

Diversidad Genética del Oso Andino en la Cordillera de Mérida: información base y desarrollo de protocolos de trabajo



Isaac Goldstein, Ananias Escalante y Robert Márquez

15 19:12

WCS - Proyecto Oso Venezuela

Introducción

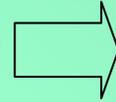
- Efectos negativos de la fragmentación pone en peligro la viabilidad de las poblaciones de oso a largo plazo
- Efectos negativos pueden ser controlados o reducidos por la creación o conexión entre áreas silvestres o por la reintroducción de individuos en una población
- Diversidad Genética de las poblaciones Unidades Evolutivamente Independientes
- Cuantas unidades evolutivamente independientes tenemos? Cual es el limite entre las distintas unidades independientes? Como identificamos a un individuo de una unidad dada?



Manejo y Planes de Conservación

Como conseguimos esta información?

Como conseguimos esta información?



Microsatelites ADN, actualmente usado de manera muy amplia como herramienta para los estudios tanto ecológicos, como poblacionales en poblaciones silvestres





Antecedentes

Orozco der Wengel 2002 A B C D L M P X MU50 MU59 Cxx 2004 Cxx 277
45% N= 150; A=6.7; He= 0.53

Ruiz-Garcia 2003 A B C D X
N= 82 He= 0.38

Escalante et al. 2004 B C M P MU50 J U
N= 34 Pid <0.001

Ruiz-Garcia *et al.* 2005 A B C D L M P X MU59
45% N= 155; A=5.7; He= 0.56

Viteri and Waits 2005 B C MU50 J H
45% A=5.7; He= 0.56

Paetkau 2003

Guidelines for selection of markers & reduction of amplification errors

N= 30; análisis de entre 12-15 marcadores que deben ser ordenados según su H_e . Si los 5 marcadores con más variabilidad tienen un $H_e > 0.80$, se seleccionan como el grupo a usar. De otra manera se prueban otros marcadores hasta que consigamos un grupo con un H_e de < 0.80

Necesitamos un número mínimo de marcadores con suficiente variabilidad para tener el poder para identificar individuos

Capacidad de evitar errores de amplificación que nos lleven a identificar individuos distintos de una misma muestra

Tener un número de muestras suficientes como para poder identificar un número mínimo de individuos que nos permita caracterizar una población

Tener la capacidad de coleccionar muestras de buena calidad para los análisis



¿Qué debemos tener como información básica para poder usar esta herramienta?



Necesitamos un número mínimo de marcadores con suficiente variabilidad para tener el poder para identificar individuos



Selección de Marcadores

Capacidad de evitar errores de amplificación que nos lleven a identificar individuos distintos de una misma muestra



Protocolo de Laboratorio

Tener un número de muestras suficientes como para poder identificar un número mínimo de individuos que nos permita caracterizar una población



Metodología de Colecta en Campo

Tener la capacidad de coleccionar muestras de buena calidad para los análisis



Metodología de Colecta en Campo

Objetivos del Trabajo

Producir la información básica necesaria que permita el desarrollo de protocolos tanto en campo como en laboratorio para la utilización de técnicas moleculares para la identificación de individuos, realizar trabajos sobre diversidad genética y conectividad entre poblaciones



Objetivos Específicos

- 1_ Poner a prueba la efectividad de la colecta de muestras de pelo a lo largo de “senderos naturales”
- 2_ Poner a prueba la efectividad de las muestras de pelo en relación a la calidad del ADN presente y su probabilidad de amplificación.
- 3_ Determinar los marcadores microsattelitales con la más alta variabilidad en poblaciones de oso andino. Se espera la obtención de un grupo de al menos 6 marcadores moleculares con una heterozigosidad esperada de entre 0.7 y 0.8
- 4_ Caracterizar genéticamente (Frecuencias Alélicas, A , H_o , H_e) de los distintos demes muestreados
- 5_ Desarrollar los protocolos de laboratorio y de campo que permitan la colecta y análisis de muestras de campo con las técnicas de DNA microsatelital

Metodología

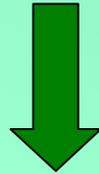


Senderos naturales

{ Santa Rosa, Niquitao y
Aricagua, Cordillera de Mérida

Señales de marca-remarca

Limpieza de árboles



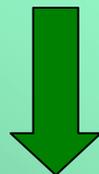
Colecta (> 5 pelos con folículos)

Wildlife Genetics Internacional en Canadá



Extracción de ADN

Kits QUIAGEN's DNeasy Tissue



Número de alelos por locus (A) (c/marcador)

Heterocigosidad promedio esperada (He)

Heterocigosidad promedio observada (Ho)

(muestra y c/población)

Paetkau y Strobeck (1994)

Paetkau et al. (1998)

Paetkau (2003)

Metodología

La efectividad de colecta de muestras de pelo se evaluó en base al número de muestras de pelo por kilómetro de transecta



La calidad de las muestras se evaluó en base al éxito de amplificación de las mismas



Resultados

EFFECTIVIDAD DE COLECTA

Niquitao Visitas = 13

N= 137 13,05 muestras/km trail

Santa Rosa Visitas =12

N= 138 10,95 muestras/km trail

Aricagua Visitas =1

N= 1 2,5 muestras/km trail



Resultados

Solo 40% amplificaron exitosamente.

19 marcadores (G1A, G10B, G10C, G1D, G10H, G10J, G10L, G10M, G10P, G10U, G10X, cxx20, cxx110, MU23, MU26, MU50, MU59, RENP07) solo 8 se aproximaron a los niveles de variabilidad esperada (G10B, G10H, G10J, G10M, G10P, G10X, MU50, P07).

Se identificaron **8 individuos en Niquitao, 6 individuos en la Culata y 1 individuo en Aricagua.**

G1A, G10B, G10C, G1D, G10H, G10J, G10L, G10M, G10P, G10U, G10X, cxx20, cxx110, mu 23, mu 50, mu59). Solo 6 (**G10B, G10C, G10H, G10J, G10L, G10**

G10B, G10C, G10H, G10J, G10L, G10M, G10P, G10X, mu23, and mu50 , AMELOGENIN

Usamos el marcador G10P para evaluar la calidad del DNA mu26 y P07

Resultados

Results	A	He	Ho	Alleles
G1A				
G19B	5	0,63	0,55	154, 156, 158, 162, 166
G10C				
G10D				
G10H	7	0,73	0,68	239, 241, 243, 245, 247, 249,
251G10J		3	0,63	0,65 194, 196, 200
G10L				
G10M	3	0,41	0,30	206, 208, 216
G10P	4	0,55	0,58	136, 136, 144, 148
G10U				
G10X	5	0,57	0,45	133, 137, 139, 141, 143
Cxx20				
Cxx110				
Mu23				
Mu50	4	0,64	0,43	124, 126, 128, 130
Mu59				
Mu26				
RENPO7	6	0,73	0,65	159, 161, 163, 165, 169, 171

Discusión

La cantidad de muestras de pelo colectadas durante la realización de este estudio es muy superior a cualquiera de los esfuerzos realizados hasta la fecha. Ruiz-García trabajó con 82 y 150 muestras que fueron el resultado de un esfuerzo colectivo en Venezuela, Colombia y Ecuador.

El trabajo de Viteri y Waits se realizó con 150 muestras colectadas en 42 trampas de pelo durante un periodo de 7 meses.

La colecta de muestras a lo largo de senderos naturales nos da la oportunidad de colectar una gran cantidad de muestras de pelo con un esfuerzo relativamente pequeño.

Sin embargo, el éxito de amplificación es menor que el de los otros trabajos que ya de por sí eran bastante bajos.

Discusión

El bajo éxito de amplificación puede ser una consecuencia del tiempo transcurrido entre muestreos (2 meses) durante el cual la muestra de pelo esta expuesta a muy altos niveles de humedad. Las muestras colectados pudieran tener una antigüedad de hasta 2 meses expuestas a la humedad.

Por otro lado a medida que pasaba el tiempo éramos mas efectivos consiguiendo muestras de pelo que posiblemente estaban mucho mas expuestas a la humedad que las muestras mas obvias

Protocolo de Colecta de Muestras de Pelo a lo largo de senderos naturales de Oso Andino

- 1_ Todos los árboles identificados con señales de marca-remarca a lo largo de los senderos naturales hay que ponerle un banderín y limpiar la corteza de todo resto de pelo visible.
- 2_ Los senderos tienen que ser visitados cada 2 semanas.
- 3_ Se colectarán solamente los pelos que tengan gran parte de su extensión despegada de la corteza del árbol.
- 4_ Solo muestras de más de 10 pelos de alta calidad son tomadas en cuenta.
- 5_ Las muestras son guardadas en sobres de papel y en un ambiente lo más seco y sin estar expuestas a la luz
- 6_ Las muestras son enviadas y procesadas de la manera más rápida posible

Protocolo de laboratorio para la caracterización genética de las poblaciones del oso andino basado en las muestras de pelo colectadas en campo



- 1_ Las muestras son evaluadas usando el marcador **G10P** para probar la calidad de la amplificación. Las muestras donde la amplificación falle son nuevamente analizadas para confirmar la falla original. Todas las muestras con amplificación fallida por el marcador **G10P** son descartadas
- 2_ Todas las muestras que amplifican usando el marcador **G10P** son probadas usando los 6 micosatélites adicionales en tres pasos:
 - a_ Las muestras que producen resultados en menos de 4 loci (incluyendo G10P) son descartadas
 - b_ Las muestras que producen resultados para 4 a 6 marcadores son nuevamente usando 5 ul de ADN por reacción, en vez de las 3 ul usadas regularmente. Las muestras inconsistentes son descartadas.
 - c_ Todas la muestras buenas son expuestas a un análisis computarizado para determinar pares genotípicos sospechosos que podrían ser creados por errores genotípicos. Las muestras que son iguales en muchos loci en un patrón de ajuste fenotípico de error son nuevamente analizados en los loci desiguales para confirmar los análisis originales. Si los resultados son confirmados las muestras son clasificadas como buenas, de lo contrario son descartadas.
- 3_ Todas las muestras buenas pertenecientes a una única identidad son analizadas con el marcador AMELOGENIN identificar el sexo.

Agradecimientos

