



Intégration des approches métagénomiques dans l'étude de la diversité des coléoptères saproxyliques : progrès et perspectives



Rodolphe Rougerie (1), Christophe Bouget (2) & Carlos Lopez-Vaamonde (1)

(1) INRA, URZF, Orléans

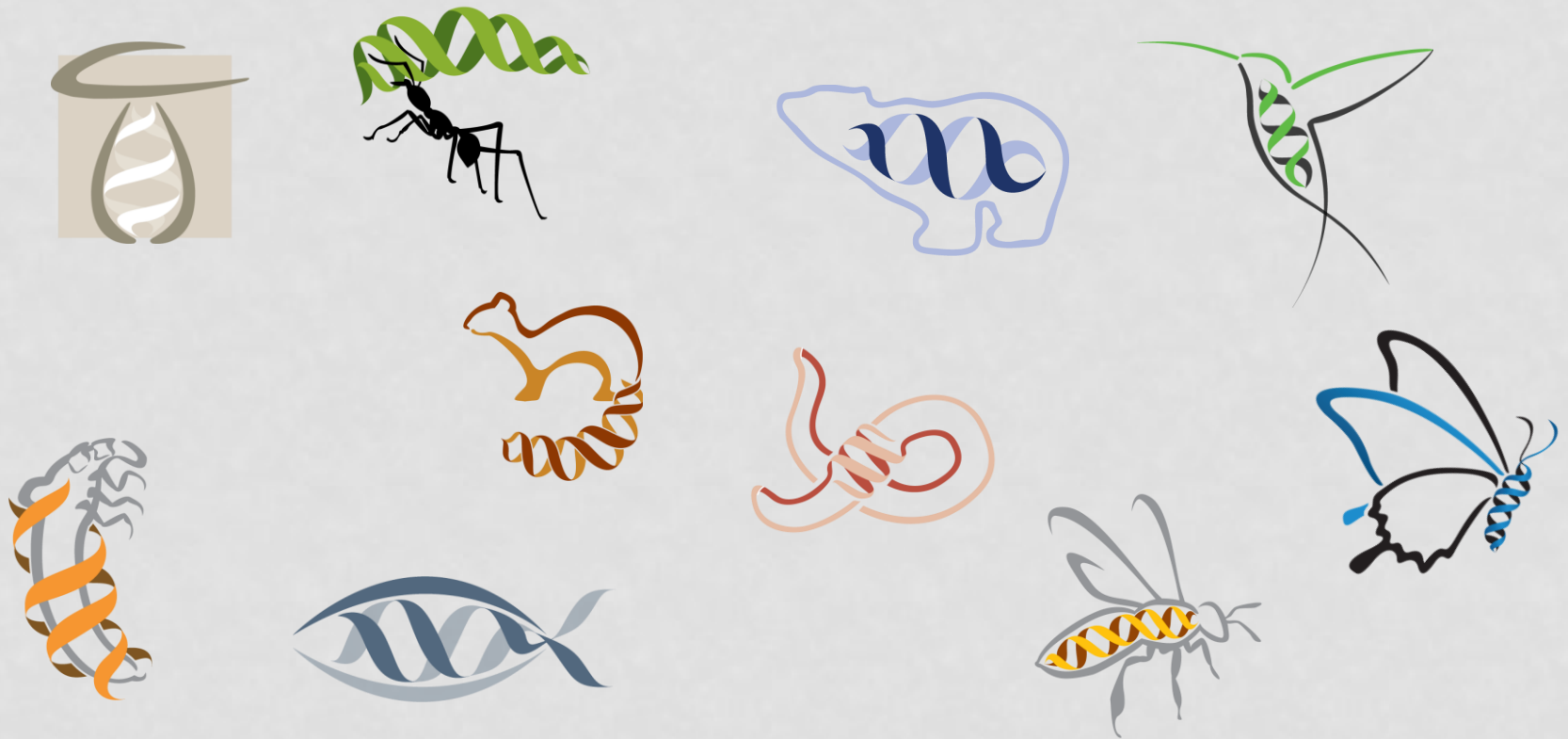
(2) IRSTEA, Nogent-sur-Vernisson



Introduction

Propositions d'Amélioration du Système de Suivi de la biodiversité FORestière (PASSIFOR)

VOLET 2 : ETUDE DE FAISABILITÉ D'UN SUIVI QUANTITATIF SIMPLIFIÉ DIRECT DES COLÉOPTÈRES SAPROXYLIQUES SUR UN RÉSEAU NATIONAL DE PLACETTES FORESTIÈRES

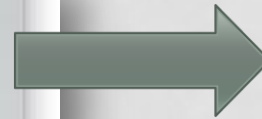


Approches métagénomiques de la diversité des coléoptères saproxyliques
R. Rougerie, C. Bouget & C. Lopez-Vaamonde

Introduction

Propositions d'Amélioration du Système de Suivi de la biodiversité FORestière (PASSIFOR)

VOLET 2 : ETUDE DE FAISABILITÉ D'UN SUIVI QUANTITATIF SIMPLIFIÉ DIRECT DES COLÉOPTÈRES SAPROXYLIQUES SUR UN RÉSEAU NATIONAL DE PLACETTES FORESTIÈRES



DNA Barcoding
Coléoptères saproxyliques

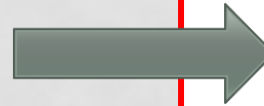
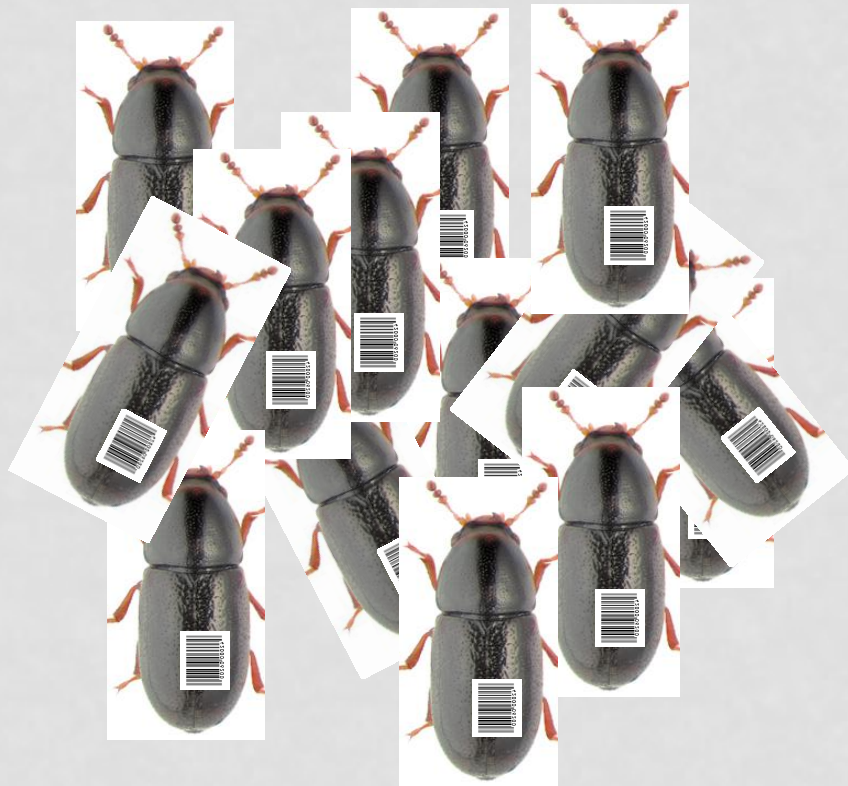


Approches métagénomiques de la diversité des coléoptères saproxyliques
R. Rougerie, C. Bouget & C. Lopez-Vaamonde

Introduction

Propositions d'Amélioration du Système de Suivi de la biodiversité FORestière (PASSIFOR)

VOLET 2 : ETUDE DE FAISABILITÉ D'UN SUIVI QUANTITATIF SIMPLIFIÉ DIRECT DES COLÉOPTÈRES SAPROXYLIQUES SUR UN RÉSEAU NATIONAL DE PLACETTES FORESTIÈRES



DNA Metabarcoding



Approches métagénomiques de la diversité des coléoptères saproxyliques
R. Rougerie, C. Bouget & C. Lopez-Vaamonde

Introduction

Propositions d'Amélioration du Système de Suivi de la biodiversité FORestière (PASSIFOR)

VOLET 2 : ETUDE DE FAISABILITÉ D'UN SUIVI QUANTITATIF SIMPLIFIÉ DIRECT DES COLÉOPTÈRES SAPROXYLIQUES SUR UN RÉSEAU NATIONAL DE PLACETTES FORESTIÈRES

- Rôle majeur dans cycles bio-géochimiques forestiers
- Agents importants des services écosystémiques
- Indicateurs biologiques

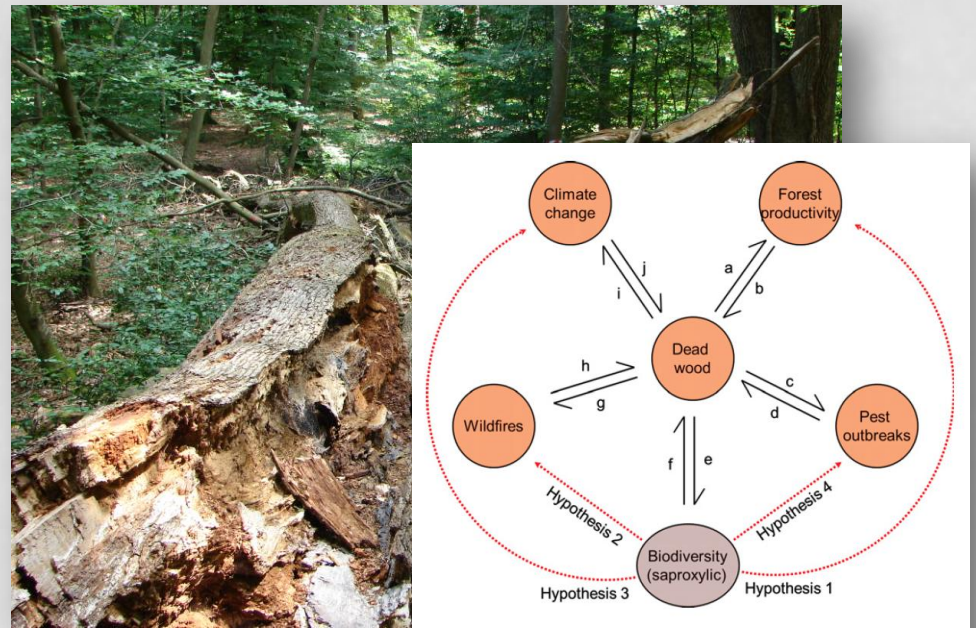


Fig. 1. Saproxylic arthropod biodiversity and four other concerns in forest ecology and management (i.e. wildfires, climate change, productivity and pest outbreaks) have the potential to influence one another either directly (not shown) or indirectly through their relationships with dead wood (solid arrows).

Reproduit d'après Ulyshen (2013)



Approches métagénomiques de la diversité des coléoptères saproxyliques

R. Rougerie, C. Bouget & C. Lopez-Vaamonde

Introduction

Propositions d'Amélioration du Système de Suivi de la biodiversité FORestière (PASSIFOR)

VOLET 2 : ETUDE DE FAISABILITÉ D'UN SUIVI QUANTITATIF SIMPLIFIÉ DIRECT DES COLÉOPTÈRES SAPROXYLIQUES SUR UN RÉSEAU NATIONAL DE PLACETTES FORESTIÈRES

- Rôle majeur dans cycles bio-géochimiques forestiers
- Agents importants des services écosystémiques
- Indicateurs biologiques

Forest Ecology and Management 261 (2011) 211–220

Contents lists available at ScienceDirect

Forest Ecology and Management

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foreco

Exploring the “last biotic frontier”: Are temperate forest canopies special for saproxylic beetles?

Christophe Bouget^{a,*}, Antoine Brin^b, Hervé Brustel^b

^a Institute for Engineering in Agriculture and Environment (Cemagref), Research Unit ‘Forest ecosystems’, Domaine des Barres, F-45290 Nogent-sur-Vernisson, France
^b Université de Toulouse, Ecole d’Ingénieurs de Purpan, 75 voie du T.O.E.C., BP 57611, F-31076 Toulouse Cedex 03, France

Ecological Indicators 20 (2012) 304–315

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Ecological Indicators

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecolind

A test for assessment of saproxylic beetle biodiversity using subsets of “monitoring species”

Pavel Sebek^{a,b}, Thomas Barnouin^c, Antoine Brin^d, Hervé Brustel^d, Marc Dufrêne^{e,f}, Frederic Gosselin^a, Bruno Meriguet^g, Lilian Micas^c, Thierry Noblecourt^c, Olivier Rose^c, Laurent Velle^c, Christophe Bouget^{a,*}

Insect Conservation and Diversity

Insect Conservation and Diversity (2013) 6, 255–264 doi: 10.1111/j.1752-4598.2012.00209.x

Are stumps important for the conservation of saproxylic beetles in managed forests? – Insights from a comparison of assemblages on logs and stumps in oak-dominated forests and pine plantations

ANTOINE BRIN,¹ CHRISTOPHE BOUGET,² LIONEL VALLADARES¹ and HERVÉ BRUSTEL¹
¹Purpan Engineering School, UMR INRA/INPT Dynafor 1201, University of Toulouse, Toulouse, France, ²Research Unit ‘Forest Ecosystems’, Institute for Engineering in Agriculture and Environment (Irstea), Domaine des Barres, Nogent-sur-Vernisson, France



Approches métagénomiques de la diversité des coléoptères saproxyliques
R. Rougerie, C. Bouget & C. Lopez-Vaamonde

Introduction

Propositions d'Amélioration du Système de Suivi de la biodiversité FORestière (PASSIFOR)

VOLET 2 : ETUDE DE FAISABILITÉ D'UN SUIVI QUANTITATIF SIMPLIFIÉ DIRECT DES COLÉOPTÈRES SAPROXYLIQUES SUR UN RÉSEAU NATIONAL DE PLACETTES FORESTIÈRES

L'approche metabarcoding pour permettre le suivi direct et à large échelle des communautés de coléoptères saproxyliques en s'affranchissant du « verrou taxonomique » (tri, identification) ?



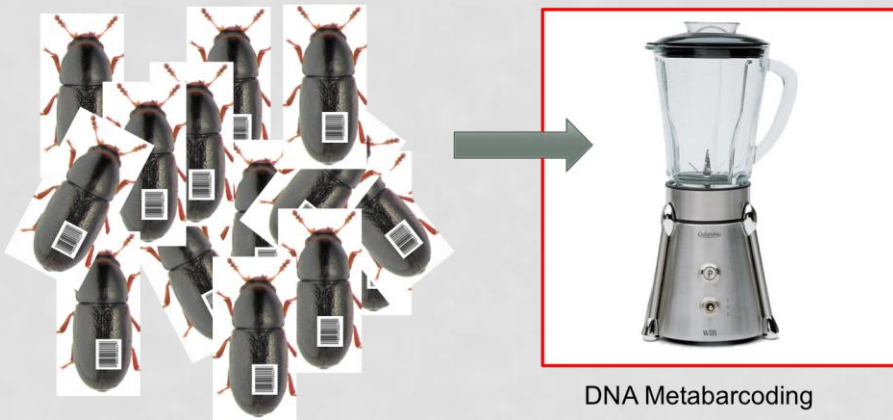
Faune de France : env. 2500 espèces (dans 71 familles)



Approches métagénomiques de la diversité des coléoptères saproxyliques
R. Rougerie, C. Bouget & C. Lopez-Vaamonde

INTÉGRATION DES APPROCHES MÉTAGÉNOMIQUES DANS L'ÉTUDE DE LA DIVERSITÉ DES COLÉOPTÈRES SAPROXYLIQUES : PROGRÈS ET PERSPECTIVES

1. DNA Metabarcoding



2. PASSIFOR



DNA Metabarcoding

ECOLOGY LETTERS

Ecology Letters, (2013)

doi: 10.1111/ele.12162

IDEA AND PERSPECTIVE

Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding

Abstract

Yinqiu Ji,^{1‡} Louise Ashton,^{2‡} Scott M. Pedley,^{3‡} David P....

To manage and conserve biodiversity, one must know what is being lost, where, and why, as well as which remedies are likely to be most effective. Metabarcoding technology can characterise the species compositions of mass samples of eukaryotes or of environmental DNA. Here, we validate metabarcoding by testing

Ji et al. 2013: « [...] une méthode rapide d'inventaire de biodiversité combinant deux technologies: la taxonomie ADN et le séquençage à haut-débit. »

Carew et al. *Frontiers in Zoology* 2013, 10:45
<http://www.frontiersinzoology.com/content/10/1/45>



FRONTIERS IN ZOOLOGY

RESEARCH

Open Access

Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species

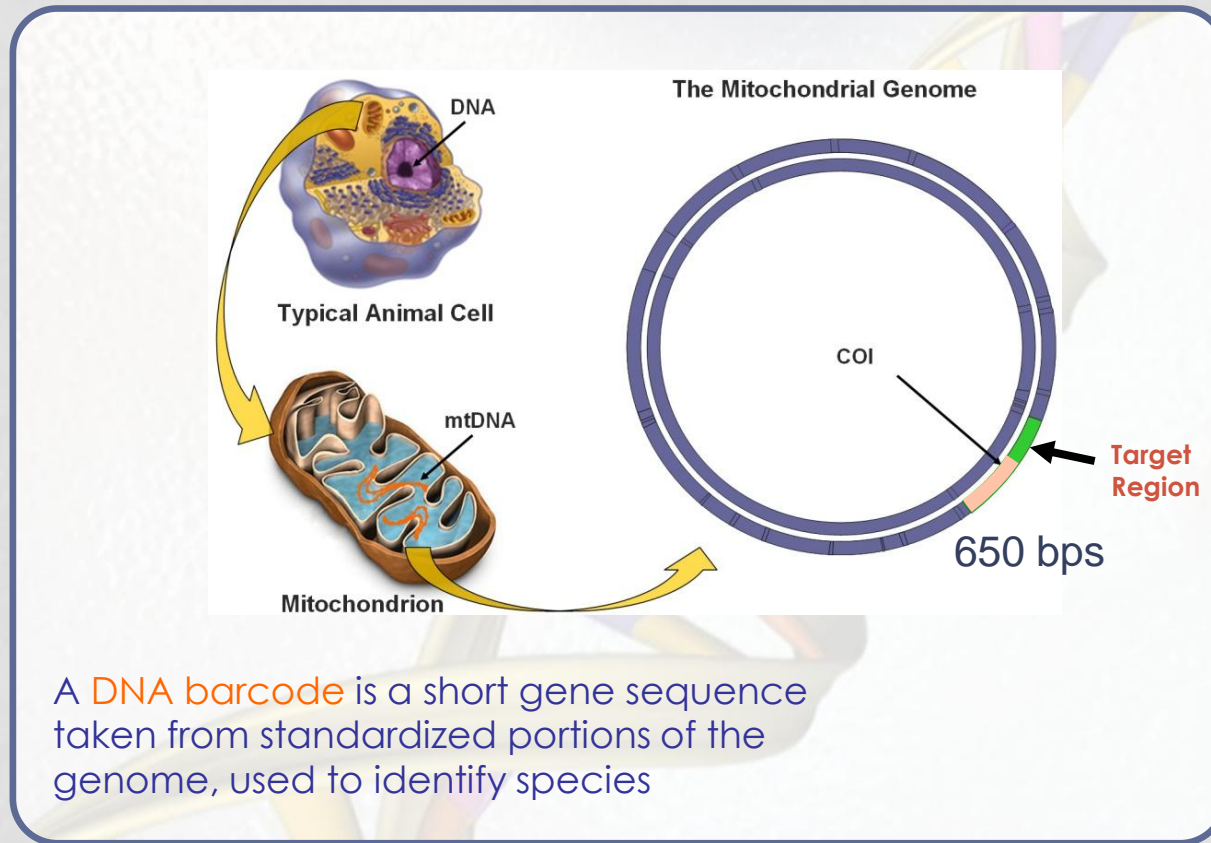
Melissa E Carew^{1*}, Vincent J Pettigrove¹, Leon Metzeling² and Ary A Hoffmann^{1,3}



Approches métagénomiques de la diversité des coléoptères saproxyliques
R. Rougerie, C. Bouget & C. Lopez-Vaamonde

DNA **Meta**barcoding : le principe

- **DNA Barcoding** : utilisation d'un marqueur génétique standard pour l'identification des espèces (comparaison de séquences d'ADN)



DNA **Meta**barcoding : est-ce que ça marche ?

biology
letters

Evolutionary biology

Biol. Lett. (2010) 6, 359–362
doi:10.1098/rsbl.2009.0848

OPEN ACCESS Freely available online

Wolbachia and DNA Barcoding Insects: Patterns, Potential, and Problems

M. Alex Smith^{1*}, Claudia Bertrand¹, Kate Crosby², Eldon S. Eveleigh³, Jose Fernandez-Triana¹, Brian L. Fisher⁴, Jason Gibbs⁵, Mehrdad Hajibabaei¹, Winnie Hallwachs⁶, Katharine Hind⁷, Jan Hrcek⁸, Da-Wei Huang⁹, Milan Janda¹⁰, Daniel H. Janzen⁶, Yanwei Li⁹, Scott E. Miller¹⁰, Laurence Packer¹¹, Donald Quicke^{12,13}, Sujeevan Ratnasingham¹, Josephine Rodriguez¹⁴, Rodolphe Rougerie¹⁵, Mark R. Shaw¹⁶, Cory Sheffield¹¹, Julie K. Stahlhut¹, Dirk Steinke¹, James Whitfield¹⁷, Monty Wood¹⁸, Xin Zhou¹⁹

¹Biodiversity Institute of Ontario, Canada N1G

²Department of Forestry Science, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada V6T 1Z4

³Entomology, Royal British Columbia Museum, Victoria, British Columbia, Canada V8W 9W2

⁴Research Centre, Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, Ontario, Canada K1A 0C6

*Author for correspondence (phebert@uoguelph.ca).

This study reports DNA barcodes for more than 1200 Lepidoptera species from the eastern half



Open
69 ad
detail

CSIRO PUBLISHING

Invertebrate Systematics, 2012, 26, 445–450
<http://dx.doi.org/10.1071/IS12029>

DNA barcodes and morphology reveal a hybrid hawkmoth in Tahiti (Lepidoptera : Sphingidae)

R. Rougerie^{A,E}, Jean Haxaire^B, Ian J. Kitching^C and Paul D. N. Hebert^D

OPEN ACCESS Freely available online

Rare Failures of DNA Bar Codes to Separate Morphologically Distinct Species in a Biodiversity Survey of Iberian Leaf Beetles

Andrés Baselga^{1*}, Carola Gómez-Rodríguez^{1,2}, Francisco Novoa¹, Alfried P. Vogler^{2,3}

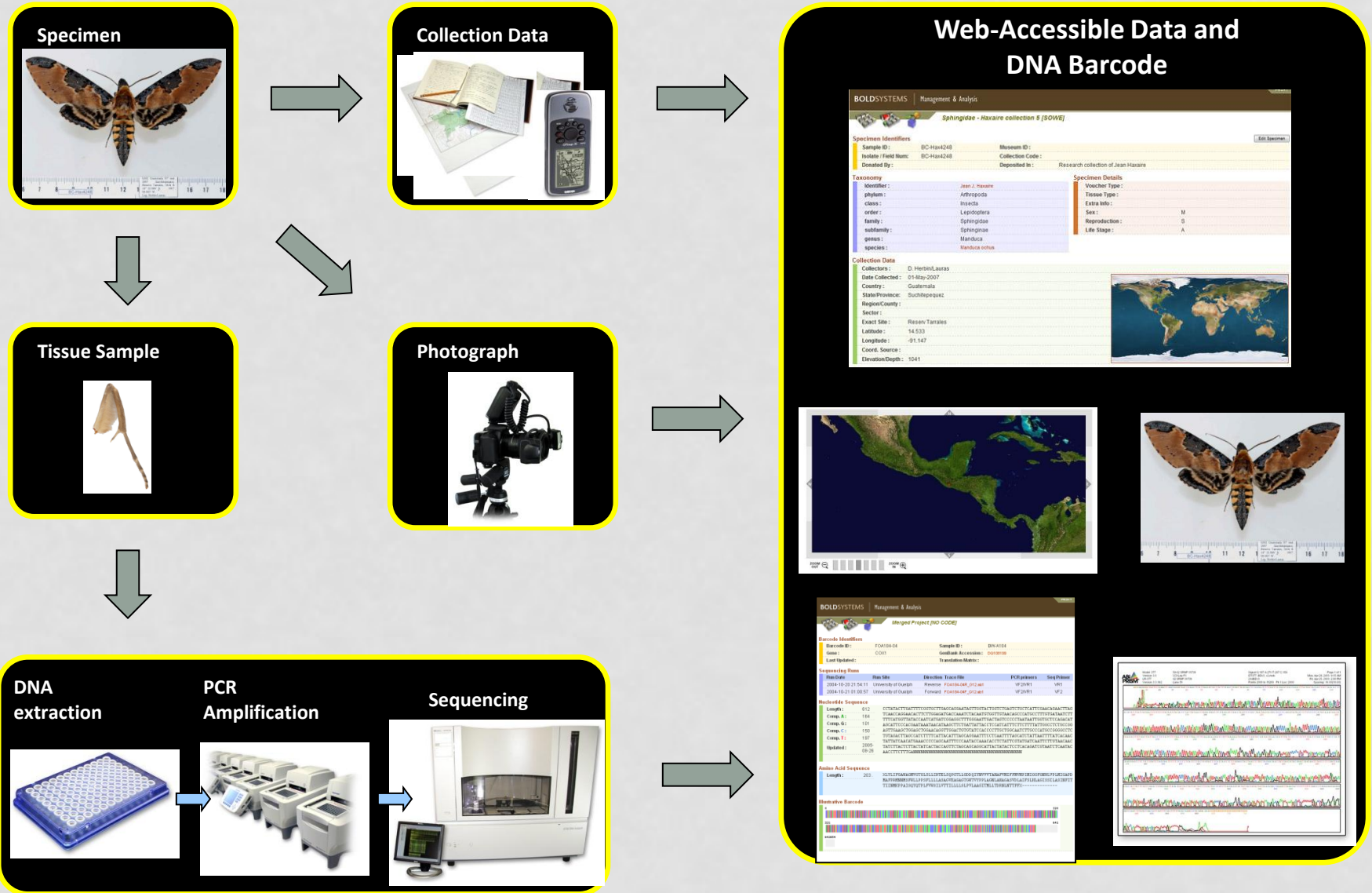
¹ Departamento de Zoología, Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain, ² Department of Life Sciences, Natural History Museum, London, United Kingdom, ³ Division of Biology, Imperial College London, Ascot, United Kingdom



Approches métagénomiques de la diversité des coléoptères saproxyliques

R. Rougerie, C. Bouget & C. Lopez-Vaamonde

DNA Metabarcoding : la librairie de référence



Approches métagénomiques de la diversité des coléoptères saproxyliques
 R. Rougerie, C. Bouget & C. Lopez-Vaamonde

DNA Metabarcoding : en pratique ?



BOLDSYSTEMS Databases |

Identification Request

Animal Identification (COI) | **Fungal Identification (ITS)**

The BOLD Identification System (IDS) for COI accepts forensic applications.
 Historical Databases: Jul-2012 Jul-2011 Jul-2010

Search Databases:

- All Barcode Records on BOLD (1,790,548 Sequences) Every COI barcode record on BOLD with a minimum of 10 matches and does not provide a probability of identification.
- Species Level Barcode Records (1,367,662 Sequences) Every COI barcode record with a species level identification as well as all species with interim taxonomic status.
- Public Record Barcode Database (341,580 Sequences) All published COI records from BOLD and GenBank section of BOLD.
- Full Length Record Barcode Database (1,126,800 Sequences) Subset of the Species library with a minimum sequence identification as it provides maximum overlap with other databases.

Enter sequences in fasta format:

Query: BLPCC851-08|Manduca oculus

Top Hit: Arthropoda - Lepidoptera - Manduca oculus (100%)

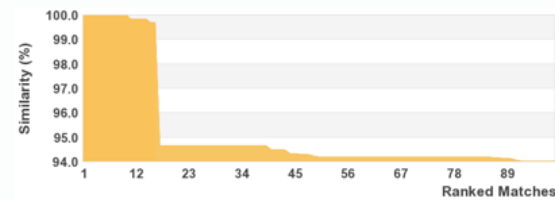
Search Request:

Type: COI FULL DATABASE (includes records without species designation)

Search Result:

Tree Based Identification

Similarity scores of the top 99 matches:



TOP 20 Matches :

Display option: Top 20

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	100	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	100	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	100	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	100	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	100	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	100	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	100	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	100	Early-Release
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	100	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	99.85	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	99.85	Early-Release
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	99.85	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	99.85	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	99.69	Early-Release
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	ochus	99.69	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	sextaDHJ03	94.65	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	sextaDHJ03	94.65	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	sextaDHJ03	94.65	Published
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Sphingidae	Manduca	sextaDHJ03	94.65	Published

TATT
 ATAC
 TTGG
 CTCG
 GAAG
 ATAT
 TTTC
 ATAT
 TATT
 TAAA
 TT



Approches métagénomiques de la diversité des coléoptères saproxyliques
 R. Rougerie, C. Bouget & C. Lopez-Vaamonde

Public Data Portal - BIN Page

Print

BINs

Specimen Data Sequences Combined

Show Help

Barcode Index Number Registry for BOLD:AAC0423

Back to Last Page

Go to public records in this BIN

BIN DETAILS:

<u>BIN URI:</u>	BOLD:AAC0423	<u>Average Distance:</u>	0.15% (p-dist)
<u>DOI:</u>	http://dx.doi.org/10.5883/BOLD:AAC0423	<u>Maximum Distance:</u>	0.62% (p-dist)
<u>Member Count:</u>	16 [16 Public]	<u>Distance to Nearest Neighbor:</u>	5.35% (p-dist)
<u>Barcode Compliant Members:</u>	14		
<u>Founding Record:</u>			

NEAREST NEIGHBOR (NN) DETAILS:

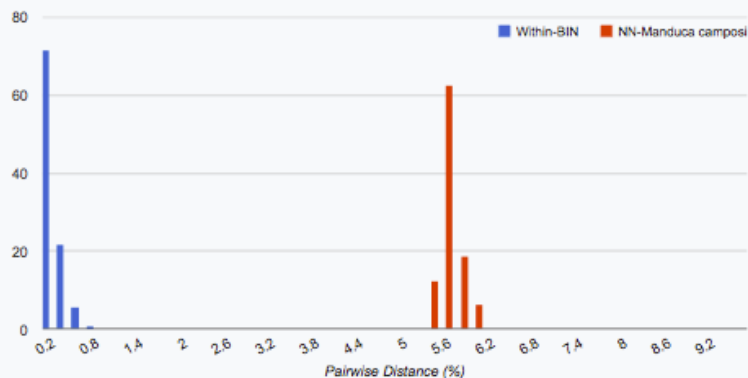
<u>Nearest BIN URI:</u>	BOLD:AAA4569	<u>Average Distance:</u>	0.86% (p-dist)
<u>Member Count:</u>	114	<u>Maximum Distance:</u>	3.15% (p-dist)
<u>Nearest Member:</u>	SOWB872-06	<u>Distance Variance:</u>	0.52% (p-dist)
<u>Nearest Member Taxonomy:</u>	Arthropoda, Insecta, Lepidoptera, Sphingidae, Sphinginae, Manduca, Manduca camposi		

TAXONOMY:

<u>Phylum:</u>	Arthropoda [16]	<input type="button" value=""/>
<u>Class:</u>	Insecta [16]	<input type="button" value=""/>
<u>Order:</u>	Lepidoptera [16]	<input type="button" value=""/>
<u>Family:</u>	Sphingidae [16]	<input type="button" value=""/>
<u>Subfamily:</u>	Sphinginae [16]	<input type="button" value=""/>
<u>Genus:</u>	Manduca [16]	<input type="button" value=""/>
<u>Species:</u>	Manduca ochus [16]	<input type="button" value=""/>

Add Tags & Comments Comments: 0 Associated Tags: No Tags

DISTANCE DISTRIBUTION:



BIN COMPLIANT WITH METADATA REQUIREMENTS

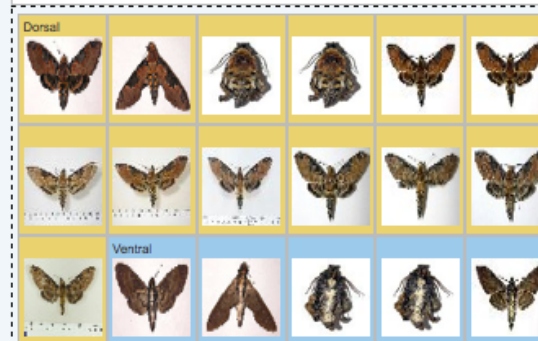
Specimen Images:



MHACG498-04 (Manduca ochus)
 License: Creative Commons - Attribution Non-Commercial Share-Alike

 License Holder: Daniel H. Janzen, Guanacaste Dry Forest Conservation Fund

Add Tags & Comments Comments: 0 Associated Tags: No Tags



Collection Sites:

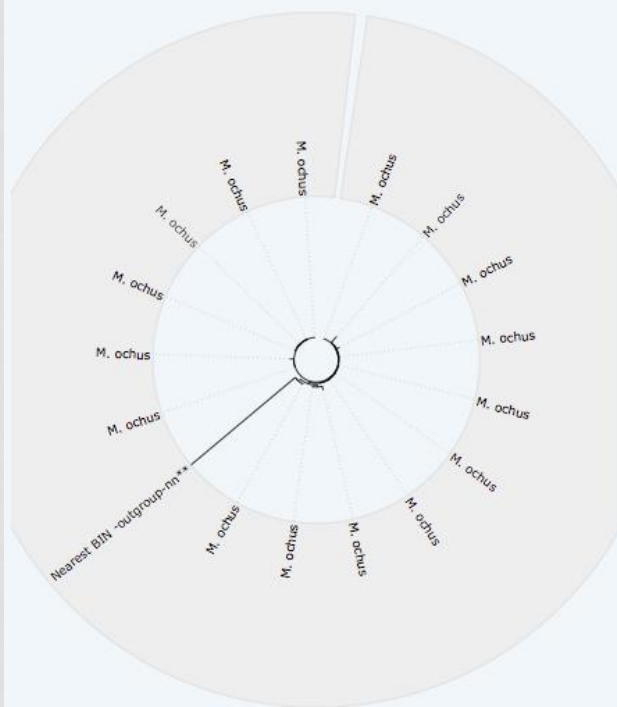


PUBLICATIONS:

John James Wilson, Rodolphe Rougerie, Justin Schonfeld, Daniel H Janzen, Winnie Hallwachs, Mehrdad Hajibabaei, Ian J Kitching, Jean Haxaire and Paul DN Hebert When species matches are unavailable are DNA barcodes correctly assigned to higher taxa? An assessment using springiid moths BMC Ecology 2011-08-01,11(18) ([PDF](#))

TREE RECONSTRUCTION OF BIN & NEAREST NEIGHBOR:

- [PDF tree \(All members and a member of the nearest BIN\)](#)

**HAPLOTYPIC NETWORK:**

Color & Label Scheme:

**COLLECTION LOCATION:**

Countries:		
Costa Rica	- [12]	
Mexico	- [2]	
Guatemala	- [2]	

DATA MANAGERS:

Public Data:	Private Data:
Mehrdad Hajibabaei - [10]	



[Add Tags & Comments](#) Comments: **0** Associated Tags: No Tags

Attribution:**Specimen Depositories:**

Area de Conservacion Guanacaste	- [2]	
Research Collection of D. H. Janzen & W. Hallwachs	- [2]	
Research Collection of Jean Haxaire	- [4]	
University of Pennsylvania	- [8]	

Sequencing Centers:

[Biodiversity Institute of Ontario](#) - [14]

Photography:

[Daniel H. Janzen](#) - [26]
[Jean Haxaire](#) - [3]

Collectors:

[D. Herbin/Lauras](#) - [1]
[F. Quesada&P. Franco](#) - [1]
[Felipe Chavarria](#) - [1]
[J. Haxaire](#) - [1]
[J. Haxaire & O. Paquit](#) - [1]
[Jose Alberto Sanchez](#) - [4]
[Julien Tourout](#) - [1]
[Mariano Pereira](#) - [2]
[Roster Moraga](#) - [3]
[S.Rios&H.Cambrenero](#) - [1]

Specimen Identification:

[Daniel H. Janzen](#) - [9]
[Jean J. Haxaire](#) - [4]

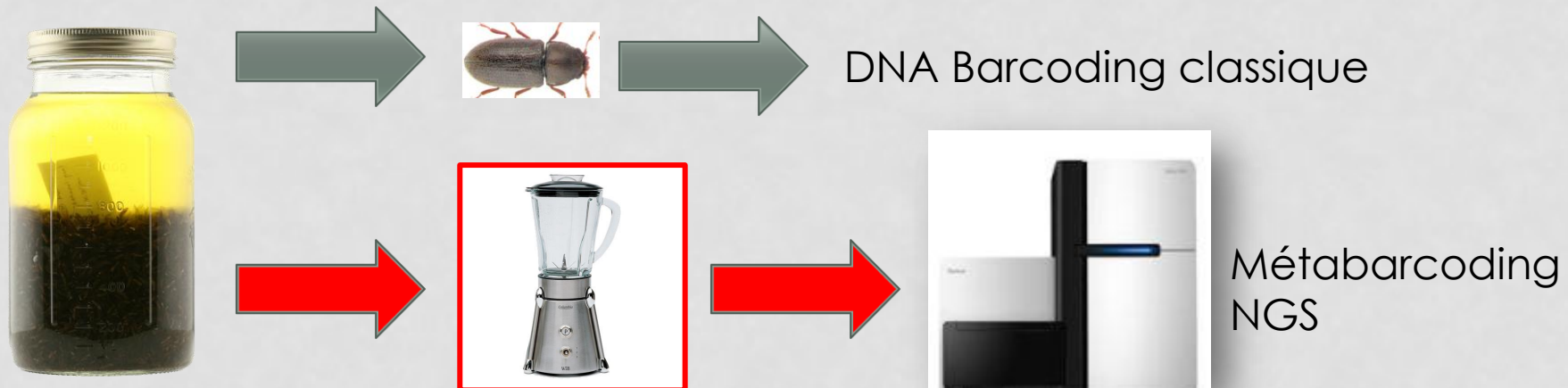
Sequencing Support:

[Canadian Barcode of Life Network](#) - [10]
[International Barcode of Life \(WG1.9\)](#) - [2]

[Add Tags & Comments](#) Comments: **0** Associated Tags: No Tags

DNA **Meta**barcoding

- **DNA Barcoding** : utilisation d'un marqueur génétique standard pour l'identification des espèces (comparaison de séquences d'ADN)
- **Identification par séquençage à haut-débit** des séquences d'ADN extraites simultanément d'un échantillon complexe (multi-espèces)
 - Échantillons totaux = « bulk samples »
 - Échantillons environnementaux (eDNA) : sol, eau, air – sans isolation des organismes cibles = mélanges complexes, parfois contenant ADN dégradé.



DNA Metabarcoding : performances et coût

NGS platforms	Read length (bp)	Data/run (GB)	Reads	Run time	Requirement of library construction
454 platform (GS FLX Titanium XL+)	700-1000	0.7	1.000.000	23 hr.	Yes
Illumina platform (Hi-Seq 2000)	2x100 PE reads	600	6.x10 ⁹ (PE)	11 d.	Yes
Illumina platform (Mi-Seq)	2x250 PE reads	2.6	35.10 ⁶ (PE)	27 hr.	Yes
Ion Torrent PI	200bp	~32 (+)	330.10 ⁶	2 hr.	No

454 pyrosequencing a jusqu'à présent été la méthode la plus utilisée du fait de la longueur des fragments lus, mais les progrès récents d'Illumina permettent de séquencer jusque 500bp (en Paired-End, sur MiSeq), avec un débit considérablement plus important. Le coût diminue aussi, notamment avec HiSeq 2000 (600Gb/run) pour 0.1 USD/1Mbp; 60K\$/run ; par comparaison : MiSeq à 0.3 USD/1Mbp (750 USD per run) ; 454 GS Junior à 31 USD/1Mbp.



DNA Metabarcoding : validations, exemples

- **Invertébrés d'eau douce** : Hajibabaei et al., 2011, 2012; Baird et al., 2012 (Biomonitoring 2.0)
- **Macro-diversité / espèces menacées en milieu aquatique** : Thomsen et al., 2012
- **Plantes** : Yoccoz et al. 2012 (dans le sol) ; Soininen et al. 2009 (contenu digestif d'herbivores)
- **Arthropodes** : Yu et al. 2012 – introduction du terme **METABARCODING**
- **Diatomées** : Kermarrec et al. 2013
- **Champignons** : Lindahl et al. 2013

DOMAINE DE RECHERCHE SE DÉVELOPPANT SUR DES AVANCÉES MÉTHODOLOGIQUES TRÈS RÉCENTES ET EN ÉVOLUTION CONSTANTE ET RAPIDE.



DNA Metabarcoding : validations, exemples

Methods in Ecology and Evolution



Methods in Ecology and Evolution 2012, 3, 613–623

doi: 10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x

Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment

Douglas W. Yu^{1,2*}†, Yinqiu Ji¹†, E. Chunyan Yang¹ and Zhaoli Ding³

Direct PCR amplification and sequencing of specimens' DNA from preservative ethanol

Shadi Shokralla, Gregory A. C. Singer, and Mehrdad Hajibabaei
Biodiversity Institute of Ontario, Department of Integrative Biology, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada

BioTechniques 48:233-234 (March 2010) doi 10.2144/000113362

Keywords: DNA extraction; sample preparation; biodiversity; DNA barcoding; museum samples

Methods in Ecology and Evolution

Methods in Ecology and Evolution 2013

High sensitivity of 454 pyrosequencing for detecting rare species in aquatic invertebrate metabarcoding

Aibin Zhan^{1,2*}, Martin Hulák¹, Francisco Sylvester³, Xiaoting Huang⁴, Abisola A. Adebayo¹, Cathryn L. Abbott⁵, Sarah J. Adamowicz⁶, Daniel D. Heath¹, Melania E. Cristescu^{1,7} and Hugh J. MacIsaac¹



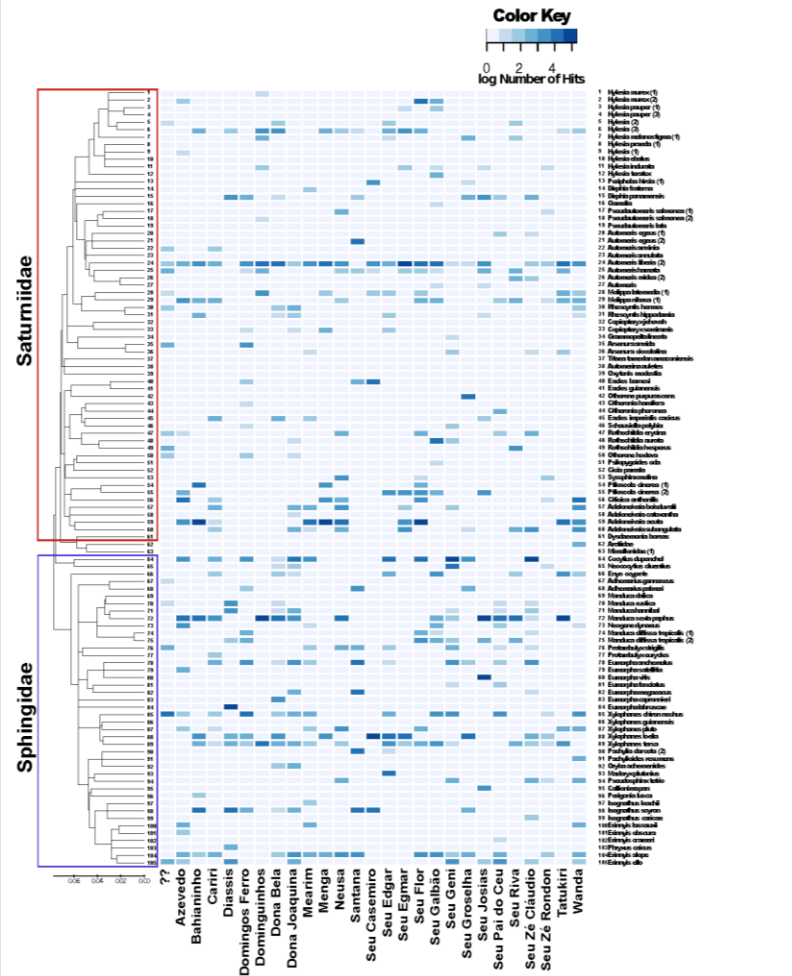
Approches métagénomiques de la diversité des coléoptères saproxyliques
R. Rougerie, C. Bouget & C. Lopez-Vaamonde

DNA Metabarcoding : validations, exemples

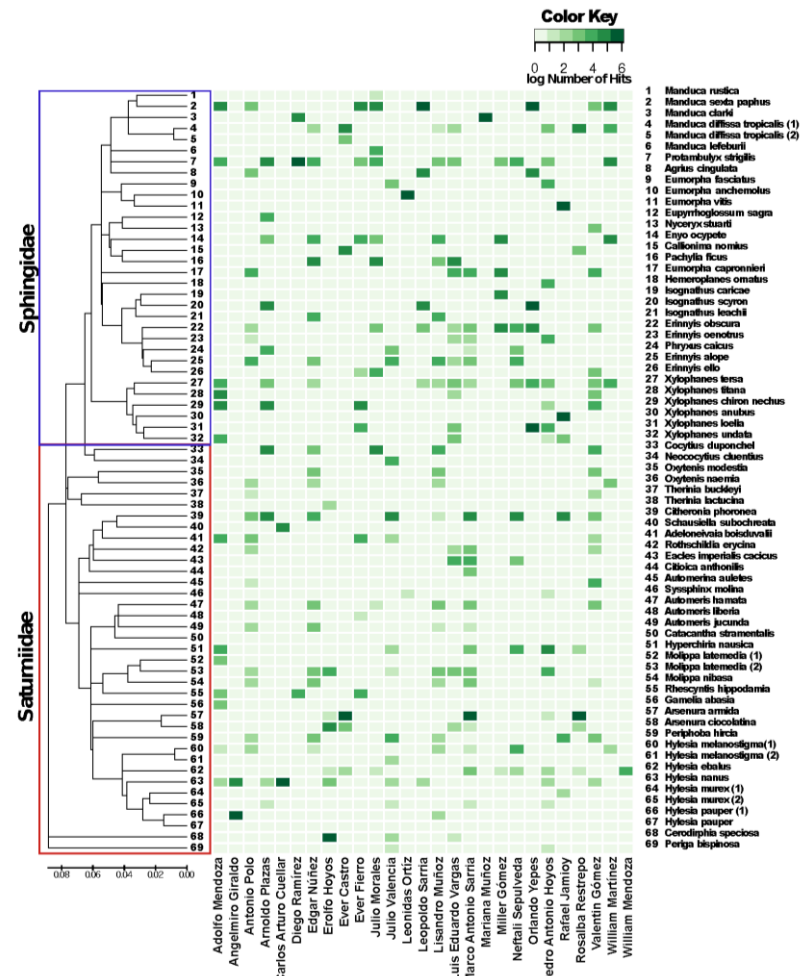
- 1767 spécimens de papillons collectés dans 54 sites
- Metabarcoding a révélé 137 espèces vs. 149 morpho-espèces



BRAZIL



COLOMBIA

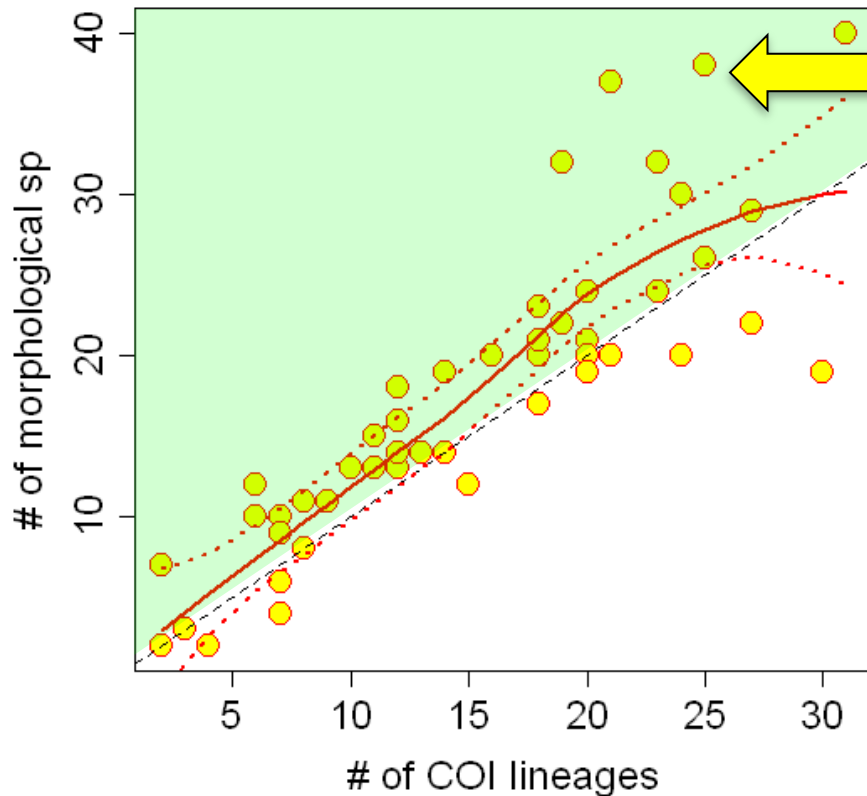


DNA Metabarcoding : validations, exemples



Morphospecies (149) vs. metabarcoding(137)

Both families

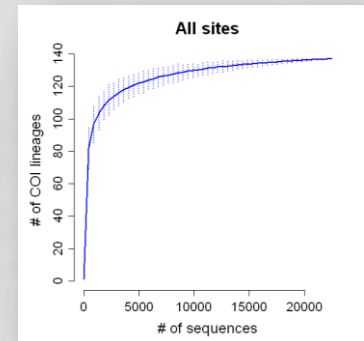


Morpho-espèces >

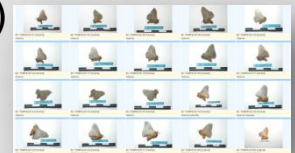
- Espèces non détectées



Syssphinx molina



- inflation erronée du nombre des morphospecies (ex. *Hylesia*)

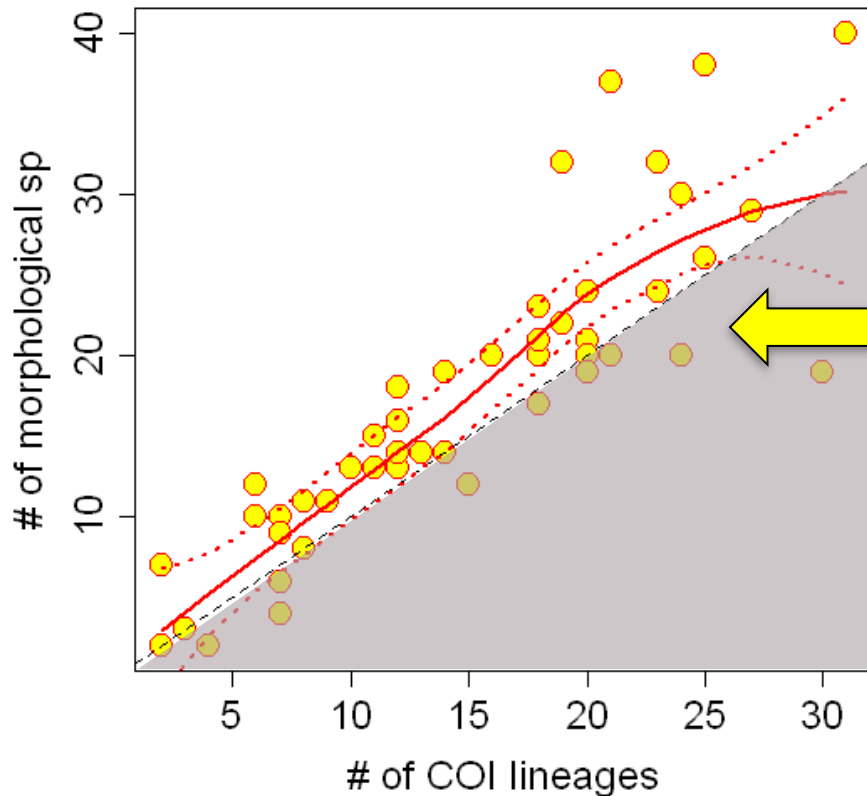


DNA Metabarcoding : validations, exemples



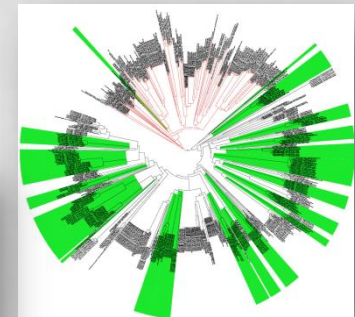
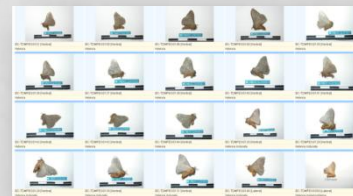
Morphospecies (149) vs. metabarcoding(137)

Both families



Morpho-espèces <

- morpho-espèces manquantes
- diversité cryptique
- Contaminations
- Erreurs de séquençage



PASSIFOR : progrès, perspectives

Construction de la librairie de référence :

- **855** spécimens échantillonnés représentant **579** espèces, dans **47** familles
 - Sources: ONF Quillan (692), IRSTEA Nogent (68), Julien Delnatte (84), Benoît Dodelin (11)
 - Photos et données compilées dans BOLD (www.boldsystems.org - projet PSFOR, accès sur login)



- **Après traitement** (extraction ADN, PCR, séquençage) obtention de **531** DNA barcodes (62.1%) représentant **370 espèces** dans 36 familles distinctes.

Pas de relation évidente entre succès du séquençage et âge, taxon, méthode de collecte – encourageant pour l'utilisation des collections de référence existantes.



PASSIFOR : la librairie de référence

BOLDSYSTEMS

Databases | Taxonomy | Identification | Workbench | Resources

Project Console - Forest Biodiversity - European saproxylic beetles PASSIFOR [PSFOR]

Project Search: Code Tag Title | Records: Search

PROJECT DATA VIEWS

[View All Records](#)

[User Console](#)

PROJECT OPTIONS

[List All Projects](#)
[Modify Project Properties](#)
[Register Primers](#)
[View All Primers](#)

PUBLICATION

[Submit to GenBank](#)
[Bibliography Submission](#)
[Project Summary - Specimens, Localities, and GenBank](#)

UPLOADS

[Specimen Data](#)
[Specimen Images](#)
[Sequences](#)
[Trace Files](#)

DOWNLOADS

[Sequences](#)
[Data Spreadsheets](#)
[Specimen Labels](#)
[Trace Files](#)

SEQUENCE ANALYSIS

[Taxon ID Tree](#)
[Distance Summary](#)
[Sequence Composition](#)
[Barcode Gap Analysis](#)
[Alignment Browser](#)
[Accumulation Curve](#)
[BIN Discordance Report](#)

	Specimens (% complete)	Species (% complete)
COI-5P	531 / 855 (62.1%)	370 / 579 (63.9%)

Project Details

Title: Forest Biodiversity - European saproxylic beetles PASSIFOR
Code: PSFOR
Description: Reference library for European (mostly French) saproxylic beetles

BOLDSYSTEMS

Specimen - Forest Biodiversity - European saproxylic beetles PASSIFOR [PSFOR] [Print](#)


[Edit Specimen](#)

IDENTIFIERS	
Sample ID:	BC-PASSIFOR0006
Process ID:	PSFOR006-13
Institution Storage:	IRSTEA, Nogent sur Vernisson
Field ID:	BC-PASSIFOR0006
Museum ID:	
Collection Code:	

TAXONOMY	
Identification:	Ruptela maculata
Rank:	Species
Identifier:	Christophe Bouget
Identification Method:	
Identifier Institution:	
Identifier Email:	Christophe.bouget@irstea.fr
Taxonomy Note:	
Rank:	Current Record (BC-PASSIFOR0006)
Phylum:	Arthropoda
Class:	Insecta
Order:	Coleoptera
Family:	Cerambycidae
Subfamily:	
Genus:	Ruptela
Species:	Ruptela maculata

SPECIMEN DETAILS	
Voucher Status:	
Tissue Descriptor:	
Sex:	
Reproduction:	Sexual
Life Stage:	Adult
Extra Info:	
Note:	Specimen en FTOH 96%_ossage_qlvcol

PHOTOGRAPHS



License: Copyright (2013)
License Holder: Rodolphe Rougerie, INRA Orleans, URZF

[Add Tags & Comments](#) Comments: 0 Associated Tags: No Tags

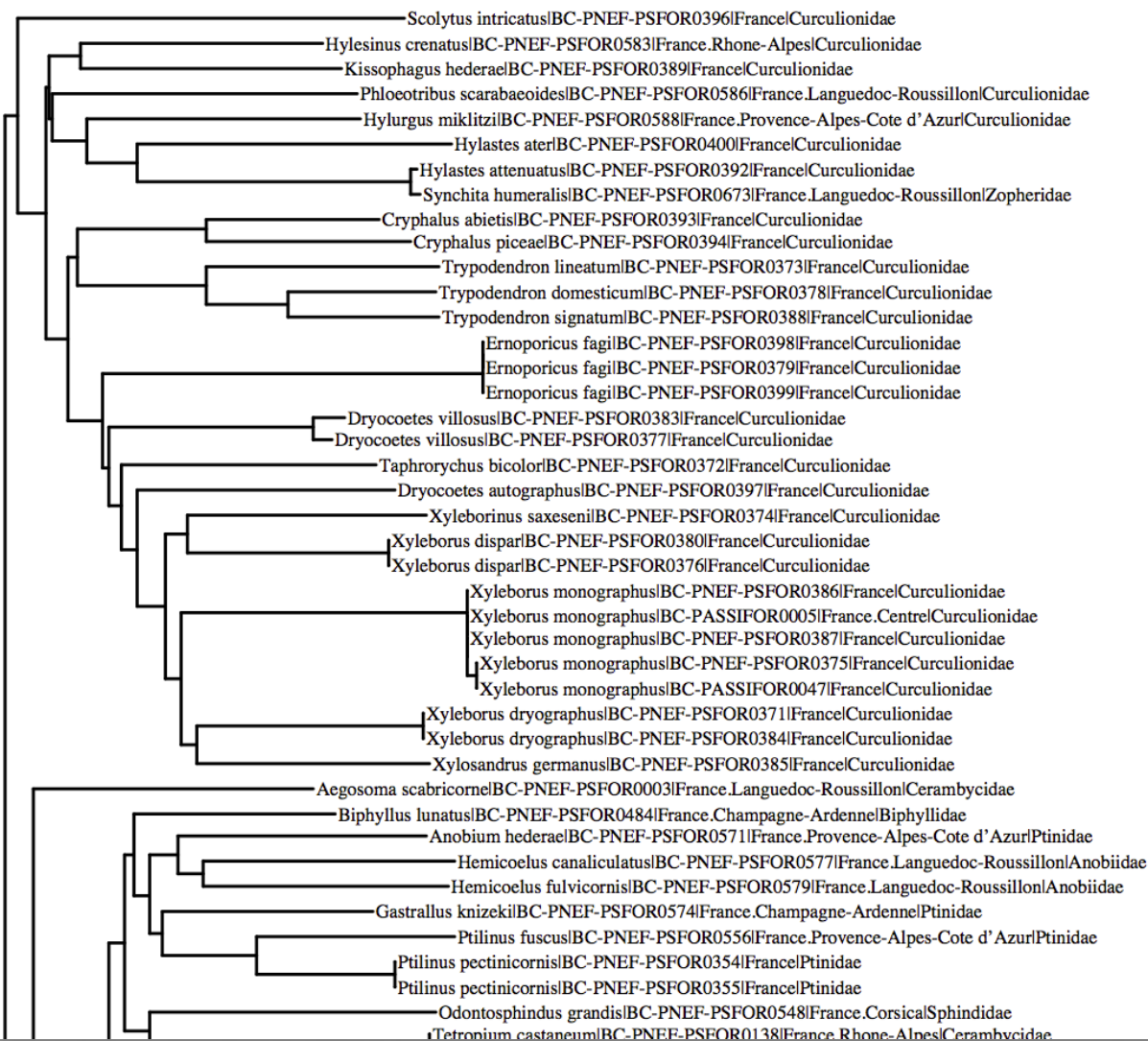
Dorsal

Upper Left: N/A
Lower Right: N/A

- Search:
- Action**
- [Delete-Sequences \(1\)](#)
 - [Delete-Sequences \(1\)](#)
 - [New-Traces \(19\)](#)
 - [New-Traces \(21\)](#)
 - [New-Traces \(19\)](#)
 - [New-Traces \(11\)](#)
 - [New-Traces \(4\)](#)
 - [New-Traces \(2\)](#)
 - [New-Traces \(20\)](#)
 - [New-Traces \(2\)](#)
 - [New-Traces \(15\)](#)
 - [New-Traces \(21\)](#)
 - [New-Traces \(18\)](#)
 - [New-Traces \(10\)](#)

PASSIFOR : la librairie de référence

5%



BOLD

Project

Project S

PROJECT DA

View All Re

User Cons

PROJECT OF

List All Project

Modify Project

Register Prim

View All Prime

PUBLICATION

Submit to Gen

Bibliography S

Project Summ

Localities, and

UPLOADS

Specimen Dat

Specimen ima

Sequences

Trace Files

DOWNLOAD:

Sequences

Data Spread

Specimen Lab

Trace Files

SEQUENCE /

Taxon ID Tree

Distance Sum

Sequence Cor

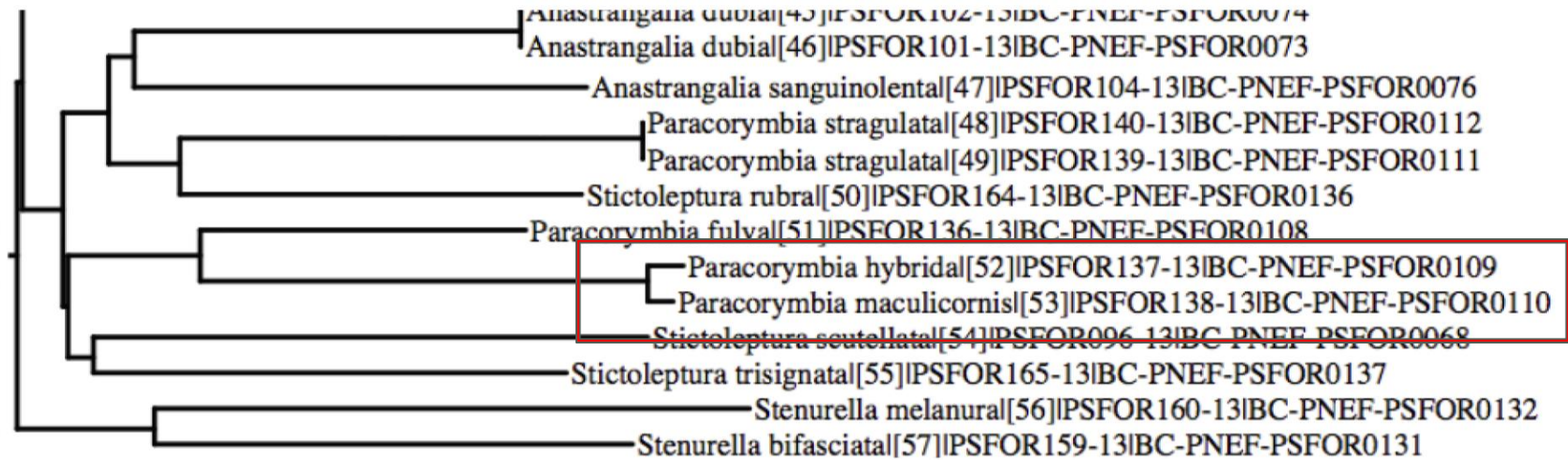
Barcode Gap

Alignment Bro

Accumulation

BIN Discordan

PASSIFOR : la librairie de référence



(52) *Paracorymbia hybrida*



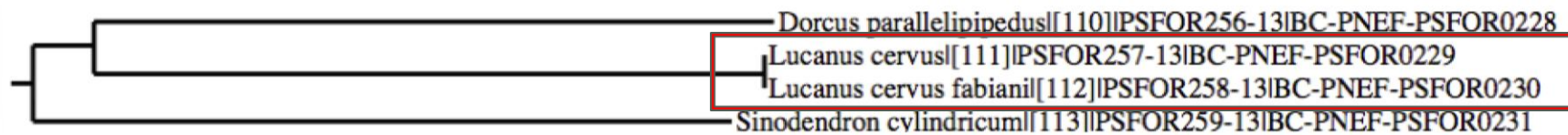
(53) *Paracorymbia maculicornis*



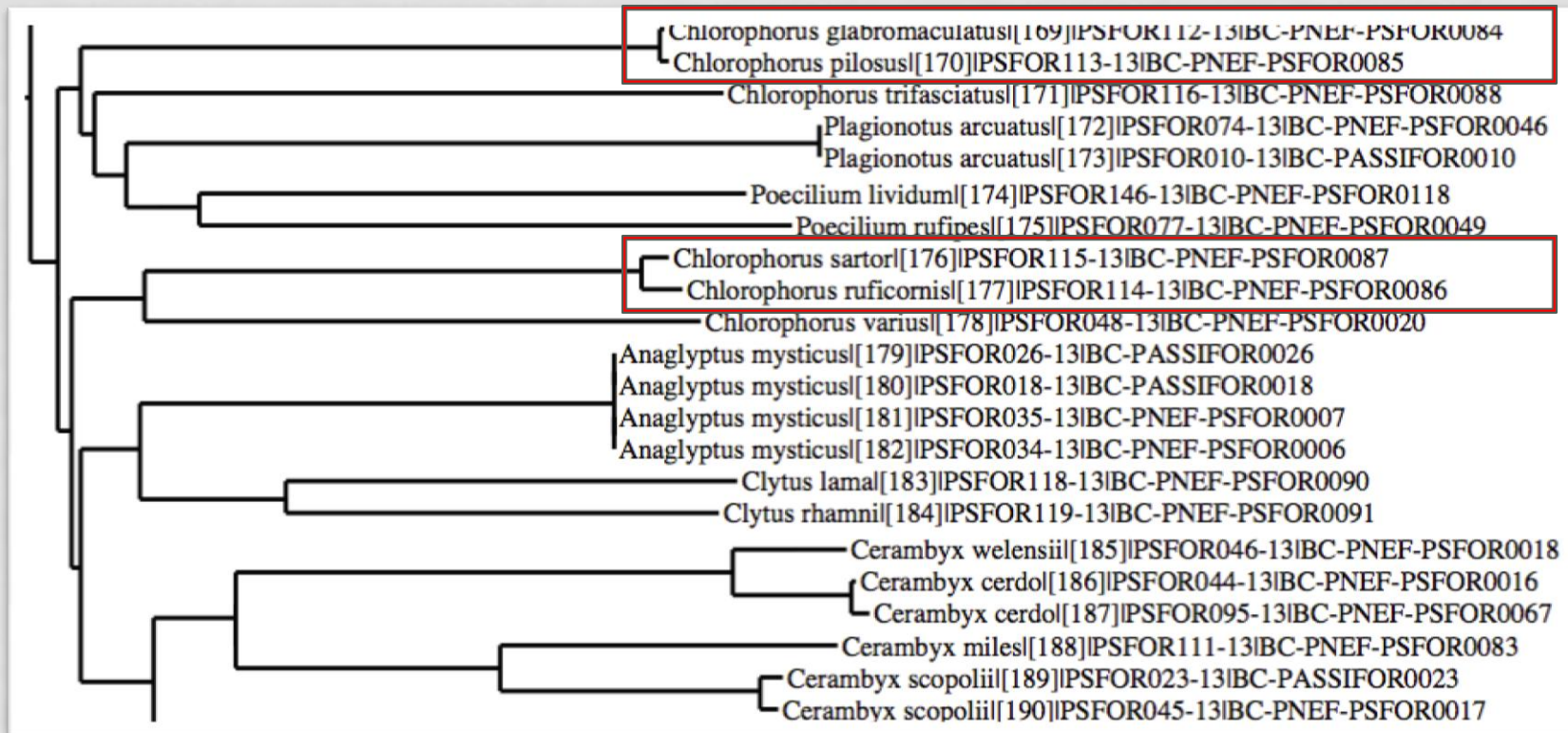
??
Erreur
d'identification?



PASSIFOR : la librairie de référence



Manque de résolution du marqueur pour ces sous-espèces ? Synonymies ? Introgression ?

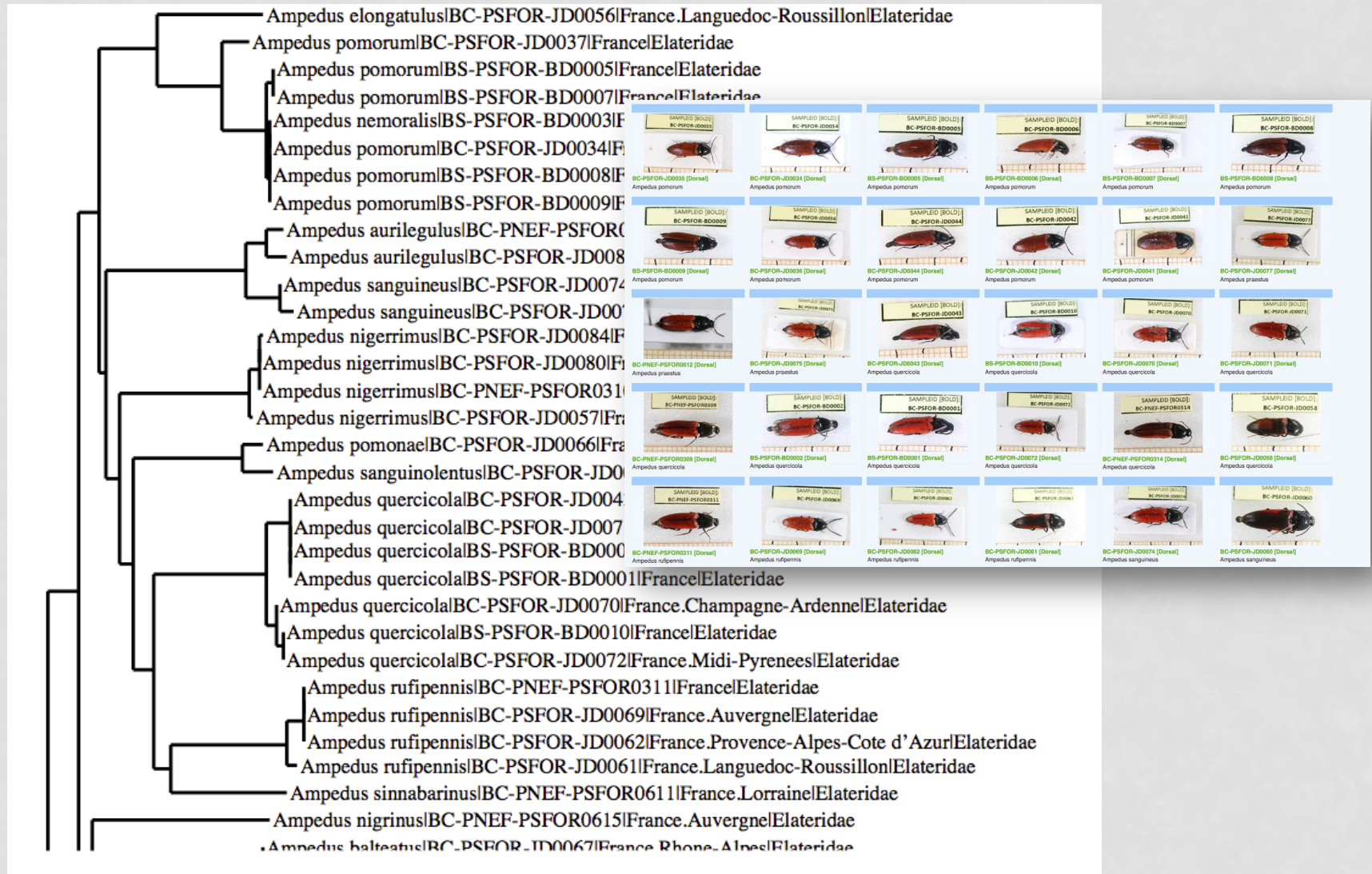


Contaminations d'échantillons voisins sur la plaque ?

Contrôle nécessaire au niveau des spécimens (identification) et séquençage d'autres individus



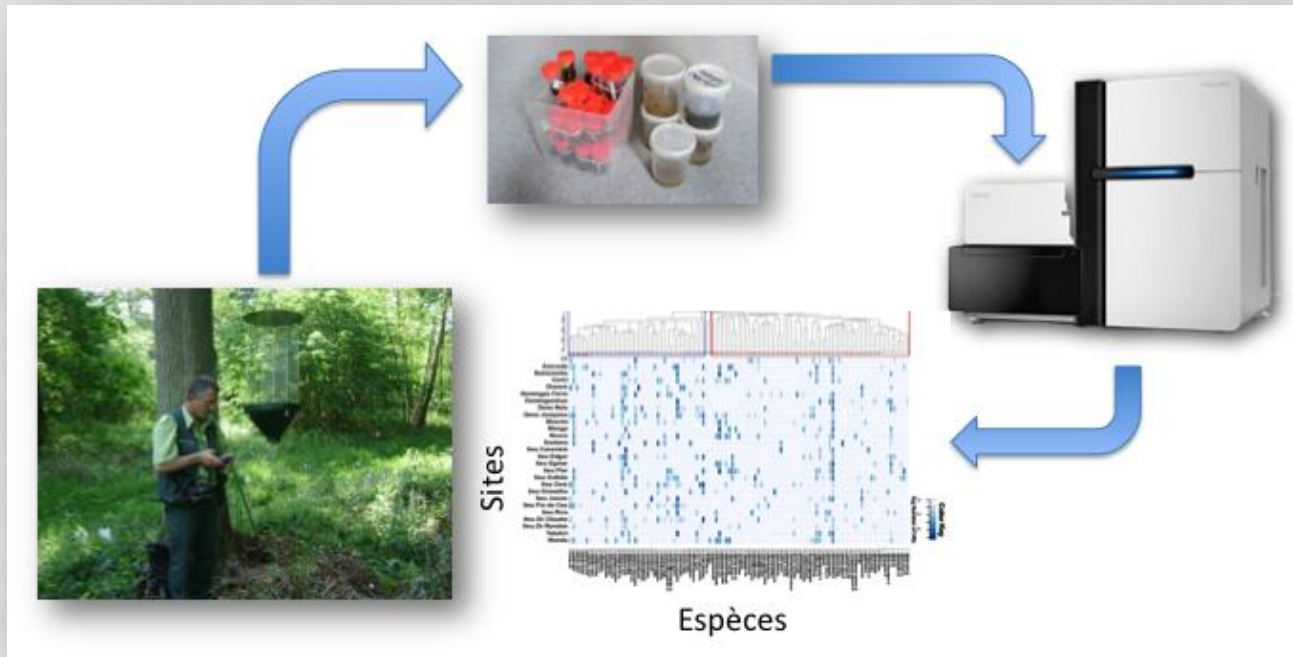
PASSIFOR : la librairie de référence





NJ tree for 442 DNA barcodes of European saproxylic beetles, representing 334 species in 32 families.

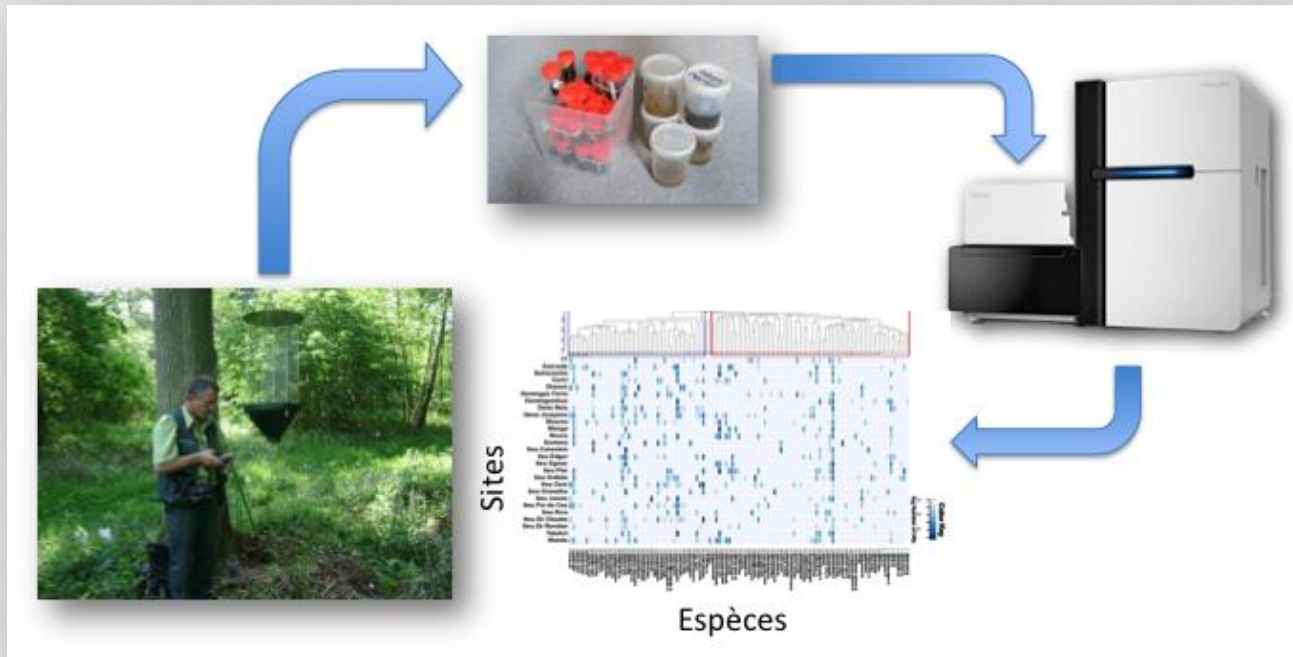
PASSIFOR : phase 2 - metabarcoding



- 2 runs exploratoires prévus pour fin 2013 sur Illumina MiSeq au Biodiversity Institute of Ontario (Hajibabaei lab), Canada.
 - Run 1 : 25+ prélèvements effectués en mai 2013 (IRSTEA Nogent, ONF Quillan)
 - Run 2 : 25+ prélèvements effectués pendant l'été 2013 ;



PASSIFOR : phase 2 - metabarcoding



- Paramètres testés sur ces 2x 25 échantillons :

- âge des échantillons (2013 / 2012 / 2009 à 2006)
- Type de piège : MPG50% vs. Piège sec à Forester
- Type de conservation (congélateur, réfrigérateur, alcool 70%)
- Type de tissus (insectes entiers vs. pattes)
- Avec/sans insectes non cibles ou débris végétaux



Conclusions, perspectives

- Avancement prometteur de la librairie de référence de codes-barres ADN pour les coléoptères saproxyliques français
- Résolution spécifique du code-barres ADN standard (COI) au rendez-vous
- Intéressantes perspectives d'intégration des codes-barres ADN dans la pratique taxonomique (taxonomie intégrative). Ex. *Ampedus* spp.
- Matériel et protocole sont en place pour les premières expérimentation de métabarcoding (novembre 2013) et le test des paramètres « de terrain »
- Ces tests permettront d'optimiser les protocoles qualitatifs et d'évaluer les potentiels quantitatifs de l'approche, en explorant éventuellement les nouvelles approches sans PCR en cours de développement.



Remerciements

F. Nusillard (IRSTEA, Nogent-Sur-Vernisson, France)

T. Noblecourt, T. Barnouin, G. Parmain & F. Soldati (ONF, Pôle National d'Entomologie Forestière, Quillan, France)

T. Decaëns (Université de Rouen, France), Julien Delnatte, Benoît Dodelin, Nicolas Moulin

S. Shokrala, M. Hajibabaei (University of Guelph, Ontario, Canada)



Merci de
votre attention !



Approches métagénomiques de la diversité des coléoptères saproxyliques
R. Rougerie, C. Bouget & C. Lopez-Vaamonde



Intégration des approches métagénomiques dans l'étude de la diversité des coléoptères saproxyliques : progrès et perspectives



Rodolphe Rougerie (1), Christophe Bouget (2) & Carlos Lopez-Vaamonde (1)

(1) INRA, URZF, Orléans

(2) IRSTEA, Nogent-sur-Vernisson



DNA Metabarcoding : limites

- Erreurs inhérentes aux technologies (chimères, erreurs de lecture, etc.) et à la nature des échantillons
- Capacité de détection, sensibilité très forte – surtout si séquences visées très courtes (ADN dégradé)
 - Risques de contamination (environnementale, laboratoire)
 - Problème de la persistance temporelle de l'ADN
- Capacité d'identification du marqueur
 - Dépendance de la longueur du fragment
 - Librairies de référence
- Aspect quantitatif
 - Fiabilité limitée : biais PCR, nombre de copies du gène cible, stabilité des parois cellulaires)
 - Abondances relatives ?
 - Approches sans PCR ?
- Besoins en ressources bio-informatiques pour l'analyse et le stockage des données
- Répétabilité des analyses ? Ex. Pompanon et al. : analyse du régime alimentaire de vaches – 5 vaches (régimes différents), 3 extraits par animal (pas de différence significative), 3 PCR par extraits (pas de différence significative, mais des variations nettes et inattendues – stochasticité PCR sur 10% des échantillons)

