

Identificación de especies acuáticas invasoras mediante ADN ambiental

José Antonio Dávila García

Doctor en Biología, Instituto de Investigación
en Recursos Cinegéticos (UCLM-CSIC-JCCM)

Desde hace una década, cada vez hay más estudios encaminados a detectar la presencia de especies en un lugar a partir del ADN que van liberando en el ambiente, o ADN ambiental (ADNa). Este nuevo método ha demostrado sus fortalezas y sus debilidades. Los pasos a seguir para detectar la presencia de una especie mediante ADNa son pocos y aparentemente sencillos, pero presentan ciertas complicaciones para su aplicación práctica, que son mayores cuando la especie es acuática. Los métodos tradicionales de detección de especies escasas adolecen de sus limitaciones también. Antes de recurrir a un estudio basado en ADNa hay que considerar varios factores en un compromiso entre la precisión buscada, la conveniencia y el presupuesto. La principal ventaja del ADNa sobre métodos tradicionales es que es más rápido. Sin embargo, no son métodos excluyentes sino complementarios.

Palabras clave: ADNa; especies invasoras

INTRODUCCIÓN

El ADN ambiental (ADNa) es el que se encuentra en la tierra, agua o atmósfera, y permite inferir la presencia de una especie en un lugar sin necesidad de verla. Es ADN intra o extracelular que seres unicelulares u organismos pluricelulares liberan al medio al desprenderse de células de tejidos, excrementos o exudados. Hacer un estudio genético o genómico a partir de ADNa es complicado, como veremos más adelante, pero a veces no hay más remedio que recurrir a él o, aun con otras opciones, puede ser la más conveniente. Los primeros en recurrir al ADNa fueron los microbiólogos hace treinta años (Ogram et al., 1987), aunque desde hace una década el término está cobrando cada vez

mayor relevancia y los estudios que se ocupan del ADNa se multiplican. Hace diez años se publicó el primer trabajo que describía la detección de fauna acuática a partir de ADNa (Ficetola et al., 2008), y desde entonces los nuevos estudios publicados se ocupan sobre todo de la biodiversidad de dos maneras. Por un lado, intentando identificar a todos los seres vivos presentes en un determinado ambiente: una medida de biodiversidad en un sitio. Por el otro, tratando de identificar alguna especie concreta escasa y elusiva, bien por estar amenazada de extinción o por ser una invasora en el comienzo de su invasión. Aquí se trata del último caso en un ambiente acuático.

PROTOCOLO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES ACUÁTICAS INVASORAS MEDIANTE ADN_a

La detección de especies invasoras al principio de su introducción y mientras su densidad es baja es fundamental en las estrategias de erradicación y control (Hulme, 2006). El procedimiento para detectarlas mediante ADN_a es sencillo en teoría: tomar muestras de agua en el lugar donde se quiere saber si hay una especie determinada (Fig. 1); llevar las muestras de agua al laboratorio, y obtener los resultados moleculares. Los tres pasos están llenos de trampas.

DIFICULTADES PARA ESTUDIAR ADN_a EN AGUA

Primer paso: toma de muestras de agua donde se quiere saber si hay una especie

Cada muestra de agua suele ser de medio litro a un litro, tomada en un lugar de la masa de agua a estudiar (Fig. 2). Se trata de encontrar ADN de la especie en cuestión en ese volumen de agua, por lo que cuantas más muestras se tomen más probable será detectarlo. El ADN_a es muy escaso en el ambiente. Se ha calculado que la cantidad de ADN_a mitocondrial de carpa (*Cyprinus carpio*) presente en un lago de 7-10 ha con una población establecida de carpas es de menos de 0,01 ng/l (Turner et al., 2014), lo que está en el nivel inferior de lo que se puede detectar en laboratorio. El ADN_a se encuentra en las proximidades de los organismos que lo liberan al medio, a no ser que el ambiente sea una corriente de agua que se lo lleve y lo diluya, lo que complica las cosas no solo en el laboratorio, sino porque se podría estar detectando una especie a muchos kilómetros de donde realmente se encuentra (Deiner y Altermatt, 2014). Hay que pensar en la escala. No hace falta ADN_a para saber que en un lago pequeño lleno de carpas hay carpas. Sí ha hecho falta para demostrar una invasión incipiente de siluro (*Silurus glanis*) en el embalse de Alarcón, por ejemplo, y esa suele ser la escala en aplicaciones prácticas. Solo encontraremos ADN_a en las proximidades de la especie buscada o donde haya estado en los



Fig. 1. Toma de muestra de agua en profundidad



Fig. 2. Equipo para toma de muestras de agua

últimos pocos días o, lo que es peor, donde se lo haya llevado la corriente. Es poco probable encontrar ADN_a de una especie escasa en una masa de agua grande tomando una muestra al azar. En teoría, la solución sería tomar muchas muestras con la esperanza de que en algunas entre el ADN_a buscado, pero en la práctica cada punto de muestreo a estudiar cuesta dinero y los recursos suelen ser limitados.

El ADN_a casi siempre es escaso, pero cuando el ambiente es el agua, su estudio tiene la complicación añadida de que se degrada mu-

cho más rápidamente que en otros medios (Barnes et al., 2014). El ADN seco aguanta razonablemente bien a temperatura ambiente pero húmedo se degrada rápidamente por varios procesos, empezando por las endonucleasas internas de las propias células y las externas, sobre todo de bacterias y hongos en el medio. Las técnicas de toma de muestras que las desecan son variadas, pero cuando la muestra es agua es difícil secarla. Una fuente importante de degradación del ADN_a en agua es la radiación ultravioleta (UV); el ADN seco aguanta UV

bastante bien, pero no así en agua. La luz solar hace llegar suficiente UV para degradar el ADN en agua. Junto a esto, el ADN se degrada más rápidamente a mayor temperatura ambiental. En el mejor de los muestreos habrá ADN de la especie buscada en el límite de lo que se puede detectar.

Segundo paso: llevar las muestras de agua al laboratorio

El ADN se degrada rápidamente en agua, sea la de un embalse o la de la botella donde se lleva la muestra al laboratorio (Fig. 3). Es conveniente que las muestras de agua lleguen al laboratorio lo más rápidamente posible y en las mejores condiciones (en hielo y a oscuras). En el medioambiente los organismos van liberando restos con ADN continuamente que sustituyen al ADN que se va degradando, pero una vez en el bote no existe ese reemplazo. Es importante la coordinación entre los trabajadores de campo y los de laboratorio. Las técnicas de ADN son relativamente recientes y todavía no están claras cuestiones como si es preferible filtrar el agua en el campo según se toma la muestra, si pudiera ser conveniente congelarla inmediatamente o en el laboratorio o no hacerlo. Sería bienvenida alguna técnica de toma de muestras de agua en el campo y conservación del ADN a temperatura ambiente. Eso facilitaría mucho este segundo paso porque no habría prisas.

Por otro lado, debe haber una correcta cadena de custodia de las muestras de agua desde que se tomen hasta que lleguen al laboratorio. Encontrar una especie acuática invasora puede obligar a restringir algún uso del lugar donde se encontró o acabar en un juzgado. Hay que poder documentar y demostrar que las muestras de agua que llegan al laboratorio corresponden a las que se han tomado en el campo.

Tercer paso: obtener los resultados moleculares

Una vez en el laboratorio las muestras de agua, el ADN se concentra por centrifugación, precipitación o, más comúnmente, filtrando el agua a través de una membrana y extrayendo de ella el ADN retenido (Fig. 4). Casi

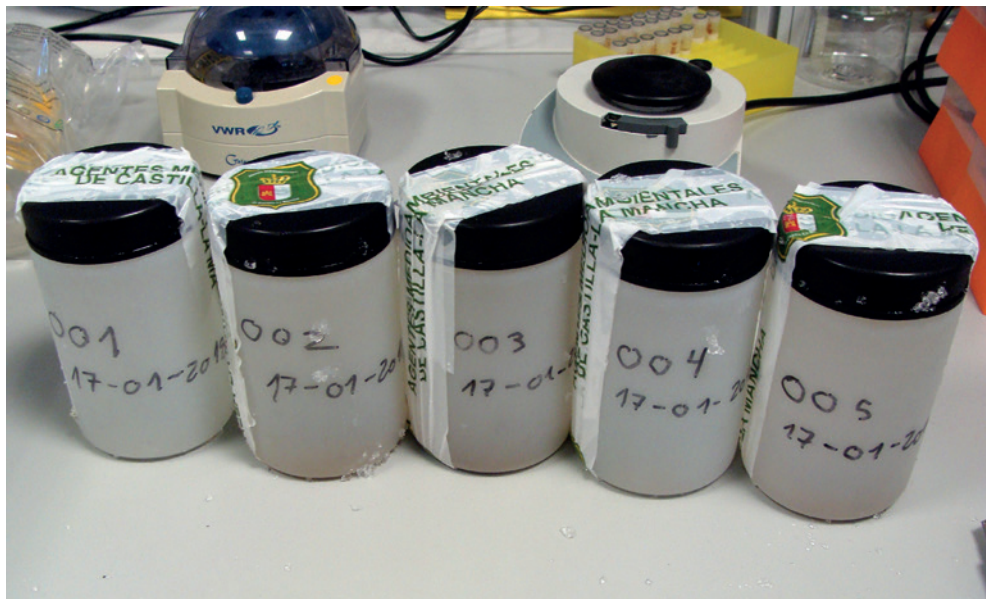


Fig. 3. Las muestras de agua deben precintarse en el campo y llegar al laboratorio mediante cadena de custodia

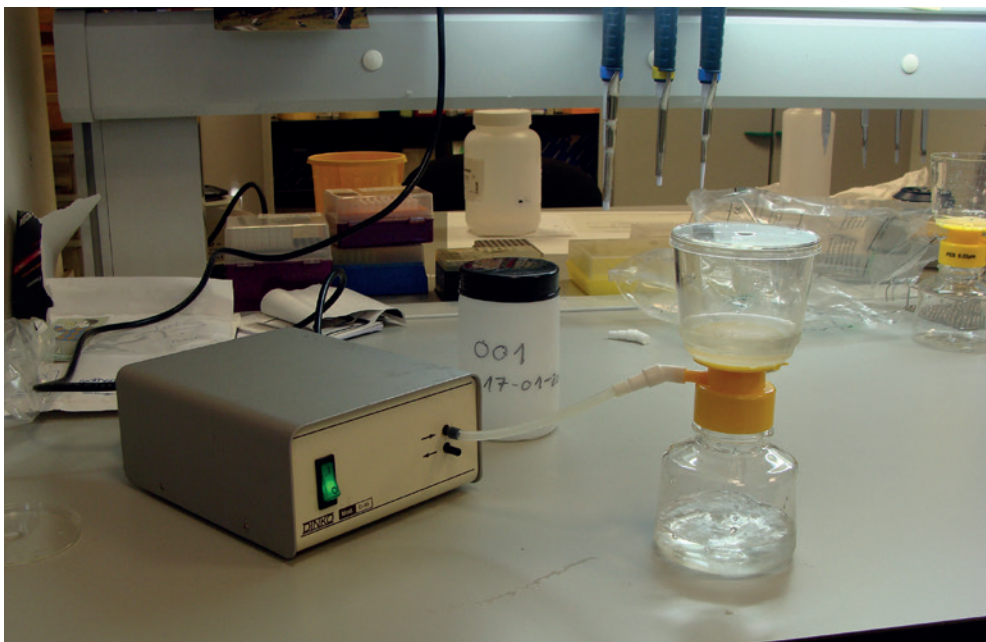


Fig. 4. Filtrado del agua para retener ADN

Fig. 5. Cebadores de PCR diseñados en el IREC para detectar ADN

sin excepción, el primer paso en el estudio molecular es amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento mitocondrial corto de la especie en cuestión. Se busca ADN mitocondrial porque típicamente una célula eucariótica tiene cientos de mitocondrias y, por tanto, cientos de dianas de PCR más que el ADN nuclear. Se intenta amplificar un fragmento de ADN pequeño porque la degradación del ADN hace menos frecuente o inexistente la presencia de

acer		
primers (nucleótidos 5' a 3')		
Nombre	Especie	Formato
Sg1_DLoopF1	gaccatcaacctctttatacc	siluro
Sg1_DLoopR1	gggttttgtaattcggtgtc	
Sg1_DLoopF2	cacagcttgctactattactgc	
Sg1_DLoopR2	caggataatgtatgtagtg	
Slu_DLoopF1	aggacaggcgacatttaagacc	lucio
Slu_DLoopR1	gaagtaggaaccaatgcagg	
Slu_DLoopF2	atacctttaccacaactctgc	
Pcl_DLoopR1	ccacaatagttgtccctcacc	
Pcl_DLoopR2	tcctgttaactctctcattatgc	
Elu_DLoopF1	gaaataactacatcggtctac	cangrejo rojo
Elu_DLoopR1	ccttaagattctagctgctaagg	
Elu_DLoopF2	atgtagtaagaaccgaccaag	
Elu_DLoopR2	aacgagtcgtatggttaacacc	lucio
Ame_DLoopF1	catcacggttattggtgtcagg	
Ame_DLoopR1	ttcagatgggtgttcttaagg	
Ame_DLoopF2	cctaaccatctccatataacc	pez gato
Ame_DLoopR2	agaccacatccctataacc	
Alb_DLoopF1	agtgtgcaagttgtgtgacc	
Alb_DLoopR1	gtaagagaccaccaaccggtcc	
Alb_DLoopF2	tatcatgaatgatagaatcagg	Alburno
Alb_DLoopR2	caccattaccggatgcaagg	
	gaaagagaaccagatacaagg	

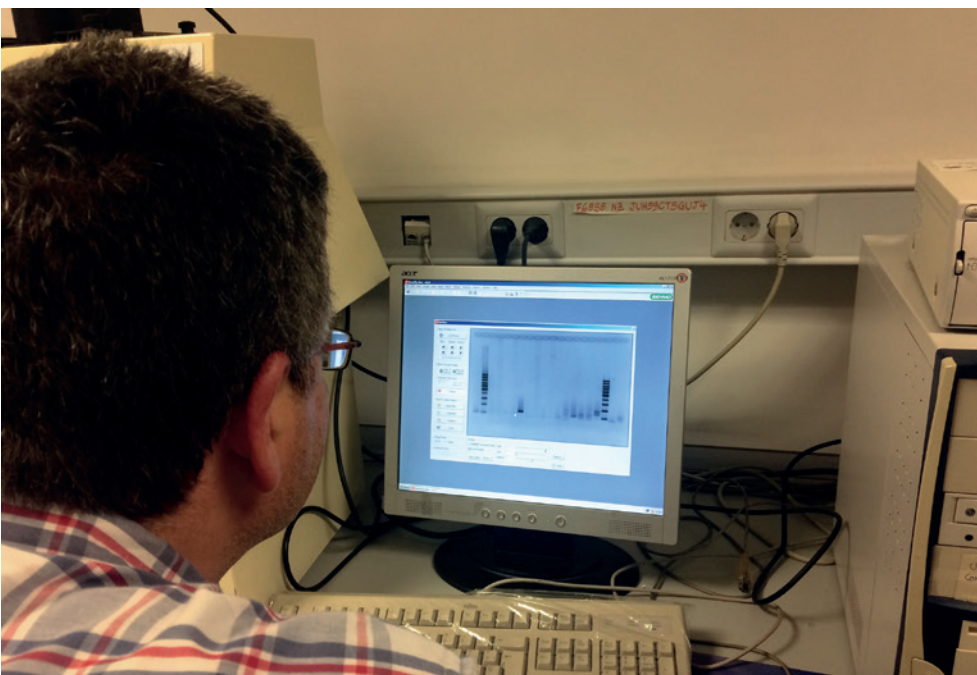


Fig. 6. Secuenciación de ADN

fragmentos de ADN mayores. Existen técnicas para aumentar la detectabilidad del ADN, como enriquecimiento de las dianas por captura o exclusión, PCR anidada, PCR cuantitativa o hibridación con sondas. Estas técnicas para aumentar la detectabilidad de ADN no son nuevas y están bien establecidas en genética forense para, por ejemplo, detectar ADN en la escena de un crimen o incluso secuenciar el genoma de subfósiles (Green et al., 2010). La ventaja de los genéticos forenses es que les llegan muestras de un ambiente donde se sabe que se ha cometido un crimen o tienen el subfósil delante. Están seguros de que la muestra contiene el ADN que buscan. En el caso de la detección de especies acuáticas invasoras no sabemos de su presencia, y además un resultado negativo no indica que la especie buscada no está en un lugar, solo que la muestra tenía su ADN o no se ha podido detectar. Similarmente, la no detección de la especie por métodos tradicionales tampoco tiene que significar que no esté, solo que no se ha visto. El trabajo de laboratorio (y el de campo) basado en ADN es mucho más rápido y quizá más barato que los métodos tradicionales de detección de especies invasoras. Una secuencia de ADN nos podría informar del posible origen de una invasión,

pero no nos informaría de la edad de los animales, lo que sí puede hacer el método de observación directa.

CONCLUSIONES

Los métodos de detección de especies acuáticas invasoras están en su infancia y hay que mejorar los protocolos técnicos. La detección de especies mediante ADN no siempre es preferible o más eficiente que los métodos tradicionales. Se suele admitir la superioridad del ADN basándose en unos pocos estudios comparativos donde generalmente se detecta una especie diana en lugares donde ya se sabía de su existencia (Dejean et al., 2012; Takahara et al., 2013). En realidad, ni siquiera tenemos mucha idea de la probabilidad de detección de una especie en un gradiente de abundancia. Quedan por desarrollar estrategias de muestreo que permitan estimar tasas de detección (Yoccoz et al., 2001; Bohmann et al., 2014).

Si el diseño de muestreo es riguroso, la probabilidad de detección de una especie depende sobre todo de aspectos técnicos en la toma de muestras de agua (Schmidt et al., 2013) y en la amplificación y detección de ADN (Rees et al., 2014). Estas técnicas van mejorando y nuestros conocimientos aumentando según se van multiplicando los estudios. La

mejora de la detectabilidad es crucial para abaratar la toma de muestras de agua en campo y los análisis moleculares en laboratorio, lo que podría permitir un muestreo mayor que aumentase la probabilidad de detección.

Para concluir, las técnicas de detección de ADN de especies acuáticas han demostrado ser una herramienta poderosa y todavía no han desarrollado todo su potencial. No obstante, no es un método milagroso. Antes de decidir utilizar ADN es fundamental conocer sus limitaciones.

REFERENCIAS

- Barnes MA, Turner CR, Jerde CL et al. 2014. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Envir. Sci. Tech.* 48: 1819–1827.
- Deiner K, Altermatt F. 2014. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS One* 9: e88786.
- Dejean T, Valentini A, Miquel C et al. 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *J. Appl. Ecol.* 49: 953–959.
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Letters* 4: 423–425.
- Green RE et al. 2010. A draft sequence of the Neandertal genome. *Science* 328: 710–722.
- Hulme PE. 2006. Beyond control: wider implications for the management of biological invasions. *J. Appl. Ecol.* 43: 835–847.
- Ogram A, Sayler GS, Barkay T. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Meth.* 7: 57–66.
- Rees HC, Maddison BC, Middleditch DJ et al. 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA – A review of eDNA as a survey tool in ecology. *J. Appl. Ecol.* 51: 1450–1459.
- Schmidt BR, Kéry M, Ursenbacher S et al. 2013. Site occupancy models in the analysis of environmental DNA presence/absence surveys: a case study of an emerging amphibian pathogen. *Methods Ecol. Evol.* 4: 646–653.
- Takahara T, Minamoto T, Doi H. 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS One* 8: e56584.
- Turner CF, Barnes MA, Xu CCY et al. 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods Ecol. Evol.* 5: 678–684.