena, nutria gigante, hurón y taira; y c) gato, burro y rinoceronte. Los tres Mustélidos y el perro mostraron una mayor relación entre ellos que con las demás especies de mamíferos presentando un alto valor de repetición de 62 y una baja distancia filogenética de 0,8 coincidiendo con clasificaciones previas. De acuerdo con las clasificaciones de Pough *et al.* (1999) y Ledje & Arnason (1995), el perro, la nutria, la taira, el hurón y la foca deberían formar un grupo ya que todos pertenecen al orden Carnívora y pertenecen a los Canidae; este grupo debería estar separado de la ballena, la cual debería ubicarse con los Perisodactile. El otro grupo está formado por el gato, el burro y el rinoceronte. Nuevamente esto no concuerda con la clasificación teórica, ya que el gato al pertenecer al orden

Carnívora, está más emparentado con el perro, la nutria, la taira, el hurón y la foca, todos Carnívoros. El gato se separa de este grupo, dejando a los animales pertenecientes al orden Perisodactile en un único grupo, con un valor de repetición de 60. No se observa un grupo formado por las especies pertenecientes al orden

Carnívora. Con todo esto, no se dilucidó la relación que existe entre las 3 especies de Mustélidos. Se hace necesario continuar con el mapa de restricción para robustecer el análisis parsimonioso por PAUP y poder aclarar las relaciones filogenéticas y evolutivas de estas especies.

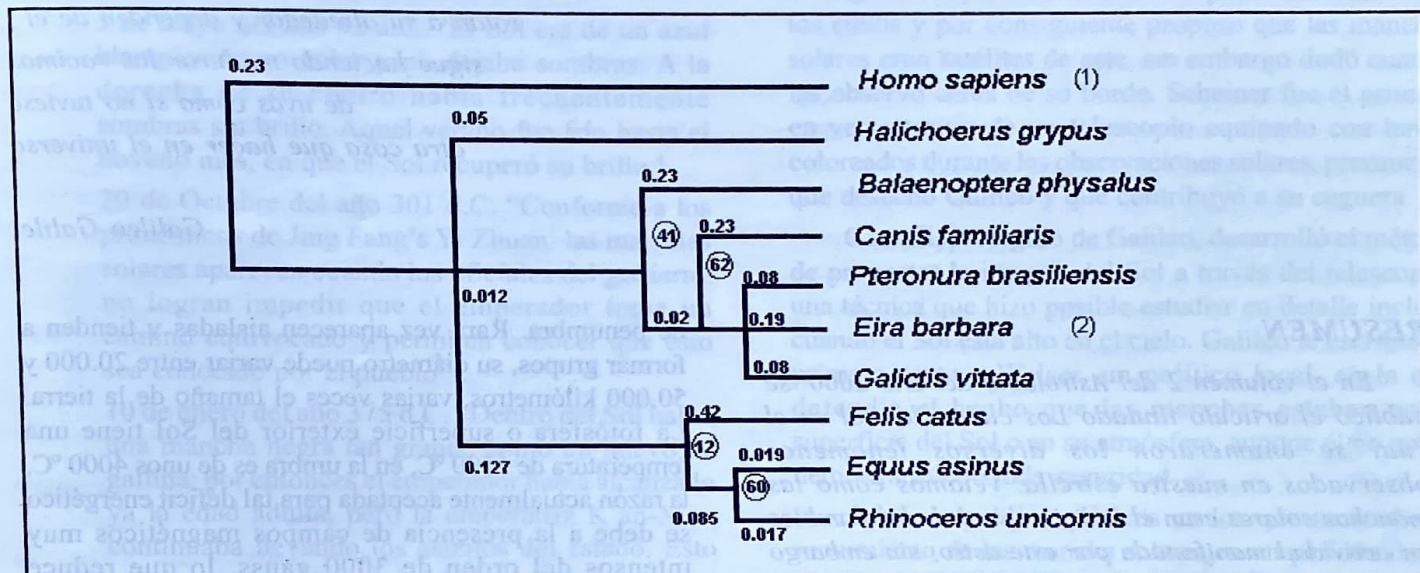


Figura 3. Árbol filogenético basado en un análisis de parsimonia de los sitios de restricción para el fragmento amplificado con la pareja de oligonucleótidos mt11-mt12 (Heuristic Search PAUP 4.0). Se muestran los valores bootstrap (entre círculos, como porcentaje de 1.000 replicaciones) y la longitud de cada una de las ramas. 1. Humano; 2. Foca, ballena, perro, nutria gigante, taira, hurón, gato, burro y rinoceronte respectivamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Martínez, A. M. 1998. Algunos aspectos del uso del hábitat de la nutria gigante de río *Pteronura brasiliensis* (Gmeling 1788) y anotaciones sobre su comportamiento en el río Meta, Caquetá medio, Amazonía Colombiana. Tesis de grado Fundación Universidad Jorge Tadeo Lozano. Bogotá, Colombia.
- Gómez, J.R. 1999. Ecología alimentaria de la nutria gigante (*Pteronura brasiliensis*) en el bajo río Bitá. (Vichada-Colombia) Tesis de grado Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Bogotá, Colombia.
- Griffiths, A.J., W.M. Gelbart, J. H. Miller, R.C. Lewontin. 1999. Modern genetic analysis. W. H. Freeman and company. New York.
- Melton, T. 1999. About Mitochondrial DNA. <http://www.mitotyping.com/aboutmt.html>. Mitotyping Technologies.LLC.
- Avice, J. 2000. Phylogeography. The history and formation of species, first edition. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Torroni, A., T. Schurr, C Yang, E. Szathmary, R. Williams, M.S. Schanfield, G.A. Troup, W. Knowler, D. Lawrence, K. Weiss, D. Wallace. 1992. Native American Mitochondrial DNA Analysis Indicates that the Amerind and the Nadene Populations were founded by two Independent Migrations. Genetics 130:153-162.
- Cann, R., M. Stoneking, A. C. Wilson. 1987. Mitochondrial DNA and Human evolution. Nature 325: 31-36.
- Samper, M., Hernández, J., Monsalve, H., Corredor, G y Bernal, J. 2002. Estandarización de un método para aislar DNA a partir de muestras de pelo de Mustelidos. El Astrolabio, v. 2 No 1.
- Samper, M., Hernández, J., Monsalve, H., Corredor, G y Bernal, J. 2002. Diseño de oligonucleótidos universales para la amplificación completa del mtDNA DE Mustelidos por la reacción en cadena de la polimerasa. El Astrolabio, v. 2 No. 1.
- Samper, M., Hernández, J., Monsalve, H., Corredor, G y Bernal, J. 2002. Estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa para la amplificación del mtDNA en Mustelidos. El Astrolabio, v. 2 No. 1.