

Uso de los Códigos de Barras de la Vida y líneas base para el biomonitoreo y detección temprana de EEI



Martha Valdez Moreno
Manuel Elías Gutiérrez

Departamento de Ecología y Sistemática Acuática

ESTRATEGIA NACIONAL SOBRE

ESPECIES INVASORAS EN MÉXICO



Contribuir a la conservación
del capital natural y el
bienestar humano a través de
acciones orientadas a la
prevención, el control y la
erradicación de especies
invasoras en México

Desarrollamos nuevas metodologías para el levantamiento rápido de líneas base y técnicas de detección temprana de EEI

Levantamiento rápido de una línea base


Diseñamos dispositivos muy sencillos y mejorando protocolos para la recolecta de ejemplares

Received: 22 May 2017 | Revised: 12 September 2017 | Accepted: 27 November 2017
DOI: 10.1002/ece3.3742

ORIGINAL RESEARCH

WILEY *Ecology and Evolution* Open Access

Improved protocols to accelerate the assembly of DNA barcode reference libraries for freshwater zooplankton

Manuel Elías-Gutiérrez¹  | Martha Valdez-Moreno¹ | Janet Topan² |
Monica R. Young² | José Angel Cohuo-Colli³

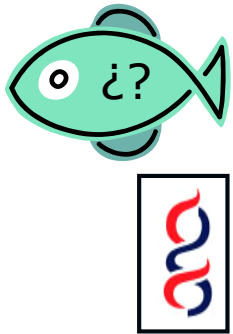
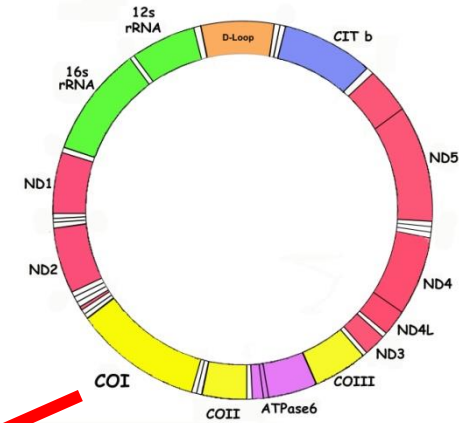


Trampa de Luz

Códigos de barras o Barcode:

Es una pequeña secuencia estandarizada de un gen para la determinación taxonómica de toda la biodiversidad del planeta

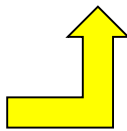
Paul Hebert (2003)



BARCODE



A
G
T
C

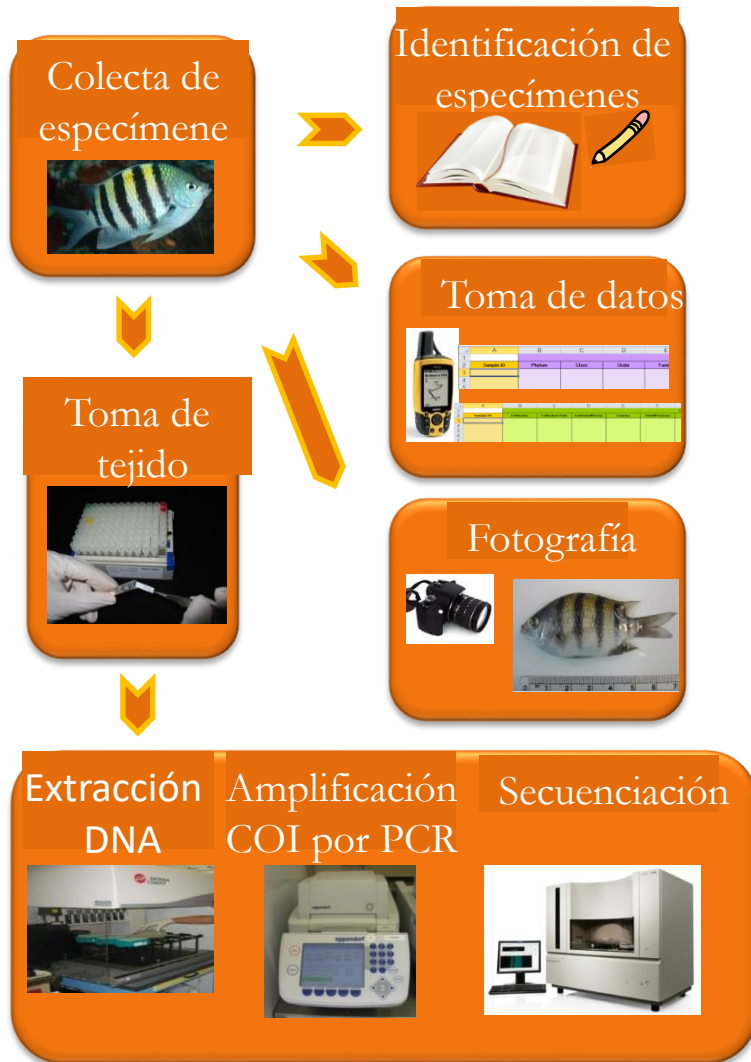


Método de ID

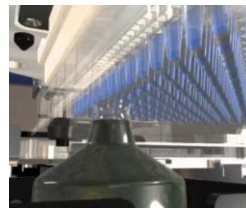


Rocio octofasciata

Método "tradicional" para construcción de la línea base

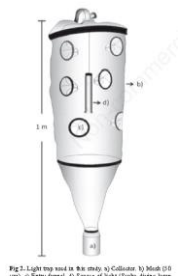


Actualmente esta cambiado

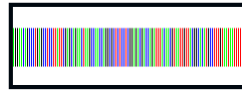


Esto permite secuenciar hasta 90,000 ejemplares en 24 hrs.

bases de datos completas



Códigos de barras

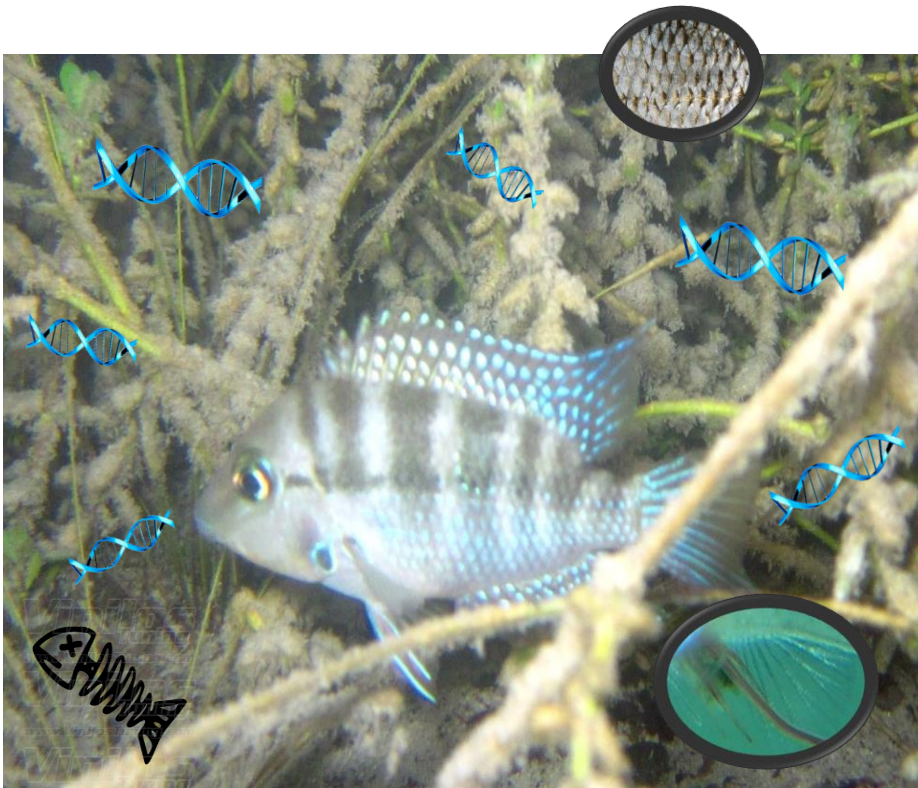


Información de los ejemplares y sus secuencias del ADN en la base de datos

[illegible]

Biomonitoreo con ADN medioambiental o eADN

Es el ADN que puede ser extraído de muestras ambientales sin la presencia directa de los organismos



Primarias	Secundarias
Egestión descarga o expulsión de materiales no digeridos, o comida, por el organismo en forma de heces	Predadores
Excreción acción por la que el organismo excreta sustancias de desecho.	Detritófagos
Secresión	Carroñeros
Exfoliación	Coprófagos
Reproducción	
Descomposición	

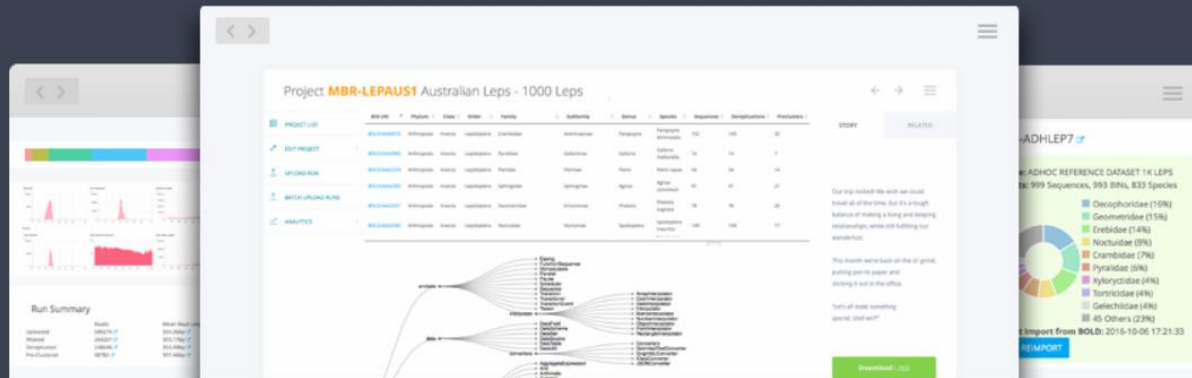


Basado en secuenciadores de siguiente generación



Multiplex Barcode Research And Visualization Environment

mBRAVE is a multi-user platform supporting the storage, validation, analysis, and publication of highly multiplexed projects based on high-throughput sequencing (HTS) instruments. This system builds on the [BOLD Platform](#) to support species identification and discovery for HTS data.

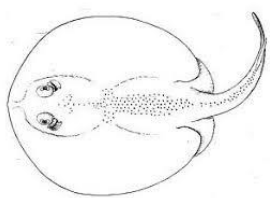
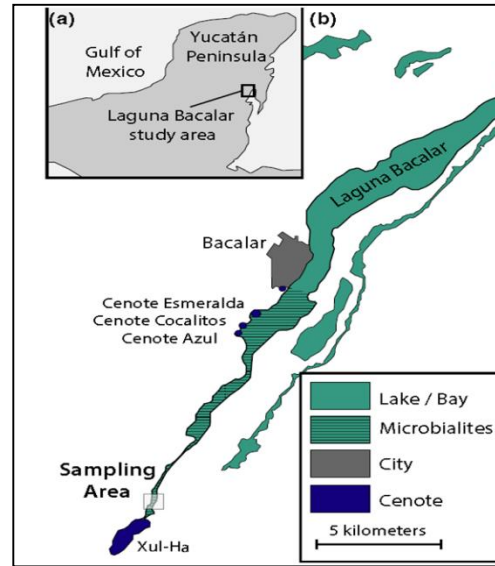


Estos sistemas asociados a nuevas plataformas informáticas que permiten el manejo de millones de secuencias



La laguna de Bacalar es el sistema epicontinental más importante en el sur de Quintana Roo

Alberga a flora y fauna muy importante ...



Elaboración de líneas base



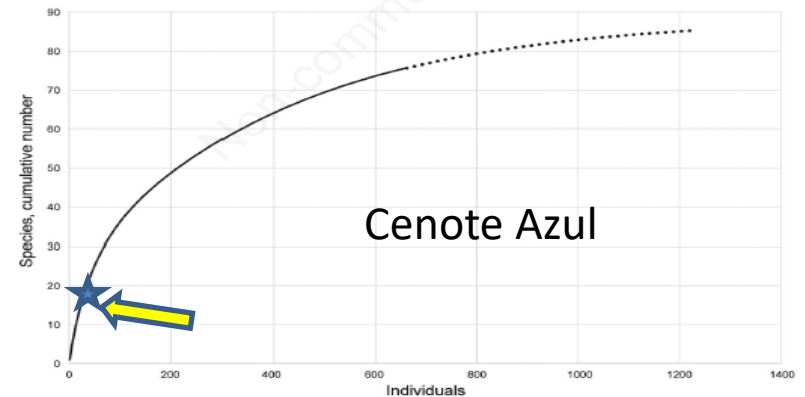
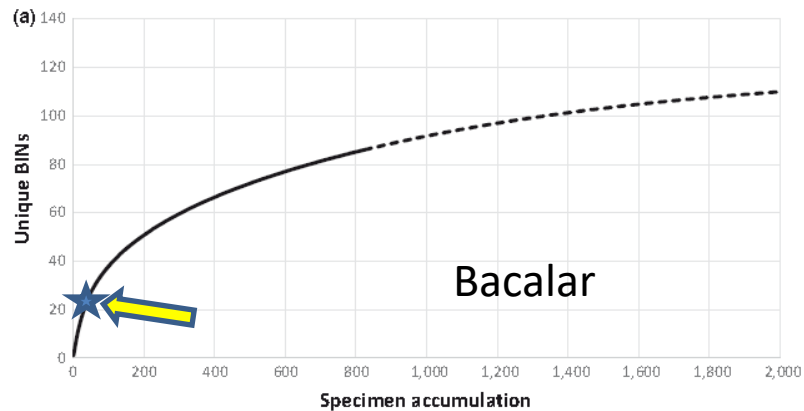
ORIGINAL ARTICLE

Faunistic survey of the zooplankton community in an oligotrophic sinkhole, Cenote Azul (Quintana Roo, Mexico), using different sampling methods, and documented with DNA barcodes

Lucia MONTES-ORTIZ, Manuel ELÍAS-GUTIÉRREZ*

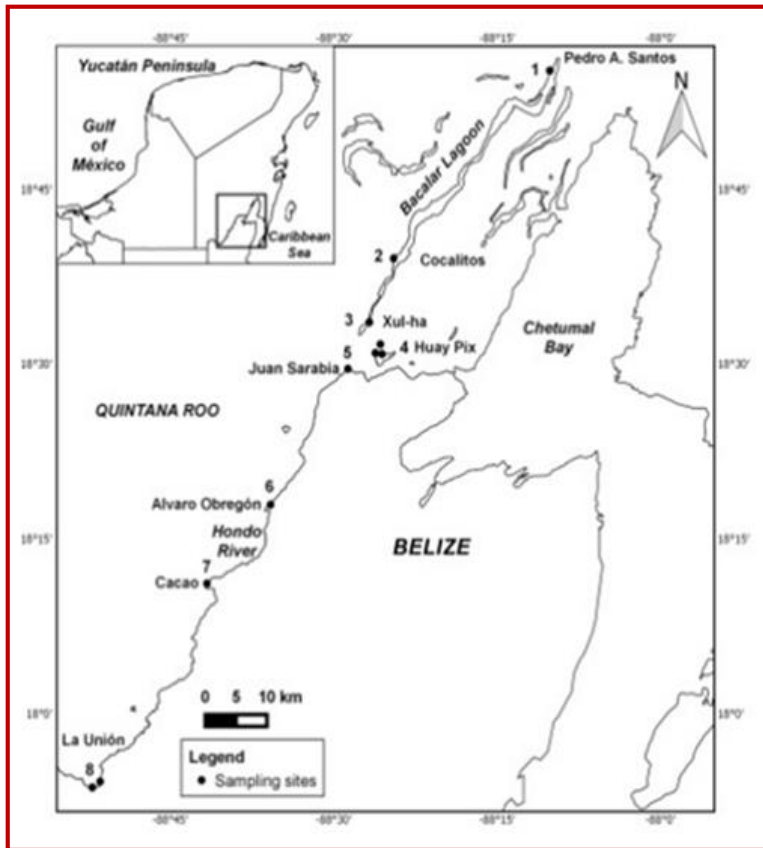
El Colegio de la Frontera Sur, Avenida Centenario Km 5.5, Chetumal 77014, Quintana Roo, Mexico

*Corresponding author: melias@ecosur.mx



El Cenote Azul tiene un poco menos especies porque se considera un ambiente más extremo que Bacalar y NO tiene intercambio de especies con la laguna. La mayoría son diferentes!!!

ADN medioambiental...detección de EEI en Bacalar

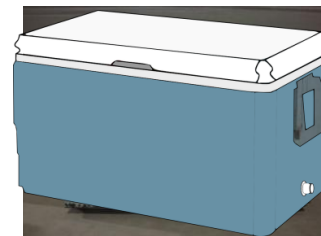


3 replicates



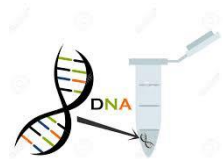
Dic 2015
Ene y Abr 2016

14 litros de agua de las 8 localidades

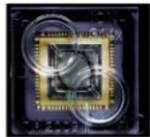


Secuenciación de siguiente generación (NGS)

Region/Primer name	Direction	Primer sequence	Reference
COXI			
AquaF2	F	ATCACRACCATCATYAAATRAARCC	[44]
AquaF3	F	CCAGCCATTTCNCARTACCARACCC	this study
C_FishR1		Cocktail primers (FR1d: FishR2; 1:1)	[45]
FR1d	R	ACCTCAGGGTGTCGAAARAAYCARAA	
FishR2	R	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	
NGS-fusion			
IonA	F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCC[GACT] [IonExpress-MID][specific sequence]	Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific
trP1	R	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT [specific sequence]	Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific



S5



PGM



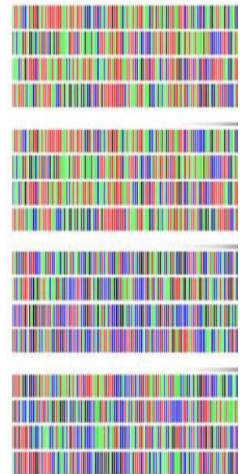
Líneas base

Creamos biblioteca de referencia (DS-EBACALAR) con 3,534 secuenciaciones en BOLD. Representa 53 de los 57 especies de peces registrados para la zona de estudio y 4 más para el resto de vertebrados con datos públicos.



CCTATGACTACAGATAGACT
ATTAAGACTTTTGATAGACA
ATTATGACTACAGATAGACA
GGTATGACTACAGATAAAAC
ATTATGACTACAGATAGACA
TTTATGAAAACAGATAGACA
ATTATGACTACAGATAGACA
ATTATGACCACAGATAGACA
ATTATGACTACAGATAGACG
ATTAAGACTACAGATAGACG
ATTATGACTACAGATAGACA
ATTATGACTACAGATAGACA
CTTATGACTACAGGGGGACA

Lissotriton vulgaris
Triturus cristatus
Pelophylax kl. esculentus
Rana temporaria
Rana arvalis
Pelobates fuscus
Carassius carassius
Carassius auratus
Cyprinus carpio
Scardinius erythrophthalmus
Tinca tinca
Leucaspis delineatus
Perca fluviatilis





272,610 reads

Resultados

OPEN ACCESS PEER-REVIEWED

RESEARCH ARTICLE

Using eDNA to biomonitor the fish community in a tropical oligotrophic lake

Martha Valdez-Moreno , Natalia V. Ivanova  , Manuel Elías-Gutiérrez, Stephanie L. Pedersen, Kyrilo Bessonov, Paul D. N. Hebert

Published: April 22, 2019 • <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215505> • >> See the preprint

Table 3. Number of species recovered from the sediment and water samples.

	Total	Sediments only	Sediments + water	Water only
Actinopterygii	47	0	14	33
Amphibia	1	0	1	0
Reptilia	5	1	1	3
Mammalia	7	2	1	4
Aves	15	2	1	12
Total:	75	5	18	52

A partir de las
secuencias
recuperadas de
eADN



Lista taxonómica... NGS

Order	Top Hit Identification
Acanthuriformes	Bairdiella ronchus 😊
Atheriniformes	Atherinella 😊
Beloniformes	Strongylura notata
	Strongylura timucu
Carangiformes	Oligoplites saurus 😊
Characiformes	Astyanax aeneus
	Astyanax mexicanus
	Bramocharax caballeroi
	Hyphessobrycon compressus
Cichliformes	Cribroheros robertsoni
	Cryptoheros chetumalensis
	Mayaheros urophthalmus
	Oreochromis mossambicus
	Oreochromis niloticus
	Parachromis friedrichsthalii
	Petenia splendida
	Rocio octofasciata
	Thorichthys meeki
	Trichromis salvini
	Vieja fenestrata
	Vieja melanura
Clupeiformes	Dorosoma anale
	Dorosoma petenense 😊
	Engraulidae 😊

Order	Top Hit Identification
Cyprinodontiformes	Belonesox belizanus
	Cyprinodon beltrani
	Floridichthys polyommus
	Gambusia sexradiata
	Gambusia yucatana
	Heterandria bimaculata
	Jordanella pulchra
	Phallichthys fairweatheri
	Poecilia mexicana
	Poecilia petenensis
	Xiphophorus maculatus
Elopiiformes	Megalops atlanticus
Gobiiformes	Bathygobius soporator
	Ctenogobius fasciatus 😊
	Gobiomorus dormitor
	Gobiosoma 😊
	Lophogobius cyprioides 😊
Labriformes	Lachnolaimus maximus
Perciformes	Eugerres plumieri
Siluriformes	Rhamdia laticauda
	Rhamdia guatemalensis
	Sciades assimilis
Synbranchiformes	Ophisternon

Se recuperaron secuencias que pertenecen a 47 especies de 57 reportadas

Nuevos registros



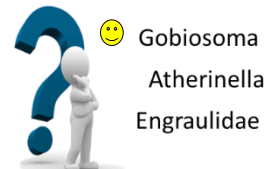
Dorosoma anale



Ctenogobius fasciatus



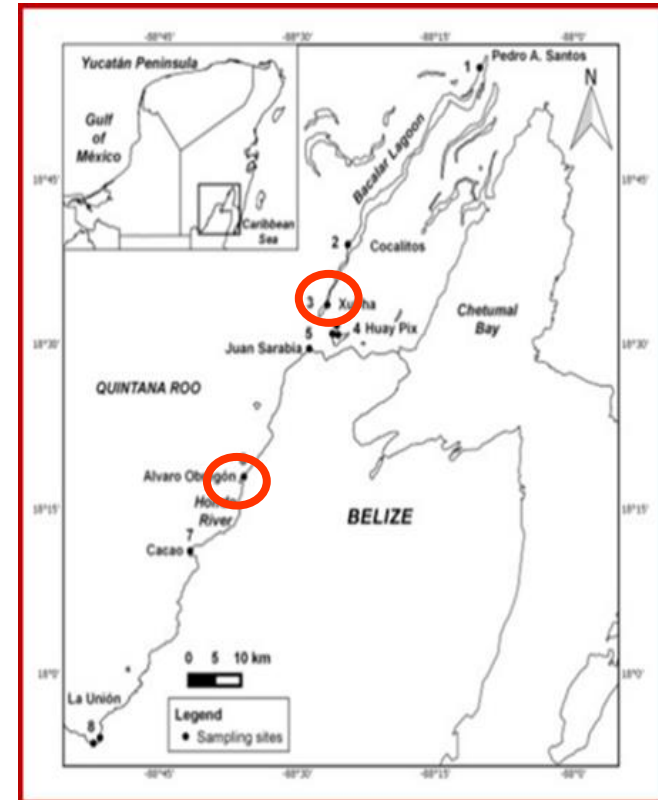
Bairdiella ronchus



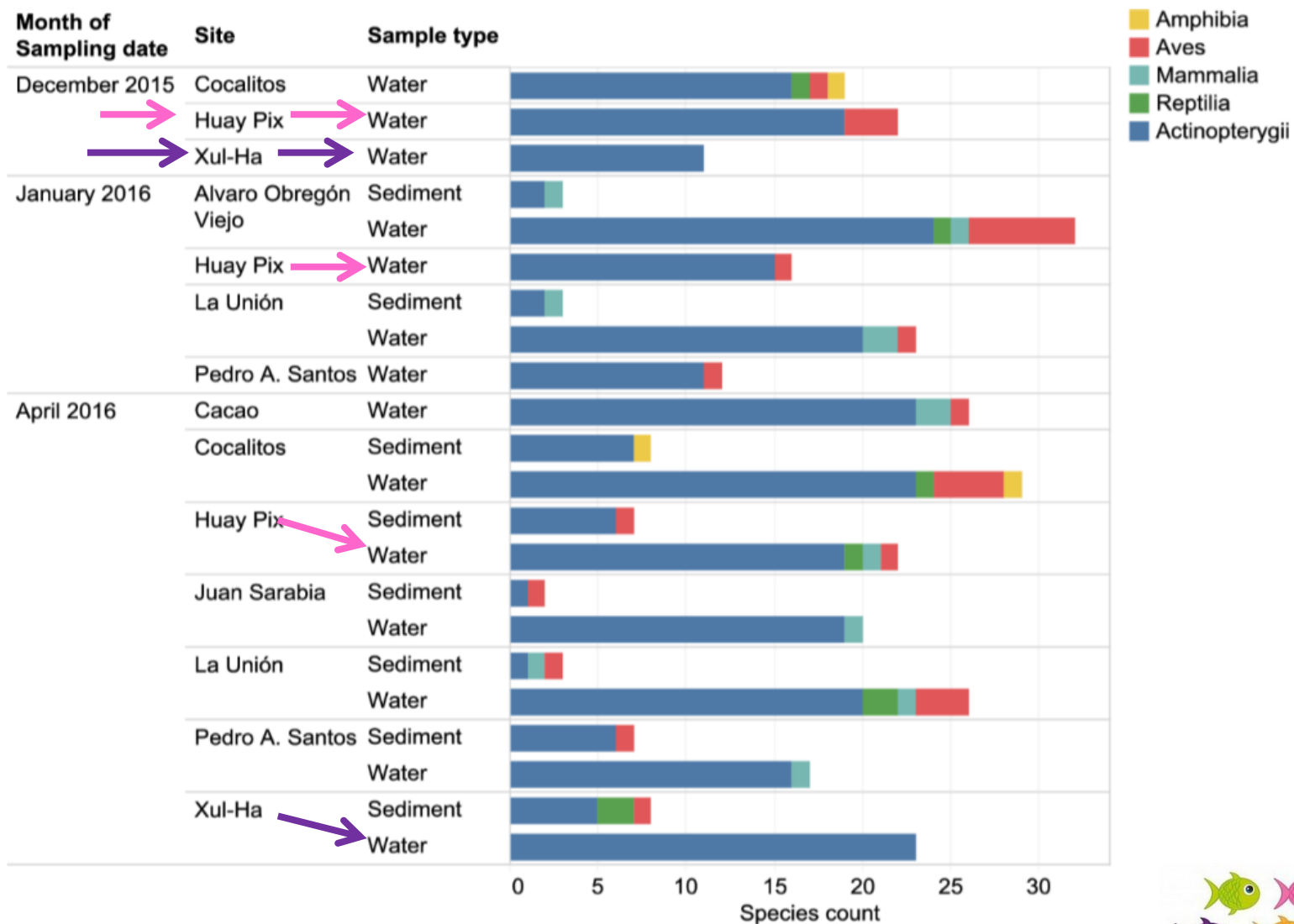
Por zonas...

Table 4. Number of vertebrate species detected at each of the eight sampling sites

Sampling site No	Sampling site	Actinopterygii	Amphibia	Aves	Mammalia	Reptilia
1	Pedro A. Santos / 18.920052°; -88.170100°	18		2	1	
2	Cocalitos / 18.651469°; -88.408948°	24	1	5		1
3	Xul-Ha / 18.560084°; -88.446216°	25		1		2
4a	Huay Pix / 18.514639°; -88.426750°	19		3		
4b	Huay Pix / 18.528561°; -88.429242°	15		1		
4c	Huay Pix / 18.516144°; -88.436876°	19		1	1	1
5	Juan Sarabia / 18.493471°; -88.478857°	19		1	1	
6	Alvaro Obregón Viejo / 18.299259°; -88.597250°	24		6	2	1
7	Cacao / 18.186488°; -88.694636°	23		1	2	
8	La Unión / 17.894676°; -88.870059°	23		4	4	2



Por época...



Otros grupos:



Florisuga mellivora



Patagioenas cayannensis



Megaceryle torquata



Gallus gallus



Porzana carolina



Bufo valliceps



Rhinella marina



Staurotypus triporcatus



Trachemys stejnegeri



*Iguana
iguana*



Tamandua mexicana



Pteronotus parnellii



Oryzomys couesi



Bos taurus



Sus scrofa



Canis lupus



Homo sapiens

Conclusiones



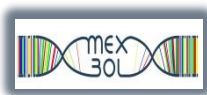
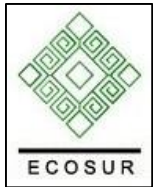
- ❖ El **eADN** es una herramienta sensible para detectar cualquier cambio en la comunidad **de peces** debido a la introducción de una especie exótica o un cambio después de la actividad humana.
- ❖ Todo este sistema se basa en una buena **LÍNEA BASE**, representada por la biblioteca de referencia de código de barras de ADN, en este caso la base de datos **BOLD** juega un papel crítico.
- ❖ Con estas herramientas, tendremos un sistema de biomonitoreo basado en toda la **comunidad de peces, no invasivo**, porque no hay necesidad de recolectar especímenes, y no se basa en una o dos especies de "bandera".
- ❖ Demostramos la utilidad de BOLD junto con las **nuevas tecnologías basadas en eADN y NGS en ecosistemas oligotrófico tropicales por primera vez!!**.
- ❖ El biomonitoreo regular a largo plazo ayudará a comprender no solo si hay algún cambio debido a la actividad humana, sino que también ayudará a ver el efecto del cambio climático en las comunidades acuáticas.



Agradecimientos



Paul Hebert, Nataly Ivanova, Alex Borisenko, Janet Topan, Aníbal Castillo, Evgeny Zakarhov, Constantine Christophoulus, Jacqueline McKeown, Sally Adamowicz, Kate Pérez, Jeremy DeWaard, Sean Prosser, Adriana Radulovici, Monica Young, Susan Mannhardt, Claudia Steinke, Shadi Shokralla.



José Angel Cohuo (Jacc), Lulú Vásquez Yeomans, Miguel Valadez, Rosaura Castro, Fernando Cortés Carrasco



que apoyó nuestra estancia sabática



Estrella Malca y John Lamkin



¡Gracias por su atención!



Martha Valdez Moreno
ECOSUR
Laboratorio de Necton
Email: mvaldez@ecosur.mx
Tel: 8350440 ext. 4307

Manuel Elías Gutiérrez
ECOSUR
Laboratorio de Zooplankton
Email: melias@ecosur.mx
Tel: 8350440 ext. 4313

Biblioteca de Códigos de Barra de la Vida



Ctenogobius fasciatus



ATCTTAC...



Lophogobius cyprinoides



TTTAAAC...



Iguana Iguana



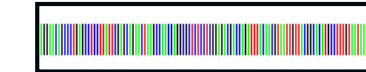
CGCGATT...



Megaceryle torquata



GTACCAA...



AGGACCAAAACCTCCAGTCAGTGAACCTTCGAGTCTGA
AAACAAGTTAATAAATAAATCTTCAACAACGATCTC
TGCTTCTGGCATCGATGAAGACGACGGAATCGGATA
GTAATGTGAATTGCAGATTTCAGTGAATCATCGAATCTT
GAACGCAATTTCGCCCTTGGTATTCGAGGGGATG
TGTTGAGGCTCATTTCAACCTCAAGCTCTGCTTGGTA
TGGGCTCGTCTCCACGACGCGCTTAAGACCTCGG
GGTGGGCTTCTCTCAAGGTAGTAGAAGACCTCGC
TTGGAGCGACGCGCTCGCCGCGGACGAACCTTTGAA
TATTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCATCGAAGTTTGA
AAGTAAGAAAGTTTCTCTCGCTGCACGCGCTGGGT
CTGGGTGCTGGGTGCTGGGTGCTGGGTCCCGACTCAA
TTGCTTATCGCTTCGGTGGGGCATTTTGGTGGTGG
TTGGCCGCGCTAAGCTCTGTTGGGCTCGGCAAAATGT
GCACTGGTTTTTTTGGACCGCGCTGGGACCGAAGCG
HCCCTCGCCAGACAGCCACGATGTGGACGAGACG



ATCTTAC...



GGGTTTA...



Otra especie...



¿Para que se usa el ADN medioambiental ?

- ❖ Detección de especies (diferentes taxones)....Líneas base
- ❖ Método genético no invasivo
- ❖ Principalmente en lugares donde la recolección de todos los organismos es difícil
- ❖ Detección de especies raras, exóticas.
- ❖ Investigación
- ❖ Conservación
- ❖ Manejo
- ❖ Genética de poblaciones
- ❖ Estimación del tamaño poblaciones



"Conservation in a cup of water"
(Lodge et al. 2012)

Avances rápidos en la tecnología y el continuo bajo en los costos en el procesamiento del ADN...ha hecho que esta técnica en los últimos años sea considerada como una buena alternativa para realizar biomonitoreos



Le entro o no le entro...esa es la cuestión...



Ventajas

Herramienta monitoreo ambiental

Detecta múltiples sp. u objetivo

Detecta especies exóticas o raras

No es invasivo

No daña a los organismos

Bajo esfuerzo

Muy sensitivo

Costo...

Pero...



Desventajas

Solo ADN mitocondrial

No detecta híbridos

No da información de Sexo, edad, talla.

No abundancia

Esta vivo o muerto

Debe existir una línea base o biblioteca de referencia de las especies que habitan el lugar

Web of Science

Showing 637 records for TEMA: (eDNA) AND TEMA: (environmental DNA)

[Create Citation Report](#)

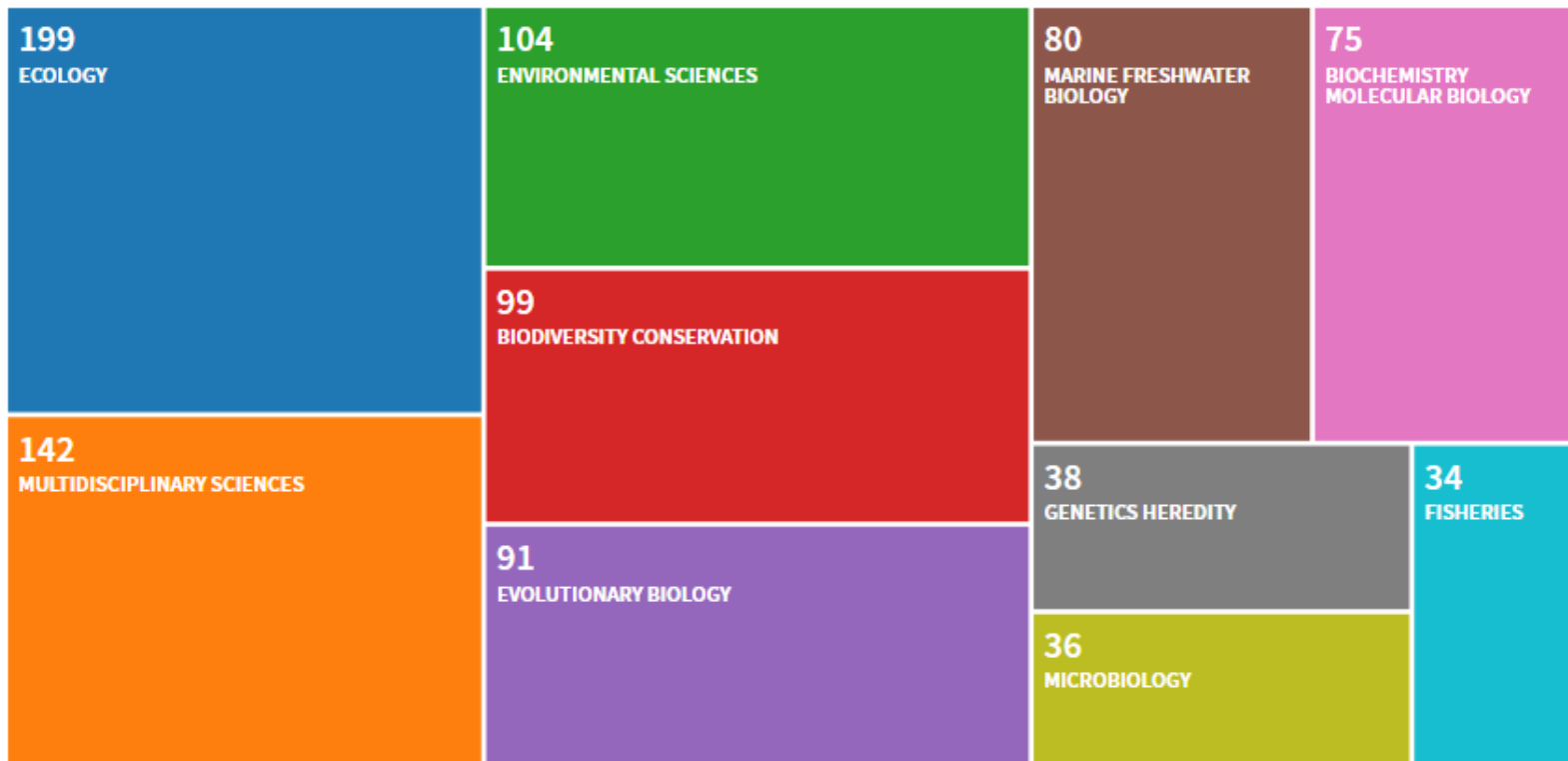
31/03/2019

Visualization **Treemap**

Number of results **10**

[Download](#)

[Hide](#)



Showing 426 records for Tema: (eDNA) AND Tema: (environmental DNA)

11/2018



Podemos competir?.....no lo sé



STREAM project team in the kick off workshop in ECCC facilities, Vancouver, BC

STREAM (Sequencing The Rivers for Environmental Assessment and Monitoring), is a new community-based project which involves DNA metabarcoding analysis of bulk benthic samples from rivers across Canada. Led by the Hajibabaei lab at CBG, STREAM was recently granted \$2.6M from Genome Canada (Ontario Genomics) and collaborators

CORE FUNDING – The Canada First Research Excellence Fund will provide \$7.5 million over the next three years. Most of these funds will sustain the development of BOLD, mBRAVE, and the CBG's sequencing platform, but \$1.5 million will support large-scale Malaise projects. PI - Paul Hebert

ARCBIO – Polar Knowledge Canada will provide \$1.8 million to advance the construction of a DNA barcode reference library for the biota of arctic Canada. PI - Paul Hebert

En conocimiento y actualidad posiblemente si.....en financiamiento nunca