



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

ESTRUCTURA Y VARIABILIDAD GENÉTICA DEL CARDENAL AMARILLO (*Gubernatrix cristata*) EN LA PROVINCIA DE SANTA FE Fessia, Paula

Laboratorio de Genética, Dpto. de Cs. Naturales, FHUC-UNL

Directora: Amavet, Patricia

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: cardenal amarillo, ADNmt, microsatelites

INTRODUCCIÓN

El cardenal amarillo (*Gubernatrix cristata*) es un passeriforme neotropical amenazado que habita en América del Sur. Su distribución en la región abarca desde el sur de Brasil hasta el centro de Argentina y Uruguay, donde habita bosques abiertos y matorrales. Es una especie territorial y socialmente monógama. El cardenal amarillo se encuentra actualmente en peligro de extinción, y sus poblaciones están en constante declive debido a la reducción de su hábitat y a la captura ilegal de ejemplares macho que son frecuentemente comercializados debido al atractivo de su color y de su canto. Existen algunos datos previos analizando la región control de ADNmt y marcadores microsátélites en poblaciones de cardenal amarillo de las provincias de Río Negro, La Pampa, Corrientes y San Luis, hallando 11 sitios polimórficos en 13 haplotipos mitocondriales diferentes, habiendo dos haplotipos más frecuentes. Recientemente se han analizado los mismos marcadores en ejemplares cautivos del sur de Brasil, hallando como haplotipo mitocondrial más frecuente el mismo que fue reportado para ejemplares del norte de Argentina y Uruguay. Hasta la fecha no se encuentran registros de estudios genéticos de esta especie en la provincia de Santa Fe.

OBJETIVOS

- Caracterizar genéticamente a ejemplares de Cardenal Amarillo (*Gubernatrix cristata*) de la provincia de Santa Fe mediante marcadores moleculares.
- Comparar patrones básicos de diversidad y estructura genética entre ejemplares de cardenal amarillo de la provincia de Santa Fe y los de otras áreas de su distribución mediante el estudio de marcadores microsátélites y un marcador mitocondrial (región control).
- Aportar datos para ampliar la escasa información disponible acerca de esta especie en nuestra provincia.

Título del proyecto: Desarrollo de estrategias de rehabilitación y reintroducción para la conservación del Cardenal Amarillo en la provincia de Santa Fe.

Instrumento: Fondo de la Conservación del Patrimonio Natural de la Provincia de Santa Fe

Año convocatoria: 2023

Organismo financiador: UNL, Fundación Hábitat y Desarrollo, Ministerio de Ambiente y Cambio Climático de Santa Fe, Sancor Seguros y Compañía de Cervecerías Unidas.

Director/a: Amavet, Patricia



METODOLOGÍA

Obtención de muestras

Durante el periodo comprendido entre los meses de Octubre, Noviembre y Diciembre del año 2022, se procedió a la obtención de muestras de plumas y tejidos pertenecientes a 13 individuos de la especie *Gubernatrix cristata*, conocida como Cardenal Amarillo, los cuales habían sido objeto de tráfico ilegal y se encontraban bajo custodia en el Centro de rescate, recepción, rehabilitación y reinserción de fauna "Granja La Esmeralda" (Figura 1 y Figura 2). Asimismo, se tomó una muestra de un ejemplar taxidermizado recolectado en la fecha del 15 de Octubre de 1931 en la localidad de San Cristóbal, provincia de Santa Fe.



Figura 1: a) y b) proceso de toma de muestras de ejemplares de Cardenal amarillo.

Figura 2: ejemplares cautivos de *G. cristata* en la Granja La Esmeralda.

Aislamiento de ADN y amplificaciones

Con el propósito de llevar a cabo la extracción del ADN, se implementó inicialmente un protocolo basado en el método de extracción salina, como fue descrito por Ojeda et al., (2012). Sin embargo, debido a que dicho procedimiento no arrojó los resultados deseados, se optó por utilizar un Kit comercial, DNeasy Blood & Tissue Kit, de Qiagen, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para obtener una visión más abarcadora de la diversidad y estructura poblacional, se emplearon dos tipos de marcadores: nucleares (microsatélites) y mitocondriales, específicamente la región control del ADNmt. Para llevar a cabo el análisis mediante microsatélites, se utilizaron diez pares de cebadores diseñados específicamente para esta especie por Martins-Ferreira et al. (2010), y se siguieron las condiciones de amplificación descritas por los autores. En cuanto a la obtención de secuencias de la región control del ADNmt, se emplearon los *primers* LCR3 y H1248 (Tarr, 1995), siguiendo las condiciones de PCR detalladas por Dominguez et al., (2017). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 μ l, utilizando 50 ng de ADN genómico, 0,2 μ M de cebadores, 0,2 mM de dNTP, 2,5 μ l de *buffer* de PCR 10X y 0,1 U de Taq polimerasa. La temperatura de *annealing* empleada para todos los marcadores fue de 55 $^{\circ}$ C.

Obtención de genotipos y secuencias

Los productos resultantes de las reacciones de PCR fueron sometidos a evaluación mediante una técnica de corrida electroforética en geles de agarosa al 2% (Figura 3). Posteriormente, se llevó a cabo el envío de dichos productos a un servicio de secuenciación externo, con el objetivo de obtener información detallada sobre la composición de las

secuencias de ADN en el caso del marcador mitocondrial, y los genotipos de los individuos, para el caso de los microsatélites.

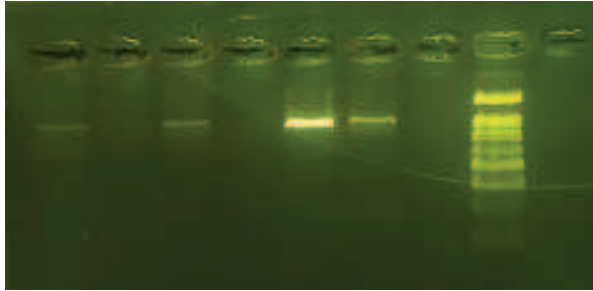


Figura 3: productos de PCR (marcador mitocondrial) visualizados en gel de agarosa al 2% junto con un marcador de tamaño molecular.

CONCLUSIONES

Se logró con éxito la obtención de muestras, el aislamiento de ADN y las amplificaciones en todos los individuos, con la excepción de la muestra proveniente del ejemplar taxidermizado. Dado el carácter considerablemente antiguo de dicha muestra, es probable que el material se encuentre en un estado avanzado de degradación. Actualmente estamos a la espera de los resultados provenientes del servicio de secuenciación externo para poder dar continuidad al análisis de los datos obtenidos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bandelt, H. J., Forster, P., & Rohl, A.,** 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Beier, C., & Fontana, C. S.,** 2019. Breeding biology of the endangered Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata* in Brazil. *Ornithology Research*, 27(1), 44–52.
- Bülau, S. E., Kretschmer, R., Furo, I. D. O., de Oliveira, E. H. C., & de Freitas, T. R. O.,** 2021. Karyotype Organization of the Endangered Species Yellow Cardinal (*Gubernatrix cristata*). *DNA*, 1(2), 77-83.
- Bülau, S. E., Peçanha, W. T., Martins-Ferreira, C., & de Freitas, T. R. O.,** 2021. Genetic diversity in captive Yellow Cardinals (*Gubernatrix cristata*) from Southern Brazil: implications for the management and conservation of an endangered species. *Journal of Ornithology*, 162(2), 579–591.
- Domínguez M., Reboreda J.C. & Mahler B.,** 2015. Impact of Shiny Cowbird and botfly parasitism on the reproductive success of the globally endangered Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata*. *Bird Conservation International* 25: 294–305.
- Domínguez, M., Tiedemann, R., Reboreda, J. C., Segura, L., Tittarelli, F., & Mahler, B.,** 2017. Genetic structure reveals management units for the yellow cardinal (*Gubernatrix cristata*), endangered by habitat loss and illegal trapping. *Conservation Genetics*, 18(5), 1131–1140.
- Dominguez, M., Pizzarello, G., Atencio, M., Scardamaglia, R., & Mahler, B.,** 2019. Genetic assignment and monitoring of yellow cardinals. *The Journal of Wildlife Management*.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L.,** 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567.
- Katoh, K., & Standley, D. M.,** 2013. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.

Martins-Ferreira C, Haddrath O, Baker AJ, Freitas TRO., 2010. Isolation and characterization of 10 microsatellite loci in the Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata*. *Mol Ecol Resour.* 10:751–754.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P., 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 155(2), 945–959.

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.

Sánchez-Cabrera, V., Pollack-Velásquez, L., & Quijano-Jara, C., 2018. Aislamiento de ADN genómico a partir de plumas de *Columbina cruziana*. *Sagasteguiana*, 1(1), 45-50.

Segura, L. N., Perelló, M., Gress, N. H., & Ontiveros, R., 2019. The lack of males due to illegal trapping is causing polygyny in the globally endangered Yellow Cardinal *Gubernatrix cristata*. *Ornithology Research*, 27(1), 40–43.

Tarr, C. L., 1995. Primers for amplification and determination of mitochondrial control-region sequences in oscine passerines. *Molecular Ecology*, 4(4), 527–530.

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.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P., 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538.

