



Protocolos de recolección de datos de campo para el análisis de ADN alimenticio en heces de aves marinas

Julie McInnes

Institute for Marine and Antarctic Studies, University of Tasmania, y
Australian Antarctic Division, Australia

Diciembre de 2016

CONTEXTO

El ADN proveniente de la dieta, presente en las heces de las aves, proporciona una herramienta no invasiva para el estudio de la dieta de las aves marinas (e.g. Deagle et al. 2007, Bowser et al. 2013, Jarman et al. 2013, McInnes et al. 2016b). El *metabarcoding* de ADN alimenticio utiliza una secuenciación de alto rendimiento de regiones pequeñas de ADN y altamente variables que sobreviven a la digestión para identificar el alimento consumido (Pompanon et al. 2012). Esto puede implicar la identificación de una determinada especie de alimento a través del uso de marcadores de la especie específicos (Jarman and Wilson 2004); alimentos dentro de un grupo taxonómico por medio de marcadores de grupo específicos (Jarman et al. 2004, Murray et al. 2011, Zeale et al. 2011); los taxa de todos los alimentos utilizando marcadores universales para metazoos (O'Rorke et al. 2012, Jarman et al. 2013); o una combinación de los métodos anteriores (Deagle et al. 2009, Bowser et al. 2013). Sin embargo, para caracterizar la dieta por completo se requieren marcadores "universales" capaces de amplificar el ADN de cualquier grupo trófico (King et al. 2008, Jarman et al. 2013).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de los metazoos universales amplifica los *primers* de ADN eucariota pero también amplifica, inevitablemente, ADN no deseado de elementos que no provienen de la dieta (Deagle et al. 2009, O'Rorke et al. 2012). El origen del ADN no deseado dentro de las heces puede provenir del ave del que se ha tomado la muestra, sus parásitos, su flora intestinal, o de la contaminación de organismos externos como los insectos y la vegetación. Estas fuentes de ADN pueden dominar las secuencias amplificadas de una muestra, lo cual reduce la efectividad de detección de ADN proveniente de alimentos. Por lo tanto, se debe aumentar el tamaño de las muestras para abordar los interrogantes de un estudio, lo que incrementa los costos de procesamiento. En algunos casos, se puede reducir la amplificación de ADN no deseado por medio de un *primer* que bloquee la amplificación de ciertos tipos de ADN, como el ADN del ave que defeca (O'Rorke et al. 2012). Sin embargo, el desarrollo de estos *primers* es un reto ya que los mismos pueden bloquear inadvertidamente ciertas secuencias de alimentos. El uso de estos *primers* puede volverse más complejo en presencia de más de un grupo de ADN no deseado.

Estos protocolos de recolección fecal optimizados fueron desarrollados para mejorar la calidad y cantidad de información sobre la dieta que se obtiene de las muestras fecales. Estos protocolos se desarrollaron utilizando albatros tímido (*Thalassarche cauta*) para proporcionar una base para futuros diseños experimentales, permitir la recolección de muestras de la dieta de alta calidad y reducir la amplificación de ADN no deseado. Para más detalles, ver McInnes et al. (2016a).

CONSIDERACIONES PREVIAS AL MUESTREO

Para que el proyecto sea exitoso es imprescindible planear los estudios de *metabarcoding* de ADN alimenticio antes de recolectar las muestras. Los investigadores deben considerar qué aspectos de la dieta desean analizar y enfocarse en aquellas muestras fecales que les sirvan para ese propósito. Esto incluye la selección de marcadores, los cambios estacionales, el ayuno y la edad de las aves.

El marcador ideal será aquel que responda la pregunta científica. Los marcadores grupo específicos pueden proporcionar una alta resolución taxonómica de presas dentro de un grupo (e.g. cefalópodos); sin embargo, solo detectarán ese grupo de presas (Deagle et al. 2009, Bowser et al. 2013). Un grupo de *primers* universales para metazoos permitirá la identificación de todos los principales grupos de presas, pero con una baja resolución taxonómica (Deagle et al. 2009, Jarman et al. 2013, McInnes et al. 2016b). En caso de elegir un marcador universal para metazoos, se requerirá un mayor cuidado en el campo para reducir la recolección de ADN no perteneciente a la dieta.

Si bien el análisis de ADN alimenticio es una excelente herramienta para identificar la dieta a nivel poblacional, la identificación de la dieta de individuos usando este método debe realizarse con precaución. El tiempo de digestión suele ser desconocido y, según la duración de los viajes de alimentación, las heces pueden no estar directamente relacionadas con la comida anterior.

FACTORES QUE AFECTAN EL ÉXITO DE LAS MUESTRAS

Frescura de la muestra

Las muestras frescas tomadas cuando se observa al ave defecar proporcionan una mayor cantidad de ADN alimenticio que las muestras secas (McInnes et al. 2016a). Las heces secas pueden haber estado más expuestas a contaminación externa, en particular a hongos, y es probable que el ADN dentro de las heces se degrade al estar expuesto a rayos UV (Oehm et al. 2011). Las heces recientes que aún estaban húmedas, pero de las cuales se desconoce el momento de defecación, tuvieron resultados inconsistentes. Las muestras recientes tuvieron un menor éxito de amplificación que las muestras frescas. Sin embargo, en aquellas muestras recientes que se amplificaron, la proporción de ADN alimenticio que se detectó no fue significativamente menor que el de las muestras frescas. Por lo tanto, el uso de heces aún húmedas puede brindar información de la dieta, pero se requerirían muestras más grandes. Confiar en pequeñas cantidades de ADN puede disminuir la calidad de la información (Murray et al. 2015).

En caso de que la investigación utilice marcadores alimenticios de grupos específicos, el ADN alimenticio se puede detectar por más tiempo. Por ejemplo, en el caso de la corneja negra (*Corvus corone*) se pudo detectar ADN alimenticio por hasta cinco días cuando la muestra estuvo protegida de los rayos UV y de la lluvia (68% de éxito), sin embargo, esto se redujo de forma drástica cuando se dejaron las heces en zonas expuestas (17,5% de éxito) (Oehm et al. 2011). Del mismo modo, en las heces del león marino de Steller (*Eumetopias jubatus*) el ADN de las presas se pudo detectar por hasta cinco días en algunas muestras que utilizaban marcadores de grupo específicos (Deagle et al. 2005).

Superficie de recolección

Las colonias de aves marinas suelen estar rodeadas de vegetación y tierra, las cuales causan contaminación de otras fuentes de ADN a través de la vegetación u organismos unicelulares en la tierra. Por lo tanto, la superficie en la que se encuentran las muestras puede afectar la cantidad de ADN alimenticio que se obtiene. Las superficies que contienen otras fuentes de ADN, tales como plantas o tierra, aumentarán el riesgo de contaminación en las heces (McInnes et al. 2016a). Al recolectar muestras en superficies rocosas o de hielo, se puede detectar más ADN alimenticio. Si obtiene muestras en la tierra o zonas de vegetación, asegúrese de

minimizar la recolección de tierra o plantas. Tenga precaución al recoger muestras en colonias con diferentes especies de aves, en particular cuando una especie pueda ser presa de otra. Por ejemplo, si se conoce que el ave objeto de estudio se alimenta de carroña y tiene crías en zonas donde hay pingüinos y focas, asegúrese de no obtener ADN contaminado.

Fase de cría

La detección de ADN alimenticio en muestras fecales a lo largo de la temporada está estrechamente relacionado al ayuno (McInnes et al. 2016a). Mientras que en los largos períodos de ayuno durante la incubación hay baja detección de ADN alimenticio en las heces, la detección de ADN alimenticio puede ser mucho más alta durante la cría de pichones. Esto puede estar relacionado con los viajes de alimentación más cortos y frecuentes que se realizan en esta fase. En los períodos de ayuno, el ADN no deseado estuvo dominado por endoparásitos y ADN aviar. De acuerdo con el propósito de la investigación, intente recoger las muestras lo antes posible desde la alimentación del ave. Durante la incubación, enfóquese en aves que hayan regresado a la colonia en menos de un día. Esto puede implicar la observación de aves que hayan regresado a la colonia recientemente o marcar un ave en el nido para vigilar el tiempo de incubación y saber cuándo se produce el cambio con la pareja. También se detectó menos ADN alimenticio en muestras de aves no reproductivas presentes en la colonia, lo que se atribuye a que hayan pasado más tiempo en la colonia y en ayuno.

Fase de desarrollo

Recolectar muestras de aves jóvenes puede generar problemas para el análisis de ADN alimenticio ya que se detectan menos alimentos en las heces (McInnes et al. 2016a). Debido a que las aves se alimentan por medio de la regurgitación, los alimentos pueden estar parcialmente digeridos antes de llegar al pichón. A raíz de esto, los procesos digestivos pueden degradar el ADN alimenticio en las muestras fecales de los pichones de forma excesiva. Además, se presume que el ADN de los padres puede haberse transferido durante la regurgitación, lo cual puede causar que aumente la cantidad de ADN del ave y que se reduzca el ADN alimenticio de forma proporcional. Es posible utilizar un *primer* que bloquee el ADN del ave y así aumentar la cantidad de ADN alimenticio que se detecte en las heces de los pichones, pero es necesario tener cuidado de que el *primer* no bloquee otros vertebrados como, por ejemplo, peces.

Las muestras fecales de pichones mayores permitieron detectar un nivel más alto de ADN alimenticio que las muestras de pichones más jóvenes (McInnes et al. 2016a), lo que puede reflejar mayores ingestas de alimento o una reducción de aceite estomacal. Este líquido aceitoso puede constituir hasta un 80% de la masa de la muestra en los estómagos de algunos albatros (Thompson 1992). En el caso del albatros tímido, hay una mayor masa de líquido aceitoso en los pichones más jóvenes que en los más viejos (Hedd & Gales 2001), lo que puede diluir el ADN alimenticio.

RESUMEN

El *metabarcoding* de ADN proporciona una valiosa herramienta dietaria para identificar las presas en las heces de los depredadores. Este método puede proporcionar una amplia fuente de información dietaria sobre varias taxa o resoluciones específicas de especies de determinados grupos de presas. Otros tipos de análisis fecales favorecen la identificación de presas con partes duras que permanecen en el estómago pero sobreestiman la posibilidad de identificar las presas con partes blandas, lo cual no sucede en el análisis de ADN. Se pueden recolectar muestras durante todas las etapas de cría y fases del ciclo vital siempre que se pueda tener acceso a las heces (Bowser et al. 2013). Sin embargo, como se ha mencionado en este artículo, se debe tener precaución durante algunas fases y edades de la cría. Este método resulta ideal para evaluar la dieta de especies sensibles ya que no requiere manipulación de las aves. Sin embargo, no permite evaluar la edad de

las presas, su clase de tamaño y masa. Adicionalmente, las heces deben estar disponibles por lo que este método no es factible a la hora de determinar la dieta de aves que, al no estar en cría, se encuentran lejos de la costa. En la actualidad, este método no está comercialmente disponible (2016), aunque hay varios institutos de investigación que lo utilizan y se espera que se comercialice en el futuro a medida que aumente la demanda.

MÉTODOS DE RECOLECCIÓN

Equipamiento de campo

- Ampolla de 2ml con 70-80% de Etanol
- Sorbete, espátula pequeña o pinzas
- Marcador permanente
- Kimwipes™/pañuelos
- Bolsa de plástico para recoger pañuelos sucios
- Cuaderno y lápiz

Tamaño de la muestra

Cuando se utilizan marcadores universales para metazoos, el éxito promedio de las muestras recolectadas al azar puede llegar a ser tan bajo como un 15%, aun estando frescas. Al seguir estas instrucciones, el éxito de las muestras fue de entre 50 y 60%. Este índice de éxito es solo una guía y puede resultar útil para determinar el tamaño de las muestras que se requieren para lograr el número de datos deseados. En las colonias grandes, generalmente se puede obtener diez muestras de heces frescas por persona cada hora. En algunas fases como en la incubación, el número de muestras puede ser menor.

Recolección de muestras

Siéntese en el borde de la colonia y espere a que el ave defeque. Esto puede tomar bastante tiempo, pero será más rápido para quienes conozcan los comportamientos de las aves. Hay diferentes comportamientos previos a la defecación. Por ejemplo, que el ave se pare y se sacuda para ponerse de cara al viento antes de inclinarse ligeramente hacia adelante para defecar y luego mover la cola. Algunas veces escuchará al ave defecar así que busque rápidamente al ave que esté sacudiendo su cola y, siguiendo la dirección de la misma, usted podrá encontrar las heces. En los casos donde no pueda observar a los petreles porque utilizan madrigueras, puede recolectar heces frescas poniendo un papel fuera de las mismas.

Una vez localizada la muestra, recoja una pequeña porción de la parte oscura de las heces que no contiene ácido úrico utilizando las pinzas o un sorbete de plástico. Tan solo se requiere una porción pequeña (de 30 a 50µL. o el equivalente a medio frijol). Las heces de las aves marinas se encuentran bien mezcladas, pero si la muestra fecal es grande, tome una pequeña porción de diferentes partes de la misma para asegurarse de que sea una muestra representativa. Evite el líquido blanco ya que es principalmente urea y no contiene ADN alimenticio. Guarde la muestra en la ampolla etiquetada con un 70-80% de etanol. Cierre bien la tapa y sacuda la muestra para asegurarse de que el ADN se mezcle y se preserve bien. Limpie la espátula o las pinzas cada vez que recoja una muestra utilizando los Kimwipes™ o un pañuelo, o utilice pinzas nuevas para cada muestra y desinféctelas al final del día.

Almacenamiento

Una vez que ha recolectado las muestras, evite el contacto directo de las mismas con la luz del sol e intente mantenerlas en un lugar fresco para evitar cualquier degradación. Si bien el etanol puede mantener las muestras en períodos cortos, para períodos más largos, guárdelas en el congelador a -20°C o en lo posible a -80°C.

Watch video at https://www.youtube.com/watch?v=CQ_6bUX91Is

Evite la urea líquida blanca y concéntrese en las partes oscuras de las heces



RECOMENDACIONES

- Recoja muestras frescas de aves que hayan sido observadas al defecar. Si esto no es posible, intente recoger únicamente muestras que aún estén húmedas, es decir, muestras recientes.
- Con la ayuda de un sorbete, una espátula o pinzas recoja una pequeña cantidad de la parte oscura de las heces evitando el líquido blanco, el cual es principalmente urea y no contiene ADN alimenticio.
- Coloque la muestra dentro de una ampolla de 2ml con 70-80% de etanol.
- Asegure la tapa y sacuda la ampolla para mezclar las heces con el etanol.
- Limpie la espátula o las pinzas después de cada muestra.
- Considere los comportamientos estacionales y la ecología alimentaria del animal en estudio antes de recolectar las muestras.
- Tenga en cuenta el tipo de superficie en que se encuentran las heces, ya que la contaminación de la superficie puede dominar las señales de ADN alimenticio. En lo posible recoja heces de superficies con fuentes mínimas de ADN contaminado como rocas y hielo. Si recoge muestras de tierra o vegetación, intente minimizar la recolección de materiales extraños y registre la superficie (y especies cuando corresponda) para verificar y validar los resultados.
- Recoja muestras de aves que posiblemente se hayan alimentado recientemente. Por ejemplo, evite las aves que están en ayuno por la incubación o por defender sus nidos o territorios.
- Durante la incubación, concéntrese en aves que hayan regresado a la colonia dentro de las últimas 24 horas.
- Recolectar muestras de pichones jóvenes puede ser problemático debido a que los padres les transfieren ADN degradado o grandes cantidades de ADN aviar. Busque heces de aves adultas o pichones más viejos.
- Si puede recoger muestras solo una vez y el momento en la temporada o el grupo de edad no son el tema central de su investigación, enfóquese en periodos en los que haya viajes de alimentación más cortos y en las aves en época de cría.
- Recoger muestras de heces por la mañana puede reducir la degradación de ADN a causa de los rayos UV.
- En caso de que se utilicen varios sitios de estudio, sea consistente con el momento y los protocolos de recolección en cada sitio.

CITAS RECOMENDADAS

McInnes, J. 2016. *Protocolos de recolección de datos de campo para el análisis de ADN alimenticio en heces de aves marinas*. Acuerdo sobre la Conservación de Albatros y Petreles. <http://www.acap.aq/es/resources/guias-de-conservacion-acap> Date viewed.

REFERENCIAS

- Bowser, A. K., A. W. Diamond, and J. A. Addison. 2013. From puffins to plankton: a DNA-based analysis of a seabird food chain in the northern Gulf of Maine. *PLOS ONE* **8**:e83152.
- Deagle, B. E., N. J. Gales, K. Evans, S. N. Jarman, S. Robinson, R. Trebilco, and M. A. Hindell. 2007. Studying seabird diet through genetic analysis of faeces: a case study on macaroni penguins (*Eudyptes chrysolophus*). *PLOS ONE* **2**:e831.
- Deagle, B. E., R. Kirkwood, and S. N. Jarman. 2009. Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. *Molecular Ecology* **18**:2022-2038.
- Deagle, B. E., D. J. Tollit, S. N. Jarman, M. A. Hindell, A. W. Trites, and N. J. Gales. 2005. Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Molecular Ecology* **14**:1831-1842.
- Jarman, S. N., B. E. Deagle, and N. J. Gales. 2004. Group-specific polymerase chain reaction for DNA-based analysis of species diversity and identity in dietary samples. *Molecular Ecology* **13**:1313-1322.
- Jarman, S. N., J. C. McInnes, C. Faux, A. M. Polanowski, J. Marthick, B. E. Deagle, C. Southwell, and L. Emmerson. 2013. Adélie penguin population diet monitoring by analysis of food DNA in scats. *PLOS ONE* **8**:e82227.
- Jarman, S. N. and S. G. Wilson. 2004. DNA-based species identification of krill consumed by whale sharks. *Journal of Fish Biology* **65**:586-591.
- King, R. A., D. S. Read, M. Traugott, and W. O. C. Symondson. 2008. Molecular analysis of predation: a review of best practice for DNA-based approaches. *Molecular Ecology* **17**:947-963.
- McInnes, J. C., R. Alderman, B. E. Deagle, M.-A. Lea, B. Raymond, and S. N. Jarman. 2016a. Optimised scat collection protocols for DNA metabarcoding in vertebrates. *Methods in Ecology and Evolution*: DOI: 10.1111/2041-1210X.12677.
- McInnes, J. C., L. Emmerson, C. Southwell, C. Faux, and S. N. Jarman. 2016b. Simultaneous DNA-based diet analysis of breeding, non-breeding and chick Adélie penguins. *Royal Society Open Science* **3**:150443.
- Murray, D. C., M. Bunce, B. L. Cannell, R. Oliver, J. Houston, N. E. White, R. A. Barrero, M. I. Bellgard, and J. Haile. 2011. DNA-based faecal dietary analysis: A comparison of qPCR and high throughput sequencing approaches. *PLOS ONE* **6**:e25776.
- Murray, D. C., M. L. Coghlan, and M. Bunce. 2015. From benchtop to desktop: Important considerations when designing amplicon sequencing workflows. *PLOS ONE* **10**:e0124671.
- O'Rorke, R., S. Lavery, S. Chow, H. Takeyama, P. Tsai, L. E. Beckley, P. A. Thompson, A. M. Waite, and A. G. Jeffs. 2012. Determining the diet of larvae of western Rock Lobster (*Panulirus cygnus*) using high-throughput DNA sequencing techniques. *PLOS ONE* **7**:e42757.
- Oehm, J., A. Juen, K. Nagiller, S. Neuhauser, and M. Traugott. 2011. Molecular scatology: how to improve prey DNA detection success in avian faeces? *Molecular Ecology Resources* **11**:620-628.
- Pompanon, F., B. E. Deagle, W. O. Symondson, D. S. Brown, S. N. Jarman, and P. Taberlet. 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology* **21**:1931-1950.
- Zeale, M. R., R. K. Butlin, G. L. Barker, D. C. Lees, and G. Jones. 2011. Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Molecular Ecology Resources* **11**:236-244.