

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Estandarización de un protocolo de extracción de ADN a  
partir de plumas de aves**

**Yulisa Mishell Alvarez Arcos**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 04 de mayo de 2020

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Estandarización de un protocolo de extracción de ADN a partir de  
plumas de aves**

**Yulisa Mishell Alvarez Arcos**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Juan José Guadalupe López, MSc.**

Quito, 04 de mayo de 2020

## **DERECHOS DE AUTOR**

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Nombres y apellidos: Yulisa Mishell Alvarez Arcos

Código: 00125325

Cédula de identidad: 050372475-9

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2020

## **ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN**

**Nota:** El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

## **UNPUBLISHED DOCUMENT**

**Note:** The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

## RESUMEN

La extracción de ADN genómico de especies animales requiere de una estandarización previa específica a la especie, dada la naturaleza de los tejidos o material biológico que se pueden obtener tras un proceso de muestreo. En el caso de las aves, al tratarse de animales con una amplia distribución en los ecosistemas, la extracción de ADN a partir de muestras obtenidas por procesos no invasivos resulta de gran utilidad. El muestreo de plumas específicamente, en lugar de sangre o tejido, tiene la ventaja de generar menor estrés y daño físico a los individuos, no sólo por tratarse de un procedimiento menos complejo, sino también porque se puede extraer ADN viable a partir de plumas encontradas en el campo y plumas de colecciones antiguas de museo, con lo cual se pueden realizar estudios sin necesidad de la destrucción de material de colección. Además, los métodos no invasivos de muestreo también son importantes en sitios como el Ecuador, en donde se encuentran ecosistemas frágiles y diversos que deben manejarse con precaución. En el presente estudio, se realizó la estandarización de un protocolo de extracción de ADN a partir de plumas, para lo cual se analizó la calidad y rendimiento de la extracción al probar variables como el tamaño de raquis, especie, tipo de pluma, antigüedad y tiempo de digestión con proteinasa K. Específicamente, al utilizarse 1 cm de raquis se obtuvo casi el doble de cantidad que con 0.5cm. Por otro lado, con 1 cm de raquis en tiempos de lisis de 18 horas en lugar de 4 horas, se obtuvo mejores rendimientos. Además, al utilizar plumas recién colectadas se logró mejores concentraciones que con plumas preservadas en museo. Los rendimientos fueron mayores en plumas de cola que de ala. Las concentraciones entre especies fueron diferentes, por ende los protocolos de extracción deben ser específicos para cada especie de ave. La calidad de ADN fue aceptable, pero hubo una posible contaminación con fenoles. Otras variables como la conservación de la muestra, así como el tiempo de almacenamiento pueden ser analizados a futuro para conseguir los mejores rendimientos. Una buena estandarización del método permitiría obtener ADN en buena cantidad y calidad para futuros estudios moleculares que aborden temas de diversidad, sexaje, y efectos antropogénicos en especies de aves del Ecuador.

**Palabras clave:** ADN genómico, plumas, método no invasivo, fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, rendimiento de ADN.

## ABSTRACT

The extraction of genomic DNA from animal species requires a previous specific standardization for the specie, given the nature of the tissue or the biological material that can be obtained after a sampling process. In the case of birds, these are animals with a wide distribution in the ecosystems, therefore DNA extraction from samples obtained through non-invasive processes can be enormously useful. Feather sampling specifically, instead of using blood or tissue, has the advantage of generating a lower levels of stress and physical damage to the individuals, not only because it is a less complex procedure, but also because DNA can be extracted from feathers found in the field. Other studies also report that viable DNA can be extracted from antique feathers at museum exhibits, with which studies can be performed without destroying collection material. Besides, non-invasive sampling methods are also important in places like Ecuador, where there are fragile and diverse ecosystems that must be handled carefully. In this study, the standardization of a protocol for DNA extraction from feathers was done, for which the quality and efficiency of the extraction was analyzed, by testing variables like rachis size, species, the age of the sample, type of feather, and digestion time with proteinase K. Specifically, when 1 cm of feather was used, almost double of the amount of the DNA was obtained than with 0.5 cm. On the other hand, with 1 cm of feather and 18 hours of digestion instead of 4 hours, higher concentrations of DNA were obtained. Also, using freshly collected feathers, better concentrations were achieved than with museum-preserved feathers. Yields were higher in tail feathers than in wing feathers. The concentrations between species were different, therefore the extraction protocols must be specific for each species of bird. Other variables, like sample conservation as well as the storage time can be analyzed in the future in order to obtain the best performance. A good standardization of the method would allow to obtain DNA in a good amount and quality for future molecular studies that deal with diversity, sexing, and anthropogenic effects in birds species of Ecuador.

**Key words:** Genomic DNA, feathers, non-invasive method, phenol:chloroform:isoamyl alcohol, concentrations of DNA.

**TABLA DE CONTENIDO**

INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Importancia de la extracción de ADN genómico aviar de plumas.....	9
1.2 Tipos de muestreos: invasivos y no invasivos.....	10
1.2.1 Métodos de conservación de las muestras.....	11
1.3 Métodos de extracción de ADN genómico.....	11
1.3.1 Limitaciones de los métodos de extracción de ADN en plumas.....	12
1.4 Aplicaciones del ADN genómico de plumas.....	13
MÉTODOS.....	15
RESULTADOS.....	17
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES.....	23
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
FIGURAS.....	28
ANEXO A: Morfología de la pluma.....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Resumen de las concentraciones de ADN al experimentar tiempos de lisis, tamaño del raquis, antigüedad de la muestra, especies de aves y tipo de pluma..... 28
- Figura 2.** Variables analizadas experimentalmente en los protocolos de extracción de ADN genómico de plumas en 28 artículos científicos ..... 28

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Importancia de la extracción de ADN genómico aviar de plumas

Pese a su pequeño territorio, Ecuador es considerado un país megadiverso y se encuentra entre los 5 países con mayor diversidad de especies de aves a nivel mundial (García & Gómez, 2007). Por ello, es importante estudiar la biodiversidad de la avifauna mediante estudios moleculares (Horvath *et al.*, 2005).

Los estudios moleculares son herramientas que permiten el análisis del material de interés como los ácidos nucleicos. Son importantes para para realizar investigaciones en el comportamiento, taxonomía, tamaño poblacional, tasas de migración, estructura genética y conservación de las aves (Maurer *et al.*, 2010). El primer paso para los estudios genéticos es la obtención del ADN, ya que es el componente principal del material de herencia en los seres vivos (Viili *et al.*, 2013). El ADN se encuentra en el material biológico que se obtiene después de un procedimiento de muestreo (Horvath *et al.*, 2005).

Los tipos de muestreos pueden variar desde procesos invasivos que inducen estrés en los individuos y los procesos no invasivos que no afectan físicamente a las especies en estudio (Sánchez *et al.*, 2013). En los últimos años los métodos no invasivos de muestreo han sido importantes para los análisis genéticos en las aves (Bello *et al.*, 2001). Concretamente, el muestreo de plumas representa una alternativa potencial para obtener ADN genómico viable, ya que las plumas pueden ser recolectadas en el campo o mediante especímenes de colecciones clásicas de museos (Rudnick *et al.*, 2008; Horvath *et al.*, 2005).

Las plumas son muestras biológicas de interés para obtener ADN. Ya que, están compuestas por una estructura queratinosa y un eje que está dividido en dos secciones: el raquis y el cálamo, el eje tiene una forma cilíndrica y se conecta directamente con la epidermis (Anexo A) (Hogan *et al.*, 2008; Onifade *et al.*, 1998). El raquis está formado

por dos orificios o también denominados ombligos, un ombligo superior donde se ubica la parte laminar de la pluma y el ombligo inferior que alimenta a la pluma con sangre durante su desarrollo. El abastecimiento de sangre se detiene cuando las plumas llegan a la etapa máxima de desarrollo, sin embargo, las células residuales, los pigmentos y las proteínas permanecen en el eje de la pluma. La queratina y los ejes de las plumas son materiales resistentes que proporcionan un microambiente que protegen la integridad del ADN de los factores ambientales extrínsecos no controlables (Sánchez *et al.*, 2013). Por tanto, las plumas son consideradas como muestras biológicas atractivas para los estudios y análisis moleculares (Beja-Pereira *et al.*, 2009).

## **1.2 Tipos de muestreos: invasivos y no invasivos**

Tradicionalmente, se han empleado tipos de muestreos invasivos y/o destructivos para especies de animales (Dai *et al.*, 2015). Se puede establecer parámetros de comparación entre el método invasivo y el método no invasivo. El primero fundamentalmente se sustenta en la obtención de muestras de tejidos internos, tales como: músculo, hígado, riñón y sangre representando un riesgo para la vida de las especies (Horvath *et al.*, 2005). Mientras que, el método no invasivo se ha convertido en una alternativa ambiental, social y representa una alta viabilidad económica para la recolección de muestras, conservando la especie y optimizando recursos (Rudnick *et al.*, 2008).

En los métodos invasivos los animales deben ser capturados y en ocasiones ser sacrificados, lo cual incluye riesgos a la especie y a la persona quien realiza el muestreo, lo que conlleva a dilemas éticos que involucran cuestiones humanitarias (Segelbacher, 2002). Capturar a las aves en sus nichos ecológicos en ocasiones son procesos factibles, pero inducen un estrés elevado que puede tener efectos secundarios en el éxito reproductivo y en la presión sanguínea (Broquet, Menard & Petit, 2006).

Una estrategia alternativa es el muestreo no invasivo, el cual presenta mayor viabilidad para obtener muestras biológicas sin causar estrés a las especies utilizando mayormente plumas y heces para extraer su ADN (Taberlet & Luikart, 1999). La ventaja del muestreo no invasivo es la obtención de muestras biológicas de animales que están en libertad sin tener que atraparlos o manipularlos (Solberg, 2006). Además, es la única opción para las especies en peligro de extinción, especies extintas, especies raras y cuando los procesos de captura son complejos debido a la edad y el tamaño de las aves (Vili *et al.*, 2013).

### **1.2.1 Métodos de conservación de las muestras.**

Actualmente, existen diversos métodos que benefician a la preservación de plumas, y con ello la integridad del ADN cuando no es posible realizar inmediatamente los procesos de extracción de los especímenes recién recolectados. Entre los métodos para la preservación de muestras se resaltan los almacenajes en: etanol absoluto, sílica de gel y agentes quelantes como la solución DETs (EDTA/Tris/DMSO), los cuales pretenden desactivar e inhibir las actividades de las nucleasas mediante un adecuado almacenamiento en lugares oscuros, frescos y con niveles de humedad controlados (Taberlet & Luikart, 1999). Los métodos de conservación de los especímenes son importantes para mantener la integridad del ADN por largos períodos de tiempo (Vili *et al.*, 2013).

### **1.3 Métodos de extracción de ADN genómico**

La extracción de ADN es uno de los pasos más importantes para realizar los análisis genéticos. Existen varios métodos para extraer ADN genómico aviar, tales como: kits de extracción comerciales, método fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (PCI), método fenol: cloroformo, chellex al 5%, protocolo con acetato de potasio, métodos de

extracción con colagenasa y proteinasa K, entre otros (Rahaman *et al.*, 2002; Bello *et al.*, 2001; Maturrrano *et al.*; 2012; Freedman *et al.*, 2008; Benja *et al.*, 2009).

Los kits comerciales son muy utilizados para extraer ADN, ya que se adaptan a una amplia gama de muestras biológicas y generan altas concentraciones de buena calidad (Fraga *et al.*, 2004). Sin embargo, sus costos son elevados, el rendimiento depende de la cantidad inicial de la muestra y actualmente no existe una amplia gama y/o disponibilidad de kits para extraer ADN genómico a partir plumas (Tang *et al.*, 2005).

En cambio, el uso de PCI es un método alternativo que representa una viabilidad económica y proporciona ADN de alto peso molecular. No obstante, en ocasiones la principal desventaja es la obtención de ADN degradado, lo cual se puede evitar mediante el uso adecuado de los solventes orgánicos durante el procedimiento (Störmer *et al.*, 2007). El protocolo de PCI ha permitido extraer ADN genómico de calidad y con buenos rendimientos de 120 especies de aves (Bello *et al.*, 2001).

Por otro lado, un método simple que no emplea solventes orgánicos tóxicos para el operador es el Chellex 5% (Walsh *et al.*, 2018). El método utiliza una resina que intercambia iones metálicos multivalentes, cuya función es remover los cationes que se localizan en una solución y los pega en la parte superior de la resina para realizar la digestión del ADN, evitando así la degradación y contaminación por nucleasas (García *et al.*, 2007). A pesar de ello, la desventaja principal es la obtención de ADN de cadena simple y/o monocatenaria, siendo menos estable para el almacenamiento del material genético a largo plazo (Alda *et al.*, 2007)

### **1.3.1 Limitaciones de los métodos de extracción de ADN en plumas.**

Estudios similares reportan que los procesos de extracción de ADN genómico para las muestras biológicas obtenidas tras un proceso de muestreo no invasivo presentan algunas limitaciones como el bajo número de copias de ácido nucleico, una calidad

deficiente del mismo, presencia de inhibidores de la PCR y degradación del ADN por la actividad de las nucleasas (Vili *et al.*, 2013; Alda, Rey & Doadrid, 2007). Otro factor es la contaminación con los compuestos presentes en el ADN, especialmente con RNAsas y otros polisacáridos (Maturrano *et al.*, 2012).

El estudio realizado por Linn (1981) establece que la integridad del ADN de las plumas es afectada por el estrés oxidativo, los procesos de hidrólisis, las actividades enzimáticas y los factores extrínsecos no controlables como la temperatura, la humedad relativa, radiaciones solares, pH, degradación microbiana y contaminación cruzada entre aves. La humedad causa un notable daño físico a las plumas, ya que forma microporos por los cuales pueden ingresar los microorganismos y degradar la queratina y el eje de la pluma que protegen el ADN (Villi *et al.*, 2013). El uso de un método adecuado de recolección de muestras, extracción y purificación garantiza la calidad y concentración del ácido nucleico (Panasci *et al.*, 2011).

#### **1.4 Aplicaciones del ADN genómico de plumas**

El ADN genómico aviar de plumas permite realizar análisis y estudios que proporcionen resultados acerca de la estructura poblacional, favoreciendo al diseño y la implementación de las reservas ecológicas de las aves. Entre los objetivos principales de los estudios genéticos ecológicos es proteger a las especies en peligro de extinción debido a la sobreexplotación de su hábitat (Sánchez *et al.*, 2013). Por otro lado, la identificación de las poblaciones de aves es importante en los programas de conservación y manejo de la variabilidad genética (Eguchi & Eguchi, 2000).

Además, en diversos estudios se ha utilizado con éxito el ADN genómico de plumas para la identificación de especies, sexaje molecular, determinación de niveles de polimorfismos genéticos, reconstrucción de pedigrí, evaluación de la estructura genética, filogeografía, así como la filogenia intraespecífica, estimaciones de la abundancia en

poblaciones no reproductivas e identificación de la paternidad, análisis del recambio individual en los nidos de las aves y análisis de telómeros que son biomarcadores de longevidad de las especies animales (Hogan *et al.*, 2008; Rudnick *et al.*, 2008; Salmon *et al.*, 2006).

Por otro lado, los procesos de extracción y purificación del ADN genómico aviar a partir de plumas obtenidas tras un método de muestreo no invasivo, requieren de una estandarización específica previa según la especie. El objetivo del presente estudio fue estandarizar un protocolo de extracción a partir de plumas de gorrión americano cuyo nombre científico es *Z. capensis* y canario maría cuyo nombre científico es *S.petechia* con la finalidad de obtener ADN genómico de buena calidad y cantidad.

## MÉTODOS

En el presente estudio se analizó cinco variables que influyen en los rendimientos de ADN, tales como: el tamaño del raquis, la especie de ave, tipo de pluma, antigüedad de la muestra y tiempo de lisis con proteínasa K.

Para probar el tamaño del raquis. Se comparó entre 0.5 cm y 1cm de raquis extraídos de cola del gorrión americano en un tiempo de lisis de 4 horas. Las otras variables se compararon a partir de 1 cm del raquis. En cuanto a la variable tiempo de lisis, se ensayó en tiempos de 4 y 18 horas a 56 °C con proteínasa K a partir de plumas de ala de gorrión americano y canario maría. Con los tratamientos de lisis también se analizó la variable especie de ave, ya que se aplicó el mismo procedimiento para ambas especies. Para probar la variable antigüedad de la muestra, se comparó plumas recién colectadas de canario maría y plumas conservadas en museo de gorrión americano en un tiempo de digestión de 18 horas. Para experimentar el tipo de pluma, se comparó plumas extraídas de ala y cola de gorrión americano en un tiempo de lisis de 4 horas.

Para los procesos de extracción de ADN, se siguió el protocolo de Bello *et al.* (2001). El protocolo consiste en usar proteínasa K para los tiempos de lisis celular y los procesos de purificación del ADN se realizan con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (PCI). Se colocó los raquis en un tubo Eppendorf de 1.5 mL, y luego 500 µl del buffer de lisis y 5.83 µl de proteínasa K a una concentración final de 175 µg/ml. Posteriormente, se incubó las muestras en la cámara de arena durante 4 y 18 horas a 56 °C respectivamente, acorde a la variable probada. Después de los procesos de lisis, las muestras se agitaron durante 1 minuto en el vórtex para tener una mezcla homogenizada, y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.

Se recolectó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se añadió 500 µl de Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a

13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Con la micropipeta se recolectó el sobrenadante, se evitó tomar la interfase, y se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se lavaron las trazas de fenol con 500 µl de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1). Se agitó las muestras vigorosamente hasta obtener un aspecto lechoso, y se centrifugó a una velocidad de 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Con una micropipeta se recolectó aproximadamente 500 µl del sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo de 1.5ml.

Para la precipitación del ADN se adicionó 50 µl de NaCl 2M, y dos volúmenes de etanol absoluto. Se volvió a centrifugar a 13.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. Se procedió a descartar el sobrenadante y para lavar el pellet se adicionó 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó durante 5 minutos a una velocidad de 13.000 rpm. Después del proceso de centrifugación se descartó el etanol. A continuación, se dejó secar el pellet a temperatura ambiente durante 12 minutos y se resuspendió el pellet en 30 µl de agua ultra pura estéril. La calidad y concentración de ADN genómico se midió con el equipo Nanodrop 2000.

## RESULTADOS

Para analizar el rendimiento y la calidad del ADN se probó experimentalmente cinco variables como el tamaño del raquis, la especie de ave, antigüedad de la muestra, tipos de pluma y tiempos de digestión con proteinasa K a 56 °C.

Al experimentar la variable tiempo de lisis a partir de un 1 cm de raquis extraídos de ala y en tiempos de lisis de 4 horas. Se obtuvo una concentración promedio de 1.13 ng/μl en plumas de gorrión americano y 23.83 ng/μl en plumas de canario maría. Mientras que en tiempos de digestión de 18 horas se obtuvo una concentración promedio de 16.9 ng/μl en plumas de gorrión americano y 66.54 ng/μl en plumas de canario maría (Fig.1A). A pesar de aplicar el mismo tratamiento de lisis para ambas especies, se alcanzaron rendimientos diferentes. Por lo cual, otras variables a parte del tiempo de digestión pueden influir en un mismo protocolo.

Al probar la variable tamaño de raquis a partir de plumas de cola del gorrión americano en tiempos de lisis de 4 horas. Se obtuvo una concentración promedio de 109.9 ng/μl para raquis de 0.5 cm y 246.8 ng/μl para raquis de 1 cm. Obteniendo casi el doble de concentraciones en plumas más grandes (Fig.1B).

Al experimentar la antigüedad de la muestra a partir de 1 cm de raquis extraídos de ala en tiempos de lisis de 18 horas. Se obtuvo un rendimiento promedio de 16.9 ng/μl en plumas de gorrión americano preservados en museo y 66.53 ng/μl en plumas de canario maría recién colectadas y almacenadas en condiciones de oscuridad y seco (Fig.1C).

Al probar la variable tipo de pluma a partir de 1 cm de raquis extraído de gorrión americano en tratamientos de digestión de 4 horas. Se alcanzaron rendimientos promedio de 1.13 ng/μl en plumas de ala y 246.8 ng/μl en plumas de cola (Fig.1D).

Por otro lado, se utilizó la relación de las absorbancias A260/280 y A260/230 para evaluar la calidad del ADN. Se considera un ADN de pureza óptima cuando la A260/280 tiene valores entre 1.8 a 2.0 y la A260/230 está entre 1.5 a 2.2 (Surzycki, 2000). Se obtuvieron valores entre 1.6 y 1.8 en la absorbancia A260/280, mostrando que la pureza fue aceptable. Sin embargo, los valores de la absorbancia A260/230 fueron menores a 1.5 indicando una posible contaminación con sales, carbohidratos o fenoles.

A través de una revisión bibliográfica, se encontró que en 28 artículos científicos similares existen otras variables que se han experimentado durante la estandarización de un protocolo de extracción de ADN genómico a partir de plumas. En la revisión se estableció que la variable más considerada en 25 de 28 artículos análogos es el tipo de ombligo u orificio del cálamo. En 22 artículos la segunda variable más estudiada es el estado de la pluma según su nivel de degradación. El tiempo de almacenamiento es otra variable considerada en 20 artículos. Finalmente, los métodos de conservación de las muestras se experimentó en 18 de 28 artículos análogos (Fig.2).

## DISCUSIÓN

Es importante analizar las variables que influyen en los procesos de extracción de ADN genómico para estandarizar y optimizar los protocolos según la especie y las muestras biológicas (Hogan *et al.*, 2008). En el presente estudio se analizó el rendimiento y la calidad del ADN a partir de plumas al experimentar cinco variables.

La primera variable que se probó fue el tamaño del raquis, se analizó la concentración de ADN a partir de 0.5 cm y 1 cm. Se obtuvo un rendimiento mayor en raquis de 1 cm, específicamente de 246.8 ng/μl. Los resultados son comparables con los estudios reportados por Sánchez *et al.* (2013) y Bayard *et al.* (2008) que analizaron la concentración de ADN a partir de diferentes tamaños de raquis y obtuvieron rendimientos promedio de 272.47 ng/μl al utilizar raquis de 1 cm. Mientras que al emplear tamaños de 0.25, 0.5 y 0.75 cm los rendimientos oscilaron entre 82.46 ng/μl y 175.56 ng/μl. Con lo mencionado, se sugiere emplear como fuente de ADN raquis de 1 cm, considerando que los raquis más grandes tienen más material genético y tejidos que los pequeños (Hogan *et al.*, 2008; Bello *et al.*, 2001).

La segunda variable analizada fue el tiempo de lisis celular con proteinasa K a 56°C. Se obtuvo un rendimiento promedio de 41.72 ng/μl en tratamientos de 18 horas y en 4 horas las concentraciones fueron de 12.48 ng/μl. Los resultados son comparables con los estudios de Bayard *et al.* (2008) y Rudnick *et al.* (2005), quienes reportan que los tiempos de digestión de 12 y 18 horas ayudaron a mejorar los rendimientos de ADN. Por ello, mientras más horas de digestión del tejido, el rendimiento obtenido es mejor (Bello *et al.*, 2001). Además, durante más tiempo actuó la proteinasa K y el buffer de lisis existe mayor degradación de la queratina, y de tal manera mayor liberación de ADN (Rudnick *et al.*, 2005; Bayard *et al.*, 2008).

La tercera variable analizada fue la antigüedad de la pluma. La concentración de ADN en especímenes antiguos presevados en museos fue de 16.9 ng/μl. Mientras que los rendimientos en plumas recién recolectadas, almacenadas en oscuridad y en seco fue de 66.53 ng/μl. Los estudios análogos de Rudnick *et al.* (2008) y Maurer *et al.* (2010) emplearon plumas de colecciones de museos conservadas en DETs y obtuvieron rendimientos de 71.4 ng/μl. Por otro lado, el estudio realizado por Robert *et al.* (2002) utilizó plumas recién recolectadas y almacenadas en oscuridad a una temperatura y humedad controlada, obtuvo rendimientos de ADN, dentro del rango 126 ng/μl y 267.16 ng/μl. En general, la obtención de ADN a partir de plumas recién colectadas es más conveniente para evitar la degradación del mismo (Maurer *et al.*, 2010).

La cuarta variable analizada fue el tipo de pluma. Las concentraciones de ADN en plumas de ala fueron de 1.13 ng/μl y 246.8 ng/μl en plumas extraídas de la cola. Los resultados obtenidos son comparables con el estudio de Villi *et al.* (2013). Obtuvo mayores rendimientos de ADN al utilizar plumas extraídas de la cola. Sin embargo, estudios similares enfatizan que otras variables además del tipo de pluma pueden influir en las concentraciones del material genético tras un mismo protocolo (Villi *et al.*, 2013; Bernstein *et al.*, 2002; Hogan *et al.*, 2008).

Los rendimientos de ADN en los procesos de extracción mostraron diferencias al emplear los mismos tratamientos de tiempos de lisis en dos especies de aves. Se obtuvo mayores rendimientos en plumas extraídas de canario maría que de gorrión americano. Los resultados son comparables con los reportados en Payne *et al.* (2002) y Martinez *et al.* (2004), cuyas concentraciones de ADN fueron distintas según las especies de ave en estudio. Lo mencionado, se adjudica a que las especies de aves tienen variaciones en las condiciones ecológicas, comportamientos, dietas y morfologías que influyen en el bombeo de la sangre durante la etapa de desarrollo, lo que repercute en la concentración

del material genético en las plumas (Piggot, 2004). Por lo cual, es importante estandarizar un protocolo de extracción específico para cada especie de ave (Horvath *et al.*, 2005).

Por otro lado, la calidad del ADN obtenido fue aceptable. Sin embargo, presentó una contaminación con fenoles, ya que el fenol absorbió una longitud de onda de 270 nm (Surzycki, 2000). Para obtener una buena calidad del ácido nucleico, el operador debe manejar una técnica de pipeteo adecuada y todas las medidas de bioseguridad. También es necesario determinar la cantidad apropiada de fenol en el proceso de extracción de ADN, específicamente cuando se utiliza el método PCI (Gallou *et al.*, 2015).

Mediante búsqueda en la literatura, se encontró que en 28 artículos análogos existen otras variables que también se han considerado durante la estandarización de protocolo de extracción de ADN genómico aviar. En esta búsqueda se estableció que la variable más considerada en los protocolos de extracción es el orificio u ombligo del cálamo de la pluma (Horvath *et al.*, 2005). Los estudios realizados por Hailer *et al.* (2007), Hogan *et al.* (2008) y Villi *et al.* (2013) alcanzaron rendimientos promedio de 275.1 ng/ $\mu$ l al emplear plumas con el orificio superior y 134.73 ng/ $\mu$ l en plumas con el orificio inferior del cálamo. Por ende, los resultados sugieren que el coágulo de sangre localizado en el ombligo superior proporciona mayor cantidad de ADN genómico en relación a la punta basal del cálamo (Hailer *et al.*, 2007; Hogan *et al.*, 2008; Villi *et al.*, 2013; Rudnick *et al.*, 2008).

Otra de las variables consideradas en estudios análogos es el estado y/o la condición de la pluma según su nivel de degradación. Hogan *et al.* (2008) señala que el estado de la pluma puede ser caracterizada de forma visual. Existen tres estados: Bueno cuando el cálamo es transparente y no tiene signos visibles de degradación; Moderado cuando existen signos visibles de degradación y el cálamo es de color amarillo por las afectaciones ambientales; Pobre cuando presenta signos extremos de degradación y el

cálamo no tiene color. Los estudios de Hogan *et al.* (2008) y Horvath *et al.* (2005) alcanzaron concentraciones entre 92.1 y 435.33 ng/ $\mu$ l al utilizar plumas en estados buenos y moderados. Sin embargo, Bush *et al.* (2005) y Runick *et al.* (2007) reportaron concentraciones promedio de 3.82 ng/ $\mu$ l de ADN en plumas con estados “pobres” y con signos extremos de degradación. En base a los resultados reportados se recomienda emplear plumas en estados “buenos” y “moderados” (Hogan *et al.*, 2008).

En cuanto, al tiempo de almacenamiento y los métodos de conservación de las muestras. Los estudios de Bernstein *et al.* (2002) y Mesa (2005) obtuvieron concentraciones promedio de 156.17 ng/ $\mu$ l en muestras conservadas entre 1 y 5 años en sílica de gel. No obstante, en muestras conservadas entre 10 a 15 años con otros métodos y tratamientos húmedos alcanzaron un rendimiento límite de 67.1 ng/ $\mu$ l (Sefc *et al.*, 2001). Considerando que el tiempo de almacenamiento y los métodos de conservación no adecuados pueden generar “cross-linkage” y/o entrecruzamiento del ADN, hidrólisis en los enlaces fosfodiéster del mismo y una elevada actividad de las endonucleasas (Jimenez *et al.*, 2007). Para mantener la integridad del material genético por mayor tiempo, el estudio de Frantz (2004) recomienda conservar las plumas en DETs, sílica de gel y almacenar en condiciones oscuras con tratamientos secos y frescos. Por ello, el tiempo de almacenamiento no es un factor relevante cuando los especímenes se conservan en métodos y tratamientos óptimos (Villi *et al.*, 2013)

Finalmente, experimentar las variables que influyen en la metodología permitirá una buena estandarización del protocolo de extracción de ADN a partir de plumas con la finalidad de conseguir concentraciones de buena calidad y cantidad para posteriores estudios moleculares.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se encontró que el tamaño del raquis, la antigüedad de la pluma, el tipo de pluma y el tiempo de lisis de 18 horas tienen una incidencia en la tasa de ADN recuperado. Además, es evidente que el protocolo de extracción para cada especie debe ser específico y dependiente de los métodos de conservación previos de los especímenes.

Estandarizar los protocolos de extracción de ADN de plumas según la especie de ave es importante para conseguir altas concentraciones de ADN viable de buena calidad para futuros estudios que abarquen temas genéticos, taxonómicos y evolutivos de aves endémicas y migratorias que se localizan en el Ecuador.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alda, F., Rey, I. & Doadrid, I. (2007). An Improved method of extracting degraded DNA samples from bird and other species. *Ardeola* 54(2), 331-334
- Andleeb, S., Shamim, S., Naeem, M. & Aziz, R. (2012). Modified Protocol for Genomic DNA Extraction from Newly Plucked Feathers of *Lophura leucomelana hamiltoni* (Galliformes) for Genetic Studies and its Endo-restriction Analysis
- Bayard, S., Reynolds, T., Douglas M. & Antolin, M. (2008) An improved extraction method to increase DNA yield from molted feathers. *Condor* 110:762–76
- Benezra, J., Johnson, D., Rossi, J., Cook, N. & Wu, A. (1991). Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. *J. Histochem Cytochem*, 39: 351-4
- Beja-Pereira, A., Oliveira, R., Alves, C., Schwartz, M. & Luikart, G. (2009) Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Mol Ecol Resour* 9:1279–130
- Bello, N., Francino, O. & Sánchez, A. (2001). Isolation of genomic DNA from feathers. *J Vet Diagn Invest* 13:162–164
- Broquet, T., Menard, N. & Petit, E. (2006) Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conserv Genet* 8:249–260
- Bush, K., Vinsky, C., Aldridge, & Paszkowski, C. (2005). A comparison of sample types varying in invasiveness for use in DNA sex determination in an endangered population of Greater Sage-Grouse (*Centrocercus urophasianus*). *Conservation Genetics* 6: 867-870.
- Coombs, N., Gough, A. & Primrose, J. (1999). Optimization of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res.*, 27 (16): 12-14.
- Dai, Y., Lin, Q., Fang, W., Zhou, X. & Chen, X. (2015). Noninvasive and nondestructive sampling for avian microsatellite genotyping: a case study on the vulnerable Chinese Egret (*Egretta eulophotes*). *Avian Research*, 6(1)23.
- Eguchi, T. & Eguchi. (2000). High yield DNA extraction from the snake cast-off skin or bird feathers using collagenase. *Bio- technology Letters* 22:1097–1100.
- Frantz, A. (2004). Non-Invasive Genetic Typing in the Study of Badger (*Meles meles*) Ecology. Tesis. University of Sussex United Kingdom. Obtenido el 25 de abril 2020 de [http://www.mnf.unigreifswald.de/fileadmin/naturschutz/thesis\\_frantz.pdf](http://www.mnf.unigreifswald.de/fileadmin/naturschutz/thesis_frantz.pdf).
- Fraga, J., Rodríguez, O., Fuentes, M., Castex. & Fernández, A. (2004). Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de triatómicos: su utilización en la

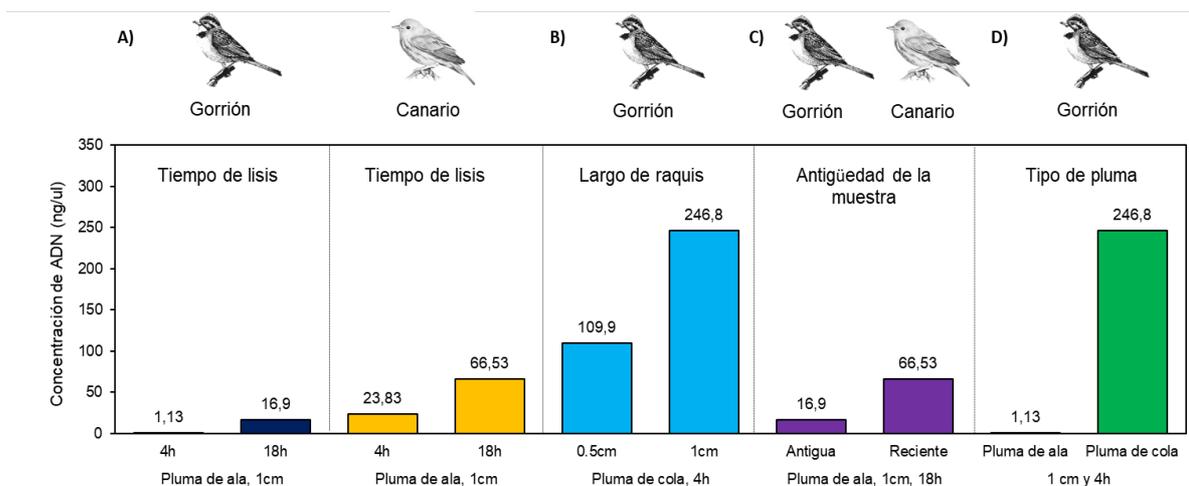
*técnica de ADN polimórfico amplificado al azar*. Revista Cubana de Medicina Tropical 56: 208-13

- García, G. & Gómez, A. (2007). *Abundancia y riqueza específica en un ensamble de aves marinas y costeras del Sudeste*. Hornero 22(1):9-16.
- García, et al. (2007). *Utilización de resina Chelex en la extracción de ADN de varios tipos de tejidos de la tortuga marina Caretta caretta, para la amplificación de marcadores moleculares*. El Caribe las ciencias básicas e ingeniería.
- García, M., Benavente, M., Melo, A. & Roa, E. (2006). Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores. *Esp. Patol*, 3: 175-179.
- Gallou, A., Dzul, A., Dominguez, M. & Andrade, G. (2015). *Manual de prácticas del laboratorio de biología molecular*. Diseño Editorial: Unidad de Promoción y Vinculación – SENASICA
- Harvey, M., Bonter, L., Stenzler, & Lovette, I. (2006). A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *Journal of Field Ornithology* 77:136-140.
- Hogan, F., Cooke, P., Burridge, & NorMan, J. (2008). Optimizing the use of shed feathers for genetic analysis. *Molecular Ecology Resources* 8:561–567.
- Horvath, B., Martínez, B., Negro, J., Kalma, L. & Godoy, J. (2005) An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal Avian Biol* 36:84–8
- Jiménez, A., Villalobos, Q., Jiménez, M. & Platero, P. (2007). Determinación de la efectividad de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de material parafinado para estudios moleculares. *Rev. Méd. Univ. Costa Rica.*, 1 (1): 10-19.
- Katzner, T., Bragin, E. & Millner-Gulland, E. (2006). Modelling populations of long-lived birds of prey for conservation: a study of imperial eagles (*Aquila heliaca*) in Kazakhstan. *Biol Cons* 132:322–335
- Martinez-Cruz, B., Godoy, J. & Negro, J. (2004). Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Mol Ecol* 13:2243–2255
- Mondol, S., Karanth, U., Kumar, N., Gopaldaswamy, A., Andheria, A. & Ramakrishnan, U. (2009). Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for estimating tiger population size. *Biol Conserv* 142:2350–2360
- Morin, et al. (1994). *DNA extraction, amplification, and direct sequencing from Hornbill Feathers*. J.Sci.Soc.Thailand 20. 31-41.
- McKelvey, K. & Schwartz, M. (2004) Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. *J Wild Mgmt* 68:439–448

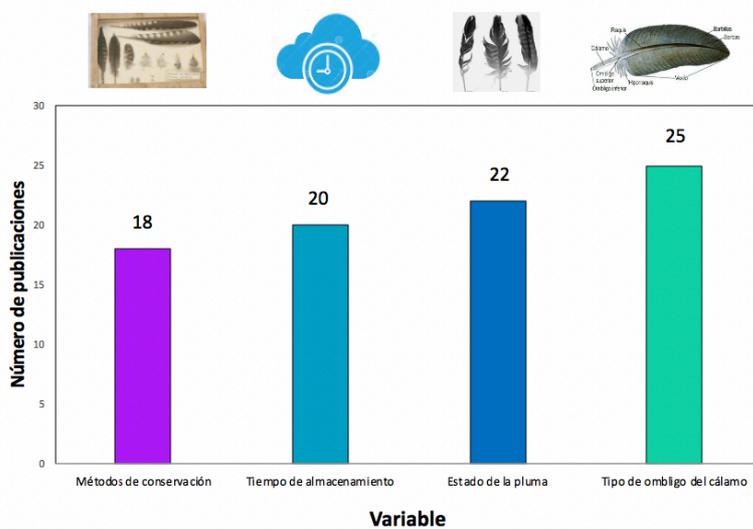
- Muñoz, et al. (2017). *Colecta y Conservación de muestras de fauna silvestre en condiciones de campo*. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Rudnick, J., KaTzner, E., Bragin. & Woody, J. (2008). A noninvasive genetic evaluation of population size, natal philopatry, and roosting behavior of non-breeding eastern Imperial Eagles (*Aquila heliaca*) in central Asia. *Conservation Genetics* 9:667–676.
- Onifade, A., Al-Sane, A., Al-Musallam, A. & Al-Zarban, S. (1998) Potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. *Bioresour Technol* 66:1–11
- Sanchez, V., Pollack, L. & Quijana, J. (2013). Isolation of genomic dna from feathers of columbina cruziana. *Sagasteguiana* 1(1):45-50.
- Salmon, P., Nilsson, F., Nord, A., Bensch, S. & Isaksson, C. (2016). Urban environment shortens telomere length in nestling great tits, *Parus major*. *Department of Biology, Lund University, Sweden*.
- Segelbacher, G. (2002). Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. *Molecular Ecology Notes*, 2(3), 367–369.
- Sefc, K., Payne, R. & Sorenson, M. (2001): Characterization of microsatellite loci in village indigo-birds *Vidua chalybeata* and cross-species amplification in estrildid and ploceid finches. *Molecular Ecology Notes* 1: 252-254.
- Singh, U., Kumare, M. & Lyengar, S. (2018). Method for improving the quality of genomic DNA obtained from minute quantities of tissue and blood samples using chellex 100 resin. *Biological Procedures*, 20, 12(6).
- Solberg, K., Bellemain, E., Drageset, M., Taberlet, P. & Swenson, J. (2006) An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. *Biol Conserv* 128:158–168.
- Sorenson, M. & Payne, R. (2002): *Molecular genetic perspectives on avian brood parasitism*. *Integrative and Comparative Biology* 42: in press.
- Surzycki, S. (2000). *Basic techniques in Molecular Biology*. Heidenberg: Springer-Verlag Berlin.
- Speller, C. F., Nicholas, G. P. & Yang, D. Y. (2011). Feather barbs as a good source of mtDNA for bird species identification in forensic wildlife investigations. *Investigative Genetics*, 2(1)16.
- Linn, S. (1981). *Deoxyribonucleases: a survey and perspectives*. In: *Enzymes*. Vol. 14. (ed. Boyer PD). Academic Press, New York. 121-135.
- Lingham-Soliar, T. & Bonser, R. (2010) Selective biodegradation of keratin matrix in feather rachis reveals classic bioengineering. *Proc R Soc Lond B* 277:1161–1168

- Taberlet, P. & Luikart, G.(1999).Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Molecular Ecology* 7: 1419–1422
- Taberlet,P. & Bouvet,J.(1991). SinglePluckedFeatherasa Sourceof DNA for Bird GeneticStudies. *University JosepFhourier, BP 53, 38041*.
- Tang.Y., Sefers, H., Li, D., Kohn,G. & Procop,D.( 2005). Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 4830-4833.
- Walsh,D.,Metzger,D. & Ruseel,H.(2018). Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based. *BioTechniques* 54(3)435
- Vili, N., Nemesházi, E., Kovács, S., Horváth, M., Kalmár, L. & Szabó, K. (2013). Factors affecting DNA quality in feathers used for non-invasive sampling. *Journal of Ornithology*, 154(2), 587–595.

## FIGURAS

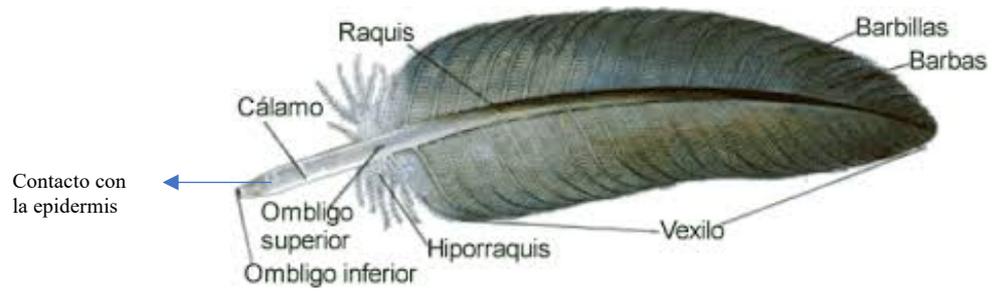


**Figura 1.** Resumen de las concentraciones de ADN al experimentar tiempos de lisis, tamaño del raquis, antigüedad de la muestra, especies de aves y tipo de pluma



**Figura 2.** Variables analizadas experimentalmente en los protocolos de extracción de ADN genómico de plumas en 28 artículos científicos

## ANEXO A: MORFOLOGÍA DE LA PLUMA



Fuente: (Onifade *et al.*, 1998)