

Reporte Final:

Biodiversidad marina en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte mediante metabarcoding de ADN ambiental marino en las expediciones organizadas por OCEANA México

Con el objetivo de estudiar la biodiversidad marina presente en el Arrecife Alacranes y Bajos del Norte, OCEANA en México organizó una expedición científica abordo de la embarcación "Caribbean Kraken", partiendo del puerto de Progreso (Yucatán) el 9 de agosto del 2021. La expedición se dirigió primero a los Bajos del Norte, donde realizamos muestreos de agua para aislar ADN ambiental mediante buceo SCUBA en sitios someros (<30 m) y muestreo de agua en sitios profundos (entre 70-100 m) con ayuda de una botella oceanográfica tipo Niskin. Los muestreos se realizaron los días 10-12 de agosto. Una segunda expedición científica abordo de la misma embarcación partió del puerto de Progreso el 19 de mayo del 2022. La expedición se enfocó en el Parque Nacional Arrecife Alacranes, donde realizamos muestreos de agua para aislar ADN ambiental mediante buceo SCUBA en sitios someros (<30 m) y muestreo de agua en sitios profundos (entre 45-60 m) con ayuda de una botella oceanográfica tipo Niskin. Los muestreos se realizaron los días 20-24 de mayo.

METODOLOGIA

Muestreo de ADN ambiental

Durante los 3 días de muestreo en Bajos del Norte, se tomaron un total de 27 muestras de ADN ambiental de 2 litros cada una que fueron filtradas con un filtro de 0.4 μm (Tabla 1), de las cuales 15 provienen de cinco sitios someros donde se realizó buceo SCUBA en Bajos del Norte (Bajos Norte 1 y 2, Paso del Zorro, Estadio, La Loma), 6 muestras provienen de sitios profundos muestreados mediante la botella Niskin en tránsito entre los sitios (70m y 91m), y 6 muestras corresponden a controles negativos (agua corriente del barco), que sirve para detectar cualquier contaminación cruzada durante la etapa del muestreo en campo. Las muestras de ADN ambiental se tomaron en un transecto de aproximadamente 50 km de longitud (Fig. 1). Las muestras de arrecifes coralinos someros se tomaron a profundidades entre 15 y 28 m y una temperatura promedio de 30 ° C mientras que las muestras de arrecifes mesofóticos de profundidad se tomaron a 70 y 91 m, a temperaturas comparativamente menores entre 24 y 19 ° C, respectivamente (Tabla 1).

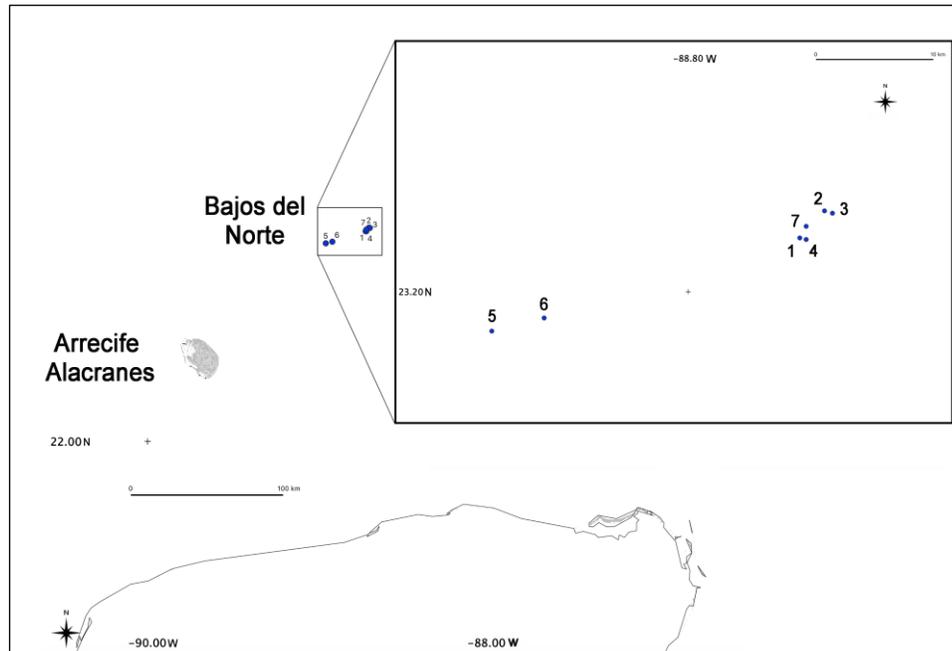


Figura 1. Mapa que muestra el norte de la Península de Yucatán, México, y la ubicación del Parque Nacional Arrecife Alacranes y los sitios de muestreo en Bajos del Norte (indicado por círculos azules). Los números asociados a cada sitio de muestreo corresponden con el # Sitio en la Tabla 1.

Durante los 5 días de muestreo en el Parque Nacional Arrecife Alacranes, se tomaron un total de 36 muestras de ADN ambiental, cada una resultado de la filtración a bordo de 2 L de agua de mar que fue regresada al sitio inmediatamente después de la filtración (Tabla 2), de las cuales 24 provienen de ocho sitios someros donde se realizó buceo SCUBA en Arrecife Alacranes (Hongos y Casi Hongos, Pendiente Norte, Interior Nuevo, Gorgonia Delfin, Marisol, Los Arcos y El Tweed), 8 muestras provienen de sitios profundos muestreados mediante la botella Niskin en tránsito entre los sitios (Niskin 1-4), y 4 muestras que corresponden a controles negativos (agua corriente del barco), que servirá para detectar cualquier contaminación cruzada durante la etapa del muestreo en campo.

Las muestras de ADN ambiental se tomaron al Oeste, Norte y Este de Arrecife Alacranes (Fig. 2). Las muestras de arrecifes coralinos someros se tomaron a profundidades entre 2.5 y 30 m y temperaturas entre 25 y 28 °C (Tabla 2) mientras que las muestras de profundidad con botella Niskin se tomaron entre 48 y 59 m, a temperaturas comparativamente menores entre 22 y 25 °C, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 1. Detalles de cada una de las 27 muestras de ADN ambiental colectadas en Bajos del Norte. El # Sitio corresponde a los números que se muestran en el mapa de la Figura 1. Se muestra el nombre de cada sitio, la profundidad a la que fue colectada el agua, el número de replica correspondiente a cada muestra, la temperatura del agua registrada a la profundidad del muestreo (en grados centígrados), y la latitud (Norte) y longitud (Oeste) del sitio de muestreo.

# Muestra	# Sitio	Fecha	Nombre Sitio	Acrónimo	Profundidad	# Replica	Temperatura (C)	Latitud	Longitud
1	1	10 Agosto	Bajos Norte 1	BN1	20 m	1	30	23.24122	-88.71497
2	1	10 Agosto	Bajos Norte 1	BN1	20 m	2	30	23.24122	-88.71497
3	1	10 Agosto	Bajos Norte 1	BN1	20 m	3	30	23.24122	-88.71497
4	2	10 Agosto	Bajos Norte 2	BN2	15 m	1	30	23.26183	-88.69596
5	2	10 Agosto	Bajos Norte 2	BN2	15 m	2	30	23.26183	-88.69596
6	2	10 Agosto	Bajos Norte 2	BN2	15 m	3	30	23.26183	-88.69596
7	3	11 Agosto	Paso del Zorro	PZ	22 m	1	30	23.26000	-88.69000
8	3	11 Agosto	Paso del Zorro	PZ	22 m	2	30	23.26000	-88.69000
9	3	11 Agosto	Paso del Zorro	PZ	22 m	3	30	23.26000	-88.69000
10	4	11 Agosto	En tránsito 1	70m	70 m	1	24	23.24000	-88.71000
11	4	11 Agosto	En tránsito 1	70m	70 m	2	24	23.24000	-88.71000
12	4	11 Agosto	En tránsito 1	70m	70 m	3	24	23.24000	-88.71000
13	5	12 Agosto	Estadio	ES	28 m	1	30	23.17000	-88.95000
14	5	12 Agosto	Estadio	ES	28 m	2	30	23.17000	-88.95000
15	5	12 Agosto	Estadio	ES	28 m	3	30	23.17000	-88.95000
16	6	12 Agosto	En tránsito 2	91m	91 m	1	19	23.18000	-88.91000
17	6	12 Agosto	En tránsito 2	91m	91 m	2	19	23.18000	-88.91000
18	6	12 Agosto	En tránsito 2	91m	91 m	3	19	23.18000	-88.91000
19	7	12 Agosto	La Loma	LO	15 m	1	30	23.25000	-88.71000
20	7	12 Agosto	La Loma	LO	15 m	2	30	23.25000	-88.71000
21	7	12 Agosto	La Loma	LO	15 m	3	30	23.25000	-88.71000
22		10 Agosto	Control Negativo		Agua del barco	1			
23		11 Agosto	Control Negativo		Agua del barco	1			
24		11 Agosto	Control Negativo		Agua del barco	1			
25		12 Agosto	Control Negativo		Agua del barco	1			
26		12 Agosto	Control Negativo		Agua del barco	1			
27		12 Agosto	Control Negativo		Agua del barco	1			

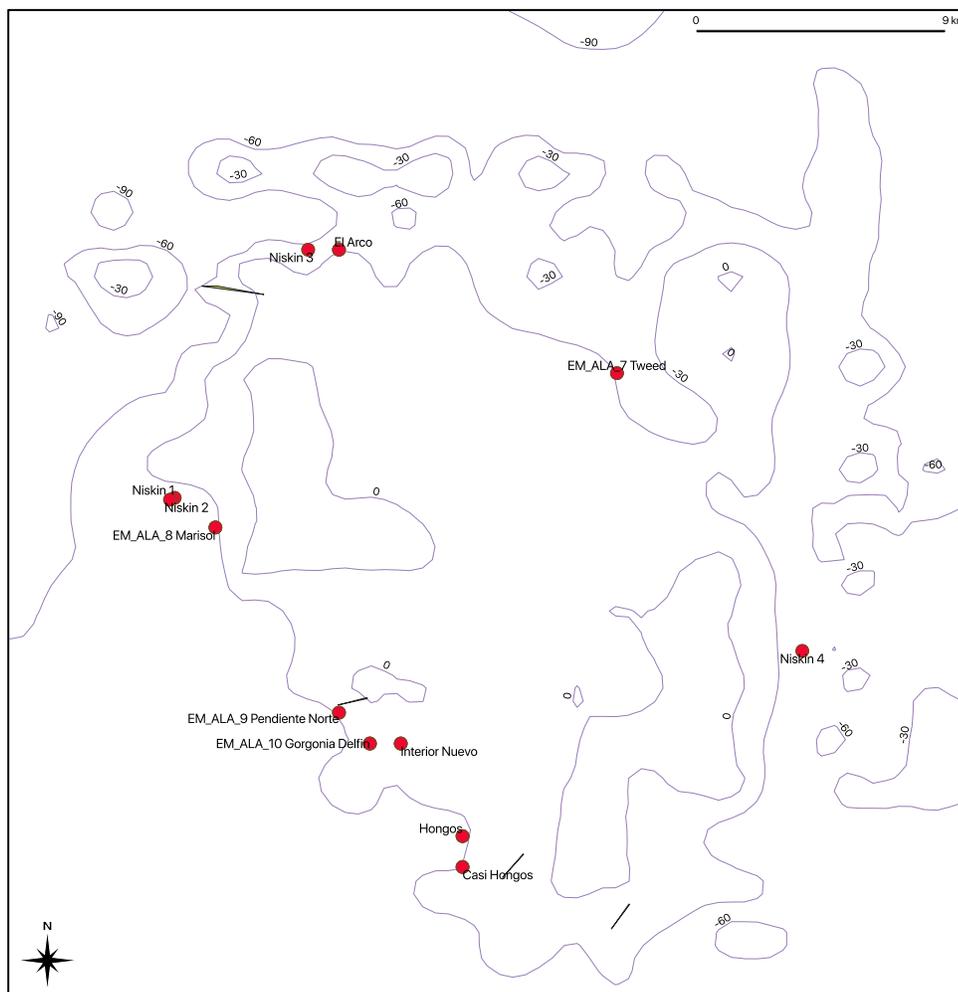


Figura 2. Mapa que muestra la ubicación del Parque Nacional Arrecife Alacranes y los sitios de muestreo (indicado por círculos rojos). Los nombres asociados a cada sitio de muestreo corresponden con la Tabla 2. Se muestra las isobatas cada 30 m.

Análisis de Laboratorio

El ADN ambiental (eDNA) fue extraído de las muestras con el kit DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN), y la concentración de eDNA fue cuantificada con un ensayo de fluorescencia (QUBIT INVITROGEN). Se construyeron dos librerías genómicas: 1) la primera enfocada en amplificar mediante PCR ~70 nucleótidos del gen 12S del ADN mitocondrial de peces óseos y elasmobranquios, empleando primers y protocolos descritos previamente por mi laboratorio (Valdivia-Carrillo et al., 2021); 2) la segunda librería amplificó mediante PCR ~310 nucleótidos del gen de la citocromo oxidasa subunidad 1 (COI) de organismos eucariotas empleando primers descritos previamente (Bakker et al., 2019). Las librerías resultantes fueron secuenciadas en la plataforma Illumina en dos corridas de secuenciación masiva (Mi Seq 150x2 V2, MiSeq 250x2 V2) para las muestras de Bajos del Norte, y otras dos corridas idénticas independientes para las muestras de Arrecife Alacranes (i.e., total 4 corridas Mi Seq). Los ensayos de secuenciación incluyeron 6 negativos de campo, y adicionalmente también 6 negativos durante el proceso de extracción y 6 negativos durante el proceso de PCR que fueron secuenciados para monitorear posible contaminación. Adicionalmente, se incluyó como control positivo una comunidad artificial (mock) conformada por 29 especies de peces y elasmobranquios y 25 especies de invertebrados de 8 phyla distintos, respectivamente.

Tabla 2. Detalles de cada una de las 36 muestras de ADN ambiental colectadas en el Parque Nacional Arrecife Alacranes. El nombre de cada sitio corresponde al mapa de la Figura 2. Se muestra el número de muestra, número de sitio, la fecha en la que se realizó el muestreo, el nombre del sitio, la profundidad a la que fue

colectada el agua, el número de replica correspondiente a cada muestra, la temperatura del agua registrada a la profundidad del muestreo (en grados centígrados), y la latitud (Norte) y longitud (Oeste).

# Muestra	# Sitio	Fecha	Nombre Sitio	Acrónimo	Profundidad	# Replica	Temperatura (C)	Latitud	Longitud
1	1	20 Mayo 2022	Casi Hongos	A1	20 m	1	27	22.3900	-89.7100
2		20 Mayo 2022	Casi Hongos	A1	20 m	2	27	22.3900	-89.7100
3		20 Mayo 2022	Casi Hongos	A1	20 m	3	27	22.3900	-89.7100
4	2	20 Mayo 2022	Hongos	A1	30 m	1	27	22.4000	-89.7100
5		20 Mayo 2022	Hongos	A1	30 m	2	27	22.4000	-89.7100
6		20 Mayo 2022	Hongos	A1	30 m	3	27	22.4000	-89.7100
7	3	21 Mayo 2022	EM_ALA_9 Pendiente Norte	A2	30 m	1	27	22.4400	-89.7500
8		21 Mayo 2022	EM_ALA_9 Pendiente Norte	A2	30 m	2	27	22.4400	-89.7500
9		21 Mayo 2022	EM_ALA_9 Pendiente Norte	A2	20 m	3	27	22.4400	-89.7500
10	4	21 Mayo 2022	Interior Nuevo	A3	2.5 m	1	28	22.4300	-89.7300
11		21 Mayo 2022	Interior Nuevo	A3	7 m	2	28	22.4300	-89.7300
12		21 Mayo 2022	Interior Nuevo	A3	2.5 m	3	28	22.4300	-89.7300
13	5	22 Mayo 2022	EM_ALA_10 Gorgonia Delfin	A4	25 m	1	27	22.4300	-89.7400
14		22 Mayo 2022	EM_ALA_10 Gorgonia Delfin	A4	25 m	2	27	22.4300	-89.7400
15		22 Mayo 2022	EM_ALA_10 Gorgonia Delfin	A4	20 m	3	27	22.4300	-89.7400
16	6	23 Mayo 2022	EM_ALA_8 Marisol	A5	6 m	1	27	22.5000	-89.7900
17		23 Mayo 2022	EM_ALA_8 Marisol	A5	6 m	2	27	22.5000	-89.7900
18		23 Mayo 2022	EM_ALA_8 Marisol	A5	6 m	3	27	22.5000	-89.7900
19	7	23 Mayo 2022	Niskin 1	53 m	53 m	1	22	22.5096	-89.8032
20		23 Mayo 2022	Niskin 1	53 m	53 m	2	22	22.5096	-89.8032
21	8	23 Mayo 2022	Niskin 2	53 m	57 m	1	22	22.5090	-89.8047
22		23 Mayo 2022	Niskin 2	53 m	57 m	2	22	22.5090	-89.8047
23	9	23 Mayo 2022	El Arco	A6	30 m	1	26	22.5900	-89.7500
24		23 Mayo 2022	El Arco	A6	30 m	2	26	22.5900	-89.7500
25		23 Mayo 2022	El Arco	A6	30 m	3	26	22.5900	-89.7500
26	10	24 Mayo 2022	Niskin 3	59 m	59 m	1	22	22.5900	-89.7600
27		24 Mayo 2022	Niskin 3	59 m	59 m	2	22	22.5900	-89.7600
28	11	24 Mayo 2022	EM_ALA_7 Tweed	A7	28	1	25	22.5500	-89.6600
29		24 Mayo 2022	EM_ALA_7 Tweed	A7	28	2	25	22.5500	-89.6600
30		24 Mayo 2022	EM_ALA_7 Tweed	A7	28	3	25	22.5500	-89.6600
31	12	24 Mayo 2022	Niskin 4	48 m	48 m	1	25	22.4600	-89.6000
32		24 Mayo 2022	Niskin 4	48 m	48 m	2	25	22.4600	-89.6000
33	Negativo	20 Mayo 2022	Negativo		Agua barco	1			
34	Negativo	21 Mayo 2022	Negativo		Agua barco	1			
35	Negativo	23 Mayo 2022	Negativo		Agua barco	1			
36	Negativo	24 Mayo 2022	Negativo		Agua barco	1			

Análisis bioinformáticos

La secuenciación de las 4 librerías produjo un total de ~80 millones de secuencias de ADN, las cuales fueron analizadas bajo estrictos filtros de calidad. Brevemente, las secuencias fueron demultiplexadas manteniendo sólo aquellas secuencias que mostraban una identidad del 100% con los barcodes o índices empleados para identificar cada muestra. Las secuencias fueron empalmadas, los primers removidos, se aplicaron filtros para eliminar secuencias que no tuvieran una calidad óptima, eliminar secuencias demasiado cortas o largas, se eliminaron secuencias quiméricas y secuencias únicas observadas una sola vez (singletons) que tienen una alta probabilidad de introducir errores. El análisis de las librerías se realizó con el software ObiTools V1 como se describe en (Valdivia-Carrillo et al., 2021), herramientas del software Usearch V11 (Edgar, 2010), y del paquete seqkit (Shen et al., 2016) y scripts de linux. Las secuencias resultantes fueron agrupadas en OTUs (Operational Taxonomic Units o Unidades Taxonómicas Operativas, que pudieran representar especies) con un criterio del 97% de similitud y posteriormente se realizó la asignación taxonómica de las secuencias empleando la base de datos de referencia de secuencias de ADN del NCBI-GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), la herramienta BLAST

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y el software MEGAN V6.24.1 (Huson et al., 2016). En los Anexos 1 y 2, la taxonomía empleada sigue el estándar del NCBI-GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>). Se realizó un segundo set de filtros de calidad, incluyendo: se eliminaron los OTUs únicos que fueron observados solo una vez en todo el estudio (pues pueden representar contaminación), se eliminaron OTUs que no estuvieron presentes en alguna de las muestras de campo, se restó el número de secuencias que estuvieron presentes en los controles negativos a las muestras de campo, resultando en algunas ocasiones en la eliminación completa de OTUs cuya frecuencia en las muestras de campo era igual o menor a la suma de los controles negativos de la librería correspondiente y que muy probablemente representan contaminación, se eliminaron secuencias de grupos taxonómicos que no son marinos o que podrían representar contaminación incluyendo virus y bacterias, invertebrados terrestres (todos los insectos, y para arácnidos, lombrices, escorpiones se mantuvieron solo aquellas especies marinas registradas en la base de datos WORMS - World Register of Marine Species, <https://www.marinespecies.org>). También se eliminaron plantas terrestres (Streptophyta), anfibios, reptiles terrestres, aves terrestres, tortugas de agua dulce, y secuencias asignadas a *Homo sapiens* y *Canis familiaris* (humano y perro doméstico, respectivamente). Finalmente, se eliminaron todas las secuencias que no tuvieron parecido alguno con ninguna secuencia en la base de datos de referencia (no hits) y que probablemente representan contaminación bacteriana.

RESULTADOS

Diversidad de Eucariotas

Después de realizar todos los filtros de calidad mencionados a las secuencias del gen COI, encontramos 1,983 especies/OTUs (Anexo 1), los cuales podrían representar cada uno especies distintas, aunque dado el uso de un agrupamiento al 97% de similitud es posible que estos números representen una sub-estimación de la diversidad de especies (i.e. 1 OTU puede representar una o más especies, especialmente si son especies recientes y tienen alta similitud en sus secuencias). De igual manera, existe la posibilidad de sobre-estimar la diversidad de especies en algunos grupos en el caso que una especie reconocida esté representada por varios OTUs. Considerando 244 especies de peces y tiburones adicionales detectados con el gen 12S (Anexo 2), el total de especies/OTUs eucariotas en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte es de 2,227.

Las formas de vida en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte pueden agruparse en 5 grandes grupos (Figura 3). El grupo más diverso son los animales multicelulares (metazoarios, 50%), seguido de las algas (verdes, rojas, cafés y microalgas) que representan 27% de toda la diversidad. Los protistas u organismos

unicelulares microscópicos y los hongos representaron un componente pequeño de la comunidad ($\leq 2\%$). Un 21% de toda la diversidad encontrada quedo clasificada simplemente como "otros eucariotas" y representan formas de vida tan diversas y poco conocidas que, con el conocimiento actual mundial, no es posible asignarlas con certeza a grupos taxonómicos inferiores, y al momento sólo sabemos que son especies eucariotas que habitan Arrecife Alacranes y Bajos del Norte.

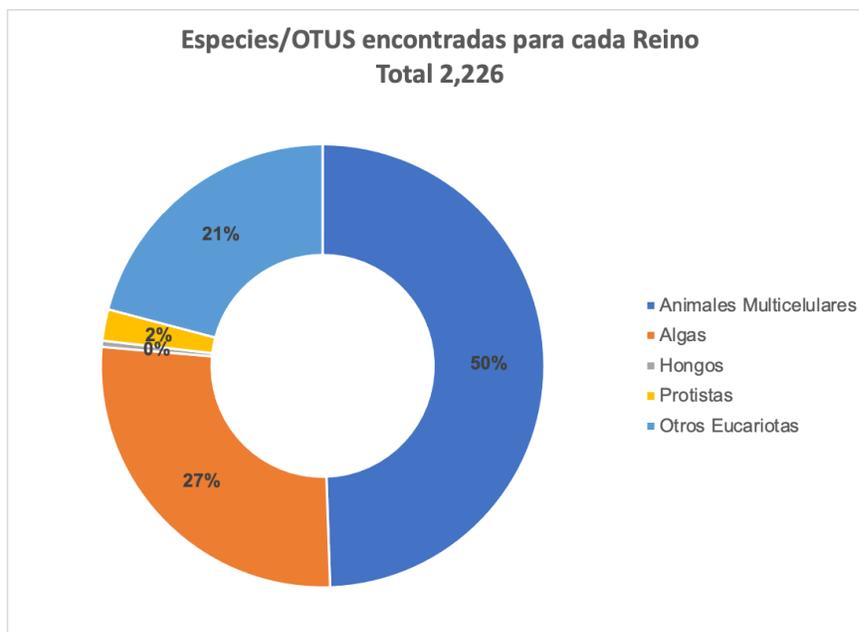


Figura 3. Resultados de la asignación taxonómica de 2,226 especies/OTUs eucariotas detectados mediante eDNA en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte e identificados a nivel de reinos y grandes grupos.

Dentro de las secuencias que si pudieron ser asignadas taxonómicamente a nivel de phylum o inferior (Figura 4), encontramos representados 32 phyla, 71 clases, 194 órdenes, 378 familias, 448 géneros y 451 especies. Otras 1,775 especies/OTUs adicionales fueron asignados a niveles taxonómicos entre genero y reino debido a la baja representación de especies marinas en las bases de ADN de referencia que se traduce en la identificación a nivel de especie de tan solo $\sim 20\%$ de todas las especies/OTUs presentes con el marcador COI.

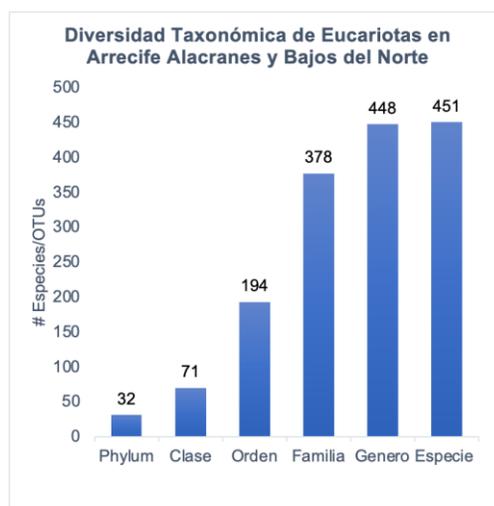


Figura 4. Número de especies/OTUs de eucariotas asignados a distintos niveles taxonómicos detectados mediante eDNA.

Encontramos que 1,281 especies/OTUs pudieron ser asignados a 32 phyla taxonómicos diferentes (Figura 5). Los phyla más diversos corresponden, en orden decreciente de importancia, a los artrópodos (representados por los crustáceos), seguido de moluscos, algas microscópicas diatomeas (Bacillariophyta), algas rojas (Rhodophyta), corales, medusas y anémonas (cnidarios) y gusanos anélidos. El resto de los phyla mostraron una riqueza de especies igual o por debajo de 60 especies/OTUs para el marcador COI.

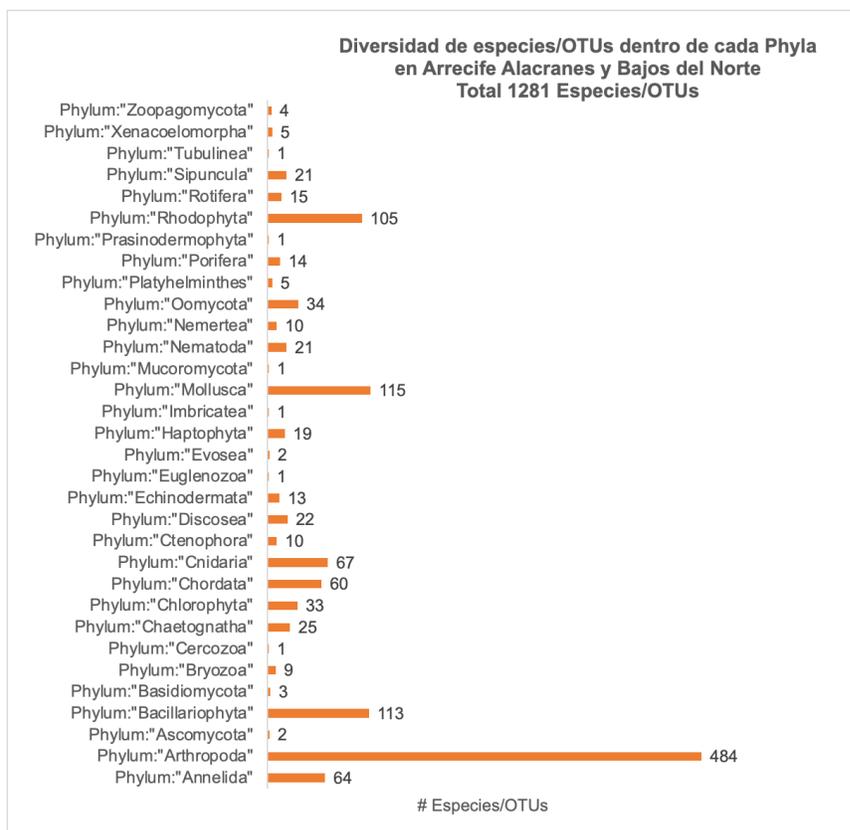


Figura 5. Resultados de la asignación taxonómica de 1,281 especies/OTUs de eucariotas a nivel de Phyla, detectados mediante eDNA.

De un total de 71 clases taxonómicas identificadas como presentes en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte (Figura 6), las que tuvieron una mayor riqueza fueron los crustáceos copépodos (Hexanauplia, 244 especies/OTUs), dinoflagelados (Dinophyceaea, 192 especies/OTUs), algas rojas (Florideophyceae, 92 especies/OTUs), caracoles gasterópodos y nudibranchios (Gastropoda, 74 especies/OTUs), diatomeas (Bacillariophyceae, 66 especies/OTUs), algas café (Phaeophyceae, 63 especies/OTUs), gusanos poliquetos (Polychaeta, 62 especies/OTUs) y crustáceos decápodos (Malacostraca, 57 especies/OTUs).

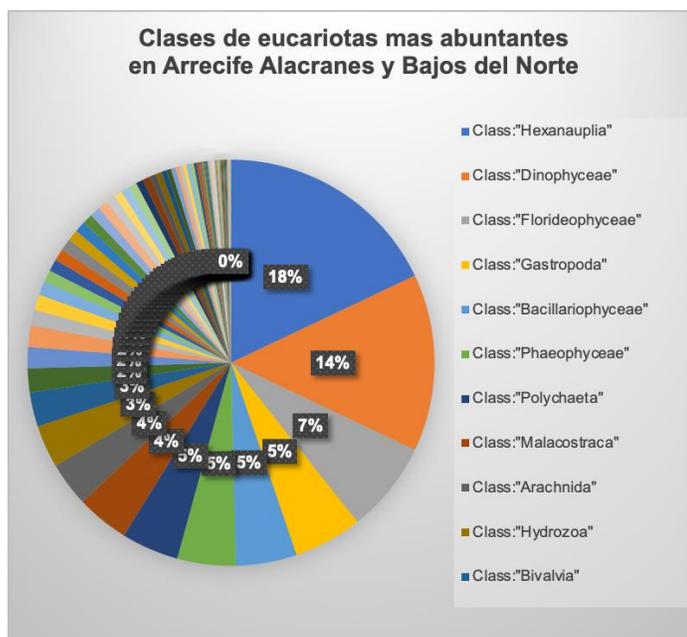


Figura 6. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Clase de especies/OTUs de animales multicelulares detectados mediante eDNA.

Registramos un total de 194 órdenes taxonómicos (Figura 7), siendo los mas diversos los crustáceos copépodos calanoideos (13%), las algas rojas ceramiales (4%), los gusanos poliquetos phyllocidos (4%). El resto de los órdenes presentes mostraron una riqueza menor o igual a 39 especies/OTUs ($\leq 3\%$). La lista completa de Reinos, Phyla, Clases, Ordenes, Familias, Generos y especies/OTUs de organismos Eucariotas encontrados puede consultarse en el Anexo 1- Eucariotas.

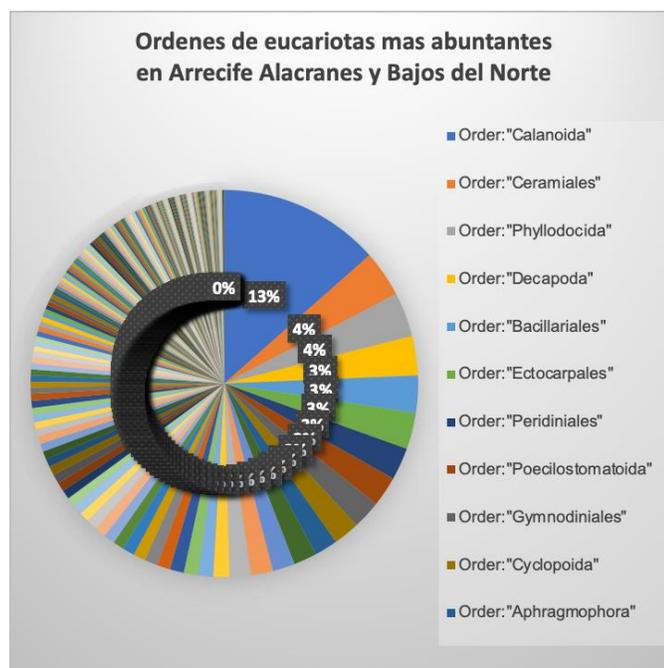


Figura 7. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Ordenes de especies/OTUs de animales multicelulares detectados mediante eDNA.

Diversidad de Peces y Elasmobranquios

El análisis de las secuencias del gen 12S, aunado a los resultados del gen COI donde se identificaron también especies de peces, mostraron la presencia de 281 especies/OTUs de peces óseos y cartilagosos (Anexo 2). Es posible que estos números representen una sub o sobre estimación de la diversidad de especies, dependiendo de la familia taxonómica, como se explicó para el gen COI. Es importante mencionar que aunque detectamos 281 entidades biológicas que podrían representar especies distintas, la resolución en la asignación taxonómica de cada especie varía en función de las secuencias presentes en la base de datos de referencia (GenBank, Anexo 2). Es decir, si una especie ya está presente en GenBank para el gen 12S analizado, entonces la asignación se da a nivel de especie/género/familia. Sin embargo, cuando no hay especies cercanas representadas en GenBank, entonces la asignación taxonómica se realiza solamente a nivel de Orden o Clase. Estas observaciones resaltan la escasa representación de especies de peces/tiburones mexicanos en las bases de datos internacionales de GenBank, y la necesidad de invertir tiempo y recursos en complementar las bases de datos de referencia con secuencias de especies locales a partir de muestras de tejido previamente identificadas.

En total, documentamos la presencia de 2 clases de peces, 22 ordenes y 49 familias. La gran mayoría de las especies/OTUs identificados fueron peces óseos (Actinopteri, 97.6%), y sólo encontramos 7 especies/OTUs de tiburones y rayas (Condriichthyes, 2.4%).

Un total de 217 especies/OTUs fueron asignados a alguno de 22 órdenes distintos (Figura 8), entre los cuales el más diverso fue el Perciformes (66%), seguido de Eupercaria (9%), Tetraodontiformes (6%) y Beloniformes (3%).



Figura 8 Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Ordenes de especies/OTUs de peces y tiburones detectados mediante eDNA.

De 218 especies/OTUs que pudieron ser asignados a alguna de las 49 familias de peces encontradas (Figura 9), las que tuvieron una mayor riqueza de especies/OTUs fueron las damiselas y jaquetas (Pomacentridae, 25 especies/OTUs), doncellas (Labridae, 22 especies/OTUs), cabrillas y meros (Serranidae, 21 especies/OTUs), pargos y huachinangos (Lutjanidae, 20 especies/OTUs), peces loro (Scaridae, 18 especies/OTUs), roncadores (Haemulidae, 15 especies/OTUs) y gobios (Gobiidae, 11 especies/OTUs). El resto de las familias tuvieron una riqueza igual o menor 7 especies/OTUs. La lista completa de Clases, Ordenes, Familias, Generos y especies/OTUs de peces encontrados puede consultarse en el Anexo 2.

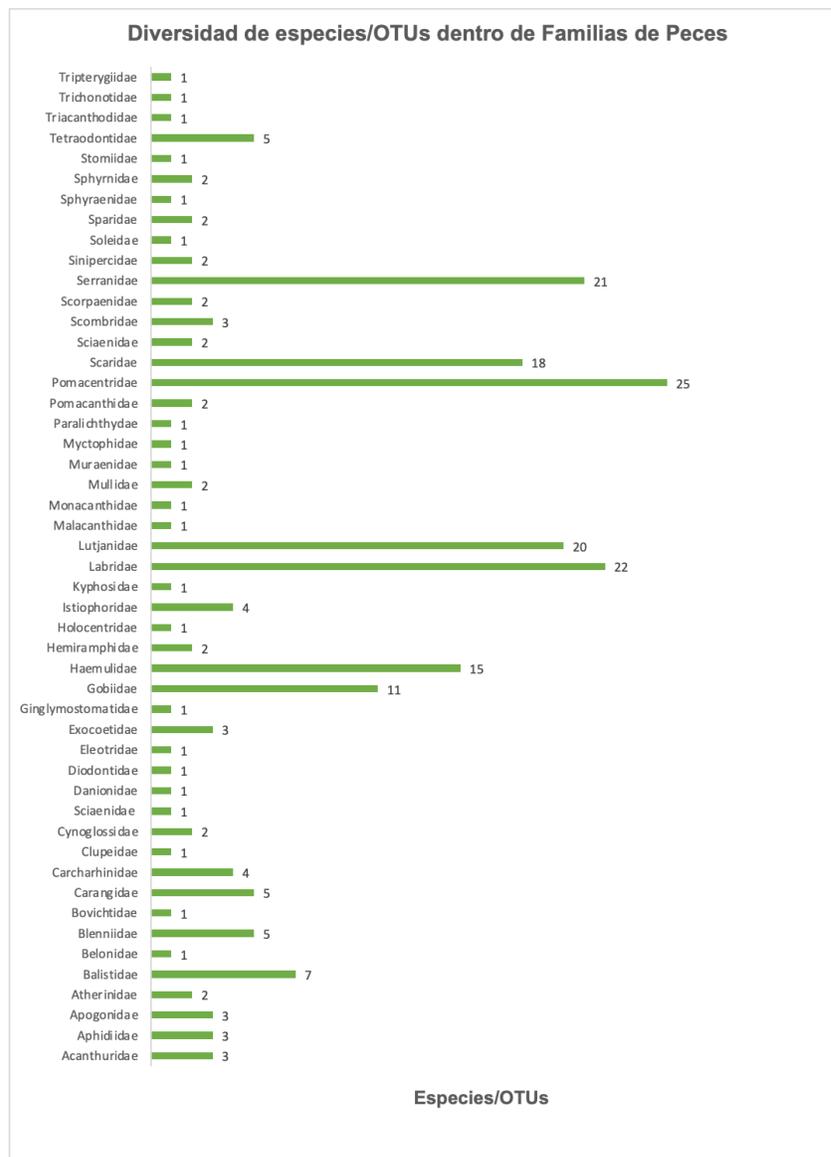


Figura 9. Resultados de la asignación taxonómica a nivel de Familias de especies/OTUs de peces y tiburones detectados mediante eDNA.

Riqueza de especies por sitio

Al analizar cada uno de los 17 sitios/profundidades muestreadas (Tabla 3), observamos que los niveles de riqueza de especies de eucariotas, animales multicelulares y algas fueron significativamente mayores en Arrecife Alacranes comparado a bajos del Norte. (ANOVA, $F = \geq 5.372$, $P \leq 0.034$), mientras que la riqueza de peces no fue estadísticamente distinta. Los rangos observados en la riqueza de especies en Arrecife Alacranes para eucariotas fueron entre 565 (A7-Tweed) y 237 (59 m- Niskin Arco), para animales multicelulares 396 (A6-Arco) y 181 (59 m-Niskin Arco), para peces 105 (A7-Tweed) y 28 (A3-Interior Nuevo), y para algas entre 195 (A7-Tweed) y 56 (59 m-Niskin Arco). En comparación en Bajos del Norte los rangos observados para eucariotas fueron 248 (LO-La Loma) a 215 (PZ- Paso del Zorro), para animales

multicelulares 176 (91 m- Niskin) a 134 (PZ- Paso del Zorro), para peces y tiburones 63 (91 m- Niskin) a 37 (PZ- Paso del Zorro), y algas entre 111 (LO-La Loma) y 62 (91 m- Niskin). Cabe resaltar que el esfuerzo de muestreo y secuenciación masiva de ADN son similares entre Arrecife Alacranes y bajos del Norte, por lo que las diferencias en diversidad encontradas no pueden atribuirse al esfuerzo de muestreo.

Tabla 3. Número de especies/OTUS de eucariotas detectados mediante eDNA en cada sitio de muestro/profundidad a nivel de grandes grupos.

Bajos del Norte	Eucariotas	Animales multicelulares	Peces y tiburones	Micro y Macro Algas
1 - BN1	226	140	58	86
2 - BN2	218	146	53	72
3 -PZ	215	134	37	81
4 - Niskin 70 m	228	148	59	80
5 - ES	247	159	58	88
6 - Niskin 91 m	238	176	63	62
7 - LO	248	137	42	111
Total Bajos	837	563	161	274
Arrecife Alacranes	Eucariotas	Animales multicelulares	Peces y tiburones	Micro y Macro Algas
A1-Hongos	440	300	31	140
A2-Pendiente N	361	269	54	92
A3-Interior Nuevo	327	224	28	103
A4-Gorgonia Delfin	359	268	36	91
A5-Marisol	410	288	48	122
53 m- Niskin Marisol	459	340	45	119
A6- Arco	551	396	88	155
59 m- Niskin Arco	237	181	34	56
A7- Tweed	565	370	105	195
48 m - Niskin canal	355	242	54	113
Total Alacranes	1831	1334	193	497
GRAN TOTAL Alacranes + Bajos	2226	1627	281	599
Compartidos Alacranes + Bajos	442	270	73	172
Exclusivos Arrecife Alacranes	1389	1064	120	325
Exclusivos Bajos del Norte	395	293	88	102

Al analizar los niveles espaciales de riqueza encontrada en cada sitio/profundidad, observamos que en Arrecife Alacranes, los sitios mas diversos se encuentran al Noreste del área protegida, en la zona mas alejada de la influencia humana. En particular, destacan A7-Tweed y A6-Arco como los sitios con mayor riqueza de especies, incluyendo eucariotas (Fig. 10) y peces (Fig. 11). Cabe destacar que el sitio con mayor diversidad marina de todo el estudio (A7-Tweed), no se encuentra dentro del área núcleo del Parque Nacional Arrecife Alacranes. En la region Oeste del parque, la mayor riqueza para eucariotas, animales multicelulares y algas se observó en el Noroeste entre A5-Marisol y la zona profunda adyacente (53 m - Niskin Marisol), seguido de A1-Hongos (Fig. 10). Para peces y tiburones en el lado oeste de Arrecife Alacranes, la mayor

riqueza se observo en A2-Pendiente Norte seguido de la zona somera y profunda al Noroeste (A5-Marisol y 53 m-Niskin Marisol) (Fig. 11).

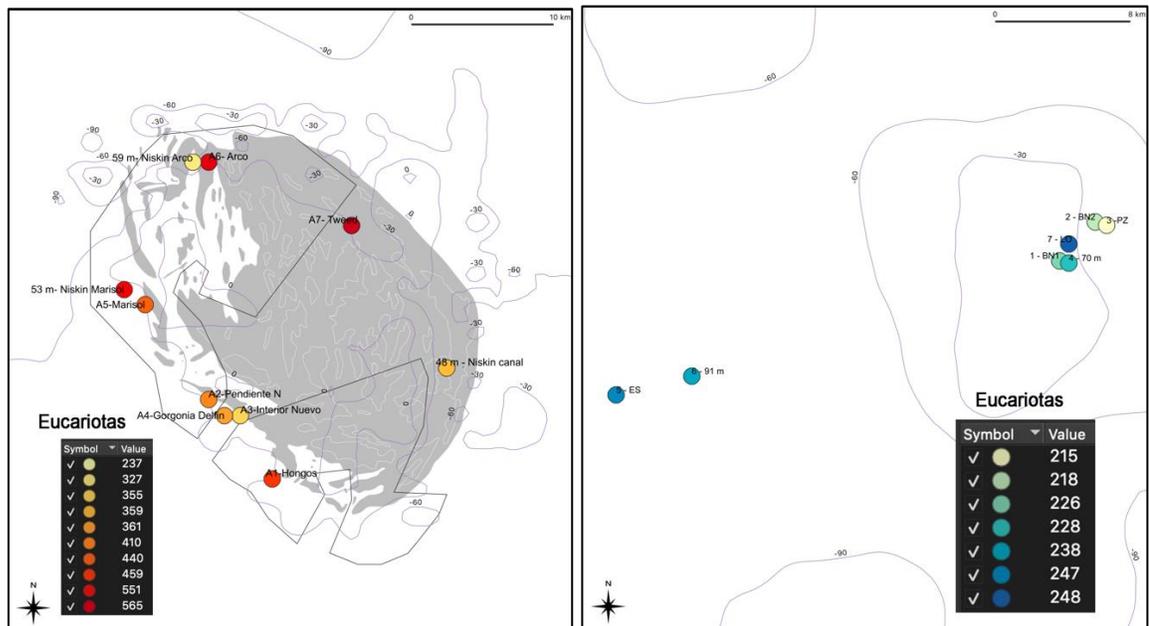


Figura 10. Patrones espaciales de riqueza de especies/OTUs de eucariotas observados mediante eDNA en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte. Se muestran los límites de la zona nucleo en el Parque Nacional Arrecife Alacranes y las isobatas de 30 m.

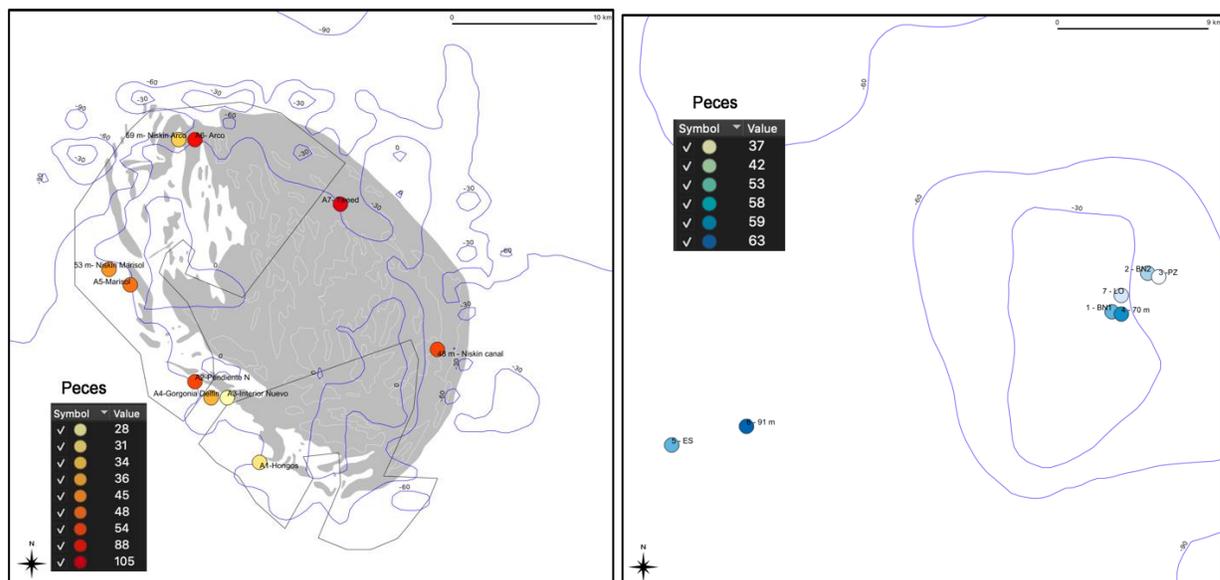


Figura 11. Patrones espaciales de riqueza de especies/OTUs de peces observados mediante eDNA en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte. Se muestran los límites de la zona nucleo en el Parque Nacional Arrecife Alacranes y las isobatas de 30 m.

En Bajos del Norte, la mayor riqueza de eucariotas y algas se observó en La loma (7-LO), seguido de Estadio (5-ES) y la zona profunda adyacente (6- 91m-Niskin). La muestra mas profunda de todo el estudio (6-

Niskin 91 m), fue el sitio mas diverso para Bajos del Norte en lo que respecta a animales multicelulares, peces y elasmobranquios (Fig. 10 y 11), destacando la importancia de sitios profundos que mantienen una diversidad comparable o incluso mayor a las zonas someras.

Detectamos la presencia de eDNA de 7 especies de elasmobranquios (tiburones y rayas, Tabla 4, Fig. 12), de los cuales 4 especies se observaron en Arrecife Alacranes y 4 especies en Bajos del Norte. En Arrecife Alacranes, observamos al tiburón gambuso considerado en peligro de extinción por la IUCN (*Carcharhinus obscurus*), el tiburón martillo cabeza de pala también clasificado en peligro (*Sphyrna tiburo*), el tiburón gata considerado como vulnerable (*Ginglymostoma cirratum*) y la raya látigo chata considerada casi en peligro (*Dasyatis say*). Los sitios con 2 especies de elasmobranquios se ubicaron en el Noroeste del parque y fueron El Arco (A6) y El tweed (A7), donde destaca la abundancia de lecturas de ADN de tiburón gata en el Arco (A6) y de tiburón gambuso en El Tweed (A7). También en Arrecife Alacranes encontramos un sitio (Marisol-A5) con una especie raya látigo. En Bajos del Norte detectamos la presencia de 4 especies totales: tiburón coralino clasificado en peligro de extinción por la IUCN (*Carcharhinus perezii*), tiburón curro considerado una especie vulnerable (*Carcharhinus brevipinna*), tiburón martillo común clasificado en peligro crítico de extinción (*Sphyrna lewini*), y tiburón gata (*Ginglymostoma cirratum*). Los sitios con 2 especies de elasmobranquios en Bajos del Norte fueron Bajo Norte 2 (BN2) y La Loma (LO), mientras que en Bajo Norte 1 (BN1) y Estadio (ES) detectamos solo una especie (Fig. 12).

Tabla 4. Frecuencia de siete especies/OTUs de elasmobranquios (tiburones y rayas), detectados mediante eDNA en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte. Los números representan las lecturas de ADN asignadas a cada uno de las especies/OTUs en cada sitio. Se muestra la clasificación de acuerdo a la lista roja de la IUCN, EN=En Peligro, VU= Vulnerable, CR= En Peligro Crítico, NT= Casi en Peligro.

Especie Tiburón	Bajos del Norte							Arrecife Alacranes										Total Alacranes	
	BN1	BN2	PZ	70 m	ES	91 m	L O	Total Bajos	A1	A2	A3	A4	A5	A 53 m	A6	A 59 m	A7		A 48 m
<i>Carcharhinus perezii</i> -EN	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Carcharhinus brevipinna</i> -VU	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Carcharhinus obscurus</i> -EN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	104	0	104
<i>Sphyrna lewini</i> - CR	1	0	0	0	3	0	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sphyrna tiburo</i> -EN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Ginglymostoma cirratum</i> -VU	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	828	0	2	0	830
<i>Dasyatis say</i> -NT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	73	0	0	0	0	0	73
# Especies/sitio	1	2	0	0	1	0	2	4	0	0	0	0	1	0	2	0	2	0	4

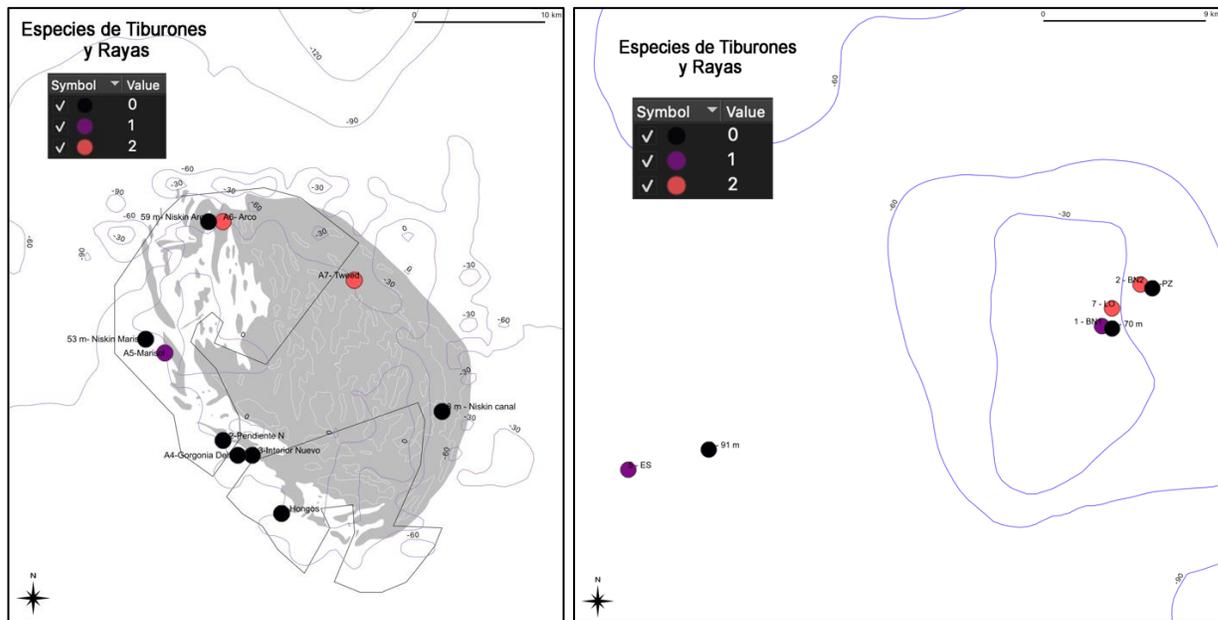


Figura 12. Patrones espaciales de riqueza de especies/OTUs de peces, tiburones y rayas observados mediante eDNA en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte. Se muestran los límites de la zona núcleo en el Parque Nacional Arrecife Alacranes y las isobatas de 30 m.

Los análisis de eDNA también nos permitieron evaluar la presencia y frecuencia del pez león (*Pterois volitans*), que es una especie invasora (Fig. 13). Todas las detecciones del pez león con eDNA fueron en sitios al este de Arrecife Alacranes, con mayor evidencia de abundancia en El Tweed (A7), seguido de El Arco (A6), y las zonas profundas adyacentes (59 m-Niskin Arco y 48 m-Niskin canal). Cabe mencionar que aunque los análisis de eDNA no detectaron al pez león en el oeste de Arrecife Alacranes, ni en Bajos del Norte, si se observaron algunos individuos aislados durante los buceos SCUBA en ambos sitios.

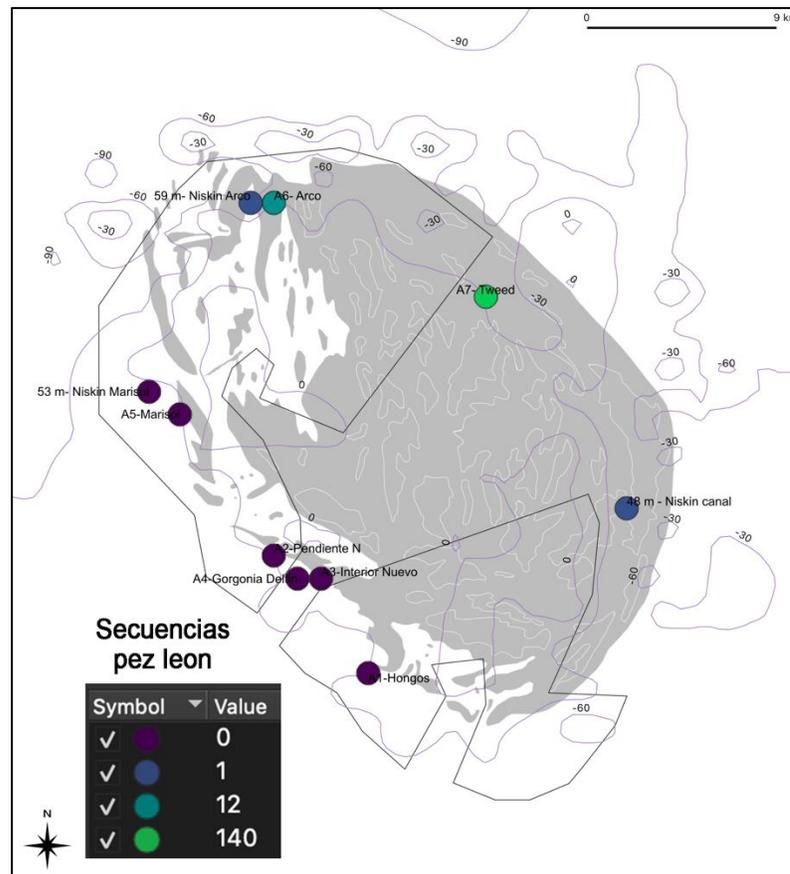


Figura 13. Patrones espaciales de la presencia y número de lecuras de eDNA asignados al pez leon (*Pterois volitans*) detectado mediante eDNA en Arrecife Alacranes. Se muestran los límites de la zona núcleo en el Parque Nacional Arrecife Alacranes y las isobatas de 30 m.

Comparación de la riqueza entre Bajos del Norte y Arrecife Alacranes

Al comparar los niveles de biodiversidad marina que son exclusivos de Arrecife Alacranes, aquellos exclusivos de Bajos del Norte y calcular los taxa que son compartidos entre las 2 regiones podemos establecer varios puntos importantes (Figs. 14-17). La riqueza de especies/OTUs es mucho mayor en Arrecife Alacranes que en Bajos del Norte para eucariotas (Fig. 14), animales multicelulares (Fig. 15) y algas (Fig. 17), lo cual puede explicarse tanto por la magnitud y extensión de la estructura coralina que es mucho mayor en Arrecife Alacranes, y probablemente por el nivel de protección, siendo Arrecife Alacranes un Parque Nacional establecido hace 28 años (en 1994). Sin embargo, los niveles de riqueza de peces y tiburones son comparables entre ambos sitios (Fig. 16), y no muestran diferencias significativas ni entre las dos regiones (Arrecife Alacranes vs. Bajos del Norte) ni tampoco considerando la profundidad ($p > 0.05$, Fig. 18).

Existe una mayor proporción de especies compartidas de peces y elasmobranquios entre Arrecife Alacranes y Bajos del Norte comparado a otros grupos de eucariotas (Fig. 16). Este patrón podría explicarse debido a la movilidad de peces, tiburones y rayas, determinado tanto por la dispersión larvaria de los peces, y los movimientos de juveniles y adultos de estos grupos. En ese sentido, la presencia de un número considerable de especies compartidas para todos los grupos taxonómicos sugiere una alta conectividad ecológica entre Arrecife Alacranes y Bajos del Norte.

Al analizar los diagramas de Venn, destaca que, aunque la riqueza es mayor en Arrecife Alacranes, la composición de especies es relativamente distinta comparado a Bajos del Norte. Aunque en general, aproximadamente la mitad de las especies encontradas en Bajos del Norte se comparten con Arrecife Alacranes, la otra mitad de las especies encontradas son exclusivas de Bajos del Norte (Fig. 14-17). Este resultado sugiera una alta complementariedad entra Arrecife Alacranes y Bajos del Norte, es decir, juntas representan una mayor biodiversidad marina que cada una por separado. Por ejemplo, para el caso de los peces y elasmobranquios, al evaluar las diferencias en la composición de especies/OTUs por Localidad (Bajos del Norte y Alacranes, $p= 0.001$) y Localidad+profundidad (Bajos del Norte somero y profundo y Alacranes somero y profundo, $p = 0.0001$) se observan diferencias significativas en la composición de especies de acuerdo a un análisis NMDs (Non-Metric Multidimensional Scaling, Fig. 19). Estos resultados indican que para la mayoría de los grupos taxonómicos Arrecife Alacranes tiene una mayor diversidad biológica, que además es distinta de la presente en Bajos del Norte, mientras que para peces y elasmobranquios, aunque los niveles de riqueza son similares, la composición de especies también es distinta entre las 2 regiones. De manera similar, el elenco de especies encontradas entre las zonas someras y profundas es distinto, indicando que expandir la protección a zonas profundas ayudaría a conservar a grupos de especies diferentes a aquellas presentes en zonas someras.

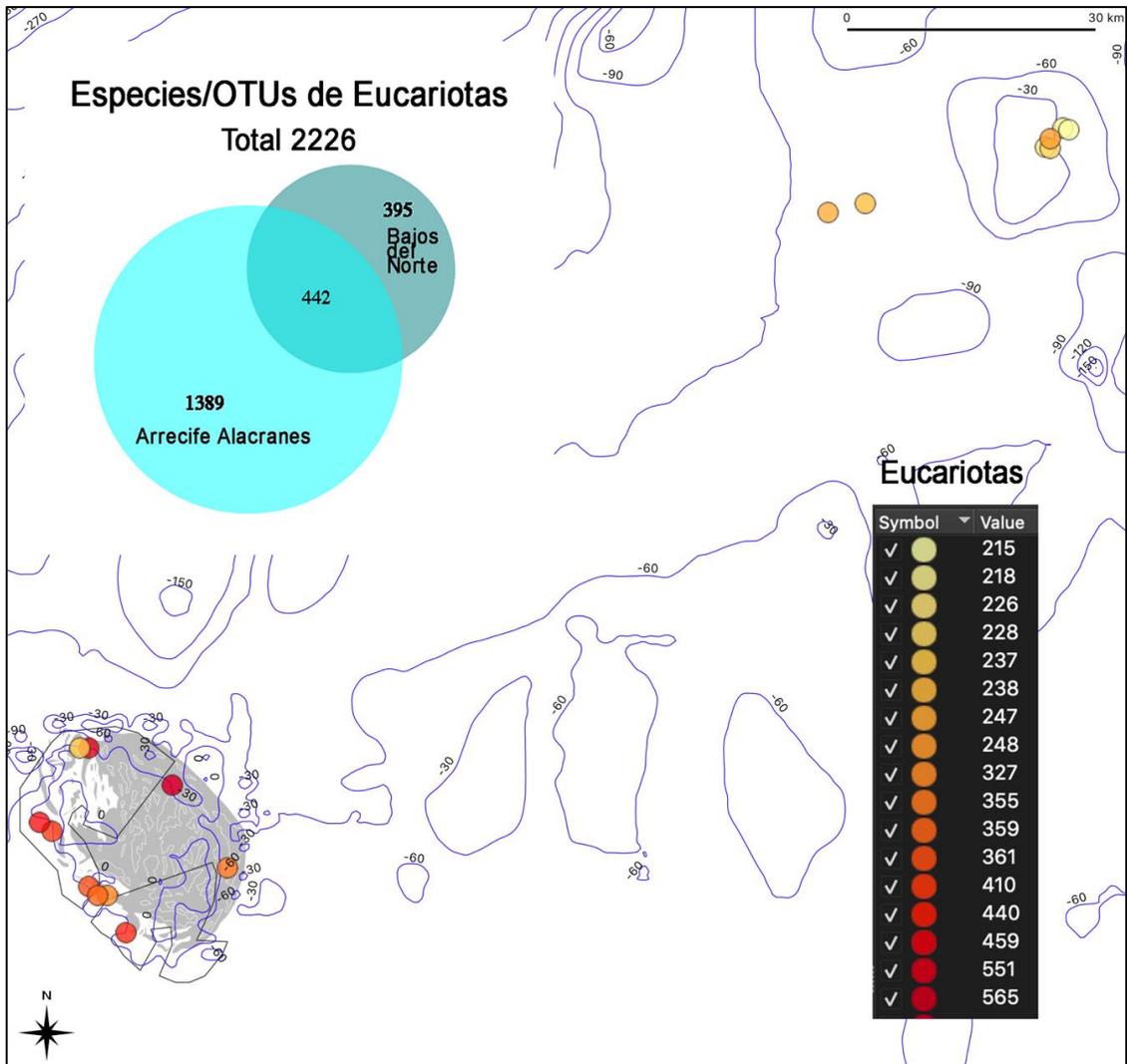


Figura 14. Patrones espaciales de riqueza de especies/OTUs de eucariotas observados mediante eDNA en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte. El diagrama de Venn muestra las especies/OTUs que son exclusivos y aquellos que son compartidos entre cada región. Se muestran los límites de la zona núcleo en el Parque Nacional Arrecife Alacranes y las isobatas de 30 m.

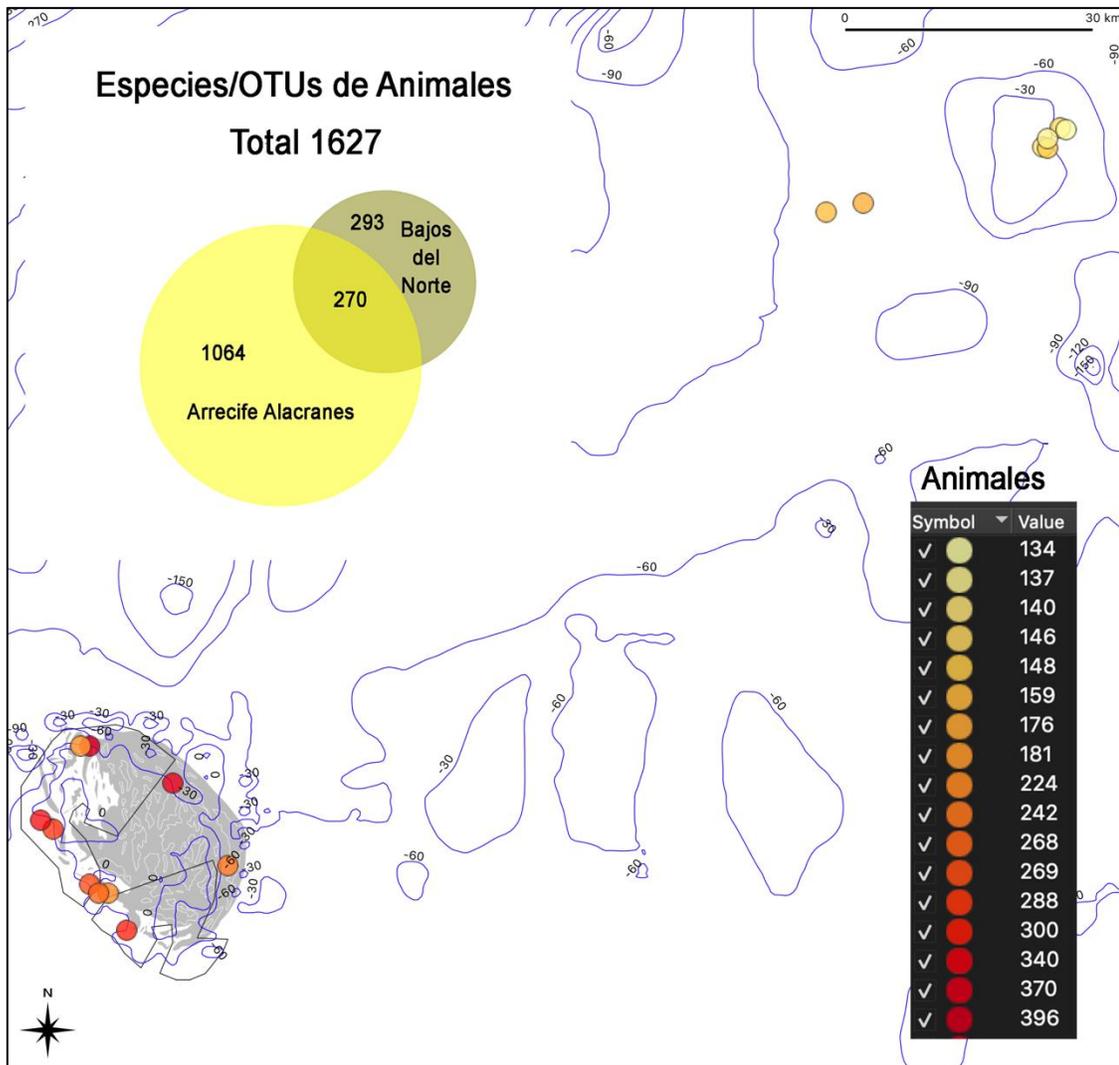


Figura 15. Patrones espaciales de riqueza de especies/OTUs de animales multicelulares observados mediante eDNA en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte. El diagrama de Venn muestra las especies/OTUs que son exclusivos y aquellos que son compartidos entre cada región. Se muestran los límites de la zona nucleo en el Parque Nacional Arrecife Alacranes y las isobatas de 30 m.

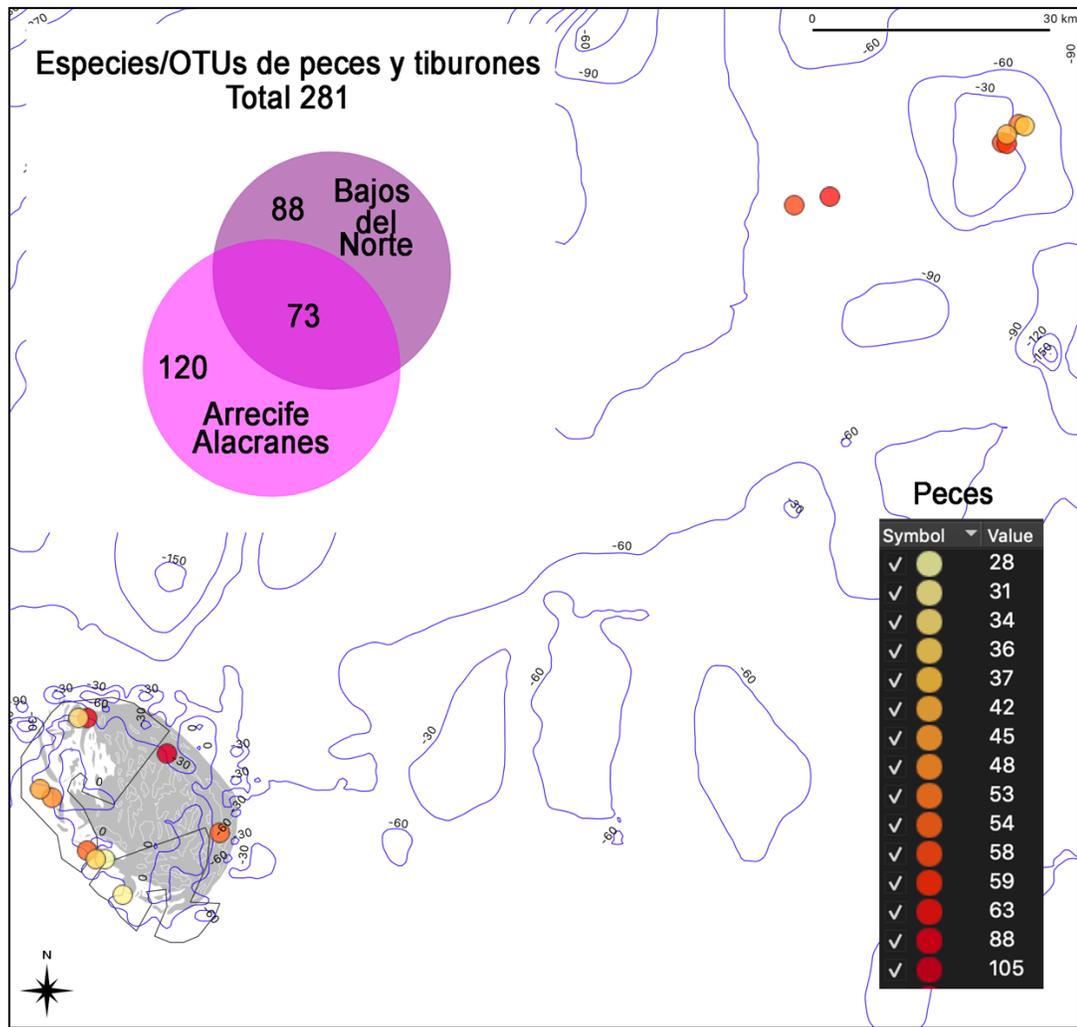


Figura 16. Patrones espaciales de riqueza de especies/OTUs de peces y elasmobranquios observados mediante eDNA en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte. El diagrama de Venn muestra las especies/OTUs que son exclusivos y aquellos que son compartidos entre cada región. Se muestran los límites de la zona núcleo en el Parque Nacional Arrecife Alacranes y las isobatas de 30 m.

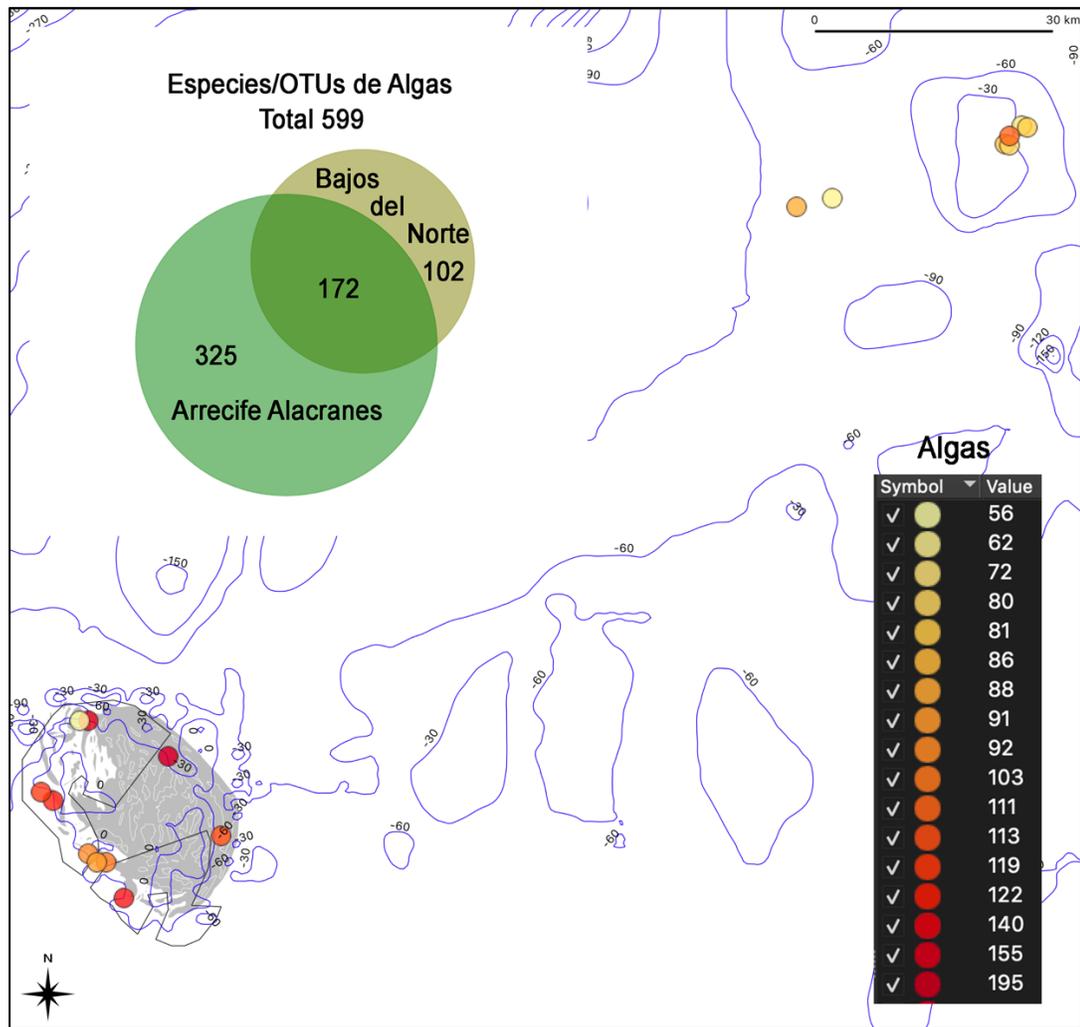


Figura 17. Patrones espaciales de riqueza de especies/OTUs de algas observados mediante eDNA en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte. El diagrama de Venn muestra las especies/OTUs que son exclusivos y aquellos que son compartidos entre cada región. Se muestran los límites de la zona núcleo en el Parque Nacional Arrecife Alacranes y las isobatas de 30 m.

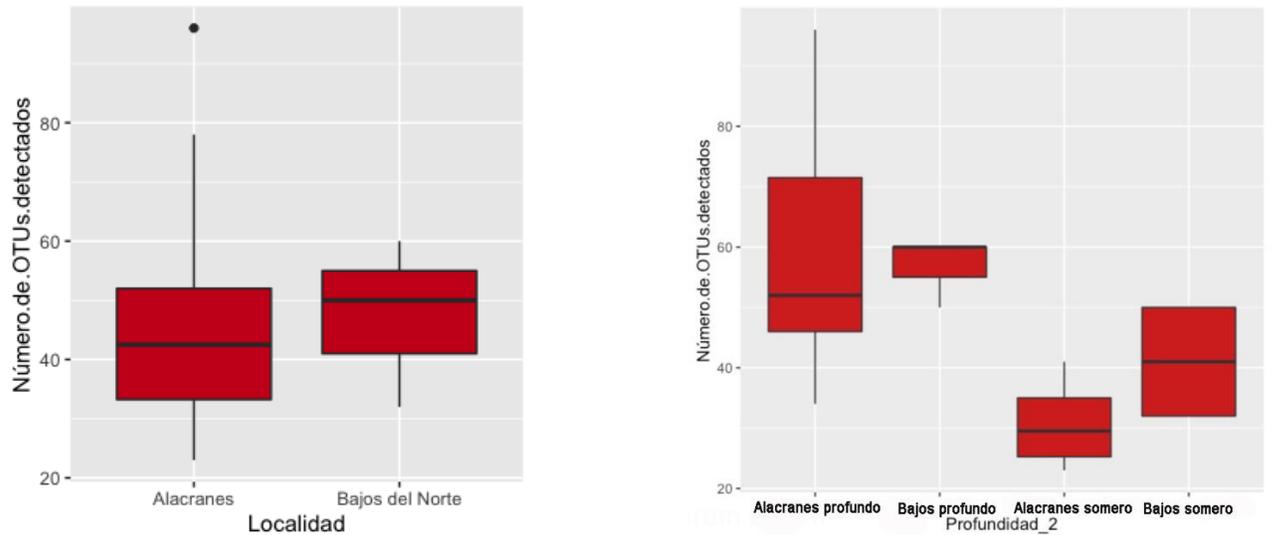


Figura 18. Boxplots mostrando el rango de valores en el número observado de especies/OTUs de peces y elasmobranquios en Arrecife Alacranes y Bajos del Norte, así como el rango de valores en el número observado de especies/OTUs por región y profundidad.

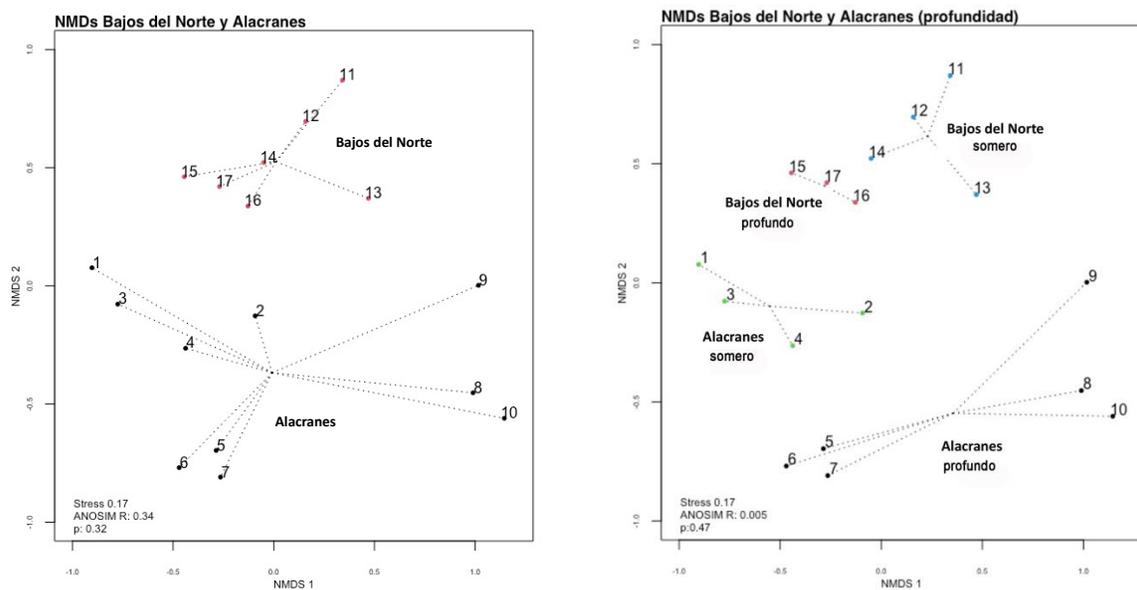


Figura 19. Diferencias en la composición de especies/OTUs de peces y elasmobranquios determinadas usando NMDS basado en la matriz de disimilitud de Jaccard (1-0) entre las localidades Bajos del Norte y Alacranes, y en dos profundidades.

Comparación de la riqueza en Arrecife Alacranes entre eDNA y el Plan de Manejo

Para poner en contexto los niveles de biodiversidad marina encontrados en Arrecife Alacranes mediante los análisis de metabarcoding de ADN ambiental, se realizó una comparación a distintos niveles taxonómicos de la riqueza de especies reportada en el Plan de Manejo del Parque Nacional Arrecife Alacranes (CONANP, 2006). Cabe destacar que los estudios de biodiversidad del Arrecife Alacranes han utilizado métodos tradicionales para verificar la presencia de las especies presentes (colectas, censos, estudios taxonómicos, etc.). Aunque las técnicas para estimar la diversidad de especies son distintas, nos permiten tener una idea de la biodiversidad marina presente en el parque nacional de acuerdo a distintas fuentes de información.

Primero, comparando a nivel de reinos de organismos vivos, encontramos que el eDNA sugiere la presencia del doble de la riqueza de animales multicelulares, y algas macro y microscópicas registrados en Arrecife Alacranes (Fig. 20).

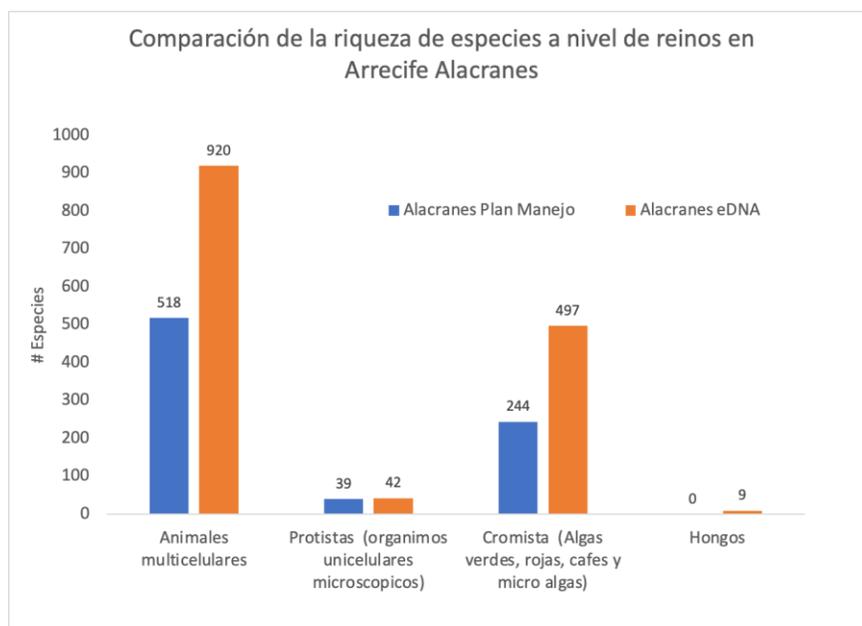


Figura 20. Comparación de la riqueza de especies de eucariotas a nivel de grandes grupos reportada en el plan de manejo del Parque Nacional Arrecife Alacranes y el número de especies/OTUs detectados mediante eDNA.

Una comparación a nivel de diferentes jerarquías taxonómicas (Fig.21), con base en datos obtenidos en la plataforma datamares para el Parque Nacional Arrecife Alacranes (<https://datamares.org/areas-naturales-protégidas>), muestra que la riqueza encontrada con eDNA adentro del parque contiene el doble de phyla y clases taxonómicas y un número mayor de órdenes, comparado al plan de manejo, y más del doble de especies/OTUs reportados. Los niveles de diversidad a nivel de familias fueron muy parecidos, pero es necesario un análisis posterior que permita distinguir la complementariedad de los niveles de diversidad de acuerdo con la identidad de cada taxa presente en las distintas categorías taxonómicas.

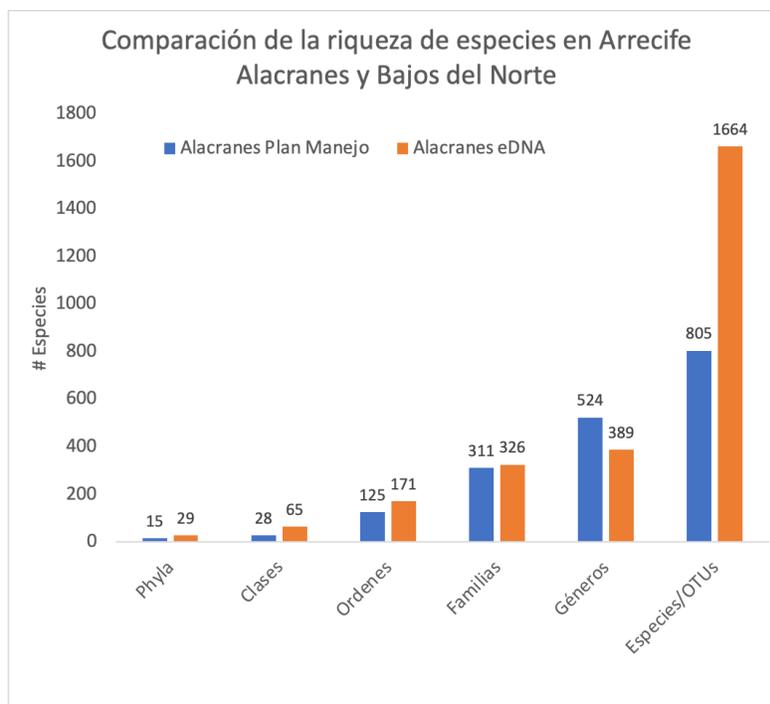


Figura 21. Comparación de la riqueza de especies de eucarioatas a distintos niveles taxonómicos reportada en el plan de manejo del Parque Nacional Arrecife Alacranes y el número de especies/OTUs detectados mediante eDNA.

Finalmente, se realizó una comparación para distintos grupos taxonómicos para los cuales fue posible estimar la riqueza de especies en Arrecife Alacranes de acuerdo a la información en su plan de manejo (Figura 22). El análisis muestra que, para algunos grupos bien estudiados en Arrecife Alacranes, la riqueza de especies reportadas en el plan de manejo es mayor o comparable a lo encontrado con eDNA (e.g. algas verdes, peces y moluscos). Sin embargo, para varios grupos menos estudiados, la diversidad encontrada con eDNA es significativamente mayor a lo reportado en el plan de manejo (e.g. algas cafés, algas rojas, diatomeas, dinoflagelados, esponjas, cnidarios, poliquetos, equinodermos y crustáceos).

Con estas comparaciones, podemos concluir que la riqueza de especies marinas encontradas en Parque Nacional Arrecife Alacranes mediante el análisis del ADN ambiental es mucho mayor a la reportada en el Plan de Manejo del Parque Nacional mediante métodos tradicionales, lo cual es cierto para la mayoría de los grupos taxonómicos analizados.

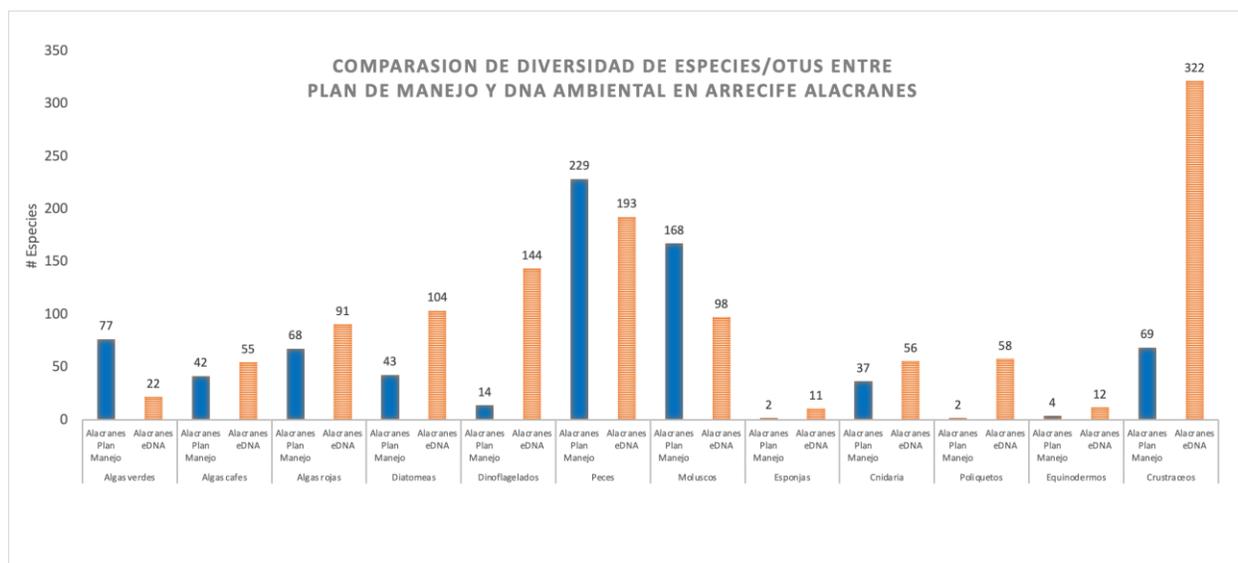


Figura 22. Comparación de la riqueza de especies de eucarioatas para distintos grupos taxonómicos reportada en el plan de manejo del Parque Nacional Arrecife Alacranes y el número de especies/OTUs detectados mediante eDNA.

Referencias

Bakker, J., O. S. Wangensteen, C. Baillie, D. Buddo, D. D. Chapman, A. J. Gallagher, T. L. Guttridge, H. Hertler, S. Mariani. 2019. Biodiversity assessment of tropical shelf eukaryotic communities via pelagic edna metabarcoding. *Ecology and Evolution*, 9: 14341-14355.10.1002/ece3.5871

- CONANP. 2006. Programa de conservacion y manejo parque nacional Arrecife Alacranes. Comision Nacional de Areas Naturales Protegidas: 168 pp
- Edgar, R. C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than blast. *Bioinformatics*, 26: 2460-2461.10.1093/bioinformatics/btq461
- Huson, D. H., S. Beier, I. Flade, A. Gorska, M. El-Hadidi, S. Mitra, H. J. Ruscheweyh, R. Tappu. 2016. Megan community edition - interactive exploration and analysis of large-scale microbiome sequencing data. *PLoS Computational Biology*, 12: e1004957.10.1371/journal.pcbi.1004957
- Shen, W., S. Le, Y. Li, F. Hu. 2016. Seqkit: A cross-platform and ultrafast toolkit for fasta/q file manipulation. *PloS one*, 11: e0163962.10.1371/journal.pone.0163962
- Valdivia-Carrillo, T., A. Rocha-Olivares, H. Reyes-Bonilla, J. Francisco Dominguez-Contreras, A. Munguia-Vega. 2021. Integrating edna metabarcoding and simultaneous underwater visual surveys to describe complex fish communities in a marine biodiversity hotspot. *Molecular Ecology Resources*, 21: 1558-1574.10.1111/1755-0998.13375