

9 Marzo 2022
Adrian Munguia-Vega
airdrian@arizona.edu

Reporte Final:

Biodiversidad marina en Bajos del Norte mediante metabarcoding de ADN ambiental marino en la expedición organizada por OCEANA México

Con el objetivo de estudiar la biodiversidad marina presente en el Arrecife Alacranes y Bajos del Norte, OCEANA México organizó una expedición científica a bordo de la embarcación "Kraken", partiendo del puerto de Progreso (Yucatán) el día 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, 11 y 12 de Agosto, antes que la expedición tuviera que ser interrumpida por condiciones climatológicas.

METODOLOGIA

Muestreo de ADN ambiental

Durante los 3 días de muestreo, 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 de 30 °C (Tabla 1) 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).

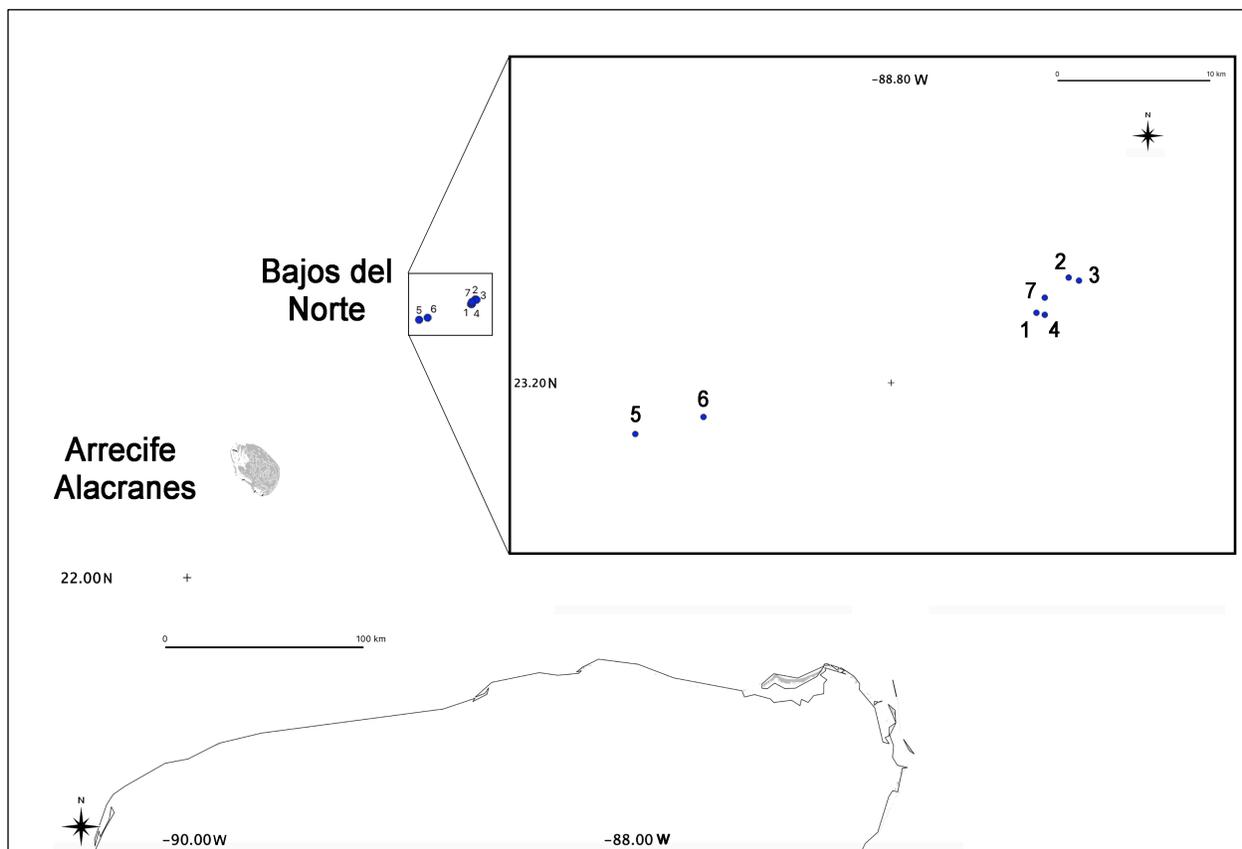


Figura 1. Mapa que muestra el norte de la Península de Yucatán, México, y la ubicación de el Arrecife Alacranes y los sitios de muestreo en Bajos del Norte (indicado por círculos azules). Los números asociados a cada sitio de muestreo corresponden con el # Sitio en la Tabla 1.

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 hora en la que se realizó el muestreo, la profundidad a la que fue colectada el agua, el número de replica correspondiente a cada muestra, el volumen de agua filtrado (en Litros), 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	Hora	Profundidad	# Replica	Volumen (L)	Temperatura (C)	Latitud	Longitud
1	1	10 Agosto	Bajos Norte 1	BN1	10:30 AM	20 m	1	2	30	23.24122	-88.71497
2	1	10 Agosto	Bajos Norte 1	BN1	10:30 AM	20 m	2	2	30	23.24122	-88.71497
3	1	10 Agosto	Bajos Norte 1	BN1	10:30 AM	20 m	3	2	30	23.24122	-88.71497
4	2	10 Agosto	Bajos Norte 2	BN2	8:00 PM	15 m	1	2	30	23.26183	-88.69596
5	2	10 Agosto	Bajos Norte 2	BN2	8:00 PM	15 m	2	2	30	23.26183	-88.69596
6	2	10 Agosto	Bajos Norte 2	BN2	8:00 PM	15 m	3	2	30	23.26183	-88.69596
7	3	11 Agosto	Paso del Zorro	PZ	9:00 AM	22 m	1	2	30	23.26000	-88.69000
8	3	11 Agosto	Paso del Zorro	PZ	9:00 AM	22 m	2	2	30	23.26000	-88.69000
9	3	11 Agosto	Paso del Zorro	PZ	9:00 AM	22 m	3	2	30	23.26000	-88.69000
10	4	11 Agosto	En tránsito 1	70m	3:00 PM	70 m	1	2	24	23.24000	-88.71000
11	4	11 Agosto	En tránsito 1	70m	3:00 PM	70 m	2	2	24	23.24000	-88.71000
12	4	11 Agosto	En tránsito 1	70m	3:00 PM	70 m	3	2	24	23.24000	-88.71000
13	5	12 Agosto	Estadio	ES	10:00 AM	28 m	1	2	30	23.17000	-88.95000
14	5	12 Agosto	Estadio	ES	10:00 AM	28 m	2	2	30	23.17000	-88.95000
15	5	12 Agosto	Estadio	ES	10:00 AM	28 m	3	2	30	23.17000	-88.95000
16	6	12 Agosto	En tránsito 2	91m	10:00 AM	91 m	1	2	19	23.18000	-88.91000
17	6	12 Agosto	En tránsito 2	91m	10:00 AM	91 m	2	2	19	23.18000	-88.91000
18	6	12 Agosto	En tránsito 2	91m	10:00 AM	91 m	3	2	19	23.18000	-88.91000
19	7	12 Agosto	La Loma	LO	5:00 PM	15 m	1	2	30	23.25000	-88.71000
20	7	12 Agosto	La Loma	LO	5:00 PM	15 m	2	2	30	23.25000	-88.71000
21	7	12 Agosto	La Loma	LO	5:00 PM	15 m	3	2	30	23.25000	-88.71000
22		10 Agosto	Control Negativo		5:00 PM	Agua del barco	1	2			
23		10 Agosto	Control Negativo		5:00 PM	Agua del barco	1	2			
24		11 Agosto	Control Negativo		5:00 PM	Agua del barco	1	2			
25		11 Agosto	Control Negativo		5:00 PM	Agua del barco	1	2			
26		12 Agosto	Control Negativo		5:00 PM	Agua del barco	1	2			
27		12 Agosto	Control Negativo		5:00 PM	Agua del barco	1	2			

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). Los ensayos de secuenciación incluyeron los negativos de campo, y adicionalmente también negativos durante el proceso de extracción y 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.

Análisis bioinformáticos

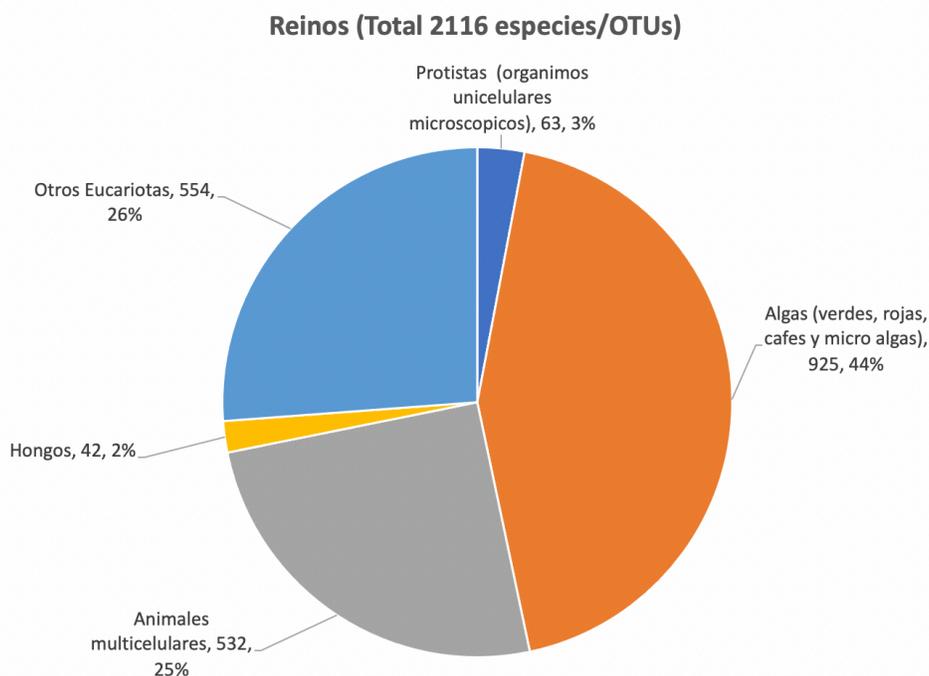
La secuenciación de ambas librerías produjo un total de ~50 millones de secuencias de ADN, las cuales fueron analizadas bajo estrictos filtros de calidad. Brevemente, las secuencias fueron demultiplexadas manteniendo sólo aquellas secuencias que mostraban una identidad del 100% con los barcodes o índices 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 la librería de peces y elasmobranquios se realizó con el software Obitools V1 como se describe en (Valdivia-Carrillo et al., 2021), mientras que la librería de organismos eucariotas se analizó con el software Usearch V11 (Edgar, 2010), herramientas 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 (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: a) 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 eliminaron OTUs que estuvieron presentes en los controles negativos y que muy probablemente representan contaminación, se eliminaron OTUs identificados en la comunidad artificial (mock), se eliminaron secuencias de grupos taxonómicos que no son marinos o que podrían representar contaminación incluyendo virus y bacterias, invertebrados terrestres (insectos, arácnidos, lombrices, escorpiones), plantas terrestres (Streptophyta), anfibios, aves terrestres, tortugas de agua dulce, y secuencias asignadas a *Homo sapiens* y *Canis familiaris* (humano y perro doméstico, respectivamente). Finalmente, se eliminaron secuencias que no tuvieron parecido alguno con ninguna secuencia en la base de datos de referencia (no hits).

RESULTADOS

Diversidad de Eucariotas

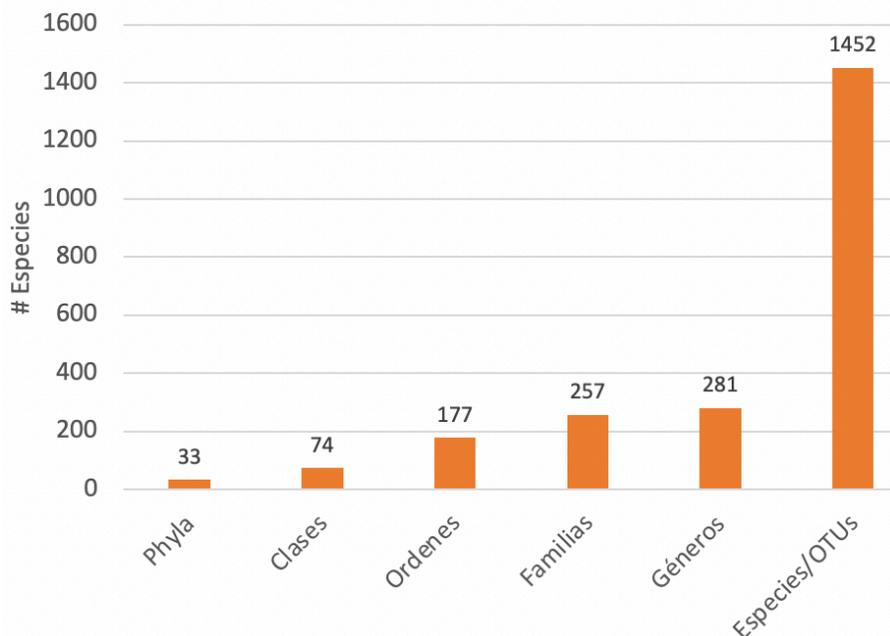
Después de realizar todos los filtros de calidad mencionados a las secuencias del gen COI, encontramos 2,116 especies/OTUs (Anexo 1), los cuales podrían representar cada uno especies distintas, aunque dado el uso de un agrupamiento al 97% de similitud es posible que estos números representen una sub-estimación de la diversidad de especies (i.e. 1 OTU puede representar una o mas especies, especialmente si son especies recientes y tienen alta similitud en sus secuencias).

La formas de vida en Bajos del Norte pueden agruparse en 5 grandes grupos. El grupo más diverso son las algas (verdes, rojas, cafés y micro algas), que representan 44% de toda la diversidad, seguido de los animales multicelulares (metazoarios, 25%), protistas u organismos unicelulares microscopicos (3%) y hongos (2%). Un 26% 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 a grupos taxonómicos inferiores, y al momento sólo sabemos que son especies eucariotas que habitan Bajos del Norte.



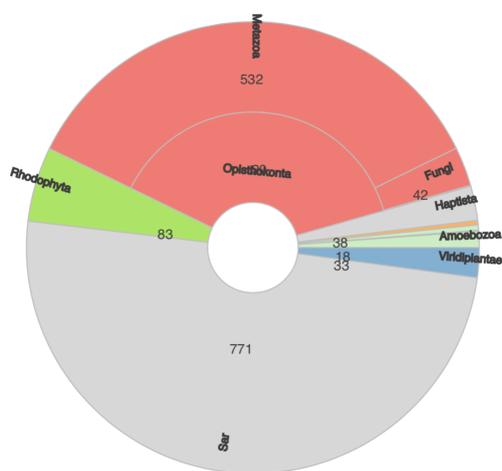
Dentro de las secuencias que si pudieron ser asignadas taxonómicamente a nivel de phylum o inferior, encontramos representados 33 phyla, 74 clases, 177 órdenes, 257 familias, 281 géneros y 1452 especies (de los cuales 256 fueron asignadas a nivel de especies y 1,196 son OTUs asignados a niveles taxonómicos entre genero y reino).

Diversidad taxonómica eucariotas Bajos del Norte



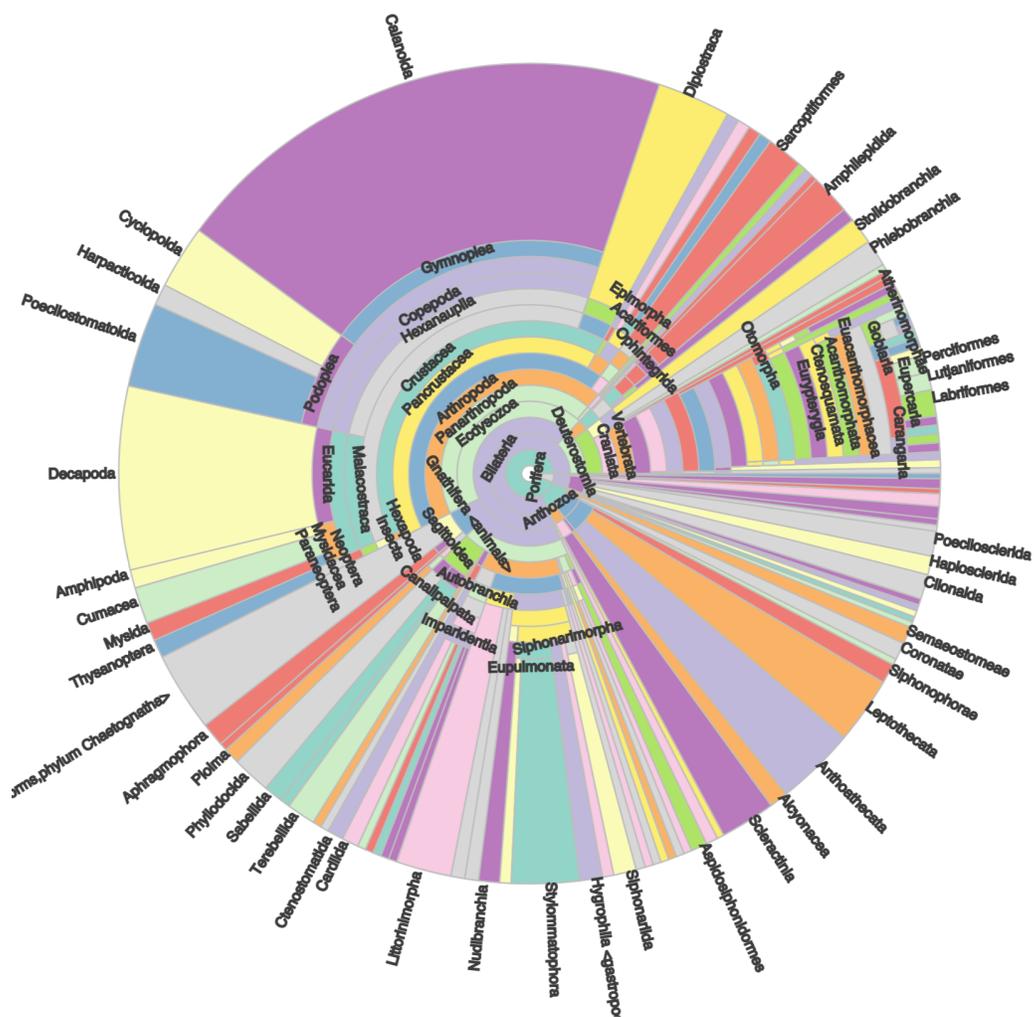
El grupo más diverso por debajo del nivel de reino es el grupo artificial SAR (que significa Stramenófilos-heterokontos, Alveolados y Rhizarios) y que agrupa a varios tipos de algas y microalgas, incluyendo dinoflagelados y diatomeas, entre otros. El siguiente grupo más importante es el Ophistokonta, que agrupa a los organismos multicelulares (metazoa) y a los hongos (fungi).

Grandes grupos de organismos eucariotas



Encontramos que 782 especies/OTUs pudieron ser asignados a 33 diferentes Phyla taxonómicos, de un total de 34 phyla de eucariotas reportados en el mundo para los organismos de ambientes marinos. Es decir, Bajos del Norte contiene la diversidad completa de formas de vida de eucariotas marinos existentes. Los phyla más diversos corresponden, en orden decreciente de importancia, a los artrópodos (17.6%, representados por los crustáceos), algas microscópicas diatomeas (17.3%), algas rojas (10.6%),

Ordenes de animales multicelulares encontrados

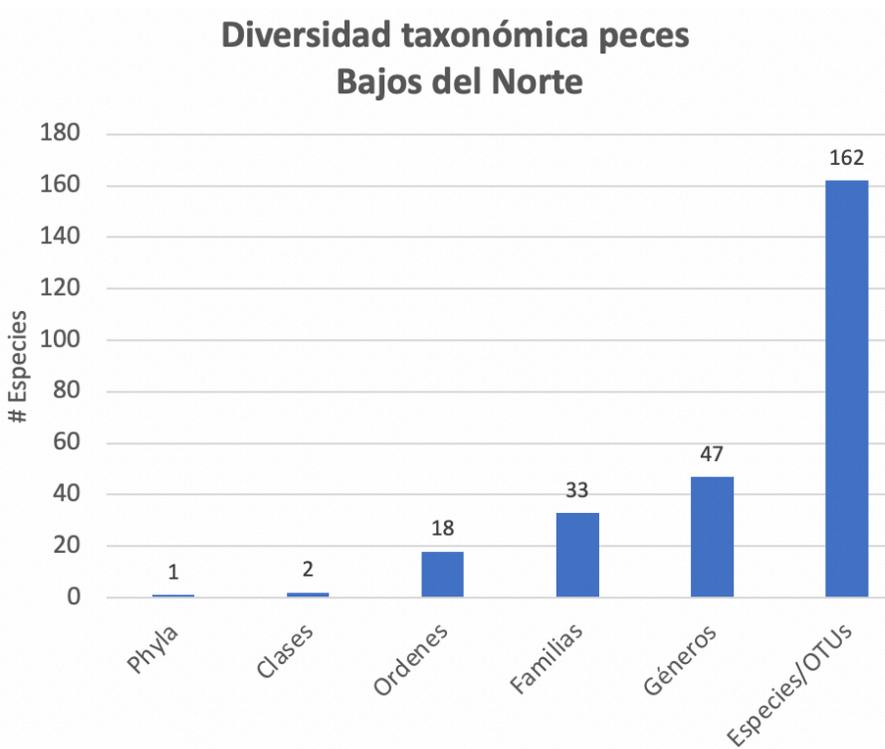


La lista completa de Reinos, Phyla, Clases, Ordenes, Familias, Generos y especies/OTUs de organismos Eucariotas encontrados puede consultarse en el Anexo 1-Eucariotas.

Diversidad de Peces y Elasmobranquios

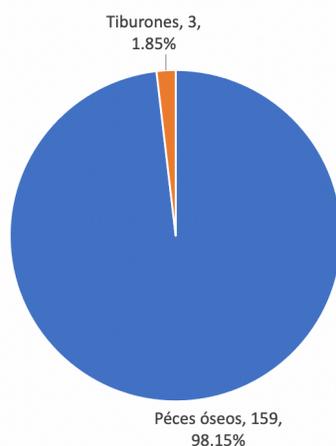
El análisis de las secuencias del gen 12S, aunado a los resultados del gen COI donde se identificaron también especies de peces, mostraron la presencia de 162 especies/OTUs de peces óseos y cartilagosos (Anexo 2). Es posible que estos números representen una sub-estimación de la diversidad de especies como se explicó para el gen COI.

En total, documentamos la presencia de 2 clases de peces, 18 órdenes, 33 familias, 47 géneros y 162 especies/OTUs.



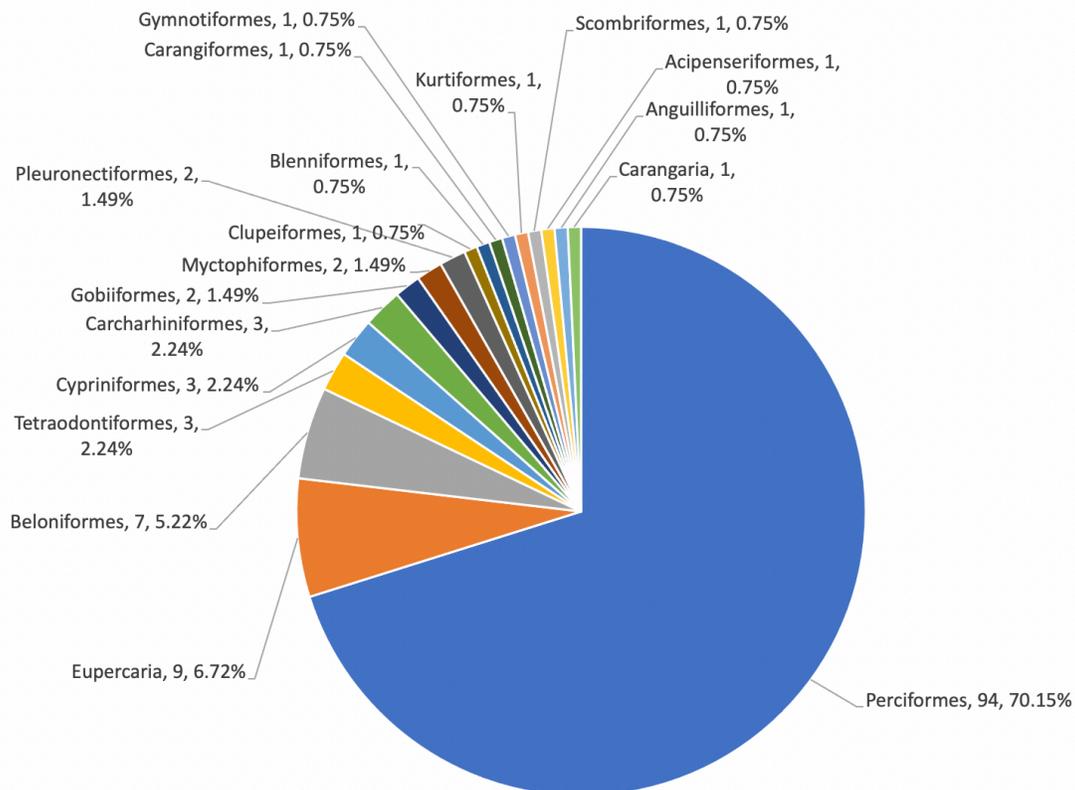
La gran mayoría de las especies/OTUs identificados fueron peces óseos (Actinopteri, 98.1%), y sólo encontramos 3 especies/OTUs de tiburones (Condriichthyes, 1.8%).

Clases de peces encontradas

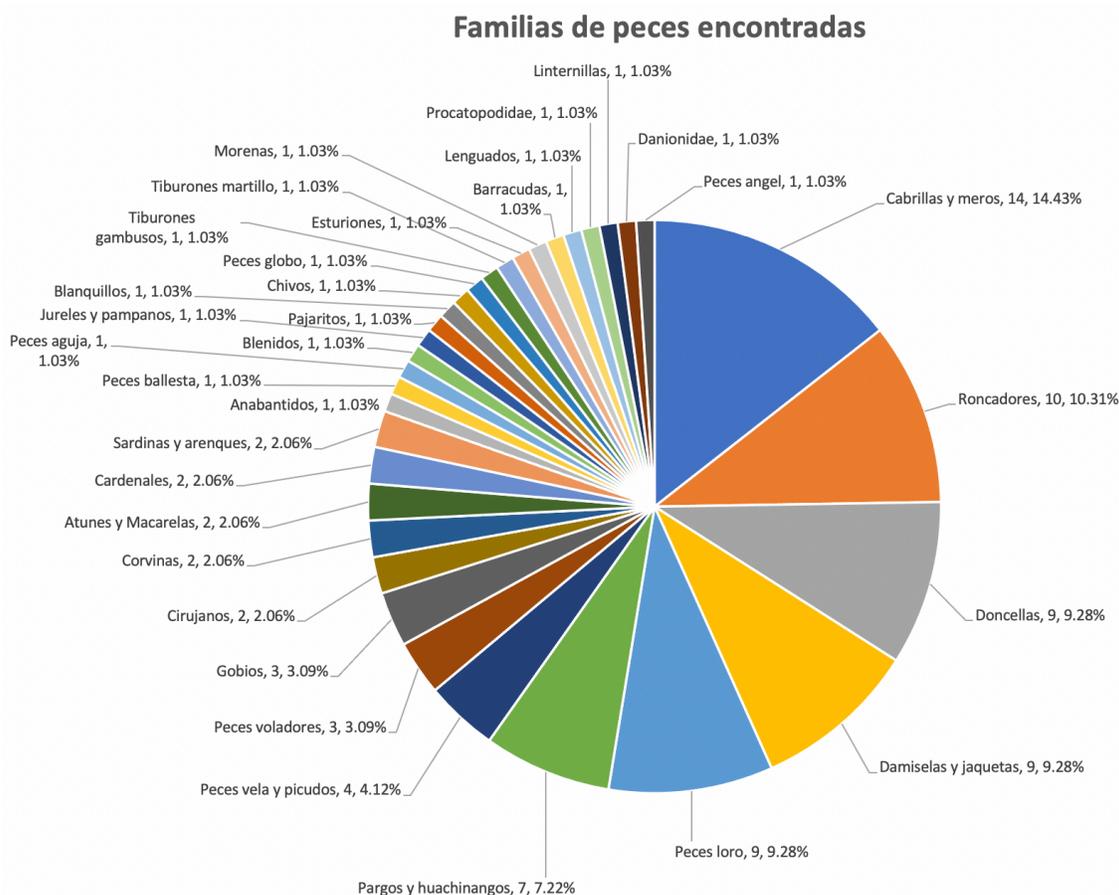


Un total de 134 especies/OTUs fueron asignados a alguno de 18 órdenes distintos, entre los cuales el más diverso por mucho fue el Perciformes (70.1%), seguido de Eupercaria (6.7%), Beloniformes (5.2%), Tetraodontiformes (2.2%), Cypriniformes (2.2%) y Carcharhiniformes (2.2%). El resto de los órdenes mostraron una riqueza igual o menor del 1.4% del total de especies/OTUs encontrados.

Órdenes de peces encontrados

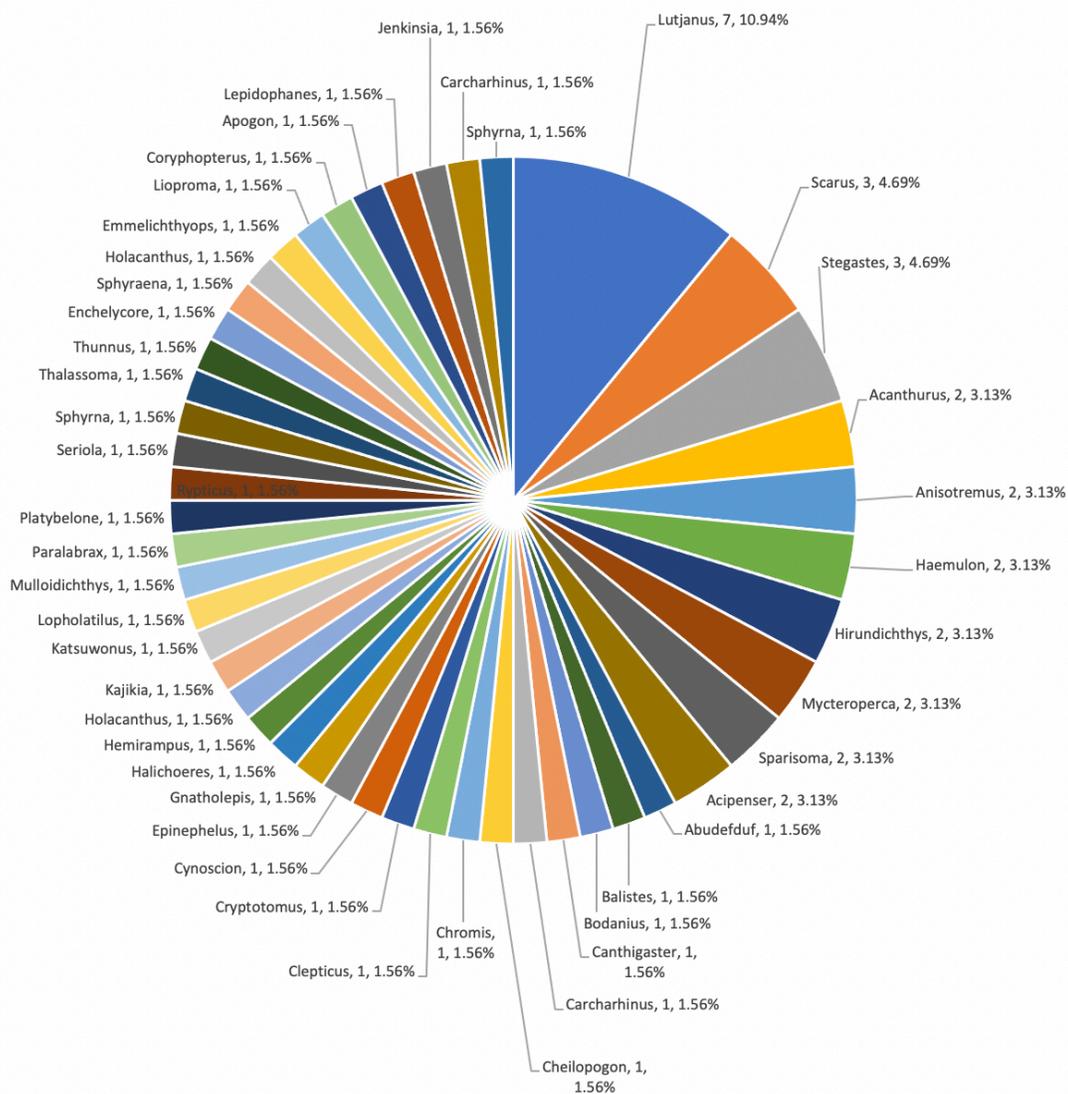


De 97 especies/OTUs que pudieron ser identificados a alguna de las 33 familias de peces encontradas, las que tuvieron una mayor riqueza de especies/OTUs fueron las cabrillas y meros (Serranidae, 14.1%, 14 especies/OTUs), roncadores (Haemulidae, 10.3%, 10 especies/OTUs), doncellas (Labridae, 9.2%, 9 especies/OTUs), damiselas y jaquetas (Pomacentridae, 9.2%, 9 especies/OTUs), peces loro (Scaridae, 9.2%, 9 especies/OTUs), pargos y huachinangos (Lutjanidae, 7.2%, 7 especies/OTUs), peces vela y picudos (Istiophoridae, 4.1%, 4 especies/OTUs), peces voladores (Exocoetidae, 3%, 3 especies/OTUs) y gobios (Gobiidae, 3%, 3 especies/OTUs). El resto de las familias tuvieron una riqueza igual o menor al 2%.



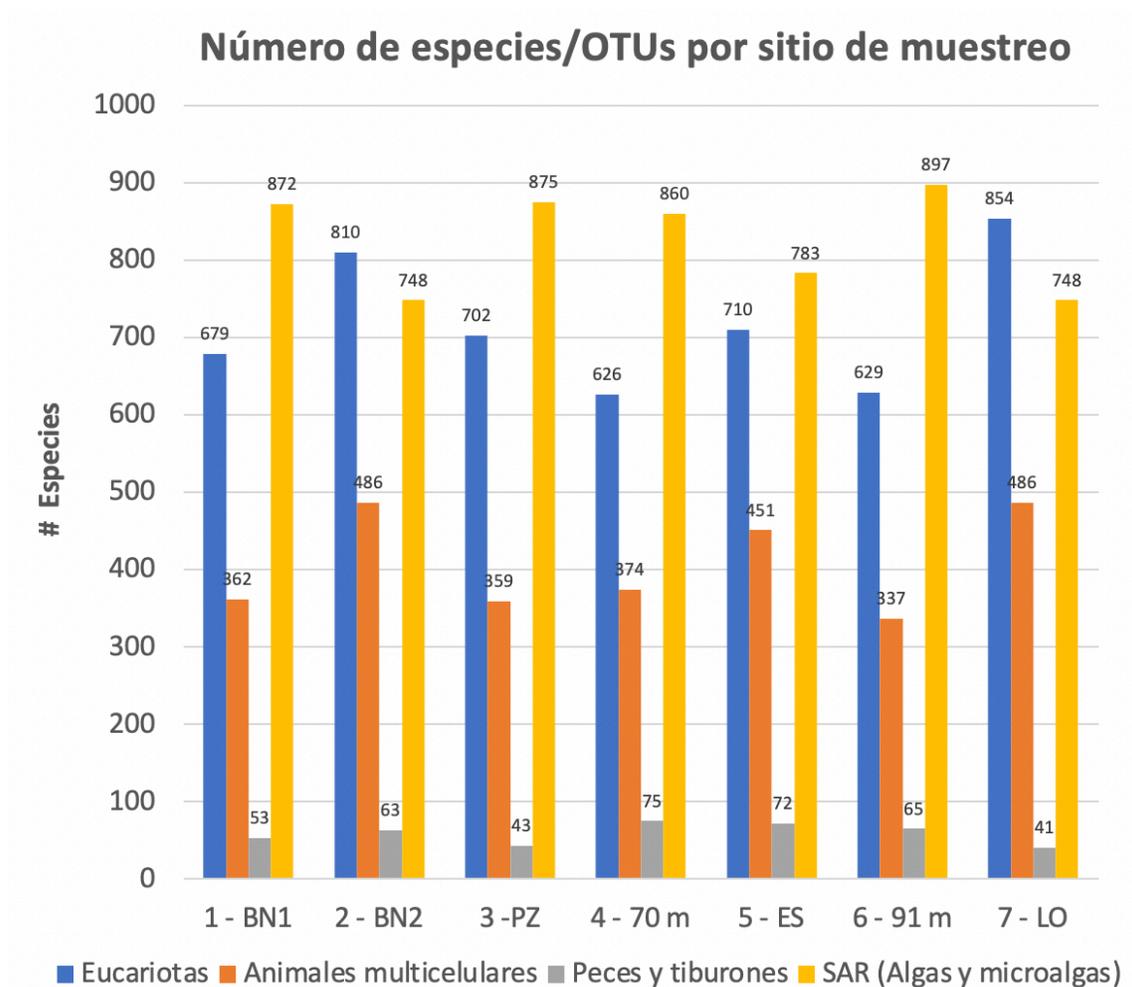
Encontramos 64 especies/OTUs que fueron asignadas a alguno de los 47 distintos géneros de peces. Los géneros más diversos fueron *Lutjanus* (7 especies/OTUs), *Scarus* (3 especies/OTUs), *Stegastes* (3 especies/OTUs), y siete géneros que mostraron 2 especies/OTUs cada uno (*Acanthurus*, *Anisotremus*, *Haemulon*, *Hirundichthys*, *Mycteroperca*, *Sparisoma* y *Acipenser*). El resto de los géneros observados tuvieron sólo 1 especie cada uno.

Géneros de peces encontrados

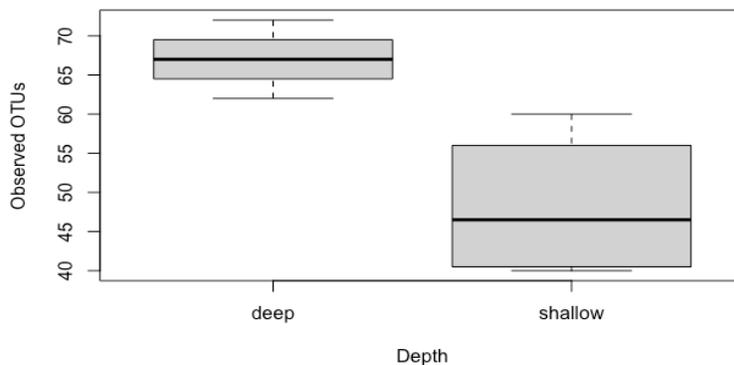


Riqueza de especies por sitio

Al analizar cada uno de los 7 sitios/profundidades muestreadas, observamos que los niveles de riqueza de especies fueron relativamente similares entre los sitios muestreados. En promedio, en cada sitio encontramos 715 eucariotas (rango 626 eucariotas en 70m a 854 eucariotas en LO), 407 animales multicelulares (rango 337 a 91 m a 486 en BN2 y LO), 59 peces (rango 41 en LO a 75 a 70 m) y 826 algas y microalgas (rango 748 en BN2 y LO a 897 a 91m).



En general, observamos que las muestras de profundidad tuvieron una alta diversidad de peces, algas y micro algas, pero menor riqueza de animales multicelulares. Las diferencias en la riqueza de peces entre zonas someras (15-22m) y profundas (28-91 m) fue significativa.



Detectamos la presencia de tiburones en 3 sitios someros de los 7 sitios visitados. En BN2 encontramos al tiburón curro (*Carcharhinus brevipinna*) y al tiburón martillo común (*Sphyrna lewini*). En el sitio ES (Estadio) encontramos al tiburón martillo común y a otra especie no identificada de tiburón (*Carcharhiniformes*). En el sitio LO (La loma) también detectamos al tiburón martillo común.

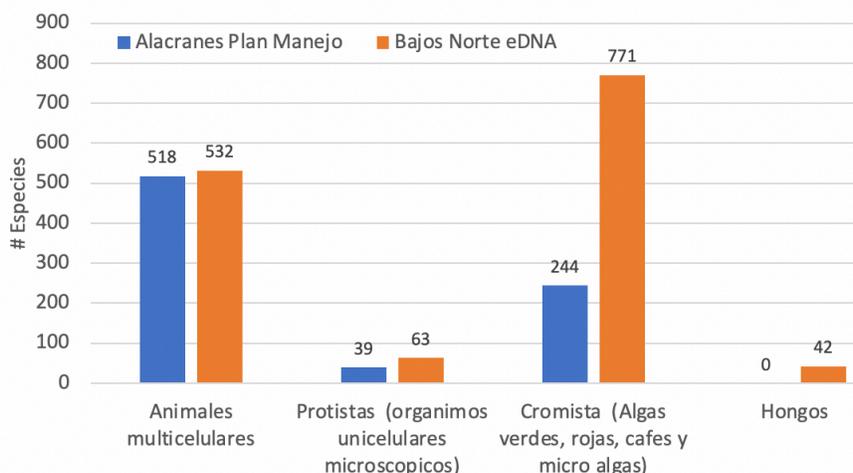
Especies de tiburones encontrados en los sitios de muestreo						
BN1	BN2	PZ	70m	ES	91m	LO
	<i>Carcharhinus brevipinna</i>					
	<i>Sphyrna lewini</i>			<i>Sphyrna lewini</i> <i>Carcharhiniformes</i> <i>sp.</i>		<i>Sphyrna lewini</i>

Comparación de la riqueza entre Bajos del Norte y Arrecife Alacranes

Para poner en contexto los niveles de biodiversidad marina encontrados en Bajos del Norte mediante los análisis de metabarcoding de ADN ambiental, realicé una comparación a distintos niveles taxonómicos de la riqueza de especies reportada en el Plan de Manejo del Parque Nacional Arrecife Alacranes (CONANP, 2006), que es el área protegida mas cercana a Bajos del Norte. 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 comparar los niveles observados en ambas zonas con el fin de evaluar si la riqueza de especies es menor, comparable o mayor en Bajos del Norte (una zona cercana sin ningún nivel de protección) respecto al Arrecife Alacranes (un Parque Nacional establecido hace 28 años en 1994).

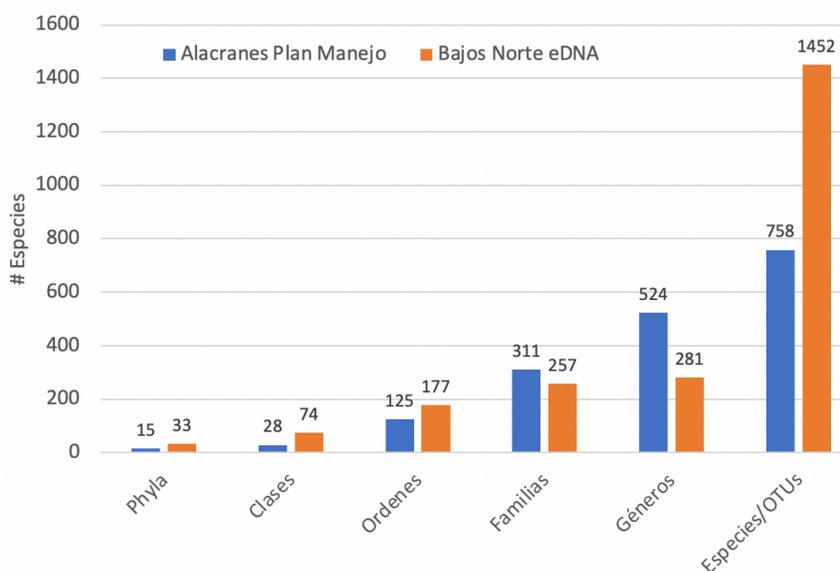
Primero, comparando a nivel de reinos de organismos vivos, encontramos que Bajos del Norte tiene una riqueza ligeramente mas alta de animales multicelulares, protistas y hongos, mientras que el número de algas macro y microscópicas registrados en Alacranes es tan solo un tercio de la riqueza estimada con ADN ambiental para Bajos del Norte.

Comparación de la riqueza de especies a nivel de reinos entre Arrecife Alacranes y Bajos del Norte



Una comparación a nivel de diferentes jerarquías taxonómicas, con base en datos obtenidos en la plataforma datamars para el Parque Nacional Arrecife Alacranes (<https://datamars.org/areas-naturales-protégidas>), muestra que la riqueza encontrada en Bajos del Norte podría ser incluso mayor a Alacranes. Particularmente, Bajos del Norte contiene el doble de phyla y clases taxonómicas comparado a Alacranes, y un número mayor de órdenes y el doble de especies/OTUs reportados. Solo a nivel de familias y géneros la riqueza de Alacranes es mayor que lo encontrado en Bajos del Norte. Sin embargo, este efecto probablemente se debe a que una gran parte de las especies/OTUs encontrados en Bajos del Norte fueron asignados a niveles taxonómicos mayores, mientras que su asignación a niveles menores (e.g. familias y géneros) es mucho menor, debido a la falta de secuencias de especies similares en las bases de datos de ADN.

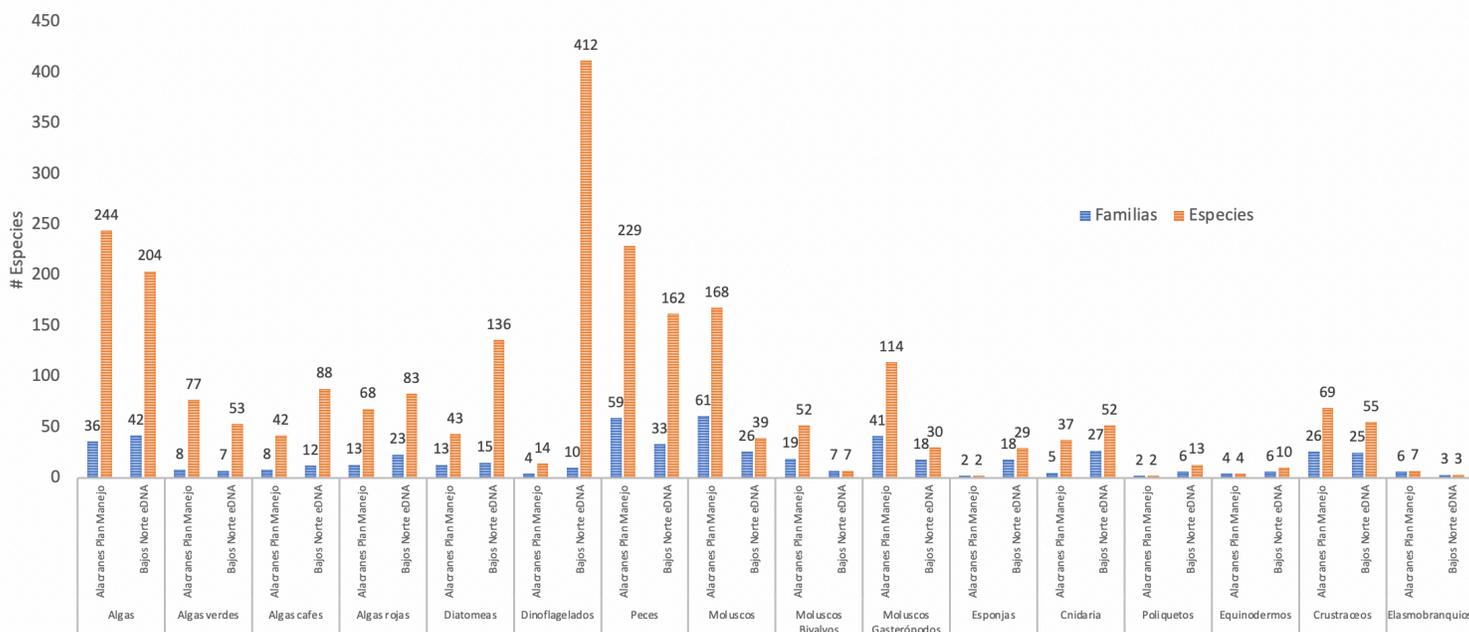
Comparación de la riqueza de especies entre Arrecife Alacranes y Bajos del Norte



Finalmente, realicé una comparación mas fina 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, incluyendo algas, diatomeas, dinoflagelados, peces, moluscos, esponjas, cnidarios, poliquetos, equinodermos, crustaceos y elasmobranquios. El análisis muestra que para algunos grupos bien estudiados en arrecife alacranes, la riqueza de especies reportadas en Alacranes es comparable a lo encontrado en Bajos del Norte (e.g. algas, algas verdes, crustáceos), o mayor en Alacranes (e.g. peces y moluscos, moluscos bivalvos, moluscos gasterópodos). Sin embargo, para varios grupos menos estudiados, la diversidad encontrada en Bajos del Norte es significativamente mayor a lo reportado para Alacranes (e.g. algas cafés, algas rojas, diatomeas, dinoflagelados, esponjas, cnidarios, poliquetos y equinodermos).

Con estas comparaciones, podemos concluir que la riqueza de especies marinas encontradas en Bajos del Norte mediante el análisis del ADN ambiental es similar, o incluso mayor, que la reportada para el Parque Nacional Arrecife Alacranes mediante métodos tradicionales, lo cual es cierto para la mayoría de los grupos taxonómicos analizados. Para un grupo selecto de taxa muy bien estudiados y que tienen un elevado número de especies (peces crípticos, moluscos bivalvos y gasterópodos), es probable que se necesite un esfuerzo de muestreo de ADN ambiental aún mayor en términos de cobertura geográfica y número de muestras, particularmente cerca de los ambientes bentónicos donde habitan estos grupos diversos, para poder caracterizar completamente las comunidades complejas que habitan los arrecifes de Bajos del Norte.

COMPARACION DE DIVERSIDAD ENTRE ARRECIFE ALACRANES Y BAJOS DEL NORTE PARA TAXA SELECTOS



La lista completa de Clases, Ordenes, Familias, Generos y especies/OTUs de peces encontrados puede consultarse en el Anexo 2-Peces.

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