

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an



Proyecto No. 00089333: "Aumentar las Capacidades Nacionales para el Manejo de las Especies Exóticas Invasoras (EEI) a través de la Implementación de la Estrategia Nacional de EEI"

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Recomendaciones para la elaboración de un protocolo de detección temprana y respuesta rápida para especies acuáticas en Sian Ka'an



Fotografía: Chanchah Veracruz, Manuel Elías-Gutiérrez/ECOSUR, 2019

EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR, UNIDAD CHETUMAL

Octubre/2019

"Las opiniones, análisis y recomendaciones de política incluidas en este informe no reflejan necesariamente el punto de vista del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, como tampoco de su junta ejecutiva ni de sus estados miembros."



Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Título: *Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an*

Objetivo: *Elaborar la línea base de la biodiversidad algunos en los sistemas dulceacuícolas de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an que servirá de sustento en la elaboración de un protocolo de detección temprana de especies exóticas con herramientas moleculares.*

Autor(es): *Martha Valdez-Moreno y Manuel Elías Gutiérrez*

Modo de citar: PNUD México (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo). 2019. Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an. Proyecto 00089333 "Aumentar las capacidades de México para manejar especies exóticas invasoras a través de la implementación de la Estrategia Nacional de Especies Invasoras". Valdez-Moreno, M. & M., Elías Gutiérrez. El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, Quintana Roo, México. 26 pp.

Área objeto del informe: Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Fecha de inicio: 1/Julio/2019

Fecha de terminación: 25/Octubre/2019

Vínculo con la Estrategia Nacional sobre Especies Invasoras: El proyecto se vincula con el Objetivo Estratégico 1: "Prevenir, detectar y reducir el riesgo de introducción, establecimiento y dispersión de especies invasoras"; Metas: 1.2, "Información científica y técnica, relevante, oportuna y accesible, que genere capacidades en diversos sectores para atender las prioridades relacionadas con las especies invasoras. 1.4 "Mecanismos y protocolos estandarizados de prevención en operación, para reducir el riesgo de introducción, establecimiento y dispersión de especies invasoras. El resultado será el proponer un sistema de biomonitoreo de especies exóticas y nativas utilizando el ADN medioambiental basado en la elaboración de la línea base de zooplancton de los sitios estudiados. Una vez completa la línea base, también se podrá utilizar la metagenómica para monitorear el zooplancton. 1.5 "Sistemas coordinados para la detección, manejo de riesgo y alerta temprana de ingreso y dispersión de especies invasoras".

Resumen: En atención a la preservación de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an, una de las Áreas Naturales Protegidas más extensa y con mayor diversidad específica y ecosistémica en México es urgente generar información base que permita la detección rápida de las especies exóticas invasoras dentro del sistema, por lo que usando métodos moleculares, no invasivos al medio, se inició la primera línea base del zooplancton de 13 sistemas dulceacuícolas dentro de la Reserva que se contrastó con XX permitiendo la detección de 80 Unidades Taxonómicas Operativas (OTU, por sus siglas en inglés), confirmando la presencia del copépodo exótico *Mesocyclops thermocyclopoides*, originario del sureste asiático, en el Cenote Pucté Cafetal 1. Además, se encontraron dos posibles géneros nativos, posiblemente traslocados, estos son: el quironímido *Kiefferelus*, ampliamente distribuido en el viejo continente, con un solo registro previo en el continente americano en Brasil, y *Cyclops*, un género holártico. De los peces no se encontró ninguna especie exótica, y el método de biomonitorio con el uso de la metagenómica demostró ser sumamente efectivo, pues permitió la detección de 25 especies, adicionalmente tres de aves (*Aramides cajaneus*, *Megaceryle torquata*, *Meleagris gallopavo*), cinco de mamífero (*Artibeus lituratus*, *Lamproncyteris brachyotis*, *Lonchorhina aurita*, *Oryzomys couesi*, *Pteronotus parnellii*) y dos de reptiles (*Kinosternon acutum*, *Trachemys* sp.). Así mismo detectamos dos complejos de especies "jóvenes", es decir de evolución reciente con baja resolución para el gen, pero ambos con una distribución en la península de Yucatán. Podemos concluir que los métodos de recolecta y análisis molecular, es permitirán una conservación de la reserva mucho más acertada, pues los datos obtenidos comprueban la eficacia de los métodos moleculares para la identificación precisa de un 99% de las OTU's encontradas. Es necesario continuar con la creación de la línea base de zooplancton acuático, aunque este primer resultado permitió construir la lista más completa de especies presentes en los 13 sistemas estudiados, es necesario ampliar a diferentes épocas del año y abarcando más microambientes de cada sistema, como vegetación sumergida, región limnética, raíz de mangle y los estromatolitos. Toda esta investigación dio sustento a emitir una serie de recomendaciones que finalmente formaran parte de una propuesta para un protocolo para la detección temprana de especies exóticas en la reserva de Sian Ka'an.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	5
2	OBJETIVO	6
	2.1 Objetivo general.....	6
	2.2 Objetivos específicos	6
3	RECOMENDACIONES PARA LA ELABORACIÓN DE UN PROTOCOLO DE DETECCIÓN TEMPRANA PARA ESPECIES EXÓTICAS EN LA RESERVA DE LA BIOSFERA SIAN KA'AN	7
	3.1 Recolección de muestras para desarrollar la línea base de organismos presenten en los sistemas acuáticos (ADN ambiental y trampas de luz).....	7
	I. Desarrollo de línea base	8

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

II.	Selección de sitios y planeación	9
III.	Recolecta de muestras con trampa de luz en campo para la línea base	10
IV.	Recolecta de muestras para ADN medioambiental	13
V.	Trabajo en laboratorio de campo (Oficina Central de la Reserva de Sian Ka'an)	14
VI.	Proceso de filtración	15
VII.	Procesamiento de muestras medioambientales en laboratorio especializado	16
VIII.	Monitoreo continuo/anual para DTRR	18
3.2	Metagenómica con el zooplancton	19
I.	Recolecta y procesamiento de las muestras	19
IX.	Secuenciación y análisis de datos	20
4	PROTOCOLO A SEGUIR EN CASO DE DETECCIÓN DE UNA ESPECIE EXÓTICA	20
	Primer paso:	21
	Segundo paso:	22
5	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
6	ANEXO 1. COSTOS	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Tipos de muestreos sugeridos en la planeación de una estrategia para desarrollar la línea base de organismos en cada sistema. A) Muestreo piloto (o preliminar); B) Muestreo de varios sitios dentro del mismo sistema acuático; C) Muestreo continuo del sistema acuático (comprendiendo varias épocas del año); D) Dar seguimiento al estudio realizando algunos muestreos interanuales (ver texto para una explicación detallada)</i>	<i>8</i>
Figura 2.	<i>Colocación de la trampa de luz</i>	<i>11</i>
Figura 3.	<i>Extracción de la trampa de luz en la mañana</i>	<i>11</i>
Figura 4.	<i>Imagen que muestra el proceso de obtención y fijación de la muestra de zooplancton</i>	<i>12</i>
Figura 5.	<i>Muestra recién colectada, etiquetada y fijada con alcohol</i>	<i>12</i>
Figura 6.	<i>Muestreo buscando diferentes ambientes que contemplen la vegetación sumergida y las raíces de los mangles</i>	<i>13</i>
Figura 7.	<i>Equipo necesario para la toma de muestra de agua para el ADN medioambiental</i>	<i>13</i>
Figura 8.	<i>Toma de muestra de 1 L de agua en una botella de CIVEQ® esterilizada.</i>	<i>14</i>
Figura 9.	<i>Laboratorio de campo para la filtración de muestras para el ADN medioambiental.</i>	<i>14</i>
Figura 10.	<i>Detalle del material para filtrado (bombas de vacío, frasco kitasato con el filtro para el agua)</i>	<i>15</i>
Figura 11.	<i>Tubos Falcon con los filtros listos para ser empaquetados.</i>	<i>15</i>
Figura 12.	<i>Paquete listo con las muestras para ser enviado.</i>	<i>16</i>
Figura 13.	<i>Sistema de Comando propuesto por Mendoza (com. pers.)</i>	<i>22</i>
Figura 14.	<i>Sistema de Comando propuesto por Mendoza (com. pers.), modificado por Martha Valdez/ECOSUR, 2019</i>	<i>23</i>

Índice de Tablas

Tabla 1. Lista de materiales para la salida al campo (Fuente: Elaboración propia Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019).	9
Tabla 2. Ejemplo de hoja de campo (Fuente: Elaboración propia Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019). ...	20

1 INTRODUCCIÓN

Las Áreas Naturales Protegidas de Quintana Roo, como la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an declarada Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO y sitio Ramsar, enfrentan, desde el punto de vista biológico, dos problemas muy importantes: la pérdida de biodiversidad y las invasiones biológicas (Santander-Monsalvo *et al.*, 2018).

Los programas de biomonitoreo convencional requieren un esfuerzo extenso con muestreos repetidos en el tiempo y espacio (Baird & Hajibabaei, 2012), además del empleo de métodos invasivos (redes y electropesca) que resulta perjudicial para el hábitat (King & Crook, 2002; Collins *et al.*, 2013). En los muestreos pocas veces se revelan todas las especies presente en un sistema particular y cada espécimen recolectado debe, obviamente, identificarse hasta el nivel taxonómico más específico, lo que requiere acceso a expertos taxonómicos (Gomes *et al.*, 2015). Dadas estas limitaciones y en la búsqueda de técnicas que permitan la solución de estos problemas, los métodos basados en técnicas de biología molecular son un enfoque atractivo para la cuantificación de la biodiversidad en los ecosistemas (Valdez-Moreno *et al.*, 2019).

La técnica de biología molecular conocida como Código de barras, consiste en emplear un fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) como marcador para la identificación de especies (Hebert *et al.*, 2003); posteriormente esta información es integrada a la plataforma informática conocida como BOLD systems (por sus siglas en inglés, Barcode of Life Data system). Dicha metodología ha demostrado tener una eficiencia superior al 90% en la determinación de especies (Ivanova *et al.*, 2009) por lo que se propuso para la identificación de los diferentes taxones del zooplancton dentro del presente Protocolo de Detección Temprana y Respuesta Rápida (DTRR).

Por su parte, el ADN ambiental (eDNA, por sus siglas en inglés) es una técnica que ha ganado popularidad para el monitoreo biológico, especialmente en proyectos para la detección de especies invasoras y la elaboración de estudios de referencia sobre las comunidades de animales y plantas presentes en los ecosistemas. Consiste en la separación del ADN disponible, a partir de los diferentes exudados que los organismos dejan, en muestras ambientales (dígase agua, sedimentos o hielo, según sea el caso) (Rees *et al.*, 2014). Este procedimiento se encuentra dentro del conjunto de técnicas conocidas como *metagenómica*, la cual se encuentra basada en plataformas de secuenciación de segunda y tercera generación.

La rápida adopción de bio-evaluaciones basadas en ADN medioambiental es reflejo de dos factores principales: 1) mejor acceso a las secuencias de referencia necesarias para vincular las lecturas cortas de eADN a sus especies de origen; y, 2) la disponibilidad de secuenciadores de alto rendimiento que generan grandes volúmenes de datos a un costo, moderadamente, accesible (Goldberg *et al.*, 2016).

En México, el grupo de trabajo de ECOSUR fue pionero en la aplicación de análisis de ADN ambiental en un sistema tropical oligotrófico y en 13 sistemas asociados con la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an para el análisis integral de la comunidad de peces y zooplancton allí presentes (Valdez-Moreno *et al.*, 2019). A partir de esta experiencia, deriva la presente compilación de metodologías y recomendaciones útiles en el monitoreo no invasivo de los sistemas para la detección temprana de especies exóticas, sentando un precedente con el sobre el que las autoridades competentes puedan formular estrategias para su combate, manejo, y probable restauración de la biodiversidad nativa.

Es fundamental destacar que un biomonitoreo eficiente a lo largo del tiempo dependerá de tres factores principales: 1) una eficaz recolección de muestras, 2) acceso a las secuencias de códigos de barras de la vida; y, 3) la aplicación de técnicas de metagenómica. Esto nos permitirá detectar cambios en la composición de zooplancton y peces asociado a las alteraciones provocadas por contaminación, introducción -voluntaria o involuntaria- de especies exóticas invasoras (EEI), o el cambio climático, entre otras.

La detección temprana de cualquier EEI, acompañada de una respuesta rápida oportuna, amplia las probabilidades de detener una invasión o de controlar la dispersión de aquellas especies que han logrado establecerse. Desde el punto de vista económico, las estrategias de prevención constituyen la alternativa menos costosa y más efectiva de tratar a las EEI.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo general

Generar una serie de recomendaciones para la elaboración de un protocolo de detección temprana usando un biomonitoreo no invasivo de ecosistemas acuáticos, basados en el gen COI y el eDNA en sistemas dulceacuícolas de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an, a fin de detectar la presencia de especies exóticas invasoras (EEI).

2.2 Objetivos específicos

- Estas recomendaciones para el sistema de detección temprana de EEI acuáticas en la Reserva Sian Ka'an, permitirán implementar acciones de respuesta rápida para evitar su establecimiento.

- Plantear un Protocolo de Detección Temprana y Respuesta Rápida (DTRR) para EEI en el Complejo Sian Ka'an y su zona de influencia.

3 RECOMENDACIONES PARA LA ELABORACIÓN DE UN PROTOCOLO DE DETECCIÓN TEMPRANA PARA ESPECIES EXÓTICAS EN LA RESERVA DE LA BIOSFERA SIAN KA'AN

Este equipo de trabajo, a partir de la experiencia obtenida del primer muestreo realizado en 13 sistemas asociados a la RB Sian Ka'an, sugiere los siguientes pasos para desarrollo de un protocolo de DTRR.

3.1 Recolección de muestras para desarrollar la línea base de organismos presentes en los sistemas acuáticos (ADN ambiental y trampas de luz)

Se deberán continuar el desarrollo de las técnicas desarrolladas en el Producto 3, Métodos de colecta y análisis de muestras en laboratorio, para establecer cuáles son las especies presentes en los sistemas acuáticos. En las siguientes figuras se resume el método empleado, que consistió en el muestreo con "trampas de luz" para la recolecta de zooplancton y de agua para la obtención de ADN ambiental (Figura 1).

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

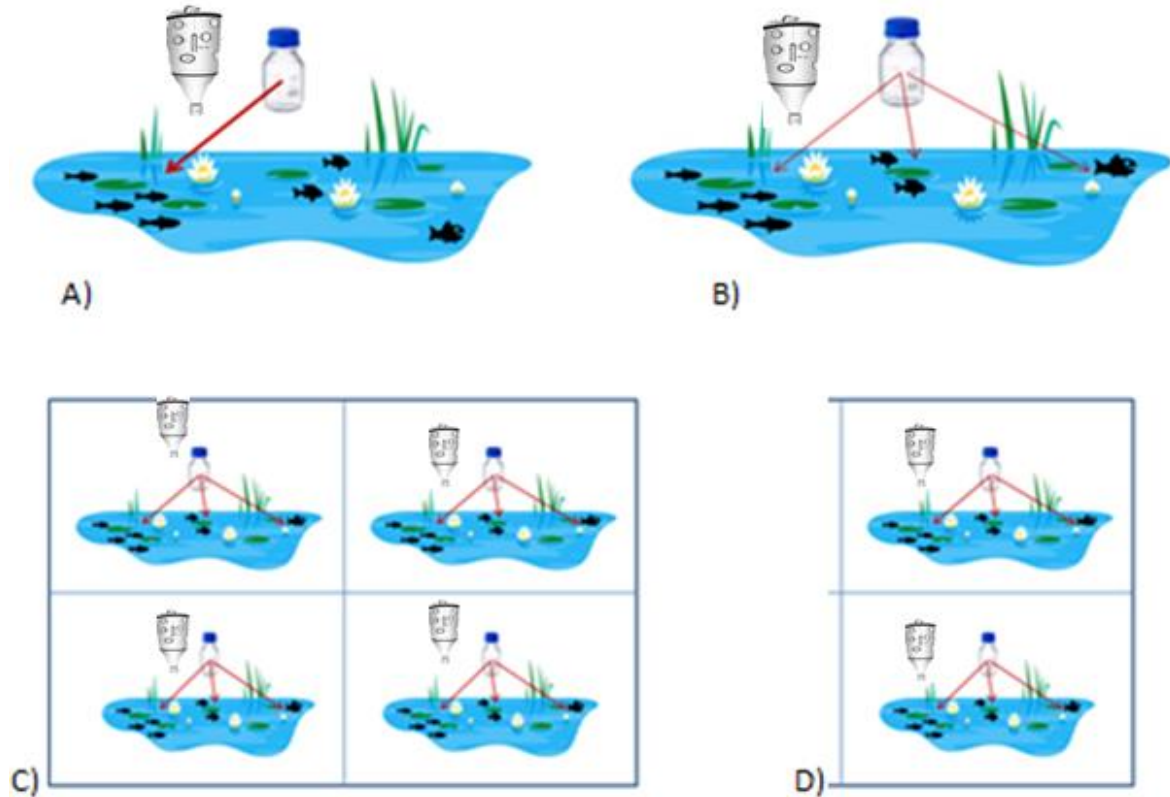


Figura 1. Tipos de muestreos sugeridos en la planeación de una estrategia para desarrollar la línea base de organismos en cada sistema. A) Muestreo piloto (o preliminar); B) Muestreo de varios sitios dentro del mismo sistema acuático; C) Muestreo continuo del sistema acuático (comprendiendo varias épocas del año); D) Dar seguimiento al estudio realizando algunos muestreos interanuales (ver texto para una explicación detallada)

(Fuente: Elaboración propia Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019).

I. Desarrollo de línea base

Es fundamental continuar con la elaboración de la línea base de los organismos presentes en los ecosistemas epicontinentales, se sugiere, para hacer eficiente el proceso de colecta, emplear las técnicas desarrolladas por el equipo de trabajo dentro de la presente consultoría. Se deberá ampliar el esfuerzo de muestreo, por lo que en cada sistema acuático se deberán realizar muestreos en diferentes puntos de colecta y en diferentes épocas interanuales. Con el objeto de tener un panorama completo de la composición biológica en cada lugar, de manera preliminar se sugiere, trabajar, al menos, en época de secas, de lluvias y de nortes (ver Figura 1C).

En el proceso de reconocimiento de los seres vivos presentes en los sistemas, se propone considerar a las Unidades Taxonómicas Operativas (OTU's, por sus siglas en inglés) para facilitar la determinación taxonómica de los organismos. Lo anterior debido a que la identificación a través de guías y especialistas resulta más complicada (tiempo/esfuerzo) respecto a la técnica de OTU's, donde la identificación se realiza, con un mecanismo sencillo similar a un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), que instantáneamente da resultados precisos.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Por esta razón, es necesario ampliar el esfuerzo de muestreo y el número de especímenes secuenciados, con lo cual se podrá elaborar una curva de acumulación de OTU's y con el programa EstimateS (Colwell, 2013) o uno similar extrapolar al número de especies posibles en cada sistema, a fin de evitar la aparición de secuencias sin identificar al máximo.

II. Selección de sitios y planeación

Para la toma de muestras estaría involucrado tanto el personal de la Reserva como personas voluntarias de las comunidades cercanas a los sistemas acuáticos que quisieran participar. Para esto, ECOSUR puede implementar un taller de capacitación para todos aquellos interesados en la conservación de la reserva. Este curso haría énfasis en la importancia del estudio y preservación de los sistemas acuáticos, los beneficios que da a la comunidad la preservación de dichos sistemas y la enseñanza de la técnica de muestreo, fijación de muestreo y posterior transporte (atendiendo a una cadena de frío con la metodología que se detalla a continuación:

1. Ubicación de los sitios de muestreo. Previo a la llegada se deberán ubicar las estaciones en cada sistema acuático utilizando diferentes fuentes para determinarlas (puede ser Google Earth o la experiencia de los lugareños).
2. Una vez en los sitios de trabajo se deberán anotar sus coordenadas. Se sugiere usar el programa *GPS test*, aplicación gratuita que se descarga para teléfonos celulares, que resulta muy precisa pues se conecta directamente a los satélites del sistema GPS sin estar asociada a una red fija de internet o a datos móviles.

2. Elaboración de la lista de materiales para el procesamiento de las muestras (Tabla 1)

Tabla 1. Lista de materiales para la salida al campo (Fuente: Elaboración propia Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019).

Material	Unidad (por muestra)	Comentario de cuidado
Trampa de Luz	1	Limpia
Frascos para la trampa	1	Nuevos o limpios
Lámpara acuática para la trampa		
Filtro para colar la muestra	1	
Alcohol al 96% desnaturalizado	3 litros	
Frascos de plástico de 1l para fijar la muestra	2	Nuevos
Pilas	4	
Frascos de vidrio para laboratorio c/tapa autoclavable	1	Esterilizado y cubierto de aluminio y envuelto en una bolsa ziploc
Gotero para pavo		Nuevo (o esterilizado con cloro en una proporción 1:5 con agua y posteriormente lavado con alcohol al 96%)
Hielera para transportar material	1	Limpia y esterilizada como en el paso anterior
Guantes de látex sin polvo	4 pares	

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Hielera grande	1	
Hielo	2-3 bolsas	
Masking tape	1	
Marcador permanente	1	
Bolsas de plástico tipo ziploc grandes		
lápiz	1	
Agua 1 galón	1	
Bitácora		
Teléfono celular con GPS y Cámara	1	
Cuerda 3 m	1	
Material para el filtrado del Agua		
Bomba de vacío	1	Limpia
Kitasato de 1l	1	Esterilizadas
Mangueras de plástico	6	Esterilizadas
Tapa bocas		
Guantes de látex sin polvo		
Filtros	1	
Pinzas	2	Esterilizadas
Tubos falcón 15 ml	1	Nuevo
Caja de unicel para transportar las muestras	1	Nueva
bolsas de gel para congelar	5	Nuevas o limpias

III. Recolecta de muestras con trampa de luz en campo para la línea base

En cada sitio de recolecta se colocará una trampa de luz (diseño de Montes-Ortiz & Elías-Gutiérrez, 2018) que trabajará durante el periodo nocturno, se sugiere colocar desde la puesta de sol hasta el amanecer del siguiente día, para que la trampa trabaje unas 8-9 horas, pero este valor puede variar dependiendo del estado trófico del sistema (en algunos casos en sistemas eutróficos se puede saturar antes de este tiempo).

La lámpara deberá encenderse previo a introducir la trampa al agua.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an



Figura 2. Colocación de la trampa de luz
(Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019).



Figura 3. Extracción de la trampa de luz en la mañana
(Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019).

Las muestras serán depositadas en un tamiz, que deberá tener la misma abertura de malla que el copo de la trampa de luz, y se lavará con alcohol frío al 96% hasta retirar todo el material que esté todavía presente en las paredes del copo o de la red.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an



Figura 4. Imagen que muestra el proceso de obtención y fijación de la muestra de zooplancton (Fotografía: José Ángel Cuhuo Colli/ECOSUR, 2019).

Estas muestras se conservarán en alcohol frío al 96% (por al menos 72 horas) previo a su procesamiento en el “laboratorio de campo”, el cual puede instalarse en las oficinas centrales de la Reserva, localizadas en Carrillo Puerto de donde se mandarán al ECOSUR, sede Chetumal, para su posterior tratamiento.



Figura 5. Muestra recién colectada, etiquetada y fijada con alcohol (Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019).

En el proceso de selección de los puntos de muestreo dentro de un sistema acuático, se recomienda seleccionar observar las particularidades de este para hacer el muestreo, estos

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

pueden ser sitios con vegetación sumergida (raíces de los mangles), espacios que se vean más superficiales respecto al resto del área inundada, entre otros. Cabe destacar que, en el caso de los sistemas pequeños, las trampas se pueden colocar cerca de la zona litoral.



Figura 6. Muestreo buscando diferentes ambientes que contemplen la vegetación sumergida y las raíces de los mangles (Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019).

IV. Recolecta de muestras para ADN medioambiental

De manera inicial, se preparan todos los utensilios necesarios para la toma de agua, éstos deberán estar esterilizados y permanecer envueltos en bolsas de plástico antes de llegar a los sitios de colecta para evitar contaminación por elementos ajenos a los sistemas (Figura 7).



Figura 7. Equipo necesario para la toma de muestra de agua para el ADN medioambiental (Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019).

En cada sitio de colecta, se deberá tomar una muestra de 1 L de agua en una botella de CIVEQ® esterilizada. Se recomienda tomar al menos 4 muestras litorales, cada una de 1 l, en partes opuestas del sistema, o bien donde los pescadores sepan que se acumulan los peces en cada sistema (la técnica de recolección se enseñaría en el taller de capacitación).

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an



Figura 8. Toma de muestra de 1 L de agua en una botella de CIVEQ® esterilizada.
Fotografía: Erika Alarcón/ECOSUR, 2019.

Todas las muestras se colocarán inmediatamente en hielo y luego se transportarán al laboratorio de campo (Oficinas Centrales de la Reserva en Carrillo Puerto) para su procesamiento inicial. Se tendrá especial cuidado en contar con la cantidad de hielo suficiente para mantener las muestras frías durante los traslados.

V. Trabajo en laboratorio de campo (Oficina Central de la Reserva de Sian Ka'an)

Un cubículo de sus instalaciones será limpiado y adecuado para que se realice la filtración de las muestras para el ADN medioambiental (Figura 9).



Figura 9. Laboratorio de campo para la filtración de muestras para el ADN medioambiental.
Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.

VI. Proceso de filtración

El material necesario para este proceso se menciona en la Tabla 1.

Es fundamental que el proceso entre la filtración de agua se realice dentro de las 48 horas posteriores a la toma de muestras para evitar la degradación del ADN (Valdez-Moreno *et al.*, 2019) (Figura 10).



Figura 10. Detalle del material para filtrado (bombas de vacío, frasco kitasato con el filtro para el agua)
(Fotografía: Erika Alarcón Chavira/CONANP, 2019).

Cada muestra de agua se filtrará en filtros de 0.22 μm , los filtros se colocarán en tubos Falcon esterilizados que se mantendrán en un sistema frío (-18°C).

Posteriormente se prepararán para su envío al lugar designado para su procesamiento final, por lo que los tubos deberán ser almacenados en una hielera acompañada de gel congelado, para preservar las muestras a una temperatura inferior a los cero grados centígrados.



Figura 11. Tubos Falcon con los filtros listos para ser empaquetados.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

(Fotografía: Erika Alarcón Chavira/CONANP, 2019).



Figura 12. Paquete listo con las muestras para ser enviado.
(Fotografía: Erika Alarcón Chavira/CONANP, 2019).

La instalación para el procesamiento final de las muestras (Centre for Biodiversity Genomics en la Universidad de Guelph Canadá o cualquier otro laboratorio con capacidad de realizar este trabajo) será donde se llevará a cabo la extracción y secuenciación del ADN de las muestras medioambientales. Cabe destacar que estos procesos se encuentran en constante actualización, lo que se ilustra a continuación deberá considerarse sólo como ejemplo.

VII. Procesamiento de muestras medioambientales en laboratorio especializado

Antes de la extracción del ADN, todas las superficies de laboratorio se esterilizarán con hipoclorito de sodio al 10%, seguido de etanol al 70%. Las pipetas se limpiarán repetidamente con hipoclorito de sodio al 10%, seguido de etanol al 70% durante la extracción y los guantes se cambiarán con frecuencia. Los rotores de centrifugación, los adaptadores y los bastidores de tubos se lavarán con ELIMINase diluido (Decon Labs) (1:10) y se enjuagarán con agua desionizada.

El ADN se extraerá de los filtros de las muestras de agua usando un kit de extracción de ADN PowerWater (MoBio) siguiendo un protocolo de lisis modificado (los tubos se incubarán a 65° C previo a la etapa de molienda) para evitar la contaminación cruzada entre muestras; la cantidad que deberá ser obtenida es de 625 µl. Posteriormente, los tubos se incubarán a 56 ° C durante 15 minutos antes de la elución del ADN en 100 µl de tampón PW6 y se cuantificarán utilizando el Qubit 2.0 y el kit denominado dsDNA de HS (No. Q33231). Se realizará una primera amplificación del material genético por PCR, que servirá como plantilla para una segunda ronda de reacción en cadena de la polimerasa a fin de aumentar la recuperación de ADN y reducir el posible sesgo introducido por los cebadores de fusión que contienen adaptadores de secuenciación y etiquetas como identificadores moleculares

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

únicos (UMI, por sus siglas en inglés). Esto dará un segmento con una extensión entre 184-187 pares de bases de la región del gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) empleando dos conjuntos de cebadores (AquaF2 / C_FishR1 y AquaF3 / C_FishR1) que se sabe que son efectivos para los vertebrados.

Las reacciones de PCR emplearán la mezcla descrita y Platinum Taq. La primera ronda de PCR seguirá el siguiente régimen térmico: 94 °C durante 2 min; 40 ciclos de 94 °C durante 40 s; anillamiento a 51 °C para AquaF2 (o 50° C para AquaF3 durante 1 min), con una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Después de la primera ronda, los productos de la PCR se diluirán dos veces con agua de grado molecular y se transferirán 2 µl del volumen resultante a un nuevo tubo para una segunda ronda de PCR para crear las bibliotecas de amplicones etiquetadas con identificadores moleculares únicos (UMI) con cebadores de fusión que contienen Ion Xpress™ las Etiquetas MID y los adaptadores de iones. El régimen de PCR para la segunda ronda consistirá en 94 °C durante 2 min, 20 ciclos de 94° C durante 40 s, anillamiento a 51 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min, con una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se visualizarán en un E-Gel96 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Las bibliotecas para AquaF2 / C_FishR1 y AquaF3 / C_FishR1 se purificarán por separado usando perlas magnéticas preparadas y se cuantificarán usando el kit de ADN de Qubit 2.0 y HS, y se normalizarán a 13 pM antes de la secuenciación. Las bibliotecas de amplicones se secuenciarán en una Personal Genome Machine (PGM Ion Torrent) utilizando los kits de 400 plantillas y secuenciación siguiendo las instrucciones del fabricante con un chip 316 o el que corresponda a la plataforma que se utilice.

Las secuencias crudas serán tratadas de la siguiente manera: se utilizará el software Cutadapt (v1.8.1), o alguno similar a éste, para recortar las secuencias de los cebadores; Sickle (v1.33) se usará para el filtrado de tamaño (se retendrán secuencias de 150-250 pb), mientras que se utilizará Uclust (v1.2.22q) para reconocer las OTU basadas en la identidad > 98% y una profundidad de lectura mínima de 2 umbrales. El algoritmo local Blast 2.2.29+ se usará para comparar cada OTU con las secuencias de referencia en cinco conjuntos de datos: datos públicos de peces de BOLD filtrados a nivel de identificación de género y especie (130,357 secuencias), y datos públicos de BOLD para las clases Amphibia, Aves, Mammalia y Reptilia representada por los siguientes conjuntos de datos: DS-EBACAMPH (11,018 secuencias), DS-EBACAVES (28,914 secuencias), DS-EBACMAMM (39,890 secuencias), DS-EBACREPT (5,424 secuencias). Los resultados de la salida del Raw Blast se analizarán utilizando un script de Python personalizado denominado OTUBlastParser.py, y se concatenarán utilizando ConcatenatorResults.py (Bessonov, 2018). Los resultados procesados en formato delimitado por tabuladores se importarán a Excel. Se realizará un filtrado por puntaje mínimo de 250, y 97-100% de rango de identidad para identificar correctamente a las especies.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Finalmente, una vez que la línea base esté construida, se implementará la metagenómica para muestras de zooplancton y búsqueda de especies exóticas de manera rutinaria.

VIII. Monitoreo continuo/anual para DTRR

Una vez que se tenga una línea base lo más completa posible, es decir cuando la curva de acumulación de especies se acerque a la asíntota, consideramos que será necesario realizar, al menos, **un muestreo al año** que involucre dos análisis metagenómicos:

- a) Recolección de muestras de agua (ver metodología definida en el punto V) en los sistemas acuáticos para la **detección de peces y otros vertebrados**. Esto obedece a que, por el momento, la línea base de estos organismos es más completa que la del zooplancton.
- b) Recolección de muestras de **zooplancton** en los mismos sitios de recolección donde se tomaron las muestras de agua, por lo que será necesario dejar una trampa de luz que permanezca activa durante la noche.

3.2 Metagenómica con el zooplancton

I. Recolecta y procesamiento de las muestras

Esta metodología deberá aplicarse tanto para la colecta de muestras para elaborar la línea base como para los resultados del monitoreo continuo, propuesto en el punto 3.1 ii) para la detección de especies exóticas.

Teniendo en consideración la experiencia generada en el presente proyecto, que el procesamiento final de las muestras deberá ser llevado a cabo por un laboratorio especializado.

Los puntos de muestreo deberán ser lo más similar a aquellos en lo que se trabajó para crear la línea base.

Se obtendrá una alícuota del total de la muestra obtenida con la trampa de luz, cuya metodología está descrita en el Producto 3 de la presente consultoría.

La mencionada alícuota será la base para el análisis genético.

De manera inicial, se realizará la evaporación del alcohol, presente en la muestra, en una incubadora a 51°C. Posteriormente se homogeneizará la muestra con un mortero esterilizado, el “homogenizado” resultante será la base para la siguiente etapa del proceso.

Previo a cualquier actividad, las superficies de laboratorio se esterilizarán con hipoclorito de sodio al 10%, seguido de etanol al 70%. Las pipetas se limpiarán repetidamente con hipoclorito de sodio al 10%, seguido de etanol al 70% durante la extracción y los guantes se cambiarán con frecuencia. Los rotores de centrifugación, los adaptadores y los bastidores de tubos se lavarán con ELIMINase diluido (Decon Labs) (1:10) y se enjuagarán con agua desionizada.

Se realizará una primera amplificación por PCR. El producto de PCR diluido de la primera amplificación servirá como plantilla para una segunda ronda de PCR con cebadores de fusión que contengan adaptadores de secuenciación y etiquetas UMI.

Se amplificará un segmento de 184-187 pares de bases de la región del código de barras de COI con un conjunto de cebadores, denominados *Zplank*, diseñados por Prosser y colaboradores (2013), que han demostrado ser efectivos para todos los invertebrados (Elías-Gutiérrez *et al.* 2018). Las reacciones de PCR emplearán dicha mezcla maestra y Platinum Taq. La primera ronda de PCR empleará el siguiente régimen térmico: 94 °C durante 2 min, 40 ciclos de 94 °C durante 40 s, anillamiento a 51 °C durante 1 min, y 72 °C para 1 min, con una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Después de la primera ronda, los productos de la PCR se diluirán dos veces con agua de grado molecular y se transferirán 2 µl de la mezcla a un nuevo tubo para una segunda ronda

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

de PCR; con esto se creará las bibliotecas de amplicones etiquetadas con identificadores moleculares únicos (UMI) con cebadores de fusión que contienen Ion Xpress™ las Etiquetas MID y los adaptadores de iones. El régimen de PCR para la segunda ronda consistirá en 94 °C durante 2 min, 20 ciclos de 94° C durante 40 s, anillamiento a 51 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min, con una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se visualizarán en un E-Gel96 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Las bibliotecas para *Zplank* se purificarán usando perlas magnéticas preparadas y se cuantificarán usando el kit de ADN de Qubit 2.0 y HS, y se normalizarán a 13 pM antes de la secuenciación. Las bibliotecas de amplicones se secuenciarán en una Personal Genome Machine con un S5 utilizando los kits de 400 plantillas y secuenciación siguiendo las instrucciones del fabricante con un chip de 530 o cualquier otra plataforma de secuenciación de siguiente generación.

IX. Secuenciación y análisis de datos.

Se creará un dataset con todos los datos de invertebrados de la península de Yucatán y se contrastará con los resultados de la metagenómica. El tratamiento bioinformático de las muestras crudas de metagenómica con el zooplancton será similar al que se propuso para los peces.

Finalmente, con los resultados obtenidos de cada análisis metagenómico se entregará una hoja de Excel y un informe sobre el estado que guardan las especies exóticas acuáticas en la Reserva de Sian Ka'an al responsable del área protegida.

El formato de la hoja Excel será similar al siguiente, haciendo referencia a los hits como el número de secuencias obtenidas para esa especie en particular en cada localidad. Se hará énfasis si hay registro de alguna especie exótica (Tabla 2)

Tabla 2. Ejemplo de hoja de campo (Fuente: Elaboración propia Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019).

Identificación	LOCALIDAD 1	LOCALIDAD 2	ETC...							
<i>Nombre de la especie</i>	Aciertos									

4 PROTOCOLO A SEGUIR EN CASO DE DETECCIÓN DE UNA ESPECIE EXÓTICA

En el caso de que se detecte la presencia de una especie invasora se seguirán los pasos del Sistema de Comando de Incidentes propuesto por Mendoza (*com. pers.*), mismo que describimos a continuación:

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Primer paso:

En caso de detección de una especie acuática invasora, se deberán considerar los siguientes criterios para ejecutar alguna acción:

- ¿Es del conocimiento que la especie causa impactos significativos (rango nativo o no nativo)?

Si la respuesta es afirmativa, es candidata para la acción potencial

- ¿Es una especie de alto impacto para la región?

Si la respuesta es afirmativa, es candidata para la acción potencial

- ¿La población está restringida permitiendo su erradicación efectiva?

Si la respuesta es afirmativa, es candidata para la acción potencial

- ¿La especie tiene posibilidades de colonización, supervivencia y establecimiento?

Si la respuesta es afirmativa, es candidata para la acción potencial

Continuar con el segundo paso.

Segundo paso:

Si uno a o más respuestas a las preguntas anteriores es afirmativa, la especie es candidata para la acción potencial y se debe notificar al responsable de la Reserva de la Biosfera de Sian Ka'an.

Los pasos por seguir deberán ser de acuerdo al siguiente diagrama de flujo:

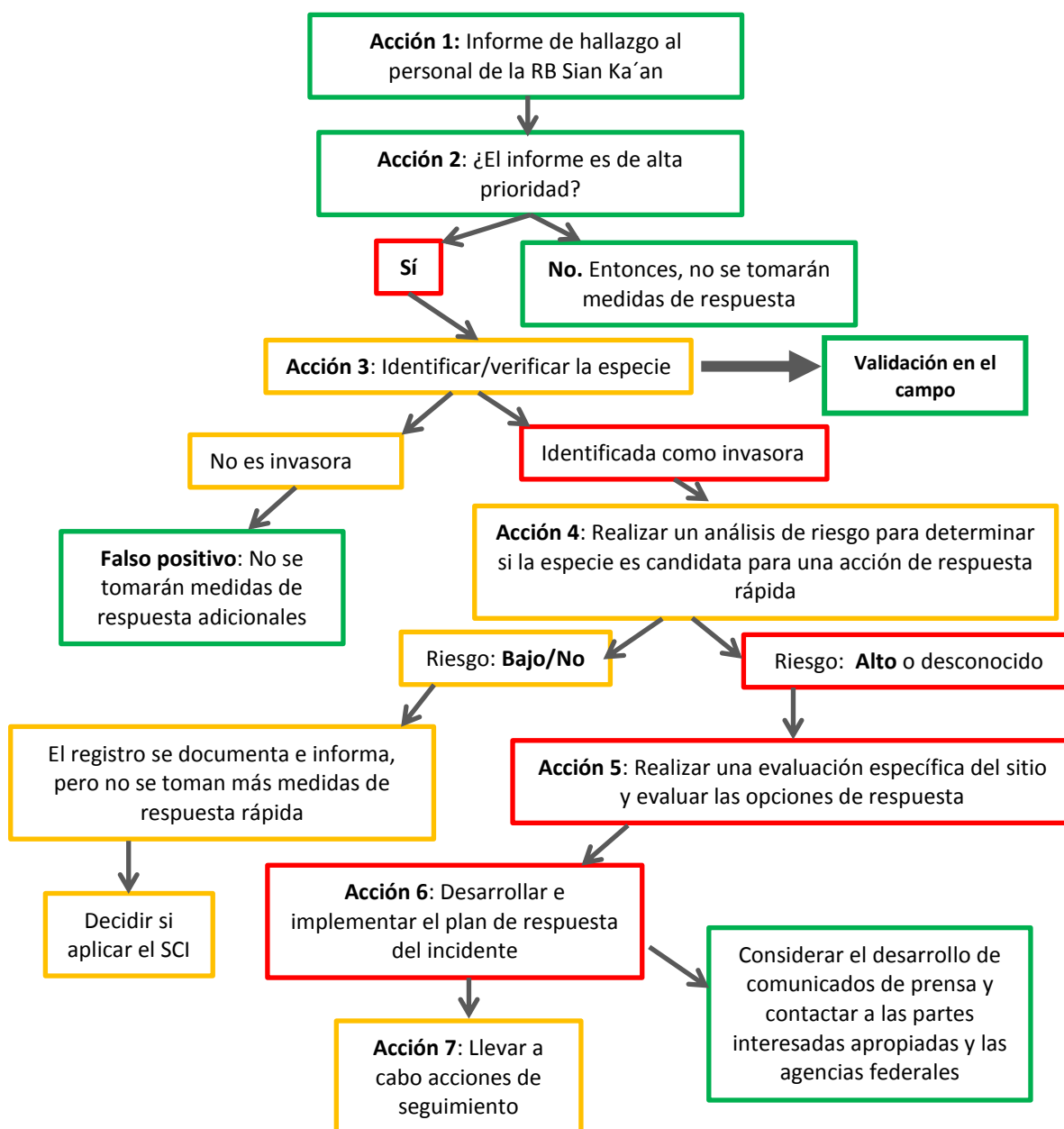


Figura 13. Sistema de Comando propuesto por Mendoza (com. pers.)

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

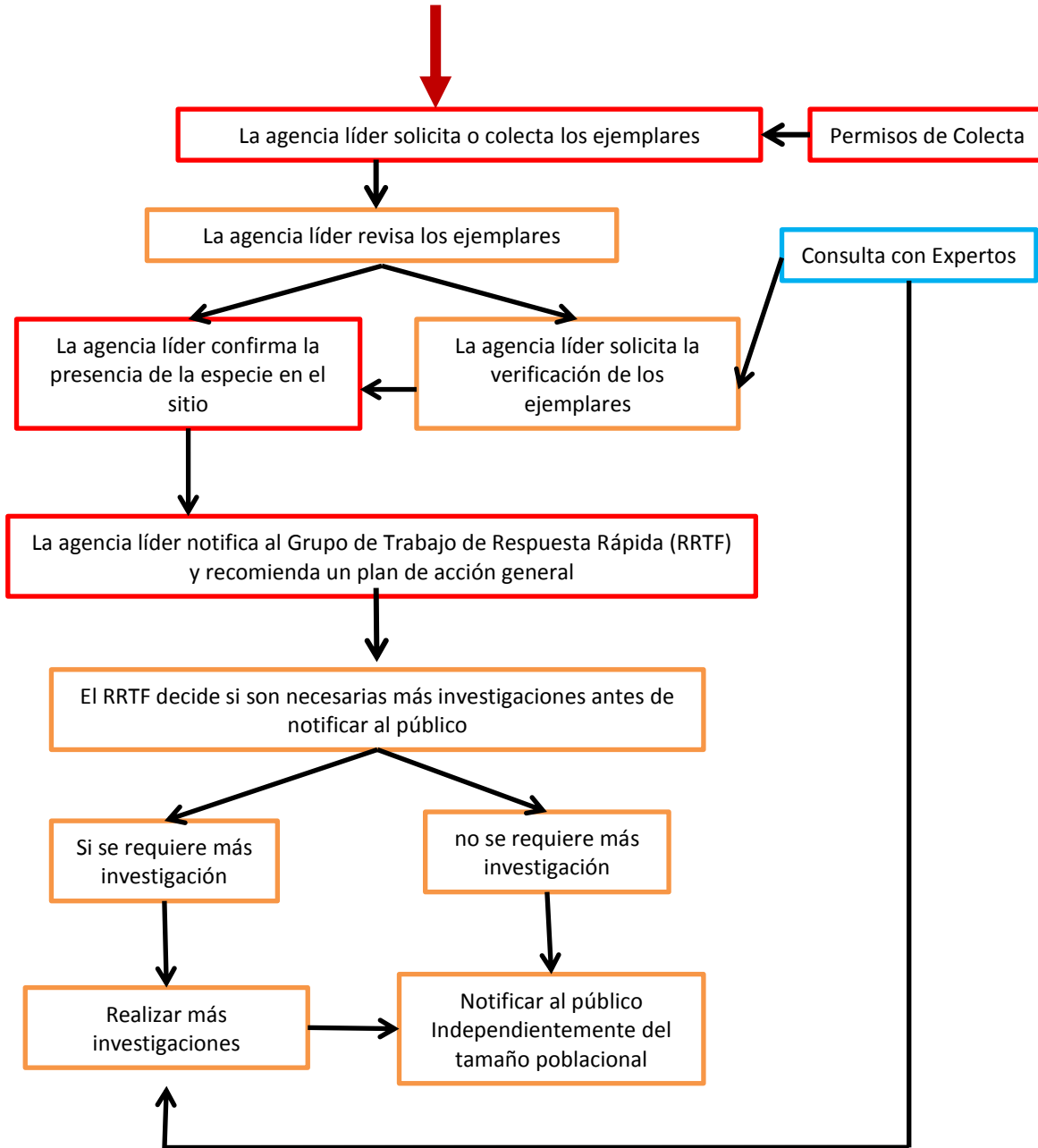


Figura 14. Sistema de Comando propuesto por Mendoza (com. pers.), modificado por Martha Valdez/ECOSUR, 2019

Finalmente, estas acciones requieren la intervención de diferentes niveles y sectores del gobierno, la academia y la sociedad, a fin de garantizar un manejo adecuado de cualquier emergencia que eventualmente se presente debido a la aparición de una especie exótica invasora.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baird, D. J. & Hajibabaei, M.** 2012. Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology*. 21(8): 2039-2044.
- Bessonov, K.** 2018. **OTUExtractorFromBLASTOutput**. Fecha de Actualización: 22 de junio de 2019.
<https://gitlab.com/biodiversity/OTUExtractorFromBLASTOutput>
- Colwell, R. K.** 2013. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9 User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>.
- Collins, R. A., Armstrong, K. F., Holyoake, A. J. & Keeling, S.** 2013. Something in the water: biosecurity monitoring of ornamental fish imports using environmental DNA. *Biological Invasions*. 15(6): 1209-1215.
- Elías-Gutiérrez, M., Valdez-Moreno, M., Topan, J., Young, M. R. & Cohuo-Colli, J. A.** 2018. Improved protocols to accelerate the assembly of DNA barcode reference libraries for freshwater zooplankton. *Ecology and Evolution*. 8(5): 3002-3018.
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A. & Taberlet, P.** 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*. 7(11): 1299-1307.
- Gomes, L. C., Pessali, T. C., Sales, N. G., Pompeu, P. S. & Carvalho, D. C.** 2015. Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. *Genetica*. 143(5): 581-588.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & DeWaard, J. R.** 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 270(1512): 313-321.
- Ivanova, N. V., Borisenko, A. V. & Hebert, P. D. N.** 2009. Express barcodes: racing from specimen to identification. *Molecular Ecology Resources*. 9: 35-41.
- King, A. J. & Crook, D. A.** 2002. Evaluation of a sweep net electrofishing method for the collection of small fish and shrimp in lotic freshwater environments. *Hydrobiologia*. 472(1-3): 223-233.

Ortiz, L. M., & Elías-Gutiérrez, M. 2018. Present day knowledge on diversity of fresh water zooplankton (invertebrates) of the Yucatan Peninsula, using integrated taxonomy. *Teoría y Praxis*. 14(25): 31-48.

Prosser, S., Martínez-Arce, A., & Elías-Gutiérrez, M. 2013. A new set of primers and some methodological improvements for COI amplification in freshwater microcrustaceans. *Molecular Ecology Resources*. 13: 1151-1155.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*. 7(3): 355-364.

Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M. & Gough, K. C. 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*. 51(5): 1450-1459.

Santander-Monsalvo, J., Espejel, I. & Ortiz-Lozano, L. 2018. Distribution, uses, and anthropic pressures on reef ecosystems of Mexico. *Ocean & Coastal Management*. 165: 39-51.

Valdez-Moreno, M., Ivanova, N. V., Elías-Gutiérrez, M., Pedersen, S. L., Bessonov, K. & Hebert, P. D. N. 2019. Using eDNA to biomonitor the fish community in a tropical oligotrophic lake. *Plos One*. 14(4): e0215505.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de DNA ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

6 ANEXO 1. COSTOS

VIÁTICOS		
14/08/2019	Comisión a la reserva de la biósfera de Sian Ka'an del 18 al 27 de agosto 2019, para realizar estudios para generar la línea base y la biblioteca de códigos de barras del zooplancton de algunos sistemas dulceacuícolas de la RB de Sian Ka'an.	\$ 13,628.59
26/08/2019	Comisión a Felipe C. Puerto y Playa del Carmen el 16 de agosto para contactar guías a la reserva de la biosfera de Sian Ka'an	\$ 692.92
TOTAL		\$ 14,321.51
COMBUSTIBLE		
14/08/2019	Combustible para salida a la reserva de la biósfera de Sian Ka'an del 18 al 27 de agosto 2019, para realizar estudios para generar la línea base y la biblioteca de códigos de barras del zooplancton de algunos sistemas dulceacuícolas de la RB de Sian Ka'an.	\$ 8,185.60
15/08/2019	Combustible para salida a Carrillo puerto y playa del carmen el 15 de agosto para contactar guías a la reserva de Sian Ka'an	\$ 818.56
TOTAL		\$ 9,004.16
MATERIALES		
15/08/2019	Compra de lámpara mini color black con baterías	\$ 4,499.99
26/08/2019	Compra de materiales para el laboratorio, cintas, casa de campaña, frascos de plástico etc.	\$ 1,162.18
26/08/2019	Compra de materiales para salida de campo y para laboratorio, usos de trampas de luz mediante pilas alcalinas, empaquetado de muestras en bolsas, etc	\$ 2,842.35
17/09/2019	Compra de lámpara led para revisión microscópica de muestras de zooplancton	\$ 1,299.00
18/09/2019	Compra de toner negro para realizar impresiones que se necesitan para el desarrollo del proyecto	\$ 1,499.00
18/09/2019	Compra de tela de nylon para red de plancton de 63 micras de abertura	\$ 6,588.80
23/09/2019	Compra de material y herramientas necesarias en la salida de comisión a Sian Kaan del 18 al 27 de agosto	\$ 629.32
03/10/2019	Compra de materiales de laboratorio para uso del proyecto.	\$ 1,862.00
TOTAL		\$ 20,382.64
SERVICIO DE ENVÍO DE PAQUETERÍA		
20/08/2019	Servicio de envío de muestras de ADN medio ambiental a la universidad Guelph, Canada	\$ 1,583.92
26/08/2019	Servicio de envío de documentos para el trámite de permiso de colecta a Sinaloa.	\$ 1,173.39
30/09/2019	Servicio de envío de productos PCR a Estados Unidos	\$ 1,059.27
08/10/2019	Servicio de envío de muestras de PCR a Eurofins a Estados Unidos para secuenciar.	\$ 1,414.50
TOTAL		\$ 5,231.08
CONTRATACIÓN DE SERVICIOS PROFESIONALES		
	Prestación de servicios profesionales especializados para el M. en C. José Angel Cohuo Colli del periodo correspondiente del 19 de agosto al 30 de septiembre 2019.	\$ 48,671.98
	Prestación de servicios profesionales especializados para el M. en C. José Angel Cohuo Colli del periodo correspondiente del 01 de octubre al 25 de octubre 2019. Pendiente pago por \$24,336.03	
TOTAL		\$ 48,671.98
SERVICIO DE SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS		
20/09/2019	Servicio de secuenciación de 12 placas (1128 especímenes en total) a eurofins genomics	\$ 187,635.49
20/09/2019	Servicio de analisis de ADN 14 filtros para extraccion y amplificación de ADN en la plataforma ION Torrent S5 y trabajo bioinformático de las secuencias	\$ 84,189.48
TOTAL		\$ 271,824.97
Total de gastos del proyecto		\$ 369,436.34