



TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ADN AMBIENTAL APLICADOS AL ESTUDIO DE LA BIODIVERSIDAD SANTAFESINA

Emilia Fassetta, Victoria Rosso

Laboratorio de Genética, Facultad de Humanidades y Ciencias, Universidad Nacional del Litoral

Patricia Amavet (Directora)

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: ADN ambiental, biodiversidad, vertebrados

INTRODUCCIÓN

El ADN ambiental constituye un método novedoso mediante el cual se puede obtener y analizar material genético presente en el ambiente a partir de muestras de agua, sedimentos o aire. En el ambiente, el ADN puede hallarse a partir de diversos materiales provenientes de organismos, como la piel, secreciones, heces, sangre, cuerpos en descomposición u organismos completos (Ruppert et al., 2019). Su metodología de análisis incluye la extracción y purificación del ADN, amplificación por PCR de ciertos genes, y su secuenciación, para lograr la identificación de los organismos presentes en la muestra mediante la detección de secuencias específicas. Por lo tanto, el uso del ADN ambiental es una potente herramienta para realizar monitoreos de la biodiversidad presente en el ambiente (Deiner et al., 2015).

El estudio del ADN ambiental tiene algunas ventajas sobre las técnicas clásicas de monitoreo de la riqueza y abundancia de seres vivos. Logra resolver cuestiones en torno a la identificación taxonómica de los organismos, posibles perturbaciones y destrucción de hábitats, y la dificultad para detectar especies elusivas, raras o crípticas. Además, siendo un método sensible a variaciones ambientales, puede ser utilizado para estandarizar y comparar muestras de ecosistemas que presentan distintos estados de conservación (Ruppert et al., 2019). La técnica está principalmente orientada al estudio de vertebrados,

Título del proyecto: EVALUACIÓN INTEGRAL DE HÁBITATS DEL YACARÉ OVERO CON DIFERENTES NIVELES DE PERTURBACIÓN, MEDIANTE ESTUDIOS MOLECULARES

Instrumento: CAI+D

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: UNL

Directora: Amavet, Patricia



por lo cual el presente estudio se orientó a aplicar esta novedosa metodología de monitoreo de especies de vertebrados a diferentes ambientes santafesinos.

OBJETIVOS

- Optimizar la metodología de extracción de ADN ambiental a partir de muestras de agua y suelo.
- Analizar la riqueza específica de vertebrados en diferentes ambientes de la provincia de Santa Fe empleando ADN ambiental.

METODOLOGÍA

Colecta de muestras

Las muestras se colectan en recipientes plásticos estériles, empleando guantes para evitar la contaminación de las mismas (Fig.1). Fueron obtenidas muestras de 1 L de agua y de 100 gr de suelo, que se trasladaron en contenedores refrigerados para evitar la degradación del material genético, conservándose a -20°C hasta su procesamiento.

Se obtuvieron muestras de diferentes sitios de la provincia de Santa Fe (Fig. 1). En cada sitio de muestreo, se obtuvieron mediciones de la temperatura del suelo, agua y aire, además de las coordenadas geográficas (Fig. 2).



Figura 1: Sitios de muestreo



Figura 2: Toma de muestras en zona de Colastiné

Metodología de extracción de ADN a partir de muestras de agua y suelo

Para extraer ADN a partir de agua, se filtraron entre 0,25-0,7 L por cada muestra (Fig. 3) y los filtros se procesaron siguiendo el método de Renshaw et al. (2015), que consiste en: colocar cada filtro en un *buffer* de digestión a 4 °C durante una semana; al retirarlos de la heladera, los filtros se incuban en un tubo a 60 °C durante 30 minutos. A partir de esta etapa se realizó para cada muestra una secuencia de tres lavados de solución de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Al *pellet* se le agregó alcohol isopropílico para que el ADN precipite. Luego, a este tubo con ADN se le agregó 3 mL de etanol 70%, se centrifugó, se eliminó el etanol y se dejó secar el *pellet*. El ADN resultante fue hidratado con 100 mL de agua ultrapura estéril y se conservó a -20 °C. Por otro lado, las muestras de suelo se procesaron siguiendo los protocolos de Epp et al. (2012), utilizando un kit de aislamiento de ADN (PowerMax® Soil DNA Isolation kit –MOBIO-).



Figura 3: Filtrado de muestras de agua empleando bomba de vacío

Evaluación de los extractos de ADN mediante electroforesis en geles

Los extractos de ADN fueron analizados en calidad y concentración mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% en transiluminador de luz azul (Fig. 4) y espectrofotómetro UV (260/280 nm).

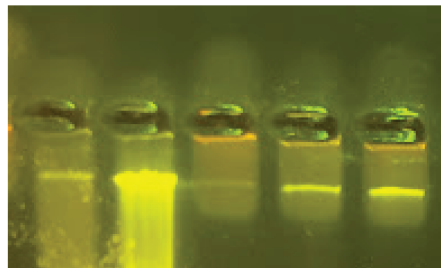


Figura 4: Gel de agarosa al 0.8% mostrando extractos de ADN obtenido a partir de muestras ambientales

Amplificación mediante PCR

Las muestras de ADN se amplificaron por PCR empleando *primers* específicos para diferentes grupos de vertebrados. Las condiciones de PCR para cada marcador dependieron de las características del par de *primers* empleados.

Una vez confirmada la utilidad de los *primers* empleados, las muestras de ADN ambientales fueron analizadas mediante un estudio de *metabarcoding*, que consiste en realizar secuenciación masiva empleando *primers* universales. Esta técnica posee el fin de determinar las especies pertenecientes a diferentes grupos de vertebrados que están presentes en cada sitio muestreado.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Empleando las metodologías descritas se obtuvieron extractos de ADN de buena calidad (mediciones observadas entre 1,8 a 2,2 en la relación 260/280 en espectrofotómetro) y concentración adecuada (mayor a 25 ng/uL) para su uso en reacciones de PCR. Las muestras de ADN fueron enviadas a secuenciar mediante la técnica de *metabarcoding* (gen 12S de rRNA), la cual permitió obtener registros de las especies presentes en cada ambiente. Se halló mayor diversidad de especies en las muestras de agua respecto de las de suelo; y las muestras más diversas fueron las de agua obtenidas en Colastiné.

Las metodologías empleadas resultaron ser exitosas en la obtención de ADN de adecuada calidad y concentración, apto para ser utilizado en posteriores análisis moleculares aplicados al estudio de biodiversidad.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Deiner, K.; Bik, H.M., Mächler, E.; Seymour, M.; Lacoursière-Roussel, A.; Altermatt, F.; Creer, S.; Bista, I.; Lodge, D.M.; de Vere, N.; Pfrender, M.E. y Bernatchez, L. 2017. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. *Mol. Ecol.* 26, 5872–5895.

Epp, L.S.; Boessenkool, S.; Bellemain, E.P.; Haile, J.; Esposito, A.; Riaz, T.; Erséus, T.; Gusarov, V. I.; Edwards, M. E.; Johnsen, A.; Stenøien, H. A.; Hassel, K.; Kauserud, H.; Yoccoz, N. G.; Bråthen, K. A.; Willerslev, E.; Taberlet, P.; Coissac, E. y Brochmann, C. 2012. New environmental metabarcodes for analyzing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Mol. Ecol.* 21, 1821–1833.

Renshaw, M.A.; Olds, B.P.; Jerde, C.L., Mcveigh, M. y Lodge, D.M. 2015. The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Mol. Ecol. Resour.* 15:168-176.

Ruppert, K.M.; Kline, R.J. y Rahman, M.S. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Glob Ecol Conserv* 17:e00547.