

Análisis metagenómico del microbioma de *Patella candei* en Fuerteventura asociado a su hábitat

Javier Quinteiro¹, Gustavo González-Lorenzo, Dailos Hernández-Reyes², Lara Quinteiro¹, Rogelio Herrera-Pérez³, Juan Martínez-Barrio³, José Antonio González², Manuel Rey-Méndez¹ & Nieves González-Henríquez²

¹Laboratorio de Sistemática Molecular, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular & Instituto de Acuicultura, Universidad de Santiago de Compostela, A Coruña, España. ²Departamento de Biología, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, España. ³Dirección General de Lucha contra el Cambio Climático y Medio Ambiente. Consejería de Transición Ecológica, Lucha contra el Cambio Climático y Planificación Territorial, Gobierno de las Islas Canarias, España.

Email: javier.quinteiro@usc.es

INTRODUCCIÓN

La lapa mayorera (*Patella candei* d'Orbigny, 1840), históricamente uno de los recursos marisqueros relevantes en el Archipiélago Canario, se encuentra incluida en el Catálogo Español de Especies Amenazadas considerada como "en peligro de extinción" (Real Decreto 139/2011; BOE 46). En el Catálogo Canario de Especies Protegidas se encuentra en la categoría supletoria (anexo V) de vulnerable, ante el supuesto de una disminución de la protección indicada en el catálogo nacional (Ley 4/2010 BOC 112). Ante esta crítica situación se ha adoptado el Plan de Recuperación de la Lapa Mayorera (Decreto 161/2015; BOC 136) con el objetivo fundamental de garantizar la supervivencia de la especie en el archipiélago. En el marco de este Plan se han llevado a cabo análisis genéticos que han puesto de manifiesto la diferenciación genética de las poblaciones de Fuerteventura y Salvajes y planteado el rango taxonómico de especie, *P. candei*, para dichas poblaciones (Quinteiro *et al.* 2022)

MATERIAL Y MÉTODOS



Figura 1. Localización geográfica de los puntos de muestreo en las costas de la península de Jandía seleccionados para obtener muestras no invasivas de individuos de *Patella candei*.

Un total de 13 sitios de muestreo, proveyeron de 104 muestras no-invasivas por hisopado del pie de individuos de *Patella candei* del litoral de Fuerteventura. En su mayoría con la excepción de la muestra de Costa Calma, los sitios se localizan en el sur de la península de Jandía (Figura 1). Las muestras de hisopado del músculo del pie proveyeron del ADN utilizado en el análisis metagenómico, extraído con el kit EZNA DNA mollusk (EZNA). Se combinaron las muestras individuales por sitio de muestreo generándose 12 pools (Corralito del Cofre-CC; Costa Calma-CCA; Cueva de la Negra-CN; Joro-J; Juan Gómez-JG; Punta Coloradas-PC; Punta Jandía-PJ; Norte de Playa La Turbia-PLTN; Sur de Playa La Turbia-PLTS; Punta Percebe-PP; Punta del Tigre-PT; Roque del Moro-RM).

El gen 16S rRNA completo fue amplificado con cebadores universales, siendo purificados los productos de PCR con Mag-Bind Total pure NGS (Omega-BioTek). Los amplicones tratados con NEBNext Ultra II End Repair / dA-tailing Module (NEB) fueron etiquetados mediante ligación con Quick T4 Ligase (NEB) y con los índices contenidos en el PCR Barcoding Expansion 1-12 (ONT). A partir de una mezcla equimolar de amplicones obtenidos para cada uno de los 12 sitios de muestreo se elabora una biblioteca con el protocolo de Ligation sequencing kit (ONT). La biblioteca fue cargada en una célula de flujo en un MinION y mantenido el run hasta obtener en torno a 1,2 M de lecturas.

El basecalling se llevó a cabo con dorado v0.3.2 y duplex-tools v0.3.3 y el de-multiplexado con Guppy. Finalmente, para el trimming se usó porechop 0.2.4.

El análisis metagenómico fue realizado a través de pipelines basadas en Qiime (*Bolyen et al.*, 2019). Como base de datos de referencia de secuencias 16S rRNA se usó GreenGenes 2022.10.

La muestra destinada al análisis del microbioma no es ideal, pero justificable por las dificultades de muestreo de una especie en peligro de extinción y la imposibilidad de obtener muestras tisulares internas.

Las muestras para el análisis del microbioma deben ser de muestras incruentas, en consecuencia, las posibilidades analíticas se limitan a las muestras de hisopados del pie. La falta de muestreos, inicialmente considerados como probables, provenientes de tejidos de algún individuo irrecuperable, fruto de especímenes requisados de actividades de captura ilícitas ha limitado la tipología de este análisis al microbioma externo.

RESULTADOS

A pesar de las dificultades metodológicas, tras el filtrado y normalización de las lecturas brutas se obtuvieron entre 75.000 y 225.000 lecturas para cada sitio de muestreo (Figura 2.A). En cuanto a la calidad, las secuencias filtradas presentaron un Q>20 en su mayoría (Figura 2. B).

Fueron definidas 3.420 secuencias consenso en el juego completo de muestras. A partir de ellas fue inferida la taxonomía para las secuencias con un match positivo en la base de datos GreenGenes. Un porcentaje entre 1 y 9% se mantuvieron como no asignadas a ningún taxa bacteriano. Entre las familias más representadas se encuentran Fusobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Rhodobacteriaceae, Vibrionaceae y Nostocaceae.

Existe diversidad en la frecuencia de diversos taxa en cada población muestreada, con especies recientemente caracterizadas en elevada frecuencia. La presencia de un Gram negativo, anaerobio estricto, *Psychrilyobacter atlanticus*, destaca en las muestras de PT (72%), PP (33%) y CCA (27%). El aeróbico estricto, *Spongiivirga citrea*, se recuperó en alta frecuencia en todas las muestras, destacando su frecuencia en PJ (40%), CN (32%) y CC (19%). El también aeróbico estricto *Litoreibacter roseus*, y otras especies del género, representan elevados porcentajes, especialmente en J (48%). Es también destacable la presencia del enigmático clado SAR324 que llega a representar el 20% de los taxa recuperados en la muestra JG (Figura 3).

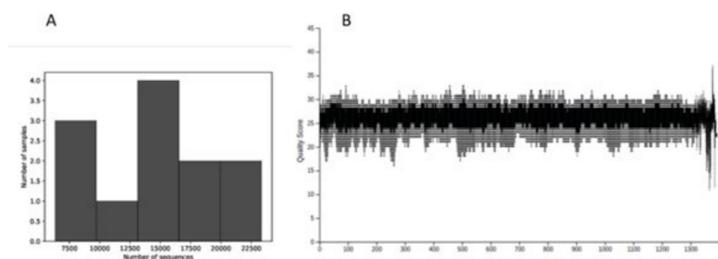


Figura 2. Número de secuencias obtenidas para las 12 muestras de hisopado de pie de *Patella candei* (A) y calidad de las secuencias del gen completo del 16 rRNA (Q>20) obtenidas con la metodología portátil de Oxford Nanopore Technologies.

No se observa una obvia distribución diferencial del patrón de perfil taxonómico bacteriano a lo largo de los puntos de muestreo (Figura 4), aunque sí se mantienen perfiles y taxa comunes. Los análisis de la diversidad alfa de Faith (test de Kruskal-Wallis; H=4,94; P=0.18), no detecta diferencias significativas cuando son considerados 4 grupos (NE, S, W, NW) definidos en función de las costas de Fuerteventura dónde se localizaron los sitios de muestreo, y en torno a la península de Jandía (Figura 4).

Los análisis de diversidad beta basados en las distancias de Jaccard y UniFrac, no mostraron un agrupamiento de las localidades asociadas a cada costa y en función de las diferencias en su diversidad taxonómica. No obstante, sí se aprecia una similitud entre aquellas muestras muy cercanas, tales como las 2 muestras (norte y sur) de la Playa de la Turbia (Figura 5). El estudio metagenómico del microbioma de muestras no-invasivas del pie de la lapa mayorera, ha permitido caracterizar la diversidad del microbioma de este específico hábitat. La diversidad taxonómica es similar para todas las muestras y no se ha observado una asociación entre la diversidad y la localización geográfica de dichas muestras. Se han detectado tanto taxa asociados al organismo como taxa asociados al ambiente abiótico marino. La metodología ha mostrado su eficiencia para la realización de monitorización y vigilancia detectando la presencia de un posible patógeno, cuya interacción con *Patella candei* debe ser evaluada.

CONCLUSIONES

- Las muestras aquí analizadas pueden ser consideradas muestras ambientales, contienen tanto taxa asociados al medio, como al hábitat de la epidermis y mucus del pie de la lapa mayorera. La ausencia de una significativa relación entre la diversidad y abundancia taxonómica y las áreas costeras de muestreo puede deberse a esta combinación de la naturaleza de los taxa.
- La metodología ha demostrado su eficiencia, rapidez y bajo coste, siendo implementable en el control rutinario del microbioma externo de la lapa, sin sacrificio.
- En cuanto a la posible patogenicidad de taxa, se ha detectado la presencia de *Vibrio chagasii* en todas las muestras, destacando su recuperación de la muestra PP (12%) y PT (5%). Este taxa ha sido identificado como agente causal de enfermedades desarrolladas en vieiras y sus larvas, ostras y mejillones (Urtubia *et al.*, 2023, Teng *et al.*, 2012, Liang *et al.*, 2019, Dégremont *et al.*, 2021). Esta detección debe ser estudiada en detalle para evaluar la relación de este taxa con *Patella candei*.

REFERENCIAS

- BOLYEN, E., *et al.* 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37, 852-857.
- DÉGREMONT, L., MORGA, B., MAUROUARD, E. & TRAVERS, M.-A. 2021. Susceptibility variation to the main pathogens of *Crassostrea gigas* at the larval, spat and juvenile stages using unselected and selected oysters to OsHV-1 and/or V. aestuarianus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 183, 107601.
- LIANG, X., WANG, J.-S., LIU, Y.-Z., PENG, L.-H., LI, Y.-F., BATISTA, F. M., POWER, D. M., GUI, L. & YANG, J.-L. 2019. Complete genome of a marine bacterium *Vibrio chagasii* ECSM814107 with the ability to infect mussels. *Marine Genomics*, 48, 100683.
- QUINTEIRO, J., GONZÁLEZ-LORENZO, G., HERNÁNDEZ-REYES, D., QUINTEIRO, L., HERRERA-PÉREZ, R., MARTÍNEZ-BARRIO, J., GONZÁLEZ, J. A., REY-MÉNDEZ, M. & GONZÁLEZ-HENRÍQUEZ, N. 2022. Genetic differentiation of a critically endangered population of the limpet *Patella candei candei* d'Orbigny, 1840, in the Canary Islands. *Conservation Genetics*, 23, 807-819.
- TENG, W., LI, W., ZHANG, M., YU, Z., LI, S., LIU, X., LI, H. & FU, C. 2012. Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio chagasii* from *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Fisheries of China*, 36, 937-943.
- URTUBIA, R., MIRANDA, C. D., RODRÍGUEZ, S., DUBERT, J., BARJA, J. L. & ROJAS, R. 2023. First Report, Characterization and Pathogenicity of *Vibrio chagasii* Isolated from Diseased Reared Larvae of Chilean Scallop, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Pathogens*, 12, 183.

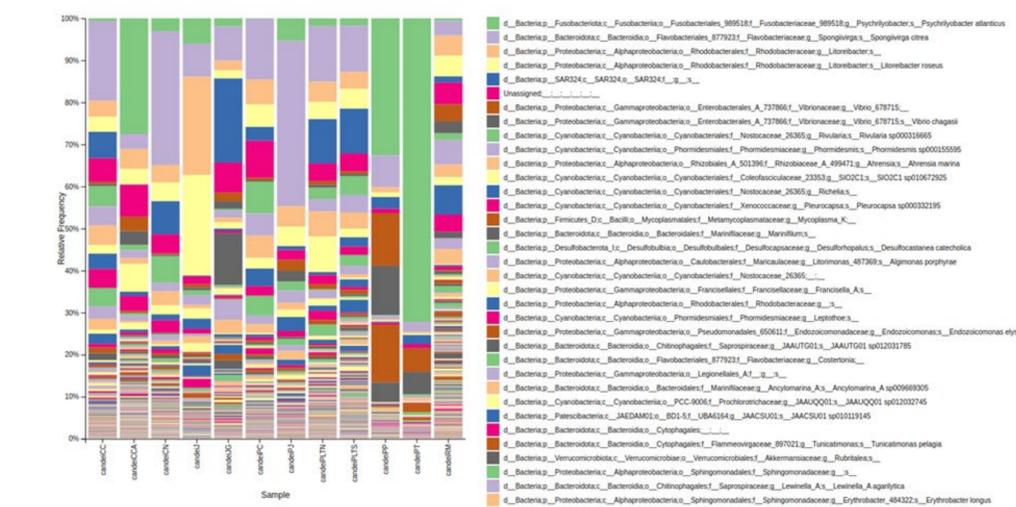


Figura 3. Perfiles de abundancia taxonómica al mayor nivel de resolución posible de especie, para las 12 muestras analizadas de hisopados del pie de *Patella candei* en Fuerteventura.

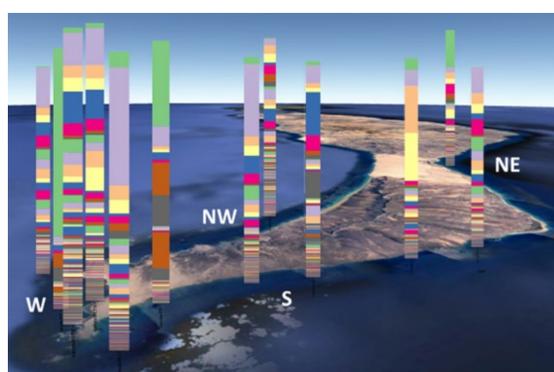


Figura 4. Distribución de los perfiles taxonómicos a lo largo de los puntos de muestreo.

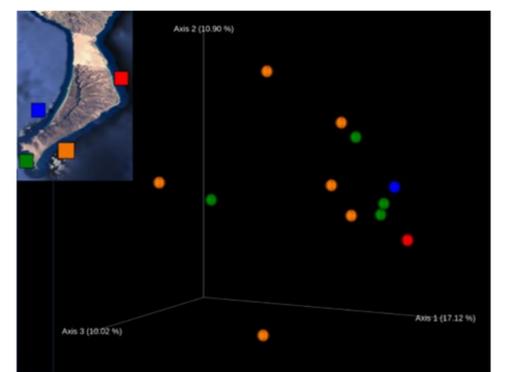


Figura 5. Gráfico basado en distancia no balanceada UniFrac, mostrando las relaciones entre las muestras considerando la diversidad taxonómica de su microbioma.