



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

Escuela de Ingeniería en Biotecnología

**“DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL eDNA DE *Poecilia reticulata* EN SEDIMENTOS ACUÁTICOS Y AGUAS SUPERFICIALES”**

**AUTORA**

Ana Judith Encarnación Díaz

**DIRECTORA**

Ing. Elizabeth Velarde. MsC

**2020**

# INTRODUCCIÓN



● Especies invasoras

● Sobreexplotación de recursos biológicos

● Contaminación

● Cambio climático

## ESPECIES INVASORAS

Afectan al 42% de las especies en peligro de extinción

● Los efectos varían de indetectables a drásticos

- Tipo de especie,
- Magnitud de la invasión,
- Vulnerabilidad del ecosistema

# INTRODUCCIÓN

## ESPECIES INVASORAS ECUADOR



Ministerio del Ambiente presentó un plan de acción para la prevención, manejo y control de especies invasoras en el Ecuador

Técnicas que permitan la detección temprana de especies.



Registro de varias especies invasora en el lago Yahuarcocha

(Crespo, 2015) (Kettunen et al., 2009)

(MAE, 2019; El Telégrafo, 2019)

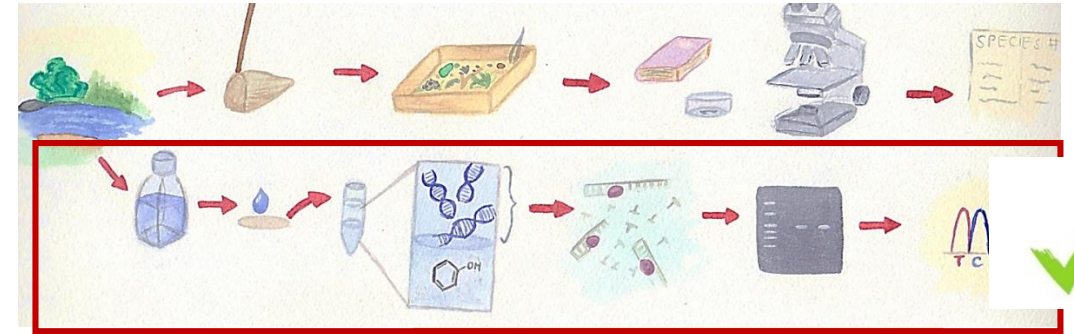
# INTRODUCCIÓN

eDNA

Técnica nueva de muestreo genético no invasivo

Técnica basada en el análisis del ADN que los organismos liberan al medio ambiente (eDNA) a manera de huella genética

Permite estimar la población y diversidad de especies; de modo sencillo y a bajo costo



## Limitaciones del eDNA

Tiende a degradarse o transformarse al interactuar con varios factores bióticos y abióticos

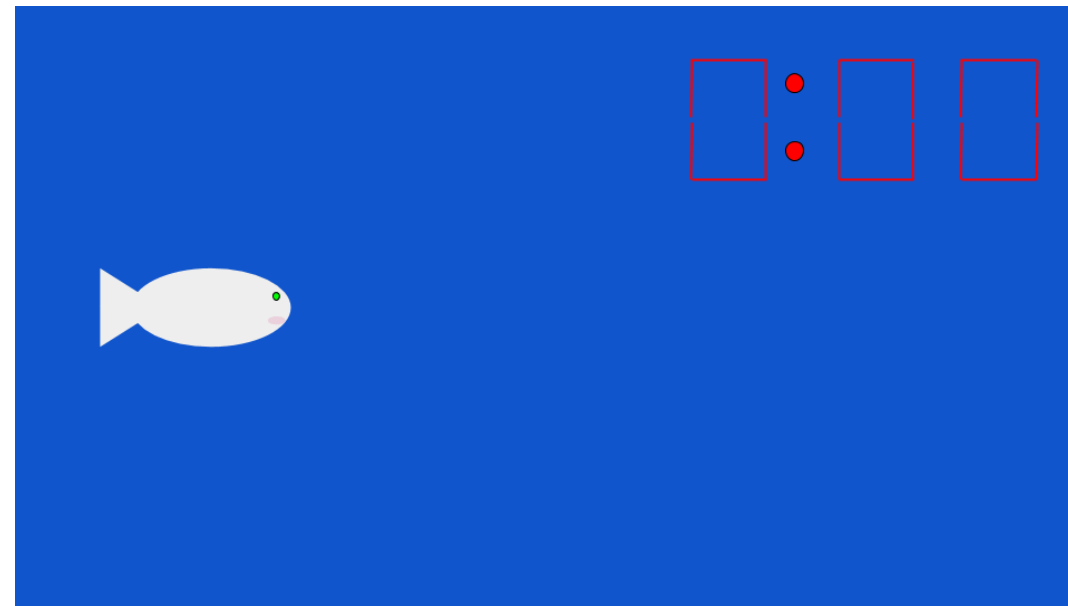
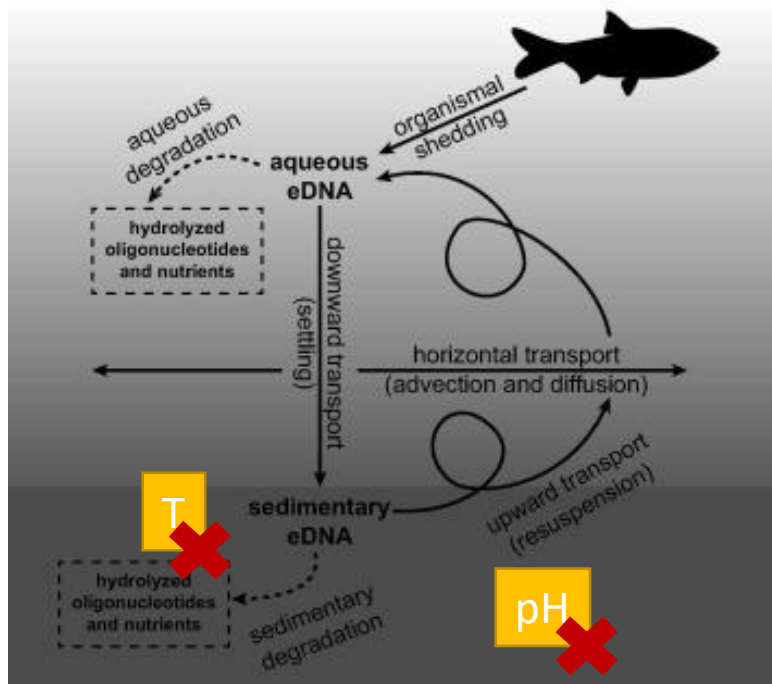
**Factores bióticos:** bacterias, enzimas

**Factores abióticos:** Temperatura, pH, luz , entre otros

La concentración y persistencia del eDNA depende del sustrato y del entorno

# JUSTIFICACIÓN

Considerando que la especies invasoras constituyen una amenaza ecológica y económica para la biodiversidad, es importante su detección en la etapas iniciales de su propagación.





eDNA

¿El eDNA, es un método capaz detectar la presencia de especies invasoras en muestras de agua y sedimento?



# OBJETIVOS

## GENERAL

Determinar la concentración del eDNA de una especie invasora en sedimentos acuáticos y aguas superficiales.

## ESPECÍFICOS

- ✓ Estandarizar el método de extracción y purificación del eDNA de *P. reticulata* para sedimentos acuáticos y aguas superficiales.
- ✓ Cuantificar la concentración del eDNA de *P. reticulata* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.
- ✓ Analizar la relación entre la concentración de eDNA de *P. reticulata*, la densidad de individuos y el tiempo de permanencia del ADN en aguas superficiales y sedimentos acuáticos.

## HIPÓTESIS

¿La concentración del eDNA permite estimar la densidad poblacional de especies invasoras?

## Proceso de estandarización del método

Colección de muestra



- ✓ Muestras a partir de tejido
- ✓ Muestras a partir de agua
- ✓ Muestras a partir de sedimento

Extracción de eDNA



Kit de purificación de ADN

Amplificación de eDNA



QuantStudio<sup>®</sup> 3

Diseño de primers

Análisis de resultados





## Extracción, cuantificación y análisis de la integridad del eDNA

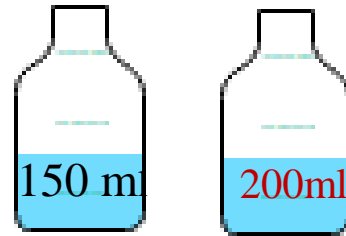
● Tejido



- Aleta
- Cola

MasterPure™ de Epicentre®.

● agua



Muestra de agua



Filtros de nitrocelulosa millipore: Poro 0.47µm

MasterPure™ de Epicentre®

● sedimento



Sedimentador manual

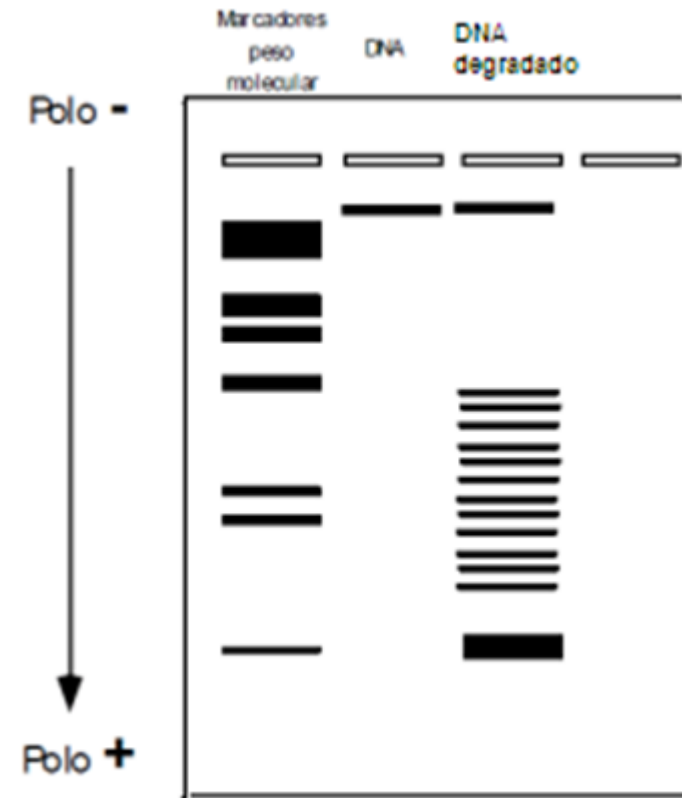


MasterPure™ de Epicentre®.

## Extracción, cuantificación y análisis de la integridad del eDNA

Cantidad y pureza de eDNA

Integridad de eDNA



Se usó el espectrómetro de microvolumen Colibri UV-VIS

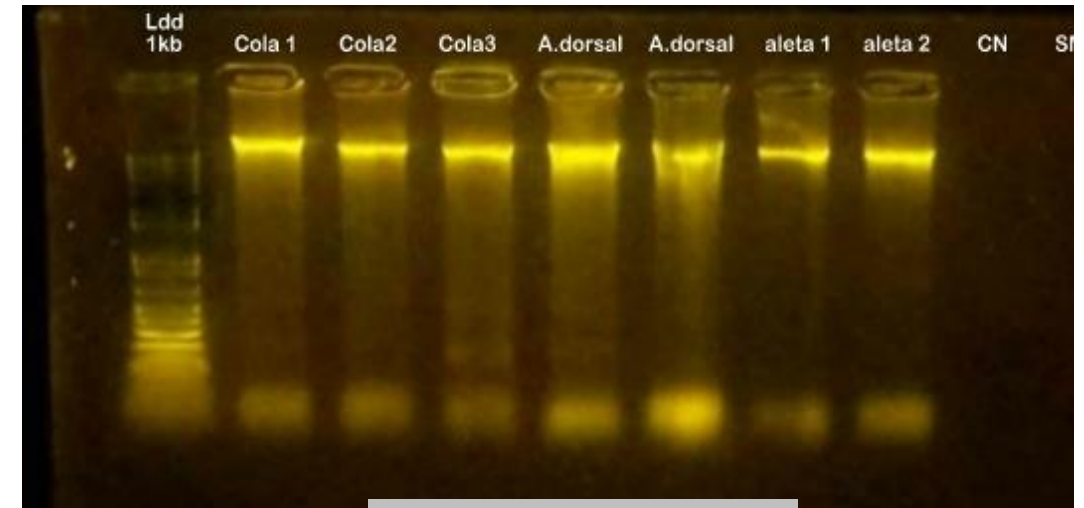
Gel de agarosa al 1%

(Lopera-Barrero et al., 2008)

# Resultados y discusión

## ADN de tejido

Tipo de tejido	Pureza de ADN Relación A260/280	Concentración de ADN (ng/μl)
Aleta1	1.896	302.35
Aleta 2	1.918	299.65
Aleta 3	1.962	303.85
Cola1	1.986	236.70
Cola2	1.975	197.00
Cola3	1.977	190.55



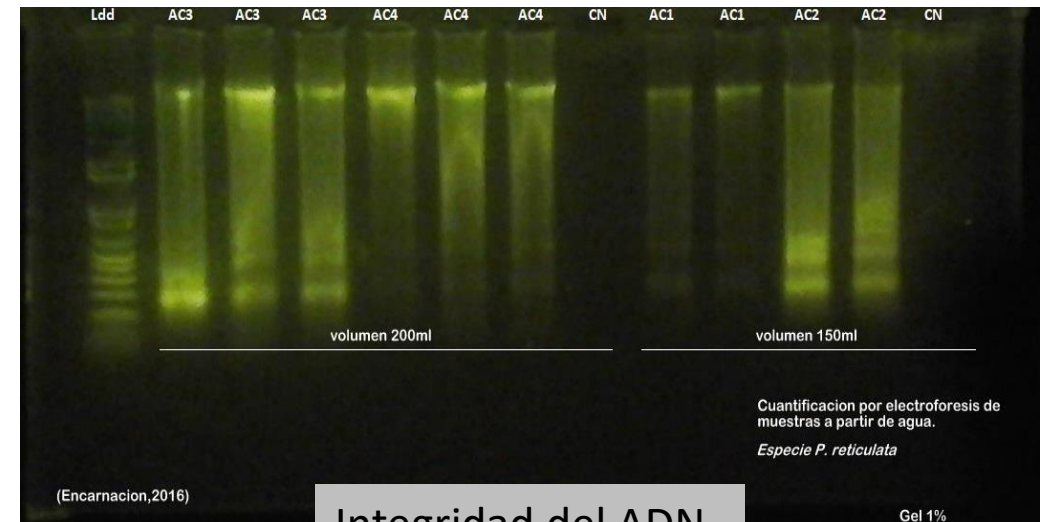
Integridad del ADN

(Wasko et al., 2003) (Nam et al., 2003)

## Resultados y discusión

### eDNA de agua

Volumen	Pureza de ADN	Concentración de ADN	Volumen	Pureza de ADN	Concentración de ADN
150ml	Relación A260/280	(ng/μl)	200ml	Relación A260/280	(ng/μl)
AC1	1.819	72.1	AC3	1.927	110.35
AC2	1.886	86.3	AC4	1.991	146.15



Integridad del ADN

(Geerts et al., 2018)

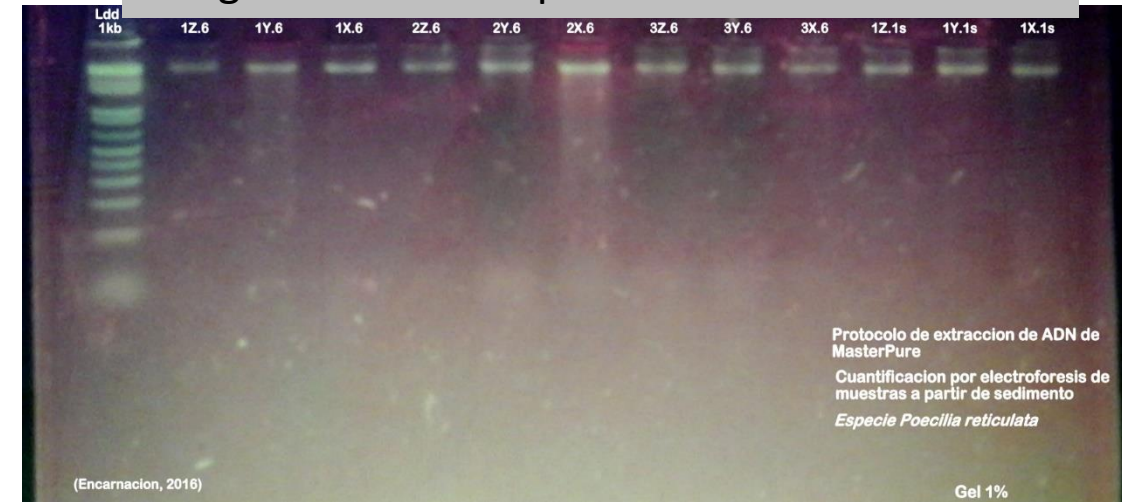
(Turner et al., 2014)

# Resultados y discusión

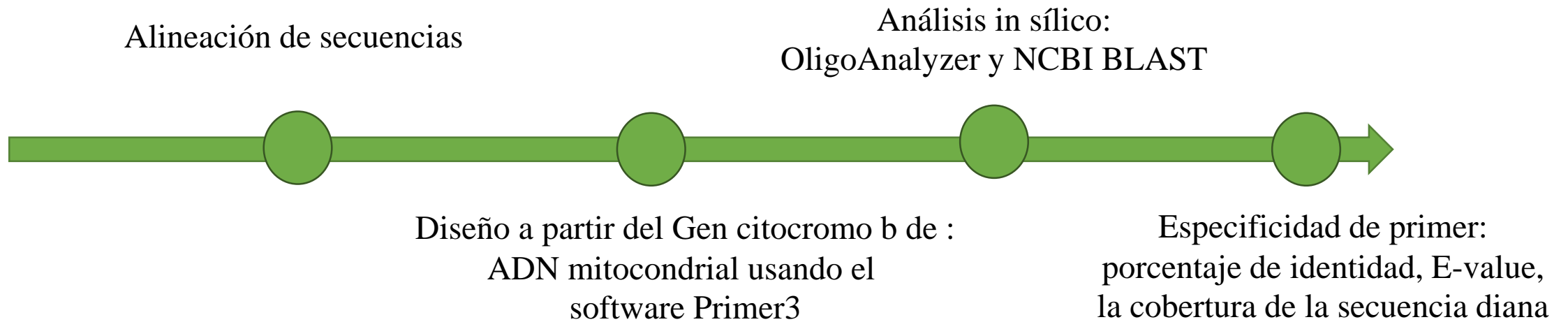
## eDNA de sedimento

Protocolo	Pureza Relación A260/280	Concentración de eDNA (ng/μl)
MasterPure™	1.918	350.00

### Integridad del ADN: protocolo MasterPure



## Elaboración y análisis *in silico* de primers





## Elaboración y análisis *in silico* de primers

### Características de primers específicos para *P. reticulata*

Nombre Primer	Secuencia Primer 5'-3'	Longitud (bp)	Tm(°C)	GC(%)	Tamaño amplicon
PoRet Fwd	AGGATTATGCCTAGTTGCCC	20	59.8	50	149
PoRet Rev	CTCCATTAGCGTGTATGTTG	22	60.8	50	

CG

### ANÁLISIS IN SÍLICO:

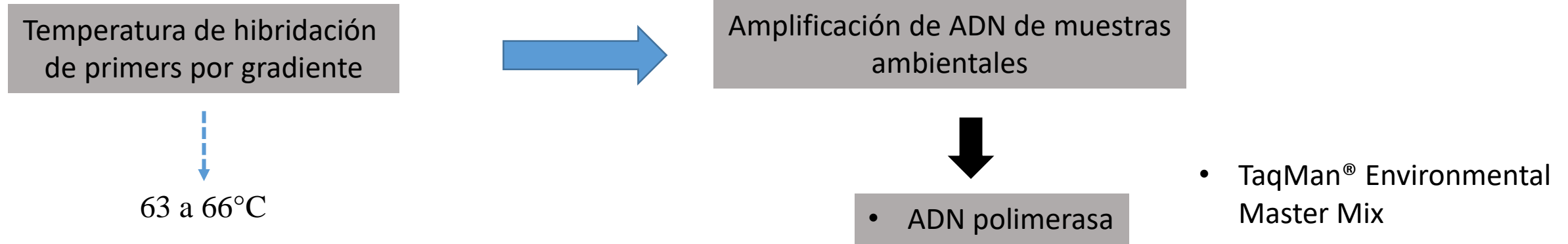
porcentaje de identidad y de cobertura de la secuencia diana del 100%

*E-value* de 0.027 para más de 10 secuencias parciales

Descripción	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor E	Por. Ident	Adhesión
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bono de Poecilia reticulata gen Pret cytochrome b (cytb), cds parciales; mitocondrial</a>	44,1	44,1	100%	0,027	100.00%	<a href="#">gi   836599591   KP700413.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bono de Poecilia reticulata 4290 gen del citocromo b (cytb), cds parciales; mitocondrial</a>	44,1	44,1	100%	0,027	100.00%	<a href="#">gi   836598441   KP699838.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Bono de Poecilia reticulata 4289 gen del citocromo b (cytb), cds parciales; mitocondrial</a>	44,1	44,1	100%	0,027	100.00%	<a href="#">gi   836598439   KP699837.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia reticulata haplotipo 52 gen citocromo b, cds parciales; mitocondrial</a>	44,1	44,1	100%	0,027	100.00%	<a href="#">gi   661788233   KJ415729.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia reticulata haplotipo 51 gen citocromo b, cds parciales; mitocondrial</a>	44,1	44,1	100%	0,027	100.00%	<a href="#">gi   661788231   KJ415728.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia reticulata haplotipo 50 gen citocromo b, cds parciales; mitocondrial</a>	44,1	44,1	100%	0,027	100.00%	<a href="#">gi   661788229   KJ415727.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia reticulata haplotipo 49 gen citocromo b, cds parciales; mitocondrial</a>	44,1	44,1	100%	0,027	100.00%	<a href="#">gi   661788227   KJ415726.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia reticulata haplotipo 48 gen citocromo b, cds parciales; mitocondrial</a>	44,1	44,1	100%	0,027	100.00%	<a href="#">gi   661788225   KJ415725.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia reticulata haplotipo 47 gen citocromo b, cds parciales; mitocondrial</a>	44,1	44,1	100%	0,027	100.00%	<a href="#">gi   661788223   KJ415724.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia reticulata haplotipo 46 gen citocromo b, cds parciales; mitocondrial</a>	44,1	44,1	100%	0,027	100.00%	<a href="#">gi   661788221   KJ415723.1</a>

# Metodología 1:

## Amplificación por PCR



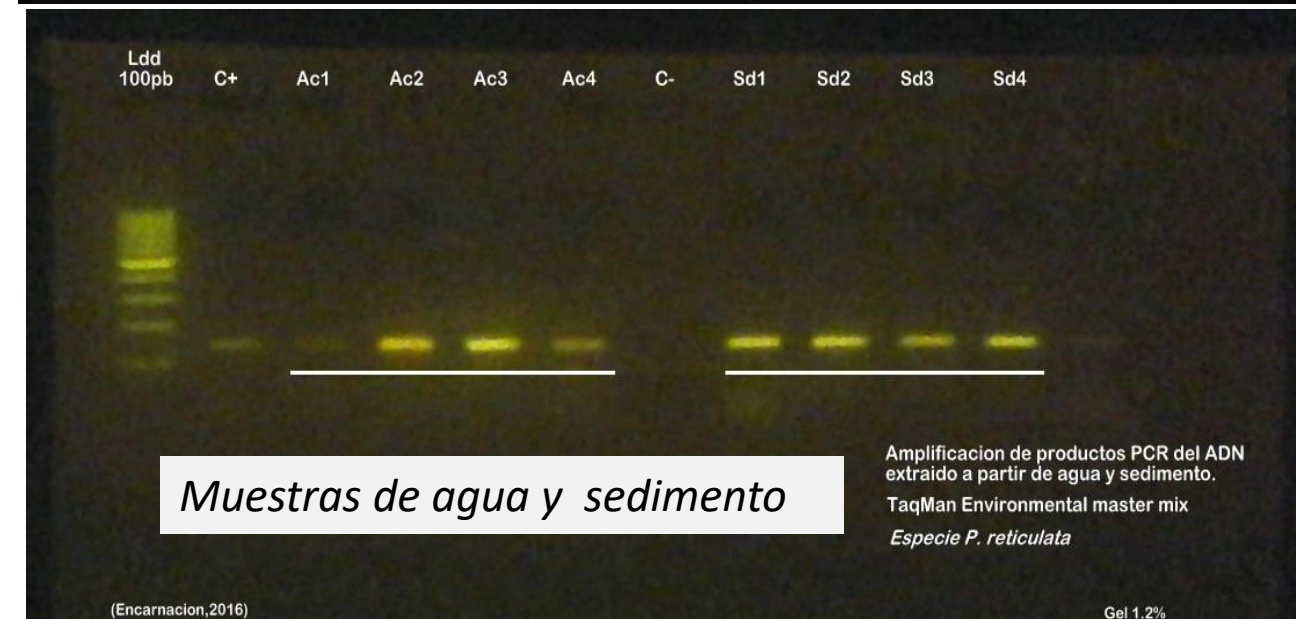
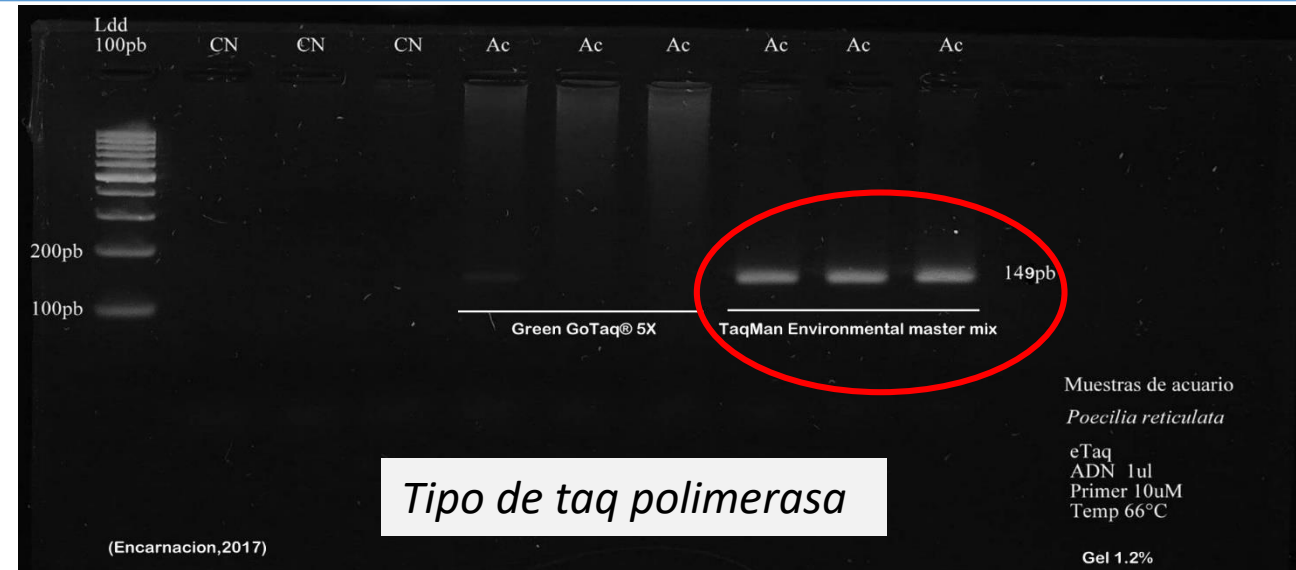
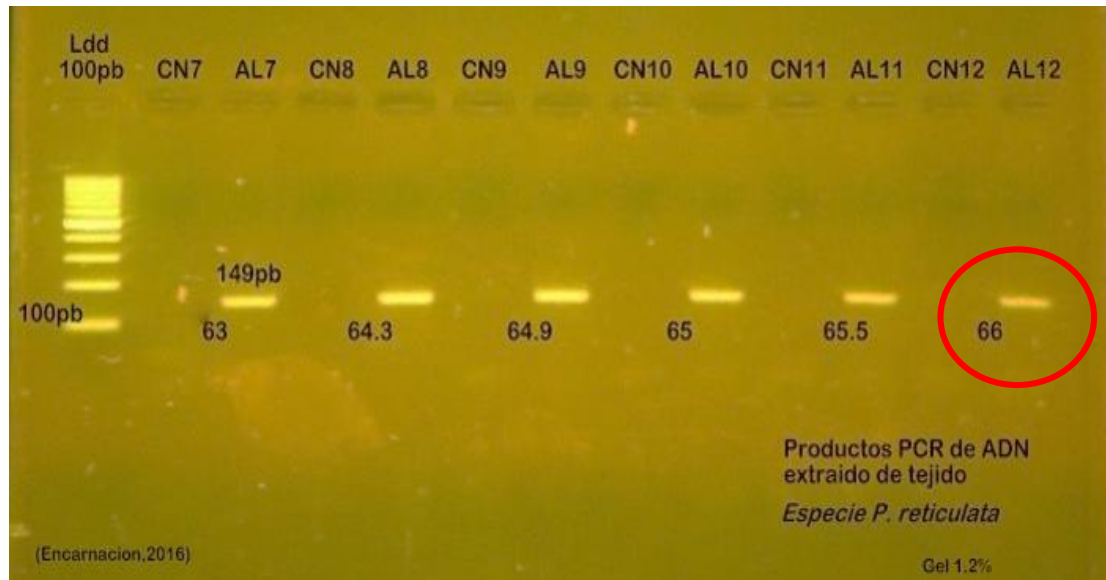
### *Reacción maestra*

Componentes	Volumen final/ R
Green GoTaq® 5X	5µl
Forward Primer 10µM	0.4µl
Reverse Primer 10µM	0.4µl
ADN 10ng/ul	0.5µl
Agua	3.8µl
Volumen final	10µl

# Resultados y discusión

## Amplificación por PCR

Temperatura de hibridación de primers por gradiente

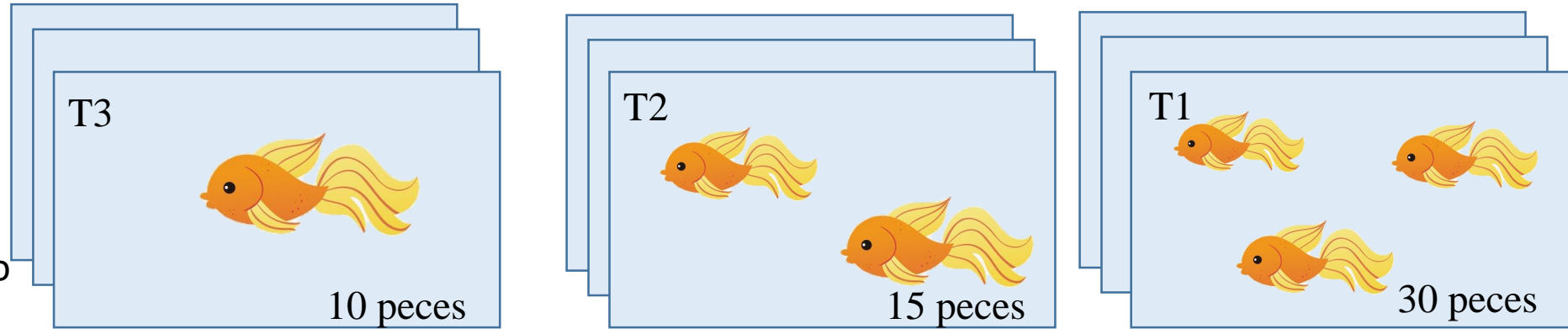


## Objetivo E. 2 Concentración del eDNA de *P. reticulata* mediante qPCR

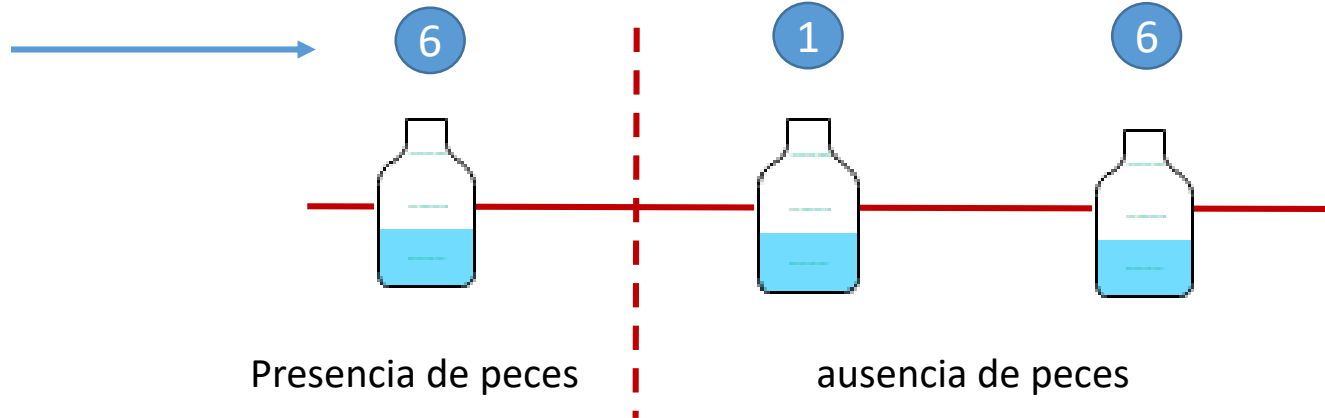
### Experimento *in vitro*

Peceras con:

- 9 L agua
- 1 kg de sedimento



Días de muestreo



Presencia de peces

ausencia de peces

- Extracción de eDNA
- Cantidad y pureza de eDNA

# Resultados:

## Experimento *in vitro*

Se procesó un total de 72 muestras:  
36 muestras de agua y 36 de sedimento

			Muestras de agua		Muestras sedimento	
Días de muestreo	Trt	Código	Pureza A260/280	Concentración del eDNA ng/ul	Pureza A260/280	Concentración del eDNA ng/ul
6 DIAS CON PECES	T1	1A.6	1.8935	246.9	1.4935	267.9
		1B.6	1.8785	654.4	1.4405	778.85
		1C.6	1.966	219.6	1.485	338.85
	T2	2A.6	1.892	203.3	1.4375	388.45
		2B.6	1.918	88.9	1.53	110.95
		2C.6	1.871	139.5	1.501	209.8
	T3	3A.6	1.8775	45.15	1.471	219.4
		3B.6	1.962	109.8	1.4595	344.65
		3C.6	1.993	99.95	1.463	370.95

## Estandarización de la PCR en tiempo real

Temperatura de hibridación de primers

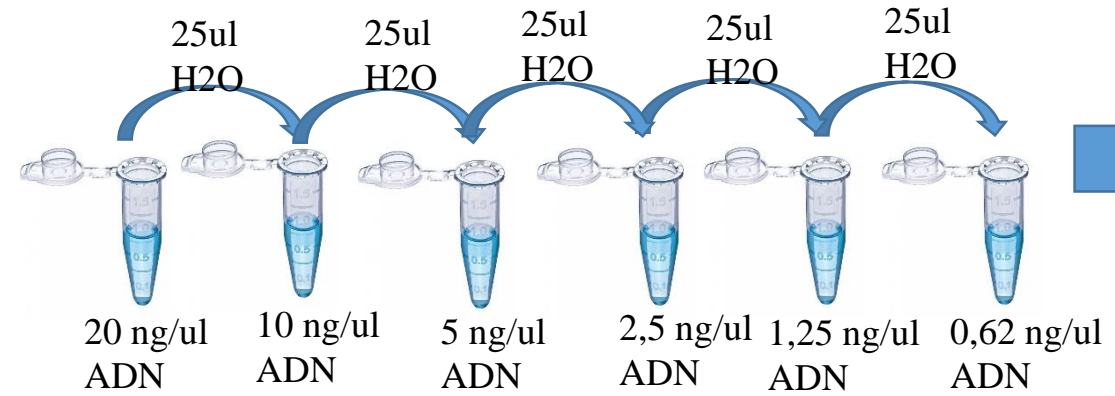


Tm: 60°C, 63°C y 66°C

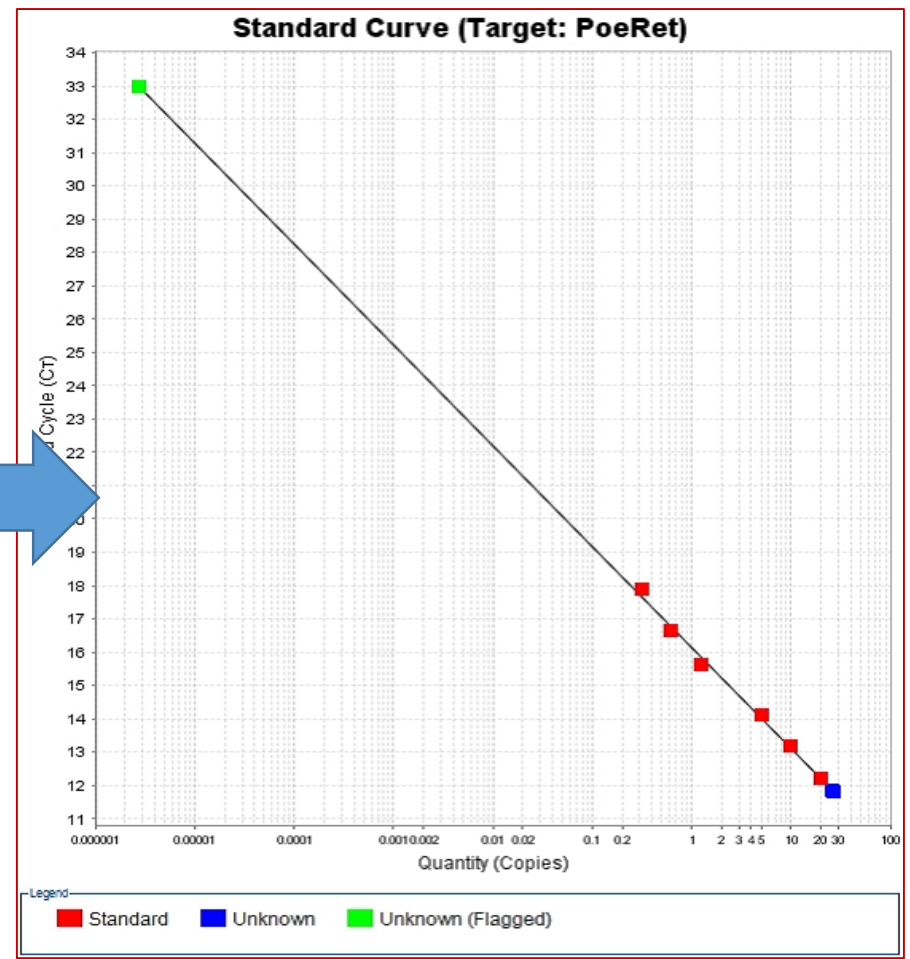
Volumen final de reacción



25 ul y 10 ul



Construcción de la curva estándar



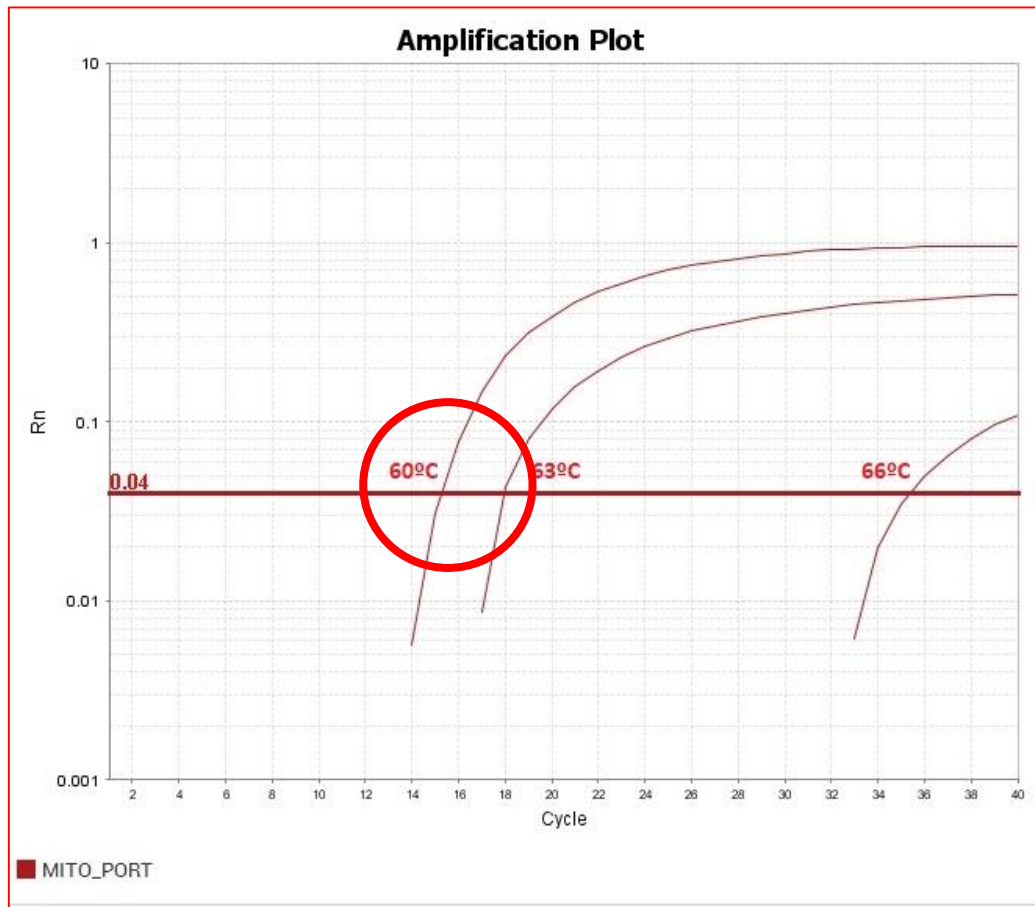
Equipo QuantStudio 3 Real-Time PCR System



# Resultados y discusión :

## Estandarización de la PCR en tiempo real

Amplificación de la temperatura de hibridación de los primers.

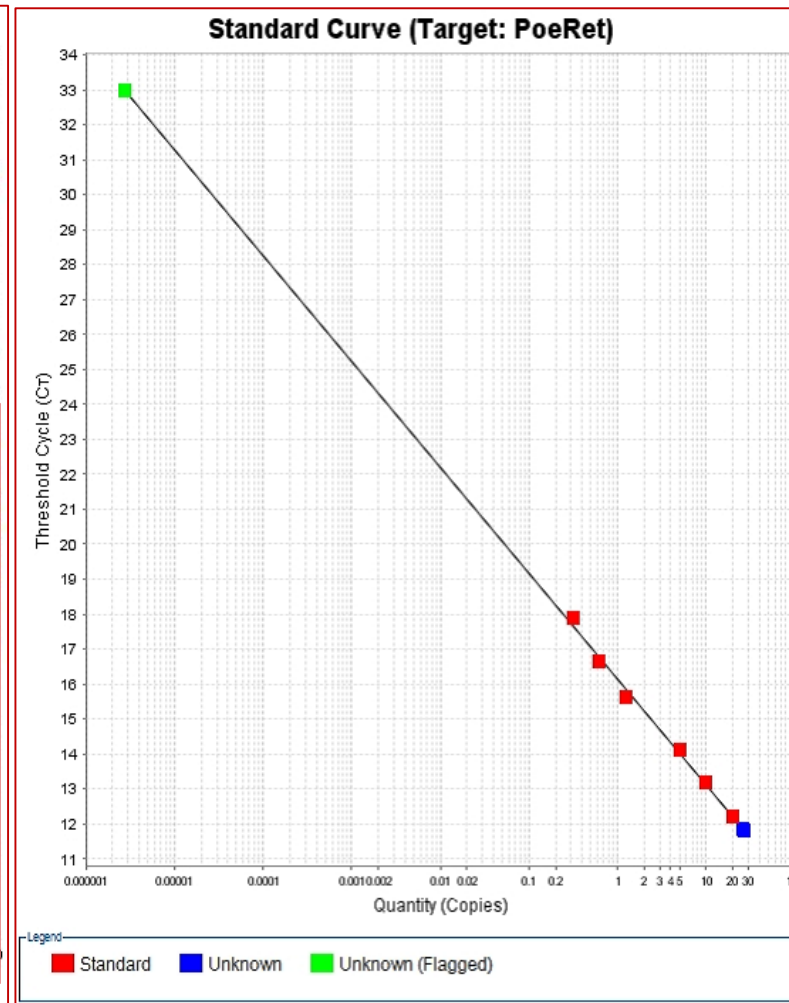
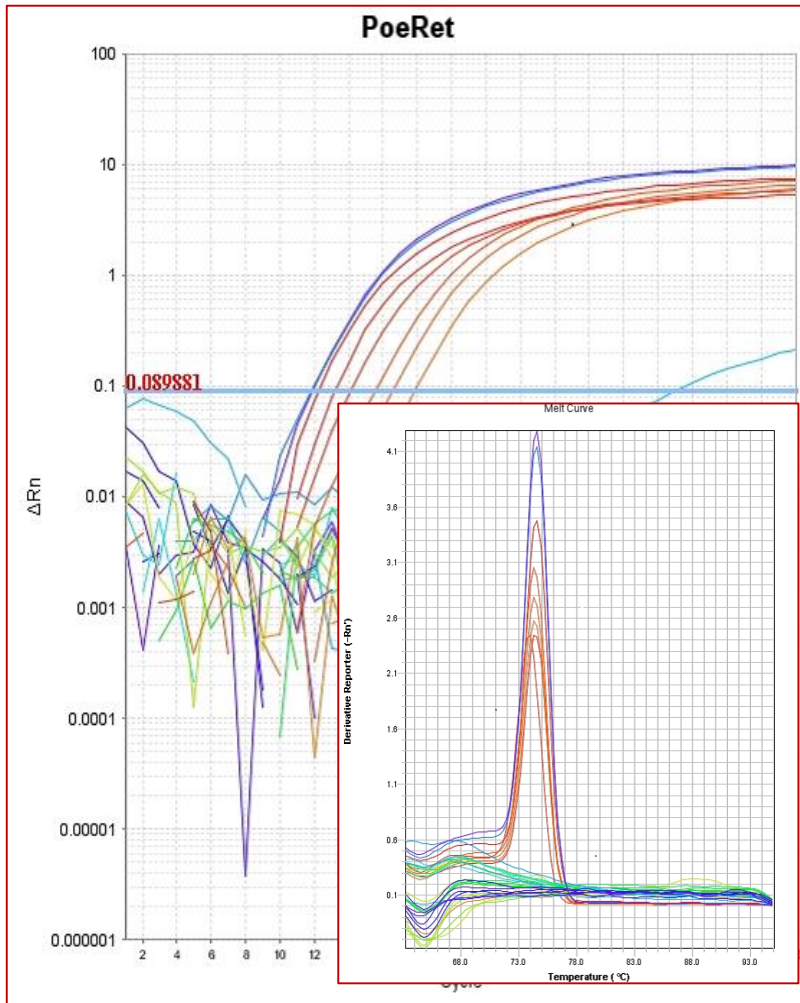


Valores de amplificación con un volumen final de 25µl y 10 µl en la reacción maestra

Código	Primer	Ct	Tm
o	Muestra		
A1	Blanco Poe_Ret NTC	30.2543	74.5615
A2	Blanco Poe_Ret NTC	27.6149	74.4124
A3	A.25µl Poe_Ret MUESTRA	13.0459	74.4124
A4	A.25µl Poe_Ret MUESTRA	13.8969	74.4124
A5	A2. 10µl Poe_Ret MUESTRA	13.6792	74.4124
A6	A2. 10µl Poe_Ret MUESTRA	13.91	74.4124

# Resultados y discusión :

## Estandarización de la PCR en tiempo real



Cantidad ng/ul	Ciclo Ct	Tm °C
20	12.1977	74.4292
10	14.1656	74.4292
5	14.1208	73.8333
2.5	-----	-----
1.25	15.6481	74.2808
0.625	16.6296	74.2802
0.3125	17.8876	74.4292

(Lawson Handley, 2015) (Tsuji et al., 2019)

### Diseño experimental

Se evaluaron tres factores en estudio i) tratamiento, ii) día de muestreo y iii) medio

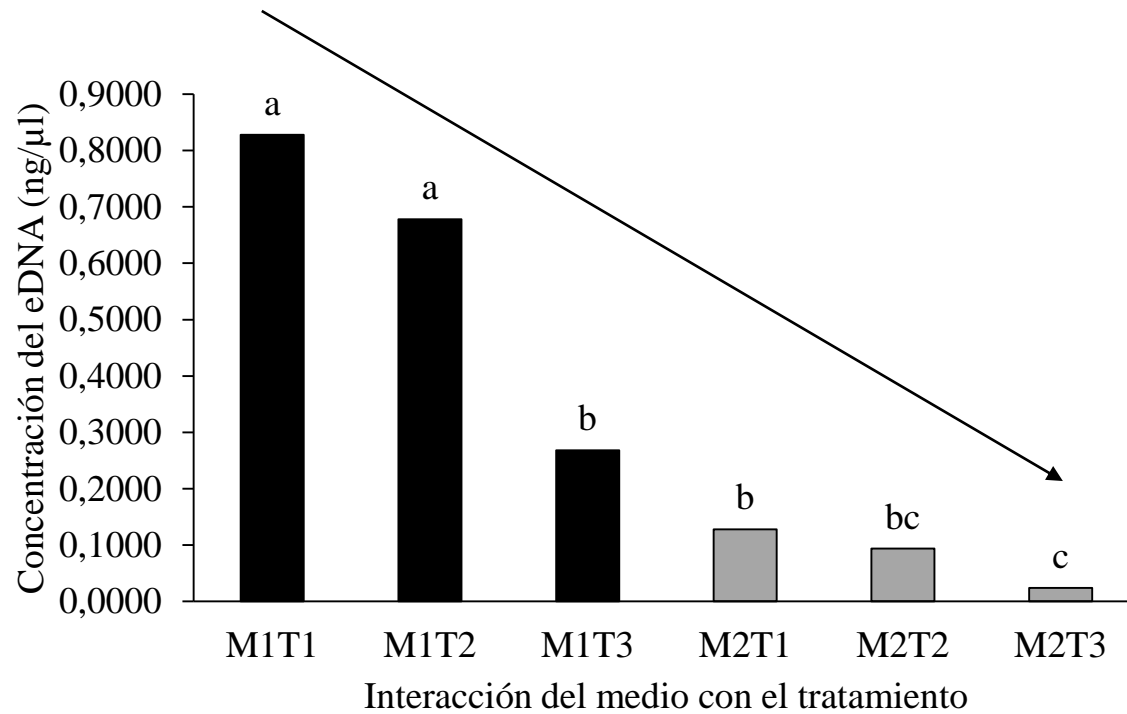
Variable	Descripción	Código
Tratamiento	30 peces	T1
	15 peces	T2
	10 peces	T3
Día de muestreo	6 días con peces	C1
	1 día sin peces	C2
	6 días sin peces	C3
Medio	Agua	M1
	Sedimento	M2

La variable evaluada fue concentración de eDNA (ng/ $\mu$ l).

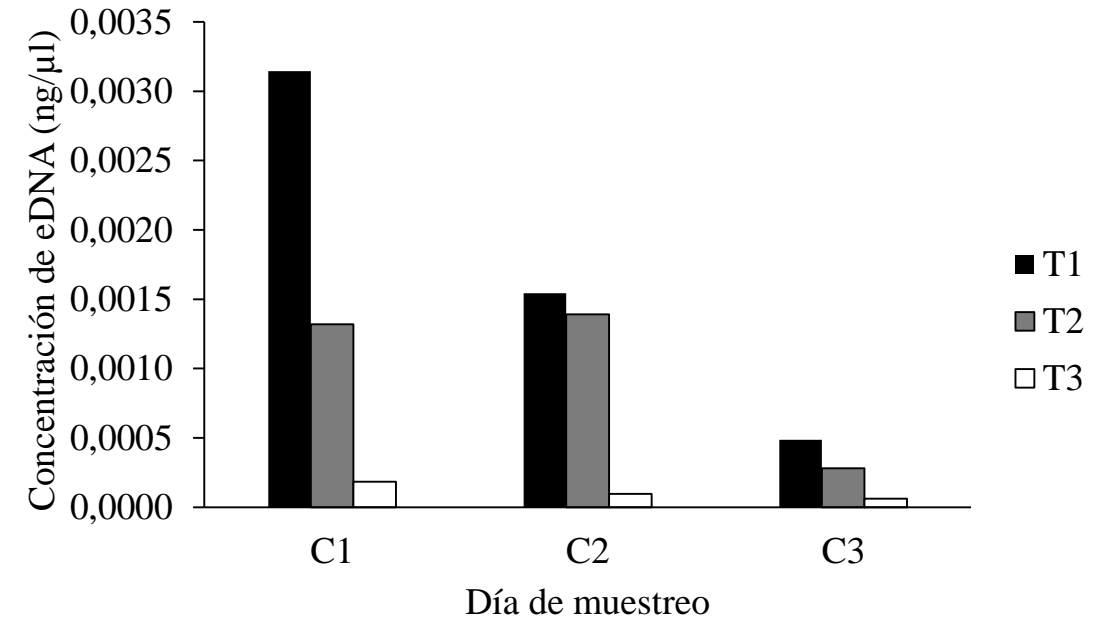
análisis de la varianza (ANOVA)

## Resultados y discusión :

### Análisis de la concentración de eDNA



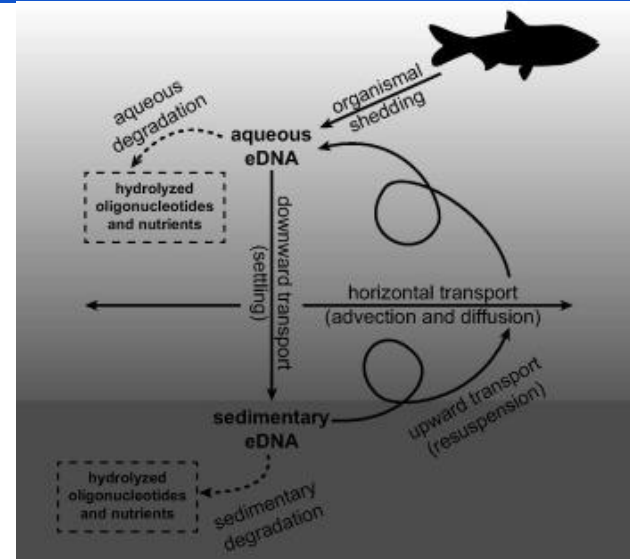
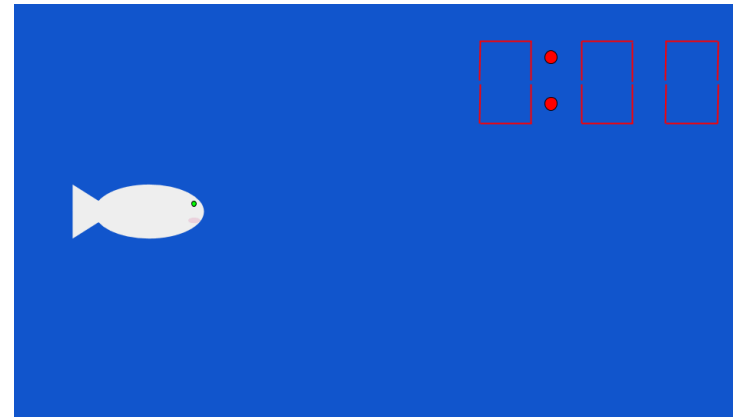
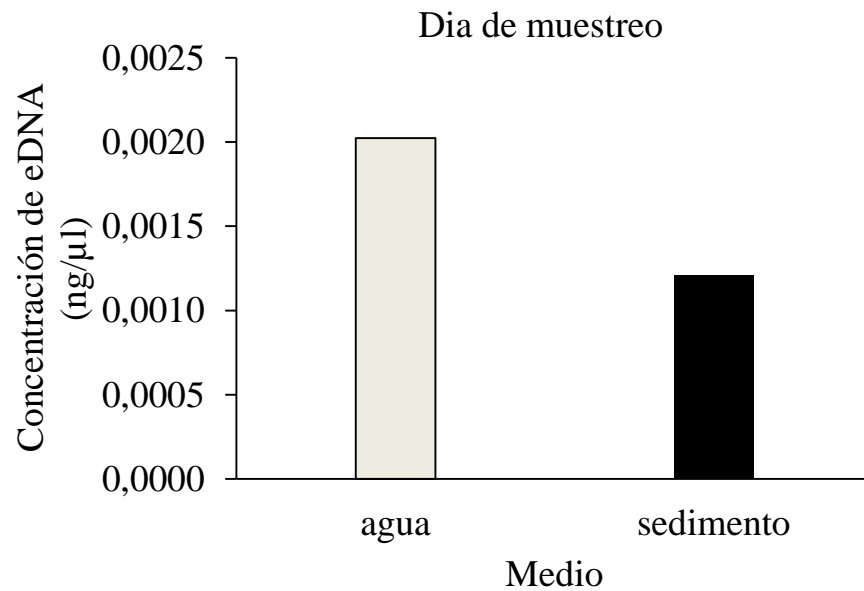
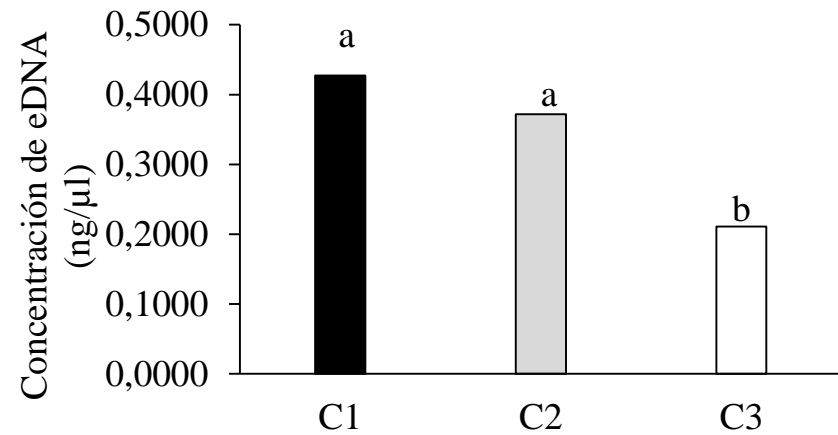
*Figura 1.* Rangos de significancia estadística de la interacción: medio con tratamiento



*Figura 2.* Concentración de eDNA de la interacción: tratamiento y día muestreo.

# Resultados y discusión :

## Análisis de la concentración de eDNA



(Turner et al., 2015)

(Buxton et al., 2017, 2018),

(Levy-Booth et al. 2007)

- Mediante la aplicación del protocolo modificado de MasterPure se logró estandarizar el método de extracción y purificación del eDNA de *P. reticulata* para muestra de tejido, agua y sedimentos, indicando de esta manera su efectividad. Además, se demostró la eficiencia de del par de primers diseñados a partir del gen citocromo b del ADN mitocondrial amplificando únicamente el producto esperado de la especie objetivo *P. reticulata* en muestras de tejido, agua y en sedimento.
- La técnica qPCR conjuntamente con los primers específico de la especie *P. reticulata* estimó la concentración del eDNA de las muestras ambientales.



- Según los resultados obtenidos basados en la evaluación de la concentración del eDNA de *P. reticulata*, con respecto a la densidad de individuos, el tiempo de permanencia del ADN y el medio, se logró demostrar que el eDNA de la especie *P. reticulata* se encuentra más concentrado en el agua. La concentración del eDNA en los tratamientos con mayor número peces fue mayor, es decir que la concentración del eDNA estuvo influenciada por el número de peces.
- Además, se demostró que el eDNA a partir de muestras de agua fue más sensible y confiable para la detección de eDNA de la especie después del sexto día de que la especie ya no estuvo presente, sin considerar la densidad de individuos. Asimismo, se demostró que el método del eDNA fue capaz de detectar la presencia de *P. reticulata* en muestras de agua aun cuando la especie se encontraba a bajas densidades (10 peces) sin la necesidad de capturar el individuo.

- También se evidenció que el eDNA sedimentario no es una fuente confiable para monitorear especies transitorias o que han permanecido temporadas cortas en el lugar de estudio ya que presentó una concentración mínima (0.00018167 ng/  $\mu$ l), debido a que estos permanecieron únicamente 6 días en el lugar de estudio haciendo casi imperceptible la concentración del eDNA ( $3.3 \times 10^{-6}$  ng/  $\mu$ l) al sexto día después de haber eliminado la especie.
- El desarrollo del método del eDNA en muestras de agua abre la posibilidad de que puede usarse en la detección de especies invasoras en ambientes naturales de una manera rápida y sencilla a diferencia de los métodos tradicionales basados en claves taxonómicas o por conteo directo.

- Ampliar investigaciones acerca de protocolos de muestreo, extracción de ADN a partir de muestras sedimentarias, que permitan eliminar inhibidores PCR, con la finalidad de robustecer los datos de ausencia y presencia de especies en lagos.
- La aplicación de eDNA a entornos acuáticos sigue siendo una tecnología nueva que requiere perfeccionamiento y desarrollo de métodos. Esta investigación resalta la necesidad de un estudio adicional con respecto al tipo sedimento, estos estudios pueden generar mayor información acerca de la concentración de eDNA en sedimento lo cual permitan afianzar la información obtenida en esta investigación, que permita analizar nuevos enfoques y comprender mejor el proceso de degradación del ADN en este medio Además de un análisis físico-químico con el fin de conocer la interacciones que tiene el eDNA con los compuestos presentes en los sedimentos.

- Extender la investigación del método de eDNA a pruebas *in situ* (pruebas en campo), considerando que la información obtenida podría proporcionar datos sólidos, comparables y ecológicamente significativos que permitan biomonitorrear no solamente la especie *P. reticulata*, si no también otras especies presentes en el lago Yahuarcocha, con el fin de que se efectúe gestiones pertinentes en su eliminación o conservación de dichas especies.

- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., & Griffiths, R. A. (2017b). Is the detection of aquatic environmental DNA influenced by substrate type? *PLOS ONE*, *12*(8), e0183371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183371>
- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., & Griffiths, R. A. (2018a). Seasonal variation in environmental DNA detection in sediment and water samples. *PLOS ONE*, *13*(1), e0191737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191737>
- Goldberg, C. S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., & Waits, L. P. (2013a). Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, *32*(3), 792-801. <https://doi.org/10.1899/13-046.1>
- Jaramillo Hoyos, C. L., Villa García, C. M., Armenteras Pascual, D., Casas Castañeda, F., Gast Harders, F., Cavelier Franco, I., Bello Silva, J. C., Díaz Merlano, J. M., Fandiño Orozco, M. C., Pardo Fajardo, M. del P., Chaves, M. E., Gaitán Uribe, M. M., Palacios Lozano, M. T., Mendieta Galindo, M., Álvarez Rebolledo, M., Rodríguez Eraso, N., García Galindo, O. L., & Franco Villegas, X. (2005). *Biodiversidad para el desarrollo. El manejo sostenible de ecosistemas como aporte al bienestar humano*. <http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/34607>

- Jiménez, C., Torres, R., & Corcuera, P. (2010). Biodiversidad una alérta.  
[http://www.uam.mx/difusion/casadeltiempo/36\\_iv\\_oct\\_2010/casa\\_del\\_tiempo\\_eIV\\_num36\\_09\\_16.pdf](http://www.uam.mx/difusion/casadeltiempo/36_iv_oct_2010/casa_del_tiempo_eIV_num36_09_16.pdf).
- Levy-Booth, D. J., Campbell, R. G., Gulden, R. H., Hart, M. M., Powell, J. R., Klironomos, J. N., Pauls, K. P., Swanton, C. J., Trevors, J. T., & Dunfield, K. E. (2007c). Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(12), 2977-2991.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.020>
- Nam, Y. K., Park, J. E., Kim, K. K., & Kim, D. S. (2003). A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fish using a restricted amount of fin tissue. *Transgenic Research*, 12(4), 523-525.  
<https://doi.org/10.1023/a:1024274508052>.
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Laramie, M. B., & Waits, L. P. (2013). *Application of environmental DNA for inventory and monitoring of aquatic species* (USGS Numbered Series N.º 2012-3146; Fact Sheet). U.S. Geological Survey. <http://pubs.er.usgs.gov/publication/fs20123146>.
- Tsuji, S., Takahara, T., Doi, H., Shibata, N., & Yamanaka, H. (2019). The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1(2), 99-108. <https://doi.org/10.1002/edn3.21>



- Takahara, T., Minamoto, T., & Doi, H. (2013). Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds. *PLOS ONE*, 8(2), e56584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056584>
- Turner, C. R., Uy, K. L., & Everhart, R. C. (2015a). Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, 183, 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.017>.
- Wasko, A. P., Martins, C., Oliveira, C., & Foresti, F. (2003). Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas*, 138(3), 161-165. <https://doi.org/10.1034/j.1601-5223.2003.01503>.

# GRACIAS!!

## EQUIPO LABINAM



**Andrés Caicedo**



**INNOVADORES  
MENORES DE 35  
LATAM**

Universidad San Francisco de Quito

