

Número: IF-2019-03569984-GDEBA-DGLYCNMAGP

Referencia: Recursos Genéticos ANEXO I

Requisitos para solicitar permiso de acceso a los recursos genéticos y a los conocimientos tradicionales asociados:

I. Datos de las Solicitantes **

Investigadora Responsable

Apellido y Nombre: Rodriguero, Marcela Silvina.

DNI: 24.583.692

Título y profesión: Dra. en Ciencias Biológicas – Investigadora Adjunta del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Correo electrónico: rodriguero@ege.fcen.uba.ar

Dirección particular: Dr. Eleodoro Lobos 285, 7J, CABA, Argentina.

Teléfono particular: (011) 2065-3269

Institución que presenta el proyecto: Universidad de Buenos Aires.

Dirección laboral: Grupo de Investigación en Filogeografía y Filogenias Moleculares; Departamento de Ecología, Genética y Evolución. Intendente Güiraldes 2160 - Pabellón II - Ciudad Universitaria (1428). Capital Federal, República Argentina.

Teléfono laboral: (011) 5285-8645

Integrante/s del proyecto que participará/n en el muestreo

Apellido y Nombre: Fernandez Goya, Lucia

DNI: 36.374.747

Título y profesión: Licenciada en Cs. Biológicas – Estudiante de Doctorado de la Universidad de Buenos Aires

Correo electrónico: luluf.goya@gmail.com

Dirección particular: Talcahuano 1097, 14D, CABA, Argentina.

Teléfono particular: 116819-7988

Dirección laboral: Laboratorio de Genética Evolutiva; Departamento de Ecología, Genética y Evolución. Intendente Güiraldes y Costanera Norte s/n Pabellón II - Ciudad Universitaria (1428). Capital Federal, República Argentina.

Teléfono laboral: (011) 5285-8645

***Con la presente se adjunta copia de título habilitante de grado y DNI*

II. Datos del proyecto

Título del proyecto: Origen de la asexualidad en gorgojos de la tribu Naupactini: aspectos microbiológicos, moleculares y ecológicos

Objetivos: Se estudiarán los aspectos microbiológicos, moleculares y ecológicos de la partenogénesis inducida por *Wolbachia* en gorgojos de la tribu Naupactini a fin de proponer un mecanismo para este modo reproductivo.

Descripción de actividades:

-Metodologías de captura, colecta y muestra.

Las muestras serán colectadas mediante dos metodologías principales.

1. Manualmente: cuando sea posible se recuperarán los ejemplares de manera individual, tomándolos directamente de la planta en la que se encuentren.
2. Método de la sábana: para vegetación en altura o muy frondosa. Se sacudirá la vegetación habiendo colocado una sábana de colecta debajo. Luego, se colectarán los especímenes necesarios manualmente de la sábana y el resto de la fauna será devuelta a la vegetación antes de continuar con el muestreo.

-Cronograma de trabajo y actividades a realizar.

Cronograma de trabajo del proyecto:

1) Muestreo de material

El material será colectado como se indicó más arriba

2) Realización de experimento de cura con antibióticos y cría de gorgojos

Los gorgojos colectados serán mantenidos en una jaula comunitaria por especie y población durante dos semanas para garantizar su madurez sexual. Luego serán sometidos a un experimento de cura con antibióticos, a saber: Se los dividirá en dos grupos al azar (Control y Tratadas) y se administrará el tratamiento acorde. Las hembras Tratadas serán alimentadas con hojas previamente sumergidas en una solución de Tetraciclina 2,5mg/ml (un antibiótico efectivo contra la bacteria *Wolbachia pipientis*), mientras que las hembras Control serán alimentadas con hojas previamente sumergidas en agua destilada. Los tratamientos serán administrados día por medio durante un período de 20 días. Se cuantificará los huevos por postura de cada hembra y se colectarán las posturas día por medio para estudiar la viabilidad. Las posturas serán mantenidas en una cámara de cría a 27,5°C, 80% HR y con un fotoperíodo de 16

horas de luz. Las hembras serán sacrificadas de manera aleatoria conforme vayan poniendo huevos a fin de poder estudiar la relación entre la densidad relativa de *Wolbachia* y la viabilidad de las posturas. Se extraerá el ADN de las hembras sacrificadas (ver punto 4 más abajo) y se procederá a la amplificación por PCR en tiempo real a fin de determinar la concentración relativa de la bacteria *Wolbachia* (ver punto 5 más abajo).

3) Disección de material biológico

Para la elaboración de microbiomas: Se esterilizará la superficie de los gorgojos en lavandina comercial 20% y posteriormente se enjuagarán tres veces en etanol 100% para reducir las bacterias externas contaminantes. Se utilizará el individuo completo.

Para la elaboración de transcriptomas: Se diseccionarán los ovarios de 5-10 hembras de cada población previamente anestesiadas con éter en RNAlater (solución estabilizadora del ARN) para preservar los transcritos.

4) Extracción y cuantificación de ácidos nucleicos (ADN o ARN)

Para ADN: El ADN se extraerá utilizando el kit “Qiagen DNA easy” (Qiagen), ya que los lavados y la elución por columna realizados con este kit garantizan elevadas relaciones de pureza. La cuantificación y la constatación de la pureza se llevarán a cabo por medio de espectrofotometría en un equipo Nanodrop.

Para ARN: El ARN será extraído mediante un protocolo de extracción utilizando TRIzol, adaptado para pequeñas cantidades de tejido. La calidad de la extracción será evaluada en geles de agarosa y la cuantificación y la constatación de la pureza se llevarán a cabo por medio de espectrofotometría en un equipo Nanodrop.

5) Amplificación en tiempo real

Se utilizarán el reactivo SYBR® Green y los cebadores específicos diseñados por la Dra. Rodríguez para genes reporteros de *Wolbachia* y del hospedador (los gorgojos), que amplifican segmentos de aproximadamente 150 pb. Se realizarán tres réplicas técnicas de cada individuo. La carga bacteriana se estimará por comparación entre la cantidad de ADN nuclear del hospedador y la cantidad de ADN de la bacteria. La evaluación de las curvas (Cq) y los datos de eficiencia se tratarán en el programa LinRegPCR.

6) Análisis e interpretación de resultados

Los datos se tratarán estadísticamente a través de modelos adecuados en cada caso.

7) Preparación de Librerías y Secuenciación masiva de microbiomas y transcriptomas

Para la elaboración de microbiomas: Se amplificará la región V4 del gen 16S rDNA, que ha probado ser muy informativa, recuperando una buena resolución taxonómica desde orden hasta género y resultando la mejor opción para la plataforma Illumina. Se utilizarán los oligonucleótidos adecuados, que serán modificados por el agregado de una secuencia identificadora multiplex específica para cada muestra/especie de gorgojo (“barcode”) y los adaptadores necesarios para la secuenciación.

Se enviará la cantidad requerida de ADN para la construcción de las bibliotecas y la secuenciación en la plataforma MiSeq Illumina Inc. a alguna de las compañías que ofrecen servicios de secuenciación de próxima generación tanto en Argentina (INDEAR o INTA) como en el exterior (Macrogen, Seqmatic).

Para la elaboración de transcriptomas: Se enviará la cantidad requerida de ARN total para la construcción de las bibliotecas normalizadas (a fin de evitar la sobrerrepresentación de los transcritos más comunes) y la secuenciación mediante la tecnología “paired-end sequencing assay” en la plataforma HiSeq Illumina Inc. a alguna de las compañías que ofrecen servicios de secuenciación de próxima generación tanto en Argentina (INDEAR o INTA) como en el exterior (Macrogen, Seqmatic).

8) Análisis Bioinformático

Para la elaboración de microbiomas: Los oligonucleótidos y los adaptadores serán removidos de las lecturas obtenidas, que serán separadas de acuerdo al barcode de cada muestra (individuo de cada especie) para proceder al filtrado según la calidad y la longitud utilizando el pipeline disponible en el programa QIIME (Quantitative Insights into Microbial Ecology). Las secuencias serán agrupadas en “unidades taxonómicas operativas” (OTUs) al 97% de similitud por selección basada en referencias utilizando QIIME y las bases de datos curadas Greengenes, Silva o RDP (“Ribosomal Database Project”). Solo se incluirán las OTUs que contengan más de cinco secuencias, para reducir la probabilidad de inclusión de OTUs resultado de errores de secuenciación. Las diferencias en la frecuencia de las OTUs entre especies serán evaluadas a través de pruebas no paramétricas con simulaciones Monte Carlo presentes en QIIME, filtrándose los taxones de baja frecuencia. Se caracterizará la estructura y la composición de los microbiomas obtenidos utilizando distintos pipelines ofrecidos por el programa mencionado. Los resultados serán visualizados en Figtree (formato network) o en Megan v. 6 (formato matriz).

Para la elaboración de transcriptomas: Se obtendrán unas 50 millones de lecturas de 75 pb, suficientes para una medición técnicamente precisa de la expresión genética de la mayoría de los genes. Las secuencias serán procesadas con los programas FastQC, Trimmomatic v. 0.22 (Illumina, Inc.), Bowtie 2 v. 2.1.0 y Trinity RNA-seq Assembly, para verificar y filtrar las secuencias en base a su calidad, eliminar adaptadores, identificar secuencias

1. Determinar el umbral de densidad bacteriana necesario para inducir partenogénesis en el gorgojo *Pantomorus postfasciatus* a través de un experimento de cura con antibióticos (ver puntos 2, 4 y 5 de las actividades descriptas anteriormente).
2. Estudiar la flora microbiana de los gorgojos partenogenéticos, de reproducción sexual no infectados con *Wolbachia* y de reproducción sexual infectados con títulos muy bajos (ver puntos 3, 4, 7 y 8 de las actividades descriptas anteriormente).

- *Lugar: indicar croquis del área donde se realizarán las actividades y adjuntar mapa de localidades a coleccionar, itinerario y sitios de muestreo.*

El muestreo se realizará en espacios públicos y al aire libre dentro de distintos municipios de la Provincia de Buenos Aires. Los sitios específicos pueden variar dependiendo de dónde podamos encontrar especímenes, pero en principio se muestreará en Zárate, La Plata, Avellaneda, General Rodríguez y aquellas localidades que integran el recorrido del Tren de la Costa: Olivos, La Lucila, Acassuso, San Isidro, Beccar, San Fernando y Tigre (ver Figura 1).

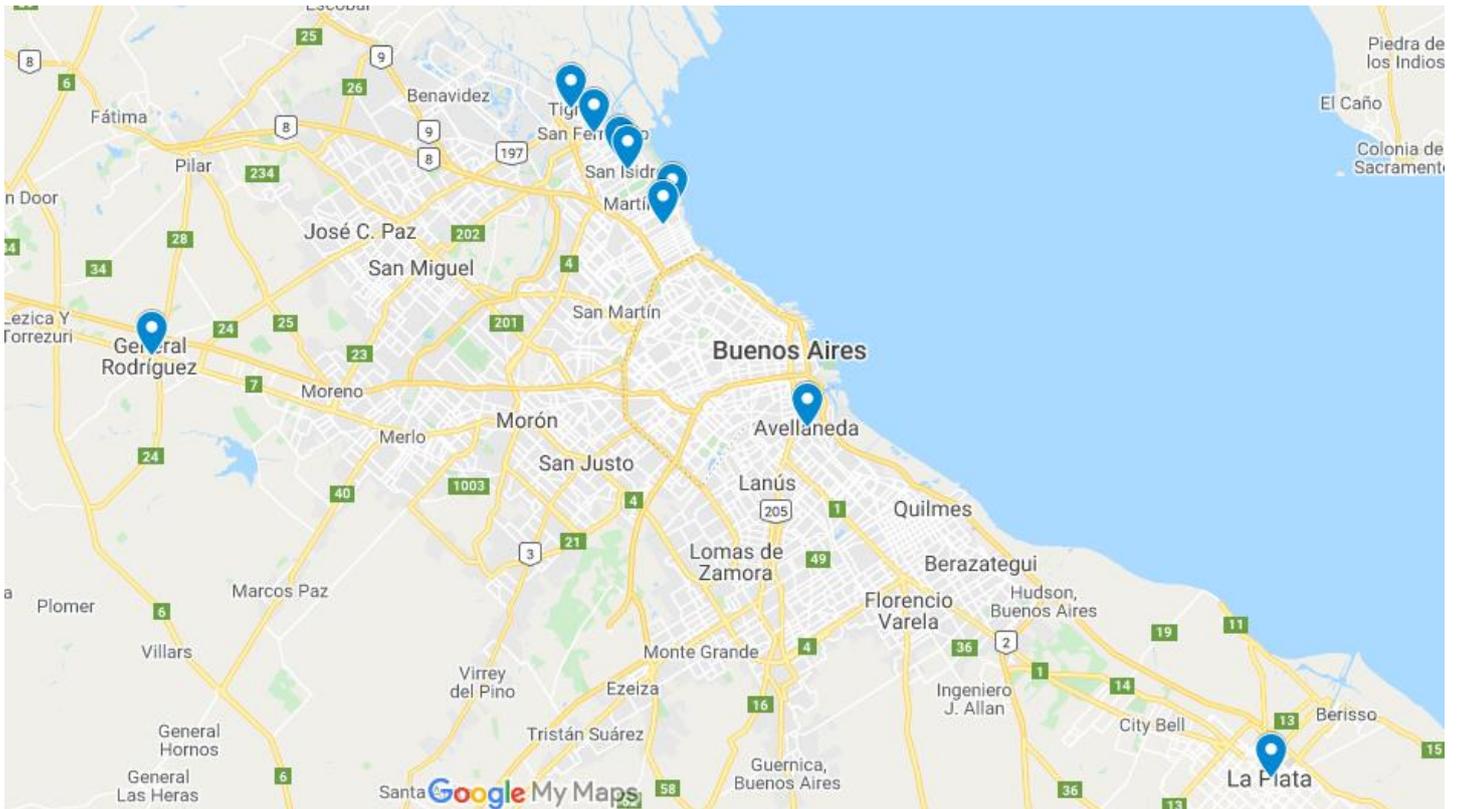


Figura 1: Mapa de la Pcia de Buenos Aires con las localidades marcadas donde esperamos realizar muestreo (dependerá de si encontramos especímenes o no)

- Lista de especies o grupos taxonómicos y/o partes de ellas a coleccionar: por nombre común y científico, indicando n° de ejemplares o muestras por especie.

- *Pantomorus postfasciatus* (Coleoptera, Curculionidae): 200 ejemplares.
- *Naupactus cervinus* (Coleoptera, Curculionidae): 100 ejemplares.
- *Naupactus dissimulador* (Coleoptera, Curculionidae): 100 ejemplares.
- *Naupactus xanthographus* (Coleoptera, Curculionidae): 100 ejemplares.
- *Naupactus versatilis* (Coleoptera, Curculionidae): 100 ejemplares.

-Descripción de las medidas y acciones a tomar para minimizar la posibilidad de ocurrencia de efectos adversos en la investigación, desarrollo y/o producción.

Los efectos adversos serán evitados de la siguiente manera:

- Se realizarán colectas conscientes y respetuosas con el resto de la flora y fauna presente, procurando afectar lo menos posible el entorno natural del cual se extraerán los gorgojos.
- Para minimizar el impacto sobre las poblaciones de gorgojos se colectará la menor cantidad posible de muestras.
- A las colectas se concurre con protector solar, lentes de sol y sombrero para proteger a quienes colectan de los efectos perjudiciales del sol. Asimismo, se utilizarán guantes y protectores visuales cuando sea necesario. También se lleva siempre un kit de primeros auxilios con los elementos necesarios para tratar picaduras, raspones y cortes menores, etc, y abundante agua para hidratarse.
- Los gorgojos colectados serán mantenidos en un contenedor plástico con tapa perforada hasta la llegada al laboratorio, donde serán mantenidos en potes individuales durante los experimentos, cuidando que se encuentren siempre confinados en el lugar de trabajo a fin de evitar que se esparzan innecesariamente a ambientes nuevos.
- El descarte del material se realizará de acuerdo a los protocolos debidamente establecidos.
- Debido a la situación sanitaria a nivel nacional, las colectas y posterior trabajo de laboratorio se llevarán a cabo de acuerdo a los protocolos de COVID establecidos en ese momento. Se utilizará barbijo durante la totalidad de la colecta de muestras y el trabajo en el laboratorio respetará las restricciones en cuanto a cantidad de personas, ventilación de ambientes, horarios, etc, establecidos por la

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, dependiente de la Universidad de Buenos Aires.

- *Indicar el modo de captura o colecta previsto (presentar si corresponde planilla autorizada de CICUAL)*

Este ítem fue aclarado previamente en “*Metodologías de captura, colecta y muestra*”. Por otro lado, no corresponde la autorización de CICUAL para trabajo con insectos.

Destino final del material (Informar el destino final del material biológico, indicando el herbario o colección oficial y/o el modo de destrucción o disposición final de las muestras)

Como se mencionó previamente, se extraerá el ADN total de los gorgojos colectados y se los guardará a -20°C en el Laboratorio 60 del Departamento de Ecología, Genética y Evolución de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, dependiente de la Universidad de Buenos Aires, hasta tanto los resultados de la investigación sean publicados. Eventualmente, el material será descartado como residuos peligrosos.

Fuente de financiamiento: Agencia Nacional De Promoción De La Investigación, El Desarrollo Tecnológico Y La Innovación; Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. PICT-201-0038.

Socios del proyecto (Indicar las instituciones, organismos e investigadores participantes):

Nombre y apellido	Rol	Institución
Marcela Silvina Rodriguez	Investigadora Responsable	Dpto de Ecología, Genética y Evolución, FCEN, UBA. Instituto de Ecología, Genética y Evolución, CONICET.

Viviana Andrea Confalonieri	Investigadora	Dto de Ecología, Genética y Evolución, FCEN, UBA. Instituto de Ecología, Genética y Evolución, CONICET.
Alejandra Carla Scannapieco	Investigadora	Instituto de Genética "E. A. Favret", Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) – Grupo Vinculado al Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO-CONICET)
Noelia Verónica Guzmán	Investigadora	Dto de Ecología, Genética y Evolución, FCEN, UBA. Instituto de Ecología, Genética y Evolución, CONICET.
Analia Alicia Lanteri	Investigadora	División Entomología, Museo de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata.
Romina Valeria Piccinali	Investigadora	Dto de Ecología, Genética y Evolución, FCEN, UBA. Instituto de Ecología, Genética y Evolución, CONICET.
Lucía Da Cruz Cabral	Becaria post-doctoral	Dto de Ecología, Genética y Evolución, FCEN, UBA. Instituto de Ecología, Genética y Evolución, CONICET.
Lucia Fernandez Goya	Becaria doctoral	Dto de Ecología, Genética y Evolución, FCEN, UBA.

Con la presente se debe adjunta el proyecto de investigación específico, donde consta: introducción con la justificación que defina el proyecto, objetivos, metodología, resultados esperados y bibliografía)



G O B I E R N O D E L A P R O V I N C I A D E B U E N O S A I R E S
2021 - Año de la Salud y del Personal Sanitario

Hoja Adicional de Firmas
Anexo

Número:

Referencia: Anexo I - RODRIGUERO Marcela, EX-2021-22827066-GDEBA-DSTAMDAGP

El documento fue importado por el sistema GEDO con un total de 11 pagina/s.