

# ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS COMPONENTES VEGETALES PRESENTES EN HECES DE HERBÍVOROS, MEDIANTE TÉCNICAS MICROHISTOLÓGICAS Y MOLECULARES

COMPARING MICROHISTOLOGICAL ANALYSIS AND DNA BARCODING APPROACHES TO DETERMINE PLANT COMPONENTS IN HERBIVORE FAECES

M. C. ESPUNYA<sup>1</sup>, L. RIVERA<sup>2</sup> Y J. BARTOLOMÉ<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología molecular, Facultad de Biociencias; <sup>2</sup>Departamento de Ciencia animal y de los alimentos, <sup>3</sup>Grupo de Investigación en Rumiantes, Facultad de Veterinaria. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 – Cerdanyola del Vallès (España). [carme.espunya@uab.es](mailto:carme.espunya@uab.es)

## RESUMEN

En la última década, los avances en el campo de la Biología molecular han permitido el desarrollo de nuevas herramientas, como el *DNA barcoding*, para la identificación de las especies vegetales presentes en muestras complejas con ADN altamente degradado, como es el caso de las heces de herbívoros. El *DNA barcoding* consiste en la amplificación de un gen marcador específico, por ejemplo el gen cloroplástico *trnL(UAA)*, mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), seguida de la determinación de la longitud de los amplicones o, alternativamente, de secuenciación masiva y comparación de las secuencias obtenidas con aquellas presentes en los bancos de datos. Hemos realizado un estudio comparativo de la composición de la dieta de la Cabra Salvaje Mallorquina que habita en matorrales mediterráneos, empleando dos técnicas: el análisis microhistológico y el *DNA barcoding*. Nuestros resultados preliminares muestran que los análisis moleculares aportan resultados robustos, reproducibles, rápidos de obtener y a un coste económico asumible. Además, las dos metodologías utilizadas podrían ser complementarias y proporcionarían datos concluyentes sobre la composición de la dieta de los animales hasta el nivel taxonómico de especie.

**Palabras clave:** herbivoría, Cabra Salvaje Mallorquina, matorral mediterráneo, composición de la dieta, análisis molecular.

## SUMMARY

In the last decade, advances in molecular biology have allowed the development of new strategies, such as the DNA barcoding for the identification of plant species in complex samples with highly degraded DNA, as faeces. DNA barcoding consists of the amplification of a specific marker gene, i.e. the chloroplast *trnL(UAA)* gene by PCR, followed by length determination of the amplicons or, alternatively, by massive sequencing and data base sequence comparison. We have conducted a comparative study of the diet composition of the Majorcan Wild Goat feeding in Mediterranean scrublands following two approaches: microhistological analysis and DNA barcoding. Our preliminary results showed that the molecular analysis provide fast, robust, reproducible and reliable results, and it is comparatively economically competitive. Furthermore, these two methodologies could be complementary and they would provide conclusive data about animal diet composition until species level.

**Key words:** herbivory, Majorcan Wild Goat, Mediterranean scrubland, diet composition, molecular analysis.

## INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre la composición de las dietas de herbívoros se vienen realizando desde hace muchos años basándose en el reconocimiento de caracteres microanatómicos, como la forma, dimensión y distribución de las células, los estomas y los tricomas, presentes en los restos de epidermis foliares que han resistido el tránsito digestivo de los herbívoros (Baumgartner, 1939; Stewart, 1967; Alipayo *et al.*, 1992). Esta identificación microhistológica presenta algunas deficiencias que pueden incurrir en resultados erróneos, principalmente debido a las fuertes similitudes morfológicas entre plantas de un mismo grupo taxonómico, lo cual impide en muchos casos la identificación hasta el nivel de especie.

El desarrollo de nuevas técnicas en el campo de la Biología molecular, ha permitido la aparición de nuevos métodos de identificación vegetal en muestras complejas. Uno de estos métodos, conocido como *DNA barcoding*, se ha erigido como una alternativa robusta y más sensible que la microhistología. El *DNA barcoding* consiste en la amplificación por PCR mediante oligonucleótidos específicos, pero a la vez universales, es decir, muy conservados entre todas las especies vegetales, de un gen marcador, por ejemplo, el gen cloroplástico *trnL(UAA)* (Taberlet *et al.*, 2007; Valentini *et al.*, 2009). La identificación

de las especies vegetales se realiza mediante secuenciación masiva de los productos amplificados o amplicones y comparación de las secuencias obtenidas con aquellas presentes en los bancos de datos (GenBank), y requiere el análisis de millones de secuencias mediante programas bioinformáticos. A pesar de que el coste de la secuenciación masiva va disminuyendo paulatinamente con la aparición de nuevas plataformas, es aún un factor limitante para su aplicación rutinaria en el laboratorio. Dado que tanto la secuencia como la longitud de los amplicones es diferente para cada especie, es posible utilizar el sistema Bioanalyzer (Agilent Technologies) para determinar el tamaño de los amplicones de ADN y poder relacionarlo con la identidad de la especie.

El estudio que se presenta a continuación es el primero en que se ha comparado la técnica microhistológica con la técnica molecular, concretamente con el objetivo futuro de poder determinar la composición botánica de la dieta de la Cabra Salvaje Mallorquina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

El estudio se realizó en la sierra de Tramuntana, situada en el noroeste de la isla de Mallorca (Puig Major: 39° 48' 27" N, 2° 47' 36" E). La vegetación es típicamen-

te mediterránea, con algunas especies endémicas. En la actualidad el paisaje está dominado por matorrales, donde abunda la carcera (*Ampelodesmos mauritanica* (Poiret) T. Durand et Schinz) y pinares de pino carrasco (*Pinus halepensis* Miller). Se tomaron heces frescas de entre cinco y diez individuos en tres épocas del año (primavera, verano e invierno) y en tres zonas distintas (Formentor, La Victoria y Bunyola). También se tomaron muestras de hojas de las 21 especies más comunes en la zona.

### Análisis microhistológico

El análisis microhistológico de las muestras de heces y de hojas se realizó siguiendo el procedimiento empleado por Stewart (1967) y Bartolomé *et al.* (1998). Con el conjunto de heces recolectado en cada una de las zonas en cada época se elaboró una muestra mixta. Cada muestra se lavó en agua destilada, se trituró en un mortero y el material disgregado se digirió en ácido nítrico concentrado. Posteriormente el contenido se diluyó en agua destilada y se filtró a través de dos tamices de 1 mm y 0,125 mm de tamaño de poro. El material se dispersó sobre una gota de glicerina al 50% en un portaobjetos y luego se selló con resina DPX. De cada muestra mixta de heces, se realizaron cinco preparaciones. De cada planta se tomaron dos hojas de dos individuos distintos y también se elaboró una muestra mixta de la que se

obtuvieron tres preparaciones. Todas las preparaciones se observaron al microscopio óptico a 100 y 400 aumentos y se compararon los fragmentos aparecidos en heces con las epidérmicas de cada especie. Para cada especie considerada se registraron los caracteres microanatómicos que permiten diferenciarlas en las heces (Tabla I).

### Análisis molecular

El ADN genómico de las diferentes plantas analizadas en el estudio (Tabla I) fue extraído a partir de 200 mg de tejido fresco de hoja mediante el kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemania) y posteriormente cuantificado mediante un fluorímetro Qubit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU). La amplificación del gen *trnL*(UAA) de cloroplasto mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) se realizó en un termociclador C1000 Touch Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) bajo las siguientes condiciones: 50 ng de ADN genómico, dNTPs 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, BSA 0,2 mg/ml, oligonucleótido C (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG<sup>3'</sup>) 1 μM, oligonucleótido D (5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC<sup>3'</sup>) 1 μM (Taberlet *et al.* 2007) y 1U de Taq polimerasa ECOTAQ (BIOLINE, Londres, Reino Unido), en un volumen final de reacción de 20 μl. Las etapas de la reacción de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización previa

**Tabla 1.** Comparación de estructuras microanatómicas que permiten distinguir las especies consideradas en este estudio en preparaciones microhistológicas de heces de cabras de la Sierra de Tramuntana de Mallorca (España). T: las especies apareadas se distinguen por los tricomas, E: se distinguen por los estomas, C: se distinguen por las células epidérmicas, e ind: no se distinguen.

	<i>Arbutus unedo</i>	<i>Brachipodium retusum</i>	<i>Buxus balearica</i>	<i>Chamaerops humilis</i>	<i>Cistus albidus</i>	<i>Cistus monspeliensis</i>	<i>Cistus salvifolius</i>	<i>Cneorum tricocum</i>	<i>Ephedra fragilis</i>	<i>Erica arborea</i>	<i>Erica multiflora</i>	<i>Genista lucida</i>	<i>Juniperus oxicedrus</i>	<i>Olea europaea</i>	<i>Phillyrea angustifolia</i>	<i>Pinus halepensis</i>	<i>Pistacia lentiscus</i>	<i>Quercus ilex</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Smilax aspera</i>
<i>Ampelodesmos mauritanica</i>	TEC	ind	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC
<i>Arbutus unedo</i>	TEC	E	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	C	EC	TEC	TEC	TEC	TEC	T	T	TEC	C	EC	TEC	TEC
<i>Brachipodium retusum</i>			TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC
<i>Buxus balearica</i>				EC	TEC	TEC	TEC	C	EC	TEC	TEC	EC	EC	T	ind	TEC	E	EC	TEC	EC
<i>Chamaerops humilis</i>					TEC	TEC	TEC	TEC	EC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	EC	TEC	TEC	EC
<i>Cistus albidus</i>						ind	ind	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC
<i>Cistus monspeliensis</i>							ind	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC
<i>Cistus salvifolius</i>								TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC
<i>Cneorum tricocum</i>									EC	TEC	TEC	EC	EC	T	C	EC	C	EC	TEC	EC
<i>Ephedra fragilis</i>										TEC	TEC	EC	EC	TEC	TEC	EC	EC	EC	TEC	TEC
<i>Erica arborea</i>											ind	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC
<i>Erica multiflora</i>												TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC	TEC
<i>Genista lucida</i>													EC	TEC	TEC	EC	EC	EC	TEC	TEC
<i>Juniperus oxicedrus</i>														TEC	TEC	EC	EC	EC	TEC	TEC
<i>Olea europaea</i>															T	TEC	T	TEC	TEC	TEC
<i>Phillyrea angustifolia</i>																TEC	T	TEC	TEC	TEC
<i>Pinus halepensis</i>																	EC	EC	TEC	TEC
<i>Pistacia lentiscus</i>																		EC	TEC	TEC
<i>Quercus ilex</i>																				TEC
<i>Rosmarinus officinalis</i>																				TEC

del ADN a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación constituidos por desnaturalización a 95°C durante 1 min, hibridación a 52°C durante 30 s y elongación a 72°C durante 1 min. La amplificación se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en 1x TAE (Tris pH 7,6 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) y los amplicones se purificaron mediante el kit GenElute-Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU). La cuantificación y la determinación de la longitud de los amplicones se realizó usando un Bioanalyzer 2100 con un chip DNA High Sensivity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) a par-

tir de 250 pg de ADN, por comparación de su movilidad en el chip en relación a unos marcadores que se tratan conjuntamente. Los resultados se ofrecen en forma de electroferograma donde el fragmento de ADN aparece como un pico de fluorescencia en la longitud correspondiente. La cuantificación se establece por integración del área del pico usando el software asociado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 1 se muestra la capacidad de discriminación entre las distintas especies vegetales a través de sus estructuras microanatómicas analizadas mediante la téc-

nica microhistológica. Las gramíneas, representadas en este estudio por las especies *A. mauritanica* y *B. retusum*, presentan una epidermis integrada por células rectangulares largas, con células cortas intercaladas, estomas paracíticos con células oclusivas alargadas y tricomas en forma de púa de rosal con un marcado ordenamiento en el sentido longitudinal. Estas características son a menudo semejantes y dificultan la identificación entre especies de la misma familia, sin embargo permiten diferenciarlas claramente de las familias de dicotiledóneas. Por otro lado, la mayoría de las dicotiledóneas consideradas en este estudio tienen una forma celular redondeada y estomas anomocíticos que complican la diferenciación de especies como *P. angustifolia*, *P. lentiscus*, *A. unedo*, y *O. europaea*. Sin embargo para el caso de *O. europaea* los tricomas peltados de la cara abaxial de la hoja permiten una correcta identificación aunque, a menudo, la falta de conservación de estas estructuras en las heces impide su identificación. *B. balearica* se distingue por sus estomas paracíticos con células oclusivas arriñonadas, pero sólo aparecen en la cara abaxial de la hoja, por lo que los fragmentos de la cara adaxial no se distinguen de las anteriores. Las especies que se han identificado con facilidad son *E. fragilis*, *C. humilis*, *G. lucida*, *J. oxycedrus*, *R. officinalis*, *S. aspera* y *Q. ilex* ya sea por la forma de los tricomas, estomas o células epidérmicas. También *P. halepensis* se

distingue bien por sus estomas ciclocíticos y células alargadas de pared gruesa. Las especies del mismo género en general son más difíciles de distinguir. Este es el caso del género *Cistus* que cuenta con tres especies en la zona y todas ellas presentan tricomas estrella-dos, estomas anomocíticos y formas celulares poligonales o redondeadas. Es el mismo caso para el género *Erica*, con dos especies en la zona y cuya epidermis es prácticamente idéntica.

En cuanto a la identificación de las especies vegetales mediante el método taxonómico del *DNA barcoding*, trabajos publicados anteriormente que desarrollaban esta técnica mediante el análisis del gen cloroplástico *trnL(UAA)* mostraban la amplificación por PCR de un amplicón de entre 84 y 100 pb con poca variabilidad en la secuencia de nucleótidos que impedía la identificación de las plantas a nivel de especie (Valentini *et al.*, 2009). En el presente trabajo hemos amplificado un fragmento del gen cuya longitud oscila entre 391 y 1427 pb, con lo que tanto la variabilidad de la secuencia como del tamaño del amplicón son mayores permitiendo una mejor resolución e identificación de las especies vegetales, tal como ya había señalado Taberlet *et al.* (2007).

En la Figura 1A se muestran dos ejemplos representativos de electroferogramas correspondientes a los amplicones *trnL*

(UAA) de las especies *O. europaea* y *P. angustifolia*, con unas longitudes de amplicón de 695 y 594 pb, respectivamente. Además, se puede observar que las longitudes determinadas mediante el Bioanalyzer son bastante diferentes para cada una de las especies, lo que sugiere que la técnica es lo suficientemente sensible y resolutive para poder identificar estas especies en muestras complejas, como pueden ser las heces de animales herbívoros (Fig 1B). Esta aproximación nos ha

permitido diferenciar algunos taxones hasta el nivel de especie, como en el caso de las especies del género *Cistus* (*C. albidus*, *C. salvifolius* y *C. monspeliensis*), y del género *Erica* (*E. arborea* y *E. multiflora*), que resultaron indistinguibles por la técnica microhistológica. Asimismo, también pueden discriminarse entre sí mediante el tamaño del gen *trnL*(UAA) las gramíneas *A. mauritanica* y *B. retusum* cuya adscripción sólo fue posible hasta el taxón de familia mediante la técnica microhistológica.

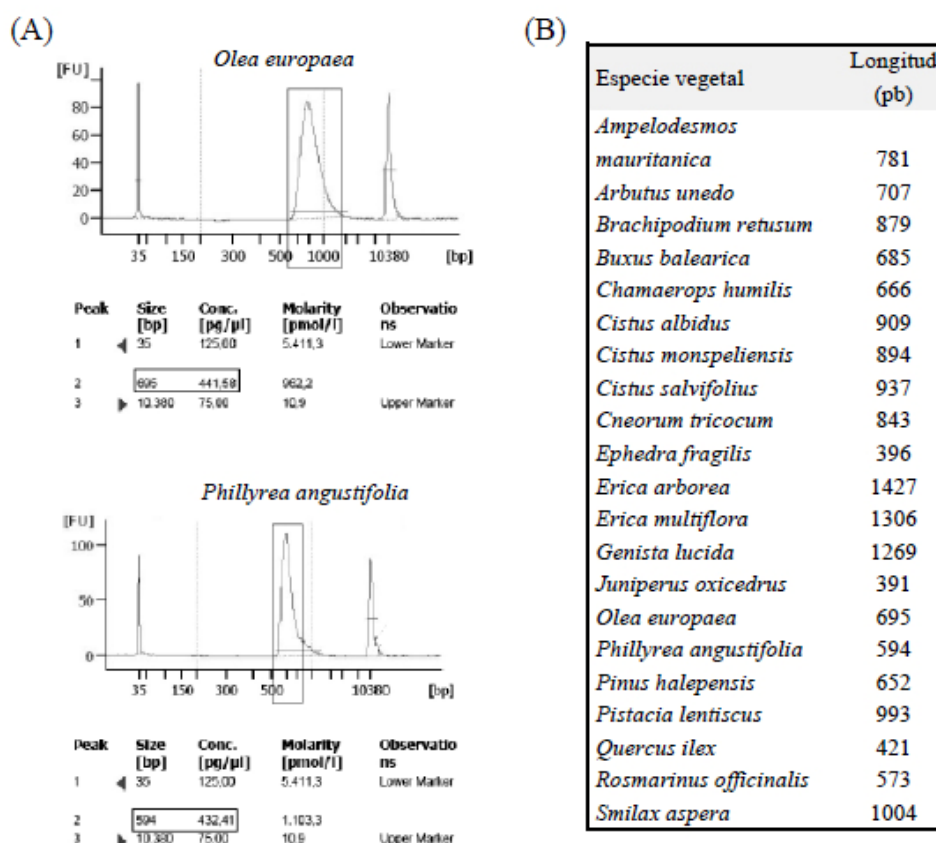


Figura 1: Electroferogramas representativos de las especies *O. europaea* y *P. angustifolia*, donde puede observarse el pico correspondiente al amplicón *trnL*, sus respectivos tamaños de 695 y 594 pb, y las concentraciones correspondientes (A); longitudes de los amplicones de las diferentes especies analizadas en pares de bases (B).

Además, a partir de la integración del área del pico es posible cuantificar la cantidad de DNA presente de cada especie, asumiendo que a más DNA más consumo de la especie considerada, aunque esta asunción aún no ha sido verificada.

Comparando las dos técnicas utilizadas, hay que considerar que la información obtenida por la microhistología depende en gran medida de la integridad de los restos vegetales como resultado del proceso de la digestión, así como del factor humano, ya que el entrenamiento y la excesiva subjetividad suponen una limitación adicional a las ya descritas en cuanto a la robustez de los resultados. El uso de las técnicas moleculares, por su parte, requiere la presencia de ADN genómico en las muestras de heces aunque un cierto grado de degradación debido a la digestión no impide su amplificación y análisis por PCR. Además, la reproducibilidad y robustez de los resultados es superior a la técnica microhistológica.

## CONCLUSIONES

Hemos desarrollado un método rápido, robusto, sensible y relativamente económico para la identificación de especies vegetales presentes en muestras complejas, basado en la amplificación por PCR de un gen marcador y la posterior determinación de la longitud de los amplicones. Los resultados

son complementarios a los que pueden obtenerse mediante la técnica de la microhistología y permiten identificar los posibles componentes de la dieta de los animales hasta el nivel de especie.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Departamento Técnico de Medio Ambiente y Recursos Naturales en el marco del Plan Nacional de I+D (proyecto CGL 2011-30307). Los autores quieren manifestar su agradecimiento a los Servicios de Genómica y de Secuenciación del CRAG (Centre de Recerca en Agrigenòmica. Consorci CSIC-IRTA-UAB-UB), de Barcelona. Uno de los autores (L. Rivera) dispone de una beca del Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CONACyT) de México.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIPAYO D., VALDEZ R., HOLECHEK J. L., CARDENAS M. (1992). Evaluation of microhistological analysis for determining ruminant diet botanical composition. *Journal of Range Management*, 45: 148-152.

BARTOLOMÉ J., PLAIXATS J., FRANCH J., SELIGMAN N. (1998). Diet selection by sheep and goats on mediterranean heath-woodland range. *Journal of Range Management*, 51(4), 379-384.

BAUMGARTNER L. L. y MARTIN A.



C. (1939) Plant histology as an aid in squirrel food-habit studies. *Journal of Wildlife Management*, 3:266-268.

STEWART D.R.M. (1967) Analysis of plant epidermis in faeces: a technique for studying food preferences of grazing herbivores. *Journal of Applied Ecology*, 4:83-111.

TABERLET P., COISSAC E., POMPANON F., GIELLY L., MIQUEL C., VALENTINI A., VERMAT T., CORTHER G., BROCHMANN C., WILLERSLEV E. (2007) Power and limitations of the chloroplast *trnL*(UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Research*, 35: e14.

VALENTINI A., MIQUEL C., NAWAZ M. A., BELLEMAIN E., COISSAC E., POMPANON F., GIELLY L., CRUAUD C., NASCETTI G., WINCKER P., SWENSON J. E., TABERLET P. (2009) New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the *trnL* approach. *Molecular Ecology Resources*, 9:51-60.