

AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO A PARTIR DE PLUMAS DE *Columbina cruziana*

ISOLATION OF GENOMIC DNA FROM FEATHERS OF *Columbina cruziana*

Víctor Sánchez-Cabrera, Luis Pollack-Velásquez, Carlos Quijano-Jara
Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo. Perú.

RESUMEN

El primer paso en los análisis de ADN es su extracción y purificación a partir de muestras biológicas, una de ellas es la sangre, que es utilizada en la mayoría de los casos. La extracción de sangre en aves pequeñas es un procedimiento complejo, lo que no ocurre con la obtención de muestras a partir de las plumas, En el presente trabajo se pretende determinar la calidad y cantidad de ADN a partir de plumas de *Columbina cruziana* mediante la utilización del método de Fenol: cloroformo para extracción de ADN, con el fin de establecer bases para estudios posteriores de especiación taxonómica y evolutiva en especies de aves endémicas y en estado de amenaza. En tal sentido, se capturaron 8 ejemplares de *C. cruziana*; a cada uno se les retiró tres plumas del ala, luego se le aislaron los cálamos, los cuales fueron conservados y utilizados para la extracción del ADN. Se obtuvo concentraciones altas de ADN genómico (1756.115 µg/mL), las cuales se consideran de una calidad y cantidad suficientes.

Palabras clave: *Columbina cruziana*, ADN genómico, pluma

ABSTRACT

The first step in the analysis of DNA is its extraction and purification from biological samples, being the blood sample of preference type, the complexity of management of some small birds difficult extraction, which does not occur in feathers, determining the quality and quantity of DNA from feathers of *Columbina cruziana* using the method of phenol: chloroform for DNA extraction, in order to establish bases for further studies of taxonomic and evolutionary speciation in endemic bird species and threatened status. In this sense, captured 8 specimens of *C. cruziana*; retired each three feathers from the wing, then they were isolated the calamos, which were preserved and used for the extraction of DNA, obtaining high concentrations of genomic DNA of 1756.115 µg/mL, a quality and satisfactory amount to obtain DNA.

Key words: *Columbina cruziana*, genomic DNA, pen.

Recibido: 9 Diciembre de 2012

Aceptado: 27 Marzo de 2013

INTRODUCCIÓN

El Perú, después de Colombia ocupa el segundo lugar en diversidad de aves contando con más de 1800 especies (Pulido y col., 2007). Una de estas especies es *Columbina cruziana* Prévost, 1842, localmente conocida como "tortolita peruana", pertenece a la familia Columbidae y al orden Columbiformes. La podemos encontrar en varios países de América del Sur, destacando los andes de Ecuador, Perú y Chile, donde ocupa los hábitats abiertos de matorral seco, comunidades lomaes, monte ribereño, campos de cultivo e incluso parques y jardines con un rango de distribución es hasta los 2800 m.s.n.m. (Orr, 1978; Gonzales & Gonzales, 1998; Schulemberg, 2010).

La tortolita mide entre 16 y 18 cm de longitud, es de color gris y posee unas manchas negras en las alas, el pico es color naranja en la base y negro en la punta, su cola es gris y sus patas

rojas, presenta una barra castaña oscura en las plumas escapulares. Anda en grandes grupos donde se alimenta principalmente de semillas (Gonzales, 1998; Schulemberg y col., 2010).

En relación a su estado de conservación, es una especie que está categorizada como en preocupación menor y no se encuentra tipificada en ninguno de los apéndices de las CITES (Decreto Supremo AG-034, 2004).

En la actualidad, los estudios de poblaciones y el análisis genético, se ha convertido en una parte central de la biología de la conservación, ya que al detectar la declinación poblacional, aporta elementos para evitar la extinción de las especies. La importancia de la variación genética para la persistencia de las especies y la sustancial contribución de las técnicas genéticas a la práctica conservacionista demandan una mayor presencia tanto en sus aspectos normativos como de gestión (Lanteri y col., 2002).

El primer paso en el análisis de ADN, ARN y proteínas es su extracción y purificación a partir de las muestras biológicas. Existen varios protocolos y equipamientos comerciales. Las estrategias aplicadas dependen del material fuente. Por ejemplo, la extracción de ADN de sangre es relativamente fácil, en tanto que su extracción de alimentos procesados es más difícil. La extracción de ARN de tejido pancreático es difícil debido a su rápida degradación en dicho órgano. La pureza del ADN, ARN y proteínas es a menudo un factor clave que no se cuida lo suficiente en la obtención de resultados fiables (Godoy, 2009), es importante que las muestras para la extracción de ADN sean fáciles de obtener. Además el ADN obtenido debe ser de buena calidad y suficiente cantidad para garantizar los análisis posteriores (Bello, 2001).

El uso de técnicas no invasivas para muestras de material genético de poblaciones naturales ha aumentado considerablemente en la última década, el avance de los métodos moleculares facilita el uso de tejidos no invasivos. La mayoría de los estudios que emplean estas técnicas se han centrado en muestras de mamíferos tales como osos (Schwartz y col., 2006), lobos (Hausknecht y col., 2007), primates (Morín y col., 2001; McGrew y col., 2004), y los elefantes (Eggert, 2003), que a menudo son difíciles de capturar.

Aunque la sangre es el tipo de muestra de preferencia para la obtención de ADN, la complejidad de manejo de algunas especies pequeñas por el tamaño de los vasos sanguíneos dificulta mucho su extracción, cosa que no ocurre con las plumas, ya que éstas pueden incluso recogerse del suelo, sin molestia alguna para el animal ni peligro para el extractor, especialmente en época reproductiva, es por ello que se prefiere la elección de plumas que recién se están formando (Bello, 2001; Moreno y col., 2011).

Las plumas se constituyen el carácter distintivo de las aves, éstas son estructuras inertes formadas principalmente por queratina, uno de los materiales biológicos más duraderos y con gran resistencia a las bacterias, a las enzimas y al agua.

El plumaje sirve para señalar la calidad de un individuo, atraer posibles parejas, defender su territorio y esconderse de los predadores. Una pluma típica está formada por una estructura central en forma de mástil, llamada vexilo. La parte proximal se llama cálamo y la distal raquis (Senar, 2004).

Varios estudios han utilizado con éxito ADN obtenido a partir de plumas para identificar especies (Rudnick y col., 2007), determinar el sexo (Griffiths y Tiwari, 1995), evaluar la estructura genética de la población (Segelbacher y col., 2003), filogeografía (Bayard, 2008) y la filogenia interespecífica (Seki, 2006). Las plumas son potencialmente una buena fuente de ADN porque los ejes de plumas proporcionan un microambiente en el que las moléculas de ADN están protegidas de las condiciones de degradación (por ejemplo, la radiación solar, la hidrólisis, la congelación y descongelación repetidas, y microorganismos). Como las plumas crecen, se suministran con sangre que contenga glóbulos rojos nucleados, y aunque el suministro de sangre se detiene cuando se completa el crecimiento de las plumas, las células residuales permanecen dentro de los ejes de las plumas (Horvath y col., 2005).

Con esta investigación se pretende determinar la calidad y cantidad de ADN a partir de plumas de *Columbina cruziana* mediante la optimización de un método de extracción de ADN, con el fin de establecer bases para estudios posteriores de especiación taxonómica y evolutiva en especies de aves endémicas y en estado de amenaza.

MATERIAL Y METODOS

1. Obtención de plumas de *Columbina cruziana*

Se capturaron 8 especímenes de *Columbina cruziana* del Jardín Botánico de la Universidad Nacional de Trujillo, Perú, con la ayuda de dos redes de neblina de 3x9m, a las cuales se les extrajo plumas de la parte ventral y dorsal para luego almacenarlas en bolsas herméticas rotuladas, las cuales fueron conservadas a -20°C .

2. Extracción de ADN

Se cortó entre 0.5 a 1 cm en la zona apical de los calamos de las plumas, los cuales colocaron en tubos Eppendorf de 1.5ml que contenían 500µl de buffer lisis (50 mM Tris-HCl, pH 8, 20 mM de EDTA, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 2%) y 5µl de proteinasa K, incubándose a 56°C durante 24 horas.

Los tubos se centrifugaron a 14000rpm por 10 min. El sobrenadante fue transferido, respectivamente, a un nuevo tubo Eppendorf 1.5ml al cual se le agregó 200µl de Fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1) (Bello, 2003).

Se centrifugó nuevamente a 14000rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf 1.5ml al cual se le agregó 50µl de NaCl 2M y 100µl de etanol. Se almacenó a -20°C durante 24 horas. Los tubos fueron centrifugados a 14000rpm nuevamente por 10 min. Al eliminar el sobrenadante se observó el sedimento o pellet. Posteriormente se seco a 45°C durante 15 min en una centrifuga de secado. Finalmente se le agregó etanol al 70% y se resuspendió en 100 µl de buffer TE.

3. Verificación y Cuantificación del ADN extraído

Se verificó la integridad de ADN mediante electroforesis horizontal utilizando gel agarosa al 2% a 80V por 30 minutos en buffer TAE 1X (40mM Tris, 20mM acido acético y 1mM EDTA). El gel fue colocado en bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 15 minutos, finalmente fue observado en el Fotodocumentador Chemidoc BIORAD.

Se cuantificó la concentración y calidad de ADN extraído a razón de Absorbancia haciendo uso de un Espectrofotómetro GENESYS 10 BIO de Thermo Fisher Scientific, con muestras diluidas al 2%.

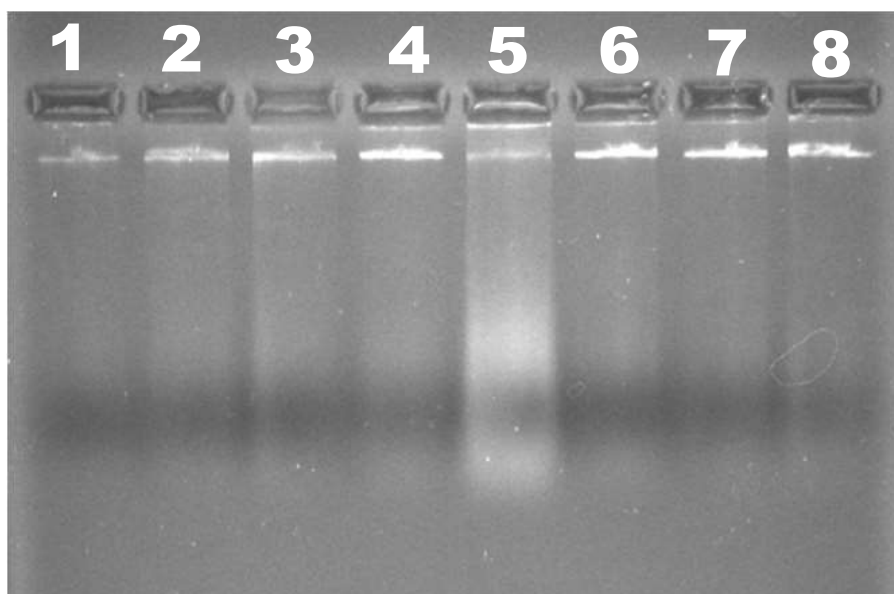
RESULTADOS

En la Fig. 1 se observan las bandas resultantes del corrido electroforético de ADN del cálamo de plumas de *Columbina cruziana* determinando la integridad del ADN.

Asimismo, en el Tabla 1 se observan las concentraciones de cada muestra de donde se extrajo el ADN de *Columbina cruziana*.

Tabla 1. Concentración de ADN y Proteínas extraídas del cálamo de plumas de *Columbina cruziana* mediante el método Fenol: cloroformo en absorbancia 260nm y 280nm en cada muestra.

Muestra	Absorbancia (A_{λ})			Concentración $\mu\text{g/mL}$	
	260	280	260/280	ADN 260	Proteína 280
1	0.215	0.15	1.433	410.21	3618.23
2	0.246	0.134	1.8358	537.85	1242.55
3	0.29	0.206	1.4078	549.32	5243.16
4	0.22	0.175	1.2571	472.395	8070.885
5	-0.004	-0.011	0.3636	20.67	304.79
6	0.948	0.68	1.3941	1756.115	16832.245
7	0.124	0.68	0.8124	824.605	48350.885
8	0.196	0.147	1.3333	272.465	1641.295

Fig. 1. Gel de agarosa con muestras de ADN extraído del cálamo de plumas de *Columbina cruziana* usando el método Fenol: Cloroformo; teñidas con bromuro de etidio y expuestas a luz UV.

DISCUSIÓN

La extracción de ADN es el primer paso para la aplicación de las muchas técnicas moleculares, aunque aparente ser sencillo, muchos fracasos experimentales se deben a problemas en esta etapa que provocan el insuficiente rendimiento, mala calidad de ADN, contaminantes en niveles inaceptables y degradaciones parciales, además una mala elección del método de extracción puede innecesariamente alargar un protocolo.

En esta investigación se optimizó un protocolo para conseguir ADN en suficiente cantidad y calidad, en relación con otras fuentes de tejido no invasivo, con la finalidad de sentar bases para la realización de diversos estudios a nivel molecular a partir de plumas.

Los resultados obtenidos presentan que en la muestra numero 5 obtuvo una concentración considerablemente baja de 20.67 $\mu\text{g/mL}$ a 260 \AA de ADN genómico, en comparación con la muestra 6, la cual tuvo una concentración de 1756.115 $\mu\text{g/mL}$ a 260 \AA considerada la más alta concentración, en el caso de la muestra 7 presenta una concentración de 824.605 $\mu\text{g/mL}$ a 260 \AA pero a la vez posee el más alto contenido de proteínas.

En diversas investigaciones donde se utilizaron plumas como fuente de ADN genómico, se obtuvo rendimientos significativamente altos en plumas de *Accipiter gentilis* de entre 152 µg/mL y 273 µg/mL (Bayar de Volo y col., 2005), también se usaron plumas frescas especialmente de tipo cobertoras en codornices (Rodríguez, 2006), pero en algunos casos se utilizaron como muestras las plumas de especies extintas (Robinson, 1999), aunque ambos trabajos demuestran la utilidad de su protocolo para obtener ADN para su amplificación por PCR de fragmentos relativamente pequeños, no hay datos sobre su uso en otro tipo de análisis.

Bello y Sánchez (2003), propuso un nuevo protocolo de extracción que permitía obtener ADN genómico en avestruces, su protocolo tiene la ventaja de poder visualizar fácilmente la calidad de la obtención de ADN en gel de agarosa, electroforesis y bromuro de etidio, porque el rendimiento de ADN es cantidad suficiente de tinción y el ADN permanece de doble cadena. Esta característica permite la comprobación de la cantidad y la integridad del ADN aislado, 2 parámetros que son esenciales para la optimización de éxito de protocolos PCR.

La presencia de Proteínas y ARN en las muestras de ADN puede tener un efecto inhibitorio sobre la amplificación por PCR. Este problema puede ser insidioso cuando se utiliza plumas grandes como fuente de ADN, pero la adición de ARNasa resulta ser de mucha utilidad, así como también el mayor tiempo de digestión que facilitó un mayor desglose de la queratina de la pluma, el aumento del tiempo en el congelador y la centrifugación ayuda a aumentar la precipitación de las moléculas de ADN.

Para degradar proteínas se realiza un tratamiento con proteasas, como la que se utilizó en este caso, proteinasa K, la cual es activa en presencia de agentes quelantes como el EDTA; por otro lado, un incremento de temperatura desde 37 a 50 - 65 °C aumenta su actividad, en condiciones en que las nucleasas pueden afectar la integridad del ADN son inactivas. De este modo, la proteinasa K degrada las nucleasas y demás proteínas, y permite la obtención de ADN genómico de alta concentración.

CONCLUSIONES

El uso de plumas como material biológico para obtener ADN, es una alternativa rápida y segura que permite obtener ADN de calidad y cantidad satisfactoria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bayard de Volo, S.; R. T. Reynolds; J. R. Topinka; B. May & M. F. Antolin.** 2005. Population genetics and genotyping for mark-recapture studies of Northern Goshawks (*Accipiter gentilis*) on the Kaibab Plateau, Arizona. *Journal of Raptor Research* 39:286–295.
- Bello, N.** 2001. Desarrollo de marcadores moleculares en el avestruz (*Struthio camelus*). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Bello, N.; O. Francino & A. Sánchez.** 2003. Isolation of genomic DNA from feathers. *J Vet Diagn Invest*; 13:162–164.
- Decreto Supremo AG-034.** 2004. Categorización de especies amenazadas de fauna silvestre y prohibición de su caza, captura, tenencia, transporte o exportación con fines comerciales.
- Eggert, L. S.; J. A. Eggert & D. S. Woodruff.** 2003. Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. *Molecular Ecology* 12:1389–1402.
- Godoy, J. A.** 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18 (1): 23-33
- González, O.; L. Pautrat & J. Gonzalez.** 1998. Las aves más comunes de Lima y sus alrededores. Santillana. 1era edición. Pág 90.
- Griffiths, R. & B. Tiwari.** 1995. Sex of the last wild Spix's Macaw. *Nature* 375:454.
- Hausknecht, R.; R. Gula; B. Pirga & R. Kuehn.** 2007. Urine—a source for noninvasive genetic monitoring in wildlife. *Molecular Ecology Notes* 7:208–212.
- Horvath, M. B.; B. Martínez-Cruz; J. J. Negro; L. Kalmar & J. A. Godoy.** 2005. An overlooked DNA source for noninvasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology* 36:84–88.

- Lanteri, A.; M. Liacono & C. Margaría.** 2002. Aportes de la Biología Molecular a la Conservación de los Insectos. Red Iberoamericana de Biogeografía y Entomología Sistemática. 02: 207-220
- McGrew, W. C.; A. L. Ensminger; L. F. Marchant; J. D. Pruett & L. Vigilant.** 2004. Genotyping aids field study of unhabituated wild chimpanzees. *American Journal of Primatology* 63:87–93.
- Moreno D, Heneao B, López A, Castaño A.** 2011. Determinación del sexo en aves de la familia Furnariidae a través de técnicas moleculares. *Boletín científico de Museo de Historia Natural*. 15 (2): 130 – 138.
- Morin, P. A.; K. E. Chambers; C. Boesch & L. Vigilant.** 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology* 10:1835–1844.
- Orr, R.** 1978. *Biología de los vertebrados*. Edición Interamericana.
- Pulido, V.; L. Salinas & C. Arana.** 2007. *Aves del desierto de Ica*. Primera edición. Editorial Agrokasa. Pag. 8.
- Rudnick, J. A.; T. E. Katzner; E. A. Bragin & J. A. DeWoody.** 2007. Species identification of birds through genetic analysis of naturally shed feathers. *Molecular Ecology Resources* 7:757–762.
- Segelbacher, G.; J. Högglund & I. Storch.** 2003. From connectivity to isolation: genetic consequences of population fragmentation in Capercaillie across Europe. *Molecular Ecology* 12:1773–1780.
- Senar, J. C.** 2004. *Mucho más que plumas*. Monografía de Museo de Ciencias Naturales. Instituto de Cultura de Barcelona.
- Seki, S.-I.** 2006. Application of molted feathers as noninvasive samples to studies on the genetic structure of pigeons (Aves: Columbidae). *Journal of Forest Research* 11:125–129.
- Schulemberg, T.; D. Stots; D. Lane; J. O'Neill & T. Parker.** 2010. *Aves de Perú*. 1era edición, USA: Serie Biodiversidad Corbidi.
- Schwartz, M. K.; S. A. Cushman; K. S. McKelvey; J. Hayden & C. Engkjer.** 2006. Detecting genotyping errors and describing American black bear movement in northern Idaho. *Ursus* 17:138–148.