

Nombre del proyecto:

El ADN ambiental como herramienta de monitoreo y conservación de fauna silvestre

Dra. Patricia Amavet
Laboratorio de Genética (FHUC-UNL),
CONICET

FONDO DE LA CONSERVACIÓN DEL PATRIMONIO
NATURAL DE LA PROVINCIA DE SANTA FE EDICIÓN 2018.

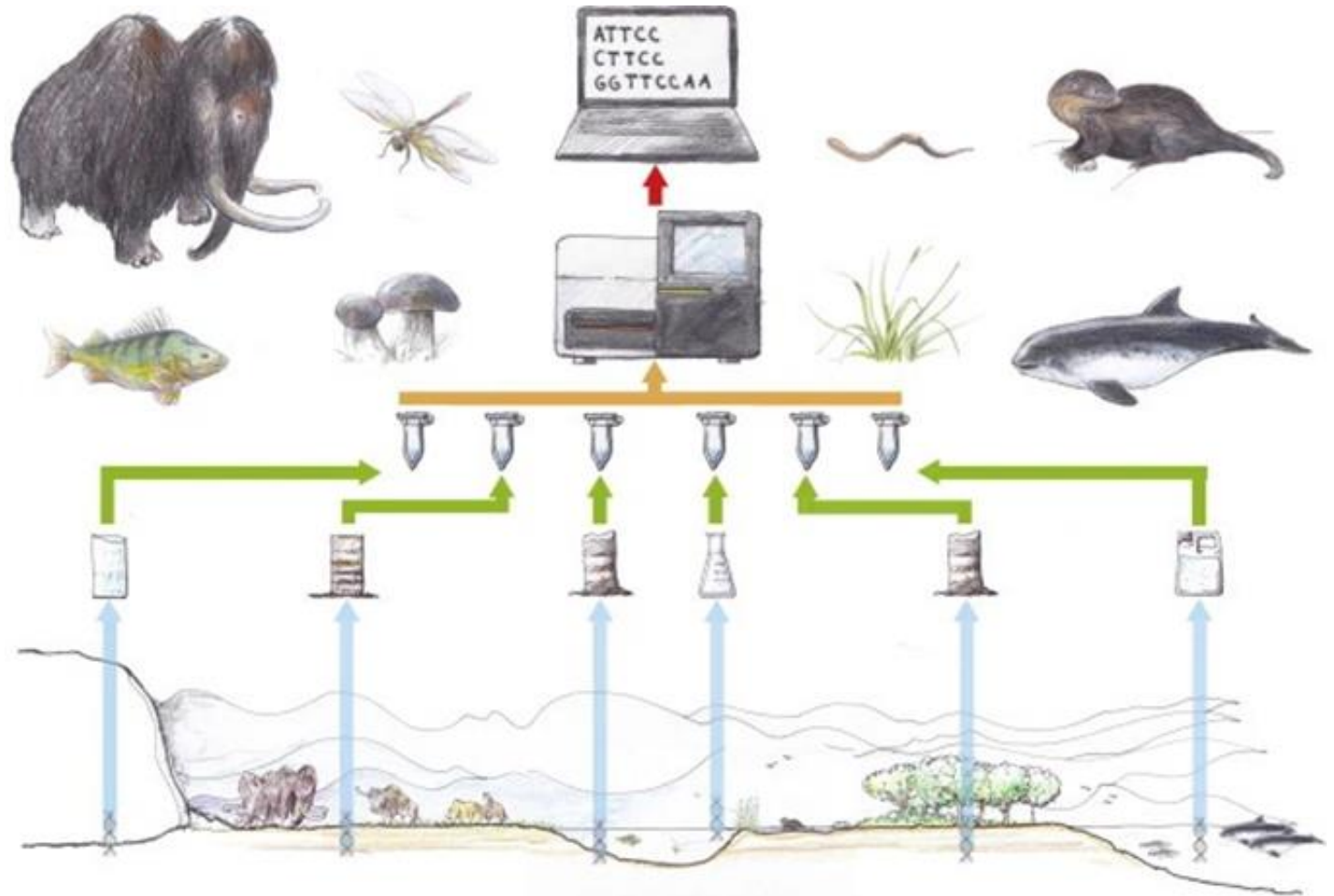
The logo for FHUC (Facultad de Humanidades y Ciencias de la Universidad Nacional de La Plata) consists of the letters 'FHUC' in white, bold, sans-serif font on an orange rectangular background.The logo for UNL (Universidad Nacional de La Plata) consists of the letters 'UNL' in white, bold, sans-serif font on a grey rectangular background.

Objetivos

- ▶ Desarrollar protocolos para la toma de muestras de agua y de suelo que permitan obtener ADN en diferentes tipos de ambientes de la provincia de Santa Fe.
- ▶ Diseñar cebadores para la detección de material genético de aguará guazú en muestras de agua y de suelo.
- ▶ Obtener datos acerca de la presencia y abundancia de ejemplares de esta especie en diferentes tipos de ambientes de la provincia de Santa Fe.
- ▶ Transferir los datos obtenidos a los organismos provinciales y nacionales encargados de implementar programas de protección de especies silvestres, para el diseño de estrategias de conservación y políticas ambientales.

ADN AMBIENTAL (eDNA)

- ▶ Identificación de especies
- ▶ Análisis de biodiversidad
- ▶ Cuantificación de abundancia de especies
- ▶ Útil para especies crípticas o poco frecuentes





Objeto de estudio

AGUARÁ GUAZÚ
(*Chrysocyon brachyurus*)

Status de conservación

- “Casi Amenazado”- UICN
- ARGENTINA:
 - ✓ Programa de Conservación de Especies Amenazadas (o Plan Extinción Cero)
 - ✓ “Vulnerable”
 - ✓ Monumento Natural Provincial

Antecedentes

- Existen escasos estudios genético-poblacionales realizados que incluyen muestras de Argentina obtenidas a partir de heces, animales cazados, muertos, de decomisos, zoológicos y colecciones de museos.
- Los resultados muestran que en el área de distribución existen diferentes unidades genéticas de conservación que deben tener programas de manejo particulares (Raimondi et al., 2015).

Actividades realizadas:

-Adquisición de reactivos y preparación de soluciones.

Kit de extracción PowerMax® Soil
DNA Isolation kit –MOBIO-



Filtros de
polietersulfona (PES)



Actividades realizadas:

-Adquisición de reactivos
y preparación de
soluciones.



Taq polimerasa



Primers



En el marco de acciones relacionadas al manejo intensivo para la recuperación y traslocación de ejemplares rescatados Estación Zoológica Experimental “Granja La Esmeralda” (Min. Producción de Santa Fe) con la intervención de:

- ▶ Ministerio de Medio Ambiente
- ▶ Ministerio de la Producción
- ▶ Museo Cs. Naturales “F. Ameghino”
- ▶ Fac. de Cs Veterinarias de la UNL).

PROTOCOLO SANITARIO



Actividades realizadas:

Colecta de muestras de sangre de dos ejemplares de aguará guazú.

Actividades realizadas:

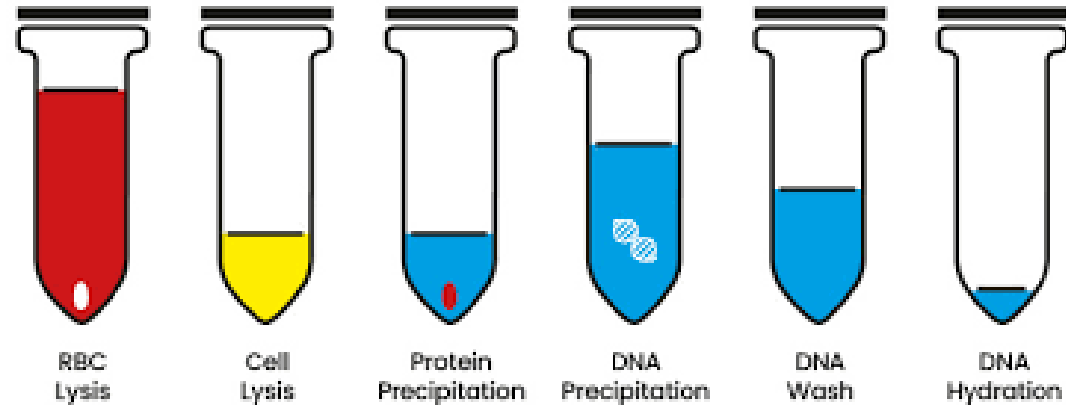
Toma de muestras de suelo (50 g) y de agua (1 lt.) en dos corrales de la Granja La Esmeralda de Santa Fe donde se encontraban alojados especímenes de aguará guazú.



Actividades realizadas:

Extracción de ADN a partir de:

- ❑ Muestras de sangre empleando métodos propios (Amavet et al., 2007)



- ❑ Muestras de agua empleando filtros de polietersulfona (PES) utilizando el método de Renshaw et al. (2015)
- ❑ Muestras de suelo siguiendo los protocolos de Epp et al. (2012), mediante el uso del kit PowerMax® Soil DNA Isolation

Actividades realizadas:

Diseño de cebadores para amplificar un fragmento del gen Cit b y otro de la región control (D-loop) mitocondrial, mediante el uso de los programas informáticos PRIMER3 (Rozen y Skaletsky 1996) y Primer-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

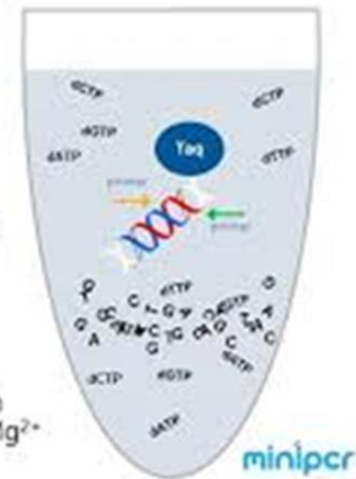
Se utilizaron secuencias ya publicadas del aguará guazú.

Actividades realizadas:

Realización de reacciones de amplificación por PCR de todas las muestras de ADN obtenidas empleando los cebadores diseñados empleando protocolos propios (Amavet et al., 2017).



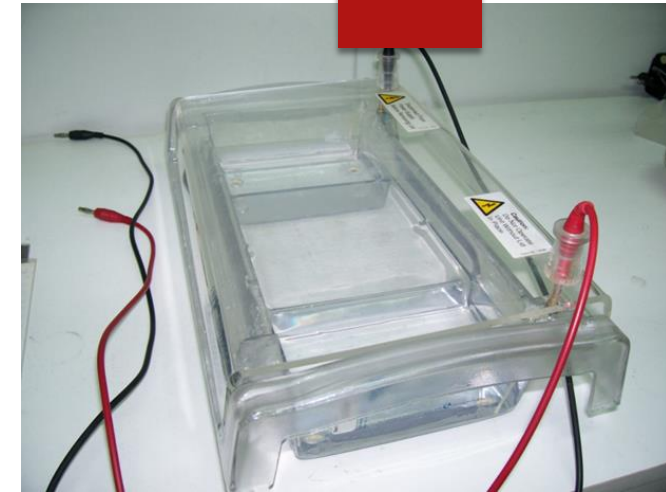
1. Template DNA
2. Oligonucleotide primers
3. DNA polymerase
4. dNTPs
5. Buffer to maintain pH and provide Mg^{2+}



Actividades realizadas:

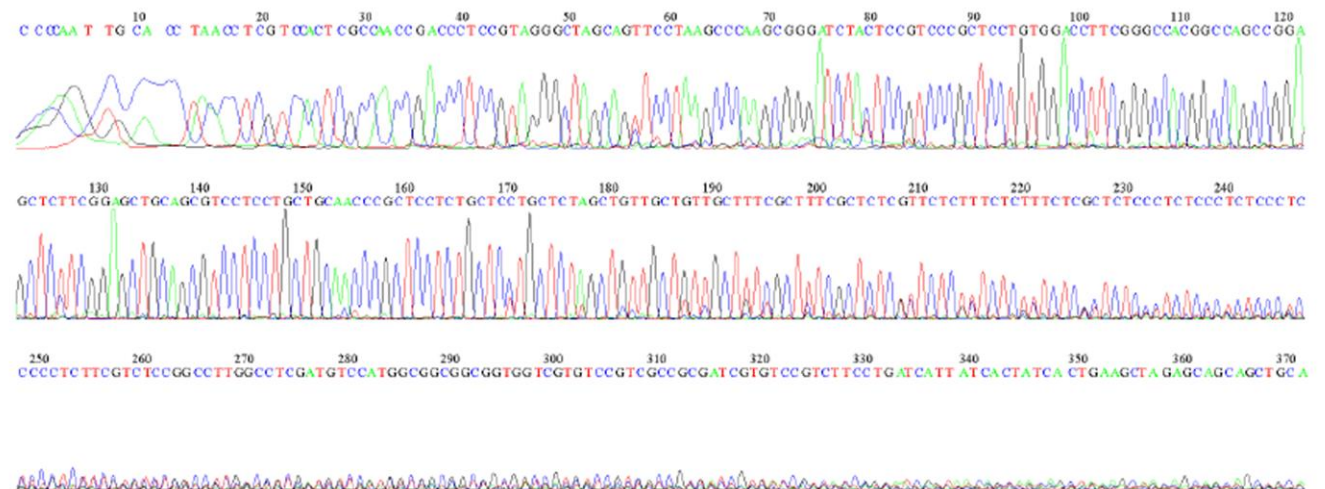
Evaluación de productos amplificados en geles de agarosa al 2%.

Secuenciación de los productos amplificados mediante servicio solicitado a MacroGen Inc.



File: 100-4-293_Clau_100.ab1 Run Ended: 2014/12/11 4:27:49 Signal G:1569 A:844 C:2472 T:1598
Sample: 100-4-293_Clau_100 Lane: 61 Base spacing: 14.947691 461 bases in 5619 scans Page 1 of 1

MACROGEN
Advancing through Genomics



RESULTADOS

Optimización de protocolos de extracción de eDNA

A partir de las muestras ambientales se logró obtener ADN de adecuada calidad y concentración.



GEL AGAROSA 2%

MUESTRAS
AGUA

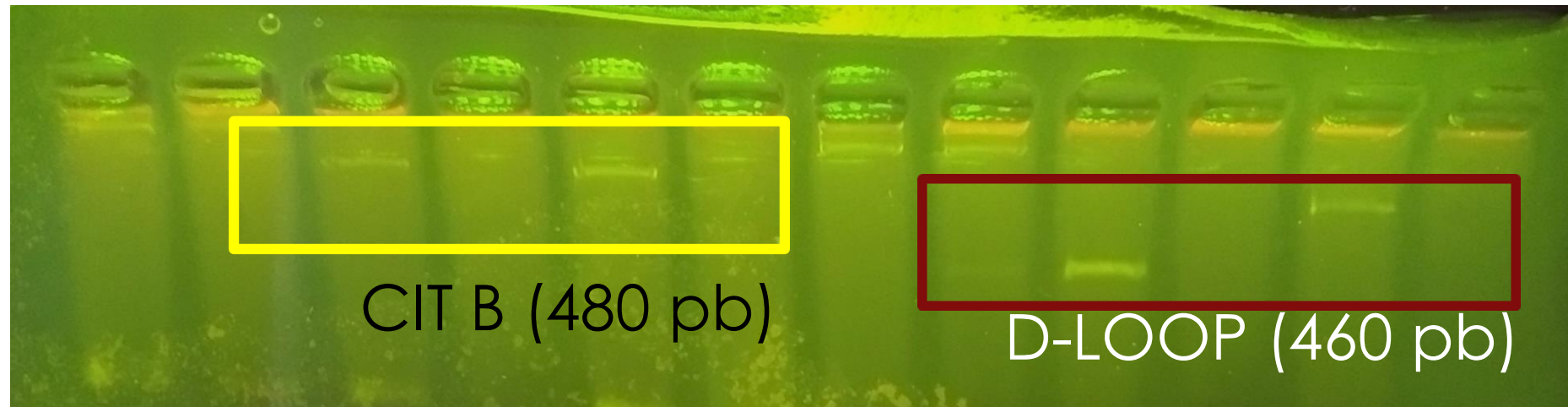
Resultados

Diseño exitoso de *primers*:

- ▶ Las dos muestras de sangre amplificaron correctamente empleando los *primers* diseñados.
- ▶ Rango de tamaño adecuado y comparación en Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) con el genoma mitocondrial del aguará guazú
- ▶ Control positivo.

Resultados

- ▶ Una muestra de eDNA obtenida a partir de agua también amplificó correctamente (gen Cit b).



GEL
AGAROSA
2%

Dificultades encontradas en el desarrollo de las actividades:

- ▶ Debido a que el proyecto fue financiado parcialmente, y al enorme incremento del precio de los reactivos importados, el subsidio, al momento fue gastado casi en su totalidad en el desarrollo de las actividades, para la obtención de los siguientes materiales: kit de extracción, filtros de agua, Taq polimerasa.
- ▶ La suspensión de actividades de investigación en el ámbito de la UNL a partir del 16 de marzo, ha imposibilitado el avance en el desarrollo del proyecto.



✓ Dra. María Virginia Parachú Marcó –(ICiVet-UNL/CONICET): colecta de muestras

✓ Dra. Gisela Poletta (FBCB-UNL, CONICET): realización de reacciones de PCR

✓ Dr. Pablo Siroski (ICiVet-UNL/CONICET): diseño de cebadores)

✓ Dra. Patricia Amavet (colecta de muestras, realización de reacciones de PCR, diseño de cebadores)



Integrantes del Proyecto



¡ MUCHAS
GRACIAS !

