

Propuesta de investigación:

FORTALECIMIENTO DE LA COLECCIÓN CIENTÍFICA DE INVERTEBRADOS

Por: Dr. Carlos I. Molina A.

Resumen ejecutivo:

El planteamiento del proyecto, fue iniciado mediante mi inserción como investigador al Instituto de Ecología (IE) y en donde el responsable de la Unidad de Zoología así como el pasado directo del IE, iniciaron gestiones de apertura para el manejo de las muestras de invertebrados de la Unidad de Limnología. Estas negociaciones, también posibilitaron la asignación de espacio físico dentro las instalaciones de Limnología e iniciar el trabajo planteado. Para el año en curso, recién la Unidad de zoología pudo asignar un presupuesto (3026Bs) y de esta manera empezar el trabajo de curatorial de los invertebrados. Por otro lado, mediante la obtención un fondo de proyecto: "Biorremediación de las zonas de Huatajata y Bahía Cohana del Lago Titicaca y Revalorización Cultural Económica de la Totorá" (proyecto obtenido conjuntamente con el colega Dario Achá de la Unidad de Calidad Ambiental), para la presente gestión se tiene agnado un presupuesto (10 000 Bs), lo cual está sirviendo para la compra de material y reactivos para el componente molecular del mismo proyecto, así como la presente propuesta. Para la siguiente gestión, se prevé incrementar estos fondos para el componente molecular y de esta manera fortalecer la presente propuesta con la búsqueda de otros fondos y así consolidar este proyecto como una actividad permanente dentro el IE.

1. Introducción

Las colecciones biológicas están consideradas como una de las categorías más importantes de los museos, que junto con las colecciones de arte e historia, hacen parte del patrimonio de la humanidad, pues constituyen la fuente básica de investigaciones científicas, específicamente de estudios taxonómicos y sistemáticos, biogeográficos, evolutivos, ecológicos y de biodiversidad (Mesa & Bernal 2005, García 2015).

Aunque los Artrópodos no son los animales más pintorescos o carismáticos, pero si son uno de los grupos biológicos más diversos y

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Puras y Naturales
Carrera de Biología - Instituto de Ecología
Área de Zoología

de gran adaptación a distintos hospederos y hábitats (Mesa & Bernal 2005). En nuestro país, a través del esfuerzo de algunas instituciones, el proceso de inventario y colección de la biodiversidad de la fauna, comenzó relativamente tarde (fines de la década de los 70's) en comparación con algunos países de la región.

En nuestra ciudad de La Paz, a iniciativa del investigador alemán Werner Hanagarth, promovió la unificación tanto de colecciones del Museo Nacional de Historia Natural de Bolivia (MNHN), unidades del Instituto de Ecología (IE) y de esta manera consolidación del Colección Boliviana de Fauna (CBF). Este investigador contribuyó significativamente al repositorio de especímenes de invertebrados (dominados por Artrópodos) y en la formación de técnicos y nuevos profesionales en la taxonomía de algunos grupos de invertebrados. En la década de los 90's, quedó como responsable de la sección de invertebrados el docente-investigador Lic. Raúl Altamirano, quién luego, para el año 2005, por cuestiones de salud tuvo que retirarse de la UMSA. Posteriormente, la colección de invertebrados quedó acéfala y, de un tiempo hasta esta parte, ésta quedó a cargo de algunos investigadores de planta del MNHN y asociados a la CBF.

Hoy en día, gracias al avance de las técnicas moleculares, está posibilitando el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas de muchos grupos de organismos, haciendo que en la actualidad las mismas se conviertan en procesos rutinarios para todos los sistemáticos. Estas técnicas están revolucionando el lento, y en muchos casos impreciso proceso del conocimiento clásico de la taxonomía. A pesar de esta realidad, hoy en día en nuestras instituciones dedicada al proceso curatorial de especímenes ha quedado estancado y el trabajo únicamente se restringe al mantenimiento de las muestras presentes. En este sentido, está propuesta plantea de una serie de actividades a ejecutarse a mediano y largo plazo para el fortalecimiento de la colección científica de Artrópodos mediante la incorporación de muestras de invertebrados de la Unidad de Limnología e incorporación del componente molecular bajo normas internacional curatoriales.

2. Antecedentes

A parte de mi orientación en la parte de ecología y contaminación ambiental, a lo largo de mi carrera profesional he tenido una fuerte inclinación al trabajo del inventario de la

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Puras y Naturales
Carrera de Biología - Instituto de Ecología
Área de Zoología

biodiversidad bajo un sistema estricto curatorial. Este trabajo de inicio en la Universidad Nacional de Tucumán (Museo Miguel Lillo de Ciencias Naturales) y la Universidad Nacional de La Plata (Museo de Naturales de La Plata), lugares donde tuve la oportunidad de compartir experiencia y trabajar con algunos de ellos, así como los investigadores: Axel Bachmann, Mónica Lopéz Ruf y Eduardo Domínguez. También estuve vinculado mediante la tesis doctoral a investigadores del Museo de Historia Natural de París, así como el Dr. François Gibon con quién tuve la posibilidad de realizar tanto colectas, descripciones de nuevas especies y colección de especímenes del orden Tricoptera (resguardados actualmente por la Unidad de Limnología).

Posteriormente, mediante la subvención de una beca familia me fui a trabajar a la Universidad de Copenhague (Museo Natural de Copenhague) y así relacionarme con gente de renombre en el campo de la cladística de Lepidopteros; Dr. Niels P. Kristensen. Esta última experiencia en Dinamarca, me permitió mi incursión en el campo de la identificación molecular de insectos acuáticos. Hoy en día, a partir del soporte de las técnicas moleculares en la sistemática convencional, las colecciones científicas están teniendo mayor valor en la precisión científica de la identificación ya sea ayudando el esclarecimiento de especies crípticas y de esta manera al fortalecimiento de las colecciones científicas de invertebrados.

3. Justificativo

La unidad de Limnología, tradicionalmente realiza estudios sobre la evaluación de la calidad de ambientes acuáticos desde el punto de vista del muestreo de las comunidades biológicas. Estas comunidades, en su mayoría están dominadas por invertebrados y de los cuales, los insectos son en su mayoría. En este sentido, Limnología ha estado realizando un sin número de muestreos en ambientes acuáticos y muchos de los especímenes colectados prácticamente tienen un dominio personal de cada investigador y muchas veces se desconoce el destino de las bases de datos. Además muchas de estas muestras se desperdician porque no tienen un manejo periódico de conservación de las mismas. Este comportamiento descrito, previamente fue observado por muchos investigadores dentro de IE, pero desafortunadamente no se hizo nada para cambiar esta situación.

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Puras y Naturales
Carrera de Biología - Instituto de Ecología
Área de Zoología

Por otro lado, fortalecer las colecciones biológicas dentro el Instituto de Ecología y CBF, es contribuir desde las funciones sustantivas a la docencia en la Carrera de Biología e investigación en la apropiación del conocimiento de la biodiversidad del nuestro país para interactuar con mayor incidencia con nuestra sociedad.

4. Objetivos

4.1 Objetivos general

Fortalecer la colección científica de Artrópodos, mediante la incorporación de especímenes y su respectiva base datos de invertebrados de la Unidad de Limnología hacia la CBF.

4.2 Objetivos específicos

Esta propuesta plantea los siguientes objetivos a ser implementas en dos plazos de tiempo.

Mediana plazo:

- Revisar especímenes e incorporar a un sistema de catalogación a los Artrópodos existes en la Unidad de Limnología.
- Homogenizar sistema de codificación bajo el sistema Internacional de la Nomenclatura Zoológica.
- Posibilitar el dominio único de una misma base de datos.
- Fortalecer la sinergia entre las diferentes áreas del IE para conservación y catalogación de especímenes de invertebrados.
- Contribuir a la formación de estudiantes en la sistemática de grupos particulares de Artrópodos.

Largo plazo:

- Incorporar el componente molecular en la delimitación de especies en especímenes de dudosa identificación.
- Consolidar la librería del DNA-Barcode de los especímenes de la CBF.
- Fomentar y apoyar al inventario de la biodiversidad Nacional de Bolivia.
- Fortalecer el cuerpo de curadores y lograr adecuada financiación para el crecimiento y mantenimiento de las colecciones científicas.

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Puras y Naturales
Carrera de Biología - Instituto de Ecología
Área de Zoología

- Generar una cultura interna de depósito y curaduría de muestras testigo ("voucher") que sirvan para validar las investigaciones en el campo de los invertebrados de medios acuáticos.

5. Metodología

5.2 Limpieza de individuos preservados en alcohol.

La preservación en un medio líquido puede realizarse para cualquier grupo de ejemplares entomológicos, es utilizada generalmente para insectos de cuerpo blando como efemerópteros, isópteros, plecópteros, trichópteros y dípteros (incluyendo larvas, ninfas y pupas). La preservación en líquido se realiza en viales de vidrio y con una torunda de algodón, donde el espécimen ó grupo de individuos se preservan totalmente cubierto con alcohol al 95%. Afortunadamente, por el mismo desarrollo de las técnicas moleculares, este sistema de conservación posibilita luego la recuperación de material genético para muestras que no tengan muchas antigüedad. Los ejemplares mejor serán fotografiados y esto a su vez posibilitará la construcción de las base de datos.

5.3. Sistematización de la información.

Los datos de cada individuo ó grupo de individuos se registrarán por el momento en una base de Excel, diseñada para consignar la información más importante y valiosa de los especímenes que se depositan en la presente colección, como ser: código dentro de la colección, datos taxonómicos, datos del lugar y fecha de colecta, métodos de colecta y nombre del colector.

Adicionalmente, las columnas dispuestas en la base de datos, permitirán la generación de las tres etiquetas básicas (código de catalogación, datos sobre la colecta y datos taxonómicos) que se depositan en cada vial de vidrio bajo las siguientes características:

Código	Resumen etiqueta_localidad	Resumen etiqueta_taxonómica
IE-CBF/Eph(Baet)00028	BOLIVIA, La Paz, Caranavi, Sarapiquí 10-Ene-2015, 15°27'37"S, 67°28'22,7"O, 400m. En los alrededores del campamento. Colecta Manual. Col.: C. Molina.	Ephemeroptera, Baetidae, <i>Andesiops</i> <i>peruvianis</i> Ulmer 1920. Det.: C. Molina, 20-Ene-2016

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Puras y Naturales
Carrera de Biología - Instituto de Ecología
Área de Zoología

La impresión de las etiquetas se realizó según el formato estándar:

- Papel blanco libre de ácido u opalina.
- Tamaño, 10 mm X 20 mm.
- Tipo de letra, Arial tamaño 6, numeración (tipo de letra Arial negrilla).
- Impresión en láser.

5.4 Almacenamiento

Para facilitar el acceso y mantenimiento de las muestras de colección, estas serán almacenadas en frascos plásticos de 250 ml con códigos de jerarquías de órdenes y familia. Estas muestras serán resguardadas en un armario metálico y evitando la incidencia directa de luz solar.

5.5 Código de barras de ADN

El material genético se obtendrá tanto en larvas como en adultos en base al protocolo sugerido por Molina et al. (2017). En el caso de las larvas se utilizó la cabeza y para los adultos, se utilizaron las patas, ya que en su composición la cantidad de lípidos es menor a la de otras estructuras.

Para el protocolo de extracción se aplicará el sistema comercial Wizard™ DNA Purification System (Promega®) modificado, basado en la lisis química y precipitación con sales, añadiendo DTT (0,5 M) y Proteinasa K (100 mg/l) en la etapa de lisis e incrementando el tiempo de precipitación con isopropanol, debido a que los tejidos utilizados, presentan una elevada cantidad de proteínas. La cantidad y calidad de ADN, se determinará mediante un espectrofotómetro, utilizando la razón de absorbancia de 260/280 nm, donde valores comprendidos entre 1,6 y 1,9 se consideran indicadores de buena calidad del ADN y muestras con valores < 1,6 pueden indicar la presencia de proteínas u otros elementos absorbentes de UV en la muestra, tales como compuestos orgánicos, entre ellos el fenol. Los valores > 1,9 indican la presencia de ARN (Amaru et al., 2006).

La amplificación del fragmento de interés se realizará utilizando el sistema comercial Colorless Master mix (Promega®). La reacción se llevará a cabo en un termociclador AmpliTronix ThermalCycler Series Four Nixtech, de acuerdo a las condiciones de temperatura especificadas (desnaturalización inicial de 95 °C x 5 min, seguido de

Universidad Mayor de San Andrés
Facultad de Ciencias Puras y Naturales
Carrera de Biología - Instituto de Ecología
Área de Zoología

30 ciclos de desnaturalización, a 94 °C x 30 s, anillamiento a 50 °C x 30 s, extensión a, 72 °C x 1 min y una elongación final de 72 °C por 5 minutos). Se utilizaron cebadores específicos LCO1490-HCO2198 (Folmer et al., 1994), para amplificar y secuenciar un fragmento de 556 pb del gen mitocondrial de la subunidad I Citocromo Oxidasa I (COI). Los amplicones, se visualizan en geles de poliacrilamida al 6 %, coloreados con nitrato de plata (García, 2000).

Los ampliaciones purificados, serán secuenciados en el laboratorio de la laboratorio técnico científico de la Universidad de la Policía Nacional de Bolivia (UNIPOL), cuyo convenio de trabajo y colaboración está en fase de preparación.

Posteriormente, luego de contar con el seguimiento desde el repositorio adecuado del espécimen y la secuencia genética, toda esta información será subida al portal del sistema BOLD (Barcode of Life Data System, <http://www.boldsystems.org>) y esto nos permitirá la generación de código biológico de barras y la comparación de las diferentes entidades biológicas.

6. Referencias bibliográficas

- Amaru, R., Miguez, H., Peñaloza, R., Torres, G., Silvestre, J., Cuevas, H., 2006.- DNA-UMSagen, extracción de DNA genómico para diagnóstico molecular: método rápido y económico. Cuadernos, 2: 11-15.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994.- DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 5: 294-299.
- García, P. H. M., 2000.- Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Univ. Diag., 1 (2): 31-41.
- García, A. G. 2015. Protocolo de manejo, cuidado y preservación de la colección de artrópodos y otros invertebrados de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá.
- Mesa R., D. P., & Bernal, A. A. 2005. Protocolos para la preservación y manejo de colecciones biológicas. Boletín Científico - Centro de Museos, 10, 117 - 148.
- Molina C.I., Gibon F.-M., Dominguez E., Pape T., & Rønsted N. 2017. Associating immatures and adults of aquatic insects using DNA barcoding in high Andean streams. Ecología en Bolivia 52(2): 88-99.