

ANÁLISIS GENÉTICO SOBRE LA PRESENCIA DE AGUARÁ GUAZÚ (CARNIVORA, MAMMALIA) EN URUGUAY

Natalia Mannise¹, Mariana Cosse¹, Leticia Repetto¹, María del Rosario Franco Berriel¹,
Jesús E. Maldonado^{2,3} & Susana González¹

¹ Laboratorio de Genética de la Conservación. Departamento de Genética. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Unidad Asociada Facultad de Ciencias-UdelaR. Avenida Italia 3318, Montevideo-11600. Uruguay.

² Center for Conservation and Evolutionary Genetics, Smithsonian Conservation Biology Institute, National Zoological Park, 3001 Connecticut Ave. NW, Washington, DC 20008.

³Department of Vertebrate Zoology, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, MRC 108, Washington DC 20013.

Autor de Correspondencia: Susana González sugonza@iibce.edu.uy

RESUMEN

El aguará guazú es el cánido más grande de Sudamérica, categorizado como cercano a la amenaza por la UICN. En Uruguay ocurrieron dos episodios de caza furtiva de ejemplares machos adultos, uno en Río Negro y otro en Cerro Largo. El objetivo de este trabajo fue confirmar la presencia de aguará guazú en dos localidades del Uruguay (Departamentos de Cerro Largo y Río Negro) y caracterizar los niveles de variabilidad genética de la especie en nuestro país utilizando marcadores moleculares. Se analizaron las muestras de ejemplares cazados y una feca colectada en el sitio de caza de Cerro Largo. Fueron amplificadas fragmentos de ADN mitocondrial (*Cit b* y *D-loop*). Las muestras de Cerro Largo fueron genotipadas para nueve loci de microsatélites. El ADN fecal fue sexado con cebadores específicos para Canidae. Los resultados obtenidos indican que la especie retiene diversidad genética ya que cada individuo analizado representó un haplotipo diferente para el fragmento de *D-loop*. El análisis del ADN fecal reveló que en la dieta del ejemplar estaban incluidos restos ovinos y que pertenecía a un individuo aguará guazú macho. Las muestras de Cerro Largo comparten al menos un alelo para cada uno de los loci microsatelitales analizados, siendo posible la presencia de un grupo familiar en Cerro Largo.

Palabras clave: ecología molecular, genética de la conservación, muestreo no invasivo.

ABSTRACT

Documenting maned wolf (Carnivora, Mammalia) occurrence in Uruguay. The maned wolf is the largest South American canid species and is categorized as Near Threatened in the IUCN Red List. In Uruguay two adult males were illegally hunted, one in Río Negro and the other in Cerro Largo. The aim of this study was to characterize the levels of genetic variability of maned wolf in Uruguay using molecular markers and to confirm their presence in Cerro Largo and Río Negro using non-invasive genetic techniques. Samples from illegally hunted animals and a faeces collected in the Cerro Largos

poaching locality were analyzed. Mitochondrial DNA fragments were amplified (*Cit b* and *D-loop*). The Cerro Largo samples were also genotyped for nine microsatellite loci. Faecal DNA was sexed using primers designed for Canidae. Our results revealed a higher genetic diversity than expected because each sample analyzed showed a different haplotype for *D-loop*. Faecal analysis revealed that sheep remains were included in the animal diet and sexing markers revealed that the maned wolf was a male. Cerro Largo samples share at least one allele in every one of the microsatellite loci used. This suggests that the animals that we screened from Cerro Largo may be members of a family group.

Key words: molecular ecology, conservation genetics, non invasive methods.

INTRODUCCIÓN

El aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*) es el cánido más grande de América del Sur (Dietz, 1985). La distribución geográfica de la especie abarca regiones de Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay, Perú y Uruguay. Debido a presiones antropogénicas se han documentado cambios en su rango de distribución geográfica ocurriendo una reciente expansión poblacional en el límite este y una gran retracción especialmente en su límite sur (Cunha de Paula *et al.*, 2008; Queirolo *et al.*, 2011).

En la actualidad, se ha identificado que el principal riesgo para su conservación es la drástica reducción de los ambientes naturales adecuados para la supervivencia de sus poblaciones, siendo categorizada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) como "Cercana a la amenaza" (Cunha de Paula *et al.*, 2008; IUCN, 2008).

En 1989 en Uruguay fue registrado un episodio de caza furtiva de un ejemplar macho adulto en el departamento de Río Negro (Mones & Olazarri, 1990; Mannise *et al.*, 2011). Por otro lado, se han encontrado huellas características de la especie en el departamento de Rocha (Prigioni & Sapa, 2003). Posteriormente en el 2006, en el departamento de Cerro Largo, se reportó otro episodio de caza furtiva (Mannise *et al.*, 2011; Queirolo *et al.*, 2011).

Las técnicas de genética molecular son ampliamente utilizadas para abordar cuestiones elusivas en biología de la conservación y ecología del comportamiento (Taberlet *et al.*, 1999). La posibilidad de identificar individuos, sexo y especie utilizando marcadores moleculares a partir de muestras colectadas de forma no invasiva (ej: fecas), ofrecen un amplio potencial (Piggott & Taylor, 2003). En estudios que utilizan este tipo de muestreos, generalmente se realizan análisis con ADN mitocondrial para determinar la especie y además analizar las relaciones filogeográficas. A su vez el empleo de marcadores moleculares nucleares permite obtener otros niveles de resolución para efectuar la identificación individual (loci de microsatélites) y sexaje (marcadores presentes en cromosomas sexuales) de la muestra (Taberlet *et al.*, 1999; Waits & Paetkau 2005).

El ADN mitocondrial en mamíferos es una molécula pequeña, circular, de aproximadamente 16 000 pb cerrada, heredada por vía materna (Avise *et al.*, 1987). Cada célula contiene entre 10 y 2500 copias del genoma mitocondrial, lo cual facilita su amplificación (Kohn & Wayne, 1997). Las secuencias de ADN mitocondrial tienen una tasa de mutación diez veces más rápida que

los genes nucleares, particularmente su región control no codificante (*D-loop*) (Ryder & Fleischer, 1996). La amplificación de la región control permite desarrollar análisis de variabilidad poblacional, determinar unidades de manejo y desarrollar estudios filogeográficos (Kohn & Wayne, 1997). Es de importancia primaria el diagnóstico de especies y la determinación de relaciones interespecíficas para biología, ecología, evolución, sistemática, manejo de la biodiversidad, conservación y estudios forenses (Tobe *et al.*, 2009). Para realizar la identificación taxonómica es apropiado amplificar una sección del gen citocromo b (*Cit b*) (González, 2005; Tobe *et al.*, 2009).

En estudios de conservación de especies amenazadas el ADN mitocondrial se ha utilizado para identificar sets de poblaciones evolutivamente divergentes, incluyendo la resolución de Unidades Evolutivas Significativas (ESUs); así como también para evaluar desde una perspectiva evolutiva ó filogenética la conservación de áreas ó poblaciones (Moritz, 1994). Un requisito para el manejo de la biodiversidad es la identificación de poblaciones con historias evolutivas independientes, tales agrupamientos son categorizados como especies, subespecies ó ESUs (Moritz, 1994). Siguiendo lo establecido en la Convención de la Biodiversidad de Rio, poblaciones genéticamente divergentes son reconocidas de manera apropiada como unidades de conservación (Moritz, 1994). Una aplicación genética muy simple pero altamente poderosa y práctica es definir Unidades de Manejo (MUs), las cuales representan poblaciones demográficamente independientes, que son diagnosticadas como tales presentando divergencia en sus frecuencias alélicas (Moritz, 1994; 1999). Las Unidades de Manejo son los componentes ecológicos de las Unidades Evolutivas Significativas (ESUs) (Moritz, 1999). Las ESUs representan un mayor elemento de diversidad dentro de especies siendo de interés para la conservación (Moritz, 1999). Ambos aspectos no deben ser considerados como entidades separadas cuando se busca conservar la mayor Unidad Evolutiva Significativa (Moritz, 1999).

Los microsatélites son marcadores genéticos nucleares de locus simple, con herencia mendeliana, que consisten en repetidos en tándem de secuencias entre dos y seis pares de bases de largo (Zane *et al.*, 2002). Dado que presentan una elevada variabilidad intraespecífica son utilizados para analizar las relaciones de parentesco entre individuos (Lacey *et al.*, 1999; Lacey *et al.*, 2000). Si bien no se han aislado loci de microsatélites específicos para aguará guazú, diversos estudios en dicha especie utilizan loci hipervariables que fueron aislados para perro doméstico (Lion *et al.*, 2007; Salim *et al.*, 2007; Da Fontoura-Rodrigues *et al.*, 2008; Lion *et al.*, 2011).

Dentro de los marcadores nucleares, encontramos aquellos ubicados en los cromosomas sexuales. El gen denominado *ZFX* ubicado en el cromosoma X y el *ZFY* ubicado en el cromosoma Y, codifica para la proteína con dedos de zinc, que cumple una función de regulación génica pero que ha sido ampliamente utilizada para el sexaje de zorros (Ortega *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo fue el de caracterizar mediante marcadores moleculares, ejemplares de aguará guazú registrados en Uruguay.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Las muestras procedentes de animales cazados se encuentran depositadas en la colección del Museo Nacional de Historia Natural (MNHN). Se extrajeron muestras de tejidos de los ejemplares cazados en Río Negro en 1989 (32°35'45"S; 58°08'46" O) y Cerro Largo en el 2006 (32°14'43"S; 54°03'30" O). Además en esta última localidad se colectó una feca días después del episodio de caza, la misma se mantuvo refrigerada por cuatro días y luego conservada en alcohol.

Extracción de ADN y Amplificación

Las extracciones de ADN para tejidos fueron realizadas siguiendo el protocolo de Medrano *et al.* (1990), mientras que para la extracción del ADN fecal se realizó utilizando el kit de DNeasy®Tissue (QIAGEN, Hilden, Germany), siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante.

Posteriormente cuantificamos y observamos la pureza del ADN extraído midiendo su absorbancia mediante espectrofotometría UV/Vis (Nanodrop 1000).

Para efectuar la caracterización genética amplificamos fragmentos del gen de *Cit b* (Irwin *et al.*, 1991) y de *D-loop* de ADN mitocondrial (Franco Berriel, 2004).

Para efectuar el sexaje de la muestra de ADN fecal utilizamos cebadores específicos desarrollados para Canidos que amplifican un fragmento del gen *ZFX-ZFY* (Ortega *et al.*, 2004). Amplificamos dicho fragmento mediante PCR en Tiempo Real (RT-PCR) y analizamos los patrones de las curvas de desnaturalización o *melting* mediante el canal de *HRM* (High Resolution Melting) para la asignación del sexo de la muestra (Repetto *et al.*, en revisión). Mediante esta técnica, en las hembras se espera observar una única curva de amplificación (*Zfx-Zfx*) mientras que en los machos se obtendría un patrón de dos curvas de amplificación (*Zfx-Zfy*) (Repetto *et al.*, en revisión).

Con la finalidad de determinar la posible relación de parentesco entre las dos muestras de Cerro Largo analizamos nueve loci de microsatélites (FH2226, FH2535, FH2140, PEZ19, FH2137, FH2848, FH2328, REN169, FH2054) que fueron diseñados para perro doméstico (Francisco *et al.*, 1996; Mellersh *et al.*, 2000). Para su empleo desarrollamos un protocolo para la reacción y termociclado de PCR en base a Franco Berriel (2004), Mellersh *et al.* (2000) y Francisco *et al.* (1996).

Análisis de secuencias y genotipificación con loci de microsatélites

Las secuencias que obtuvimos para los marcadores mitocondriales fueron analizadas y se asignaron haplotipos con el software Mega.5 © (Tamura *et al.*, 2011). A su vez efectuamos, con la aplicación "Blast Search", la comparación de las secuencias obtenidas con la base de datos del Genbank.

Los productos amplificados de loci de microsatélites fueron corridos en gel microcapilar y genotipificados con el software GenMarker V1.75© (Softgenetics).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la especie y relaciones filogenéticas

El análisis que realizamos de los fragmentos de *D-loop* amplificados con cebadores

específicos para aguará guazú reveló la presencia de tres haplotipos diferentes para la especie. Sin embargo, las secuencias de *Cit b* obtenidas de los animales cazados evidenciaron que las muestras de tejidos tenían el mismo haplotipo. Mientras que la secuencia del fragmento de *Cit b* obtenida del ADN fecal y amplificada a partir de cebadores universales para mamíferos, fue determinada por “*Blast Search*” como perteneciente a *Ovis aries*. Este hallazgo está en concordancia con los diferentes estudios de dieta donde se menciona que sería una especie omnívora que eventualmente podría consumir otros vertebrados y carroña (Dietz, 1984; Rodrigues, 2002; Queirolo & Motta-Junior, 2007; Trovati, 2009).

Estas herramientas moleculares permiten estimar a partir de ADN fecal, de manera cualitativa, ítems presentes en la dieta a través de la amplificación por PCR con cebadores específicos y/o universales (Valentini *et al.*, 2009).

Sexaje

Mediante la comparación de la curva de *melting* obtenida para el ADN fecal con muestras de sexo conocido, se determinó que pertenecía a un ejemplar macho (Fig. 1). De esta manera, las muestras de Cerro Largo pertenecen a dos individuos machos, con diferente origen materno.

Genotipificación con loci de microsatélites

Mediante la comparación de los dos genotipos de los ejemplares de Cerro Largo, se pudo

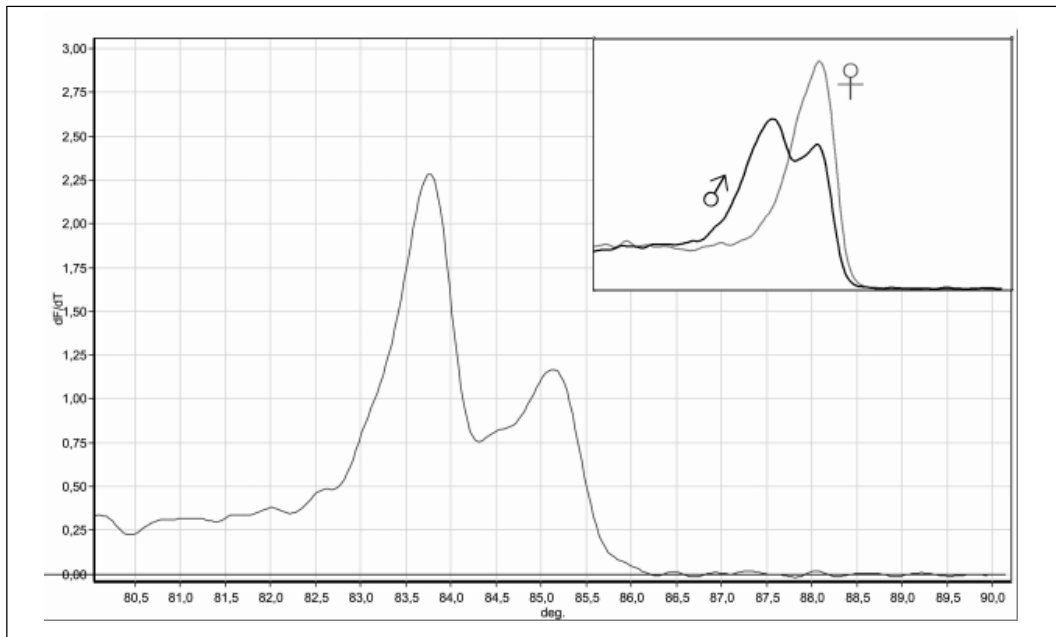


Fig. 1. Patrón de curvas obtenido para la muestra de ADN fecal, la cual exhibe un pico a 83,75°C y otro a 85,2°C. En la parte superior se observan los controles positivos ♂ y ♀. Los ♂ presentan dos picos: a 83,75°C representa aquel fragmento presente en el cromosoma sexual Y, a 85,2°C que representa a la copia en el cromosoma sexual X. Las ♀ presentan un único pico a 85,2°C presente en el cromosoma sexual X.

Tabla 1. Se muestran los alelos para cada loci de microsatélite utilizado, aquellos alelos compartidos se encuentran marcados con un asterisco (*).

Loci	FH2226		FH2535		FH2140		Pez 19		FH 2137		FH2848		FH2328		REN169		FH2054	
Individuo cazado	158	170*	94*	94*	134*	174	197*	207*	278*	288	293*	299	363	373*	199*	199*	62*	72
Feca	140	170*	94*	102	122	134*	197*	207*	276	278*	293*	303	373*	403	199*	199*	62*	62*

observar que para cada loci de microsatélite analizado, ambas muestras comparten por lo menos un alelo (Tabla 1).

Los resultados con los fragmentos de *D-loop* y *ZFX* revelaron que las muestras de Cerro Largo pertenecen a dos individuos machos con diferente origen materno, por lo que se descarta que sean hermanos. Dado que las dos muestras de Cerro Largo comparten al menos un alelo para cada loci de microsatélites, nos permite plantearnos la hipótesis de que éstas podrían tener una relación de parentesco padre-hijo. Dicha relación podrá ser verificada mediante el cálculo del coeficiente de parentesco, para lo cual se necesitan datos de las frecuencias alélicas en un número mayor de muestras.

CONCLUSIÓN

Los marcadores moleculares empleados demostraron ser eficientes para determinar en forma confiable y repetible, la presencia en Uruguay de este cánido vulnerable y elusivo. Los resultados presentados en este trabajo revelan que la especie retiene diversidad génica ya que cada individuo analizado representó un haplotipo diferente para el fragmento de *D-loop*. A su vez, serían consistentes con la presencia de un grupo familiar de aguará guazú en Cerro Largo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Enrique González (MEC-MNHN), a Jorge Cravino (MGAP-RENARE) y a los revisores Dres. Jorge Ortega y Diego Queirolo que efectuaron valiosos comentarios. Este estudio fue parcialmente financiado por: CSIC-UdelaR; PEDECIBA, ANII-Uruguay.

REFERENCIAS

Avise J.C., Arnold J., Ball R.M, Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A. & Saunders N.C. 1987. Intraespecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.

- Cunha de Paula R., Medici P. & Goncalves Morato R. 2008. Maned Wolf Action Plan. Icmbio, Brasília, pp 29.
- Da Fontoura- Rodrigues M.L., Lima-Rosa C.A, Tchaicka L., Valdez F., Rodrigues F.H.G., Paula R.C., Gough M.P., Johnson W.E., Bonato S.L. & Eizirik E. 2008. Cross- amplification and characterization of 13 tetranucleotide microsatellites in multiple species of Neotropical canids. *Molecular Ecology Resource* 8: 898-900.
- Dietz J.M. 1984. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Smithsonian Institution Pr., City of Washington, pp 51.
- Dietz J.M. 1985. *Chrysocyon brachyurus*. *Mammalian Species* 234: 1-4.
- Francisco L., Langsten A., Mellersh C., Neal C. & Ostrander E. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* 7(5): 359-362.
- Franco Berriel M.R. 2004. Genetic Variability of the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Master Thesis in Biological Sciences, University of Amsterdam, Amsterdam, 46 pp.
- González S. 2005. Métodos de muestreo no invasivo para el diagnóstico de la diversidad de mamíferos. *Agrociencia* IX: 545-550.
- Irwin D., Kocher T. & Wilson A. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32(2): 128-144.
- Kohn M.H. & Wayne R.K. 1997. Facts from feces revisited. *Trends in ecology & Evolution* 12(6): 223-227.
- Lacey E.A., Maldonado J.E., Clabaugh J.P. & Matocq M.D. 1999. Interspecific variation in microsatellites isolated from tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Molecular Ecology* 8(10): 1754-1756.
- Lacey E.A., Patton J.L. & Cameron G.N. 2000. Introduction. Pp. 1-14. *En: Lacey E.A.P, Patton J.L. & Cameron G.N. (Eds.). Life underground: the Biology of Subterranean Rodents. University of Chicago Press, Chicago.*
- Lion M.B. 2007. Diversidade Genética e conservação do lobo guará, *Chrysocyon brachyurus*, em áreas protegidas do Distrito Federal. Tesis de Maestría en Ecología. Instituto de Ciencias Biológicas, Departamento de Ecología. Universidad de Brasilia, Brasil. (Orientador: Jader Soares Marinho- Filho), 57pp.
- Lion M.B., Eizirik E., Garda A.A., Da Fontoura- Rodrigues M.L., Rodriguez F.H.G. & Marinho-Filho J.S. 2011. Conservation genetics of maned wolves in a highly impacted area of the Brazilian Cerrado biome. *Genetica* 139: 369-381.
- Mannise N., Cosse M., Repetto L., Franco R., Maldonado J. & González S. 2011. Caso de estudio: caracterización y presencia de aguara guazú (*Chrysocyon brachyurus*) en Uruguay empleando herramientas de ecología molecular. *Segundas Jornadas de Genética del Uruguay Sociedad Uruguaya de Genética*, pp. 19.
- Medrano J.F., Aasen E. & Sharrow L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. *Biotechniques* 8(1): 43.
- Mellersh C.S., Hitte C., Richman M., Vignaux F., Priat C., Jouquand S., Werner P., André C., DeRose S., Patterson D.F., Ostrander E.A. & Galibert F. 2000. An integrated linkage-radiation hybrid map of the canine genome. *Mammalian Genome* 11(2): 120-130.
- Mones A. & Olazarrí J. 1990. Confirmacion de la existencia de *Chrysocyon brachyurus* (Illiger)

- en el Uruguay: (Mammalia: Carnivora: Canidae). *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo* 174(XII): 1-6.
- Moritz C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology* 3(4): 401-411.
- Ortega J., Rosario Franco M.D., Adams B.A., Ralls K. & Maldonado J.E. 2004. A reliable, non-invasive method for sex determination in the endangered San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*) and other canids. *Conservation Genetics* 5(5): 715-718.
- Piggott M.P. & Taylor A.C. 2003. Extensive evaluation of faecal preservation and DNA extraction methods in Australian native and introduced species. *Australian Journal of Zoology* 51(4): 341-355.
- Prigioni C.M. & Sapa A. 2003. Aguará guazú (*Chrysocyon brachyurus*) en el área natural protegida Potrerillo de Santa Teresa. *Acta Zoológica Platense* 6(1): 1-8.
- Queirolo D. & Motta-Junior J. 2007. Prey availability and diet of maned wolf in Serra da Canastra National Park, southeastern Brazil. *Acta Theriologica* 52(4): 391-402.
- Queirolo D., Moreira J.R., Soler L., Emmons L.H., Rodrigues F.H.G., Pautasso A.A., Cartes J.L. & Salvatori V. 2011. Historical and current range of the Near Threatened maned wolf *Chrysocyon brachyurus* in South America. *Oryx* 45(2): 296-303.
- Rodrigues F.H.G. 2002. *Biología e conservação do lobo-guará na estação ecológica de águas emendadas*. Tesis de Doctorado en Ecología. Instituto de Biología. Universidad Estatal do Campinas, Brasil. (Orientador: Wesley Rodrigues da Silva), 105 pp.
- Ryder O.A. & Fleischer R.C. 1996. Genetics Research and Its Application in Zoos. Pp. 255-262. *En: Kleiman D.G., Allen M., Thompson K.V. (Eds.). Wild Mammals in captivity. Principles and Techniques*. University Chicago Press.
- Salim D.C., Akimoto A.A., Carvalho C.B., Oliveira S.F., Grisolia C.K., Moreira J.R. & Klautau-Guimaraes M.N. 2007. Genetic variability in maned wolf based on heterologous short-tandem repeat markers from domestic dog. *Genet. Mol. Res.* 6(2): 248-57.
- Taberlet P., Waits L.P. & Luikart G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends Ecol. Evol.* 14(8): 323-327.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731-2739.
- Tobe S.S., Kitchener A. & Linacre A. 2009. Cytochrome b or cytochrome c oxidase subunit I for mammalian species identification—An answer to the debate. *Forensic Science International. Genetics Supplement Series* 2(1): 306-307.
- Trovati G.R. 2009. *Mamíferos escavadores (Dasypodidae e Echimyidae) do cerrado da região de Itirapina e seu papel em comunidades de vertebrados terrestres*. Tesis de Doctor en Ecología Aplicada. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Brasil (Orientador: Luciano Martins Verdade), 116 pp.
- Valentini A., Miquel C., Nawaz M.A., Bellemain E., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Cruaud C., Nascetti G., Wincker P., Swenson J.E. & Taberlet P. 2009. New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Molecular Ecology Resources* 9(1): 51-60.

- Waits L.P. & Paetkau D. 2005. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologist: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management* 69(4): 1419-1433.
- Zane L., Bargelloni L. & Patarnello T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11(1): 1-16.

Fecha de Recepción: 20 de junio de 2012
Fecha de Aceptación: 23 de agosto de 2012