

## Plaguicidas y variabilidad genética del Pez *Oligosarcus schindleri* Menezes y Gery 1983 en dos lagunas andinas de Bolivia

Mirtha Rivero L.<sup>1</sup>, Fernando M. Carvajal V.

<sup>1</sup>Unidad de Limnología Recursos Acuáticos, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia  
<sup>1</sup>limnomrl@fcyt.umss.edu.bo

### Resumen

Se presenta el contenido de plaguicidas organoclorados (Heptacloro) y organofosforados (Clorpirifos) en las aguas de las lagunas andinas La Angostura (Municipio de Arbieta; noviembre 2018) y Acero Khocha (Municipio de Vacas; octubre 2019) en el departamento de Cochabamba, y la variabilidad genética en 520 (pb) de la Región de Control (RC, DNAm) del pez platincho *Oligosarcus schindleri* Menezes & Géry 1983, especie endémica de Bolivia y amenazada de extinción. La Angostura mostró valores de contaminación de las aguas con Heptacloro, pero no con Clorpirifos, mientras que ambos pesticidas fueron indetectables en Acero Khocha. No se detectó variación en las secuencias del locus analizado; los individuos de platincho de la Angostura y Acero Khocha presentaron el mismo haplotipo en el fragmento de la RC. El contenido de plaguicidas en las aguas posiblemente no tenga una relación con la ausencia de variabilidad genética observada, pero el uso permanente de estos contaminantes puede tornarse en una amenaza inmediata para las poblaciones relictas de platincho con variación genética disminuida y amenazado severamente por su distribución reducida y otras perturbaciones humanas realizadas desde varias décadas.

**Palabras clave:** *Organoclorados, Organofosforados, Especie endémica, Región de Control (DNAm), Characiformes, Platincho o Plateado.*

### 1. Introducción

Los plaguicidas son utilizados en la producción de alimentos para prevenir, eliminar o controlar plagas que generan enfermedades en plantas. Son una de las pocas alternativas para minimizar o eliminar pérdidas en las cosechas y mantener la calidad de los alimentos (Ichikawa 2015). El flujo de plaguicidas hacia los sistemas acuáticos ocurre generalmente por escorrentía superficial o lluvia. También se desplazan por infiltración o lixiviación hacia las capas profundas de suelo, alcanzando las capas freáticas o canales de drenaje que se comunican con cuerpos de agua superficiales. Una vez que estos compuestos orgánicos entran al sistema acuático pueden degradarse en la columna de agua o en los sedimentos donde se depositan. Estos depósitos asociados a los compuestos orgánicos tóxicos ingresan a la cadena alimentaria, mediante la cual sirven de alimento a los macroinvertebrados bentónicos, y estos a su vez sirven de alimento a otros organismos acuáticos como los peces.

Los plaguicidas se acumulan en los tejidos grasos de los organismos, e incrementan en proporción al nivel trófico que alcanzan. Aumentan progresivamente su toxicidad como consecuencia de la velocidad de absorción superior a la velocidad de eliminación. Así, se produce la bioacumulación y biomagnificación de plaguicidas; este último se refiere al aumento de concentración del contaminante a medida que se transmiten de un nivel trófico a otro superior (Pastor, 2002). Los plaguicidas al degradarse en la columna de agua pueden acumularse en los organismos como peces o macroinvertebrados. El proceso de asimilación implica atravesar la epidermis del tracto respiratorio e intestinal, y el subsecuente estrés fisiológico (Morgan, 1989; Moreno, 2003). La absorción de los plaguicidas produce trastornos a nivel de la morfología, fisiología y genética de los organismos (Polanco *et al.* 2019). Los principales efectos de toxicidad reportados son a nivel neurológico y endocrino (fisiológico), en los cuales se alteran los procesos de crecimiento, desarrollo, reproducción, y todos ellos en el reclutamiento. En consecuencia, los efectos de intoxicación pueden alterar

la constitución y variabilidad genética de las poblaciones y/o comunidades de ambientes acuáticos en periodos cortos de tiempo.

El pH de las aguas tiene influencia sobre la estabilidad de plaguicidas organofosforados. El pH básico produce una hidrólisis alcalina al reaccionar el ion oxidrilo con la molécula de fósforo. Por lo tanto, la degradación de pesticidas organofosforados se acelera en condiciones de pH básicos. Los herbicidas y fungicidas son los pesticidas más sensibles al pH de las aguas (Hock, 2000). La temperatura puede incrementar la tasa de reacciones químicas en las aguas, la volatilización de plaguicidas, y actividad biológica, y por lo tanto el incremento de la temperatura puede acelerar la degradación de plaguicidas (Rico, 1999).

Las importaciones de plaguicidas en Bolivia se incrementó en el año 2016 corresponde a 5.772.412,83 kilos (16%), con respecto al año 2010 cuya importación fue de 1.289.641,52 kilos (4 %) (Saravia, 2017 en base a los datos del portal Gran Paititi, SENASAG). Este incremento regional es alarmante y denota el incremento de plaguicidas, desertificación, y crecimiento del sector productivo agrícola. La misma fuente indica que la contaminación de agua por agroquímicos en Cochabamba es de 60.9%. Este aumento paulatino del sector productivo de alimentos está generando un problema ambiental de magnitud en los ecosistemas acuáticos, puesto que fertilizantes y plaguicidas pueden ser transportados fácilmente por escorrentía e infiltración a los acuíferos.

Las cuencas y alrededores de las lagunas Angostura (Municipio de Arbieto) y Acero Khocha (Municipio de Vacas), son zonas agrícolas tradicionales en el Valle Alto del departamento de Cochabamba dedicadas al cultivo de diferentes productos para la alimentación (p.e frutas, granos, tubérculos, hortalizas, entre otros). El uso de plaguicidas en proximidades de estas lagunas es inevitable y frecuente, puesto que existen pocas alternativas para mitigar las pérdidas por plagas periódicas, y a ello se suma la limitada información de los usuarios para usar y manejar adecuadamente estas sustancias tóxicas (Rivero *et al.*, 2019). La incidencia de los plaguicidas sobre la salud humana local se evidencia según los casos de intoxicación por plaguicidas reportados en las provincias Esteban Arce (38 casos, 0.74%, jurisdicción que incluye La Angostura) y Tiraque (90 casos, 2.4%, jurisdicción que incluye Acero Khocha) entre el periodo 2010 y 2016 en el departamento de Cochabamba (Saravia 2017, según

datos del SNIS).

Tanto las lagunas de Vacas como de la Angostura están sujetas a perturbación antrópica en continuo crecimiento por actividades turísticas, recreativas, extractivistas (pesca), agrícolas, y aumento de la población rural. La actividad agrícola es la más importante para la economía local y regional, y por lo tanto emplea diferentes plaguicidas (p.e. insecticidas, fungicidas y herbicidas) para controlar plagas que atacan los cultivos más aptos y establecidos. El uso de los plaguicidas genera contaminación de las aguas superficiales principalmente durante la época de lluvias (Rivero *et al.*, 2019). El movimiento de aguas contaminadas hacia las lagunas, principalmente con insecticidas (Sabra y Mehana, 2015), se torna en una amenaza para los peces y la fauna acuática que contribuyen al normal funcionamiento ecológico del sistema, y otras actividades económicas locales como la pesca comercial y de subsistencia.

En el 2016-2018 un estudio titulado “Evaluación de residuos de plaguicidas en macroinvertebrados y peces de consumo en la cuenca del valle alto de Cochabamba” (informe no publicado), realizado por la Unidad de Limnología y Recursos Acuáticos (ULRA) y el Centro de Aguas y Saneamiento Ambiental (CASA), evaluó la concentración de 10 plaguicidas en aguas de la laguna Angostura. Este estudio concluyó que los compuestos Atrazina, Heptacloro (organoclorados) y Dimetoato, Clorpirifos y Metil Paration (organofosforados) fueron elevados según una guía de referencia de calidad de agua, y potencialmente existe impacto negativo sobre los organismos acuáticos. Por otra parte, en la laguna de Acero Khocha (Vacas) no se realizaron estudios hasta la actualidad, y solo se conocen condiciones fisicoquímicas (pH, T, OD, conductividad) colectadas durante el “Estudio socioeconómico y ambiental para el manejo y Conservación de tres lagunas de la comunidad de Vacas” (Castellón *et al.*, 2007). entre los años 2005 y 2019.

Las pesquerías juegan un rol importante a nivel local porque proporcionan alimento (proteínas y lípidos) de alta calidad a bajo costo, a la población rural caracterizada por tener elevados índices de pobreza y desnutrición (Mamani *et al.* 2019). En ambas lagunas, habita una especie de pez de tamaño mediano conocido como platincho o plateado *Oligosarcus schindleri* Menezes & Géry 1983, el cual aporta a las pesquerías y es emblemático por ser endémico de Bolivia y amenazado de extinción por diferentes perturbaciones

humanas (Carvajal-Vallejos *et al.* 2009). Esta especie ha sido poco estudiada a nivel biológico y ecológico, no obstante, de su aporte a la seguridad alimentaria y ser parte del patrimonio natural exclusivo de Bolivia. El efecto de los plaguicidas sobre la fauna acuática de la Angostura y Acero Khocha todavía no ha sido explorado, al margen de los servicios ecosistémicos (p.e. pesca de consumo, recreación) que ellos brindan. Los plaguicidas pueden generar múltiples efectos negativos sobre los peces, entre ellos la disminución de la variabilidad genética de poblaciones (Hamilton *et al.*, 2016).

En este sentido, el presente estudio tuvo por objetivo determinar si existe alguna relación entre el contenido de plaguicidas en las aguas de las lagunas Angostura y Acero Khocha, y la variabilidad genética en un fragmento del DNA mitocondrial del pez platincho, en un periodo específico del ciclo hidrológico anual (octubre-noviembre).

## 2. Métodos

### Descripción del área de estudio

La laguna La Angostura (10.2 km<sup>2</sup>, 2702 msnm, -17.530342 latitud y -66.104369 longitud) se ubica dentro el municipio de Arbieto, provincia Esteban Arce, departamento de Cochabamba, sobre una planicie fluvio lacustre. Se caracteriza por ser un embalse artificial, con agua turbia permanente y mineralizada. Su posición corresponde al nivel mesotropical (Navarro y Maldonado, 2002). El clima es semiárido y mesotérmico (semifrío). Presenta temperatura media anual del aire de 18°C. La transparencia varía entre 12-30 cm (disco Secchi). El oxígeno disuelto oscila entre 48.3-103.5%, ocurriendo los más bajos durante el periodo de sequía. La conductividad es de 546-1104  $\mu\text{Scm}^{-1}$ , denotando su estado salino. Los sólidos suspendidos varían de 551-1090 mgL<sup>-1</sup>, los valores más bajos se observan durante la sequía y los mayores durante la temporada de lluvias. La clorofila "a" presenta concentraciones de 12-38  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Los valores promedio en el agua de fosforo es de 1.80 mgL<sup>-1</sup>, los

nitratos mostraron concentraciones de 0.3 mg N-NO<sub>3</sub>L<sup>-1</sup> y la Demanda Química de Oxígeno de 43.5 mgO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup>. El pH es básico, presentando valores de 7.6 a 8.8. Los valores de pH se aproximan a la neutralidad durante los meses de lluvia (enero-febrero). La temperatura promedio de las aguas es de 18.6-21.3 °C.

La laguna Acero Khocha (5.9 Km<sup>2</sup>, 3425 msnm, -17.596166 latitud y -65.597684 longitud) se encuentra en el municipio de Vacas, provincia Araní, Cochabamba. Se caracteriza por ser endorreica y de origen tectónico. Su posición corresponde a los pisos ecológicos de cabecera de valle y puna (Navarro & Maldonado, 2002). El clima es seco (mayo a septiembre) y frío (abril a octubre), con temperatura promedio de 12-13° C. En los meses invernales de mayo a junio, la temperatura es por debajo de 10 °C. La precipitación anual en los meses de verano es 550 mm. La transparencia media es de 5.7 a 104.9 cm (disco Secchi). El oxígeno disuelto presenta valores de 67.7-249%; los valores más elevados dependen de la actividad fotosintética. La conductividad es elevada (933-1455  $\mu\text{Scm}^{-1}$ ), lo que define un estado salino. La concentración de sólidos suspendidos es de 37-727.3 mgL<sup>-1</sup>, dándose los mayores valores durante la época seca. La clorofila "a" varía de 5.4-31  $\mu\text{L}^{-1}$ . Los valores de DQO son elevados (102 mg O<sub>2</sub>/l), reflejando alto contenido de materia orgánica. De igual manera, las concentraciones de fósforo (0.1-17.4 mg PL<sup>-1</sup>), denotan enriquecimiento orgánico. Los nitratos presentan valores menores a 5 mg N-NO<sub>3</sub>L<sup>-1</sup>. El pH de las aguas es básico, oscilando entre 9.1-10.6. La temperatura promedio de las aguas es 13.4 a 20.9 °C, siendo mayor durante el verano (Rivero *et al.*, 2019).

Estas lagunas poseen aguas alcalinas; y con base en la OECD, 1982, y los valores de fosforo total, nitrógeno total, clorofila "a", y transparencia, se sugiere que son eutrófica e hipereutrófica. Los valores elevados de fosfatos y DQO, indican que existe contaminación actividad antrópica, o residuos de fertilizantes y plaguicidas.

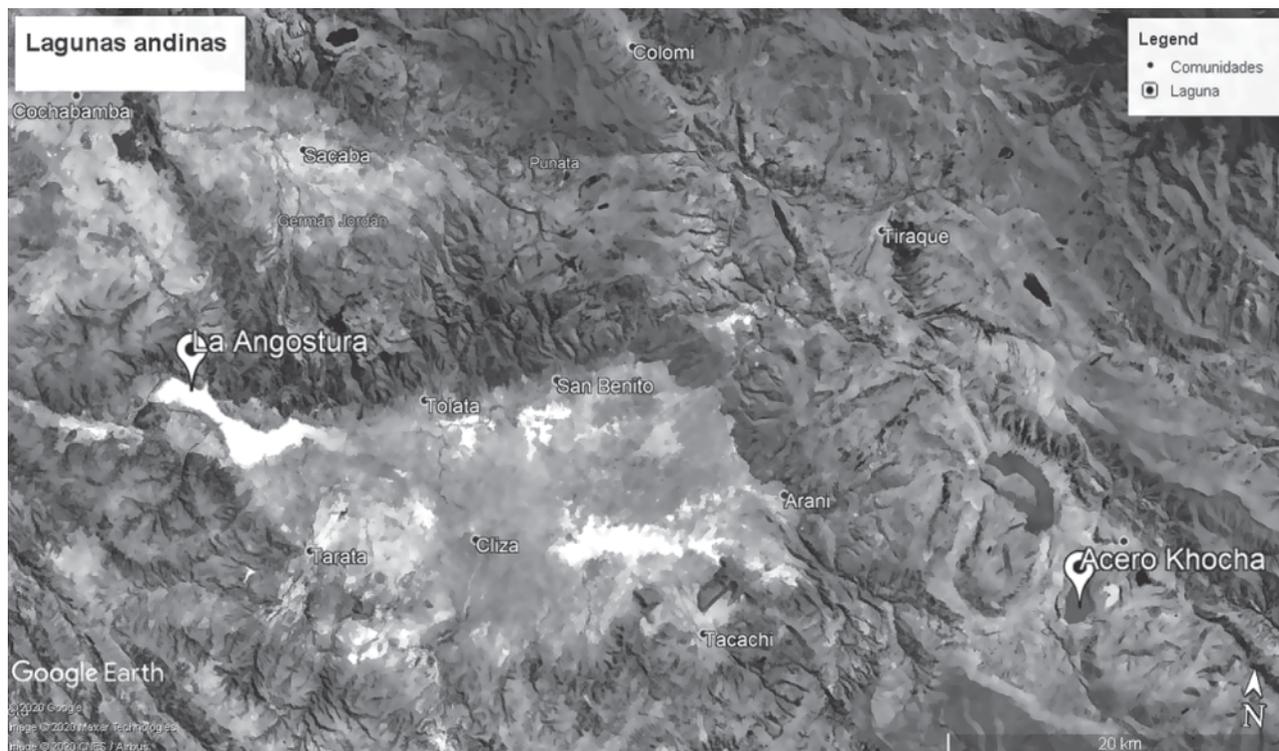


Figura 1. Representación geográfica de las lagunas Angostura (Municipio de Arbieto) y Acero Khocha (Municipio de Vacas) visitadas para la colecta de muestras de agua y peces platincho (*Oligosarcus schindleri* Menezes & Géry 1983) en noviembre de 2018 y octubre de 2019, Departamento de Cochabamba, Bolivia.

### Colecta de agua y análisis químicos

La colecta de muestras de agua en la Angostura y Acero Khocha se realizó en la zona litoral (Figura 1.), siguiendo los Procedimientos Normalizados de CASA, Universidad Mayor de San Simón (UMSS). El muestreo para el análisis de plaguicidas se realizó en frascos de vidrio ámbar de un litro con tapa de teflón y preservadas con diclorometano. La colecta en la Angostura fue realizada durante noviembre de 2018, y en Acero Khocha durante octubre 2019.

### Análisis de plaguicidas

Para la cuantificación de los residuos de plaguicidas en las muestras de agua se utilizó el método EPA 3510, 2011 (extracción líquido - líquido por agitación de la muestra con Diclorometano). Los análisis se determinaron según Procedimientos Normalizados de Operación (Standard Methods for the Examination of water and wastewater, 2012) método EPA 8081A y EPA 8141A modificados para plaguicidas organoclorados y organofosforados, respectivamente. Se utilizó un cromatógrafo de gases SHIMADZU 17A equipado con un detector de captura de electrones (ECD) para los

compuestos organoclorados y un detector termoiónico de llama (FTD) para los organofosforados. Los parámetros del sistema y los datos cromatográficos fueron controlados y analizados usando el software SHIMADZU CLASS VPTM 4.3. El gas portador fue helio, se utilizó una columna Cpsil19cb (Varian) (50 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,2  $\mu$ m de espesor de película). El modo de inyección fue Split-Splitless, la temperatura del inyector de 220 °C. El programa de temperatura fue: 100 °C durante 2 min, 100-150 °C a 15 °C min<sup>-1</sup>, 150 °C durante 5 min, 150-240 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>, 240 °C durante 11 min, 240-245 °C a 10 °C min<sup>-1</sup>, y finalmente a 245 °C durante 19,5 min. Las condiciones de los detectores fueron los siguientes: detector ECD a 300 °C, gas portador He (presión de entrada 60 kPa, relación 1:10, gas de arrastre N<sub>2</sub> a 80 kPa y 15 mL min<sup>-1</sup>); detector FTD a temperatura de 290 °C, gas portador He a 60 kPa, relación 1:10, gas de reposición (He) a 80 kPa y 30 mL min<sup>-1</sup>, Hidrógeno a 50 kPa y 3 mL min<sup>-1</sup>, aire a 30 kPa y 80 mL min<sup>-1</sup>. La cuantificación se realizó a través del método del estándar externo y/o interno y los picos se identificaron según su tiempo de retención.

Los plaguicidas analizados en agua de las lagunas fueron Heptacloro, Dimetoato y Clorpirifos. El límite de detección del equipo fue menor a  $0.05 \mu\text{gL}^{-1}$ .

Se evaluó el contenido de plaguicidas con base en valores de la guía de calidad del agua, Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación, República Argentina (2005), y la guía canadiense para la protección de la vida acuática (CCME, 2001). Se clasificó la calidad del agua como contaminado (C) y no contaminado (NC).

### Colecta de peces

La colecta de peces se realizó en las lagunas Angostura y Acero Khocha empleando redes argalleras de 10 a 20 mm de rombo, con 50-100 m de largo por 2-3 m de alto. Los peces capturados fueron transportados en hielo al laboratorio de ictiología de la ULRA.

De cada ejemplar se extrajo  $0.5-0.7 \text{ cm}^3$  de músculo de la porción dorsal derecha del cuerpo para ser preservado en alcohol etílico al 95%. El cuerpo de los peces fue etiquetado y fijado en formol al 4%, para ser depositados en la colección ictiológica de la ULRA-Museo Alcide d'Orbigny.

### Extracción de DNA

El DNA genómico fue extraído de las muestras de músculo conservados en alcohol siguiendo una modificación del procedimiento CTAB de Doyle & Doyle (1987). La extracción consistió de un precalentamiento de la solución de extracción (5% de hexadeciltrimetil bromuro de amonio [CTAB, Sigma], NaCl 5M, EDTA 0.5 M pH 8, Tris.Hcl 1 M) a  $60^\circ\text{C}$  en estufa. Posteriormente, alrededor de 100 mg de músculo seco triturado se introdujo en un tubo (2 mL) con 1 mL de la solución de extracción CTAB precalentada más  $15 \mu\text{L}$  de Proteinasa K ( $10 \text{ mgmL}^{-1}$ ) (Sigma). Este tubo fue incubado en estufa a  $60^\circ\text{C}$  por el lapso de 8-10 h, con agitaciones ocasionales cada 2-3 h para acelerar y mejorar la digestión. Una vez que la solución adquirió un aspecto homogéneo y los fragmentos de músculo fueron digeridos, se añadió 1 mL de Cloroformo y se mezcló vigorosamente el contenido por 5 min, antes de someterlo a 8 000 rpm (5 min). Una vez centrifugado,  $750 \mu\text{L}$  del sobrenadante fueron transferidos a un tubo estéril (1.5 mL) para ser mezclados suavemente (2 min) con  $750 \mu\text{L}$  de Isopropanol a  $-5^\circ\text{C}$ . Esta mezcla se dejó reposar a  $-20^\circ\text{C}$  por 2 h para precipitar el DNA. Pasado el tiempo de reposo, la solución fue sometida a 13 000 rpm durante 15 min para separar y concentrar el DNA en forma de un ovillo blanquecino sobre las paredes o el fondo del

tubo. La solución sobre el ovillo fue descartada cuidadosamente y en su lugar se añadió  $750 \mu\text{L}$  de Etanol (70 %), para un lavado final de 15 min a 13 000 rpm. Después del lavado, se descartó el etanol y se dejó secar el ovillo a temperatura ambiente por 5-7 h para eliminar los residuos de etanol. Finalmente, el DNA resultante fue resuspendido en  $50 \mu\text{L}$  de agua ultrapura para su posterior dilución y uso en las reacciones de amplificación.

Amplificación de la Región de Control (DNA mitocondrial) y secuenciamiento

Se eligió y evaluó las secuencias haplotípicas parciales de la Región de Control (RC) o DLoop del DNA mitocondrial (DNAm) en virtud de que su tasa de evolución rápida (William *et al.* 2004) sumado a su herencia materna, lo convierten en un descriptor extremadamente adecuado para estudiar fenómenos evolutivos recientes a nivel de las poblaciones (Avice *et al.* 1987; Ballard & Whitlock 2004). La RC es de longitud variable (aprox. 720 - 1400 pb – Satoh *et al.* 2016), y fue uno de los fragmentos más utilizados del genoma mitocondrial para estudios de genética de poblaciones en peces, basados sobre secuencias (Lee *et al.* 1995). Los patrones de distribución del número de diferencias entre haplotipos han sido utilizados para delinear procesos evolutivos de poblaciones (Excoffier 2004; Rogers 1995; Rogers & Harpending 1992). De esta manera, varios métodos han sido aplicados para estimar los parámetros de las poblaciones y para probar hipótesis biológicas de evolución temprana (p.e. Fu 1997; Tajima 1989).

Se amplificaron y obtuvieron secuencias parciales de la RC para 10 individuos de platincho de Acero Khocha y 10 de la Angostura, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los cebadores (primer) DL20 F (Forward) (ACCCCTAGCTCCCAAAGCTA) de Agnès *et al.* (2006) y DL20 R (Reverse) (TTAGCAAGGCGTCTTGGGCT) (Carvajal-Vallejos, 2013). La amplificación de toda la RC fue llevada a cabo en  $25 \mu\text{L}$  de volumen de reacción conteniendo  $2.5 \mu\text{L}$  de tampón 10X (Invitrogen),  $1.0 \mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM, Invitrogen),  $4 \mu\text{L}$  de dNTPs (2 mM cada dNTP, Thermo Scientific),  $1.2 \mu\text{L}$  de cada cebador (DL20 F y DL20 R,  $10 \mu\text{M}$ ), 1.2 U de *Taq* polimerasa (Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen), aproximadamente 100 ng de extracto de DNA total genómico ( $1.0 \mu\text{L}$  de extracción), y  $13.98 \mu\text{L}$  de agua ultrapura. El régimen del ciclo de temperaturas estuvo compuesto de una desnaturalización inicial a  $94^\circ\text{C}$  por 2 minutos, seguido

de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C (1 min), hibridación a 50°C (1 min), extensión a 72°C (1.5 min), y una extensión final a 72°C por 5 min para terminar refrigerado a 4°C. Cada reacción de PCR incluyó un control negativo de tubo de reacción, en el cual se incluyeron todos los reactivos excepto la plantilla de DNA. Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador MyGene, MG96G (Germany). Los productos de PCR fueron secuenciados utilizando el cebador DL20 F para obtener un fragmento de 520 pb. El secuenciamiento fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias y Tecnología, UMSS, empleando un secuenciador ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

### 3. Resultados

#### Plaguicidas

El contenido de Heptacloro en las aguas de la Angostura fue de 0.06  $\mu\text{gL}^{-1}$ , denotando contaminación de las aguas por ser superior al valor guía 0.01  $\mu\text{gL}^{-1}$ . Respecto a la concentración de Clorpirifos, no se encontró residuos de este compuesto. Por lo tanto, se puede clasificar el sitio de colecta como no contaminado.

El contenido de Heptacloro y Clorpirifos en Acero Khocha fue indetectable por los equipos empleados. Por lo tanto, se puede considerar al sitio colectado como no contaminado por estos plaguicidas.

#### Variabilidad genética

El análisis del fragmento de 520 pares de bases de la RC del DNA mitocondrial, mostró que tanto los ejemplares examinados de la laguna Acero Khocha como de la laguna Angostura, se constituyen de un único haplotipo. Esto significa que todos los ejemplares fueron idénticos a nivel de la secuencia obtenida y no se puede detectar alguna influencia del contenido de plaguicidas en las lagunas, u otros factores de orden geográfico, ecológico, histórico, o climático.

### DISCUSIÓN

El valor elevado de Heptacloro en la laguna Angostura durante el inicio de las lluvias (noviembre), puede deberse a la escorrentía con arrastre de material alóctono que ocurre en toda la periferia y cuenca de la laguna, donde se han establecido cultivos estacionales y permanentes sometidos al control de plagas periódicamente. La característica de lixiviación de este producto es que pueden ser arrastrados por el agua de lluvia por su solubilidad elevada. Los organoclorados

son empleados principalmente para el control de insectos, y su uso parece ser más intenso que los fosforados (Clorpirifos). (Soler 2002) sugiere que el heptacloro posee elevada toxicidad para los peces (CL-50 a 96 h, 1-4  $\mu\text{gL}^{-1}$ ), ya que estos organismos pueden incorporar este pesticida en periodos cortos de tiempo mediante absorción branquial o la cadena trófica. La laguna Acero Khocha presentó niveles indetectables de los plaguicidas Heptacloro y Clorpirifos, posiblemente debido al efecto del pH básico sobre la estabilidad de los plaguicidas. Los clorpirifos tienen vida media de 36 horas a pH entre 8-9. La conductividad alta de las aguas al contener cationes Ca, Mg, Fe, Al, Na, K, también pueden inactivar los sitios activos de los plaguicidas como la Atrazina (herbicidas), (Hock, 2000). Se recomienda completar la investigación, considerando mayor número de muestras en distintos periodos del año y ambas lagunas, porque es posible que estos plaguicidas y otros sean detectables durante o después de la época de lluvias.

La ausencia de variabilidad genética observada en las muestras de platincho, puede ser resultado de un cuello de botella por disminución drástica de las poblaciones dentro de cada laguna debido a eventos recientes de mortandad causados por acciones humanas (p.e. uso de plaguicidas, contaminación orgánica de las aguas, sobrepesca, desvío de cursos de agua, introducción de especies, entre otros), o eventos históricos climáticos recientes que impactaron en el tamaño (volumen de agua) o condiciones del ambiente (decremento de temperatura). La identificación de un único haplotipo identificado en la región hipervariable del DNAm estudiada, denota su posible vulnerabilidad a una extinción por cambios drásticos en el ambiente acuático, generados por contenido de contaminantes (p.e. plaguicidas), cambio climático (p.e. disminución de niveles de agua, descenso o ascenso extremo de temperaturas, entre otros), sobrepesca, u otros factores perturbadores (p.e. introducción de especies). La ausencia de variación en el fragmento estudiado, también podría deberse a una baja tasa de mutación del DNAm, y una elevada tasa de mutación del DNA nuclear, como ha sido observado en algunos grupos acuáticos (Hellberg 2006) y debe ser sujeto de futuras investigaciones por ser poco común en peces. Aunque no se puede descartar que los pesticidas tengan una relación con la ausencia de variabilidad genética observada en el platincho, el uso y presencia de estos contaminantes en las aguas representa una amenaza potencial para las poblaciones relictas de esta especie.

en lagunas estudiadas. A futuro, se recomienda continuar los estudios de variabilidad genética en la especie platincho complementando la secuencia total de la RC, incluyendo otros loci del DNA mitocondrial (p.e. CytB), y/o del genoma nuclear (p.e. microsatélites). Esta información dará un panorama más amplio sobre la variabilidad genética poblacional de esta especie endémica y amenazada en las lagunas de Cochabamba, y por tanto sobre su vulnerabilidad a la extinción por actividades humanas (p.e. contaminación por plaguicidas), la cual parece ser elevada.

#### Agradecimientos

A la Dirección de Investigación Científica y tecnología (DICyT), Facultad de Ciencias y Tecnología (FCyT), y la Agencia Sueca para el Desarrollo de la Investigación (ASDI), que hicieron posible la realización del proyecto “Evaluación de la variabilidad genética del pez platincho y su relación con el contenido de plaguicidas en dos lagunas de Cochabamba-Bolivia”. A Daniel Guzmán Duchén por su colaboración para la obtención de secuencias de DNA.

#### 4. Referencias bibliográficas

- Agnèse, J.-F., F. Zentz, O. Legros y D. Sellos. 2006. Phylogenetic relationships and phylogeography of the killifish species of the subgenus *Chromaphyosemion* (Radda, 1971) in West Africa, inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 332–346.
- Awise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Neigel, C.A. Reeb y N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489–522.
- Ballard, J.W.O. y M.C. Whitlock. 2004. The incomplete natural history of mitochondrial. *Molecular Ecology*, 13: 729–744.
- Castellón, D., M. Rivero, J. Verduguez, H. Muñoz, F. Acosta y R. Ayala. 2007. Estudio socioeconómico y ambiental para el manejo y conservación de tres lagunas de la comunidad de Vacas. Unidad de Limnología y Recursos Acuáticos, Centro de Aguas y Saneamiento Ambiental. Agencia sueca de Cooperación Internacional para el Desarrollo (ASDI) – Suecia. Cochabamba – Bolivia. 27 p.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). 2001. Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life (CEQGs). Environment Canada. Hull, Quebec. 8 chapters.
- Carvajal-Vallejos, F.M., H. Muñoz, E. De La Barra y A. Argote. 2009. Threatened fishes of the world: *Oligosarcus schindleri* Menezes & Gery 1983 (Characidae). *Environmental Biology of Fishes*, 85: 39-40.
- Carvajal-Vallejos, F.M. 2013. Phylogeny and population genetics of the fish performing the largest migration known in freshwater, the Amazonian catfish *Brachyplatystoma rousseauxii*: Revelations from the Upper Madera Basin. Tesis de Doctorado. Universidad de Montpellier 2, Montpellier, Francia. 170 p.
- Doyle, J.J. y Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11–15.
- Excoffier, L. 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology*, 13: 853–864.
- EPA (2000). Environmental Protection Agency. Test Methods of Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods – Chapter Four – Organic Analytes – 4.1. Sample Considerations. Recuperado de [www.epa.gov/SW-846/pdfs/chapter4.pdf](http://www.epa.gov/SW-846/pdfs/chapter4.pdf) - Dato tomado 10/10/19
- Fu, Y.-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.
- Hamilton, P.B., I.G. Cowx, M.F. Oleksiak, A.M. Griffiths, M. Grahn, J.R. Stevens, G.R. Carvalho, E. Nicol y C.R. Tyler. 2016. Population-level consequences for wild fish exposed to sublethal concentrations of chemicals - a critical review. *Fish and Fisheries*, 17: 545-566.
- Hellberg, M.E. 2006. No variation and los synonymous substitutions rates in coral mtDNA despite high nuclear variation. *BMC Evolutionary Biology*, 6:24.
- Hock K.W. 2000. Ohio. Extension Pesticides Specialist - Penn State University · Vegetable Production Guide - Bulletin 672-00, Handling Pesticides
- Ichikawa, H. 2015. Neurotoxicology of pesticides. *Brain Nerve*, 67(1): 39-48.

- Lee, W.J., J. Conroy, W.K. Howell, y T.D. Kocher. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 54–66.
- Mamani, Y, J.M. Luizaga, D.E. Illanes. 2019. Malnutrición infantil en Cochabamba, Bolivia: la doble carga entre desnutrición y obesidad. *Gaceta Médica Boliviana*, 42(1): 17-28.
- Morgan, D. 1989. Diagnósticos y tratamiento de los envenenamientos por plaguicidas. 4° ed. EPA, U.S.A. 2-10 p.
- Moreno, M. 2003. Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgo para la salud Humana. Mc Graw-Hill/Interamericana, España. 280-307 p.
- Navarro, G. y M. Maldonado. 2002. Geografía ecológica de Bolivia: Vegetación y Ambientes Acuáticos. Centro de Ecología Simón I. Patiño, departamento de Difusión, Cochabamba, Bolivia. 719 p.
- OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico). 1982. Eutrophication of Waters. Monitoring, Assessment and Control. Cooperative Programmers on Monitoring of Inland Waters.
- Pastor, S. 2002. Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos. Universitat Autònoma de Barcelona, Tesis doctoral.
- Polanco, A., T. Magaña T., J. Cetz y R. Quintal. 2019. Uso de agroquímicos cancerígenos en la region Agrícola de Yucatán, México, Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, 46(2), México, 72-83 p.
- Rivero, M., M. Álvarez, H. Antezana, M. Campero. y S. Castellón. 2019. Evaluación y efectos de plaguicidas en ecosistemas acuáticos de la cuenca del valle alto de Cochabamba- Bolivia. Unidad de Limnología y Recursos Acuáticos, Centro de Aguas y Saneamiento Ambiental. Agencia sueca de Cooperación Internacional para el Desarrollo (ASDI) – Suecia. Cochabamba – Bolivia. 56 p.
- Rico, J.C. 1999. Efecto del pH del agua sobre los agroquímicos. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Buenavista, México.
- Rogers, A.R. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population expansion. *Evolution*, 49: 608–615.
- Rogers, A.R. y H. Harpending. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569.
- Sabra, F.S. y E.-S. E.-D. Mehana. 2015. Pesticides toxicity in fish with particular reference to insecticides. *Asian Journal of Agriculture and Food Sciences*, 3(1): 40-60.
- OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico). Eutrophication of Waters. Monitoring, Assessment and Control. Cooperative Programmers on Monitoring of Inland Waters (Eutrophication Control), Environment Directorate, OECD Paris, Final Report. France. 1982.
- Saravia, I. (2017) Estado actual de la comercialización y uso de plaguicidas en el Departamento de Cochabamba. Trabajo de adscripción para obtener el título de Licenciatura en Biología. Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba-Bolivia. 24-50 p.
- Satoh, T.P., M. Miya, K. Mabuchi y N. Nishida. 2016. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. *BMC Genomics*, 17: 719.
- Standard Methods for the Examination of water and wastewater. (2012). 22<sup>th</sup> Edition. AWWA, APHA, WEF. USA.
- Soler, R.F. 2002. Estado actual de la contaminación por metales pesados y pesticidas organoclorados en el parque natural de Monfragüe. Universidad de Extremadura, Edit. Universidad de Extremadura, España.
- Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación (Argentina). 2005. Niveles Guía Nacionales de la Calidad del Agua Ambiente 2,4-D. DESARROLLOS DE NIVELES GUIA NACIONALES DE CALIDAD DE AGUA AMBIENTE CORRESPONDIENTES A 2,4-D. 23 p.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
- William, J., O. Ballard y C. Whitlock. 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, 13, 729-744.