



Curso posgrado PEDECIBA - BIOLOGÍA
Aplicaciones moleculares para la conservación de fauna nativa en Uruguay

PRÁCTICO

8 - 11 de abril
2025

Aplicación de marcadores moleculares para la identificación de especies a partir de muestras no invasivas.

Coordinadoras: Dras. Claudia Corbi-Botto y Verónica Gutiérrez

Docentes colaboradores: Mag. Nadia Bou, Mag. Guillermo Morera y Lic. Matías González-Barboza



Cerdocyon thous

Objetivo

Determinar los patrones de variación genética en *C. thous* de Uruguay y su relación con las muestras de Brasil.

Actividades

Martes 8 de abril:

1. Obtención de muestras

Colectar muestras no invasivas (fecas) en la salida de campo a los Humedales del Santa Lucía.

Miércoles 9 de abril:

2. Extracción de ADN a partir de muestras no invasivas

- a. Extraer el ADN genómico total utilizando el kit comercial “QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)” siguiendo las instrucciones sugeridas por el fabricante (ver protocolo adjunto).
- b. Determinar la concentración y calidad del ADN extraído en el Nanodrop.

Jueves 10 de abril:

- c. Evaluar la integridad del ADN extraído en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE 1X teñido con Goodview.

3. Amplificación *in vitro* mediante PCR en tiempo real

- a. Amplificar una región del gen mitocondrial COII en todos los ADN extraídos (ver planilla adjunta).
- b. Enviar a purificar y secuenciar todos los productos amplificados a la empresa MACROGEN (Seúl, Corea).

Viernes 11 de abril:

4. Análisis de polimorfismo en el set de datos

- a. Realizar un alineamiento de las secuencias obtenidas y editarlas en el programa MEGA 11 (alineamiento proporcionado). Descarga del programa: <https://www.megasoftware.net/>
- b. Incorporar algunas secuencias homólogas que están disponibles en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)
- c. Incorporar secuencias homólogas de al menos 2 individuos pertenecientes a otras familias, como grupo externo.
- d. Realizar un alineamiento múltiple de todas las secuencias (MEGA 11).
- e. Determinar el número de sitios variables y filogenéticamente informativos en el set de datos (MEGA 11 o DNAsp 6.12.03).

5. Análisis de genética poblacional

- a. Definir los haplotipos para *C. thous* (usar DNAsp).

- b. Construir una red de haplotipos (usar PopArt).
 - c. Estimar la diversidad genética dentro y entre las poblaciones mediante un análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) (Arlequin v3.5).
6. Análisis filogenéticos
- a. Realizar diferentes análisis filogenéticos (NJ, ML, MP) (MEGA 11).

Protocolo breve para el uso de los programas DnaSP, Arlequin 3.5 y PopArt

Programas que utilizaremos y que sugerimos traer ya instalados en la computadora que vayan a utilizar para el análisis de secuencias:

DnaSP

El DnaSP (polimorfismo de secuencia de ADN) es un software dirigido a genetistas de poblaciones moleculares y puede calcular varias medidas de variación de secuencia de ADN dentro y entre poblaciones. Además, sirve para preparar datos a otros formatos.

Descarga: <http://www.ub.edu/dnasp/downloadTv6.html> → *Los lleva a una página de registro, donde deberán ingresar sus datos y los redireccionará a una página con el link de descarga.*

Arlequin

Conjunto bastante amplio de métodos básicos y pruebas estadísticas, con el fin de extraer información sobre las características genéticas y demográficas de una colección de muestras de población.

Descarga:

<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35/>

PopArt

Genera redes de haplotipos a partir de datos genéticos.

Descarga:

<https://popart.maths.otago.ac.nz/download/>

Pasos

1. Descargar la secuencia del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de código EF107023.1 e incorporarla al alineamiento de un fragmento del D-loop del zorro. El alineamiento fue creado a partir de secuencias homólogas obtenidas del GenBank y 5 secuencias analizadas de Uruguay. Editar la secuencia en MEGA y agregarla al grupo "Bosque".

2. Abrir DnaSP y en la pestaña FILE abrir archivo formato fasta "ct_todas.fas".

Tenemos que trabajar con nuestros datos en el formato adecuado: Data → Format...DNA, Haplotid, Mitochondrial.

En la pestaña DATA definir agrupaciones de haplotipos con el comando Define Sequence Sets. En esta instancia agrupamos las "unidades poblacionales" mínimas de análisis. En este caso cada ecorregión.

Add New Sequence Set: para definir la población.

IMPORTANTE! No se olviden de actualizar los datos "Update all entries" antes de cerrar la ventana.

Ahora podremos calcular métricas de diversidad para la población total de secuencias, así como los subgrupos que definimos.

Overview → Polymorphism Data → Seleccionar dataset

Para las distintas poblaciones extraiga los valores de: Número de sitios variables, Diversidad Haplotípica y Diversidad nucleotídica.

3. Generar la lista de haplotipos y el archivo para Arlequin. File → Save/Export as → **Arlequin Format File**. Guardarlos en formato arp y hap (para utilizar en Arlequin guardar en la misma carpeta). Guardamos archivo como "ct_sur".

También copiar en el procesador de texto el contenido de la ventana emergente donde está la info de los haplotipos (útil para editar luego las redes de haplotipos)

4. Abrir el archivo "ct_sur.arp" en Arlequin 3.5 (file/open project). Este archivo mantiene las poblaciones que trabajamos en DnaSP.

5. Para que nuestro proyecto corra adecuadamente. Vaya a "Arlequin configuration". Seleccione las primeras 4 opciones y deje las demás 3 en blanco.

6. En la opción "Structure Editor" puede cambiar la agrupación de las diferentes localidades asignándolas a diferentes grupos haciendo "doble click" sobre el número de grupo al cual pertenecen, y asignándolas a otro diferentes (e.g. 2, 3, 4, etc.) Luego de definidos los grupos "Update Project"

7. Ir a la opción "Settings" y allí elegir los análisis que se van a efectuar:

a. "AMOVA/ Standard AMOVA computations (haplotypic format)."

b. "compute pairwise FST", con las condiciones por defecto.

8. Para utilizar PopArt para hacer la red de haplotipos, tenemos que modificar el archivo .nex, agregando un bloque de rasgos (en este caso, ecorregiones). Este bloque lleva este encabezado:

```
BEGIN TRAITS;  
Dimensions NTRAITS=5; ### Indicamos el número de  
poblaciones/localidades/cuencas/ecorregiones  
Format labels=yes missing=? separator=Comma;  
TraitLatitude #ingresamos las coordenadas de latitud  
TraitLongitude #ingresamos las coordenadas de longitud  
TraitLabels Pantanal Cerrado Bosque Pampa UY  
Matrix ###Listamos los haplotipos como en Arlequin (recuerden, guardamos la definición  
de haplotipos de DnaSP) y su frecuencia, en este caso por ecorregión  
H01 0,0,0,1  
H02 0,0,0,1  
.  
.  
H19' 0,1,0,0  
  
;  
End;
```

File → Open.. Abrimos el archivo en formato Nexus

Network → Median Joining Network → Mantener valores por defecto

Con el click izquierdo puede mover los círculos en el espacio. Con click derecho en los colores de la leyenda “Change trait colour”

En “Edit” puede cambiar cuestiones estéticas: fondo, grosor de las líneas, fuente, etc.