

A IDENTIDADE DA ORIXE XEOGRÁFICA DO BERBERECHO GALEGO. RESULTADOS DO PROXECTO VALOBER.GAL.



Proxecto concedido no marco das axudas autonómicas 2016 dentro das estratexias de desenvolvemento local participativas (GALP4.011).

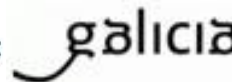
Javier Quinteiro e Manuel Rey Méndez
Laboratorio de Sistemática Molecular
Departamento de Bioquímica e Bioloxía Molecular
CIBUS. Campus Vida. Universidade de Santiago de Compostela

III XORNADAS TÉCNICAS DE EXALTACIÓN DO BERBERECHO DE NOIA

Casa da Cultura de Noia, 20 de outubro de 2018



Grupos de Acción Local
do sector Pesqueiro
Seo de Fisterra Ría de Muros-Noia:
Costa Sostible



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DO MAR



Unión Europea

Fondo Europeo Marítimo y
de Pesca (FEMP)

PROXECTO

VALORIZACIÓN DO BERBERECHO *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) DA COSTA GALEGA, MEDIANTE MARCADOR DE IDENTIDADE DA SÚA ORIXE XEOGRÁFICA. VALOBER.GAL

Participantes

Solicitante: Confraría de Noia



Colaboran:

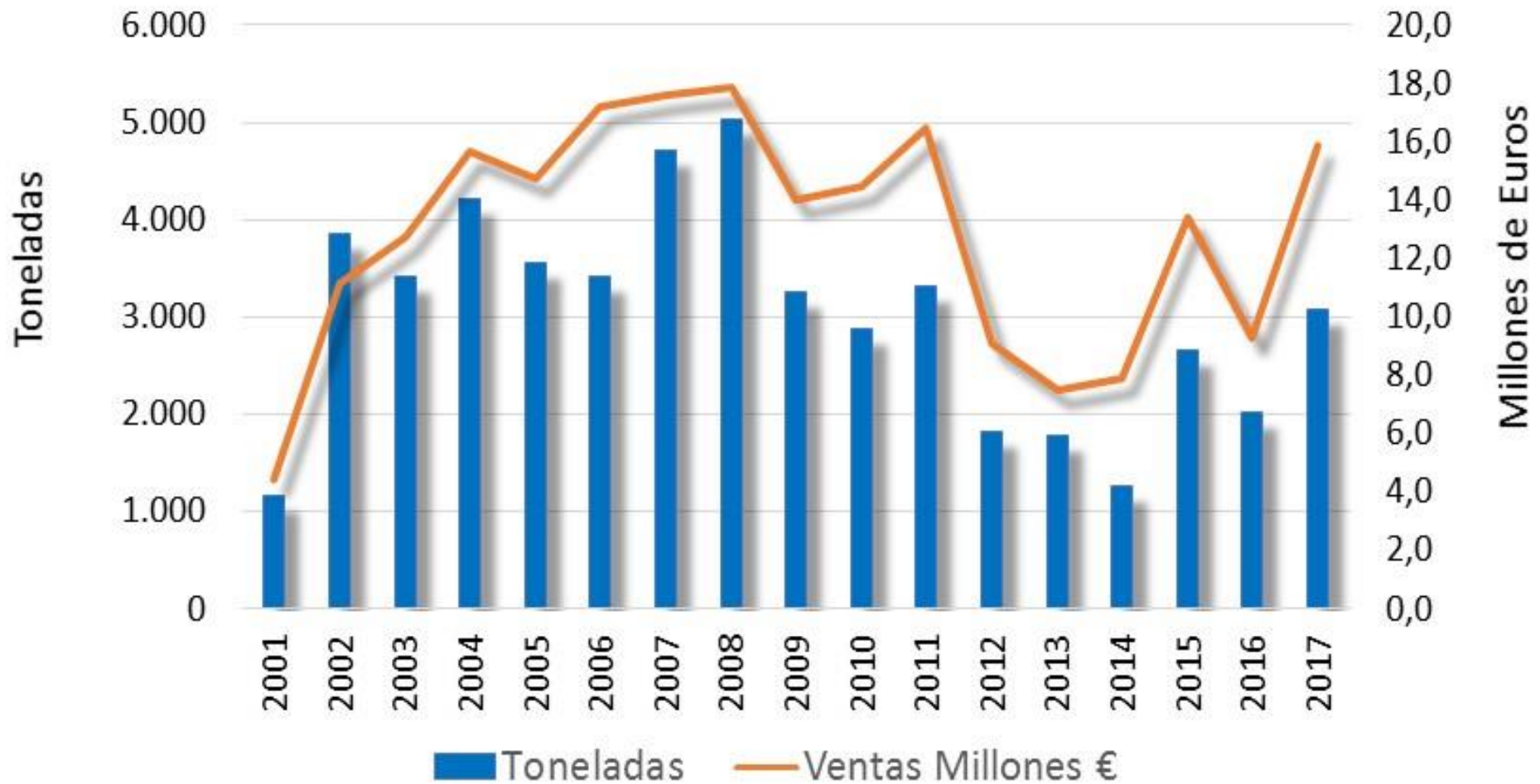
- Confraría de Pescadores de Muros,
- Agrupación de Mariscadores "Río Anllóns",
- Confraría de Pescadores de Barallobre,
- Confraría de Pescadores de Espasante,
- Confraría de Pescadores de Cabo de Cruz.
- Confraría de Pescadores de Lourizán.
- Confraría de Pescadores de Pontevedra.
- Confraría de Pescadores de Raxó.
- Confraría de Pescadores de Camariñas.

Asistencia técnica:

- Laboratorio de Sistemática Molecular. Dpto. de Bioquímica e Bioloxía Molecular da USC.



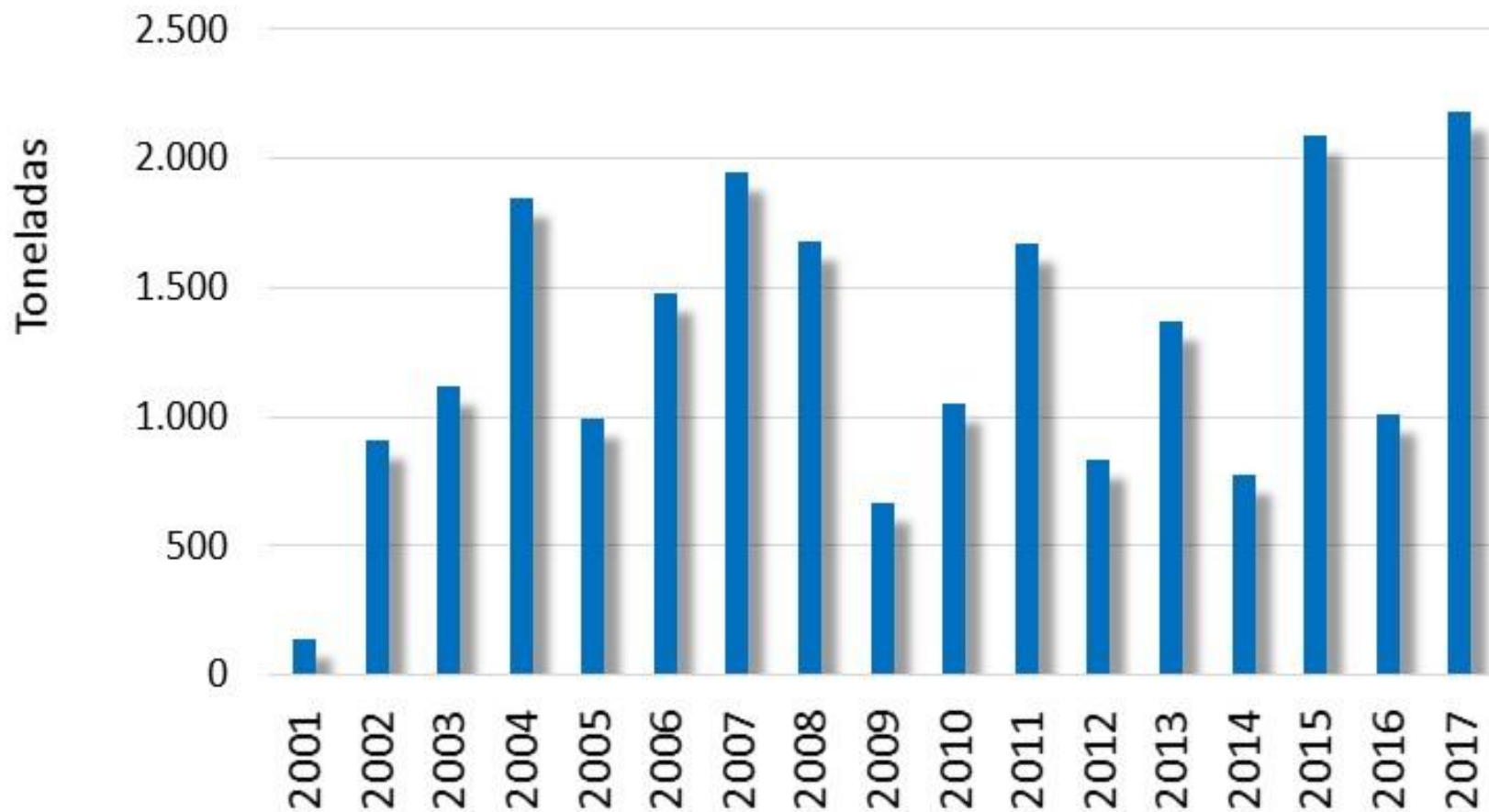
Total producción de berberecho en Galicia



Berberecho capturado en 2017 = 3.069 t (un 51,3% más que no 2016).

Facturación total primeira venda en 2017 = 15,88 millóns de €. A suba do precio medio foi un 12,63% superior ao 2016 (pasa de 4,59 a 5,17 €/Kg).

Total produción de berberecho en Noia



Poderíase dicir que o aumento en produción do 2017 provén exclusivamente de Noia, cun aumento na súa captura total de 1.174 t (un 116% máis que no ano anterior), conseguido unha facturación de máis de 11,5 millóns de euros (72,42% do total de Galicia) e que en volume son 2.185 toneladas (71,20% do total de Galicia). É a zona máis produtiva de Galicia, cunha taxa media de captura/venda durante o 2017 de 26.300 kg/día (as outras 34 lonxas en toda Galicia teñen unha media de 197 kg/día).



- Obxectivo Xeral do Proxecto:

- Dotar ao berberecho da costa galega dunha identidade propia e diferenciada no mercado como recurso sostible.

- Obxectivos tecnolóxicos:

- Desenvolver técnicas moleculares de vangarda que permitan a diferenciación do berberecho galego (*Cerastoderma edule*) do berberecho doutras procedencias.
- Implementar novas tecnoloxías que permitan dispoñer de información de cara ao consumidor final sobre a procedencia e características do produto grazas á trazabilidade na etiquetaxe.

- Obxectivos económicos:

- Garantir a trazabilidade dos produtos etiquetados, valorizando este produto fronte aos procedentes doutras áreas xeográficas.
- Favorecer o rendemento económico do berberecho como produto de calidade garantindo a súa trazabilidade, xerando un valor engadido como produto procedente do marisqueo das confrarías galegas.

- Obxectivos medioambientais:

- Potenciar a correcta xestión dos recursos propios evitando a introdución doutras especies que poidan afectar ás poboacións autóctonas, garantindo unha explotación sostible, responsable e continuada do berberecho como base importante da economía rexional.

RESULTADOS PREVISTOS DO PROXECTO

- Definir marcadores moleculares para diferenciar o berberecho galego do de outras procedencias.
- Establecer un sistema de cuantificación de larvas de *C. edule* na columna de auga.
- Deseño dun sistema para a transferencia dos resultados e a súa implementación na trazabilidade alimentaria e a xestión sostible do recurso.



Taxonomía

Classification: Biota

> [Animalia](#) (Kingdom) > [Mollusca](#) (Phylum) > [Bivalvia](#) (Class) > [Heterodonta](#) (Subclass)
> [Euheterodonta](#) (Infraclass) > [Imparidentia](#) (Superorder) > [Cardiida](#) (Order) > [Cardioid](#)
[ea](#) (Superfamily) > [Cardiidae](#) (Family) > [Lymnocardiinae](#) (Subfamily) > [Cerastoderma](#) (Genus)

Género

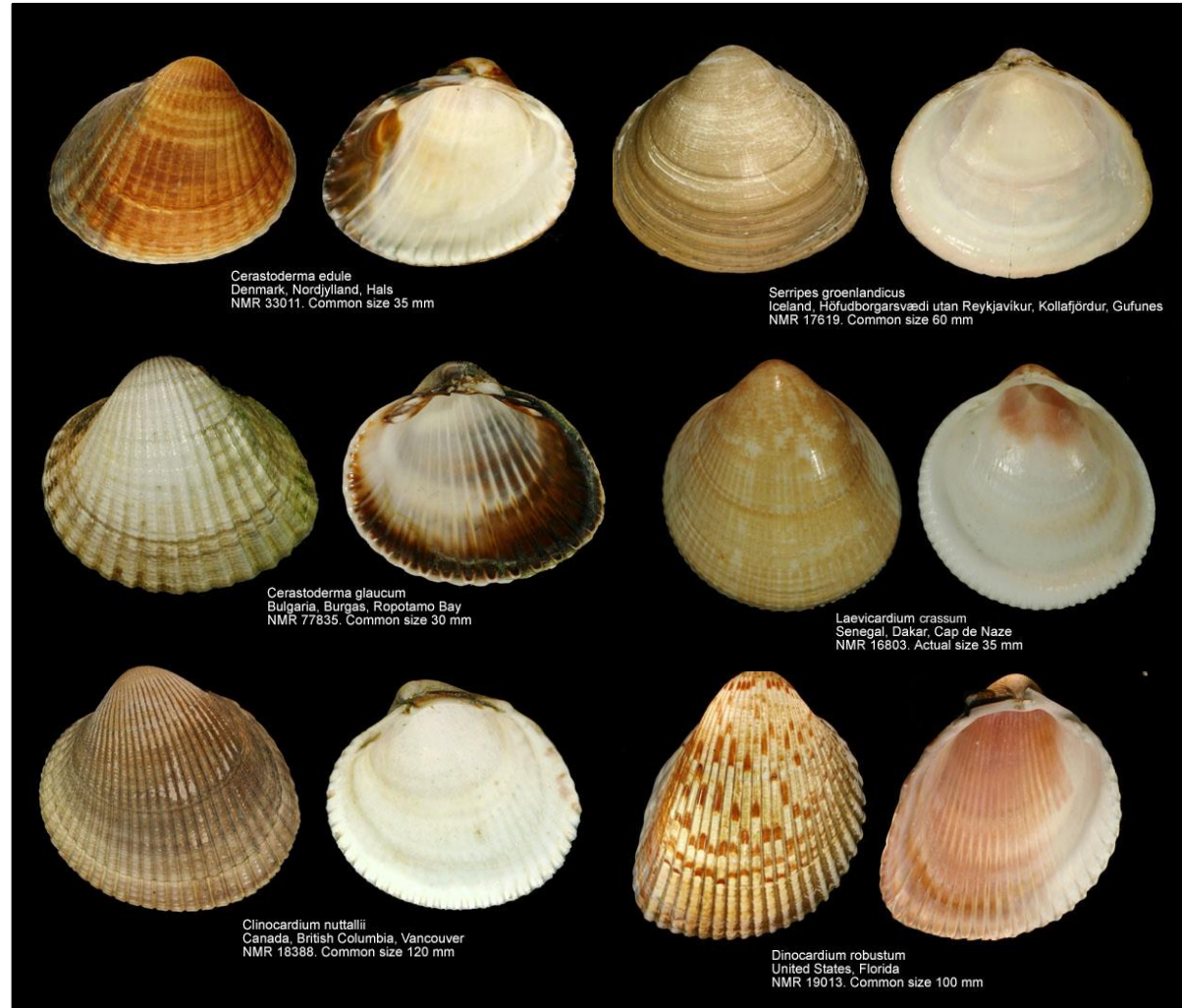
- *Cerastoderma* Poli, 1795

Especies

- *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758)
- *Cerastoderma glaucum* (Bruguière, 1789)

Denominaciones comerciales

- Resolución de 28 de marzo de 2016, de la Secretaría General de Pesca, por la que se publica el **listado de denominaciones comerciales** de especies pesqueras y de acuicultura admitidas en España. (BOE, 84. 7 de abril de 2016).
- *Cerastoderma edule*: BERBERECHO, VERDIGÓN, COPINYA O ESCOPINYA DE GALLET, VERIGÜETO, CATXEL, COC (FAO).
- *Cerastoderma glaucum*: BERBERECHO VERDE, ESCOPINYA DE GALLET, CATXEL VERD, BIROLLO
- BERBERECHO DE GROENLANDIA: *Serripes groenlandicus*
- BERBERECHO DENTADO : *Laevicardium crassum* (SALTON)
- BERBERECHO GIGANTE DEL ATLÁNTICO: *Dinocardium robustum*



Figuras de Protección de la Calidad

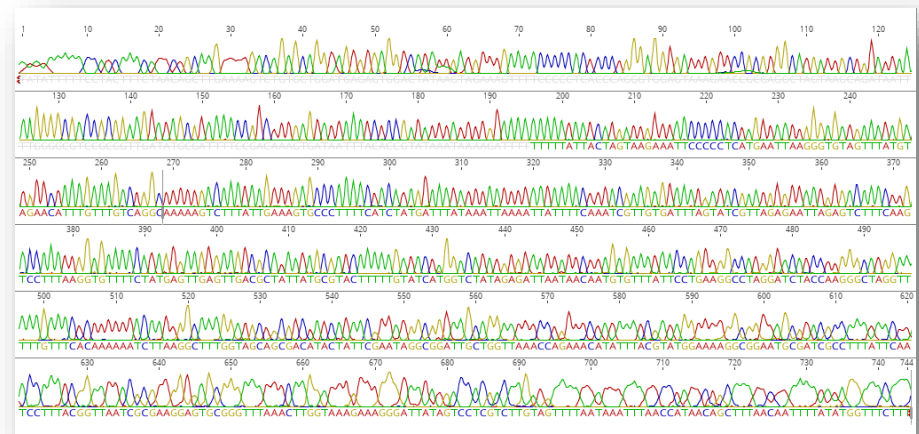
- Vía fundamental para la promoción, fomento de la calidad y busca de noticias, o alternativas, salidas comerciales a los productos de la pesca
- Asociadas a la **identificación de la especie y origen, área geográfica** sistema de producción o sostenibilidad de la explotación,
- Ley 6/2015, de 12 de mayo, de Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas Protegidas
 - protección desde la producción, a la comercialización, presentación, publicidad y etiquetado



- Requiere que el producto implicado sea **identificable y diferenciable** de sus competidores en un mercado globalizado
- Es necesario disponer de **técnicas analíticas adecuadas** para su autenticación y verificación, en cualquiera de las fases de extracción, producción y comercialización, que constituyan una garantía para el sector productivo, administración y consumidor, conllevando el cumplimiento de las normas asociadas al etiquetado del producto



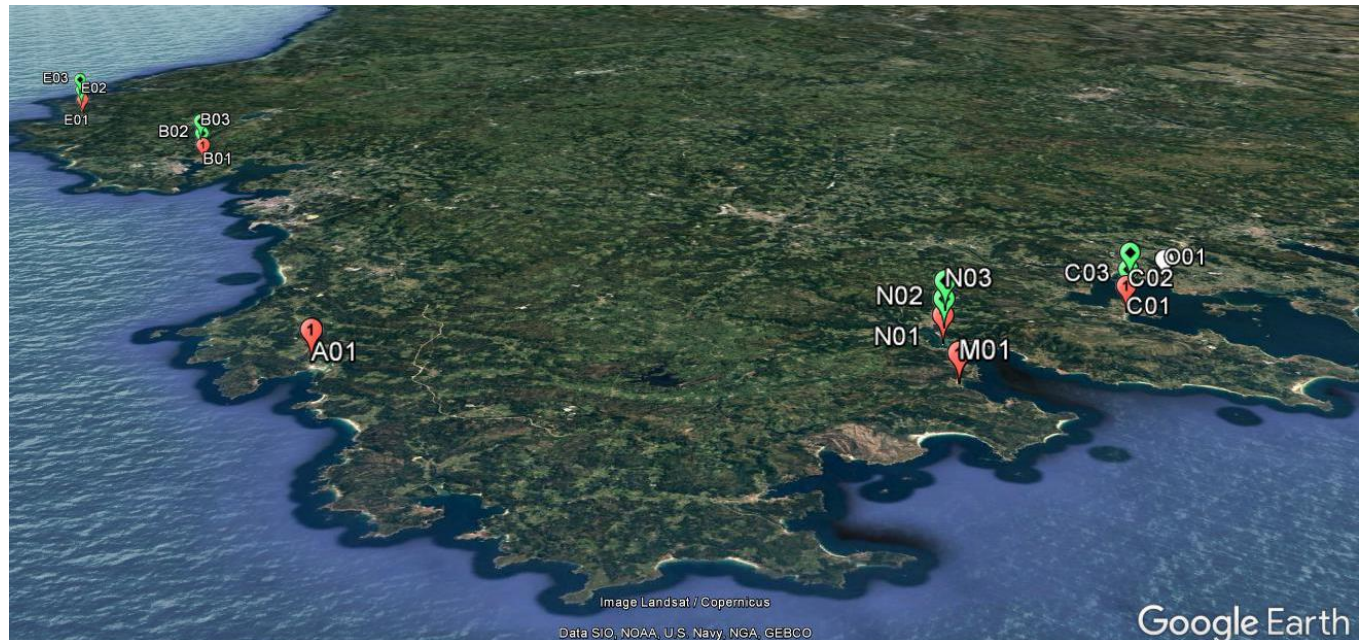
DOP





Muestreo del recurso

- En esta actividad se obtuvieron las muestras básicas con los individuos partir de los cuales se iniciaron los trabajos de investigación propuestos en el proyecto.
- Muestreo de individuos de *Cerastoderma edule* del litoral gallego.
- Muestreo de individuos de *Cerastoderma glaucum* del litoral gallego
- Muestreo de berberecho, *Cerastoderma* sp. de zonas de cultivo no gallegas
 - Aveiro, Portugal
 - Le Croisic, Francia
 - EscociaOtras muestras comerciales:
 - Holanda, “Aguas portuguesas”



Aislamiento de ADN

A partir de biopsias de tejidos de las muestras obtenidas se aisló el ADN de un número representativo y adecuado para los análisis planeados, mediante el kit EZNA DNA Mollusk (Omega Biotek)

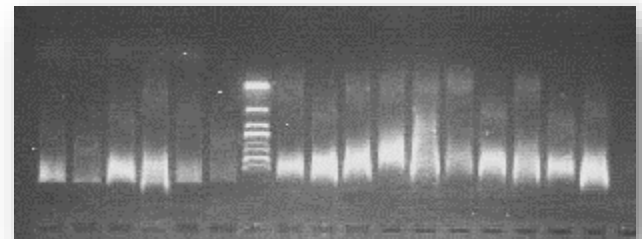
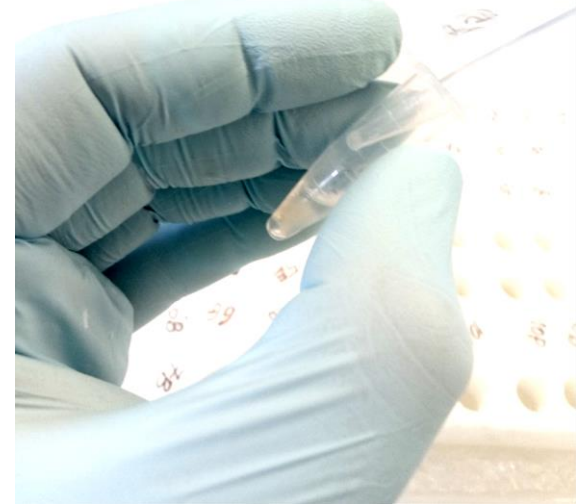


Colección de ADN

- Tejidos berberechos
- Productos comerciales, elaborados
- Muestras ambientales
- Muestras problema

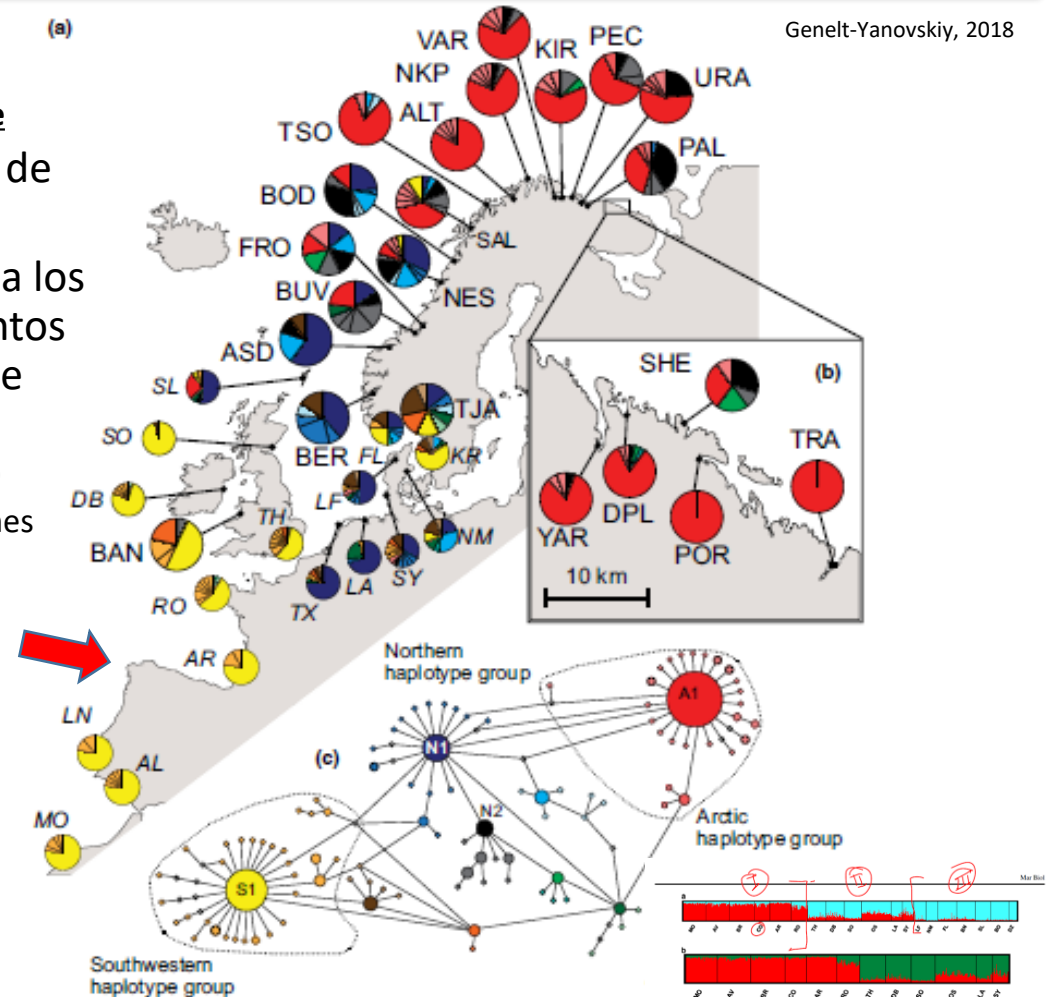


Ejemplo de ADN total aislado a partir de muestras de músculo de los individuos muestreados de C. edule..



Análisis de estructura genética poblacional mtDNA: Aplicación a la trazabilidad

- Datos previos
 - **Grupo Suroeste**
 - Incremento de resolución
 - Adaptación a los requerimientos de un test de trazabilidad
 - Utils SPID
 - Poblaciones Nordeste



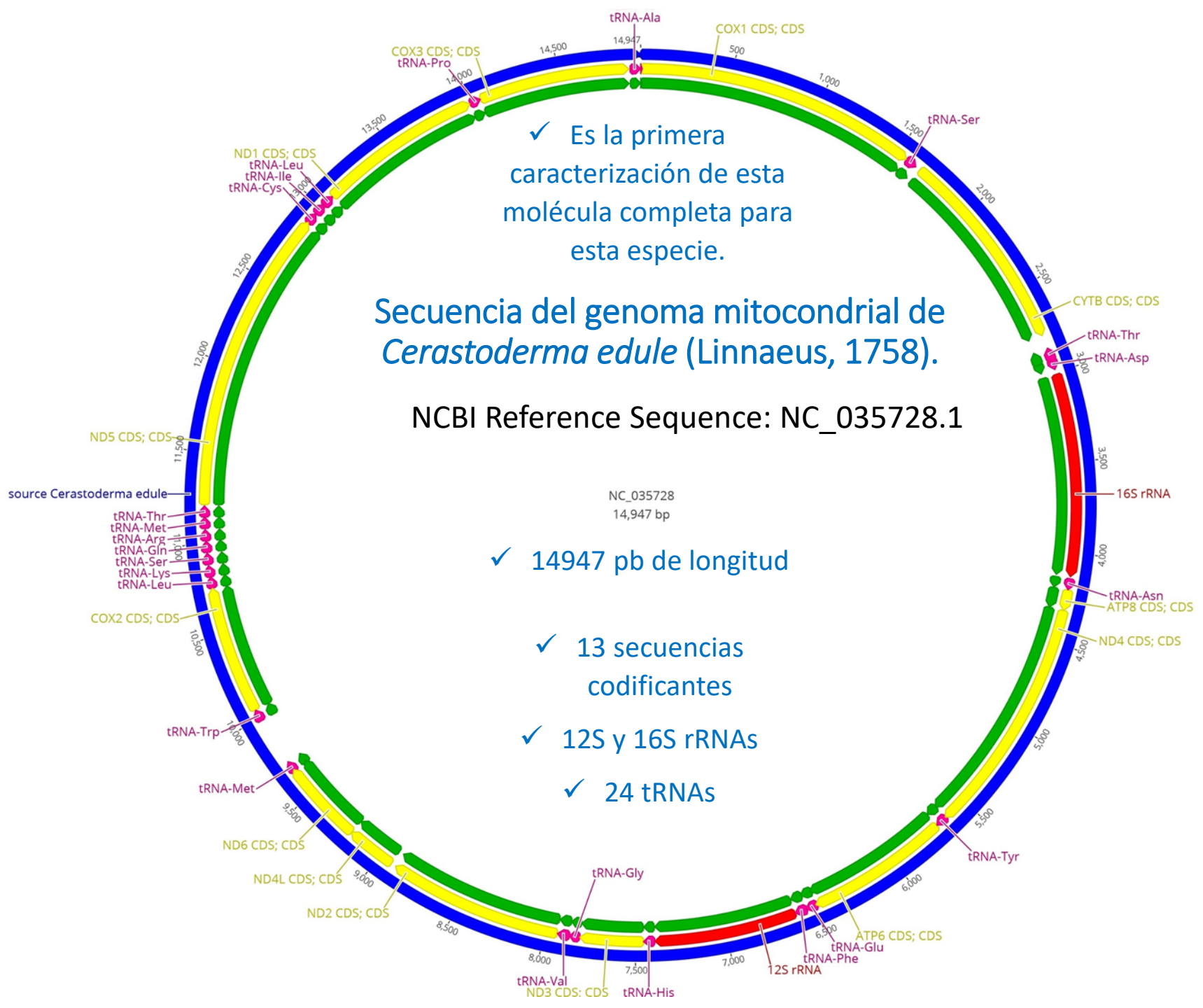
- **Búsqueda de una zona más resolutive e eficaz**

✓ Es la primera
caracterización de esta
molécula completa para
esta especie.

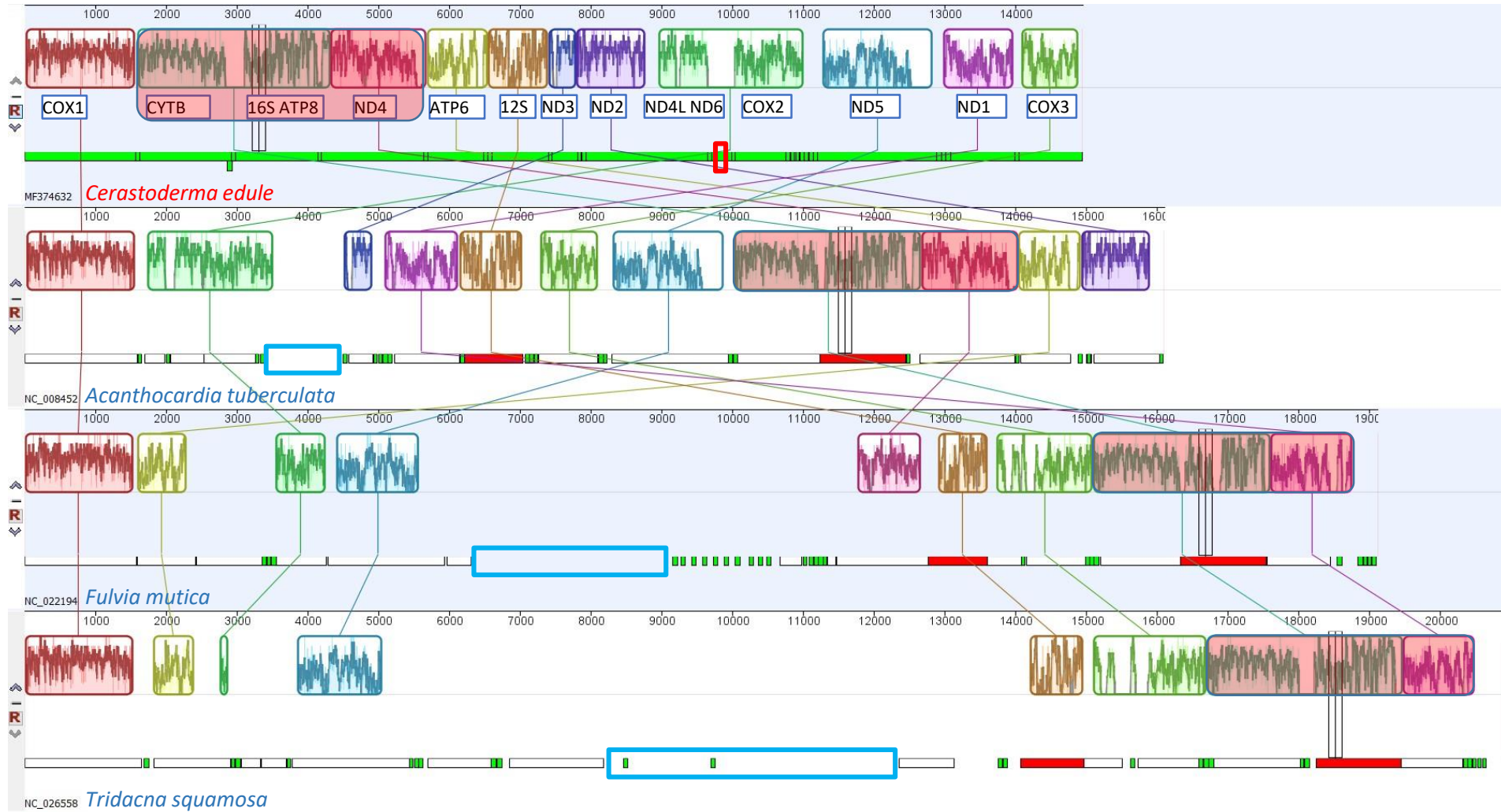
Secuencia del genoma mitocondrial de *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758).

NCBI Reference Sequence: NC_035728.1

- ✓ 14947 pb de longitud
- ✓ 13 secuencias
codificantes
- ✓ 12S y 16S rRNAs
- ✓ 24 tRNAs

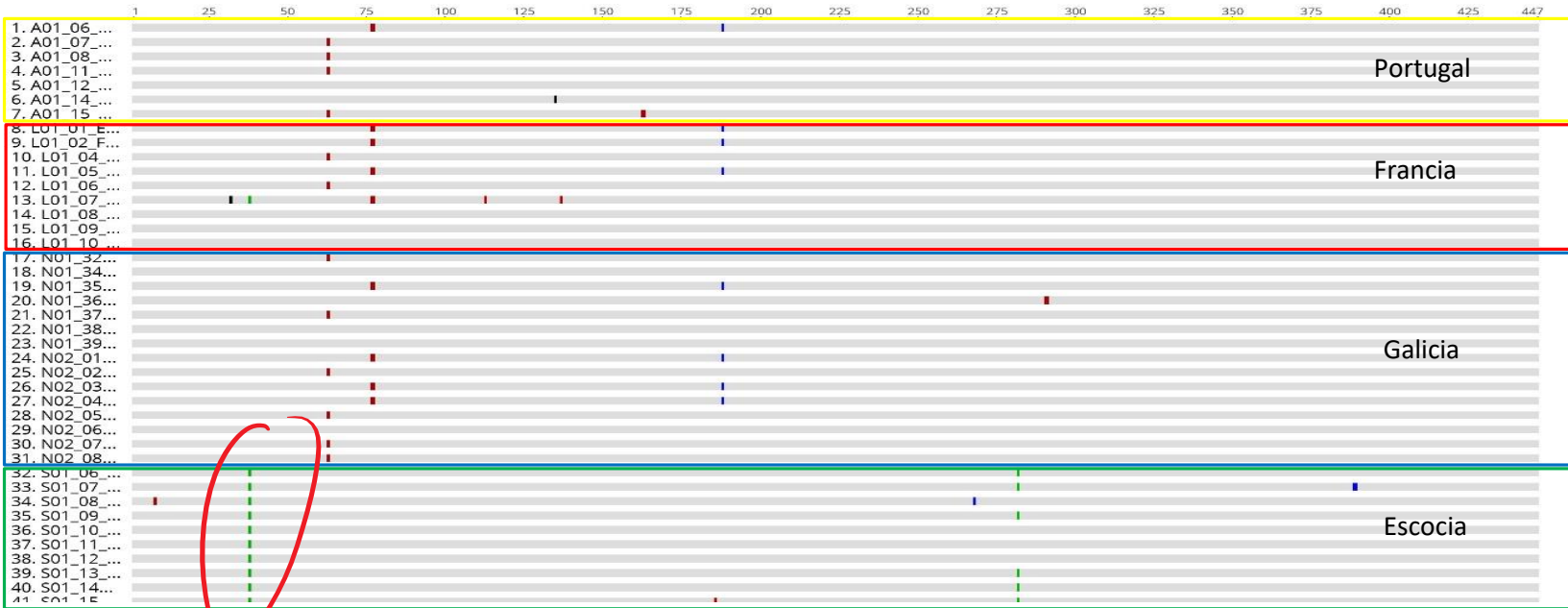


Alineamiento Mauve de bloques conservados en mtDNAs de Cardoidea



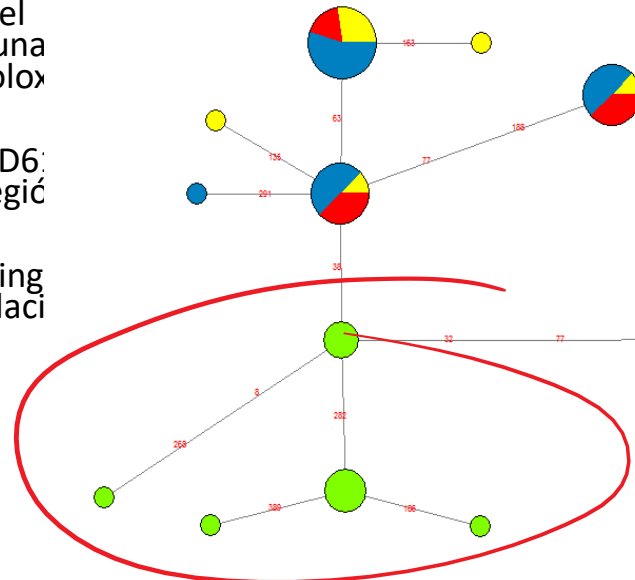
- ✓ Orden génica compacta y diferenciada de otros mtDNAs caracterizados en Cardoidea
- ✓ Ausencia de una amplia región control, no codificante; rica en AT
- ✓ Presencia de una región no codificante; sin homología; 268pb; 50,7% AT

Diversidad genética secuencia no-codificante.



- La obtención de la secuencia completa del genoma mitocondrial permitió localizar una pequeña región no codificante, sin homología conocida, entre los genes ND6 y COX2.
- Diseño de cebadores específicos (CeduND6; CeduCOX21R) para la amplificación de región codificante y secuenciación.
- Se mantiene la diferenciación entre contingentes norte y sur. Sin discriminación entre poblaciones del contingente Sur

	Número de secuencias	Número de haplotipos	Diversidad haplotípica	Diversidad nucleotídica
Aveiro	7	5	0,857	0,00384
Noia	15	4	0,743	0,00332
LeCroisix	9	4	0,806	0,00522
Escocia	10	5	0,800	0,00298



Red de haplotipos detectados, basado en el algoritmo de median-joining y elaborado con el programa Network. Los colores indican el área de muestreo (Amarillo: Aveiro; azul: Noia; rojo: Le Croisix, Francia; Verde: Escocia). El área es proporcional al número de secuencias mostrando ese haplotipo. Los números sobre las líneas indican el número de mutaciones y su posición en el alineamiento.

Detección larvaria: Monitorización en tiempo real del recurso en las rías

Cuantificación larvaria

- Requisito de semilla para el establecimiento de una curva de calibrado: Señal PCR a tiempo real / Número de larvas

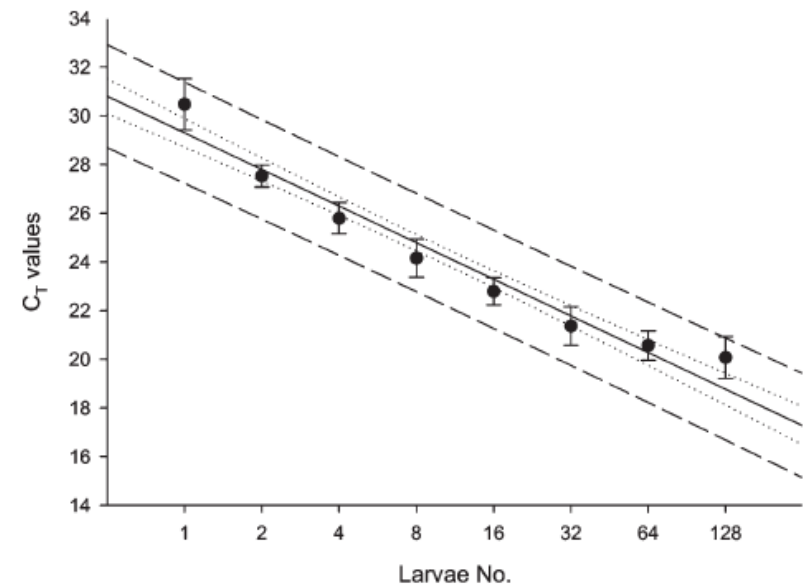
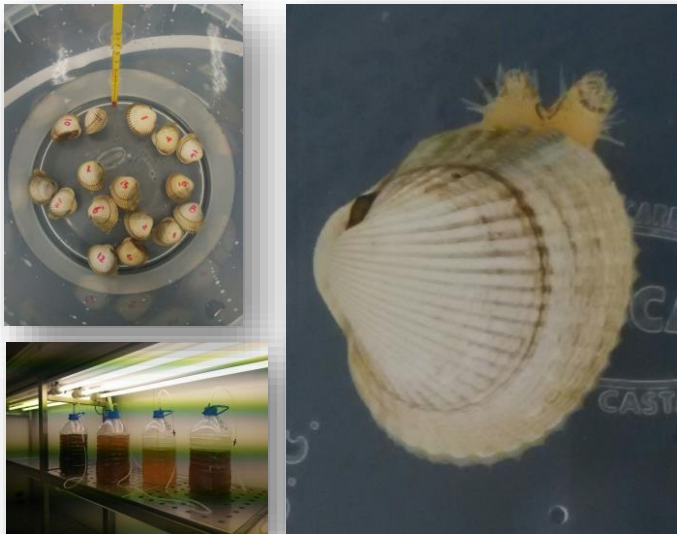
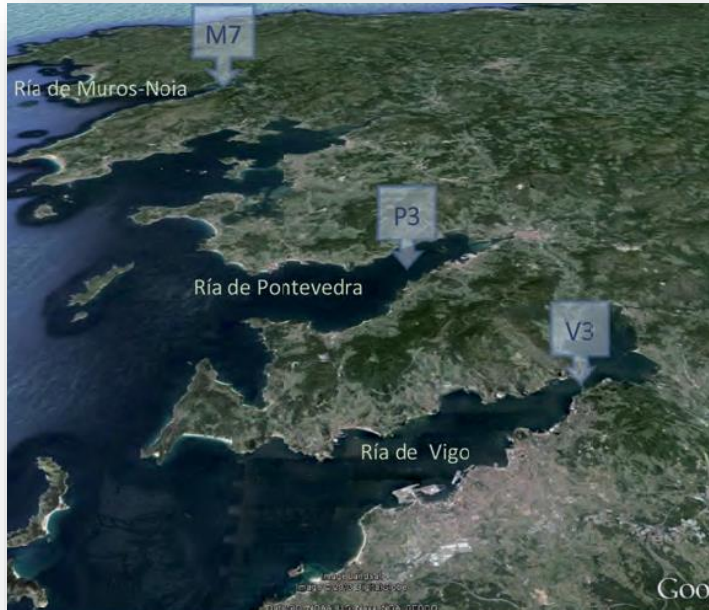


Figure 3. Relationship between larval number of *R. philippinarum* and the estimated C_T values from real-time PCR. Black dots are mean values from 5 DNA isolates; error bars are SDs. The solid line corresponds to the linear regression ($r^2 = 0.9246$; $P = 0$; $y = 29.2932 - 4.9961x$). Confidence intervals and prediction intervals (95%) are depicted with dotted and dashed lines, respectively.

Muestreo de la columna de agua

Muestreo INTECMAR Junio 2013



Red cónica de 55 μ m, de una muestra vertical a una profundidad de 5 m y equivalentes a un volumen filtrado de 7,5 l



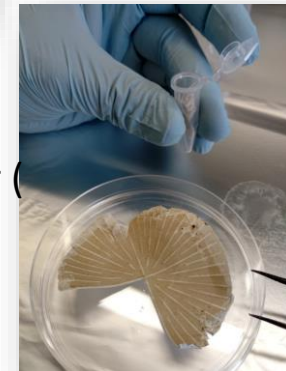
Aislamiento de ADN



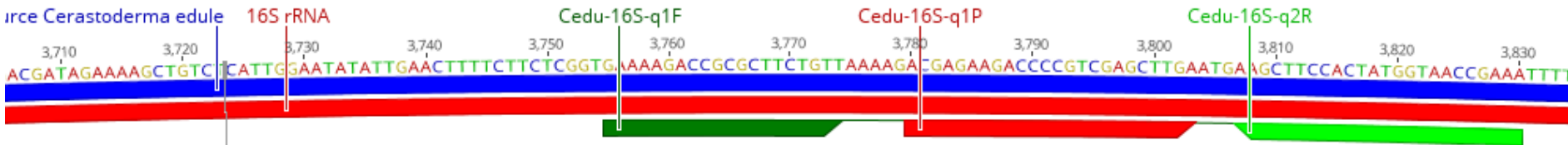
Muestreo Confraría Noia Mayo 2017



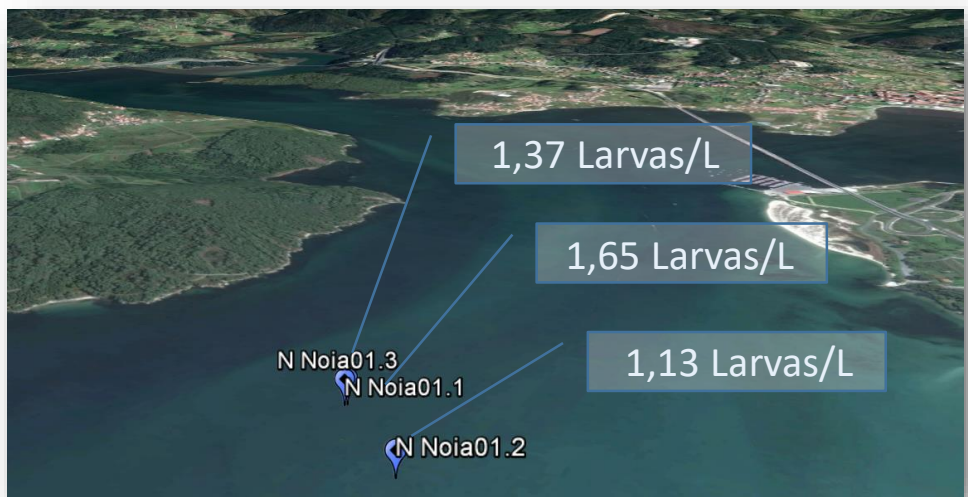
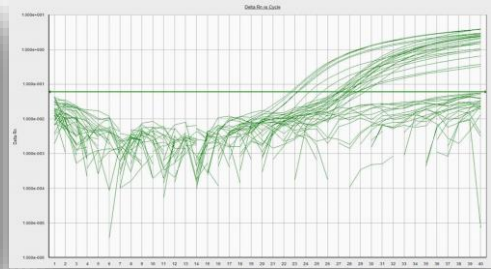
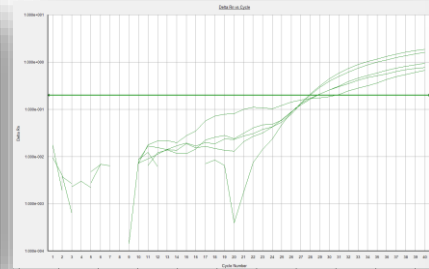
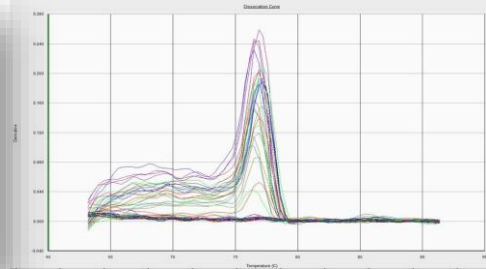
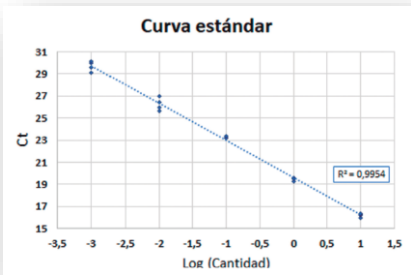
Las muestras fueron obtenidas directamente desde la superficie del mar (2,5 L), filtradas a 0,22 μ m

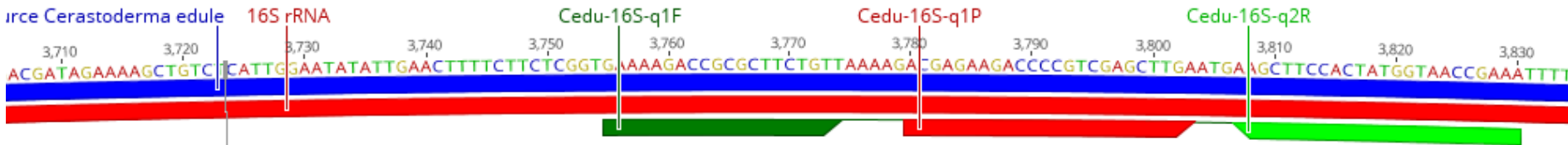


Detección larvaria: PCR a tiempo real

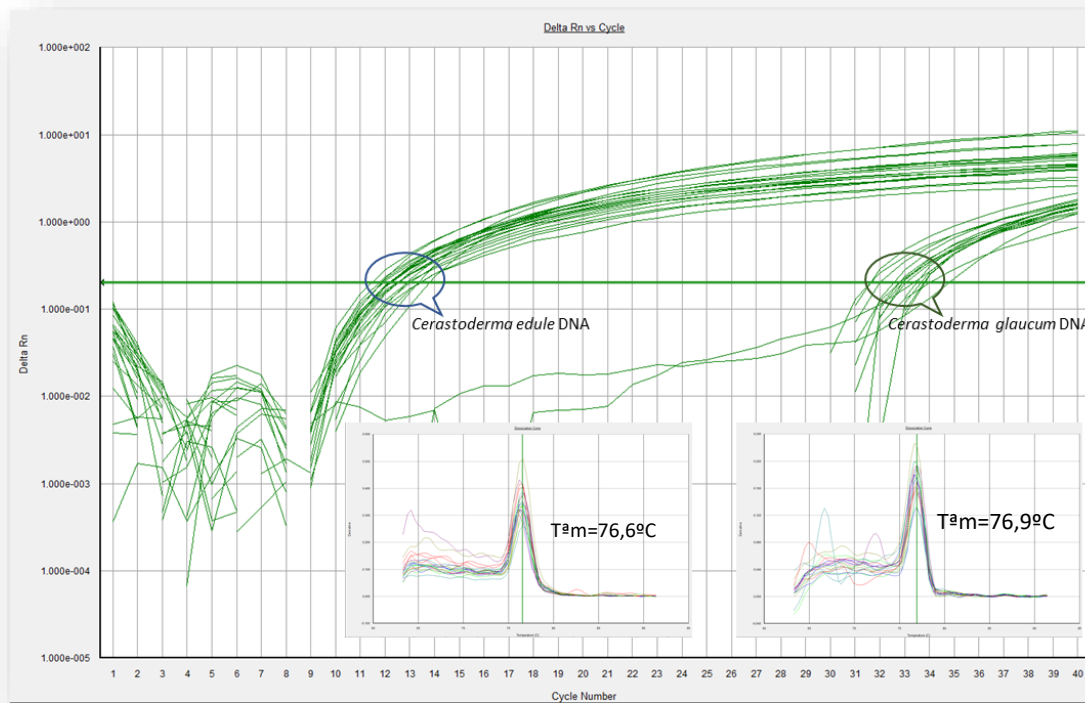


- Cedu-16S-q1F y Cedu-16S-q2R.
- x1 SYBR Green Power Master Mix (Life Technologies),





➤ Sistema de detección por PCR a tiempo real de *C. edule* (sistema SYBRGreen Cedu-16S-q1F/q2R)



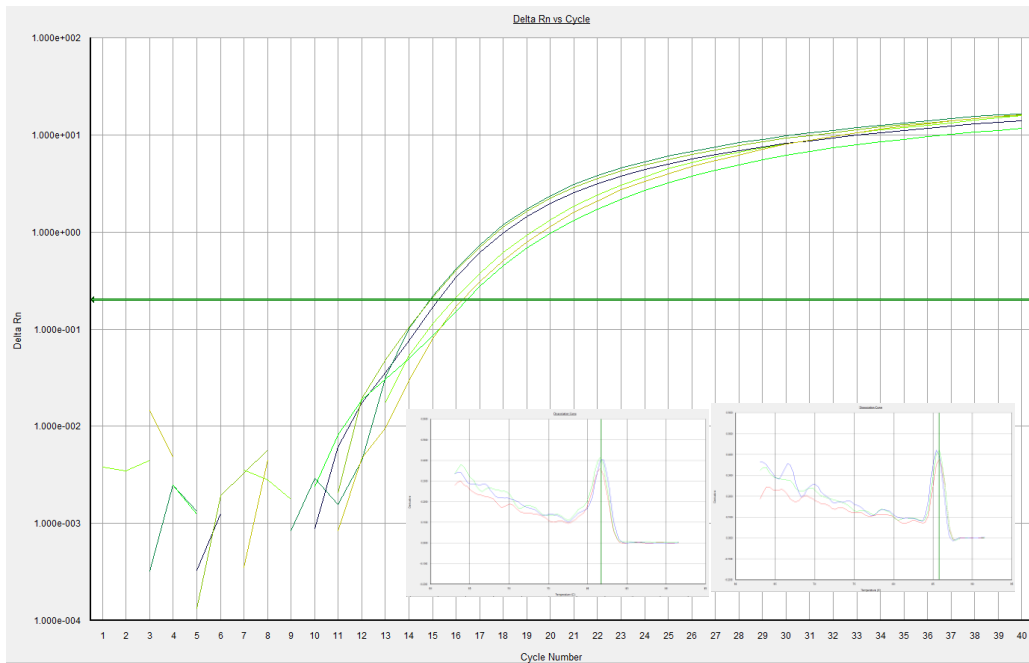
- Test inicial en SYBR Green
- Disponible sonda TaqMan
- Especificidad/Inclusividad
- Sensibilidad



✓ Preparado para aplicar a la identificación de especie en trazabilidad del recurso en cualquier estadio de comercialización e procesado.



➤ Sistemas de detección por PCR a tiempo real de *Marteilia cochilia*



Ejemplo de detección, con 2 sistemas, de ADN de *M. cochilia* en aislados de la glándula digestiva de *C. edule*, provenientes de la Ría de Arosa.



- Test en SYBR Green
- Especificidad/Inclusividad
- Sensibilidad

- ✓ Preparados para aplicar a la detección del patógeno en individuos infectados y en el medio marino.

Identificación y análisis de **SNPs** en *C. edule* para la autenticación del recurso

- Muestreo.
 - Poblaciones próximas a dentro del “contingente sur”
 - Le Croisic, Francia
 - Noia, España
 - Aveiro, Portugal
 - 10 individuos/población

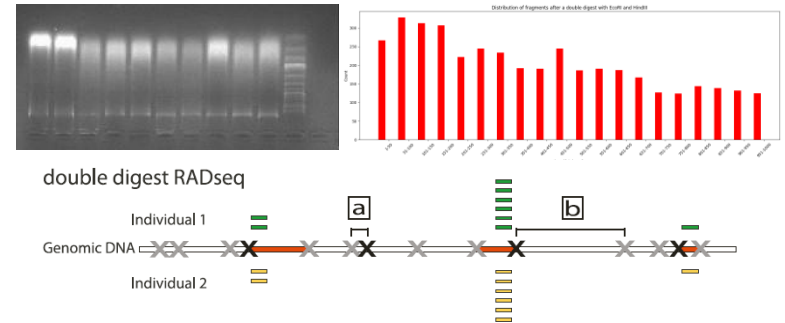


Identificación y análisis de **SNPs** en *C. edule* para la autenticación del recurso

- Preparación de bibliotecas NGS.

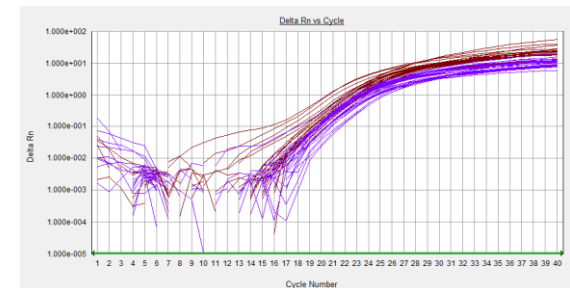
- Metanálisis del transcriptoma de *C. edule* para la definición del protocolo de secuenciación para una representación reducida del genoma.
- Diseño, síntesis y evaluación de dos sistemas de cuantificación precisa de bibliotecas genómicas por PCR a tiempo real

- Amy
- EF1a



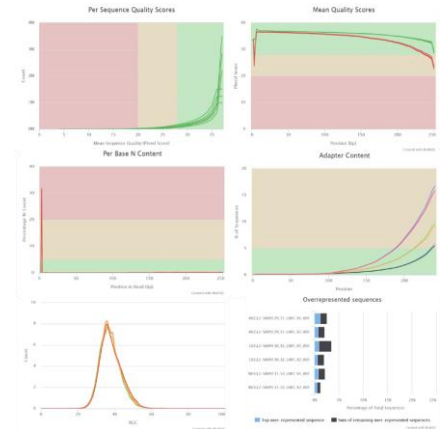
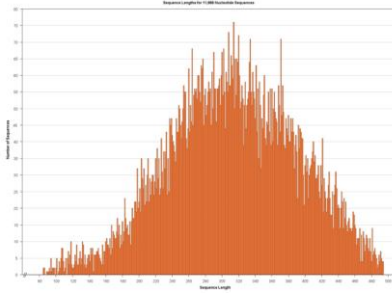
Librerías:

- 10 individuos/población
- 3 poblaciones *C. edule*: Aveiro
LeCroisic, Noia



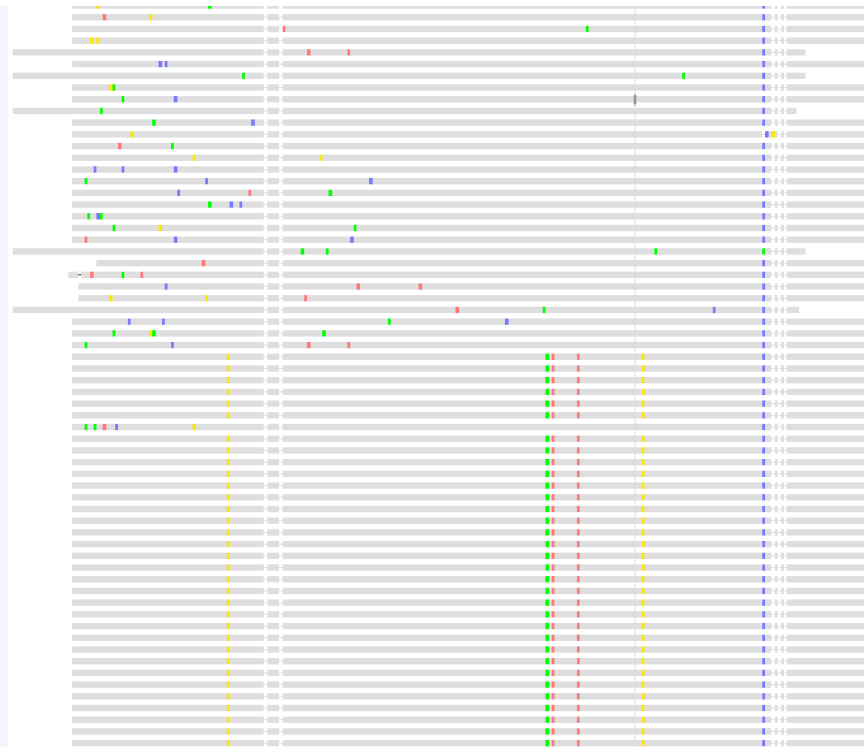
Secuenciación de bibliotecas ddRAD

- 6,58 ($\pm 1,27$) million paired reads
 - 2,6M: Aveiro (A02)
 - 3,3M: Le Croisic (L02)
 - 4,3M: Noia (N03)
- 21.433 contigs
- 11.988 clusters
- 19.420 SNPs



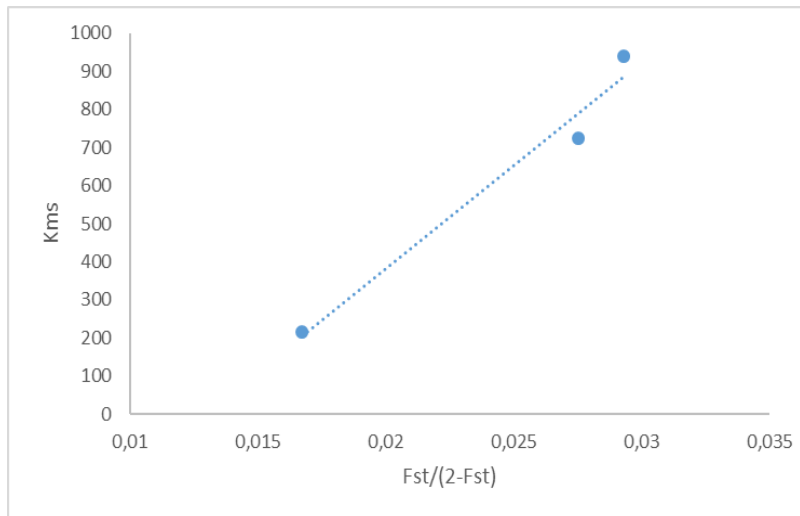
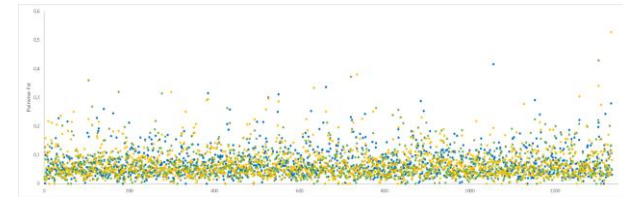
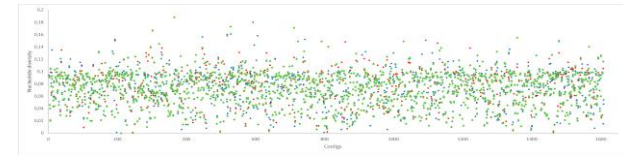
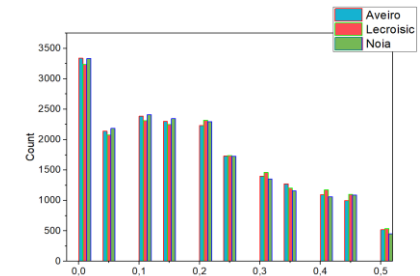
```

D# 3_1101_16129_19991/2
D# 3_1101_25190_22196/2
D# 3_1102_21447_4831/2
D# 3_1109_3146_18012/2
D# 3_1114_10155_22172/1
D# 3_1115_12503_2800/2
D# 3_1115_23862_19189/1
D# 3_1117_27603_9017/2
D# 3_2104_16166_2609/2
D# 3_2109_13734_9104/1
D# 3_2109_27568_10853/2
D# 3_2110_11102_7597/2
D# 3_2110_2364_16902/2
D# 3_2113_4613_1931/2
D# 3_1104_10326_6860/2
D# 3_1108_9844_24013/2
D# 3_1111_18442_13584/2
D# 3_1114_19289_21938/2
D# 3_1115_11745_16103/2
D# 3_1116_13157_3299/2
D# 3_2107_18458_14512/2
D# 3_2110_17705_23238/1
D# 2_2101_13643_9097/2
D# 3_1106_5994_4961/2
D# 3_1110_5843_1805/2
D# 3_1115_23862_19189/2
D# 3_2101_8539_22356/1
D# 3_1106_12705_7847/2
D# 3_1111_16082_2820/2
D# 3_1114_10155_22172/2
D# 1_1101_16129_19991/2
D# 1_1104_16321_15298/2
D# 1_1105_20602_3834/2
D# 1_1105_20996_22165/2
D# 1_1105_23379_7310/2
D# 1_1106_10534_7105/2
D# 1_1107_25054_5374/2
D# 1_1110_11883_9204/2
D# 1_1116_6925_17326/2
D# 1_1118_17292_11157/2
D# 1_1119_6185_15980/2
D# 2_1105_11609_4908/2
D# 2_1110_11222_13597/2
D# 2_1101_11690_6734/2
D# 2_1101_13017_5646/2
D# 2_1101_8666_10320/2
D# 2_1102_13676_21762/2
D# 2_1102_16003_20355/2
D# 2_1103_5426_8457/2
D# 2_1104_4285_12969/2
D# 2_1106_8193_14318/2
D# 2_1108_20999_13454/2
D# 2_1109_21188_19185/2
D# 2_1110_21066_15486/2
D# 2_1112_5815_16523/2
D# 2_1114_12487_3927/2
D# 2_1114_4651_11102/2
D# 2_1115_13611_4572/2
D# 2_1116_6416_14473/2
D# 2_1117_11753_13384/2
D# 2_1118_15494_17782/2
D# 2_1118_24144_5387/2
D# 2_1119_16236_16765/2
D# 2_1119_8523_20445/2
    
```



Diversidad genética y diferenciación poblacional

- Similares frecuencias alélicas en las 3 poblaciones
- Contigs con valores extremos
- F_{ST} global = 0,0239
- Aislamiento por distancia

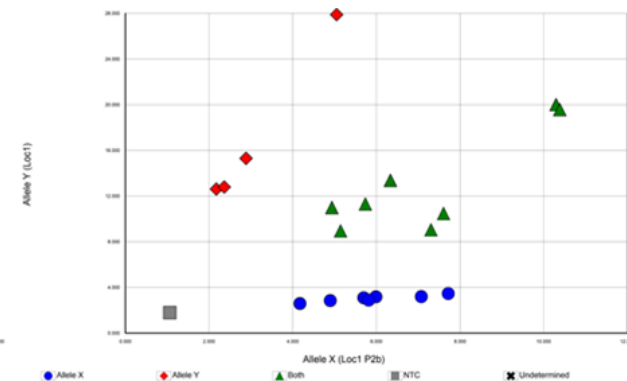
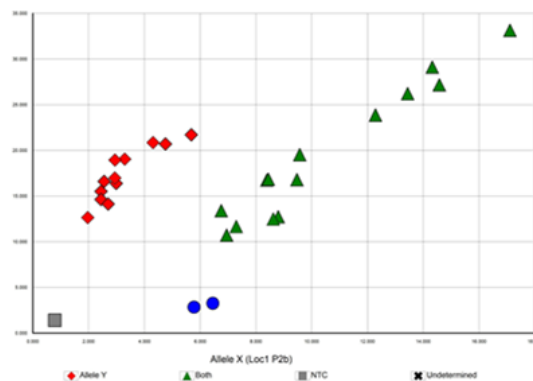
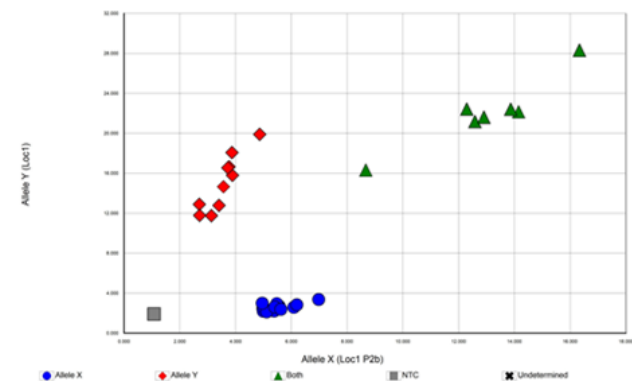
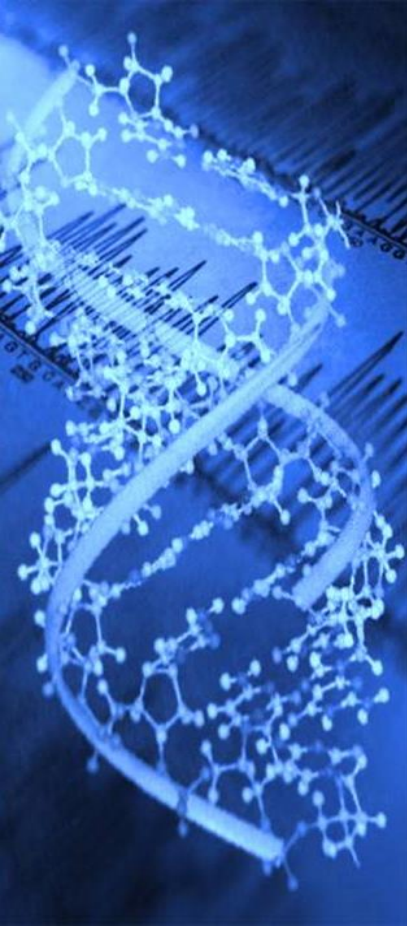


Samples			
Aveiro			
Lecroisic	0,02845		
Noia	0,01647	0,026789	

Table 1. Pairwise F_{ST} values among de samples from the three evaluated geographic locations.

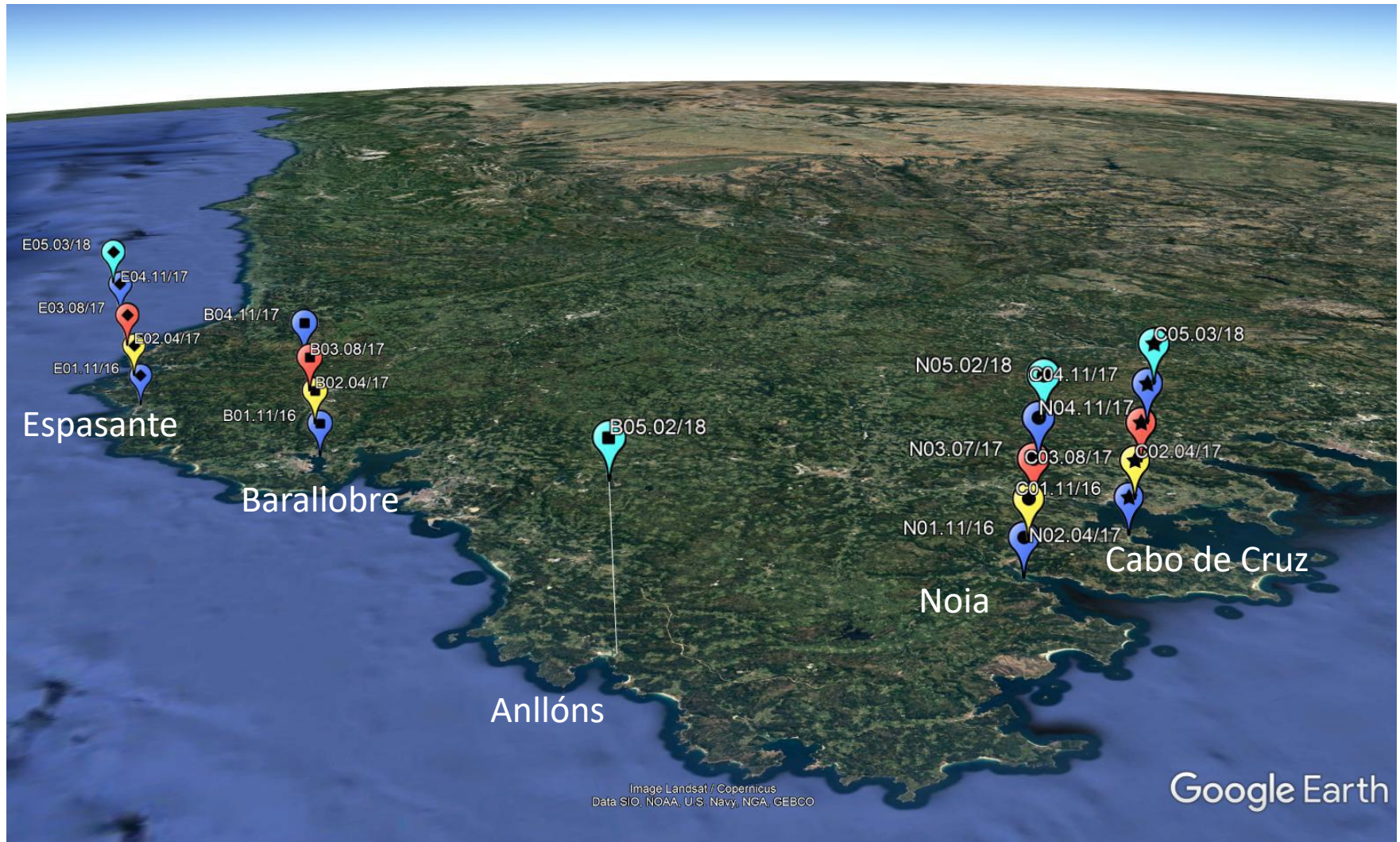
Asignación a una población basada en la discriminación alélica

- Interrogación SNPs por real-time PCR
 - Alta capacidad de procesamiento
 - Fiabilidad
 - Rapidez
 - Económico
 - Universal
- Combinación de loci para la obtención de una alta probabilidad discriminatoria



Análisis del microbioma de *C. edule* para la autenticación del recurso.

- Se elaboraron 5 colecciones estacionales de 5 individuos por muestreo suministrados por diversas cofradías.

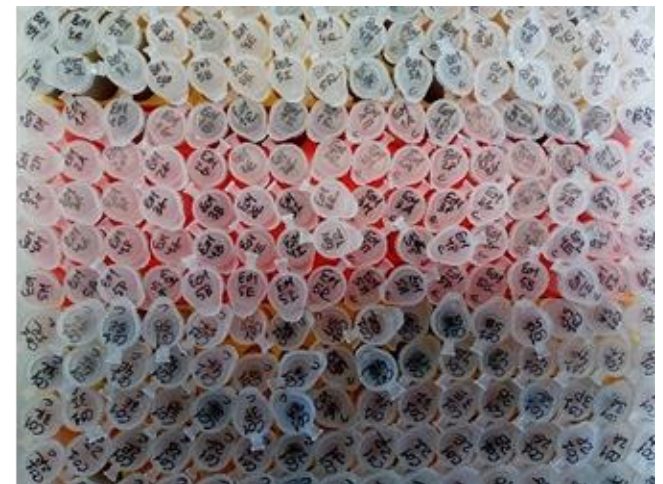
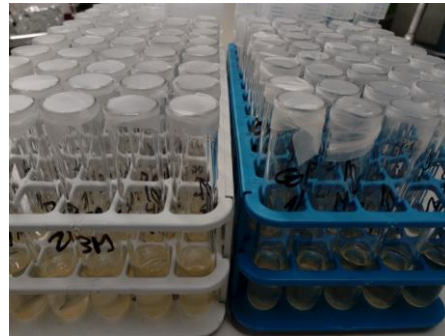


Análisis del microbioma de *C. edule* para la autenticación del recurso.

- Se elaboraron las correspondientes colecciones estacionales de microorganismos obtenidos a partir de biopsias de individuos de las distintas poblaciones de Galicia evaluadas.



Colección de microorganismos aislados a partir de biopsias de individuos de *Cerastoderma edule*.



Análisis del microbioma de *C. edule* para la autenticación del recurso.

- **Metodología:** Aislamiento DNA, PCRs barcoding 16S rRNA, Secuenciación masiva, Análisis metagenómicos

20 muestras
2463946 seqs
1313 features

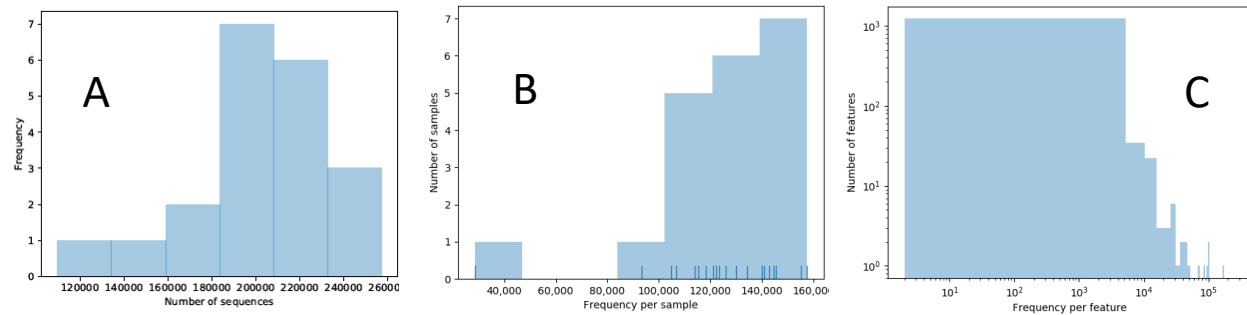


Figure 1. Histograms summarizing the sequence data.

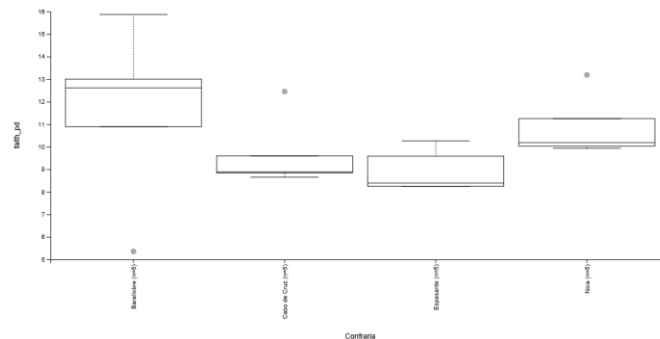
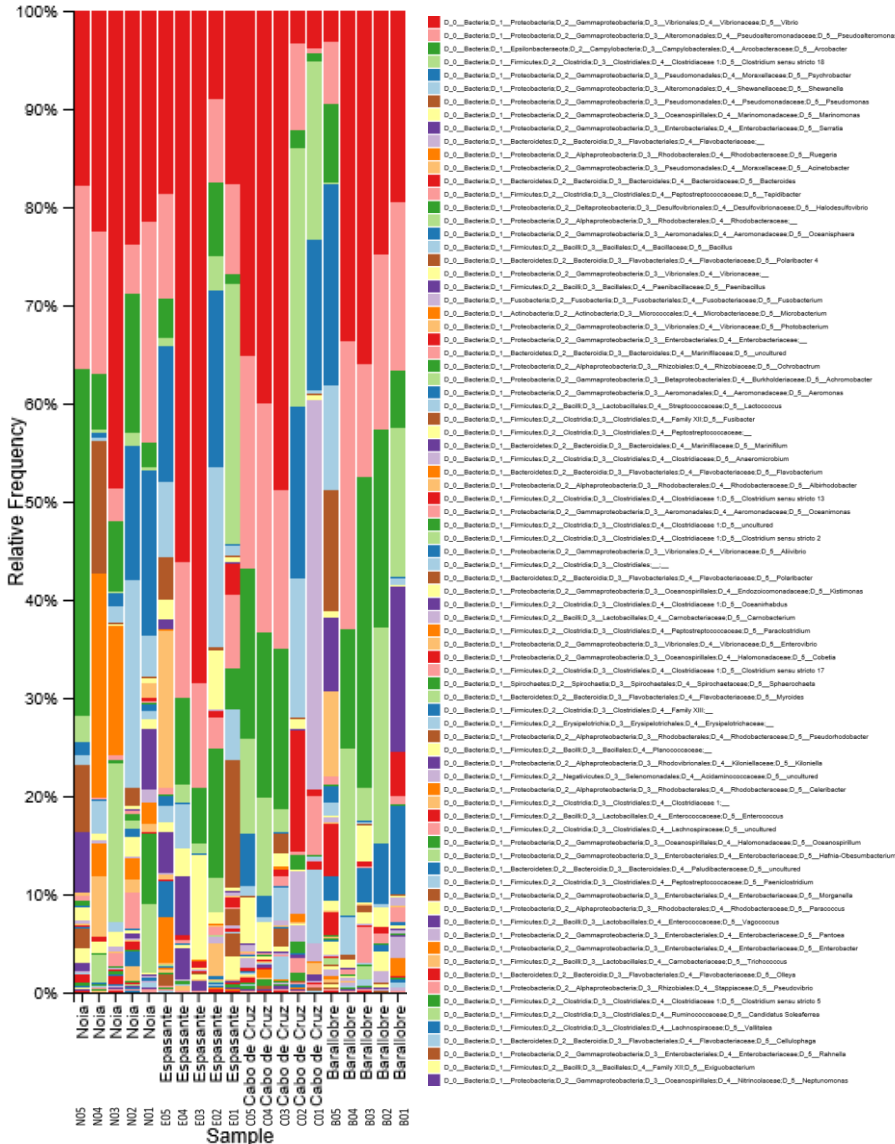


Figure 3. Test for the association among location of common cockle capture (Confrarias) and bacterial community richness.

The analysis of bacterial composition respect to the to the capture location and season was performed using PERMANOVA (6). Thus, the samples from the same capture location (Confraria) were more similar to each other then they are to samples from the other Confrarias (pseudo-F=1.511, 999 permutations, P=0.035). In contrast, non-significant value was obtained when considering year season of capture (pseudo-F=1.017, 999 permutations, P=0.442)

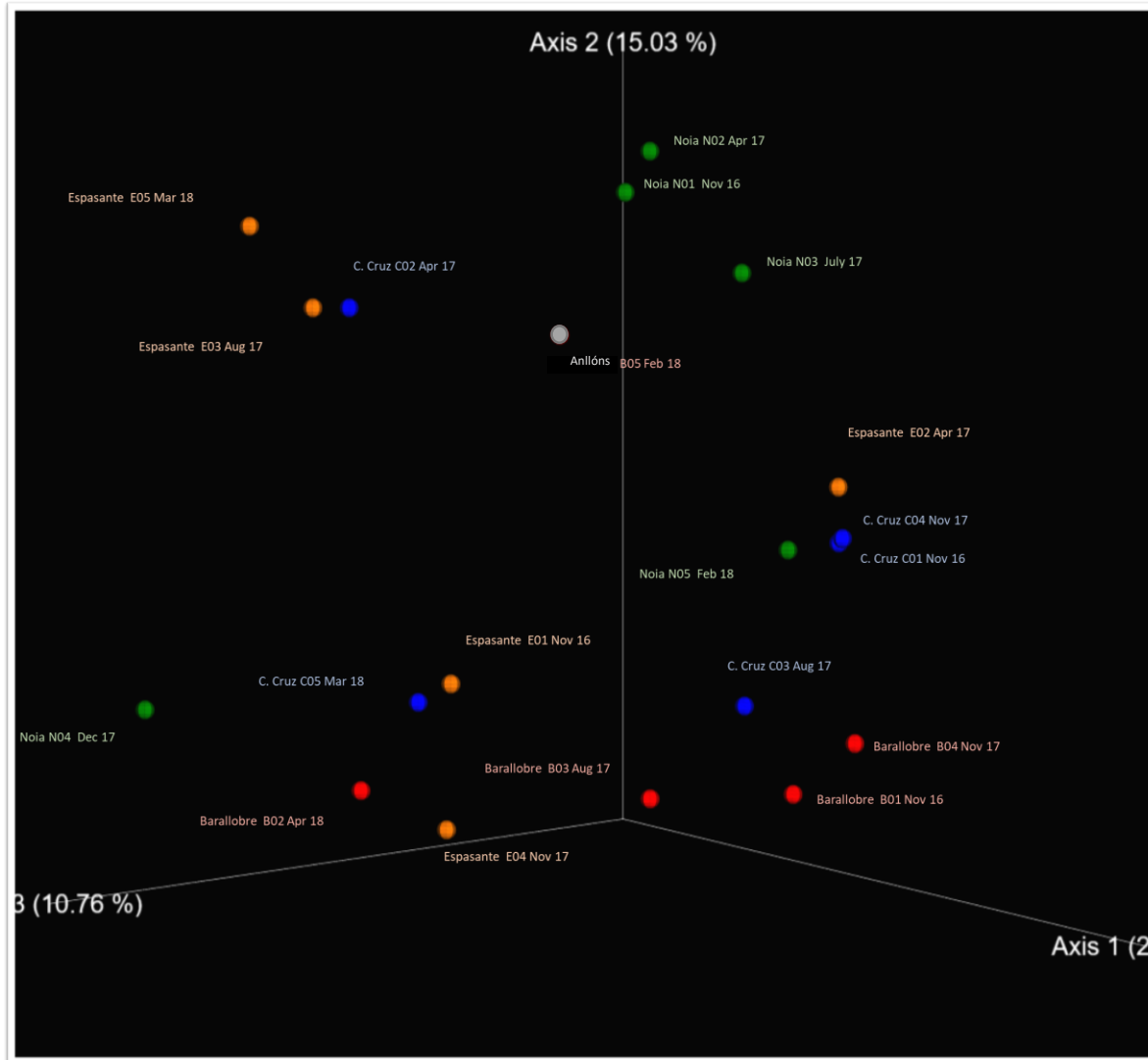
Diversidad taxonómica en el microbioma de *C. edule* en poblaciones de la costa gallega



Principales taxa % abundancia

- Gammaproteobacteria
 - *Vibrio*
 - *Pseudoalteromonas*
 - *Psychrobacter*
 - *Shewanella*
 - *Pseudomonas*
 - *Serratia*
 - *Acinetobacter*
 - *Marinomonas*
 - *Oceanisphaera*
 - *Photobacterium*
- Alfaproteobacteria
 - *Ruegeria*
 - Rhodobacteraceae
- Deltaproteobacteria
 - *Halodesulfovibrio*
- Campylobacteria
 - *Arcobacter*
- Firmicutes
 - *Clostridium*
 - *Paenibacillus*
 - *Bacillus*
- Bacteroidia
 - Flavobacteriaceae
- Fusobacteria
 - *Fusobacterium*
- Actinobacteria
 - *Microbacterium*

Relación entre la composición del microbioma de *C. edule* y la localización de captura (Confraría)

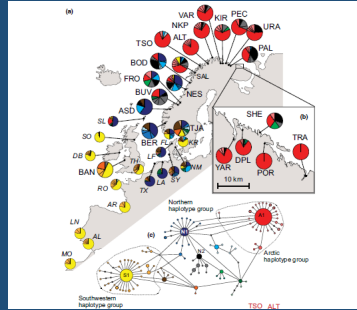


PCoA
(unweighted
UniFRac)
incluyendo 20
muestras
analizadas con
el color
codificando el
origen de
captura
(Confraría).

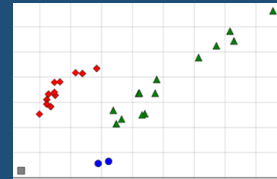
Protocolo para la autenticación del berberecho *C. edule* de la rías gallegas

- Análisis de identificación de especie (*Cerastoderma edule*)
- Pertenencia a poblaciones suroeste europeo

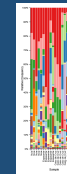
Reino Unido e Irlanda
Francia
España
Portugal
Marruecos



- Análisis de asignación a la población de las costas gallegas



- Discriminación entre poblaciones vecinas



Secuenciación/
PCR-RFLP COX1

Secuenciación
librería ddRAD
EcoRI/HindIII

Secuenciación
fragmentos de loci
con SNPs
diagnóstico

Real-time PCR
Discriminación
alélica/ Ensayo Plus-
Minus

Análisis de microbioma

Especie
Sur Europa

Gallego

Confraría



Muchas gracias por su atención

Este trabajo fue financiado por el Proyecto: ValoBer.Gal :” VALORIZACIÓN DO BERBERECHO *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) DA COSTA GALEGA, MEDIANTE MARCADOR DE IDENTIDADE DA SÚA ORIXE XEOGRÁFICA”. GALP4.011. Participants: Confraría de Noia and Confraría de pescadores de Muros, Agrupación de Mariscadores "Río Anllóns“, Confraría de Pescadores de Barallobre, Confraría de Pescadores de Espasante, Confraría de Pescadores de Cabo de Cruz.



Agradecimientos: Rodrigo Burgos, Enrique Varo, Laurent Cortijos, Jacobo Fernández y Paulo Mello (Mar de Sensacoés)