

## ESTUDIOS DE VARIACIÓN GENÉTICA Y FENOTÍPICA EN EJEMPLARES DE PUMA (*Puma concolor*)

**Dumont, Ailen**

Laboratorio de Genética, FHUC-UNL

Directora: Amavet, Patricia

Codirector: Siroski, Pablo

Área: Ciencias Biológicas

Palabras clave: puma, diversidad genética, análisis morfológicos

### INTRODUCCIÓN

El puma (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) es el mamífero de más amplia distribución en América luego del ser humano (Ruiz-García et al., 2009) ya que presenta características que le permiten adaptarse a una gran variedad de climas (Currier, 1983; Nowell y Jackson, 1996). Posee la capacidad de sortear obstáculos geográficos, posee alta longevidad y madura sexualmente a temprana edad, esto facilita el intercambio genético entre individuos muy alejados entre sí (Ruiz-García et al., 2009). En cuanto al tamaño corporal, diversos autores señalan que este cambia en relación a las zonas de la distribución de la especie (Mcnab, 1971; Nowell & Jackson, 1996; Machado, 2017). Los pumas necesitan, en general, territorios mayores a 100 km<sup>2</sup> y han llegado a dispersarse más de 450 km<sup>2</sup> a través de espacios altamente fragmentados (Ruiz-García et al., 2009). Presentan densidades poblacionales bajas y los migrantes exitosos suelen ser poco frecuentes, esto contribuye a una pérdida de diversidad genética. En consecuencia, incluso moderados niveles de fragmentación de hábitat afectarán a su diversidad genómica (Ernest et al., 2003; Saremi et al., 2019). Se han realizado algunos estudios de la variación genética en la especie, y en la identificación de subespecies a través de diferentes marcadores moleculares, entre ellos, el gen mitocondrial ND5 (Culver et al., 2000; Ruiz-García et al., 2009; Caragiulo et al., 2013; Matte et al., 2013; Gallo et al., 2020). Sin embargo no se han realizado hasta el momento estudios de las variaciones genéticas y fenotípicas de los ejemplares de puma en Santa Fe.

### OBJETIVO

Caracterizar morfológica y genéticamente a ejemplares de puma mantenidos cautivos en la Granja La Esmeralda y conservados en el Museo Provincial Florentino Ameghino de la ciudad de Santa Fe.

### METODOLOGÍA

Se analizaron siete individuos mantenidos en cautiverio en la Granja La Esmeralda, y dos ejemplares conservados en el Museo de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino". A estos últimos dos ejemplares sólo se los analizó genéticamente pues solo se contó con parte del animal. Se obtuvieron medidas morfométricas de cada ejemplar, determinadas a partir de la lectura de los textos de: Palacios (2007), Isasi-Catalá y Barreto (2008), López Romero (2008),

Título del proyecto: Estudios de variación genética y fenotípica en ejemplares de puma (*Puma concolor*)

Instrumento: CIENTIBECA

Año de convocatoria: 2019

Organismo financiador: UNL

Directora: Amavet, Patricia Susana

Ferreira et al. (2014), que fueron: largo y ancho de cabeza, largo y ancho de oreja, largo total del cuerpo (del hocico a la punta de la cola), largo de cuerpo, largo de la cola, largo del cuello, altura al hombro, altura a la cadera, diámetro del pecho, diámetro del cuello, largo de las vibrisas, largo pata delantera derecha (inferior y superior) y pata trasera derecha (inferior y superior), distancia entre caninos superiores, distancia entre caninos inferiores y peso. A cada individuo se le extrajo además una muestra de sangre de 100  $\mu$ l que fue conservada en un tubo eppendorf con solución de lisis (100mM Tris HCl pH8; 100mM EDTA pH8; 10mM NaCl; 1% SDS (p/v)) en proporción 1:10. A los ejemplares del museo se les extrajo con un taladro inalámbrico una muestra de hueso que fue almacenada en un tubo eppendorf a -20 °C. Además se contó con dos muestras de tejido muscular provenientes de ejemplares preservados en estado de congelación (un individuo del centro de rescate “Granja La Esmeralda”, y otro del museo “Florentino Ameghino”), que fueron almacenadas a -20 °C.

### Extracción de ADN

Se desarrollaron tres protocolos diferentes dependiendo del tipo de muestra que se utilizara para extraer ADN, ellos fueron: protocolo con empleo de CTAB descrito por Amavet et al. (2009), protocolo de extracción salina, descrito por Sambrook et al. (1989) con las modificaciones propuestas por Ojeda et al. (2012), y empleo de un kit de extracción (ADN PuriPrep-T kit -K1208, de INBIO HIGHWAY S.A.) Se analizó el gen mitocondrial ND5, y los *primers* utilizados en las reacciones de PCR fueron aquellos diseñados por Trigo et al. (2008): ND5-DF1 (TTGGTGCAACTCCAATAAAAGT) y ND5-DR1 (AGGAGTTGGGCCTTCTATGG). El protocolo de amplificación del gen ND5 se adaptó a partir de los métodos propuestos por Trigo et al. (2008) y Culver et al. (2000). Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar a un servicio de secuenciación.

### Análisis de datos

Los datos morfométricos fueron analizados mediante el programa Rstudio (Version 1.1.463 – © 2009-2018 RStudio, Inc.). Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA), y además se estimaron las medidas mínimas, máximas, la media aritmética y varianza de cada variable.

Para analizar la variabilidad del gen ND5, se alinearon las secuencias obtenidas utilizando el programa MAFFT Versión 7 (Kato y Standley, 2013) empleando el algoritmo Clustal W (Thompson et al., 1994). Luego las secuencias se visualizaron mediante el software MEGA X Versión 10.0.5 (Kumar et al., 2018) y posteriormente se calculó el número de haplotipos (n), diversidad de haplotipos (h), número de sitios segregantes entre secuencias (S) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), empleando el programa DnaSP (Rozas et al., 2017).

## RESULTADOS

### Análisis Morfométricos

Se analizaron 4 hembras adultas y 1 hembra de 6 meses de edad; y 1 macho adulto y 1 de 6 meses de edad. Se obtuvo un peso mínimo de 25,5 Kg y uno máximo de 31 Kg para las hembras adultas, el único macho adulto estudiado pesó 45 Kg. El diámetro del cuello del macho adulto midió 48,3 cm y el de las hembras adultas midió de 36 a 39 cm. En las hembras adultas se obtuvieron valores de 110,5 a 116 cm para el largo desde la punta de la nariz hasta la base de la cola, y valores de 58 a 70 cm para el largo de la cola, mientras que el macho adulto midió 141 cm desde la punta de su nariz hasta la base de la cola y 61 cm desde la base de la cola hasta el final de la misma. En cuanto al PCA, los componentes principales (PC) seleccionados explicaron el 80,15% de los datos, las variables más representativas fueron: PC1: distancia entre caninos superiores, peso, diámetro del pecho, diámetro del cuello y largo

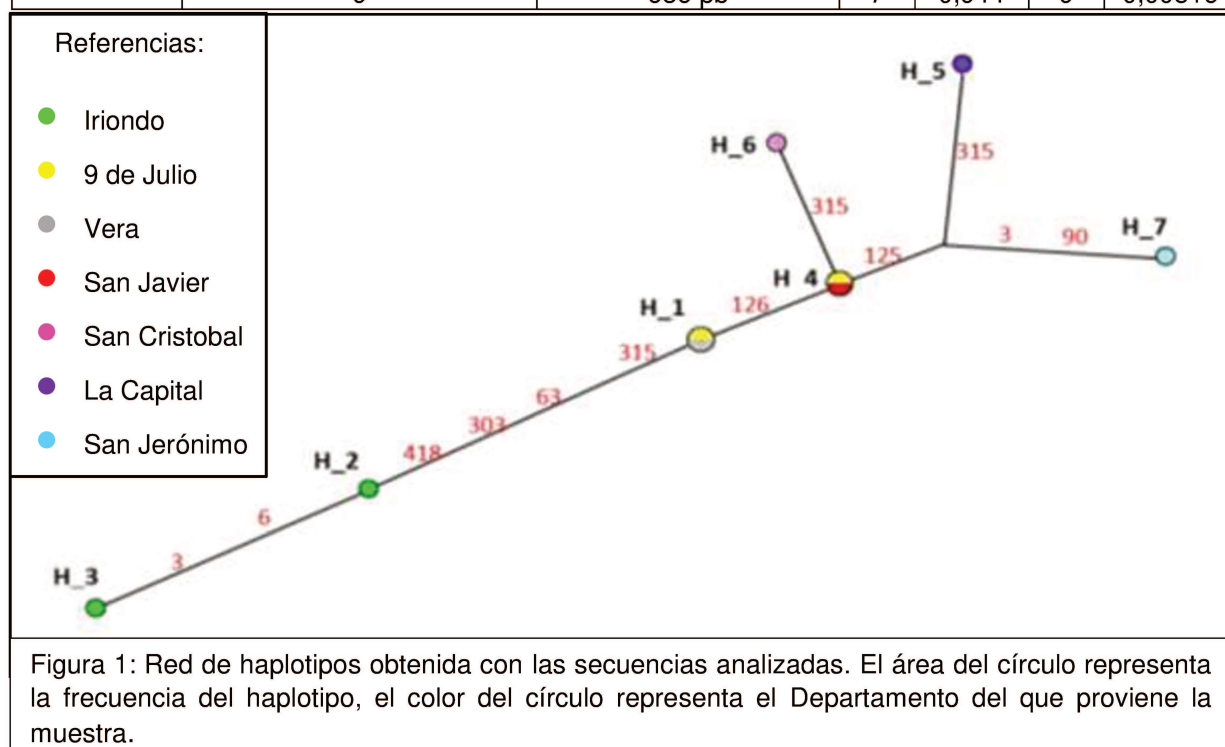
del miembro delantero superior; PC2: edad y miembro trasero inferior. Las variables seleccionadas del PC1 presentaron un orden de magnitud similar, indicando que este PC pondera por igual a esas variables, y estableciendo que se encuentran muy relacionadas entre sí. Los caracteres que más variaron fueron: largo total, largo del cuerpo y peso; y aquellos con menor varianza fueron: distancia entre caninos superiores, distancia entre caninos inferiores, miembro trasero inferior y largo de las vibrisas.

### Análisis Genéticos

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos a partir de la secuenciación de los productos de PCR y en la Figura 1 se observa una red de haplotipos generada a partir de las mismas.

Tabla 1: Resultados obtenidos para: número de haplotipos (n), diversidad de haplotipos (h), número de sitios segregantes entre secuencias (S) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ).

Secuencias	Número de secuencias (N)	Largo de la secuencia	(n)	(h)	(S)	( $\pi$ )
	9	686 pb	7	0,944	9	0,00516



De las 9 secuencias analizadas se obtuvieron 7 haplotipos diferentes. Los individuos 1 y 6 comparten el haplotipo 1, los individuos 2 y 9 comparten el haplotipo 4, y el resto de los individuos poseen haplotipos diferentes individualmente. Se concluye que en los ejemplares analizados existen variaciones en la morfología, principalmente en las variables largo total, largo del cuerpo y peso, así como en los patrones de diversidad genética. Finalmente, se propone continuar con estos trabajos, a fin de aumentar el tamaño de la muestra en las diferentes regiones de distribución de la especie y obtener resultados más concluyentes.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Amavet, P. S., Vilardi, J. C., Rosso, E., Saidman, B.** 2009. Genetic and morphometric variability in *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman), Reptilia, Alligatoridae. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 311(4), 258–269.

**Caragiulo, A., Dias-Freedman, I., Clark, J. A., Rabinowitz, S., Amato, G.** 2013. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogeography of Neotropic pumas (*Puma concolor*). *Mitochondrial DNA*, 304–



312.

- Culver, M., Johnson, W. E., Pecon-Slatery, J., O'Brien, S. J.** 2000. Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*). *Journal of Heredity*, 91(3), 186–197.
- Currier, M. J. P.** 1983. Mammalian Species. *Felis concolor*. *The American Society of Mammalogists*, 200, 1–7.
- Ernest, H. B., Boyce, W. M., Bleich, V. C., May, B., Stiver, S. J., Torres, S. G.** 2003. Genetic structure of mountain lion (*Puma concolor*) populations in California. *Conservation Genetics*, 4(3), 353–366.
- Ferreira, M. A., Allemann, N., Dias, L. G. G. G., & dos Santos Honsho, C.** 2014. Relação entre a biometria ultrassonográfica ocular e os parâmetros morfométricos do crânio, idade, peso e gênero em gatos domésticos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(2), 192–198.
- Gallo, O., Castillo, D. F., Godinho, R., Casanave, E. B.** 2020. Genetic diversity, population structure, and immigration, in a partially hunted puma population of south-central Argentina. *Journal of Mammalogy*, 101(3), 766–778.
- Isasi-Catalá, E., Barreto, G. R.** 2008. Identificación de individuos de jaguares (*Panthera onca*) y pumas (*Puma concolor*) a partir de morfometría de sus huellas (Carnivora: Felidae). *Revista de Biología Tropical*, 56(4), 1893–1904.
- Katoh, K., Standley, D. M.** 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772–780.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, T.** 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- López Romero, A. P.** 2008. *Determinación de variables morfométricas corporales en cien felinos en tres clínicas del norte de Bogotá*. Universidad de La Salle.
- Machado, R. F.** 2017. *Fatores determinantes do tamanho corporal, forma do crânio e uso do espaço em mamíferos sul-americanos (Laurasiatheria), com ênfase em felídeos*. Universidade Federal de Santa Maria.
- Matte, E. M., Castilho, C. S., Miotto, R. A., Sana, D. A., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., de Freitas, T. R. O., Eizirik, E.** 2013. Molecular evidence for a recent demographic expansion in the puma (*Puma concolor*) (Mammalia, Felidae). *Genetics and Molecular Biology*, 36(4), 586–597.
- McNab, K. B.** 1971. On the Ecological Significance of Bergmann's Rule. *Ecological Society of America*, 52(5).
- Nowell, K., Jackson, P.** 1996. Status survey and conservation action plan. Wild cats. *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources*.
- Ojeda, G. N., Amavet, P. S., Rueda, E. C., Siroski, P. A.** 2012. DNA extraction from skins of wild (*Hydrochoerus hydrochaeris* and *Pecari tajacu*) and domestic (*Sus scrofa domestica*) species using a novel protocol. *Genetics and Molecular Research*, 11(1), 672–78.
- Palacios, R.** 2007. Manual para la identificación de carnívoros andinos. Guía de campo. In *Alianza Gato Andino, Córdoba, Argentina*.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C. Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., Sánchez-Gracia, A.** 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299–3302.
- Ruiz-García, M., Pacheco, L. F., Álvarez, D.** 2009. Caracterización genética del puma andino boliviano (*Puma concolor*) en el Parque Nacional Sajama (PNS) y relaciones con otras poblaciones de pumas del noroccidente de Sudamérica. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82(1), 97–117.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*.
- Saremi, N. F., Supple, M. A., Byrne, A., Cahill, J. A., Coutinho, L. L., Dalén, L., Figueiró, H. V., Johnson, W. E., Milne, H. J., O'Brien, S. J., O'Connell, B., Onorato, D. P., Riley, S. P. D., Sikich, J. A., Stahler, D. R., Villela, P. M. S., Vollmers, C., Wayne, R. K., Eizirik, E., ... Shapiro, B.** 2019. Puma genomes from North and South America provide insights into the genomic consequences of inbreeding. *Nature Communications*, 10(1).
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Trigo, T. C., Freitas, T. R. O., Kunzler, G., Cardoso, L., Silva, J. C. R., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., Bonatto, S. L., Eizirik, E.** 2008. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Molecular Ecology*, 17, 4317–4333.