

ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP) DEL GEN RIBOSÓMICO 18S RNA DE NUTRIA GIGANTE DE RIO *Pteronura brasiliensis*

Hernández, J^{1*}, Acosta, A², Gutiérrez, A³, Hoyos, M.,⁴ Esguerra, A.,⁴
Merizalde, D.⁴ y Bernal, J.⁵

Grupo de Investigación en Genética Molecular de Nutria de Río del Gimnasio Campestre

1. Coordinador Centro de Biología Molecular Gimnasio Campestre; 2. Aspirante a B.Sc. Biología Pontificia Universidad Javeriana
3. Estudiante 10° grado Gimnasio Campestre; 4. Estudiantes 8° grado Gimnasio Campestre; 5. Director Centro de Biología Molecular,
Rector Gimnasio Campestre.

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

RESUMEN

Con el fin de identificar las bondades de la metodología de RFLP se realizó un análisis de un fragmento del gen ribosómico 18S RNA de dos Nutrias Gigantes de Río, el cual se amplificó por PCR y después se cortó con las enzimas de restricción Hind III, EcoR I, BamH I, Hinf I, Bgl I, Xba I y Sal I. Los perfiles electroforéticos observados fueron idénticos para las dos Nutrias, hembra y macho. Las enzimas Hind III, EcoR I, Bgl I y Xba I no cortaron el fragmento del gen 18S RNA, Por el contrario, las enzimas BamH I, Hinf I y Sal I si cortaron el fragmento del gen 18S RNA. La enzima BamH I produjo tres bandas de aproximadamente 30, 40 y 230 pares de bases aproximadamente. La enzima Hinf I produjo dos bandas de 200 y 100 pares de bases aproximadamente y la enzima Sal I produjo dos bandas de peso molecular muy parecido a las bandas producidas por la enzima Hinf I de 190 y 110 pares de bases aproximadamente. La metodología de RFLP provee un invaluable recurso para mapeo genético.

Palabras clave: *Pteronura brasiliensis*, Nutria de Río, gen ribosómico 18S RNA, enzimas de restricción.

SUMMARY

With the purpose to identify the utility of RFLP methodology an analysis of a ribosomic gen 18S RNA fragment of two giant otters was made. The fragment was amplified by PCR and then cut with Hind III, EcoR I, BamH I, Hinf I, Bgl I, Xba I and Sal I restriction enzymes. The electroforetic profiles observed for both otters male and female were identical. The Hind III, EcoR I, Bgl I and Xba I enzymes didn't cut the gen. The BamH I enzyme made three bands approximately 30, 40 and 230 base pairs. The Hinf I enzyme made two bands of approximately 200 and 100 base pairs, and Sal I enzyme made two bands of very similar molecular weight than those produced by Hinf I enzyme of 190 and 110 base pairs approximately. The RFLP methodology is a great resource for gen mapping.

Key words: *Pteronura brasiliensis*, Giant otters, ribosomic gen 18S RNA, restriction enzymes.

INTRODUCCIÓN

En Sudamérica encontramos cuatro de las trece especies de nutrias existentes en el mundo. Estas se distribuyen desde las selvas del Darién colombianas hasta las costas de Argentina y Chile. Dos de las especies suramericanas se encuentran en Colombia: la nutria neotropical *Lontra longicaudis*, más pequeña, solitaria y nocturna, y la nutria gigante de río *Pteronura brasiliensis*. Se han descrito nutrias gigantes en las cuencas de los ríos Arauca, Orinoco, Vichada, Bitá, Tomo, Tuparro y Tuparrito, como también en la serranía de la Macarena^{1,2}.

La nutria gigante es una de las especies más amenazadas de nutrias en el mundo. La Unión Mundial para la Natura-

leza UICN en 1994 publicó el Libro Rojo, en donde se describen las especies colombianas en peligro de extinción en el cual la nutria aparece como especie vulnerable. El número de nutrias en Colombia se ha reducido considerablemente por la destrucción de las selvas tropicales, la pesca excesiva, la contaminación de las aguas, la cacería ilegal y el turismo local².

Actualmente, no existen mayores trabajos en genética o biología molecular de la nutria gigante. La mayoría de estudios están relacionados con la ecología y etología de la nutria describiendo el hábitat, alimentación, conductas y estado de conservación^{1,2,4}.

Koepfli & Wayne³ publicaron un trabajo sobre las relaciones filogenéticas de nutrias basados en secuencias

mitocondriales del citocromo *b*. Ellos estudiaron las relaciones entre 9 de 13 especies de nutrias y su relación filogenética dentro de la familia Mustelidae utilizando la secuencia nucleotídica completa del gen citocromo *b*. Otros grupos de investigación han trabajado en filogenia molecular de la familia Mustelidae basándose también en las secuencias nucleotídicas del citocromo *b*^{5,6}.

Moncayo⁷ en el Centro de Biología Molecular del Gimnasio Campestre realizó un estudio en citogenética y determinación del gen del choque térmico (*hsp70*) en mustélidos, lo cual es un buen aporte para futuros estudios de la especie *Pteronura brasiliensis*.

La nutria gigante de río perteneciente a la subfamilia Lutrinae, es una especie única en sus adaptaciones semiacuáticas que la diferencian de sus parientes de la familia Mustelidae. Es un grupo carnívoro del cual se desconoce aún su evolución con respecto a sus parientes las nutrias de los ríos de Norte América, neotropicales y marinas. Según el estudio realizado por Koepfli & Wayne³ mediante secuencias nucleotídicas de citocromo *b* mitocondrial, no se pudieron resolver sus relaciones filogenéticas por este medio con sus otras parientes y se sugirió que su entrada a Sur América debió ser en el Pleistoceno y se cree que descende del Plioceno tardío al Pleistoceno temprano del género *Satherium* proveniente de Norte América que inmigro de Asia durante el Plioceno³.

Son realmente pocos los estudios hechos en Colombia acerca de su genética y biología molecular. La nutria gigante de río se ve afectada por diferentes tipos de enfermedades víricas y parasitarias, y gravemente amenazada por la contaminación de las aguas, su cacería incontrolada y la pesca excesiva lo que la hace una especie con gran necesidad de estudio.

En este trabajo se amplificó por PCR el gen ribosomal 18S RNA y se analizó con enzimas de restricción mostrándose un mapa físico del gen. Este modelo de estudio molecular puede ser utilizado para hacer mapas físicos de otros genes o partes del genoma que posean algún interés evolutivo, adaptativo o médico. En este momento en el Centro de Biología Molecular se está realizando el mapa físico del DNA mitocondrial de la Nutria.

METODOLOGÍA

Aislamiento de DNA. Muestras de sangre periférica de Nutria de Río obtenidas del Zoológico de Cali se utilizaron para obtener DNA purificado por el método de Salting out⁸.

Reacción en Cadena de la Polimerasa. Un segmento del gen ribosomal 18S RNA se amplificó utilizando una mezcla de reacción que contenía 200 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1X PCR buffer, 1U de Taq DNA polimerasa, 20 pM de oligonucleótidos "primers" 18S-a y 18S-b y 100 g de DNA. La

reacción se llevó a cabo en un termociclador de bloque HYBAID Omn-E, UK, utilizando un programa que comprendió 5 ciclos de 30 seg. a 94°C, 40 seg. a 62°C y 40 seg. a 72°C; 5 ciclos de 30 seg. a 94°C, 40 seg. a 60°C y 40 seg. a 72°C; 10 ciclos de 30 seg. a 94°C, 40 seg. a 55°C y 40 seg. a 72°C; y 15 ciclos de 30 seg. a 94°C, 40 seg. a 52°C y 40 seg. a 72°C; con una extensión final de 5 min a 72°C.

Restricción enzimática. El segmento del gen amplificado se cortó con las enzimas Hind III, EcoR I, BamH I, Hinf I, Bgl I, Xba I y *Sal I*. A 0,5 µg de DNA se adicionó 1X buffer específico y 2,5U de enzima y esto se repitió para cada una de las enzimas y se incubó a 37°C durante 6 horas de acuerdo con las especificaciones de la casa comercial fabricante (Gibco BRL, USA).

Análisis de la restricción. Una alícuota de 10 µL de reacción de restricción se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó en un transiluminador.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los genomas de gran tamaño se pueden mapear tanto física como genéticamente. Los mapas físicos se basan en el análisis directo de las moléculas de DNA que constituyen cada cromosoma, incluyendo tanto mapas de restricción como colecciones ordenadas de clones genómicos de DNA (Figura 1), que se pueden considerar como representaciones incompletas o parciales del mapa físico completo, que sería la secuencia lineal continua de todos los nucleótidos que forman el genoma⁹. Recientemente los métodos del DNA recombinante han permitido utilizar como marcadores genéticos pequeñas secuencias de DNA que pueden diferir entre individuos de la población sin producir ningún efecto detectable en el organismo. Uno de los marcadores genéticos de este tipo más utilizados se basa en que pequeños cambios en la secuencia de DNA pueden modificar los patrones de corte de las endonucleasas de restricción, produciendo importantes diferencias en las longitudes de ciertos fragmentos de restricción del DNA en esa zona. Asimismo pueden variar las longitudes de los fragmentos de restricción debido a pequeñas inserciones o deleciones que afecten a un número reducido de bases. A estas pequeñas diferencias entre individuos se les denomina polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción RFLP⁹. Un RFLP es tanto más útil cuanto más frecuente sea la población, ya que existe una probabilidad mayor de que los padres de un cierto individuo porten marcadores diferenciables. Esta es una de las razones por las cuales la base de los marcadores RFLP más útiles sean las secuencias cortas repetidas que se encuentran en número muy variable en los diferentes individuos⁹.

En este trabajo particular se amplificó un fragmento del gen ribosomal 18S RNA de dos nutrias de río (macho y hembra) de aproximadamente 300 pares de bases de longitud. La Figura 2 presenta los fragmentos de restricción con las

enzimas *Hind* III, *Eco*R I, *Bam*H I, *Hinf* I, *Bgl* I, *Xba* I y *Sal* I. Los carriles 2 al 8 presentan los RFLPs de la nutria macho y los carriles 9 al 13 de la nutria hembra. Los perfiles observados son idénticos para los dos individuos. Es poco probable que dentro de la misma especie se encuentren polimorfismos de restricción si las poblaciones tienen el mismo origen y procedencia, como se presenta en este caso. Las enzimas *Hind* III, *Eco*R I, *Bgl* I y *Xba* I no cortaron el fragmento del gen 18S RNA, lo que indica que el gen no posee las secuencias nucleotídicas A ACGTT, G AATTC GCCNNNN NGGC y TC TAGA sitios de reconocimiento para estas enzimas. Por el contrario, las enzimas *Bam*H I, *Hinf* I y *Sal* I si cortaron el fragmento del gen 18S RNA. La enzima *Bam*H I produjo tres bandas de aproximadamente 30, 40 y 230 pares de bases aproximadamente, que indica la presencia de dos sitios de corte de la secuencia G GATCC. La enzima *Hinf* I produjo dos bandas de 200 y 100 pares de bases aproximadamente, con un solo sitio de corte para esta enzima en la secuencia G ANTC y la enzima *Sal* I produjo dos bandas de peso molecular muy parecido a las bandas producidas por la enzima *Hinf* I de 190 y 110 pares de bases aproximadamente, con un único sitio de corte en la secuencia G TCGAC adyacente al sitio *Hinf* I.

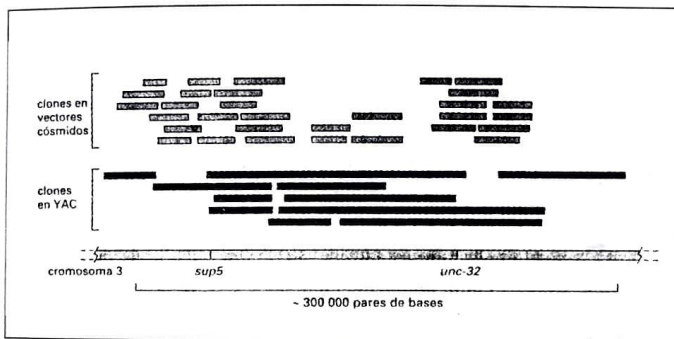


Figura No 1. Clones de DNA genómicos solapados. La colección de clones que se muestran cubren una pequeña una pequeña región del cromosoma del gusano nemátodo *Caenorhabditis elegans* y representa un 0,3% del genoma total (de *Biología Molecular de la Célula*, 1996. Alberts et al.).

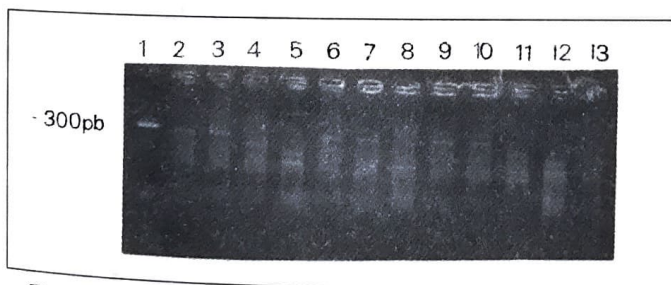


Figura No 2. Restricción enzimática del gen ribosómico 18S RNA de 300 pares de bases aproximadamente (Carril 1), amplificado por PCR. Carriles 2-7 restricción del producto amplificado a partir del DNA de la nutria hembra con las enzimas *Hind* III, *Eco*R I, *Bam*H I, *Hinf* I, *Bgl* I, *Xba* I y *Sal* I. Carriles 8-13 restricción del producto amplificado a partir del DNA de la nutria macho con las enzimas *Hind* III, *Eco*R I, *Bam*H I, *Hinf* I, *Bgl* I y *Xba* I. pb: pares de bases.

Los RFLP son útiles para el mapaje genético gracias a que las diferencias de tamaño de fragmento que un individuo hereda se detectan con gran facilidad mediante transferencia de Southern utilizando una sonda DNA complementaria a dicha región. Además, los RFLP permiten relacionar el mapa genético con el mapa físico: por un lado sirven como verdaderos marcadores genéticos, como el color de los ojos; por otro lado las sondas DNA que permiten detectar son secuencias DNA que se pueden localizar con relativa facilidad en el mapa físico mediante hibridación de DNA⁹.

Como se puede ver, los RFLP son una herramienta importante para la realización de mapas parciales y totales de genomas completos. Uno de los objetivos de este trabajo es estudiar las posibilidades que brinda la metodología de RFLP para la realización de mapas parciales del genoma de la Nutria de Río como un aporte importante en el estudio de la genética molecular de esta especie que se encuentra en peligro de extinción.

BIBLIOGRAFÍA

Defler, T. 1986. Association of the giant otter (*Pteronura brasiliensis*) with fresh water dolphins (*Inia geoffrensis*). *J. Mammal.* 64:692 pp.

Gómez, J. 1999. Ecología alimentaria de la Nutria Gigante de Río (*Pteronura brasiliensis*) en el río Bita (Vichada-Colombia). Tesis de grado Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. 85 pp.

Koefli, K. and Wayne, R. 1988. Phylogenetic relationships of otter (*Carnivora: Mustelidae*) based on mitochondrial cytochrome b sequences.

Modofli, E. and Trebban, P. 1978. Distribution and Status of giant otters in Venezuela, en otters, N. Duplaix ed. *Proceedings IUCN Otter Specialist Group Meeting*; IUCN Publication, New Series.

Masuda, R. and Yoshida, M. 1994. A molecular phylogeny of the family Mustelidae (Mammalia, Carnivora) based on comparison of mitochondrial cytochrome b nucleotide sequences. *Zool.Sci.* 11:605-612.

Moore, W. and DeFilippis, V. 1997. The window of taxonomic resolution for phylogenies based on mitochondrial cytochrome b. in *Avian molecular evolution and systematics*: 83-119. Mindel, D. (Ed.). San Diego, CA: Academic Press.

Moncayo, E. 2001. Caracterización citogenética y molecular del gen *hsp-70* de Mustelidos. Tesis de posgrado Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Miller, S. Dykes, D. and Polesky, H. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cell. *Nucleic Acid. Res.* 16: 1215.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. *Biología Molecular de la Célula*. 1996. 3ra edición. Ediciones OMEGA, S.A. España.