Conceptos básicos de técnicas moleculares para DNA barcoding y metabarcoding

Dra. Mariana Cosse

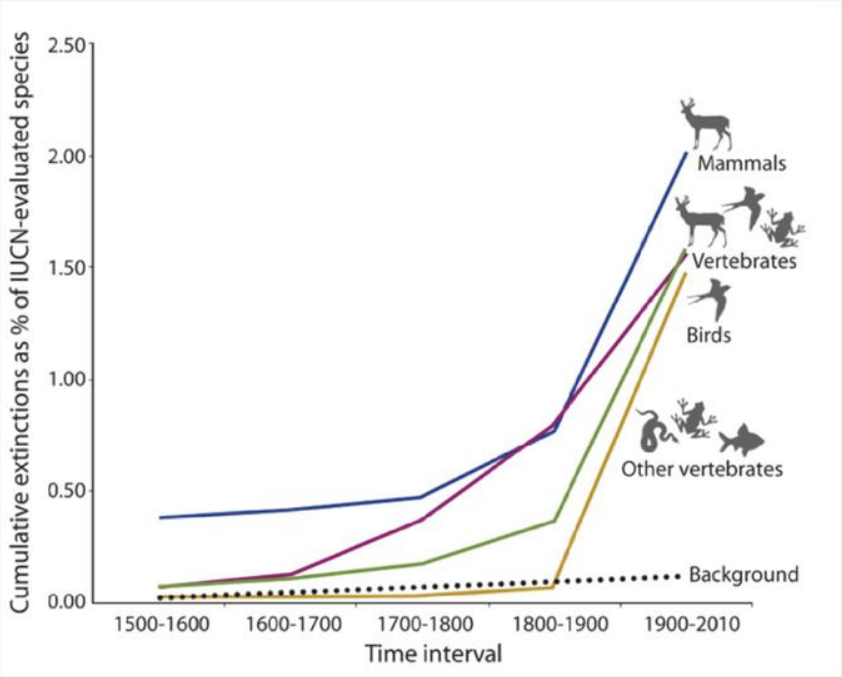
Barcoding y metabarcoding: oportunidades y desafíos para la caracterización de la biodiversidad

Grupo de Ecología Molecular
Depto. Biodiversidad y Genética

iibce
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE

cica centro de investigación en ciencias ambientales

Desafíos para la conservación de la biodiversidad



Especies vertebradas acumulativas registradas como extintas o extintas en estado salvaje por la UICN (2012). La curva negra punteada representa el número de extinciones previstas con una tasa de fondo estándar constante de 2 E/MSY. Estimación conservadora. Tomado de Ceballos et al. 2015.

Antropoceno: a nivel global la pérdida de biodiversidad presenta tasas similares a las de la última extinción masiva

Ceballos, et al. 2015
Johnson, et al. 2017

Barcoding de ADN

1.
2.
3.
4.

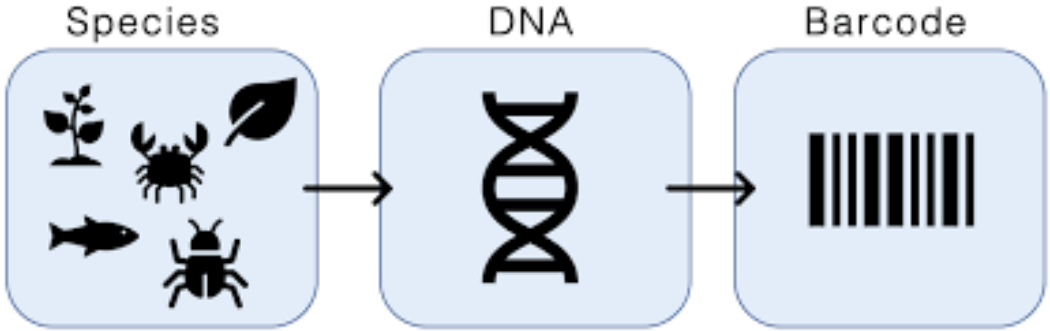
THE ROYAL SOCIETY

Received 29 July 2002
Accepted 30 September 2002
Published online 8 January 2003

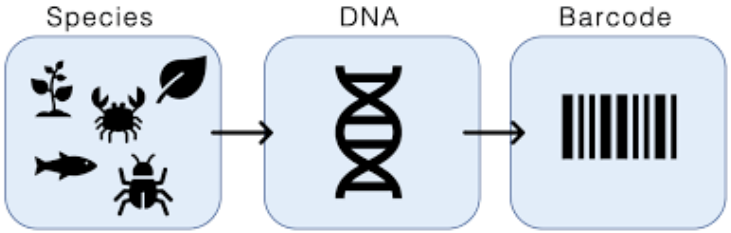
Biological identifications through DNA barcodes

Paul D. N. Hebert*, Alina Cywinska, Shelley L. Ball and Jeremy R. deWaard

Department of Zoology, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada

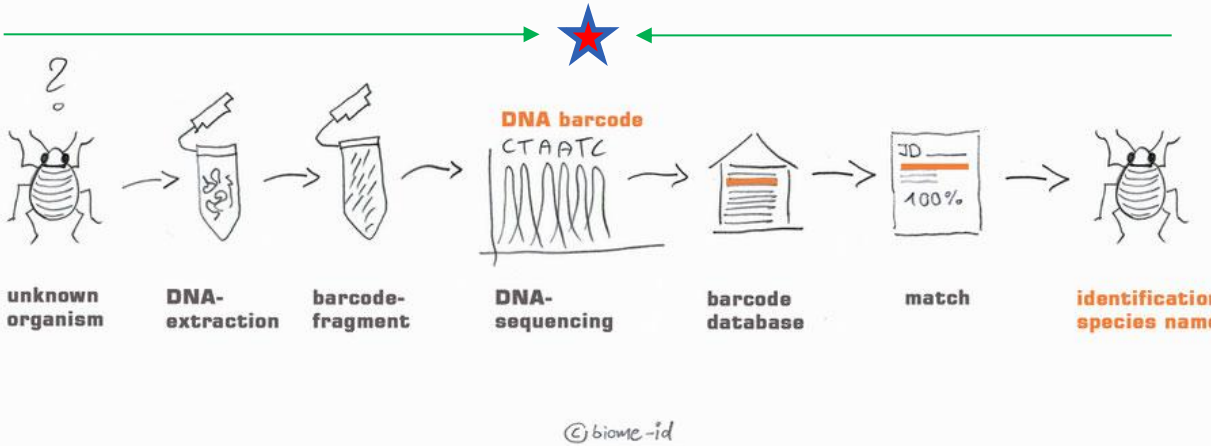


Barcoding de ADN

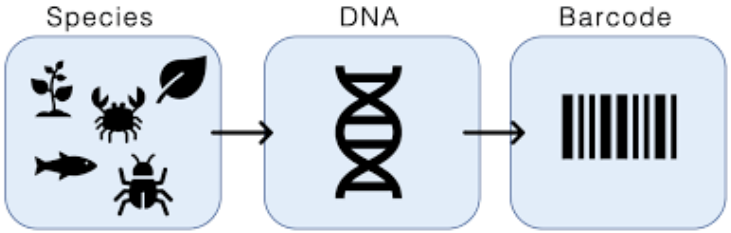


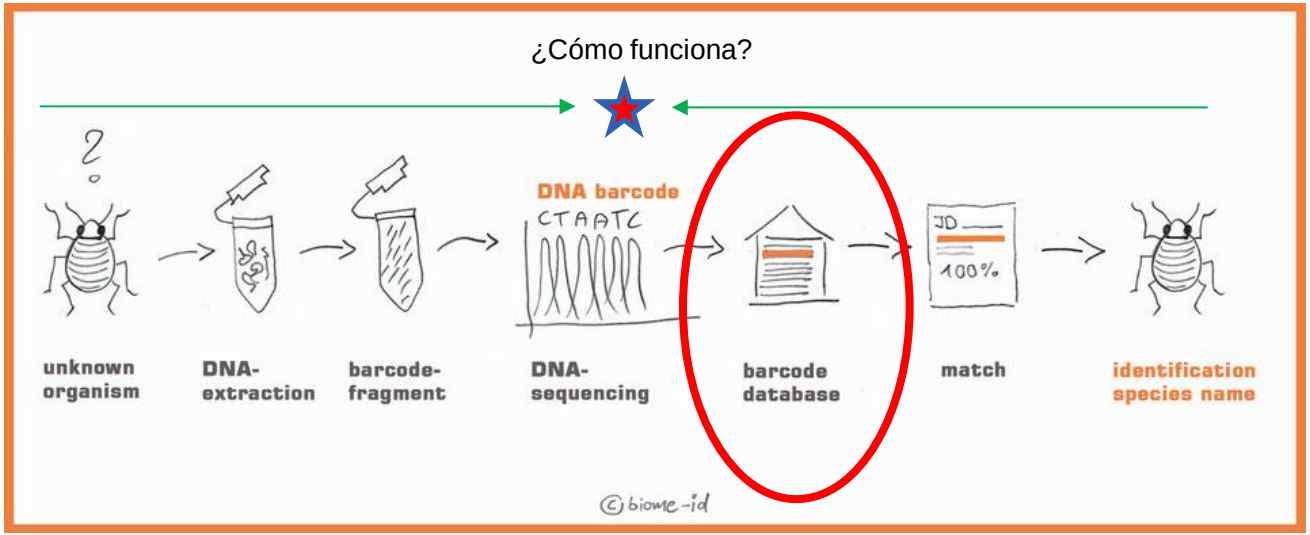
Carácteres morfológicos
Región corta de ADN

¿Cómo funciona?



Barcoding de ADN

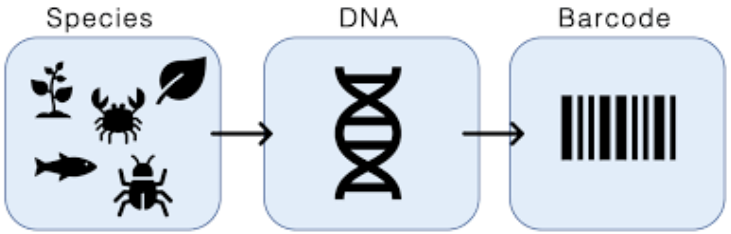




Barcoding de ADN

Bases de referencia

- Voucher en colección pública con determinación taxonómica
- Datos de colecta: fecha y localidad
- Secuencia tipo barcode en base pública



Barcoding de ADN

12,633K	247K	72K	24K
Barcodes	Animal Species	Plant Species	Fungi & Other Species

BASE DE DATOS GLOBAL

1123	249	27	40

URUGUAY

Consorcio de Barcoding-Uruguay

2014
Iniciativa gubernamental
Cooperación con EEUU
Iniciativa Biblioteca de la Vida

2017-2018
Fondos concursables p/curso nacional de barcoding

SET 2018
1ra Reunión con interesados en el nodo nacional

Consorcio de Barcoding-Uruguay

Capacitación

Marzo 2023:
Viajaron siete jóvenes investigadores
Lab. de Paul Hebert, Centro de Genómica de la Biodiversidad, UoG
Udelar: Fac. Ciencias, Fac. Agronomía
MEC: IIBCE, MNHN;
DINABISE-MA, LATU, INIA

IDRC · CRDI
Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo

ANII AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

Consorcio de Barcoding-Uruguay

Introduction to DNA Barcoding

Llevaron más de 1500 especímenes, 500 especies colectadas por 47 investigadores.

Entre un 60-70% éxito en la secuenciación.

Proyecto colaborativo, generando sinergias, abierto y público

IDRC · CRDI

Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo

ANII AGENCIA NACIONAL DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN

Consorcio de Barcoding-Uruguay

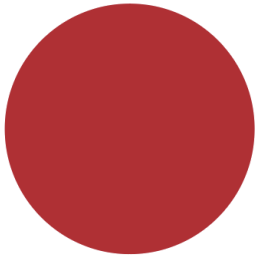
1.
2.
3.
4.

Colecciones y taxónomos

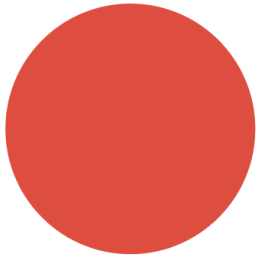
Proyectos

Capacitación

Colecciones botánicas



MVM
100000 specimens



MVFA
100000 specimens

MVJB
60000 specimens

MVFQ
10000 specimens

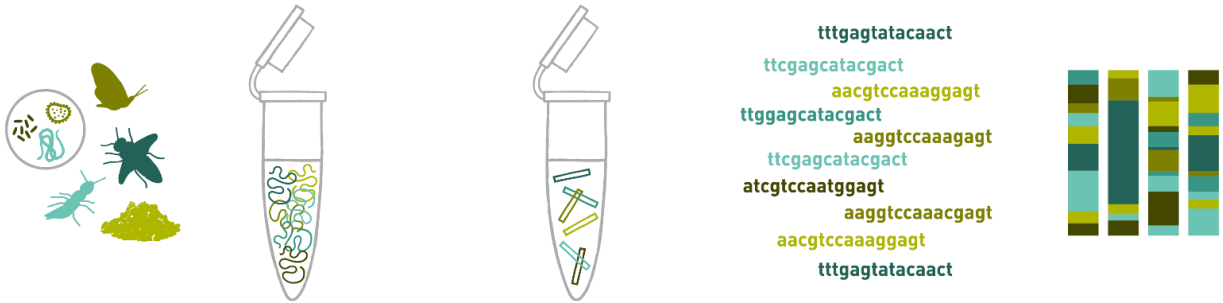
MVHC
5000 specimens

el óptimo
New York Botanical Garden

Barcoding de ADN

BARCODING & METABARCODING

1 › 2 › 3 › 4



Base de referencia

Herramienta potente para avanzar en la descripción de la biodiversidad.

Revolución para los inventarios de biodiversidad

Puntapié inicial y fundamental para la comprensión de las interacciones ecológicas en los ecosistemas

METABARCODING

2 › 3

tttgagtatacaact
ttcgagcatacgact
aacgtccaaaggagt
ttggagcatacgact
aaggtccaaagagt
ttcgagcatacgact
atcgtccaatggagt
aaggtccaaacgagt
aacgtccaaaggagt
tttgagtatacaact

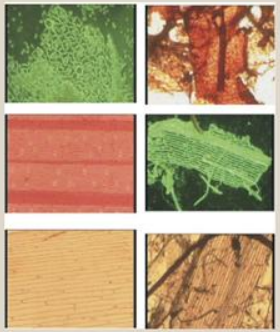
MULTIPLES APLICACIONES

- Inventarios de biodiversidad
- Trazabilidad alimentaria
- Detección de especies amenazadas
- Etc.

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN

De Sousa et al. 2019

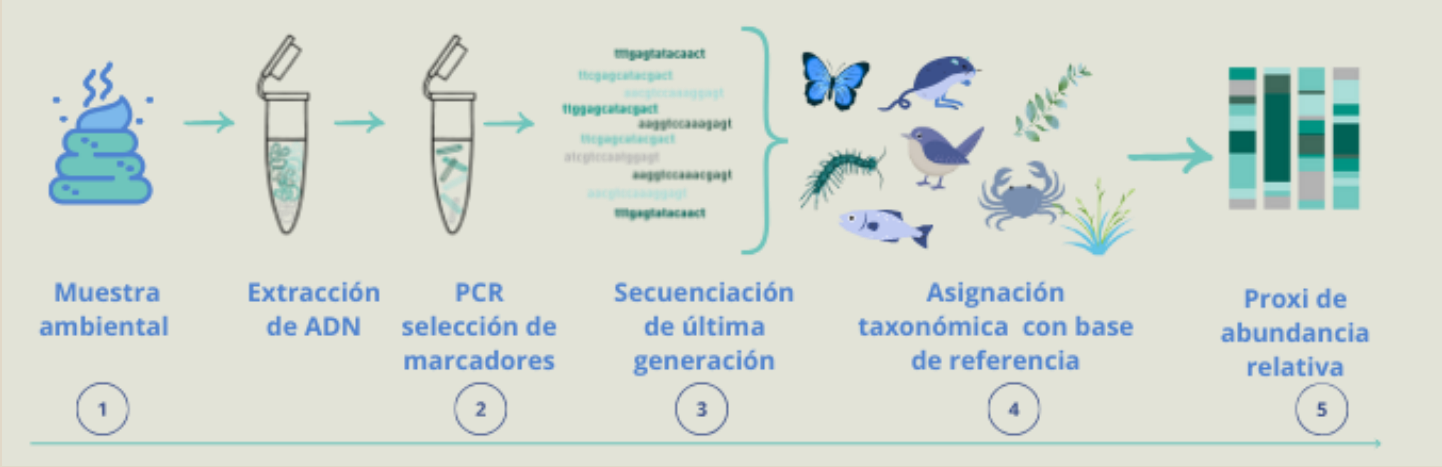
Ozotoceros bezoarticus venado de campo



Estudios de posgrado en venado de campo:

- Demografía
- Dieta por microhistología
- Uso del ambiente con radiocollares
- Análisis de microsatélites para establecer estructura de los grupos

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: *aprendizajes metodológicos*



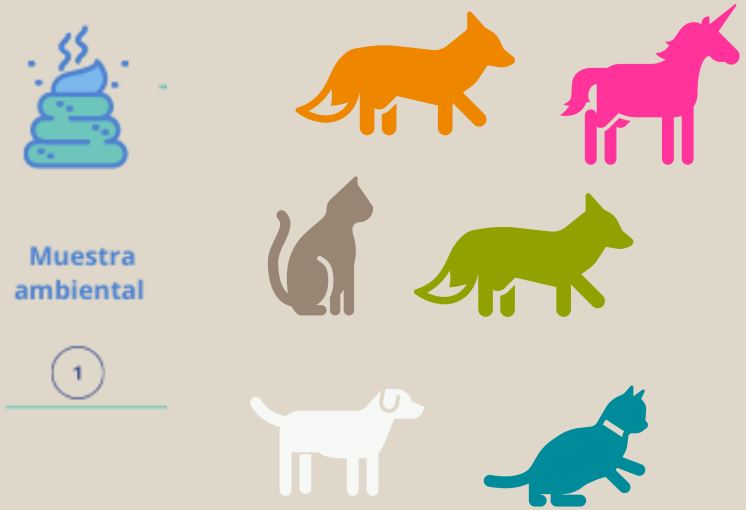
1. Asignación taxonómica de muestra ambiental
2.Cebadores universales: COI; vertebrados 12S; roedores: Cit-B; plantas: trnL e ITS
3. Bloqueadores de amplificación de especies predadoras
4. Asignación taxonómica
5. Métodos de estimación de la dieta a partir de las lecturas obtenidas

Patrones tróficos de mesocarnívoros simpátricos: ecología molecular

Material y métodos

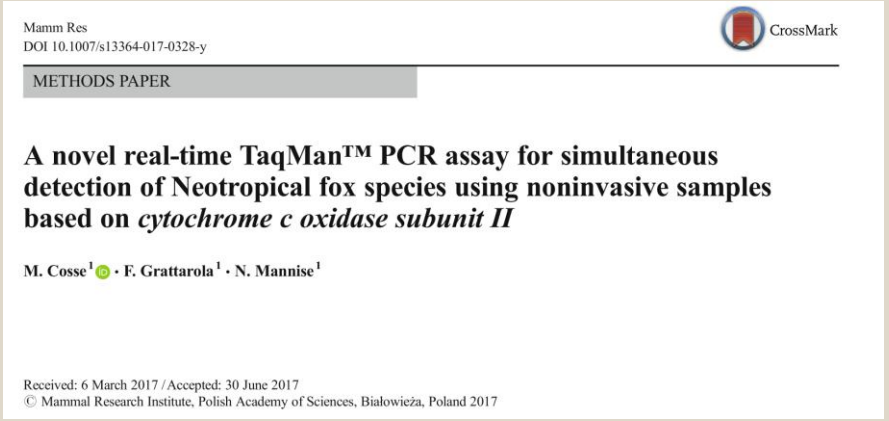
Metabarcoding: aprendizajes metodológicos

Desarrollo de SONDAS: determinación de especies de cánidos y felinos por PCR-RT



Cebadores y sonda COII para:

Cerdocyon thous
Lycalopex gymnocercus
Canis lupus familiaris
Leopardus geoffrogyi
Leopardus widii
Felis catus


Mamm Res
DOI 10.1007/s13364-017-0328-y

CrossMark

METHODS PAPER

A novel real-time TaqMan™ PCR assay for simultaneous detection of Neotropical fox species using noninvasive samples based on *cytochrome c oxidase subunit II*

M. Cosse[1] · F. Grattarola[1] · N. Mannise[1]

Received: 6 March 2017 / Accepted: 30 June 2017
© Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences, Białowieża, Poland 2017

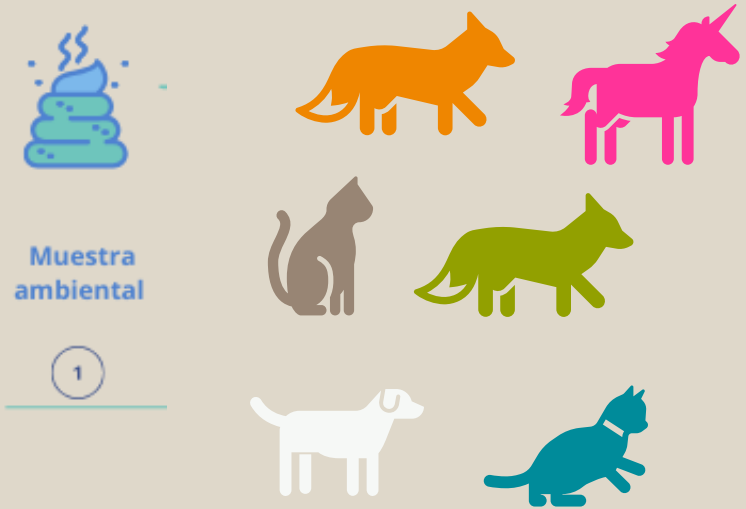
- Extracción con QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit

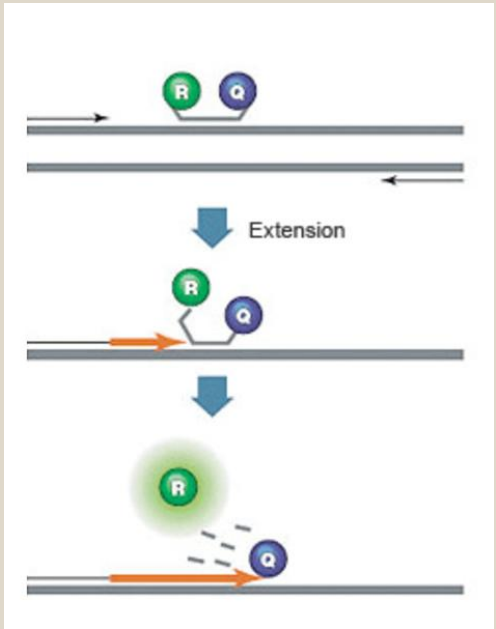
Patrones tróficos de mesocarnívoros simpátricos: ecología molecular

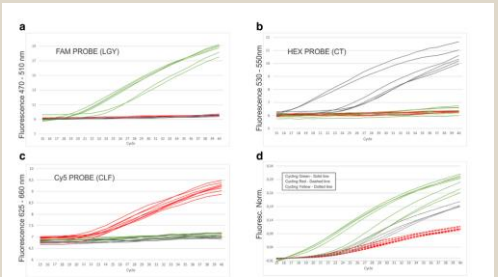
Material y métodos

Metabarcoding: aprendizajes metodológicos

Desarrollo de SONDAS: determinación de especies de cánidos y felinos por PCR-RT

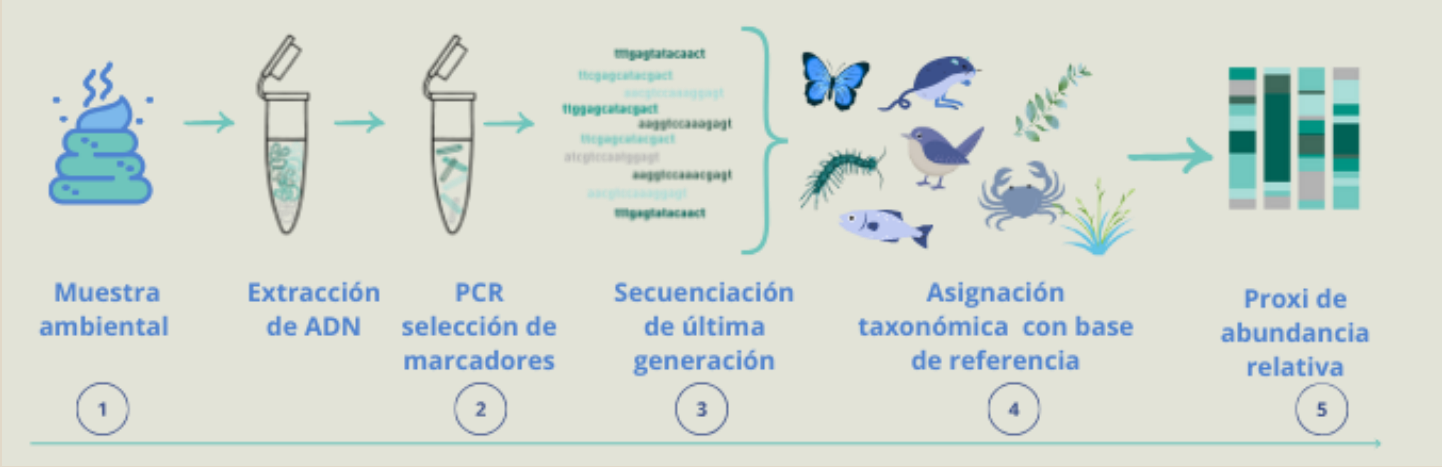






- Extracción con QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: *aprendizajes metodológicos*



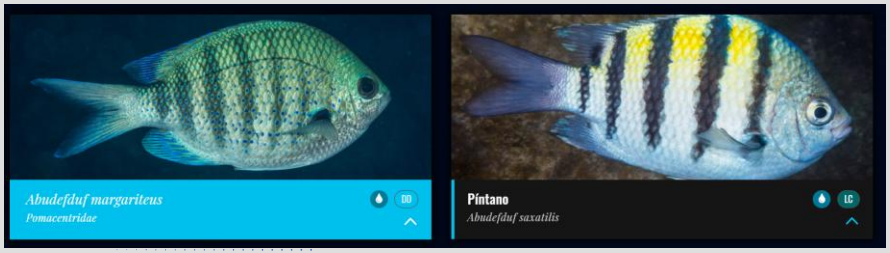
1. Asignación taxonómica de muestra ambiental
2.Cebadores universales: COI; vertebrados 12S; roedores: Cit-B; plantas: trnL e ITS
3. Bloqueadores de amplificación de especies predadoras
4. Asignación taxonómica
5. Métodos de estimación de la dieta a partir de las lecturas obtenidas

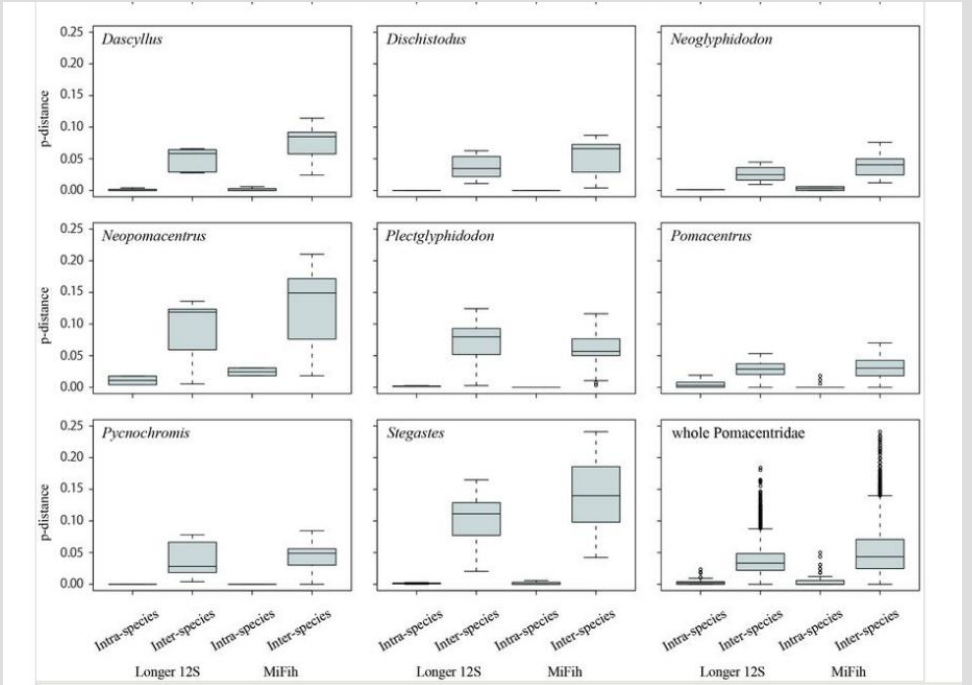
01. Dinámica de poblaciones y ecología trófica

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: aprendizajes metodológicos

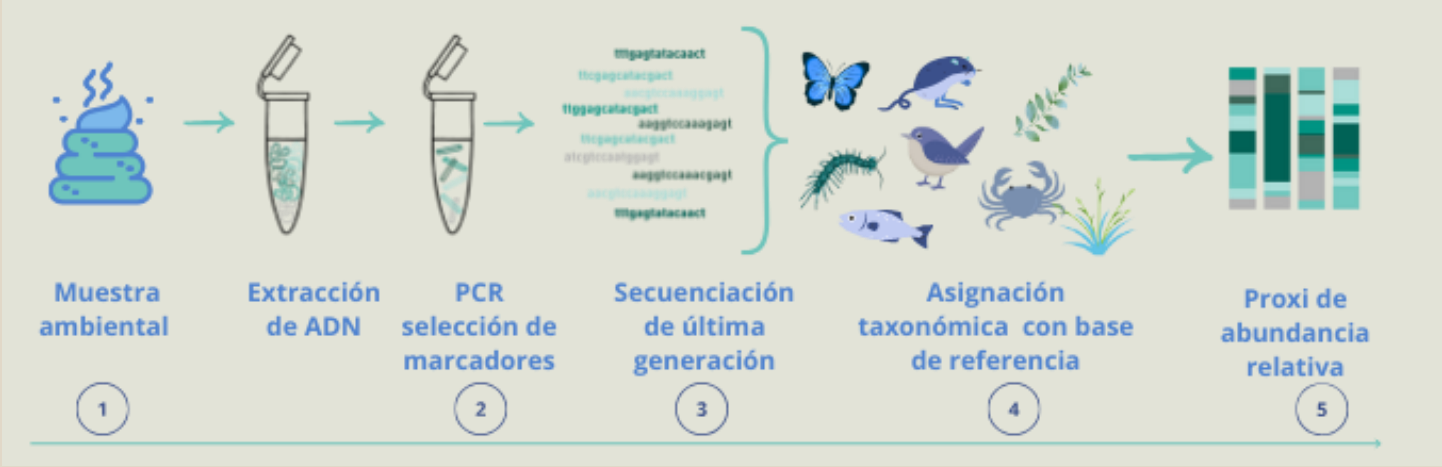
Yamamoto, T., K. Tachihara, and M. Toda. 2024. Examination of sequence variations in partial mitochondrial 12S gene amongst damselfish species as references for DNA barcoding. Biodiversity Data Journal **12**:e126744.

Variación
Dentro y entre especies
en secuencias de distinto largo en la region 12S
Peces del género Pomacentridae





Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: *aprendizajes metodológicos*



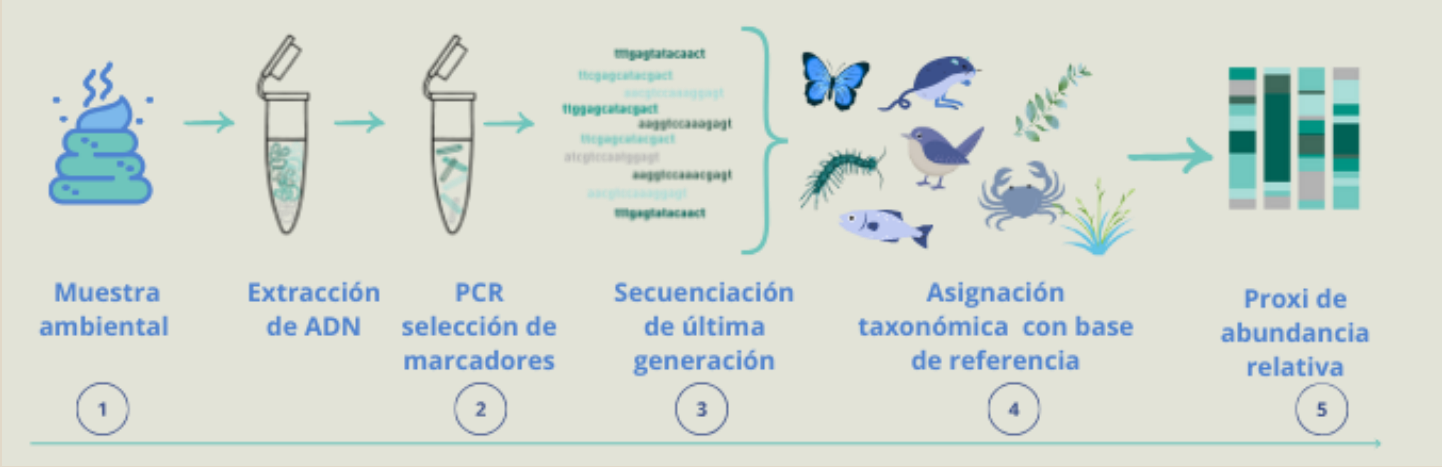
1. Asignación taxonómica de muestra ambiental
2.Cebadores universales: COI; vertebrados 12S; roedores: Cit-B; plantas: trnL e ITS
3. Bloqueadores de amplificación de especies predadoras
4. Asignación taxonómica
5. Métodos de estimación de la dieta a partir de las lecturas obtenidas

01. Dinámica de poblaciones y ecología trófica

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: aprendizajes metodológicos

Plataforma de Secuenciación Masiva IIBCE (MEC)- Ion GeneStudio™ S5 System

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: *aprendizajes metodológicos*



1. Asignación taxonómica de muestra ambiental
2.Cebadores universales: COI; vertebrados 12S; roedores: Cit-B; plantas: trnL e ITS
3. Bloqueadores de amplificación de especies predadoras
4. Asignación taxonómica
5. Métodos de estimación de la dieta a partir de las lecturas obtenidas

01. Dinámica de poblaciones y ecología trófica

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: aprendizajes metodológicos

Secuenciación de última generación

Asignación taxonómica con base de referencia

Cebadores COI

Secuenciación de última generación

Asignación taxonómica con base de referencia

Cebadores vertebrados:
12S; Cit-b

Las lecturas “reads” obtenidos pueden corresponder a la especie “hospedadora” en una frecuencia del 90%: desarrollo de BLOQUEADORES

Boessenkool, S., L. S. Epp, J. Haile, E. Bellemain, M. Edwards, E. Coissac, E. Willerslev, and C. Brochmann. 2012. Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA. Mol Ecol **21**:1806-1815.

Vestheim, H., B. E. Deagle, and S. N. Jarman. 2011. Application of blocking oligonucleotides to improve signal-to-noise ratio in a PCR. Methods Mol Biol **687**:265-274.

01. Dinámica de poblaciones y ecología trófica

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: aprendizajes metodológicos

Desarrollo de BLOQUEADORES: zorros, felinos y aves marinas. Ej. aves marinas

Pygoscelis papua
Pygoscelis adeliae
Himantopus mexicanus melanurus

Cebadores COI

#BlockCOISeaBird5_3-
C3GCATTYCCCCGYATAAAYAACATAAGCTTCTGACTACTACC

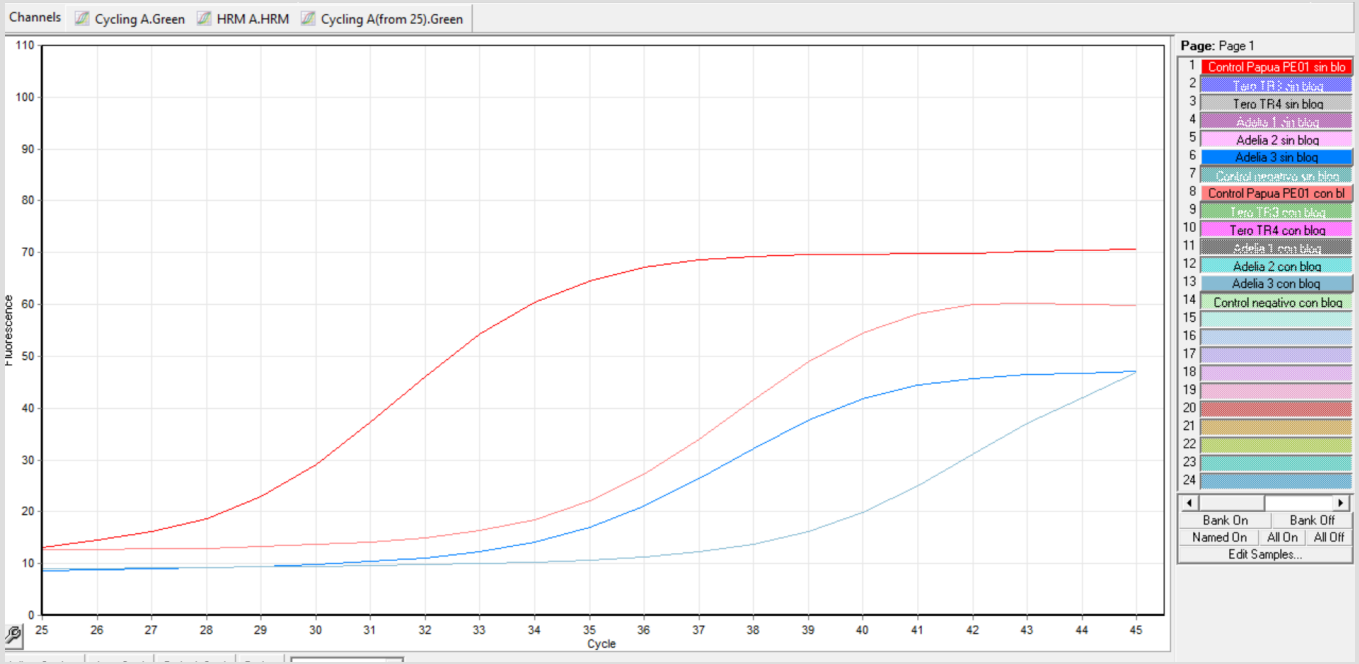
01. Dinámica de poblaciones y ecología trófica

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: aprendizajes metodológicos

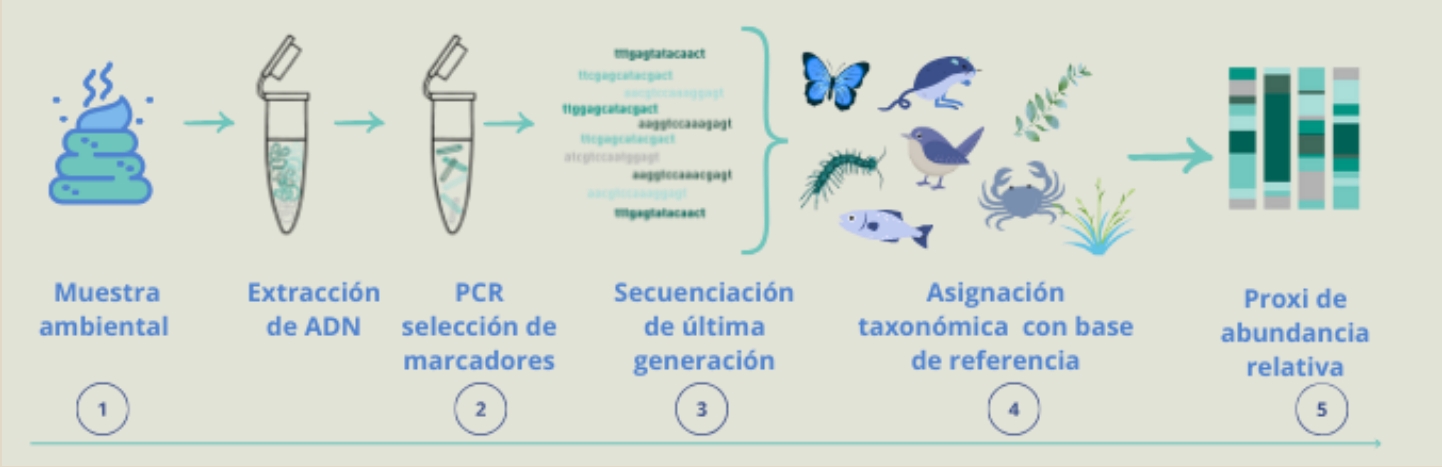
Desarrollo de BLOQUEADORES, ej. aves marinas

Pygoscelis papua
Pygoscelis adeliae
Himantopus mexicanus melanurus

Cebadores COI



Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: *aprendizajes metodológicos*



1. Asignación taxonómica de muestra ambiental
2.Cebadores universales: COI; vertebrados 12S; roedores: Cit-B; plantas: trnL e ITS
3. Bloqueadores de amplificación de especies predadoras
4. Asignación taxonómica
5. Métodos de estimación de la dieta a partir de las lecturas obtenidas

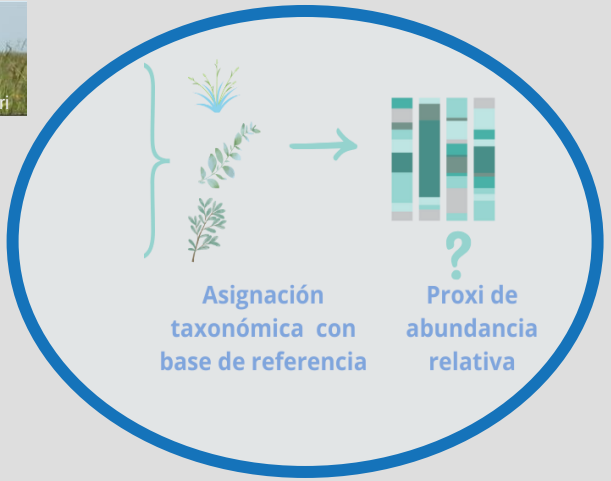
01. Dinámica de poblaciones y ecología trófica

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: aprendizajes metodológicos

BC63_BC64_M2
Paspalum dilatatum
Cyperus reflexus
Poa lanígera
Nassella neesiana
Desmodium incanum
Chevreulia sarmentosa
Dichondra sericea
Piptochaetium stipoides
Richardia humistrata
Juncus imbricatus

Selección de especies

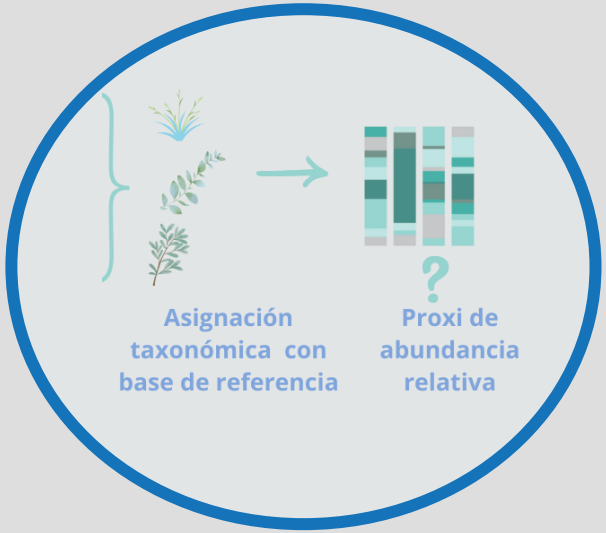
Igual masa seca por especie



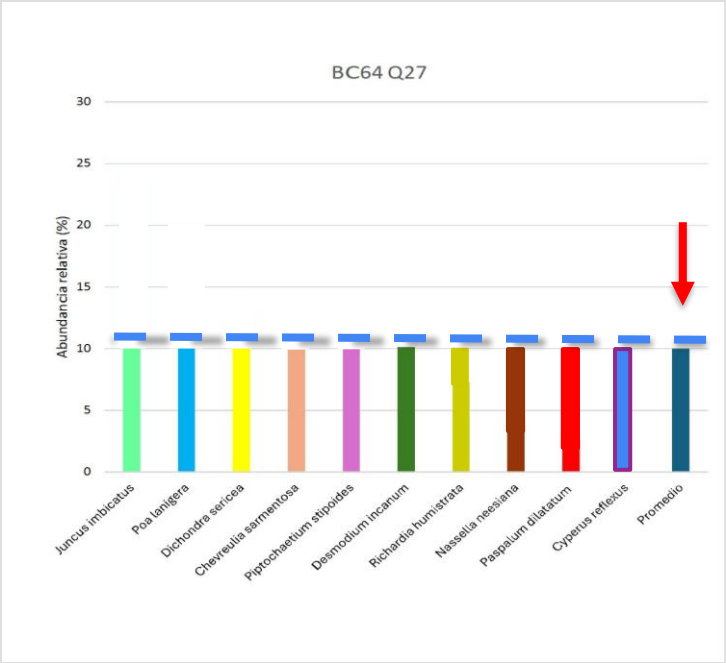
Abundancia relativa de lecturas: comunidades simuladas o mock communities

01. Dinámica de poblaciones y ecología trófica

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: aprendizajes metodológicos

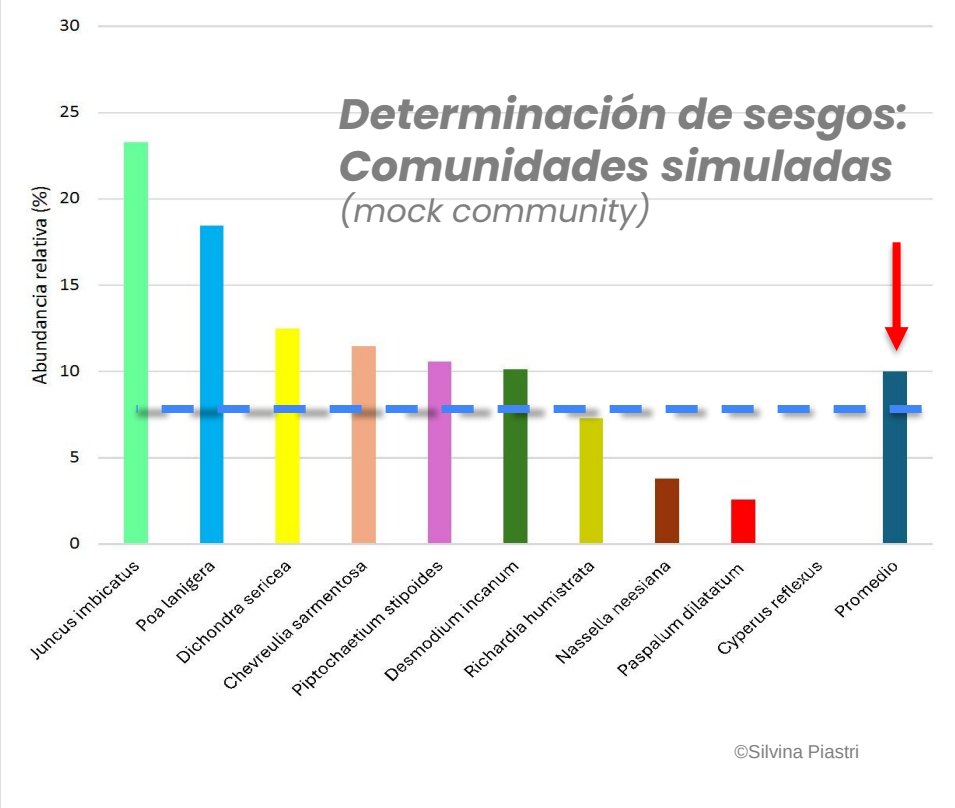


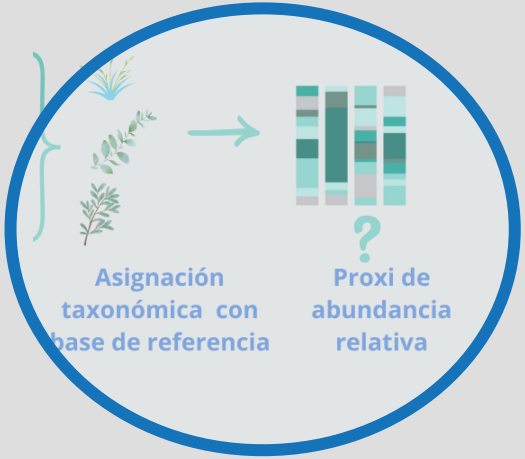
- Comunidades simuladas (Mock)



01. Dinámica de poblaciones y ecología trófica

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: aprendizajes metodológicos





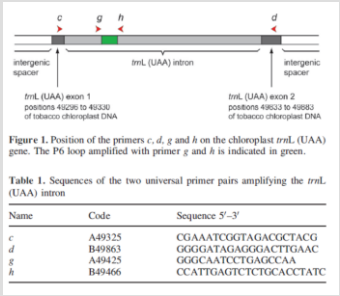
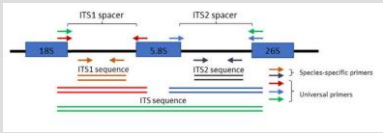


Figure 1. Position of the primers *c*, *d*, *g* and *h* on the chloroplast *trn*L (UAA) gene. The P6 loop amplified with primer *g* and *h* is indicated in green.

Table 1. Sequences of the two universal primer pairs amplifying the *trn*L (UAA) intron

Name	Code	Sequence 5′–3′
c	A49325	CGAAATCGGTAGACGCTACG
d	B49863	GGGGATAGAGGGACTTGAAC
g	A49425	GGGCAATCCTGAGCCAA
h	B49466	CCATTGAGTCTCTGCACCTATC

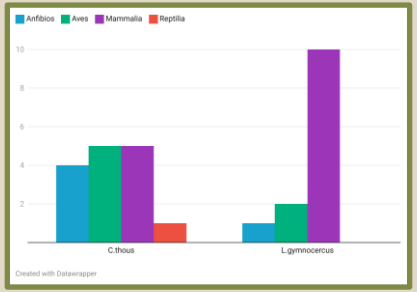


Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: *mamíferos nativos*

Subulo gouazoubira

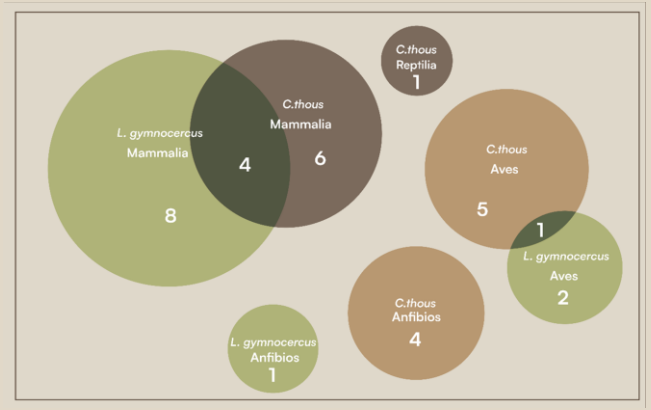
Cerdocyon thous

Lycalopex gymnocercus



El guazubirá es una especie oportunista, dispersor de zarzamora

No aparecen las especies de bosque implantado de eucaliptus y pino



Marcador 12S

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN: proyectos en curso

Dos proyectos que buscan mejorar la producción agropecuaria sobre campo natural de manera **SOSTENIBLE**

↓

- Construcción de bases de secuencias de referencia para las especies presentes en los potreros de estudio

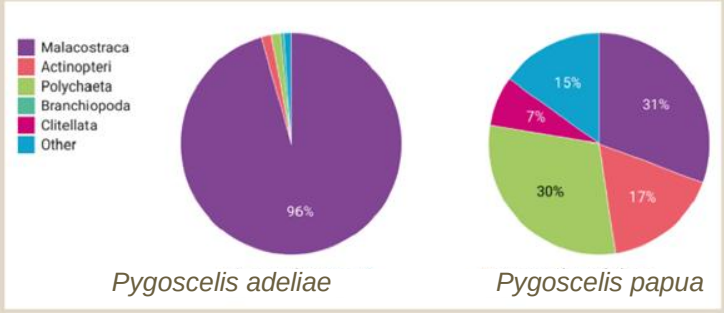
- Abundancia relativa de lecturas: determinación de sesgos a partir de comunidades simuladas (mock communites)

- Utilización de dos marcadores

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN proyectos en curso

Pygoscelis papua y Pygoscelis adeliae

https://repliegue.com.ar/antartida-argentina-119-anos-de-presencia-sucesos-de-la-historia-2/



Pygoscelis adeliae *Pygoscelis papua*

Dr. Álvaro Soutullo
CURE-Udelar

PEDECIBA
MEC-UDELAR

Proyecto de Maestría
Lic. Maryam Raslan

Marcador COI

Estudios de dieta por metabarcoding de ADN

FORMACIÓN DE INVESTIGADORES

Antonella Bruno, Lic.

Lucía Marín, estudiante Dr.

Silvina Piastri estudiante Dr.

Natalia Mannise, Dr

Maryam Raslan, estudiante MSc.

COLABORADORES:

INSTITUTO DE HIGIENE
Prof. Arnoldo Berta
FACULTAD DE MEDICINA

CURE
Centro Universitario Regional del Este

Centro Universitario **Rivera**

INIA URUGUAY

FACULTAD DE AGRONOMIA
UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN LOS ÚLTIMOS CINCO AÑOS:

frontiers | Frontiers in Ecology and Evolution

TYPE Original Research
PUBLISHED 30 May 2024
DOI 10.3389/fevo.2024.1360714

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Gabriela Paula Fernández,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires (UNNOBA), Argentina

REVIEWED BY
Thales Renato Ochotorena De Freitas,
Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil
Santiago Ceballos,
Universidad Nacional de Tierra del Fuego, Argentina

Developing a DNA metabarcoding method to identify diet taxa in Neotropical foxes

Natalia Mannise[1,2], Mariana Cosse[1*], Gonzalo Greif[3], Nadia Bou[1], Carlos Robello[3,4], Susana González[1] and Andres Iriarte[2*]

THERYA, 2024, Vol. 15(1):51-58 DOI:10.12933/therya-24-5746 ISSN 2007-3364

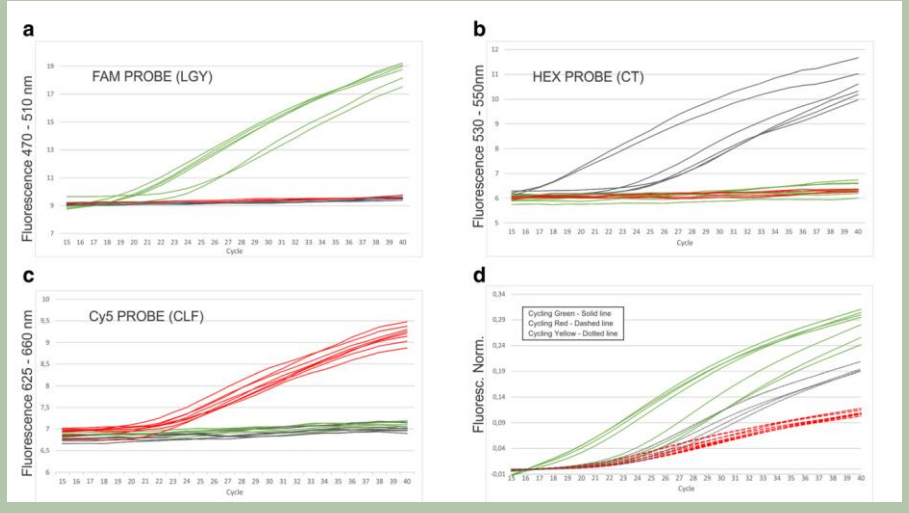
Applicability of DNA barcoding-based analyses on the diet of the Gray brocket deer (*Subulo gouazoubira*) in xeric hillside forests

Mariana Cosse[1]*, Antonella Bruno[1], Natalia Mannise[1], Nadia Bou[1], María Zabaleta[2], Mauricio Bonifacino[3,4], Arley Camargo[5], Pablo Smircich[6], Andrés Iriarte[7], and Alejandro Brazeiro[3]

[1] Departamento de Biodiversidad y Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), MEC. Av. Italia 3318, CP. 11600. Montevideo, Uruguay. Email: mcosse@iibce.edu.uy (MC); antobruno82@gmail.com (AB); natymanni@gmail.com (NM); nadiabou57@gmail.com (NB).
[2] Centro Universitario Regional del Este Sede Maldonado, Universidad de la República. Av. Cachimba del Rey, CP. 20100. Maldonado, Uruguay. Email: zabaleta.maria@gmail.com (MZ).
[3] Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Igúa 4225, CP 11400. Montevideo, Uruguay. Email: mbonifa@gmail.com (MB); brazeiro@fcien.edu.uy (AB).
[4] Laboratorio de Botánica, Facultad de Agronomía, Universidad de la República. Casilla de Correos 1238. Montevideo, Uruguay.
[5] Laboratorio de Biogeografía y Evolución, Centro Universitario Regional Noreste, Sede Rivera, Universidad de la República. Ituzaingó 667, CP. 40000. Rivera, Uruguay. Email: arleycamargo@gmail.com (AC).
[6] Laboratorio de Bioinformática, Departamento de Genómica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), MEC. Av. Italia 3318, CP. 11600. Montevideo, Uruguay. Email: psmircich@gmail.com (PS).
[7] Laboratorio de Biología Computacional, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República. Avenida Dr. Alfredo Navarro 3051, CP. 11600. Montevideo, Uruguay. Email: airiarte@fcien.edu.uy (AI).
*Corresponding author: https://orcid.org/0000-0001-9644-1633.

DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE MUESTRAS NO-INVASIVAS

Sonda TaqMan utilizando RT-PCR.
Región de COII.
Puesta a punto para cánidos y felinos presentes en Uruguay.



Cosse, M., F. Grattarola, and N. Mannise. 2017. A novel real-time TaqMan™ PCR assay for simultaneous detection of Neotropical fox species using noninvasive samples based on cytochrome c oxidase subunit II. Mammal Research **62**:405-411.

DETERMINACIÓN TAXONÓMICA DE MUESTRAS NO-INVASIVAS

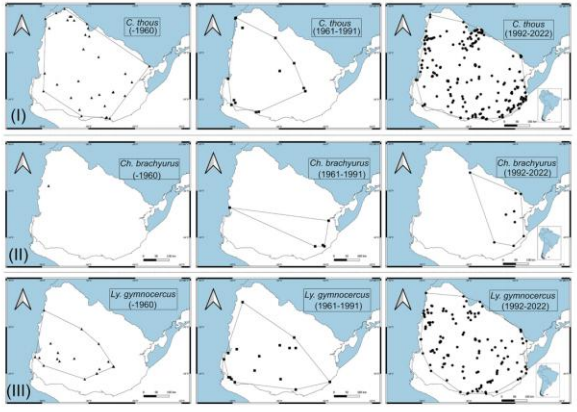


Fig. 7. Results of changes in known distribution for canid species from Uruguay for the three temporal slices considered. (I) *C. thous*. (II) *Ch. brachyurus*. (III) *Ly. gymnocercus*.

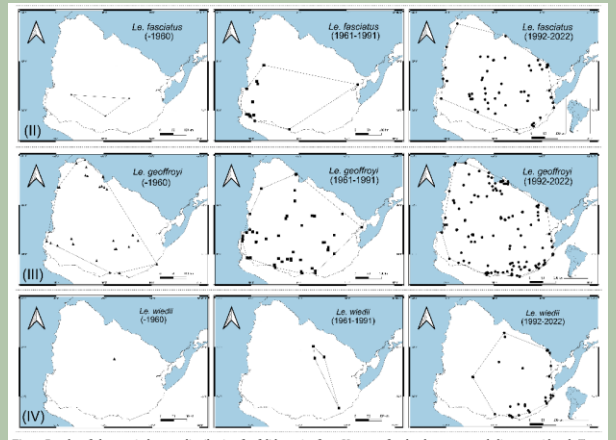


Fig. 8. Results of changes in known distribution for felid species from Uruguay for the three temporal slices considered. (I) *H. yagouaroundi*. (II) *Le. fasciatus*. (III) *Le. geoffroyi*, (IV) *Le. wiedii*. (V) *Pa. onca*. (VI) *Pu. concolor*.

Mastozoología Neotropical, 30(2):e0959, Mendoza, 2023
Versión on-line ISSN 1666-0536
https://doi.org/10.31687/saremMN.23.30.2.08.e0959

Copyright © SAREM, 2023
http://www.sarem.org.ar
http://www.sbmz.org

Article

SBMz Sociedade Brasileira de Mastozoologia

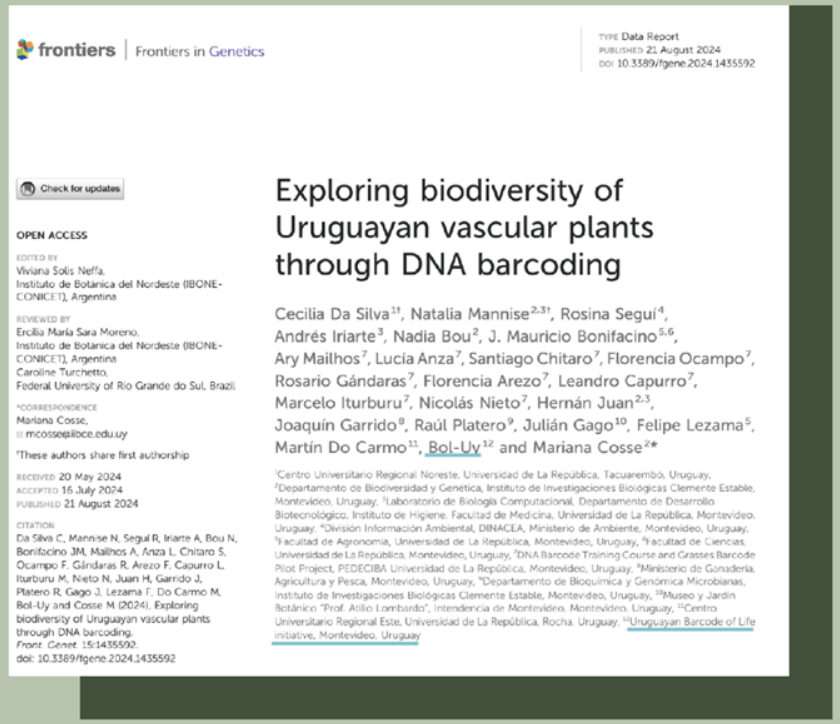
SAREM

CARNIVORANS FROM URUGUAY: UPDATED DISTRIBUTION AND CHANGES THROUGH TIME

Mauro I. Schiaffini[1], Alexandra Cravino Mol[2], Enrique M. González[3], Juan A. Martínez-Lanfranco[4], Martín Buschiazzo[5], Nadia Bou[6], Mariana Cosse[6] & Susana González[6]

CÓDIGOS DE BARRA DE LA VIDA URUGUAY

Publicación



frontiers | Frontiers in Genetics

TYPE Data Report
PUBLISHED 21 August 2024
DOI 10.3389/fgene.2024.1435592

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Viviana Solís Neffa,
Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET), Argentina

REVIEWED BY
Ercilia María Sara Moreno,
Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE-CONICET), Argentina
Caroline Turchetto,
Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil

*CORRESPONDENCE
Mariana Cosse,
mcosse@iibce.edu.uy

†These authors share first authorship

RECEIVED 20 May 2024
ACCEPTED 16 July 2024
PUBLISHED 21 August 2024

CITATION
Da Silva C, Mannise N, Segul R, Iriarte A, Bou N, Bonifacino JM, Mailhos A, Anza L, Chitaro S, Ocampo F, Gándaras R, Arezo F, Capurro L, Iturburu M, Nieto N, Juan H, Garrido J, Platero R, Gago J, Lezama F, Do Carmo M, Bol-Uy and Cosse M (2024). Exploring biodiversity of Uruguayan vascular plants through DNA barcoding.
Front. Genet. 15:1435592.
doi: 10.3389/fgene.2024.1435592

Exploring biodiversity of Uruguayan vascular plants through DNA barcoding

Cecilia Da Silva[1†], Natalia Mannise[2,3†], Rosina Segul[4], Andrés Iriarte[3], Nadia Bou[2], J. Mauricio Bonifacino[5,6], Ary Mailhos[7], Lucía Anza[7], Santiago Chitaro[7], Florencia Ocampo[7], Rosario Gándaras[7], Florencia Arezo[7], Leandro Capurro[7], Marcelo Iturburu[7], Nicolás Nieto[7], Hernán Juan[2,3], Joaquín Garrido[8], Raúl Platero[9], Julián Gago[10], Felipe Lezama[5], Martín Do Carmo[11], Bol-Uy[12] and Mariana Cosse[2*]

[1]Centro Universitario Regional Noreste, Universidad de La República, Tacuarembó, Uruguay, [2]Departamento de Biodiversidad y Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, [3]Laboratorio de Biología Computacional, Departamento de Desarrollo Biotecnológico, Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de La República, Montevideo, Uruguay, [4]División Información Ambiental, DINACEA, Ministerio de Ambiente, Montevideo, Uruguay, [5]Facultad de Agronomía, Universidad de La República, Montevideo, Uruguay, [6]Facultad de Ciencias, Universidad de La República, Montevideo, Uruguay, [7]DNA Barcode Training Course and Grasses Barcode Pilot Project, PEDECIBA Universidad de La República, Montevideo, Uruguay, [8]Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Montevideo, Uruguay, [9]Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay, [10]Museo y Jardín Botánico "Prof. Atilio Lombardo", Intendencia de Montevideo, Montevideo, Uruguay, [11]Centro Universitario Regional Este, Universidad de La República, Rocha, Uruguay, [12]Uruguayan Barcode of Life Initiative, Montevideo, Uruguay

¡Muchas gracias!