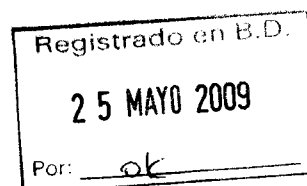


VARIABILIDAD GENÉTICA Y RELACIONES DE PARENTESCO DE LAS
POBLACIONES DE LAPA ROJA (*Ara macao*)

Informe Final
23-02-2009

CODIGO DEL PROYECTO: 111-A7-160

Antecedentes



31-05-08

1. Objetivo general

Caracterizar la variabilidad genética de la población silvestre de *Ara macao* en Costa Rica para establecer políticas de manejo y conservación de esta especie.

Objetivos específicos

- Recolectar muestras de plumas, sangre o heces de individuos de la especie *Ara macao* de poblaciones silvestres de Costa Rica.
- Determinar las relaciones de parentesco entre individuos silvestres de *Ara macao* a partir de las muestras analizadas.
- Comparar la variación genética de poblaciones silvestres obtenidas en el presente proyecto con individuos en cautiverio de otros estudios.
- Determinar el sexo de los individuos analizados.
- Formular recomendaciones a partir de la información generada para el mejoramiento de las estrategias para el manejo y la conservación de la población silvestre de *Ara macao*.

2. Duración original del proyecto: 08/03/07 al 31/05/08

3. Períodos de ampliación de vigencia en caso de que los hubiera: NA

4. Investigadores y carga académica

Gustavo Gutiérrez Espeleta, Ph. D., investigador principal, 1/8 tc
Kenneth Madriz Ordeñana, sin carga
Henry Soto Muñoz, sin carga
Julio Sánchez Pérez, sin carga

¿Cómo se hizo y qué se hizo para ejecutar el proyecto?

5. Las actividades que se desarrollaron para la consecución de las metas y el porcentaje de logro total al concluir la investigación

Meta: Contar con 50 muestras de ADN de individuos silvestres.

Se colectaron 39 muestras de plumas de lapas en cautiverio, provenientes del zooave y 35 muestras de heces secas y frescas de lapas silvestres. A estas muestras se le realizaron dos tratamientos: la mitad de la muestra se preservó en etanol y la otra mitad no se le adicionó ningún reactivo.

Se probaron dos métodos de extracción para plumas con el Kit Nuclospin Tissue y también el método de Wizard (Promega) para tejido. En ambos casos se obtuvieron excelentes resultados. De las 39 muestras de plumas, se obtuvo 36 ADNs de muy buena calidad. De tres plumas no fue posible obtener ADN, asumimos que se debe a la ausencia de células en el extremo de la pluma.

Para la extracción de heces se probaron los métodos Wizard de promega y el kit Qiamp@ DNA stool (Qiagen), el segundo da mejores resultados. Con ambos métodos, de las 35 muestras de heces, se obtuvo 15 ADNs de buena calidad (42%). Hay que repetir los procesos de extracción para las otras muestras.

Meta: Establecer relaciones de parentesco entre las dos poblaciones estudiadas.

Aunque se tienen algunos datos moleculares, no se puede establecer este tipo de relaciones. Se necesitan de la totalidad de datos para todos los iniciadores para todas las muestras. Ver adelante.

Meta: determinar diferencias entre poblaciones de Osa y Carara y comparar estos datos con los estudios que incluyen individuos en cautiverio.

Los individuos en cautiverio serán analizados en este mismo estudio. Se probaron tres iniciadores fluorocromados CT21, CT43 y CT74 en las muestras de plumas (población en cautiverio). Se obtuvo los siguientes resultados:

CT21: se obtuvieron los genotipos de 18 individuos (ADNs de plumas) y se identificaron seis alelos diferentes.

CT43: se obtuvieron los genotipos de 21 individuos (ADNs de plumas) y se identificaron seis alelos diferentes.

CT74: No se ha podido amplificar este marcador, pese a muchos intentos realizados.

Pendiente

- Correr estos últimos tres iniciadores para todas las muestras de plumas y heces.
- Probar dos iniciadores sin fluorocromar AgGT31 y AgGT83, para determinar si son polimórficos. Si lo son, correr estos dos marcadores para todas las muestras del estudio.

Meta: Establecer el sexo de todos los individuos muestreados.

Meta: Establecer políticas que garanticen la preservación de la variabilidad genética de *Ara macao*.

Hay que esperar los resultados moleculares para intentar algo en este sentido.

6. Los métodos o los procedimientos utilizados

Colecta de muestras

Dado que el objeto de estudio es la población silvestre de *Ara macao*, la recolección de muestras se realizó principalmente en las dos localidades donde se encuentran las poblaciones silvestres de mayor tamaño en Costa Rica: los alrededores del Parque Nacional Carara y del Parque Nacional Corcovado.

Considerando que las parejas de lapas rojas de Costa Rica inician la incubación en el mes de diciembre la cual se prolonga por 24 a 28 días, además de que las crías permanecen en el nido durante tres meses, el muestreo se llevó a cabo en los meses de enero a abril. Originalmente, se pensó que las muestras fueran principalmente plumas de pichones o de adultos que fueran tomadas directamente de nidos previamente reconocidos y ubicados por funcionarios de organizaciones o particulares de la comunidad local. Sin embargo, tanto la ubicación de los nidos como la escalada para su acceso, fue difícil de coordinar con las personas de la comunidad local, esta fue la fase más difícil del proyecto.

Se pensó tomar un registro de cada nido muestreado con la siguiente información: localización del sitio mediante posicionamiento satelital (GPS), fecha de muestreo, condiciones del nido, condición de los pichones (tamaño y peso), condición de los padres (en caso de ser observados), especie del árbol en que se encuentra el nido, altura y orientación de la entrada del nido.

Además de plumas se colectaron muestras de heces, las cuales fueron obtenidas dentro o fuera de la época de anidación. Se colocaron láminas de plástico debajo de los árboles donde se alimentaban las lapas y se conservaron las heces en etanol en tubos de plástico.

También se recolectaron muestras provenientes de individuos de *Ara macao* decomisados o que se encontraban en cautiverio, que hayan nacido en el medio silvestre y su zona de procedencia fuera conocida.

Extracción del ADN genómico

Para la extracción de ADN a partir de muestras de plumas, se tomó el cálamo (base de la pluma) que es la porción que contiene residuos de células del ave, a partir del cual el ADN fue extraído utilizando el kit QIAamp DNA (Qiaen). La extracción de ADN a partir de heces se realizó siguiendo el protocolo de ExtractMaster Fecal Extraction Kit (Epicentre Biotechnologies). La calidad del ADN extraído se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, luego se cuantificó por espectrofotometría y se conservó a -20°C. De todas las muestras biológicas obtenidas, se clasificaron 40 ADNs como de buena calidad, y fueron los que se procesaron para los análisis de microsátélites.

Aplicación de los marcadores moleculares

El levantamiento de perfiles de ADN se llevó a cabo utilizando marcadores microsátélites que son altamente informativos. Russello et al. (2001) y Caparroz et al. (2003) han descrito 14 marcadores en total para las especies *Amazona guildingii* y *Ara ararauna* respectivamente, de los cuales cuatro marcadores son informativos para la especie en estudio, *Ara macao*. Los iniciadores correspondientes fueron evaluados preliminarmente con resultados positivos tanto para *Ara macao* como para *Ara ambiguus* en Costa Rica en el Laboratorio BioTécnica. Se intentó correr algunos microsátélites con los siguientes resultados.

Análisis genético

La interpretación de los perfiles de ADN se realizó utilizando los programas informáticos Genescan y Genotyper 3.1 de PE Biosystems. No se procedió a calcular las frecuencias alélicas, distancias genéticas y equilibrio de Hardy-Weinberg puesto que no hubo suficientes resultados.

Los resultados de la presente investigación concernientes a la población silvestre de *Ara macao* se tratarán de comparar con los datos del estudio de la variabilidad genética de la misma especie en cautiverio realizada por el Dr. Kenneth Madriz y los que generará la Lic. Sheirys Jiménez en coordinación con las organizaciones ZooAve y Amigos de las Aves.

7. Las dificultades y la manera de confrontarlas

Un problema importante que se presentó y que aún vemos las consecuencias, fue que de agosto del 2007 a la tercera semana de enero del 2009, el ABI 310 de la Escuela de Biología estuvo fuera de servicio, es decir, casi toda la vigencia de este proyecto. Esto atrasó drásticamente los avances en la parte molecular al extremo que se tuvo que paralizar este y otros proyectos en su totalidad, ya que no habían fondos suficientes para comprar el servicio al CIBCM. Con fondos de otros proyectos se pudieron hacer algunas corridas en el CIBCM, pero no la totalidad. Además, muchas de estas corridas tuvieron que repetirse al no obtenerse resultado alguno o por ser inconsistentes, es decir, se repitieron algunas muestras y los resultados no eran los mismos.

Resultados

8. Los logros o resultados más relevantes

Cuadro 1. Dos marcadores microsatélites y sus respectivos alelos para cada una de las muestras analizadas.

Muestra	CT21		CT43	
	alelo 1	alelo 2	alelo1	alelo2
1			196	204
2			200	204
3			196	196
4			196	196
5			198	198
6				
7			198	210
8	247	247	196	210
9	0	0	202	202
10				
11			196	196
12	249	259	196	210
13	251	253	198	198
14	0	0	196	202
15	247	249		
16				
17			196	200
18			196	200
19			200	204
20	247	253	198	204
21	0	0	196	196
22	247	251		
23				
24	247	253		
25				
26	247	249	198	210
26	247	249		
28	247	247		
29	247	249	210	210
30	247	247		
31	245	247	198	204
32				
33	247	249	196	198
34	259	259		
35	247	255		
36	249	251		
40	247	247		

Al utilizar algunos de estas muestras como controles en otras corridas, se encontraron resultados inconsistentes. Por ejemplo, si las corridas se hicieron en el ABI 310 se obtuvieron resultados homocigotos y si se corrieron en el ABI 3100 eran heterocigotos para la misma muestra. Ante esto, se tomó la decisión de repetir absolutamente todos los PCR y correrlos en un mismo aparato.

9. Trabajos de graduación y presentaciones hechas en congresos o seminarios, en el caso de que los hubiera.

Aiko Takahashi, estudiante de maestría de Agronomía, participó en la colección, análisis de laboratorio y de datos de algunas de las muestras incluidas en este informe. Por razones personales, ella decidió no continuar con este estudio. En su lugar, Fernando Villanea Guevara, estudiante de licenciatura de Biología, continuó con el mismo, como su proyecto de graduación de licenciatura. Sin embargo, recibió una beca para hacer estudios de doctorado y no continuó con el proyecto.

10. Las observaciones o recomendaciones

Se procede a entregar este informe final para cerrar formalmente el proyecto, pero continuaremos con la generación de datos y sus respectivos análisis para ver si podrían conducir a una publicación.

11. PUBLICACIONES: No se ha concluido con la generación de datos y por tanto con el análisis, por lo que no se ha podido elaborar publicaciones sobre el proyecto.

Informe Financiero

12. La VI aportó únicamente 8 horas asistente x 7.5 meses para el año 2007. Hubo aportes económicos por parte del Dr. Christopher Vaughan, Universidad de Wisconsin, Dep.. of Wildlife Ecology y de la estudiante Aiko Takahashi. Estos aportes se utilizaron en la compra de reactivos de laboratorio, específicamente los iniciadores específicos de *Ara macao* y los reactivos de PCR.