



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

PATRONES DE BIODIVERSIDAD DE ADN AMBIENTAL EN EL  
GOLFO DE CALIFORNIA.

T E S I S

Que para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales  
(Orientación en Biología Marina)

P r e s e n t a

**Camila Mac Loughlin Aleman**

La Paz, Baja California Sur, junio de 2024.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 19 del Mes de Junio del 2024, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Patrones de biodiversidad de ADN ambiental en el Golfo de California"**

Presentada por la alumna: **Camila Mac Loughlin Aleman**

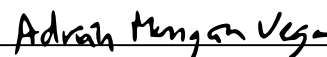
Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN **Biología Marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez  
Co-Director de Tesis



Dr. Adrián Munguía Vega  
Co-Director de Tesis



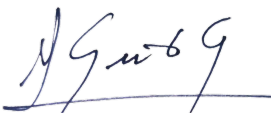
Dr. Héctor Reyes Bonilla  
Co-Tutor



Dr. Leonardo Huato Soberanis  
Co-Tutor



Dr. Andrés Lira Noriega  
Co-Tutor



Dra. Alejandra Nieto Garibay,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos



La Paz, Baja California Sur, a 28 de mayo de 2024.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Camila Mac Loughlin Aleman, del Programa de Doctorado en el Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:  
iThenticate®
- Filtros utilizados:  
Citas y referencias  
bibliográficas  
excluidas, fuentes y  
coincidencias menores  
a 10 palabras excluidas.
- Porcentajes de similitud:  
6%  
Se muestra captura de  
pantalla

Citas excluidas Bibliografía excluida		6%
<b>Resumen de Coincidencias</b>		
1	Internet 556 palabras Copiado el 17-Oct-2022. <a href="http://ciencia.repositorioinstitucional.mx">ciencia.repositorioinstitucional.mx</a>	2%
2	Internet 162 palabras Copiado el 25-May-2023 <a href="https://repositorioinstitucional.mx">repositorioinstitucional.mx</a>	1%
3	Crossref 103 palabras Camila Mac Loughlin, Tania Valdivia-Carrillo, Fausto Valen- Zuela-Quifonez, Hector Reyes-Bonilla et al. "eDNA metab-	<1%
4	Internet 54 palabras <a href="http://hdl.handle.net">hdl.handle.net</a>	<1%
5	Internet 43 palabras Copiado el 25-Sep-2022 <a href="http://repositoriodigital.ipn.mx">repositoriodigital.ipn.mx</a>	<1%
6	Internet 34 palabras Copiado el 21-Jul-2020 <a href="http://www.scribd.org.mx">www.scribd.org.mx</a>	<1%
7	Internet 32 palabras Copiado el 17-Nov-2022 <a href="http://ciencia.repositorioinstitucional.mx">ciencia.repositorioinstitucional.mx</a>	<1%
8	Internet 31 palabras Copiado el 09-Oct-2020 <a href="http://docplayer.es">docplayer.es</a>	<1%

### Firmas del Comité

Dr. Fausto Valenzuela Quifonez  
Co-Director de Tesis

Dr. Héctor Reyes Bonilla  
Co-Tutor

Dr. Adrián Munguía Vega  
Co-Director de Tesis

Dr. Leonardo Huato Soberanis  
Co-Tutor

Dr. Andrés Lira Noriega  
Co-Tutor

## **Conformación de Comités**

### **Comité Tutorial**

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Director de Tesis

Dr. Adrián Munguía Vega  
Universidad de Arizona  
Co-Director de Tesis

Dr. Héctor Reyes Bonilla  
Universidad Autónoma de Baja California Sur  
Co-Tutor de Tesis

Dr. Leonardo Huato Soberanis  
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.  
Co-Tutor de Tesis

Dr. Andrés Lira Noriega  
Instituto de Ecología A.C. - INECOL  
Co-Tutor de Tesis

### **Comité Revisor de Tesis**

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez  
Dr. Adrián Munguía Vega  
Dr. Héctor Reyes Bonilla  
Dr. Leonardo Huato Soberanis  
Dr. Andrés Lira Noriega

### **Jurado de Examen**

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez  
Dr. Adrián Munguía Vega  
Dr. Héctor Reyes Bonilla  
Dr. Leonardo Huato Soberanis  
Dr. Andrés Lira Noriega

### **Suplentes**

Dr. Ricardo Pérez Enríquez  
Dr. David Arturo Paz García

## Resumen

La integración de monitoreos tradicionales de biodiversidad con metabarcoding de ADN ambiental se ha vuelto frecuente por su complementariedad taxonómica. Sin embargo, las comparaciones de métodos tradicionales y novedosos con datos históricos a largo plazo siguen siendo escasas, dificultando poner en perspectiva la contribución de cada uno. Se llevaron a cabo evaluaciones exhaustivas de la biodiversidad en las regiones Norte y Central del Golfo de California utilizando tanto metabarcoding de ADN ambiental, como censos visuales, capturas de peces con uso de anestésico, y un compilado histórico de especies de la región. En primer lugar, se empleó el metabarcoding de ADN ambiental con el metabarcoding 18S para apuntar a grandes grupos de eucariotas: invertebrados, vertebrados, algas, hongos y otros eucariotas. El nuevo compilado de eucariotas incluyó 52 phyla, 160 clases, 577 órdenes, 1,599 familias, 3,525 géneros, y 6,375 especies. Los análisis revelaron una diversidad taxonómica sustancial previamente pasada por alto, con el metabarcoding 18S detectando una gran diversidad de altos rangos taxonómicos dentro de mirco-invertebrados, hongos microscópicos y otros micro-eucariotas. En general, se encontró que cada método de monitoreo presentó diferente sesgo taxonómico, con pocas detecciones de vertebrados con el metabarcoding 18S, censos visuales enfocados a peces y algunos macroinvertebrados dentro de 7 phyla, y registros históricos con una pobre riqueza de hongos y micro-eucariotas. En segundo lugar, se compararon peces crípticos y conspicuos detectados mediante el metabarcoding 12S, censos visuales y capturas con anestésico, cuyos niveles se compararon con aquellos del registro histórico. Mientras que la contribución del ADN ambiental a las 139 especies de peces conspicuos fue equiparable a censos visuales, solo 5 de las 60 especies de peces crípticos detectadas aparecieron en el metabarcoding 12S, destacando el uso de anestésico como el mejor método de detección, bajo las limitantes del presente estudio. A pesar de los desafíos, como las bases de datos de referencia genética incompletas y los sesgos metodológicos detectados, la combinación de métodos expandió significativamente la amplitud taxonómica en comparación con los registros históricos, enfatizando la necesidad de incorporar técnicas novedosas para una comprensión más completa de la biodiversidad regional del Golfo de California. Por último, se identificaron patrones heterogéneos de biodiversidad regional, posiblemente relacionados a sesgos metodológicos y diferencias intrínsecas a los distintos grupos de eucariotas. Los resultados del presente estudio resaltan que la biodiversidad del Golfo de California es mucho mayor de lo que se creía, y que los paradigmas de distribución de la riqueza y composición comunitaria pueden no ser compartidos entre todos los eucariotas.

**Palabras clave:** ADN ambiental, metabarcoding, biodiversidad comunitaria, árbol de la vida, biomonitoreo.

**Orcid ID:** 0000-0002-3156-201X

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez



Dr. Adrián Munguía Vega

## Summary

Integrating traditional biodiversity monitoring with environmental DNA metabarcoding has become common due to their taxonomic complementarity. However, comparisons of traditional and novel methods with long-term historical data remain scarce, hindering the perspective on the contribution of each. Comprehensive biodiversity assessments were conducted in the Northern and Central regions of the Gulf of California using both environmental DNA metabarcoding and traditional methods such as visual censuses, fish captures using anesthetics, and a historical compilation of species in the region. Firstly, environmental DNA metabarcoding with the 18S metabarcode was employed to target major groups of eukaryotes: invertebrates, vertebrates, algae, fungi, and other eukaryotes. The new compilation of eukaryotes included 52 phyla, 160 classes, 577 orders, 1,599 families, 3,525 genera, and 6,375 species. Analyses revealed substantial taxonomic diversity previously overlooked, with environmental DNA metabarcoding detecting a wide diversity of high taxonomic ranks within micro-invertebrates, microscopic fungi, and other micro-eukaryotes. Overall, each monitoring method showed different taxonomic biases, with few vertebrate detections with the 18S metabarcode, visual censuses focused on fish and some macro-invertebrates within 7 phyla, and historical records with poor richness of fungi and micro-eukaryotes. Secondly, cryptic and conspicuous fish detected through the 12S metabarcode, visual censuses, and anesthetic captures were compared, with detections then compared to those of the historical record. While the contribution of environmental DNA to the 139 species of conspicuous fish was comparable to visual censuses, only 5 out of 60 species of cryptic fish detected appeared in the 12S metabarcode, highlighting the use of anesthetics as the best detection method, under the limitations of the present study. Despite challenges such as incomplete genetic reference databases and detected methodological biases, the combination of methods significantly expanded the taxonomic breadth compared to historical records, emphasizing the need to incorporate novel techniques for a more comprehensive understanding of the regional biodiversity of the Gulf of California. Lastly, discrepancies in regional biodiversity patterns were identified, highlighting the influence of methodological biases, intrinsic characteristics of different groups of eukaryotes, both interacting with the dynamic nature of marine ecosystems. The results of this study emphasize that the biodiversity of the Gulf of California is much greater than previously believed, and that paradigms of richness distribution and community composition may not be shared among all eukaryotes."

**Keywords:** eDNA, metabarcoding, community biodiversity, tree of life, biomonitoring

**Orcid ID:** 0000-0002-3156-201X

Vo.Bo. Co-Directores de Tesis



Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez



Dr. Adrián Munguía Vega

## Dedicatoria

A mis papás, Bernardo Mac Loughlin y Florencia Aleman.

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., por aceptarme en el Programa de Estudios de Posgrado, y por el apoyo académico brindado durante el trascurso de estos casi cinco años.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT) por la beca otorgada (CVU/Becario: 780612).

A mis co-directores, Dr. Adrián Munguía Vega y Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez, por su apoyo, enseñanzas y confianza en la realización del proyecto de tesis.

A los miembros de mi comité, Dr. Héctor Reyes Bonilla, Dr. Leonardo Huato Soberanis y Dr. Andrés Lira Noriega, por sus valiosos aportes durante la elaboración de este trabajo.

Al proyecto SEP-CONACYT 2015-01-257524 “PAISAJE GENÓMICO EN EL MEDIO MARINO: PATRONES DE DIVERSIDAD ADAPTATIVA” por el financiamiento recibido para llevar a cabo la tesis.

Al Dr. Jonathan Puritz, de la Universidad de Rhode Island, por su enorme contribución en la etapa de laboratorio y procesamiento bioinformático de secuencias.

A la Dra. Tania Valdivia Carrillo, por brindar su ayuda y apoyo incondicional a lo largo de la totalidad del proyecto.

Al Laboratorio de Genética Aplicada de La Paz del Dr. Munguía Vega, por el espacio de laboratorio brindado.

Al personal de la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del CIBNOR, Dra. Alejandra Nieto Garibay, Adriana Franzoni García, Mtra. Osvelia Ibarra Morales, Tania Verónica Núñez Valdez y al Ing. Horacio Sandoval Gómez por su apoyo y asesoramiento.

A mis tribus paceña y argentina, a mi familia y a mis perros, les agradezco por ser mi sostén.



## Contenido

<b>Resumen</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Contenido</b> .....	v
<b>Lista de figuras</b> .....	vii
<b>Lista de tablas</b> .....	x
<b>Abreviaturas</b> .....	xi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1 Monitoreo de biodiversidad en el medio marino .....	3
2.2 Metabarcoding de ADN ambiental.....	4
2.3 El Golfo de California y su biodiversidad .....	6
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	10
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	11
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	12
5.1 Objetivo general .....	12
5.2 Objetivos particulares.....	12
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	13
6.1 Campañas de monitoreo .....	13
6.1.1 Muestreo de ADN ambiental .....	14
6.1.2 Censos visuales submarinos .....	15
6.1.3 Capturas de peces.....	16
6.2 Trabajo de laboratorio.....	17
6.2.1 Generación de referencias locales para 12S.....	18
6.2.2 Metabarcoding de ADN ambiental .....	19
6.3 Procesamiento de datos por método.....	21
6.3.1 Metabarcoding de ADN ambiental .....	21
6.3.1.1 Referencia local de peces.....	22
6.3.1.2 Compilado de referencias genéticas .....	23
6.3.1.3 Generación de secuencias Fastq a partir de imágenes BCL.....	24
6.3.1.4 Control de calidad y agrupamiento de secuencias .....	25
6.3.1.5 Anotaciones taxonómicas .....	26
6.3.1.6 Filtrado post- anotación .....	27
6.3.2 Censos visuales submarinos .....	28
6.3.3 Capturas de peces.....	30
6.3.4 Registros históricos.....	30
6.4 Curado y clasificación de grupos taxonómicos.....	31
6.4.1 Homogeneización de la taxonomía entre métodos .....	31
6.4.2 Clasificación de grupos de eucariotas y peces.....	32
6.5 Biodiversidad por método y grupo taxonómico.....	33
6.6 Patrones regionales de biodiversidad .....	34
<b>7. RESULTADOS</b> .....	36

7.1 Laboratorio: Generación de referencias locales para 12S .....	36
7.2 Procesamiento de datos por método.....	38
7.2.1 Metabarcoding de ADN ambiental .....	38
7.2.1.1 Compilados de referencias genéticas .....	38
7.2.1.2 Control de calidad y agrupamiento de secuencias de ADN ambiental.....	39
7.2.1.3 Anotaciones taxonómicas y filtros posteriores.....	43
7.2.2 Censos visuales submarinos .....	47
7.2.3 Capturas de peces.....	48
7.2.4 Registros históricos.....	48
7.3 Biodiversidad por método y grupo taxonómico.....	50
7.3.1 Grandes grupos de eucariotas .....	50
7.3.2 Peces crípticos versus conspicuos .....	55
7.4 Patrones regionales de biodiversidad .....	60
7.4.1 Patrones regionales de familias de eucariotas .....	60
7.4.2 Patrones regionales de especies de peces .....	68
<b>8.DISCUSIÓN</b> .....	73
8.1 Biodiversidad por método y grupo taxonómico.....	73
8.2 Patrones regionales de biodiversidad .....	81
<b>9.CONCLUSIONES</b> .....	85
<b>10.LITERATURA CITADA</b> .....	87
<b>11.ANEXOS</b> .....	99
ANEXO A. Parámetros de ANACAPA utilizados. ....	99
ANEXO B. Código genético del metabarcoding del gen 12S de las especies de peces locales del presente estudio.....	102
ANEXO C. Lista de 26 Filos y 15 linajes principales exclusivos de los ADNa18S, agrupados dentro de “Otros NA”.....	105
ANEXO D. Familias de metazoos adicionadas al compilado histórico por ADNa18S dentro de linajes representativos. ....	107
Anexo E.-eDNA metabarcoding warms up a hotspot of marine biodiversity: Revealing underrepresented taxa in visual surveys and historical records from the Gulf of California. ....	110
Anexo F.-Size matters: contrasting regional cryptobenthic and conspicuous fish diversity using 12S eDNA metabarcoding, surveys, captures and historical records. ....	130

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Sitios de monitoreo en el Golfo de California. Distribución de sitios monitoreados mediante metabarcoding de ADN ambiental, censos visuales y capturas de peces con uso de anestésico.....	13
<b>Figura 2.</b> Flujo de trabajo del pipeline ANACAPA. Imagen tomada de (Curd <i>et al.</i> , 2019).....	22
<b>Figura 3.</b> Comparación de especies en referencia local del metabarcode 12S, contra disponibles en GenBank y todos los peces crípticos y conspicuos detectados. ....	36
<b>Figura 4.</b> Árbol de distancia genética en base al metabarcode <i>teleo</i> del gen 12S, entre especies de referencia local de peces del Golfo de California. ....	37
<b>Figura 5.</b> Base de referencias genéticas del metabarcode 18S. Diagrama Krona de diversidad taxonómica, desde grandes grupos hasta clase, incluyendo porcentaje de distribución de referencias al interior de cada clase. ....	38
<b>Figura 6.</b> Base de referencias genéticas del metabarcode <i>teleo</i> del gen 12S. Diagrama Krona de diversidad taxonómica, de phylum a familia, incluyendo porcentaje de distribución de referencias dentro de familias. ....	39
<b>Figura 7.</b> Monitoreo vía ADNa18S, censos visuales y datos históricos de eucariotas del Golfo de California. Las regiones biogeográficas señaladas con líneas punteadas fueron tomadas de (Brusca <i>et al.</i> , 2005). Consulte la Tabla 1 para nombres y características de los sitios.....	41
<b>Figura 8.</b> Monitoreo de peces crípticos y conspicuos mediante ADNa12S, censos visuales, capturas y datos históricos. Las regiones biogeográficas señaladas con líneas punteadas fueron tomadas de (Brusca <i>et al.</i> , 2005).....	43
<b>Figura 9.</b> Resolución taxonómica de ADNa18S. Número de ASVs anotados a cada rango taxonómico (de phylum a especie) para (a) el conjunto de eucariotas, (b) algas, (c) otros eucariotas, (d) invertebrados, (e) hongos y (f) vertebrados.....	44
<b>Figura 10.</b> Resolución taxonómica de ADNa12S. Número de ASVs anotados a cada rango taxonómico (de phylum a especie) para (a) peces crípticos y (b) peces conspicuos.....	47
<b>Figura 11.</b> Mapeo de ocurrencias históricas a sitios monitoreados. Mapa de ocurrencias históricas individuales georreferenciadas, clasificadas de acuerdo con un umbral de ~11 km y ~55 km de los sitios de monitoreo de ADNa18S. ....	49
<b>Figura 12.</b> Inclusión de de ocurrencias históricas de acuerdo con distancia de ADNa18S. Diagrama de Venn mostrando coincidencias taxonómicas, de phylum a especie, entre ADNa18S y el criterio angosto (~11 km) y amplio (~55 km) de clasificación de ocurrencias históricas.....	50
<b>Figura 13.</b> Riqueza taxonómica de eucariotas de las regiones Norte y Central del Golfo de California. Diagrama de barras apiladas con número de taxa, de phylum a especie, recuperados por método (ADNa18S, censos visuales y datos históricos) y por grupo de eucariotas (invertebrados, vertebrados, algas, hongos y otros eucariotas). ....	51
<b>Figura 14.</b> Contribución por método a la diversidad taxonómica de eucariotas del Centro y Norte del Golfo de California. Diagrama Venn de riqueza taxonómica, de phylum a especie, comparando ADNa18S, censos visuales y datos históricos.....	53

- Figura 15.** Contribución taxonómica exclusiva de ADNa18S. Diagrama de barras con número de taxa (eje y principal, izquierda) aportados por el ADNa18S al compilado histórico, de phylum a especie, para cada grupo de eucariotas. La línea sólida indica el porcentaje de taxa históricos con referencia genética disponible. La línea punteada gruesa muestra el porcentaje de ASVs anotados taxonómicamente para cada rango, y la línea punteada fina muestra el porcentaje de incremento al nivel histórico de riqueza (eje % secundario, derecha)..... 54
- Figura 16.** Composición de familias de algas rojas e invertebrados selectos. Diagrama de Venn de familias de (a) Rhodophyta, (b) Arthropoda, (c) Mollusca y (d) Echinodermata. Todas las familias excepto las exclusivamente históricas se muestran en la figura. .... 55
- Figura 17.** Riqueza taxonómica de peces crípticos y conspicuos del Norte y Centro del Golfo de California. Diagrama de barras apiladas de número de familias, géneros y especies recuperadas a partir del ADNa12S, censos visuales y capturas, mediante métodos combinados e individuales, y valores de registros históricos de cada grupo de peces. .... 56
- Figura 18.** Contribución taxonómica por método a (a) peces crípticos y (b) conspicuos. Diagramas de Venn comparando composición de familias, géneros y especies detectadas vía ADNa12S, censos visuales y capturas. Los taxa crípticos detectados se incluyen en la figura..... 57
- Figura 19.** Detecciones de ADNa12S señaladas sobre diagrama de frecuencia-ocurrencia de especies de peces crípticos capturados. Las especies detectadas por ADNa12S se denotan sobre la figura, con la adición de *Acanthemblemaria crockeri*, especie congénérica, frecuente y abundante, de la especie rara detectada *A. macrospilus*. .... 58
- Figura 20.** Diversidad taxonómica de (a) peces crípticos y (b) conspicuos según detecciones y registros históricos. Diagrama de Venn comparando familias, géneros y especies detectadas (vía ADNa12S, censos visuales y capturas combinadas) contra registros históricos. Para peces crípticos, todas las familias y las especies detectadas se mencionan en la figura (para especies conspicuas agregadas al compilado histórico, ver Tabla 7). .... 59
- Figura 21.** Estructura meta-comunitaria de familias de eucariotas por región. Diagramas nMDS y estadísticos de ANOSIM basados en la matriz de distancia de Jaccard de composición taxonómica entre regiones norte (azul) y centro (rojo) del Golfo de California para (a) métodos combinados, (b) ADNa18S, (c) censos visuales, y (d) registros históricos. Las elipses representan desviación estándar de puntos, y los números se corresponden con la Fig. 7. .... 61
- Figura 22.** Estructura meta-comunitaria a nivel familia para cada combinación método-grupo entre el Norte y Centro del Golfo de California. Diagramas de nMDS (Jaccard) y estadísticos ANOSIM para toda métodos combinados e independientes (ADNa18S, censos visuales y datos históricos), y grupo de eucariotas (invertebrados, vertebrados, algas, hongos y otros eucariotas), separando norte (azul) y centro (rojo) del golfo. Las elipses representan la desviación estándar de los puntos y los números de sitios se corresponden con la Fig. 7. .... 64
- Figura 23.** Distribución geográfica de diversidad taxonómica de familias de eucariotas para el Norte (azul) y Centro (rojo) del Golfo de California. Número de familias por sitio de acuerdo con cinco categorías cuantiles de tamaño, y diagrama de cajas (min-Q1-median-Q3-max) por región

para: (a, e) métodos combinados, e individualmente para: (b, f) ADN <sub>a</sub> 18S; (c, g) censos visuales; (d, h) datos históricos. Las letras del diagrama de cajas indican el resultado de la prueba Kruskal-Wallis de diferencias entre regiones dentro de cada método.....	66
<b>Figura 24.</b> Curvas de acumulación de familias para ADN <sub>a</sub> 18S, censos visuales y datos históricos para (a) todos los sitios, (b) región Norte y (c) región Central del Golfo de California. ....	67
<b>Figura 25.</b> Diversidad beta detectada e histórica de peces crípticos y conspicuos entre regiones Norte y Central del Golfo de California. Gráficos de nMDS de peces crípticos detectados (a) e históricos (c), así como peces conspicuos detectados (b) e históricos (d), y estadísticas de pruebas PERMANOVA o ANOSIM basadas en la distancia de Jaccard de la composición de especies entre las regiones Norte (azul) y Central (rojo). Las elipses representan la desviación estándar de los puntos y los números de sitios se corresponden con la Fig. 8.....	68
<b>Figura 26.</b> Prueba de Mantel de correlación entre distancia geográfica y diferenciación comunitaria (Jaccard) de peces crípticos y conspicuos, detectados e históricos, en el Golfo de California. La línea recta indica la regresión modelada entre las matrices de distancia, y la línea suavizada en rojo sigue la dispersión de los datos sin procesar. Se indican el estadístico R de Mantel y el p-valor. ....	69
<b>Figura 27.</b> Variación detectada e histórica en la riqueza de especies para peces crípticos y conspicuos del Golfo de California Norte y Central. Número de especies por sitio mapeado en una escala continua de colores, y diagrama de cajas de distribución regional (mínimo-Q1-mediana-Q3-máximo) para peces crípticos detectados (a,c) e históricos (e,g), y conspicuos detectados (b,d) e históricos (f,h).....	71
<b>Figura 28.</b> Curvas de acumulación de especies, detectadas e históricas, de peces crípticos y conspicuos en el Golfo Norte y Central de California. Los valores de extrapolación se graficaron hasta duplicar el tamaño de la muestra en cada caso. El área sombreada muestra los intervalos de confianza del 95%.....	72

## Lista de tablas

<b>Tabla 1.</b> Sitios de colecta de ADN ambiental. Características de sitios, incluyendo código y nombre del sitio, coordenadas geográficas, profundidad (z), temperatura, fecha y región del golfo a la que pertenece cada sitio. ....	15
<b>Tabla 2.</b> Sitios de capturas. Características de sitios de captura de peces, incluyendo nombre del sitio, coordenadas geográficas, profundidad (z), fecha, número de cuadrantes (n cuad.) y región del golfo a la que pertenece cada sitio. ....	17
Tabla 3. Especies incluidas en la elaboración de referencias locales. ....	19
<b>Tabla 4.</b> Filtrado de datos de ADNa18S, censos visuales y datos históricos de eucariotas del Golfo de California. La columna de filtros indica los pasos de procesamiento o elementos removidos. Se reporta el número de secuencias y ASVs u ocurrencias retenidos junto al porcentaje con respecto al valor inicial. ....	40
<b>Tabla 5.</b> Filtro de datos de ADNa12S, censos visuales, capturas y datos históricos de peces del Golfo de California. La columna de filtros indica los pasos de procesamiento o elementos removidos de secuencias y ASVs u ocurrencias, junto al porcentaje con respecto al valor inicial. ....	42
<b>Tabla 6.</b> Comunidad <i>mock</i> . Diversidad taxonómica de taxa esperados en la comunidad <i>mock</i> , señalando en color verde el nivel taxonómico al cual fueron identificados mediante metabarcoding de 18S. ....	46
<b>Tabla 7.</b> Especies conspicuas detectadas que no se encontraron en el compilado histórico. ....	60
<b>Tabla 8.</b> Riqueza de familias de eucariotas, invertebrados y vertebrados por sitio. Número de familias detectadas mediante métodos combinados (com), ADNa18S (ADN), censos visuales (vis) y datos históricos (hist) por sitio (ID) y región (R; N por Norte y C por Central). Metadata de sitios disponible en Tabla 1. ....	62
<b>Tabla 9.</b> Riqueza de familias de algas, hongos y otros eucariotas por sitio. Número de familias detectadas mediante métodos combinados (com), ADNa18S (ADN) y datos históricos (hist) por sitio (ID) y región (R; N por Norte y C por Central). Metadata de sitios en Tabla 1. ....	63
<b>Tabla 10.</b> Prueba de Kruskal-Wallis comparando la riqueza regional de familias entre cada método individual, y la base de de métodos combinados (p-valores ajustados con el método de Holm).65	
<b>Tabla 11.</b> Valores de riqueza de especies de peces crípticos y conspicuos, detectados e históricos. Número de especies por sitio considerando las detecciones de métodos combinados (ADNa12S, censos visuales y capturas) y registros históricos. Metadata de sitios en Tabla 1. ....	70

**Abreviaturas**

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
pb	Pares de bases
COI	citocromo oxidasa 1
PCR	reacción en cadena de polimerasa
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
ENA	Archivo Nucleotídico Europeo
ADNa18S	metabarcoding de ADN ambiental 18S
ADNa12S	metabarcoding de ADN ambiental 12S
PLO	Puerto Lobos
PLI	Puerto Libertad
SLG	San Luis Gonzaga
AGU1	Ángel de la Guarda1
AGU2	Ángel de la Guarda2
PAT	Patos
TIB	Tiburón
EST	San Esteban
LOR	San Lorenzo
SFN	San Francisquito N.
SPM	San Pedro Mártir
SPN	San Pedro Nolasco
TOR	Isla Tortuga
MAR	San Marcos
IDE	San Idelfonso
PUL	Punta Pulpito
COR	Coronado
CAR	Carmen
DAN	Isla Danzante
MON	Monserrat
CAT	Catalana
BSN	Bajo Seco Norte
MAT	San Mateo
CRU	Santa Cruz
DIE	San Diego
ANI	Las Animas
BSS	Bajo Seco Sur
POR	El Portugués

## 1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad marina es un componente crucial del planeta, albergando entre el 15% y el 35% de todas las especies conocidas, además de constituir el 78% de la biomasa animal global (Mora *et al.*, 2011; Grosberg *et al.*, 2012; Bar-On *et al.*, 2018). Sin embargo, los océanos reciben menos del 10% de los recursos para conservación a nivel mundial, lo que resulta en un desequilibrio en la atención hacia la biodiversidad marina en comparación con los ecosistemas terrestres (Caldwell *et al.*, 2024). Los cambios en los océanos, como el aumento de temperatura y otras alteraciones biogeoquímicas, están provocando cambios en la distribución de especies y hábitats marinos, lo que a su vez puede alterar las interacciones ecológicas y la estructura de los ecosistemas marinos (Pörtner *et al.*, 2019; Lenoir *et al.*, 2020; Pinsky *et al.*, 2020).

Para mejorar el entendimiento y mitigar afectaciones por estos cambios, es fundamental mejorar los inventarios taxonómicos y considerar grupos históricamente menos estudiados de la biodiversidad marina, como la micro-biota, fauna críptica y hábitats de difícil acceso (Pawlowski *et al.*, 2018; Seymour *et al.*, 2020; Caldwell *et al.*, 2024). Además, es esencial describir los patrones geográficos de biodiversidad a distintas escalas y niveles de organización biológica, para establecer nuevas líneas base y comprender cómo las condiciones del ambiente y la retroalimentación de procesos que ocurren al interior de las comunidades moldean los patrones regionales de biodiversidad (Blowes *et al.*, 2019; Manel *et al.*, 2020). Las técnicas convencionales de monitoreo de biodiversidad en el medio marino, como artes de pesca o censos visuales submarinos, se caracterizan por tener elevados costos y una capacidad de resolución espacio-temporal y taxonómica limitada.

En este contexto, el metabarcoding de ADN ambiental ha surgido como una herramienta prometedora para el monitoreo de la biodiversidad. Esta técnica, que analiza el ADN presente en muestras ambientales, permite detectar una amplia gama de organismos de manera no invasiva y con un alto poder de resolución taxonómica (Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2021; Takahashi *et al.*, 2023). Sin embargo, la eficacia del metabarcoding de ADN ambiental para capturar la diversidad en el medio marino aún no está completamente comprendida y los protocolos para su uso son cada vez más diversos, lo que dificulta su implementación. Su eficacia puede verse limitada por diversos factores, como la disponibilidad de secuencias de referencia genética y la resolución



taxonómica de los diversos marcadores moleculares (Collins *et al.*, 2019; Gómez-Buckley *et al.*, 2023).

El Golfo de California, con su rica biodiversidad y características geográficas únicas, proporciona un escenario ideal para investigar la eficacia del metabarcoding de ADN ambiental en la detección de biodiversidad de diferentes grupos taxonómicos. Este mar interior del Pacífico Oriental alberga una gran cantidad de especies endémicas y es considerado un *hotspot* de biodiversidad (Roberts *et al.*, 2002). La distribución y abundancia de los distintos hábitats, las condiciones oceanográficas y la marcada heterogeneidad ambiental influyen sobre la diversidad y estructura meta-comunitaria de diferentes grupos de organismos (Ulate *et al.*, 2016; Galland *et al.*, 2017; Olivier *et al.*, 2018). El estudio de la biodiversidad del golfo tiene una larga historia, de más de 150 años (Brusca *et al.*, 2005), y ha devenido en amplio conocimiento, principalmente de peces (Hastings *et al.*, 2010; Galland *et al.*, 2017; Olivier *et al.*, 2018), macro-invertebrados bentónicos (Brusca y Hendrickx, 2010; Ulate *et al.*, 2016), y componentes del plancton como huevos y larvas de peces (Peguero-Icaza *et al.*, 2008; Sánchez-Velasco *et al.*, 2017; Ahern *et al.*, 2018). En un compilado reciente, se han identificado más de 12,000 especies incluyendo vertebrados e invertebrados, algas y otros microorganismos (Morzaria-Luna *et al.*, 2018), cuya distribución ha servido para mapear la distribución de la riqueza a nivel regional (Munguia-Vega *et al.*, 2018a).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la diversidad y estructura meta-comunitaria a escala regional de grandes grupos de eucariotas, usando una combinación de metabarcoding de ADN ambiental, censos visuales submarinos, capturas de peces con uso de anestésico y el compilado histórico georreferenciado del Golfo de California. La técnica de metabarcoding de ADN ambiental se aplicó para dos marcadores moleculares de diferente tasa mutacional, cuya resolución taxonómica aborda al conjunto de eucariotas sin entrar a gran detalle (metabarcode 18S), y a los vertebrados con mejor discriminación a nivel de especie (metabarcode 12S). Los eucariotas fueron clasificados en 5 grandes grupos: vertebrados, invertebrados, algas, hongos y otros eucariotas, mientras que los peces fueron clasificados en crípticos y conspicuos. De este modo, se pudo discriminar las diferentes contribuciones taxonómicas de métodos tradicionales, en comparación con los aportes novedosos del metabarcoding de ADN ambiental, y mapear los patrones de biodiversidad emergentes.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Monitoreo de biodiversidad en el medio marino

La biodiversidad se puede entender como tres componentes anidados, al interior de las especies o diversidad genética, diversidad de especies, y diversidad de ecosistemas (Convention on Biological Diversity, 1992). Monitorear la diversidad comunitaria presenta un reto especialmente complejo en el medio marino, ocupando 99% del volumen de hábitats del planeta e incluyendo un estimado de 15-35% de las especies, lo que engloba 78% de la biomasa animal del mundo (Mora *et al.*, 2011; Grosberg *et al.*, 2012; Bar-On *et al.*, 2018). La vida en el mar es 3 veces más antigua que la vida en la superficie, con una historia evolutiva riquísima, incluyendo el doble de phyla que el ambiente terrestre con 15 phyla exclusivamente marinos. Sin embargo, un meta-análisis reciente identificando tendencias globales en conservación de diversidad, encontró que los océanos reciben menos del 10% de los recursos para conservación a nivel mundial, con un sesgo histórico hacia animales y ecosistemas terrestres, considerando miles de artículos científicos de las últimas cuatro décadas (Caldwell *et al.*, 2024).

Estudios recientes evidencian cambios en rangos de distribución de especies y hábitats debidos al calentamiento de los océanos y otras alteraciones biogeoquímicas que afectan el medio marino (Lenoir *et al.*, 2020; Pinsky *et al.*, 2020). Estos re-arreglos pueden desencadenar nuevas interacciones ecológicas, con el potencial de producir alteraciones en la estructura de ecosistemas y los servicios que proveen (Pörtner *et al.*, 2019). Para poder identificar y comprender los desencadenantes de re-estructuración de comunidades, y sus consecuencias sobre la salud de los ecosistemas, es importante mejorar los inventarios taxonómicos más allá de grupos históricamente reconocidos, a lo largo del árbol de la vida (Pawlowski *et al.*, 2018; Seymour *et al.*, 2020).

Las comunidades marinas son tradicionalmente evaluadas a partir de distintos métodos, de acuerdo con el grupo taxonómico objetivo. Los métodos de monitoreo pueden ser invasivos, como capturas utilizando trampas, redes, líneas de pesca, etc.; y no invasivos, como censos visuales realizados por buzos calificados, grabaciones de video y métodos acústicos. Las técnicas tradicionales de monitoreo enfocadas a captura u observación de macrofauna, raramente

incorporan el componente microscópico, poco abundante o críptico de los ambientes marinos, llevando a sesgos históricos en la representación de estos grupos en inventarios de biodiversidad marinos (Keck *et al.*, 2022; Caldwell *et al.*, 2024). Un caso ejemplar es el componente criptobéntico de peces arrecifales, ya que su pequeño tamaño y naturaleza críptica dificultan su identificación. Los estudios de diversidad de peces crípticos suelen involucrar muestreos invasivos con uso de anestésicos para capturar a los individuos (Ackerman y Bellwood, 2000; González-Cabello y Bellwood, 2009). La asignación taxonómica también es comparativamente compleja en comparación con los peces conspicuos (no crípticos) ya que la diversidad filogenética de este grupo incluye a las familias más diversas de peces, como los góbidos y blénidos, por lo que la literatura para la asignación taxonómica es limitada, quizás no proviene de la región geográfica de interés y/o ha sido comparativamente poco validada.

## **2.2 Metabarcoding de ADN ambiental**

La técnica de metabarcoding de ADN ambiental ha visto un incremento exponencial en sus aplicaciones en la última década, demostrando ser no invasiva, complementaria a los métodos tradicionales de monitoreo, y contar con un poder comparable o mayor a los métodos clásicos en estudios de biodiversidad (Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2021; Keck *et al.*, 2022; Takahashi *et al.*, 2023). Se entiende como ADN ambiental al material genético presente en muestras tomadas del ambiente, como agua, aire o sedimento. Su origen puede ser células de la piel, de mucosas, saliva, esperma, huevos, heces, sangre, organismos en descomposición y microorganismos completos (Taberlet *et al.*, 2012). El ADN ambiental se procesa en laboratorio con la técnica de *metabarcoding*, en la que se identifica y amplifica una secuencia genética (conocida como marcador molecular, metabarcoding o amplicón) que posee cierto grado de discriminación taxonómica, generalmente dentro de genes altamente conservados. Gracias al desarrollo en secuenciación de alta resolución, millones de secuencias amplificadas en distintos ambientes pueden ser indexadas mediante la adición de adaptadores (secuencias de ADN conocida de 4-8 pares de bases, “pb”) y multiplexadas (combinadas) para su secuenciación conjunta, permitiendo así la caracterización indirecta de comunidades a partir de su “huella genética” en el ambiente.

La selección del marcador molecular tiene una gran influencia en la diversidad recuperada, debido principalmente a factores como la tasa mutacional, que incide en el balance entre amplitud

taxonómica (el tamaño del grupo objetivo, por ej. eucariotas, corales o peces) y resolución taxonómica (el nivel de detalle al que se pueden identificar las secuencias recuperadas, por ej. orden, género o especie). Otro factor determinante es la eficiencia de amplificación dentro del grupo taxonómico objetivo, debido a diferencias en la afinidad entre cebador y secuencia objetivo al momento de realizar la amplificación, lo que resulta en una proporción desigual del producto de amplificación con respecto a la proporción inicial de taxa en la muestra (Collins *et al.*, 2019; Casey *et al.*, 2021).

Por ejemplo, el gen ribosomal 16S presente en la mitocondria es comúnmente usado en descripción de procariontes, invertebrados y peces (Djurhuus *et al.*, 2020; Holman *et al.*, 2021); el gen ribosomal 18S, de tasa mutacional menor y presente en numerosas copias en el genoma nuclear, puede detectar diversidad de eucariotas, con un compromiso de resolución a nivel especie (Guardiola *et al.*, 2015; Wangensteen *et al.*, 2018); el gen mitocondrial citocromo oxidasa 1 (COI) posee una rápida tasa mutacional y ha sido ampliamente utilizado para numerosos grupos taxonómicos por su alta resolución, aunque posee elevados niveles de detección de taxa no-objetivo (Collins *et al.*, 2019; Gómez-Buckley *et al.*, 2023); el gen ribosomal 12S presente en la mitocondria ha sido ampliamente usado para peces por su resolución y especificidad (Valentini *et al.*, 2016; Sawaya *et al.*, 2019; Miya *et al.*, 2020).

La ventaja de conocer el compromiso entre la amplitud taxonómica y nivel de resolución de cada marcador molecular confiere al ADN ambiental la versatilidad de abordar la biodiversidad desde múltiples niveles jerárquicos, ya que existen regiones del genoma que permiten discriminar el nivel de diversidad entre poblaciones al interior de una especie (Sigsgaard *et al.*, 2017), hasta diversidad de grandes linajes evolutivos (Bakker *et al.*, 2019). Esto facilita abordar distintas problemáticas de manejo y conservación, que van desde evaluar la salud de una especie mediante marcadores específicos, a procesos ecosistémicos en los que quizás la identificación de especies es menos relevante en contraste con la identificación de grandes grupos funcionales o niveles tróficos (Zhang *et al.*, 2020).

El poder de detección de cada marcador también se ve fuertemente condicionado por la abundancia y calidad de referencias que se pueden extraer de repositorios públicos como GenBank (Pruitt *et al.*, 2005), a partir de los cuales se realiza la asociación entre secuencia y

especie, o ancestro común más cercano (Deiner *et al.*, 2017a; Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2021). La cobertura taxonómica y geográfica de la biodiversidad en repositorios públicos es una de las principales limitantes de la técnica (Schroeter *et al.*, 2019; Bucklin *et al.*, 2021; Questel *et al.*, 2021), por lo que numerosos trabajos generan en paralelo sus propias bases de referencia locales para mejorar el poder de asignación taxonómica de las secuencias recuperadas (Wangenstein *et al.*, 2018; Cilleros *et al.*, 2019; Saenz-Agudelo *et al.*, 2021).

En el mundo, las aplicaciones del metabarcoding de ADN ambiental abarcan un amplio espectro espacio-temporal, desde estudios que abordan la riqueza global de peces (Jerde *et al.*, 2019), a planes nacionales de monitoreo de ecosistemas acuáticos (Pawlowski *et al.*, 2020), a estudios a escala regional (Sevellec *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020), y a escala local (Stat *et al.*, 2017). Numerosos ejemplos y recientes meta-análisis revelan el potencial del metabarcoding de ADN ambiental como complemento a los monitoreos tradicionales, por su capacidad de abordar grupos taxonómicos no detectados, y por recuperar patrones de biodiversidad congruentes con métodos tradicionales (Keck *et al.*, 2022). Sin embargo, como toda disciplina emergente, requiere de tiempo y aplicación en estudios empíricos y teóricos para poder ser utilizado como un método estándar de monitoreo de biodiversidad (Alberdi *et al.*, 2018; Calderón-Sanou *et al.*, 2019; Kelly *et al.*, 2019).

### **2.3 El Golfo de California y su biodiversidad**

El Golfo de California es el único mar interior del Pacífico Oriental, posee aproximadamente 80 Islas y más de 800 Islotes, y ha sido catalogado como *hotspot* de biodiversidad a nivel mundial por sus niveles de riqueza y endemismo (Roberts *et al.*, 2002). Sus características geográficas y la diversidad de ecosistemas que alberga ofrecen numerosos servicios ecosistémicos, incluyendo aproximadamente la mitad de las pesquerías comerciales de México, y un medio de vida para muchas personas que habitan sus costas a través de la pesca artesanal y deportiva, y el turismo (Lluch-Cota *et al.*, 2007).

El monitoreo continuo de biodiversidad en el conjunto de ecosistemas que componen el Golfo de California presenta un reto logísticamente complejo. De acuerdo con una compilación histórica realizada a partir de repositorios públicos de biodiversidad y múltiples campañas de monitoreo,

se han identificado más de 12,000 especies, incluyendo algas, peces, mamíferos marinos, invertebrados y múltiples eucariotas unicelulares (Morzaria-Luna *et al.*, 2018). De acuerdo con la literatura tradicional, la composición de la macrofauna del Golfo de California incluye 4,854 especies de macroinvertebrados y 1,115 vertebrados identificados (Brusca *et al.*, 2005). Entre los vertebrados se distinguen 801 peces teleósteos y 87 elasmobranquios, con un nivel de endemismo que ronda el 10% (Brusca *et al.*, 2005). El componente de peces arrecifales que habitan ambientes coralinos y rocosos incluye 361 especies (Robertson y Allen, 2015), de las cuales 104 son especies catalogadas como criptobénticas o crípticas, y aquí el grado de endemismo ronda el 40% (Galland *et al.*, 2017).

Ciertos grupos taxonómicos, como peces (González-Cabello y Bellwood, 2009; Olivier *et al.*, 2018) y macroinvertebrados (Ulate *et al.*, 2016), han sido históricamente favorecidos en el Golfo de California por sobre otros grupos taxonómicos de menor tamaño o relaciones más indirectas con el ser humano. Las características físicas y estructuración de comunidades de peces e invertebrados consistentemente dividen al Golfo de California en tres regiones biogeográficas: norte, centro y sur (Fig. 1) (Walker, 1960; Thomson *et al.*, 2000; Brusca *et al.*, 2005).

En el Golfo Norte se pueden describir dos biomas. El Alto Golfo parte desde la desembocadura del río Colorado, allí predomina una baja profundidad y elevados niveles de sedimentos en agua por la acción de fuertes corrientes causadas por los rangos extremos de mareas. Más al sur, pero aún en el Golfo Norte, se ubica la “zona de las grandes Islas” de mayor profundidad y predominancia de arrecifes rocosos con numerosos bosques de macroalgas. Al sur de las grandes Islas se da la transición al Golfo Central, en donde las cuencas tienen mayor tamaño y profundidad. Allí se distinguen en mayor medida la costa peninsular con numerosos arrecifes rocosos y pocos afluentes desde la península, de las costas lodosas y arenosas, con múltiples afluentes desde el continente. El Centro y Sur del Golfo se separan en la punta sur de la Bahía de La Paz del lado peninsular y a la altura de Guaymas en la costa continental. La región sur se caracteriza por la presencia de manglares y arrecifes coralinos además de costas rocosas y arenosas del lado peninsular, y playas arenosas, estuarios y lagunas costeras del lado continental (Lluch-Cota *et al.*, 2007; Munguia-Vega *et al.*, 2018a).

El paradigma de distribución espacial de la riqueza entre regiones del golfo denota una mayor riqueza en el Golfo Central, con niveles que disminuyen hacia norte y sur (Ulate *et al.*, 2016; Galland *et al.*, 2017; Fernández-Rivera Melo *et al.*, 2018; Munguia-Vega *et al.*, 2018a). Por ejemplo, las comunidades de peces en el Golfo de California son principalmente tropicales, con un 87% de las especies también encontradas fuera del golfo hacia el sur, pero también alberga un 31% de especies de afinidad templada, encontradas también en la costa del Pacífico Norte (Brusca *et al.*, 2005), incluyendo varias poblaciones disyuntas, que están limitadas por temperaturas más cálidas en el Golfo Central y Sur (Bernardi *et al.*, 2003). Así, la diversidad de especies alcanza su punto máximo en el Golfo Central, donde coinciden las regiones faunísticas tropicales Panámicas y templadas del noreste del Océano Pacífico (Brusca *et al.*, 2005; Munguia-Vega *et al.*, 2018a).

El primer estudio de metabarcoding de ADN ambiental en el Golfo de California (Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021), compara la cobertura taxonómica y patrones espaciales de biodiversidad con censos visuales submarinos de peces teleósteos. Los resultados destacan la complementariedad de técnicas, duplicando el poder de detección de especies de peces mediante métodos combinados. El patrón espacial de variación de la biodiversidad a escala regional también fue similar entre métodos, recuperándose el pico de riqueza del Golfo Central y la diferenciación entre Golfo Central y Norte (Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021).

El presente estudio consistió en una extensión del trabajo mencionado, en el que se investigó el poder de resolución taxonómica del metabarcoding de ADN ambiental, enfocándose en la detección de grandes grupos de eucariotas mediante el metabarcoding de 18S, y la detección de peces crípticos mediante el metabarcoding de 12S. Estos grupos taxonómicos fueron seleccionados por que distinguen grupos mejor estudiados, como peces e invertebrados, de algas, hongos y otros eucariotas unicelulares, en donde aún mucha diversidad queda por describir.

El caso de peces crípticos es un ejemplo a mayor detalle, ya que son comúnmente el componente oculto de peces arrecifales. Los peces crípticos representan aproximadamente el 50% de los individuos y el 40% de las especies de arrecifes de coral (Goatley *et al.*, 2016; Brandl *et al.*, 2018). Este grupo de peces proviene principalmente de 17 familias que poseen entre el 10% (Syngnathidae) y el 90% (Tripterygiidae) de especies caracterizadas por sus pequeños tamaños

corporales (longitud de hasta 50 mm), mostrando morfología y/o comportamiento críptico (Brandl *et al.*, 2018). Tales características los excluyen de la mayoría de las campañas de monitoreo tradicionales basadas en la identificación visual morfológica (Ackerman y Bellwood, 2000; Depczynski *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha propuesto que este grupo de peces pequeños desempeña un papel clave en las redes tróficas al transferir nutrientes hacia organismos de mayor tamaño (Brandl *et al.*, 2018; Goatley *et al.*, 2020). Además, los peces crípticos han sido denominados "especialistas de microhábitat" (Depczynski y Bellwood, 2004) debido a poseer mayor especificidad de nicho, y poseen otros rasgos ecológicos que los distinguen de los peces conspicuos, incluyendo alta fidelidad al sitio, altas densidades poblacionales, rápido recambio generacional y tasas de especiación, y una naturaleza cuasi-sésil luego del asentamiento de larvas móviles (González-Cabello y Bellwood, 2009; Goatley *et al.*, 2016; Brandl *et al.*, 2018).

Hasta ahora, la mejor manera de estudiar los peces crípticos ha sido mediante estaciones anestésicas u otras herramientas invasivas, con la extracción y la ardua identificación taxonómica actuando como factores limitantes (Ackerman y Bellwood, 2000). En la última década, el metabarcoding de ADN ambiental ha ganado mucha atención como una herramienta de monitoreo no invasiva capaz de detectar la biodiversidad rara y críptica (Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2021; Miya, 2022; Takahashi *et al.*, 2023). A pesar de la afirmación frecuente encontrada en estudios de metabarcoding de ADN ambiental sobre la inclusión de fauna críptica y rara en inventarios taxonómicos, la eficacia del metabarcoding de ADN ambiental para capturar simultáneamente los componentes críptico y conspicuo de la diversidad de peces permanece poco clara. Solo se ha encontrado un artículo recientemente publicado (Gómez-Buckley *et al.*, 2023) que compara estaciones anestésicas y metabarcoding de ADN ambiental para describir la composición comunitaria de peces crípticos en Tonga (Océano Pacífico Occidental), encontrando en sus muestras de ADN ambiental solo cuatro de las 33 especies de peces crípticos capturadas con anestesia. Los autores sugieren que las principales causas del bajo rendimiento del ADN ambiental fueron la baja abundancia de ADN críptico en sus muestras, en parte explicada por la alta tasa de amplificaciones de metazoos no objetivo asociados con la elección del metabarcoding COI (Collins *et al.*, 2019), así como la falta de secuencias de referencia genética en repositorios públicos (Mugnai *et al.*, 2021), como se ha descrito en la sección previa.



### 3. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los esfuerzos acumulados hasta la fecha, muchos aspectos de la biodiversidad de los océanos aún no se comprenden. No es posible monitorear cambios en la biodiversidad sin tener conocimiento de base, por lo que se reconoce la necesidad y urgencia de describir la biodiversidad marina, especialmente en países subdesarrollados de elevada biodiversidad.

Las herramientas genéticas han probado tener enorme potencial para el monitoreo de la biodiversidad en el mar. Particularmente, la técnica de metabarcoding de ADN ambiental provee la oportunidad de realizar monitoreos estandarizados, continuos e independientes de expertos en taxonomía, y es capaz de representar ecosistemas y grupos históricamente desfavorecidos, especialmente el componente microscópico y la fauna que, por su tamaño, morfología, comportamiento o distribución, se ven poco representados en monitoreos tradicionales de macrofauna.

Los bienes y servicios del Golfo de California son disputados por diversos grupos, incluyendo conservacionistas, productores, pescadores y desarrolladores turísticos, muchas veces con intereses contradictorios. A su vez, el cambio en las condiciones de los océanos incentiva re-arreglos en las comunidades, con posible impacto en la salud de los ecosistemas. Por ende, es necesario comprender como se distribuye la biodiversidad en el golfo, para diseñar estrategias que balanceen los intereses de los agentes involucrados y así garantizar la sustentabilidad del sistema a largo plazo.

El presente estudio contribuye a actualizar los inventarios regionales de biodiversidad, integrando métodos tradicionales de monitoreo, inventarios históricos de la región y metabarcoding de ADN ambiental. La descripción de la contribución de cada método a la diversidad de los eucariotas permitió identificar sesgos metodológicos e históricos hacia ciertos grupos taxonómicos, y aportó nueva información sobre aquellos grupos con menor representación en métodos tradicionales. A su vez, los patrones espaciales emergentes para distintos grupos taxonómicos en el área de estudio permitieron poner a prueba los paradigmas de diversidad y estructura meta-comunitaria del Golfo de California, contribuyendo a un mejor entendimiento de cómo se moldea la diversidad en la región.

#### **4. HIPÓTESIS**

Dada la complementariedad entre métodos tradicionales y metabarcoding de ADN ambiental reportada en la literatura, se espera encontrar un bajo nivel de coincidencias taxonómicas entre métodos de monitoreo de diversidad de eucariotas del Golfo de California. A su vez, se espera que los patrones de riqueza y estructura meta-comunitaria regional sean congruentes con la literatura previa, a pesar de provenir de diferentes metodologías y abarcar diversos grupos taxonómicos. Considerando específicamente a los peces, se espera que la comunidad de peces crípticos presente un patrón de mayor diferenciación que peces conspicuos con respecto a la distancia geográfica entre sitios, debido a características como mayor fidelidad a sitio, baja movilidad, y su condición de micro-especialistas de hábitat.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Evaluar la riqueza y estructura meta-comunitaria regional de familias de grandes grupos de eucariotas y especies de peces crípticos y conspicuos, usando una combinación de metabarcoding de ADN ambiental (metabarcodes 18S y 12S), censos visuales submarinos, capturas de peces con uso de anestésico y un compilado histórico de especies del Golfo de California.

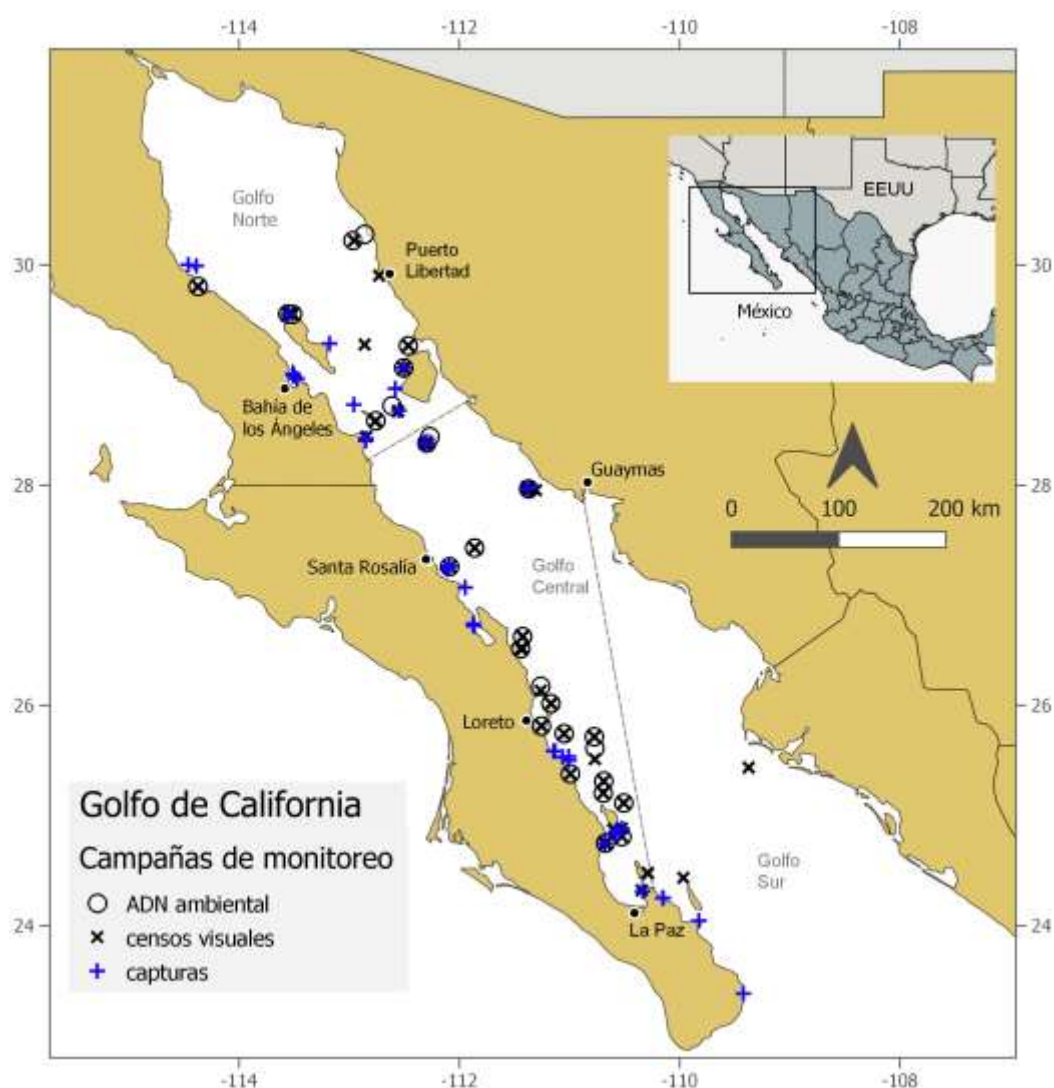
### **5.2 Objetivos particulares**

1. Evaluar la contribución del metabarcoding de ADN ambiental vía metabarcodes 18S, censos visuales y registros históricos a la riqueza taxonómica de distintos grupos de eucariotas: invertebrados, vertebrados, algas, hongos y otros eucariotas.
2. Evaluar los patrones de riqueza y estructura meta-comunitaria a nivel familia para todos los eucariotas detectados por métodos conjuntos, y para las detecciones método-específicas de invertebrados, vertebrados, algas, hongos y otros eucariotas.
3. Generar una base de referencias genéticas del metabarcodes 12S para especies de peces locales del Golfo de California.
4. Evaluar la contribución del metabarcoding de ADN ambiental vía metabarcodes 12S, censos visuales y capturas con uso de anestésico a la detección de especies de peces criptobénticos y conspicuos, y comparar los inventarios recuperados contra la diversidad presente en registros históricos para cada grupo de peces.
5. Evaluar los patrones de riqueza y estructura meta-comunitaria a nivel especie, comparando niveles detectados e históricos para peces crípticos y conspicuos del Golfo de California.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Campañas de monitoreo

Las campañas de monitoreo recopiladas en el presente estudio (Fig. 1), metabarcoding de ADN ambiental, censos visuales submarinos y capturas de peces con uso de anestésico, se dieron en temporada verano-otoño de los años 2016 a 2019, abarcando la región norte y central del Golfo de California, como se describe a continuación.



**Figura 1.** Sitios de monitoreo en el Golfo de California. Distribución de sitios monitoreados mediante metabarcoding de ADN ambiental, censos visuales y capturas de peces con uso de anestésico.

### 6.1.1 Muestreo de ADN ambiental

A bordo de un crucero científico de 23 días realizado en octubre de 2016, se realizó la colecta de un litro de agua en 28 arrecifes rocosos del Golfo Central y Norte (Fig. 1, Tabla 1). El agua fue tomada en botellas Nalgene™ Wide-Mouth HDPE (Thermo Scientific™) por un equipo de dos buzos. Transcurridas no más de 4 horas, las muestras de agua fueron filtradas utilizando filtros Millipore® de 0.44 µm de nitrocelulosa hidrofílica, puestos en un sistema de filtración Millipore® Sterifil®, y conectado a una bomba de presión. Los filtros se colocaron en tubos de 1.6 mL (Neptune®) con buffer estéril STE (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM Tris/HCl pH 7.5), y fueron almacenados a -20°C. Las muestras de agua fueron procesadas en un área del barco independiente de la utilizada por los buzos monitores para minimizar contaminación. Entre muestras, todo el material y botellas fueron remojados con una solución de cloro al 10% y enjuagados repetidamente con abundante agua.

**Tabla 1.** Sitios de colecta de ADN ambiental. Características de sitios, incluyendo código y nombre del sitio, coordenadas geográficas, profundidad (z), temperatura, fecha y región del golfo a la que pertenece cada sitio.

Código	Nombre	Latitud	Longitud	z (m)	Temp (°C)	Fecha	Región
PLO	Puerto Lobos	30.22188	-112.96634	3.0	22.2	11/11/16	Norte
PLI	Puerto Libertad	29.90258	-112.72910	4.6	20.6	12/11/16	Norte
SLG	San Luis Gonzaga	29.80552	-114.37281	8.2	23.9	13/11/16	Norte
AGU1	Ángel de la Guarda1	29.55492	-113.55855	10.7	23.9	14/11/16	Norte
AGU2	Ángel de la Guarda2	29.55194	-113.51441	14.6	24.4	15/11/16	Norte
PAT	Patos	29.26635	-112.46409	8.5	19.4	16/11/16	Norte
TIB	Tiburón	29.06492	-112.50581	13.4	22.2	17/11/16	Norte
EST	San Esteban	28.72152	-112.61259	10.7	17.8	18/11/16	Norte
LOR	San Lorenzo	28.58472	-112.75922	15.2	23.3	19/11/16	Norte
SFN	San Francisquito N.	28.44126	-112.26764	10.1	23.3	20/11/16	Norte
SPM	San Pedro Mártir	28.38201	-112.29588	13.1	21.1	21/11/16	Central
SPN	San Pedro Nolasco	27.96585	-111.37097	20.1	23.9	22/11/16	Central
TOR	Isla Tortuga	27.43053	-111.86171	16.8	26.1	23/11/16	Central
MAR	San Marcos	27.26016	-112.08899	7.6	25.0	24/11/16	Central
IDE	San Idelfonso	26.62452	-111.42674	8.5	27.2	25/11/16	Central
PUL	Punta Pulpito	26.51492	-111.44327	4.3	26.7	26/11/16	Central
COR	Coronado	26.17440	-111.26173	8.5	27.2	27/11/16	Central
CAR	Carmen	26.01657	-111.16914	6.4	25.6	28/11/16	Central
DAN	Isla Danzante	25.81281	-111.25526	12.8	27.2	29/11/16	Central
MON	Montserrat	25.74411	-111.04932	7.3	28.3	30/11/16	Central
CAT	Catalana	25.71534	-110.77560	11.9	27.8	1/12/16	Central
BSN	Bajo Seco Norte	25.61154	-110.77045	32	25.0	2/12/16	Central
MAT	San Mateo	25.37902	-110.99271	7.9	28.3	3/12/16	Central
CRU	Santa Cruz	25.31262	-110.68939	10.7	27.8	4/12/16	Central
DIE	San Diego	25.20403	-110.69490	4.6	28.3	5/12/16	Central
ANI	Las Animas	25.11358	-110.50777	10.1	27.8	6/12/16	Central
BSS	Bajo Seco Sur	24.80856	-110.52517	20.7	26.7	7/12/16	Central
POR	El Portugués	24.74921	-110.67361	5.5	27.8	8/12/16	Central

### 6.1.2 Censos visuales submarinos

Los censos visuales (Fig. 1) fueron realizados simultáneamente con el muestreo de ADN ambiental por equipos de 6 buzos capacitados para la identificación taxonómica de peces y macroinvertebrados a lo largo de transectos de 50 m de largo por 4 m de ancho y 2 m de alto, equivalente a 200 m<sup>3</sup> de agua, en un rango de profundidad de 3 a 25 m. La longitud total mínima

de identificación de organismos fue de 3 cm, y los invertebrados pertenecieron a los phyla Annelida, Arthropoda, Cnidaria, Echinodermata, Mollusca y Platyhelminthes.

### **6.1.3 Capturas de peces**

Las capturas de peces ocurrieron durante múltiples campañas ejecutadas durante la temporada verano-otoño del año 2017 por la costa peninsular del Golfo de California, y del año 2019 por la región de las grandes islas del Golfo Norte, en un rango de profundidades de 1 a 14 m (Fig. 1, Tabla 2). En cada sitio, un grupo de al menos 3 buzos recorrió el arrecife en búsqueda de sitios con aparente presencia de peces crípticos. En cada punto se señaló el tipo de sustrato (arrecife rocoso, coralino o pared rocosa) y profundidad, y se delimitó un cuadrante con una bolsa semi-esférica de 1m<sup>3</sup> de volumen. Una mezcla 1:3 de aceite de clavo y etanol fue esparcida al interior del cuadrante cubierto anestesiando a los individuos, que fueron recolectados con redes de pecera o pinzas, y almacenados en bolsas de plástico rotuladas por cada cuadrante. La identificación taxonómica fue realizada por Salwa El Khattabi Salazar (El Khattabi Salazar, 2019). Brevemente, los peces capturados fueron identificados tras desembarcar, y aquellos individuos que no pudieron ser clasificados en sitio fueron fotografiados y llevados a laboratorio para su identificación utilizando literatura y criterio experto.

**Tabla 2.** Sitios de capturas. Características de sitios de captura de peces, incluyendo nombre del sitio, coordenadas geográficas, profundidad (z), fecha, número de cuadrantes (n. cuad.) y región del golfo a la que pertenece cada sitio.

Nombre	Latitud	Longitud	z (m)	Fecha	n. cuad.	Región
Ángel de la Guarda 1	29.28697	- 113.17897	7.50	15/7/19	3	Norte
Ángel de la Guarda 2	29.55088	- 113.55605	12.00	16/7/19	3	Norte
Isla Tiburón	29.06495	- 112.50470	5.95	13/7/19	3	Norte
Bahía de los Ángeles 1	29.01000	- 113.51170	5.72	25/9/17	4	Norte
Bahía de los Ángeles 2	28.99330	- 113.50330	6.10	25/9/17	5	Norte
Bahía de los Ángeles 3	28.96830	- 113.47500	7.16	25/9/17	4	Norte
San Esteban	28.67853	- 112.54914	8.90	12/7/19	3	Norte
Isla Tiburón	28.87750	- 112.58330	7.50	12/7/19	3	Norte
Sal Si Puedes	28.73202	- 112.95838	8.00	14/7/19	3	Norte
Puerto San Francisquito 1	28.42500	- 112.86500	1.91	27/9/17	4	Norte
Puerto San Francisquito 2	28.40500	- 112.86000	1.17	27/9/17	6	Norte
San Pedro Mártir 1	28.37428	- 112.30922	14.00	11/7/19	3	Central
San Pedro Mártir 2	28.38918	- 112.30378	12.50	11/7/19	3	Central
San Pedro Nolasco 1	27.97498	- 111.37773	13.95	10/7/19	3	Central
San Pedro Nolasco 2	27.96654	- 111.37181	10.00	10/7/19	3	Central
Punta Chivato	27.07110	- 111.94770	3.58	29/9/17	5	Central
San Marcos 1	27.26500	- 112.09170	7.52	30/9/17	3	Central
San Marcos 2	27.23740	- 112.10910	5.61	30/9/17	5	Central
San Cosme 1	25.58510	- 111.13110	4.39	22/10/17	5	Central
San Cosme 2	25.58500	- 111.14500	6.40	22/10/17	5	Central
Agua Verde 1	25.53570	- 111.00830	7.11	21/10/17	3	Central
Agua Verde 2	25.53170	- 111.06320	8.00	21/10/17	4	Central
Agua Verde 3	25.50050	- 111.00580	8.53	21/10/17	4	Central
Isla San José	24.88310	- 110.52560	5.28	12/7/17	6	Central
El Pardito	24.85330	- 110.58020	7.32	12/7/17	4	Central
Isla San Francisquito	24.82470	- 110.58420	7.01	12/7/17	6	Central
Bahía de la Paz	24.74680	- 110.68010	0.72	11/7/17	8	Central

## 6.2 Trabajo de laboratorio

El trabajo de laboratorio consistió en la generación de una base de referencias genéticas de especies del metabarcoding 12S para peces del Golfo de California, utilizada para complementar las referencias disponibles en repositorios públicos de secuencias genéticas y mejorar la asignación taxonómica del ADN ambiental. Adicionalmente, se informa sobre la generación de librerías de metabarcoding de ADN ambiental con los metabarcoding 18S y 12S, cuyas secuencias se utilizan en el presente estudio. El trabajo de laboratorio fue realizado previamente por la Dra. Tania



Valdivia Carrillo y el Dr. Adrián Munguía Vega (Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021; Mac Loughlin *et al.*, 2024).

### 6.2.1 Generación de referencias locales para 12S

Para la generación de referencias se seleccionaron un total de 96 especímenes, abarcando 73 especies de peces crípticos y 23 especies de peces conspicuos (Tabla 3). Los organismos fueron identificados a partir de la colección de capturas con uso de anestésico, y a partir del proyecto PANGAS y Gato X Liebre (Munguía-Vega *et al.*, 2015; Munguía-Vega *et al.*, 2021, 2022). El marcador molecular objetivo fue una región de ~530 pb del gen ribosomal 12S presente en la mitocondria, dado que incluye el metabarcoding *teleo* (Valentini *et al.*, 2016) amplificado en las muestras de ADN ambiental.

El protocolo utilizado en el presente estudio fue detallado en (Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021). Brevemente, la extracción de ADN a partir de tejido se realizó siguiendo el protocolo de sales (Aljanabi y Martinez, 1997) y la extracción fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las amplificaciones mediante PCR (reacción en cadena de polimerasa) se llevaron a cabo mezclando 0.2  $\mu$ M de cada cebador (*forward* CAGGTCGAGGTGTAGCGYATG; *reverse* CTTTCAGCTTCCCTTGCGG), 0.2 mM de dNTP mix, 1X de PCR Buffer libre de Mg<sup>+</sup>, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.02% BSA, 1 U de DNA Taq polimerasa (Invitrogen) y 1 ng de ADN templado en un volumen total de 25  $\mu$ L. Se utilizó un termociclador T100<sup>TM</sup> (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C, alineamiento a 61°C y extensión a 72°C, cada uno por 30 seg, y una extensión final por 5 min a 72°C. Las amplificaciones se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Las amplificaciones exitosas fueron disecadas y enviadas a secuenciación Sanger *paired-end* al Centro de Genómica de la Universidad de Arizona (UAGC) en Tucson, USA.

**Tabla 3.** Especies incluidas en la elaboración de referencias locales.

Especies		
<i>Acanthemblemaria crockeri</i>	<i>Enneanectes carminalis</i>	<i>Nematistius pectoralis</i>
<i>Acanthemblemaria macrospilus</i>	<i>Enneanectes reticulatus</i>	<i>Ogilbia ventralis</i>
<i>Alphestes immaculatus</i>	<i>Fistularia comersoni</i>	<i>Paraclinus altivelis</i>
<i>Anarchias galapagensis</i>	<i>Fowlerichthys avalonis</i>	<i>Paraclinus beebei</i>
<i>Antennatus sanguineus</i>	<i>Gillellus semicinctus</i>	<i>Pareques fuscovittatus</i>
<i>Apogon retrosella</i>	<i>Gobiosox adustus</i>	<i>Paraclinus mexicanus</i>
<i>Aruma histrio</i>	<i>Gobiosoma chiquita</i>	<i>Paraclinus sini (Variedad novo)</i>
<i>Axoclinus multicinctus</i>	<i>Gobulus crescentalis</i>	<i>Paraclinus sini</i>
<i>Axoclinus nigricaudus</i>	<i>Gymnothorax panamensis</i>	<i>Paralichthys woolmani</i>
<i>Axoclinus storeyae</i>	<i>Gymneleotris seminuda</i>	<i>Pontinus vaughani</i>
<i>Barbulifer pantherinus</i>	<i>Halichoeres chierchiaie</i>	<i>Protemblemaria bicirrus</i>
<i>Canthigaster punctatissima</i>	<i>Halichoeres melanotis</i>	<i>Pseudogramma thaumasia</i>
<i>Caranx caballus</i>	<i>Halichoeres semicinctus</i>	<i>Scorpaena guttata</i>
<i>Caranx caninus</i>	<i>Hemanthias signifer</i>	<i>Scorpaena mystes</i>
<i>Caranx sexfasciatus</i>	<i>Heteropriacanthus cruentatus</i>	<i>Scorpaenodes xyris</i>
<i>Cephalopholis panamensis</i>	<i>Hypsoblennius gentilis</i>	<i>Selar crumenophthalmus</i>
<i>Chaenopsis alepidota</i>	<i>Hyporthodus nasus</i>	<i>Semicossyphus pulcher</i>
<i>Chromis atrilobata</i>	<i>Hyporthodus niphobles</i>	<i>Serranus psittacinus</i>
<i>Chriolepis semisquamata</i>	<i>Kyphosus labriformis</i>	<i>Sphoeroides anulatus/lobatus</i>
<i>Chriolepis zebra</i>	<i>Labrisomus multiporosus</i>	<i>Stathmonotus culebrai</i>
<i>Cirriemblemaria lucasana</i>	<i>Labrisomus xanti</i>	<i>Stathmonotus lugubris</i>
<i>Cirrhitichthys oxycephalus</i>	<i>Lythrypnus dalli</i>	<i>Stathmonotus sinuscalifornici</i>
<i>Coralliozetus micropes</i>	<i>Lythrypnus pulchellus</i>	<i>Starksia spinipenis</i>
<i>Coralliozetus rosenblatti</i>	<i>Lythrypnus rhizophora</i>	<i>Stegastes acapulcoensis</i>
<i>Coryphopterus urospilus</i>	<i>Malacoctenus hubbsi</i>	<i>Stegastes flavilatus</i>
<i>Cosmocampus arctus</i>	<i>Malacoctenus mararitae</i>	<i>Thalassoma lucasanum</i>
<i>Crocodilichthys gracilis</i>	<i>Malacoctenus mexicanus</i>	<i>Tigrigobius digueti</i>
<i>Ctenogobius sagittula</i>	<i>Malacoctenus tetranemus</i>	<i>Tylosorus crocodilus</i>
<i>Dasyatis brevis</i>	<i>Malacoctenus zacaе</i>	<i>Uropterygius macrocephalus</i>
<i>Doryrhamphus excisus</i>	<i>Merluccius productus</i>	<i>Xenomedeia rhodopyga</i>
<i>Elagatis bipinnulata</i>	<i>Microdesmus sp</i>	
<i>Emblemaria hypacanthus</i>	<i>Mugil curema</i>	
<i>Enchelynassa canina</i>	<i>Mustelus henlei</i>	

### 6.2.2 Metabarcoding de ADN ambiental

La generación de librerías de metabarcoding de ADN ambiental de los metabarcodes 18S y 12S (de aquí en adelante referidas como ADN<sub>18S</sub> y ADN<sub>12S</sub>, respectivamente) se llevó a cabo para las de 28 muestras de 1L d agua colectadas. En breve, la extracción de ADN fue realizada con el

kit Qiagen Blood and Tissue (Qiagen, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, duplicando el paso de elución. En cada evento de extracción se incluyó un control negativo de extracción utilizando agua MQ. Para evitar contaminación cruzada, materiales y reactivos fueron esterilizados al interior de una campana con una solución de cloro al 10% y 10 minutos de luz UV previo a su uso.

Para la elaboración de librerías, durante la primer PCR se amplificó un metabarcote de entre 36 y 892 pb (longitud promedio 123 pb) de la región V7 del gen ribosomal 18S ubicado en múltiple copias en el genoma nuclear, que permite identificar la diversidad de eucariotas, con una resolución taxonómica estimada en 67–68% para orden y familia, disminuyendo a 59% para género y 47% de discriminación entre especies (Guardiola *et al.*, 2015; Taberlet *et al.*, 2018). Para el caso de 12S, se amplificó el metabarcote *teleo* (Valentini *et al.*, 2016) con una longitud de 45 a 96 pb (promedio 64 pb), cuyo objetivo es discriminar especies de peces teleosteos. La resolución taxonómica fue estimada en 99-100% para orden y familia, 91% para género y 81% de discriminación entre especies (Taberlet *et al.*, 2018).

La segunda PCR consistió en la adición de adaptadores indexados (secuencias de 8 pb y 3 discrepancias entre sí) a las muestras amplificadas, junto a adaptadores para secuenciación Illumina. Las réplicas de la primer PCR (realizada por triplicado) fueron combinadas, purificadas y cuantificadas previamente a su combinación equimolar. Se incluyó un control positivo (llamado comunidad *mock* en la literatura) del metabarcote 18S a partir de ADN extraído de tejido de 25 taxa pertenecientes a 5 phyla de metazoos, para evaluar la incidencia y abundancia de identificaciones mediante ADNa18S, conociendo la diversidad inicial de la muestra. Una comunidad *mock* de 25 especies de peces también se incluyó para comparar contra las detecciones de ADNa12S, la cual fue previamente analizada (Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021) y no se incluye en el presente estudio. Como control negativo se utilizaron muestras de agua MQ en paralelo con las muestras de campo, cuyo resultado fue combinado y secuenciado para cada metabarcote. Las librerías generadas consistieron en 2 conjuntos de: 28 muestras de ADN ambiental, un control positivo y uno negativo, correspondientes a los metabarcote 18S y 12S, enviados a secuenciación Illumina Nextseq 500 MID (35Gb) v2 química (2 x 150 *paired-end*) por parte de Langebio-CINVESTAV.

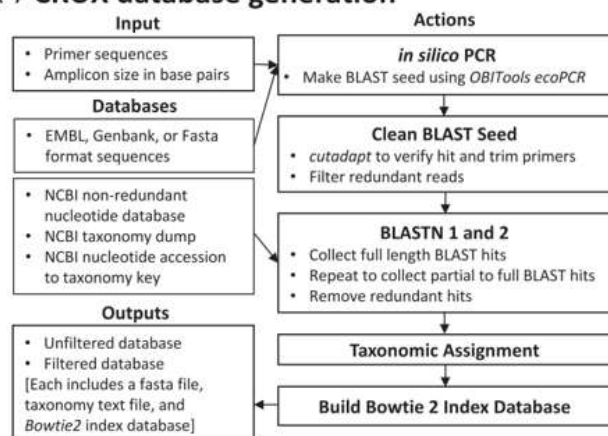
### **6.3 Procesamiento de datos por método**

A continuación, se describe el procesamiento de las secuencias generadas para obtener referencias genéticas de especies locales de peces, usado para mejorar la asignación taxonómica de especies locales vía ADNa12S. A su vez, se describe el procesamiento de datos llevado a cabo para obtener listados taxonómicos geográficamente comparables entre las metodologías comparadas, incluyendo también el compilado histórico de especies del Golfo de California.

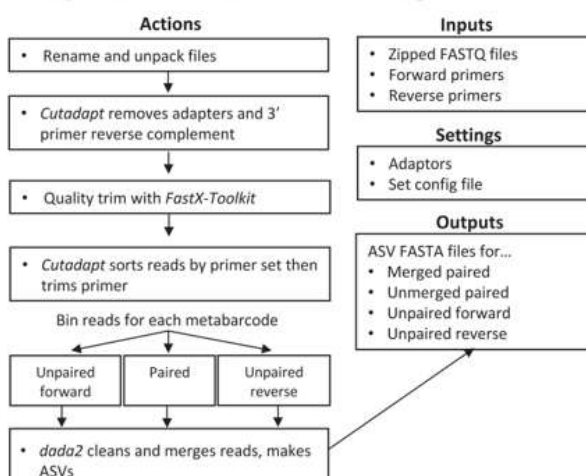
#### **6.3.1 Metabarcoding de ADN ambiental**

El análisis bioinformático se llevó a cabo siguiendo el flujo de trabajo de ANACAPA (Curd *et al.*, 2019), diseñado con una estructura modular, abarcando los pasos necesarios para obtener listados de secuencias de ADN con su conteo por muestra y correspondiente anotación taxonómica (Fig. 4). Todos los parámetros usados en ANACAPA, descritos a continuación, se pueden consultar en el Anexo A.

## (a) CRUX database generation



## (b) Sequence QC and ASV Parsing



## (c) Assignment

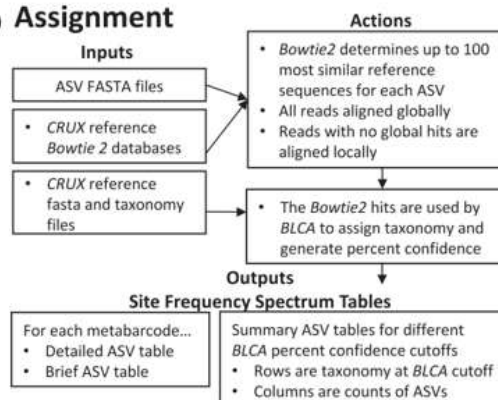


Figura 2. Flujo de trabajo del pipeline ANACAPA. Imagen tomada de (Curd *et al.*, 2019).

### 6.3.1.1 Referencia local de peces

Las secuencias obtenidas para la generación de referencias genéticas de especies de peces locales fueron procesadas manualmente utilizando el programa Chromas Pro v2.1.10 (Technelysium, 1996) para identificar y corregir secuencias ambiguas o erróneas mediante observación de electroferogramas. Posteriormente, se realizó un alineamiento completo de secuencias y posterior recorte de extremos de baja calidad usando ClustalX v2.1 (Thompson *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 2007), resultando en 59 secuencias de calidad. La taxonomía de cada especie se obtuvo utilizando el buscador taxonómico de NCBI-GenBank

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>; accesado el 15 de enero de 2023).

Para obtener el fragmento de referencia de identificación, incluido en las secuencias generadas, se realizó una PCR *in silico* mediante la función ecoPCR del paquete Obitools (Boyer *et al.*, 2016) en línea de comando, con los mismos cebadores *teleo* usados para metabarcoding de ADN ambiental 12S (Valentini *et al.*, 2016). Para un sub-conjunto de 14 especies que dieron resultado negativo en PCR *in silico*, el metabarcoding *teleo* se obtuvo realizando un alineamiento completo con los metabarcoding ya obtenidos, usando el programa ClustalX v2.1 (Thompson *et al.*, 1994; Larkin *et al.*, 2007). Para evaluar el grado de discriminación de las referencias generadas, se visualizó un árbol de distancia utilizando FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2010), basado en el alineamiento completo de secuencias generado previamente.

### 6.3.1.2 Compilado de referencias genéticas

Para generar los listados de referencias genéticas que permiten anotar taxonómicamente a las secuencias de ADN ambiental, se usó el módulo CRUX: *Creating Reference libraries Using eXisting tools* (Fig. 2a) bajo parámetros estándar para ambos amplicones de interés: 18S y 12S. Primero se utilizó la función ecoPCR de Obitools (Boyer *et al.*, 2016) para realizar una PCR *in silico* utilizando cada par de cebadores independientemente, sobre el repositorio nucleotídico europeo estándar (Kanz *et al.*, 2005), creando una base de referencia “semilla”. Cada PCR *in silico* se realizó permitiendo hasta 3 discrepancias en el alineamiento de cebadores y un rango de longitud saliente de 50-450 pb para 18S y 20-180 pb para 12S, considerando así abundante margen con respecto a las longitudes promedio reportadas en literatura en ambos casos (Taberlet *et al.*, 2018). Posteriormente, CRUX ejecuta dos veces la función blastn para complementar la base semilla con el repositorio nucleotídico anotado de NCBI (Pruitt *et al.*, 2005). Ambas rondas de blastn se ejecutaron permitiendo un e-valor máximo de  $1 \times 10^{-5}$ . El e-valor es un indicador de la robustez del alineamiento entre secuencias y se ve influenciado por la longitud y variabilidad de los fragmentos comparados. Valores pequeños ( $\leq 1 \times 10^{-2}$ ) son considerados como verdaderas homologías, y valores mayores (desde  $1 \times 10^{-2}$  hasta 10) son considerados como alineamientos azarosos. En una primera ronda se buscó un 50 % de identidad inicial entre secuencias, reteniendo aquellos casos en que el 100% de la secuencia consultada está incluida en la referencia. En una

segunda vuelta se ejecutó `blastn` permitiendo un 70% de identidad para aumentar la probabilidad de recuperar la región de interés. Luego, CRUX eliminó secuencias repetidas y retuvo solo el fragmento más largo como representante, sobre el cual recupera la taxonomía de acuerdo con NCBI a través de la función `'entrez-qiime.py'` (Baker, 2016). Finalmente, CRUX transforma las bases de referencia generadas al formato Bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2012), para su uso en el módulo de asignación taxonómica.

Para evaluar el grado de disponibilidad de referencias genéticas de cada metabarcote en el repositorio público NCBI-GenBank (Pruitt et al., 2005), se realizaron diagramas de Venn creados en TaxonTableTools (Macher *et al.*, 2021). Para el caso de eucariotas usando el metabarcote 18S, se compararon las referencias genéticas públicas contra el listado histórico curado de especies marinas (ver sección 6.3.4. Registros históricos), y se anotó el porcentaje de taxa con referencias genéticas disponibles, desde especie hasta phylum. Para el foco en vertebrados vía 12S, se compararon las referencias en GenBank contra las especies de la referencia local generada en este estudio, y contra un listado de todos los peces detectados mediante censos visuales y capturas, discriminando entre peces conspicuos y crípticos.

### **6.3.1.3 Generación de secuencias Fastq a partir de imágenes BCL**

Mediante el software `Bcl2fastq` (Illumina, 2018) se obtuvieron los amplicones de ADN secuenciados en el formato `'fastq'` (listado de secuencias con calidad de secuenciación asociada), a partir de las imágenes en formato BCL (nucleótidos por ciclo dentro de la placa de secuenciación) en dos formatos: global y demultiplexado por muestra. Los archivos globales (*forward* y *reverse*, derivado de secuenciación *paired-end*) fueron analizados con el software `FastQC` (Andrews, 2010) para evaluar la calidad general de la secuenciación. Dado que ANACAPA procesa amplicones previamente demultiplexados, las lecturas fueron agrupadas por muestra, permitiendo una única discrepancia en la identificación de adaptadores (cada par de adaptadores posee 3 discrepancias entre sí). Aquellos adaptadores con al menos 90% de coincidencia fueron removidos, y se excluyeron las lecturas menores a 35 pb al eliminar adaptadores.

#### 6.3.1.4 Control de calidad y agrupamiento de secuencias

El segundo módulo de ANACAPA, *Sequence Quality Control and ASV Parsing* (Fig. 2b) fue ejecutado para procesar las secuencias obtenidas y obtener el marcador molecular de interés: amplicones de secuencia variable (ASVs por sus siglas en inglés: *Amplicon Sequence Variants*). Los ASVs son un tipo de unidades taxonómicas moleculares (MOTUs, *Molecular Operational Taxonomic Units*) cuya similitud es del 100%, es decir, son conjuntos de amplicones idénticos entre sí. Otros estudios se han enfocado en delinear MOTUs, quienes sacrifican variabilidad y establecen un umbral de similitud menor, por ejemplo 97% de similitud correspondiente a secuencias de una misma especie. Sin embargo, la similitud entre amplicones puede variar notoriamente entre distintos linajes de eucariotas, mientras que los ASVs recuperan la estructura intrínseca de cada set de datos, y pueden ser agrupados de acuerdo con su anotación taxonómica posteriormente (Callahan *et al.*, 2017; Antich *et al.*, 2021).

Partiendo de las secuencias demultiplexadas, primero se removieron cebadores y adaptadores con el programa cutadapt (Martin, 2011) permitiendo hasta un 30% de desacople. Segundo, se realizó un filtrado de calidad de secuenciación con fastx-toolkit (Gordon y Hannon, 2010), reteniendo amplicones con una calidad (*phred score*) promedio  $\geq 30$  (default 35) y al menos 50 pb de longitud para el metabarcote 18S, y 40 pb para el metabarcote 12S (default 100). Las lecturas libres de adaptadores y cebadores que pasaron los filtros de calidad y longitud fueron clasificadas con un código personalizado de python para separar aquellas secuencias “pareadas” (ambas secuencias *forward* y *reverse* están presentes), de secuencias individuales *forward*, e individuales *reverse*. De aquí en adelante, ANACAPA procesa estos 3 conjuntos de datos por separado, y posteriormente divide las lecturas pareadas en “alineadas” y “pareadas-no-alineadas” (sin región de traslape, llamadas pareadas de aquí en adelante), con el objetivo de maximizar la diversidad de amplicones capturados. Así, taxa cuyo metabarcote supera la ventana de secuenciación, o casos en donde uno del par no pasó los filtros de calidad, pueden ser identificados por secuencias individuales o pares de secuencias que no traslapan (Curd *et al.*, 2019).

ANACAPA posteriormente utiliza el software DADA2 v1.2 (Callahan *et al.*, 2016) para la obtención de ASVs. Previo al alineamiento (sólo posible para las lecturas pareadas), DADA2 eliminó



secuencias bajo los siguientes criterios: presencia de nucleótidos ambiguos (DADA2 no los admite), alineamiento al genoma phiX (usado comúnmente durante la secuenciación Illumina), y/o secuencias con más de 2 errores esperados, una alternativa al filtrado en base a un umbral de calidad promedio (Edgar y Flyvbjerg, 2015). El algoritmo de *Divisive Amplicon denoising* (DADA, por sus siglas en inglés) se ejecutó usando el paquete DADA2 (Callahan *et al.*, 2016) para obtener ASVs a partir de las lecturas. Para ello, el algoritmo usa un modelo paramétrico de error específico para cada muestra, en el que se alterna la estimación de tasas de error e inferencia de composición de la muestra, hasta que se converge en una solución consistente (Callahan, 2021). Para el conjunto de datos pareados, el alineamiento se realiza con las lecturas *forward* y el complemento reverso de las lecturas *reverse*, permitiendo un traslape mínimo de 40 pb para el metabarcodes 18S y 20 pb para el metabarcodes 12S, con hasta 2 discrepancias en el área de traslape. El umbral de traslape seleccionado se encuentra en el equilibrio entre el elevado requisito computacional al permitir traslapes pequeños, como el usado por default en DADA2 (12 pb), y es menor al recomendado por los autores de ANACAPA, que podría limitar el alineamiento de metabarcodes cortos, como el *teleo* (promedio 64 pb). Finalmente, la remoción de quimeras (un tipo de error generado por la combinación de dos fragmentos de PCR en uno) se ejecutó buscando ASVs que combinen exactamente un par de segmentos (izquierda + derecha) de 2 ASVs parentales de mayor abundancia.

#### 6.3.1.5 Anotaciones taxonómicas

*El Anacapa Classifier module* (Fig. 2c) se encarga de alinear los ASVs a su respectiva base de referencia genética generada con el módulo CRUX, utilizando distintos intervalos de confianza mediante el algoritmo bayesiano de ancestro común más cercano (*BCLA*, *Bayesian Lowest Common Ancestor*) ejecutado en Bowtie2 v2.3.5 (Langmead y Salzberg, 2012). El módulo se ejecuta por default para los 4 conjuntos de secuencias: alineadas, pareadas, *forward* y *reverse*. Primero, Bowtie2 se ejecuta con sus parámetros default estrictos para recuperar hasta 100 de los mejores alineamientos de cada ASV a la base de referencia generada en CRUX. Con esta información, se ejecuta el algoritmo Bowtie2-BCLA con parámetros más relajados (máxima proporción de discrepancias y mínima proporción de inclusión de ASV en referencia establecidos en 0.8), en el que se realizan múltiples alineamientos de secuencias para identificar la anotación

taxonómica más probable, seleccionando al ancestro común más cercano ponderando los resultados de Bowtie2 del paso anterior, y de acuerdo con distintos umbrales de confiabilidad obtenidos mediante pruebas de *bootstrap* (ejecutada por default con 100 iteraciones).

Como resultado, se obtiene para cada metabarcodes una tabla cruda de ASVs que incluye su origen (proveniente de secuencias alineadas, pareadas, *forward* o *reverse*), conteo de secuencias por muestra, código genético, longitud, si el alineamiento fue a una o múltiples referencias, si el alineamiento fue parcial o completo (secuencia completa del amplicón alineada) con respecto a la referencia, anotaciones taxonómicas de phylum a especie, y valor de prueba *bootstrap* para cada rango taxonómico.

#### 6.3.1.6 Filtrado post- anotación

El filtrado de las tablas de ASVs anotadas para los metabarcodes 18S y 12S posee algunos pasos en común, y otros específicos de cada metabarcodes. Para ambos metabarcodes, los ASVs con una única secuencia total reportada (i.e. *singletons* globales) y todo amplicón presente en cada pool de controles negativos fueron removidos. Las anotaciones taxonómicas con un *bootstrap* menor a 70 (i.e., anotación identificada como un mismo taxa en menos del 70% de las iteraciones) fueron eliminadas. La comparación entre la riqueza y abundancia taxonómica esperada y observada se realizó utilizando la comunidad *mock* del metabarcodes 18S, para evaluar sesgos en la identificación y amplificación de las especies incluidas.

Dado que 18S aborda la diversidad de eucariotas, un grupo propenso a anotaciones inciertas en GenBank dada su magnitud, la taxonomía a nivel especie se revisó para descartar anotaciones erróneas o ambiguas (i.e. aquellas con un rango mayor, acompañadas de “sp”, “nan”, “uncultured”, o “incertae sedis”), para poder identificar el poder de resolución taxonómica del metabarcodes considerando taxonomía válida. Por ejemplo, “*Blepharocysta sp. FG216*” sería contabilizada como una identificación a nivel especie y no género, o “uncultured Thraustochytriaceae” también contaría como especie siendo una asignación a nivel familia. Adicionalmente, se eliminaron aquellos ASVs correspondientes a ambientes terrestres y dulceacuícolas. Por último, para prevenir el comportamiento atípico de algunos sitios durante los análisis ecológico-comunitarios, aquellas muestras con riqueza de ASVs menor a 4,000 fueron



obtuvieron 6 censos de macroinvertebrados. El Bajo Seco Norte (BSN) fue el único sitio con muestras de ADN<sub>a</sub>18S descartado por no contar con suficiente replicación. Los transectos restantes, en donde no se tomaron muestras de ADN ambiental, fueron excluidos en esta instancia. Para cada especie observada se verificó y completó la taxonomía de acuerdo con el buscador taxonómico de NCBI-GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>). Los datos fueron compilados a una tabla anotada de abundancia de observaciones por sitio con taxonomía de especie a phylum.

Para comparar contra los datos de ADN<sub>a</sub>12S, se procesaron únicamente los censos visuales de peces, y se aplicó un umbral de distancia geográfica para agrupar todos los sitios en donde se realizaron censos visuales (que exceden a los sitios donde se tomó ADN ambiental). Como punto de partida, se mapearon las 25 muestras retenidas de ADN<sub>a</sub>12S junto a todos los transectos de censos visuales (y datos de capturas, descrito en la siguiente sección). Considerando el posible transporte y persistencia del ADN ambiental dada la condición advectiva del sistema de corrientes del Golfo de California (Munguia-Vega *et al.*, 2018b), y las evidencias previamente reportadas de detecciones de organismos peri-arrecifales para el conjunto de muestras re-analizadas aquí (Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021), se utilizaron dos umbrales de distancia para estimar la huella espacial del ADN ambiental. Para peces, se consideraron dos umbrales de distancia para clasificar los transectos, de ~11 km, y ~28 km (0.1 y 0.25 grados latitudinales, respectivamente) al sitio de ADN<sub>a</sub>12S más cercano. Al tomar en cuenta un flujo promedio de advección de partículas de 0.3 m s<sup>-1</sup> (Santiago-García *et al.*, 2014), estas distancias contemplan un transporte y persistencia del ADN ambiental por aproximadamente 10 y 24 horas previas al momento de la colecta, respectivamente. La clasificación se ejecutó con la función *join attributes by nearest* en QGIS v3.14.1-Pi (QGIS Development Team, 2009), registrando durante el proceso el número de transectos acumulados por sitio, y el porcentaje de las ocurrencias totales retenidas bajo cada umbral de distancia. Los transectos por sitio fueron combinados dando lugar a una tabla de contingencia de abundancia de observaciones por sitio, con sus anotaciones taxonómicas de especie a phylum.

### 6.3.3 Capturas de peces

Las capturas se incorporaron específicamente para incorporar el componente críptico a la comparación de peces. Las capturas fueron clasificadas de la misma manera que los censos visuales, con un umbral de distancia de ~11 km y 28 km, registrando el número de cuadrantes adjudicados a cada sitio y la proporción de capturas retenida en cada caso. Finalizada la clasificación, las réplicas de cada sitio bajo la nueva clasificación fueron combinadas en una tabla de contingencia de abundancia de peces por sitio, incluyendo anotaciones taxonómicas recuperada del buscador taxonómico de NCBI-GenBank.

### 6.3.4 Registros históricos

Los registros históricos provienen de una recopilación llevada a cabo por Morzaria-Luna *et al.* (2018), en la cual se incluyeron 286,533 ocurrencias de 12,105 especies del Golfo de California, recuperadas de bases biogeográficas públicas globales, nacionales y regionales, además de incorporar ocurrencias de trabajos orientados específicamente a pastos marinos, rodolitos, tiburones, especies comerciales y monitoreos arrecifales. Cada ocurrencia fue georreferenciada individualmente y acompañada de taxonomía de especie a clase, de acuerdo con el repositorio WoRMS (*World Record of Marine Species*, [https:// www.marinespecies.org](https://www.marinespecies.org)) y criterio experto.

Los registros históricos también fueron procesados de modo diferencial, considerando los diferentes grupos taxonómicos abordados (eucariotas y peces), y tomando en cuenta exclusivamente los sitios seleccionados de ADNa18S y 12S. El primer procesamiento se dio para los datos de eucariotas, clasificados por su cercanía a las 20 muestras retenidas. En la segunda iteración enfocada a peces, no se procesaron nuevamente los datos crudos, sino que se re-utilizaron los datos históricos curados y clasificados para ADNa18S, seleccionando solo los peces de los 20 sitios mencionados, de los cuales 18 sitios son compartidos con ADNa12S.

Las ocurrencias históricas se clasificaron geográficamente con la función *join attributes by nearest* en QGIS v3.14.1-Pi (QGIS Development Team, 2009) de igual manera que los censos visuales y capturas de peces, en este caso con un criterio más inclusivo de clasificación. Los umbrales de distancia utilizados para registros históricos fueron de ~11 km (0.1 grado latitudinal, transporte y permanencia de ADN ambiental de ~10 hs) y ~55 km (0.5 grado latitudinal, transporte y

permanencia de ~48 hs; (Wood *et al.*, 2020). Para el umbral de ~ 55 km se permitió un máximo de tres vecinos (i.e. cada ocurrencia será clasificada a los tres sitios más cercanos dentro del umbral de 55km), buscando maximizar el inventario histórico de especies por sitio para su comparación contra los métodos de detección. Las especies terrestres fueron identificadas y removidas usando el repositorio WoRMS. Como resultado, dos inventarios históricos (eucariotas y peces) fueron convertidos en tablas de contingencia de abundancia de ocurrencias por sitio, con sus anotaciones taxonómicas originales.

Para comparar registros históricos contra los datos de peces detectados, se tomó la base histórica curada taxonómicamente de eucariotas (descrita en la siguiente sección) considerando el umbral de distancia más inclusivo (~55 km), por demostrar mayores coincidencias con los métodos de detección. La base de eucariotas fue filtrada para seleccionar los taxa de interés: peces óseos (Actinopteri) y cartilagosos (Chondrychthyes).

#### **6.4 Curado y clasificación de grupos taxonómicos**

Uno de los desafíos emergentes al comparar distintas fuentes de biodiversidad son las inconsistencias que surgen en la taxonomía debido a la ocurrencia de sinonimias, relaciones filogenéticas no resueltas, y diferencias de criterio entre repositorios públicos. El segundo desafío que surgió, particularmente para un grupo taxonómico tan amplio como los eucariotas, fue la agrupación de los distintos linajes identificados dentro de eucariotas, de modo tal que se consideren los diferentes enfoques taxonómicos de cada método, y la selección de un rango taxonómico para los análisis ecológico-comunitarios. Finalmente, la sección aborda los criterios usados para la clasificación de peces en crípticos y conspicuos.

##### **6.4.1 Homogeneización de la taxonomía entre métodos**

Para homogeneizar la taxonomía de eucariotas se realizó una verificación de la taxonomía a nivel especie con el paquete bdc v1.0.0 (Ribeiro *et al.*, 2022) en R (R Core team, 2018). El repositorio anotado de NCBI-GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>, consultado el 3 de marzo de 2022) fue seleccionado para homogeneizar la taxonomía, permitiendo un 20% de discrepancias entre las especies consultadas y la referencia. En el caso de taxonomía faltante o inconclusa a nivel phylum, se agregaron las ocurrencias bajo un “<nombre de grupo> NA” (por

ejemplo, algas Cryptophyceae fueron clasificadas bajo el phylum “Algae NA”). Esta clasificación engloba al menos 15 linajes de micro-eucariotas descubiertos únicamente en las secuencias de ADN<sub>18S</sub> y agrupados bajo el phylum “Otros NA” para la comparación de métodos y patrones de biodiversidad. Sin embargo, estos linajes fueron adicionalmente clasificados de acuerdo con de Vargas *et al.* (2015), incluyendo información sobre su nivel trófico y tipo de hábitat, para resaltar su rol ecológico en el ecosistema. Para rangos taxonómicos intermedios (clase, orden, familia) con taxonomía faltante o incierta, se utilizaron las siglas “HLNA” (por sus siglas en inglés, *Higher Level taxonomy Not Available*).

#### **6.4.2 Clasificación de grupos de eucariotas y peces**

Habiendo obtenido los inventarios de biodiversidad en un modo espacial y taxonómicamente comparables, los phyla de eucariotas fueron clasificados *ad hoc* en 5 categorías que destacan la contribución de los distintos métodos: invertebrados, vertebrados, algas (incluye en su mayoría entidades fotosintéticas), hongos y los restantes “otros eucariotas”.

La segunda clasificación fue realizada para la comparación específicamente de peces. El carácter diagnóstico principal de peces crípticos es poseer una talla menor a 5 cm en adultez. Sin embargo, siendo el objetivo incorporar peces pequeños a los inventarios de biodiversidad, se decidió utilizar un criterio más inclusivo para la clasificación, extendiendo la talla mínima a 10 cm. De este modo la categoría de peces crípticos incluye otros pequeños organismos posiblemente ausentes en censos visuales. Para todos los métodos, se desarrolló una serie de pasos para identificar las especies crípticas. Primero se identificaron las familias criptobénticas de acuerdo con el criterio de Brandl *et al.* (2018), en la cual se listan 19 familias con más de 5% de ocurrencia de especies de talla máxima hasta 5 cm. Sobre toda especie perteneciente a una familia criptobéntica, se realizó una búsqueda de talla máxima en los repositorios Shorefishes (Robertson y Allen, 2015) y FishBase (Froese y Pauly, 2002). Así, se identificaron 3 especies de talla máxima superior a 10 cm (*Ophioblennius steindachneri*, *Plagiotremus azaleus* y *Chaenopsis alepidota*), quienes fueron re-clasificadas y agrupadas a todas las especies restantes, como peces conspicuos.

## 6.5 Biodiversidad por método y grupo taxonómico

En el presente estudio se extiende el uso de la partición de la diversidad de especies en sus componentes local (diversidad alfa) y regional (diversidad gama), y la variación espacial de la composición de la comunidad o estructura meta-comunitaria (diversidad beta), a todos los rangos taxonómicos (especie a phylum) comparados entre métodos. Particularmente, se compara la riqueza (número de taxa recuperado por rango taxonómico) y estructura meta-comunitaria, sin considerar abundancias.

Para evaluar la riqueza taxonómica regional de grupos de eucariotas y peces del Golfo de California, se utilizaron diagramas de barras acumuladas. Para eucariotas, cada método individual (ADNa18S, censos visuales y datos históricos) se comparó contra un inventario global de métodos combinados, permitiendo estimar la contribución por método al total, desde phylum a especie. Para peces en cambio, las detecciones (ADNa12S, censos visuales y capturas) se combinaron y contrastaron contra la riqueza histórica, de familias a especies, de peces crípticos y conspicuos.

La composición taxonómica recuperada por cada método se comparó con diagramas de Venn creados en TaxonTableTools (Macher *et al.*, 2021) y editados en Inkscape (Inkscape Project, 2020). Tanto para eucariotas como para peces, se compararon los listados taxonómicos completos de cada método. Para eucariotas específicamente y a modo de ejemplificar la contribución de cada método, se incluyó una comparación de la diversidad recuperada a nivel familia de un conjunto representativo de taxa. La comparación a nivel familia se seleccionó considerando que la magnitud de variación entre sitios fue baja a mayores niveles taxonómicos (orden, clase), mientras que la contribución de métodos a nivel de género y especie fue muy dispar entre métodos. Las familias dentro de los phyla Arthropoda, Mollusca y Echinodermata se seleccionaron por tener contribución comparable de los tres métodos, y se agregó Rhodophyta a la comparación con ausencia de registros en censos visuales. Para evaluar la influencia de la disponibilidad de referencias genéticas en las anotaciones taxonómicas, las detecciones exclusivas de ADNa18S se plasmaron en un diagrama de barras, junto con el porcentaje de registros histórico que poseen referencia genética, el porcentaje de asignaciones taxonómicas de los ASVs, y el porcentaje de incremento de la línea histórica de riqueza que representa el aporte, para los rangos de especie a phylum.



La contribución de ADN<sub>a</sub>12S, censos visuales y capturas se compararon discriminando peces crípticos de conspicuos, y el listado de detecciones mediante métodos combinados se comparó contra los registros históricos para cada grupo de peces. Las pocas detecciones de peces crípticos en ADN<sub>a</sub>12S se señalaron en un diagrama de frecuencia y abundancia creado a partir de los datos de abundancia de capturas (principal fuente de especies de peces crípticos, ver resultados).

## 6.6 Patrones regionales de biodiversidad

Los patrones espaciales de biodiversidad obtenidos mediante las diferentes metodologías, para grupos de eucariotas y peces, fueron comparados considerando las diferencias intrínsecas de cada conjunto de datos.

Para los eucariotas, el análisis espacial se centró en diversidad de familias, como previamente mencionado, rango en el cual la contribución entre métodos posee la mejor resolución espacial y contribuciones comparables entre métodos. La estructura meta-comunitaria de familias entre Golfo Norte y Central se evaluó para cada grupo de eucariotas individualmente, y para el inventario global (de métodos combinados). Ciertas combinaciones método-grupo de eucariotas, con menos de 7 familias registradas por sitio (ADN<sub>a</sub>18S-vertebrados, históricos-hongos e históricos-otros eucariotas) fueron excluidas del análisis. La comparación se hizo mediante escalamiento no métrico multidimensional (nMDS) basado en el índice pareado de incidencias de Jaccard con 5,000 iniciaciones como máximo. Las diferencias estadísticas entre regiones se probaron mediante análisis de similitud (ANOSIM) con 1,000 permutaciones.

La riqueza de familias de eucariotas por sitio se mapeó en QGIS v3.4.1 (QGIS Development Team, 2009), y se crearon diagramas de caja y curvas de acumulación de especies para representar la variación a nivel regional entre el Golfo Norte y Central. Se evaluó la significancia de diferencias de riqueza entre métodos y entre regiones dentro de cada método, mediante la prueba de rangos de Kruskal-Wallis y la prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Dunn, con los paquetes stats y FSA en R (R Core team, 2018; Ogle *et al.*, 2023). Las curvas de acumulación, nMDS (metaMDS), y ANOSIM fueron ejecutados desde el paquete vegan v2.5-7 (Oksanen *et al.*, 2018) en R (R Core team, 2018).

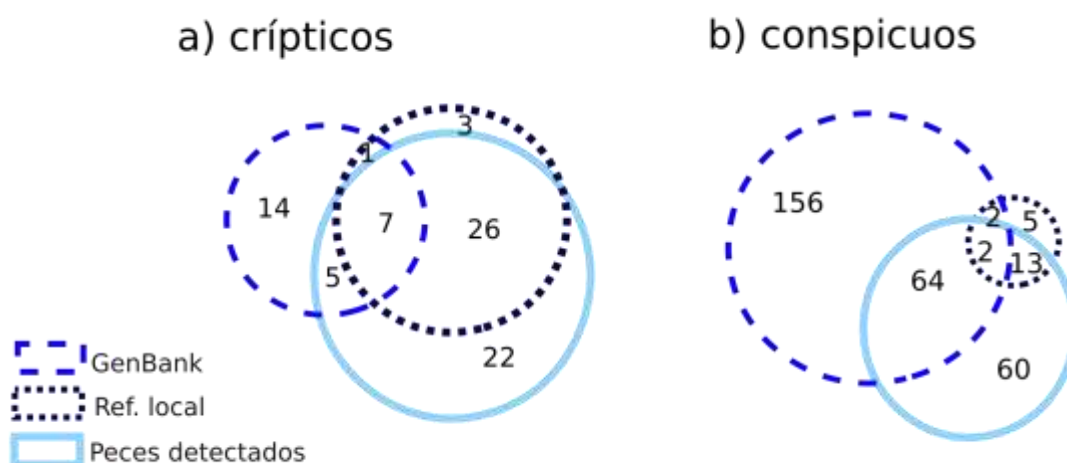
Para peces, considerando la resolución taxonómica de ADNa12S y los métodos tradicionales, el análisis espacial se llevó a cabo a nivel especie. La contribución de cada método y la distribución espacial de riqueza de peces crípticos y conspicuos resultó muy dispareja, por lo que los métodos de detección fueron combinados en una base de peces detectados, para contrastar contra la base histórica de peces. Posteriormente, los sitios con riqueza de crípticos o conspicuos menor a cinco fueron descartados del análisis espacial. La estructura meta-comunitaria se estimó para las especies de peces igual que para eucariotas, mediante nMDS basado en el índice de jaccard. Para diferenciar regiones estadísticamente se usó la prueba paramétrica de análisis de varianza permutacional (PERMANOVA) con la función `adonis` y 9,999 permutaciones, en caso de cumplirse con los supuestos paramétricos (homogeneidad de varianza multivariada, estimada con la función `betadisper`). En caso contrario, se utilizó ANOSIM con 9,999 permutaciones. Por último, se evaluó la relación entre diferenciación comunitaria y distancia geográfica, usando la prueba de Mantel de correlación de matrices de distancia, con 9,999 permutaciones. Los análisis de nMDS, PERMANOVA, ANOSIM y Mantel se ejecutaron con el paquete `vegan` (Oksanen *et al.*, 2018) en R (R Core team, 2018).

La riqueza de especies de peces por sitio se mapeó en R con el paquete `terra` v1.7-65 (Hijmans *et al.*, 2023), discriminando peces crípticos y conspicuos, detectados e históricos. Para la comparación regional también se crearon diagramas de caja y curvas de acumulación de especies por región, en este caso utilizando el paquete `inext` (Chao *et al.*, 2014; Hsieh *et al.*, 2022) en R, que incluye intervalos de confianza al 95% para los datos rarefaccionados, extrapolación al doble del tamaño muestral en cada caso y valores asintóticos. Para identificar diferencias estadísticas entre Golfo Norte y Central para peces detectados e históricos, se aplicó para datos paramétricos un análisis de varianza de dos factores, grupo (crípticos y conspicuos) y región (norte y centro), con la función `aov` en R. Para datos no paramétricos se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, identificando diferencias entre región dentro de cada grupo de peces. Las pruebas de `aov` y `Kruskal.test` se ejecutaron con el paquete `stats` en R (R Core team, 2018).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Laboratorio: Generación de referencias locales para 12S

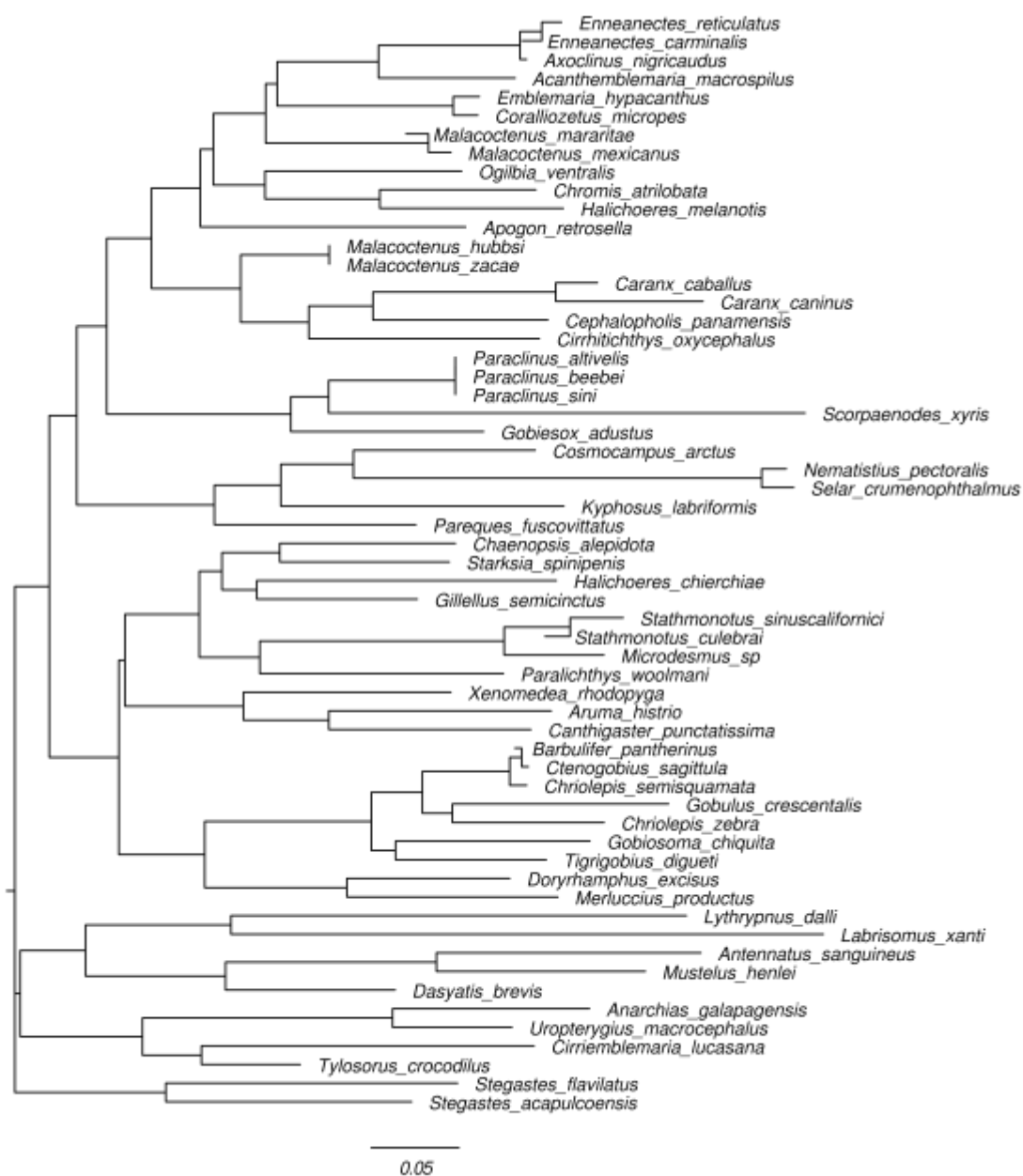
La elaboración de una base de referencias genéticas de peces locales resultó para 37 especies crípticas dentro de 29 géneros y 12 familias (Anexo B). Las familias Antennariidae, Chaenopsidae, Dactyloscopidae and Microdesmidae no poseían registros previos del metabarcote *teleo*(12S) en GenBank. La comparación taxonómica entre la referencia local, GenBank y todos los peces detectados, resultó en 29 especies crípticas incorporadas a las 27 especies disponibles en GenBank (Fig. 3). Para peces conspicuos, se agregaron 22 especies dentro de 19 géneros y 16 familias, de las cuales 18 nuevas especies se sumaron a las 224 referencias disponibles del Golfo de California. No se consiguió un producto de amplificación para 4 especies (*Acanthemblemaria crockeri*, *Fowlerichthys avalonis*, *Lythrypnus pulchellus* y *Lythrypnus rhizophora*), y las secuencias no resultaron de calidad para 32 especies restantes. Considerando todas las especies detectadas en este estudio (sin considerar datos históricos), restan 21 especies crípticas y 60 conspicuas que aún no poseen referencias para el metabarcote *teleo* en GenBank (Fig. 3).



**Figura 3.** Comparación de especies en referencia local del metabarcote 12S, contra disponibles en GenBank y todos los peces crípticos y conspicuos detectados.

EL árbol de distancia genética elaborado para la referencia local (Fig. 4) demostró que la mayoría de las especies incorporadas son discriminables con el metabarcote *teleo* del gen 12S. Las

excepciones fueron dentro de la familia Labrisomidae, *Malacotenus spp.* (2 especies) y *Paraclinus spp.* (3 especies).



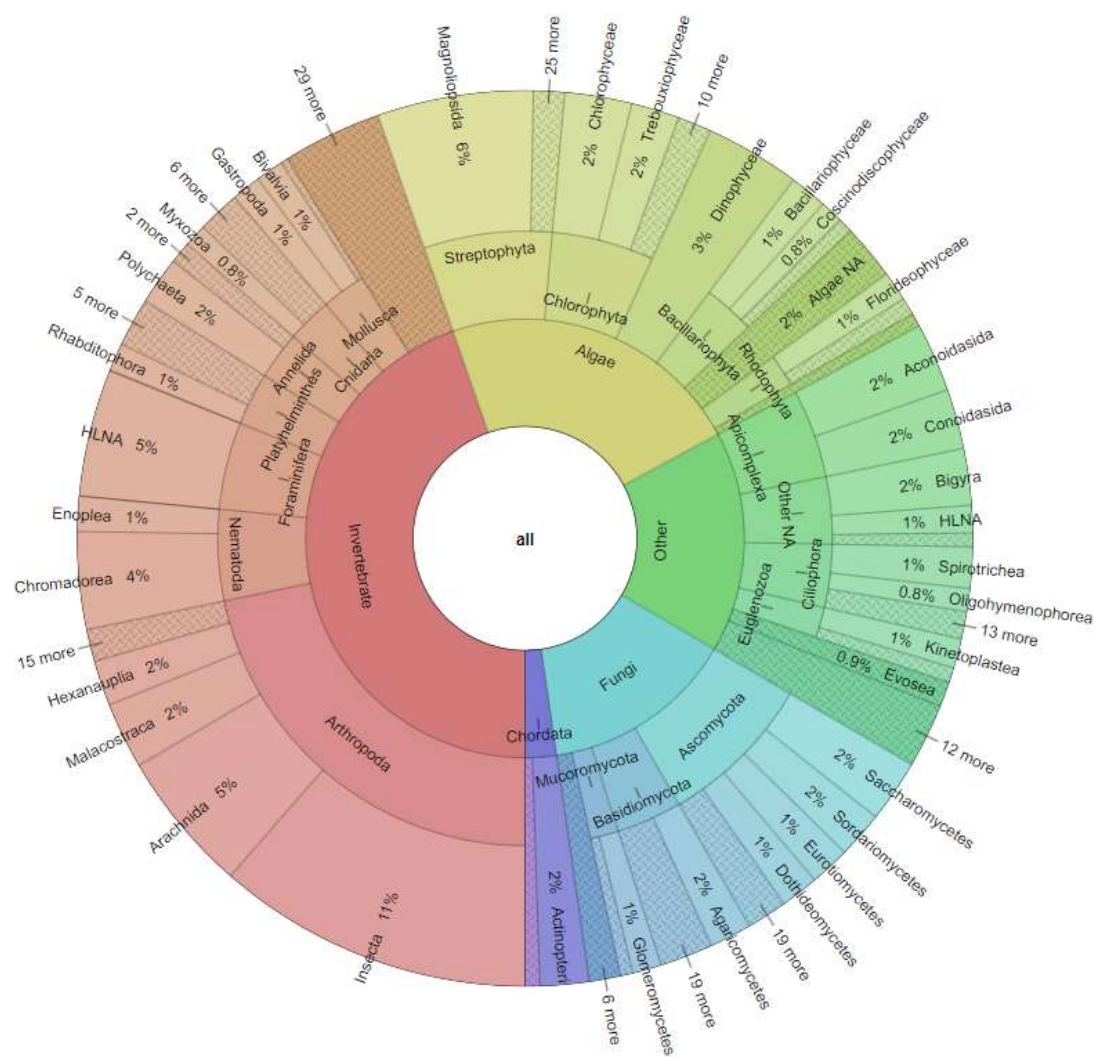
**Figura 4.** Árbol de distancia genética en base al metabarcode *teleo* del gen 12S, entre especies de referencia local de peces del Golfo de California.

## 7.2 Procesamiento de datos por método

### 7.2.1 Metabarcoding de ADN ambiental

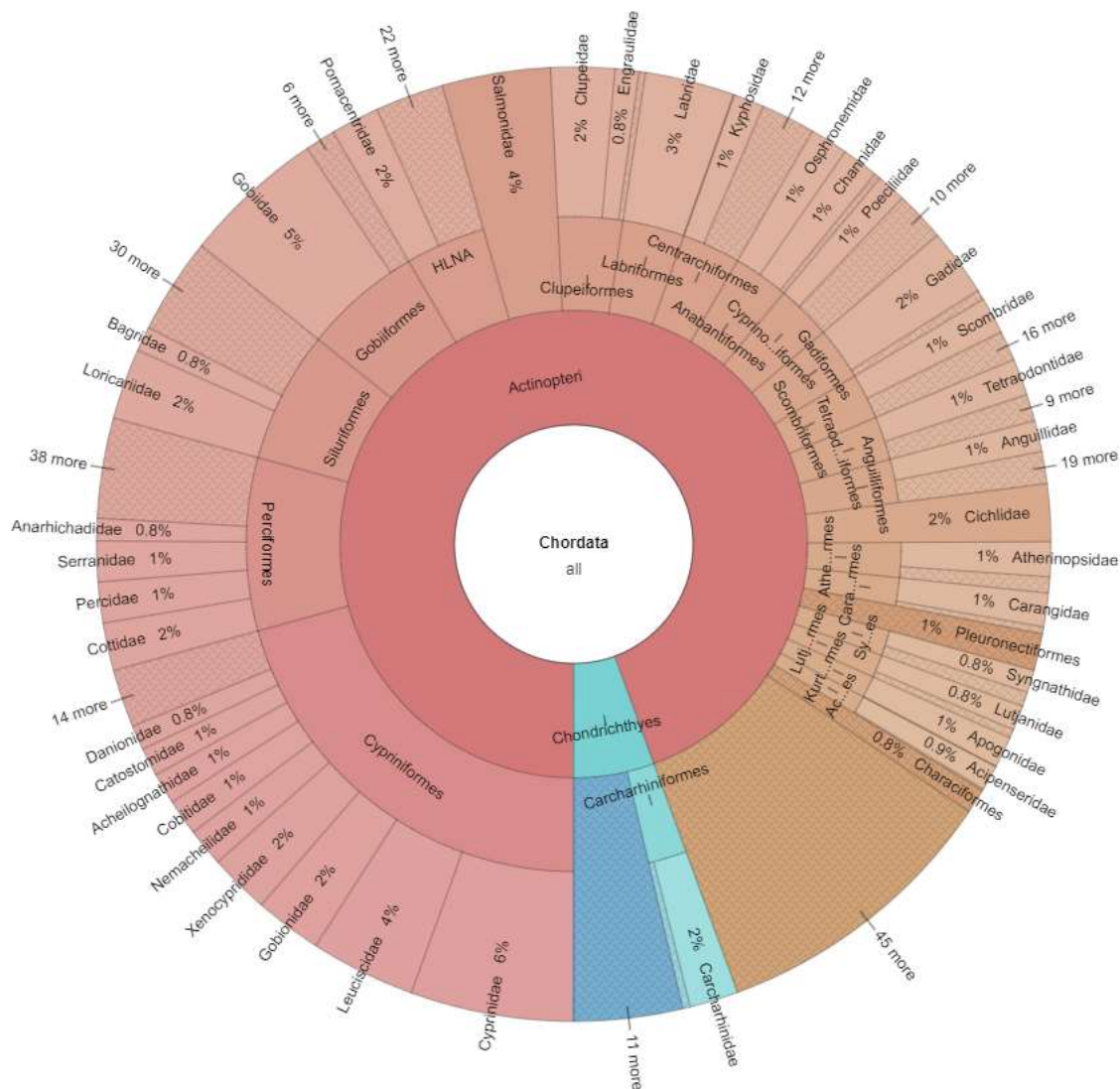
#### 7.2.1.1 Compilados de referencias genéticas

La base de referencias genéticas del fragmento v7 del gen 18S, disponibles en los repositorios GenBank y EMBL, constó de 170,737 ASVs correspondientes a 76,128 especies, 27,414 géneros, 6,438 familias, 1,220 órdenes, 267 clases y 69 phyla (Fig. 5).



**Figura 5.** Base de referencias genéticas del metabarcoding 18S. Diagrama Krona de diversidad taxonómica, desde grandes grupos hasta clase, incluyendo porcentaje de distribución de referencias al interior de cada clase.

La base de referencias generada para el metabarcote 12S, incluyendo las 59 especies locales del Golfo de California, constó de 17,888 ASVs correspondientes a 6,610 especies, 2,346 géneros, 465 familias y 80 órdenes dentro de las clases Actinopteri y Chondrichthyes (Fig. 6).



**Figura 6.** Base de referencias genéticas del metabarcote *teleo* del gen 12S. Diagrama Krona de diversidad taxonómica, de phylum a familia, incluyendo porcentaje de distribución de referencias dentro de familias.

### 7.2.1.2 Control de calidad y agrupamiento de secuencias de ADN ambiental

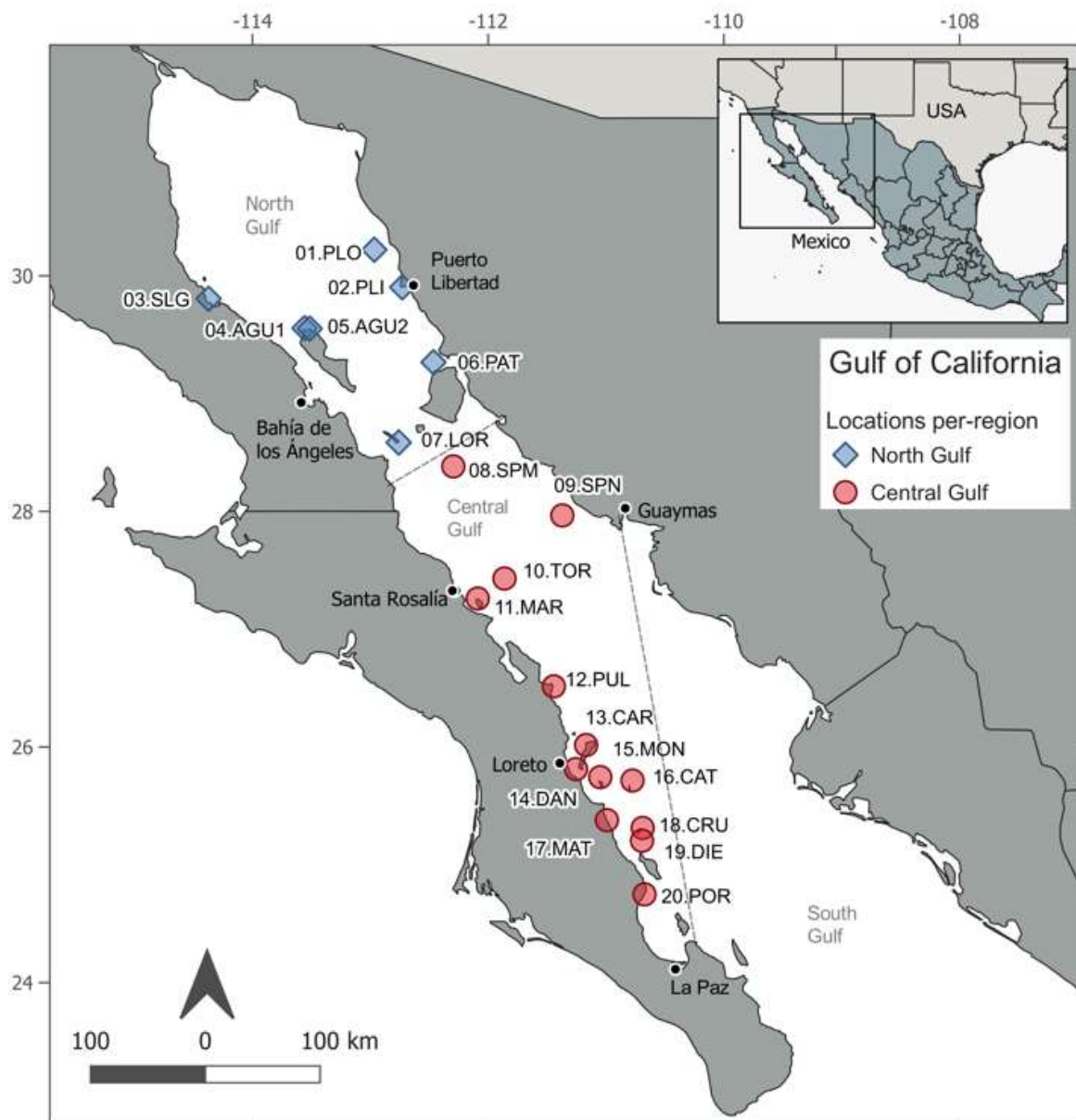
Para ADNa18S, se obtuvieron 26.2 millones de secuencias crudas, de las cuales 16.1 millones (61%) fueron retenidas luego de realizar los controles de calidad, agrupamiento de secuencias y filtrados post- anotación (Tabla 4). Las secuencias crudas se encuentran disponibles en el archivo

de secuencias cortas de NCBI bajo el bio-proyecto PRJNA919092. El procesamiento de ASVs redujo los 222,331 ASVs iniciales a 61,197 (27%) tras los filtrados de singletons (ASVs con una lectura global), selección de muestras y filtrados post- anotación taxonómica.

**Tabla 4.** Filtrado de datos de ADN<sub>a</sub>18S, censos visuales y datos históricos de eucariotas del Golfo de California. La columna de filtros indica los pasos de procesamiento o elementos removidos. Se reporta el número de secuencias y ASVs u ocurrencias retenidas junto al porcentaje con respecto al valor inicial.

Método genético	Filtros	n secuencias (%)	n ASVs (%)
ADN <sub>a</sub> 18S - eucariotas	secuencias crudas	26,201,746	
	secuencias limpias	22,847,932 (87%)	222,331
	singletons	22,687,290 (87%)	69,576 (28%)
	muestras descartadas	16,102,405 (61%)	61,346 (28%)
	post- anotación	16,077,043 (61%)	61,197 (27%)
Métodos tradicionales	Filtros	n ocurrencias (%)	
Censos visuales	datos crudos	71,460	
Censos visuales	selección espacial	28,269 (40%)	
Históricos	datos crudos	286,533	
Históricos	selección espacial	131,980 (46%)	

De las secuencias pareadas, 21,624,932 (94.6%) pudieron ser alineadas, mientras que 505,466 (2.2%) secuencias no alinearon, 673,408 (2.9%) fueron individuales *forward* y 44,126 (0.2%) fueron *reverse*. Se descartaron 8 muestras de baja diversidad con comportamiento atípico (TIB, EST, FRA, IDE, COR, BSN, ANI, BSS; referencias en Tabla 1), dejando un total de 20 muestras de calidad de ADN<sub>a</sub>18S (Fig. 7) para análisis posteriores. Al interior de cada muestra, se registraron entre 594,000 y 944,000 secuencias, con un promedio de 811,000 secuencias.



**Figura 7.** Monitoreo vía ADN<sub>a</sub>18S, censos visuales y datos históricos de eucariotas del Golfo de California. Las regiones biogeográficas señaladas con líneas punteadas fueron tomadas de (Brusca *et al.*, 2005). Consulte la Tabla 1 para nombres y características de los sitios.

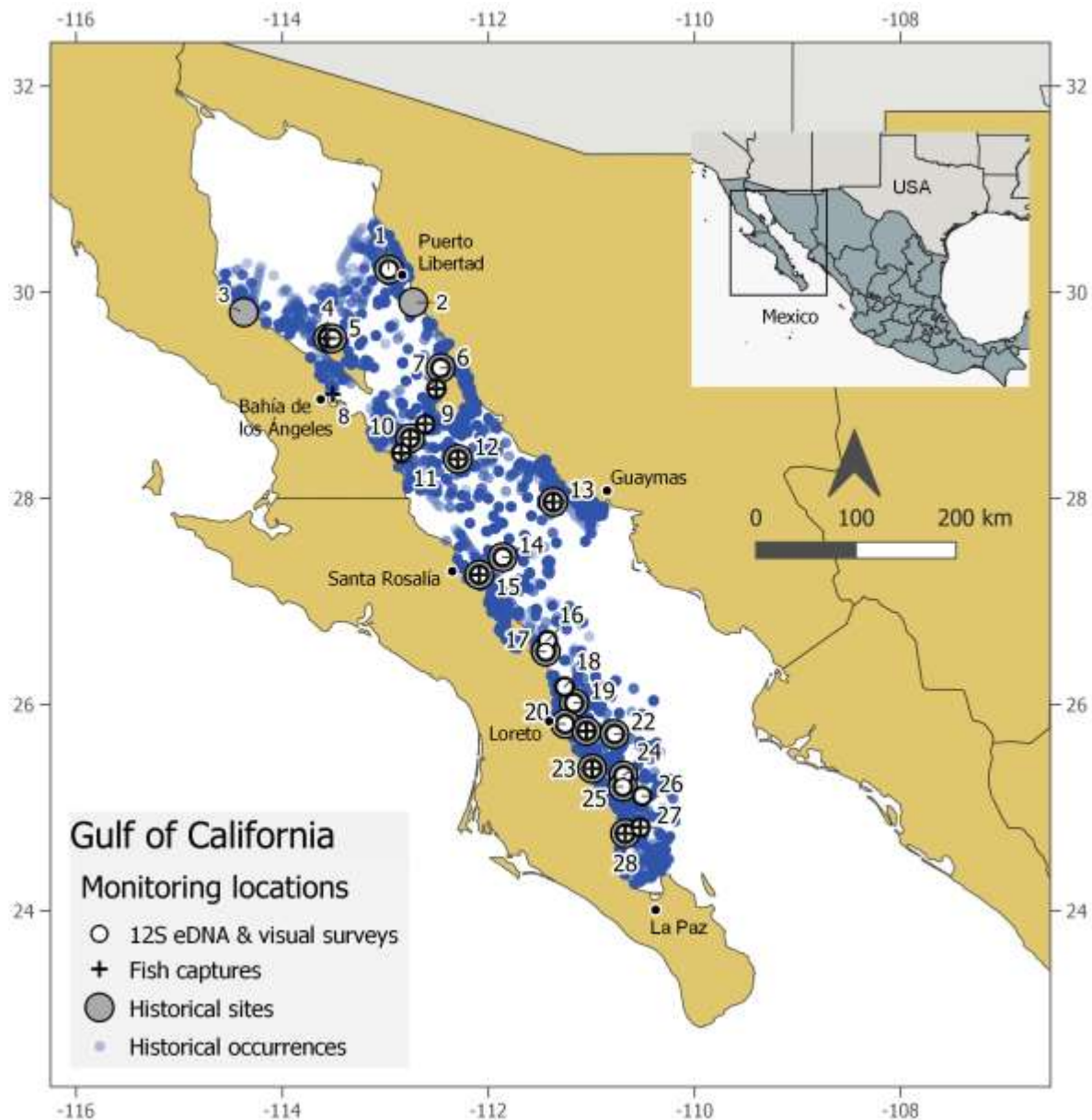
La base de datos de ADN<sub>a</sub>12S consistió en 23,090,275 secuencias crudas, de las cuales 5,145,704 (22%) permanecieron después del control de calidad, selección de muestras y curado taxonómico. De los 44,874 ASVs crudos encontrados, se retuvieron 6,804 (15%) tras los filtros de calidad, remoción de singletons globales, selección de muestras de calidad y de especies del Golfo de California (Tabla 5).



**Tabla 5.** Filtro de datos de ADNa12S, censos visuales, capturas y datos históricos de peces del Golfo de California. La columna de filtros indica los pasos de procesamiento o elementos removidos de secuencias y ASVs u ocurrencias, junto al porcentaje con respecto al valor inicial.

Método genético	Filtros	n secuencias (%)	n ASVs (%)
ADNa12S - peces	secuencias crudas	23,090,275	
	secuencias limpias	12,868,013 (56%)	44,874
	singletons	12,832,064 (56%)	8,925 (20%)
	cola polyG	12,819,194 (56%)	8,387 (19%)
	control negativo	7,086,009 (31%)	8,352 (19%)
	especies no-GC	5,897,786 (26%)	7,070 (16%)
	muestras descartadas	5,145,704 (22%)	6,804 (15%)
Métodos tradicionales	Filtros	n ocurrencias (%)	
Censos visuales	datos crudos	56,375	
Censos visuales	selección espacial	47,366 (84%)	
Capturas	datos crudos	4,274	
Capturas	selección espacial	3,733 (87%)	
Históricos	datos crudos vert. 18S	76,801	
Históricos	especies no-pep	65,137 (85%)	

De los 5.1 millones de secuencias limpias de ADNa12S, 4,958,354 (96%) de las lecturas se alinearon, mientras que 55,196 (1.07%) quedaron pareadas, 120,725 (2.35%) lecturas fueron *forward* y 11,429 (0.22%) *reverse*. En el filtrado de muestras se identificaron y descartaron tres sitios con menos de 4,000 ASVs (PLI, SLG y BSN, referencias en Tabla 1), dejando 25 sitios con muestras de ADNa12S (Fig. 8). El conteo por muestra tuvo un rango de 114 mil a 303 mil secuencias, con un promedio de 205 mil secuencias.

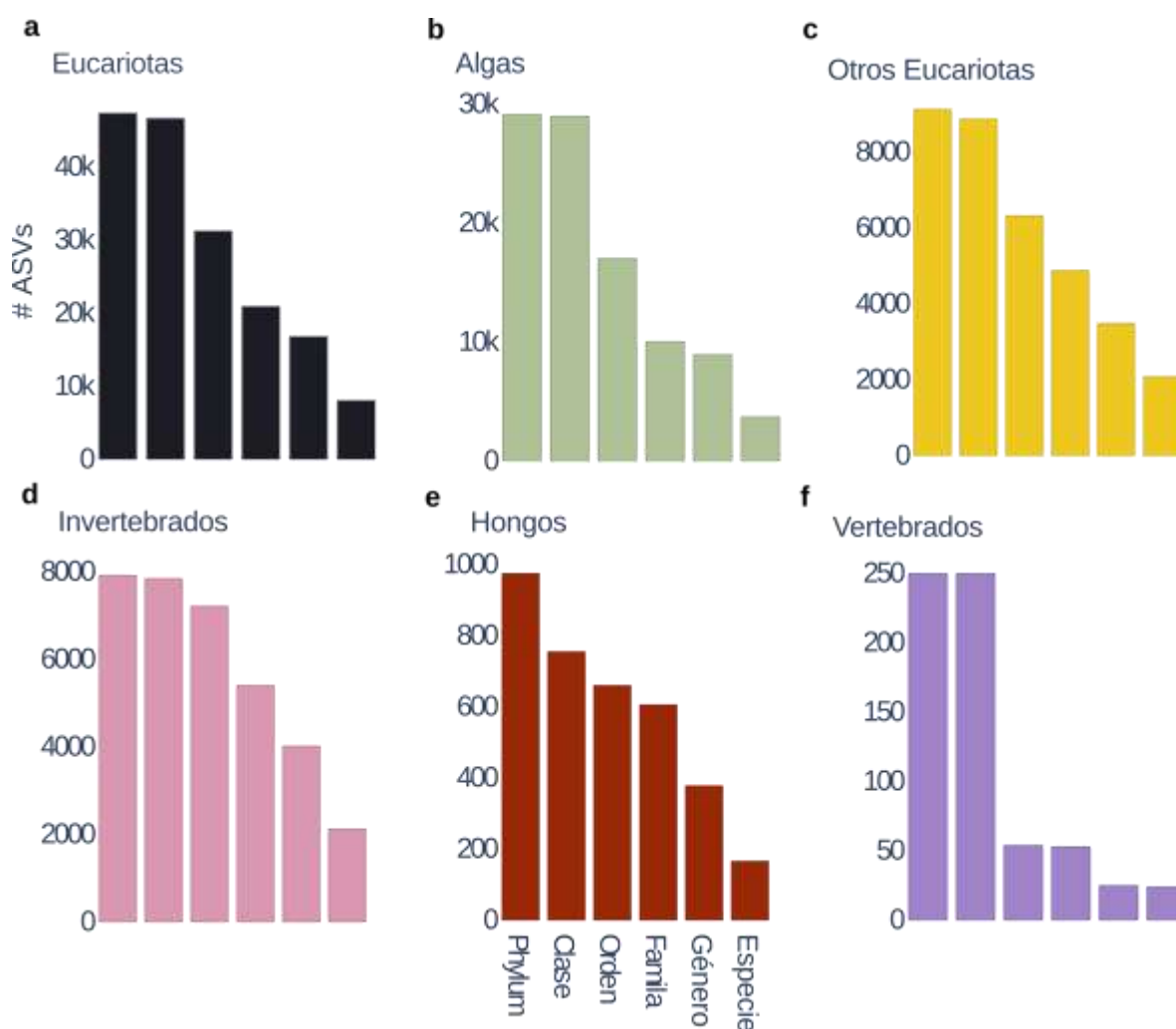


**Figura 8.** Monitoreo de peces crípticos y conspicuos mediante ADNa12S, censos visuales, capturas y datos históricos. Las regiones biogeográficas señaladas con líneas punteadas fueron tomadas de (Brusca *et al.*, 2005).

### 7.2.1.3 Anotaciones taxonómicas y filtros posteriores

Para los datos de ADNa18S, se identificaron y removieron 12 ASVs identificados a cordados terrestres (Mamalia, Primates, Aves), 119 ASVs identificados a plantas terrestres (phylum Streptophyta), 4 ASVs de algas dulceacuícolas (phylum Rhodophyta) y 14 ASVs asociados a taxa no marinos dentro de metazoa (Mollusca, Arthropoda, Anellida, Nematoda y Platyhelminthes). La base final pulida de 61,197 ASVs contó con ~13 mil ASVs que no pudieron ser identificados

dentro de Eucaryota bajo el protocolo bioinformático aplicado. Los ASVs restantes fueron identificados a distintos rangos taxonómicos, con  $\sim 47$  mil (77%) ASVs identificados a phylum o clase,  $\sim 31$  mil (51%) a su vez identificados a orden,  $\sim 21$  mil (34%) a familia,  $\sim 17$  mil (28%) a género y solo  $\sim 8$  mil (13%) ASVs identificados a nivel especie (Fig. 9). La distribución de ASVs dentro de cada grupo de eucariotas reveló una mayoría de algas ( $\sim 63\%$ ), seguido de otros eucariotas ( $\sim 18\%$ ) e invertebrados ( $\sim 16\%$ ), y por último hongos ( $\sim 2.1\%$ ) y vertebrados ( $\sim 0.5\%$ ) con una contribución menor (Fig. 9).



**Figura 9.** Resolución taxonómica de ADNa18S. Número de ASVs anotados a cada rango taxonómico (de phylum a especie) para (a) el conjunto de eucariotas, (b) algas, (c) otros eucariotas, (d) invertebrados, (e) hongos y (f) vertebrados.

La comparación entre la composición esperada de la comunidad *mock* (hecha a partir de concentraciones equimolares de 25 metazoos de identidad conocida) y la observada (al procesarla vía ADNa18S), reveló que los 25 taxa fueron recuperados a distinto nivel de resolución

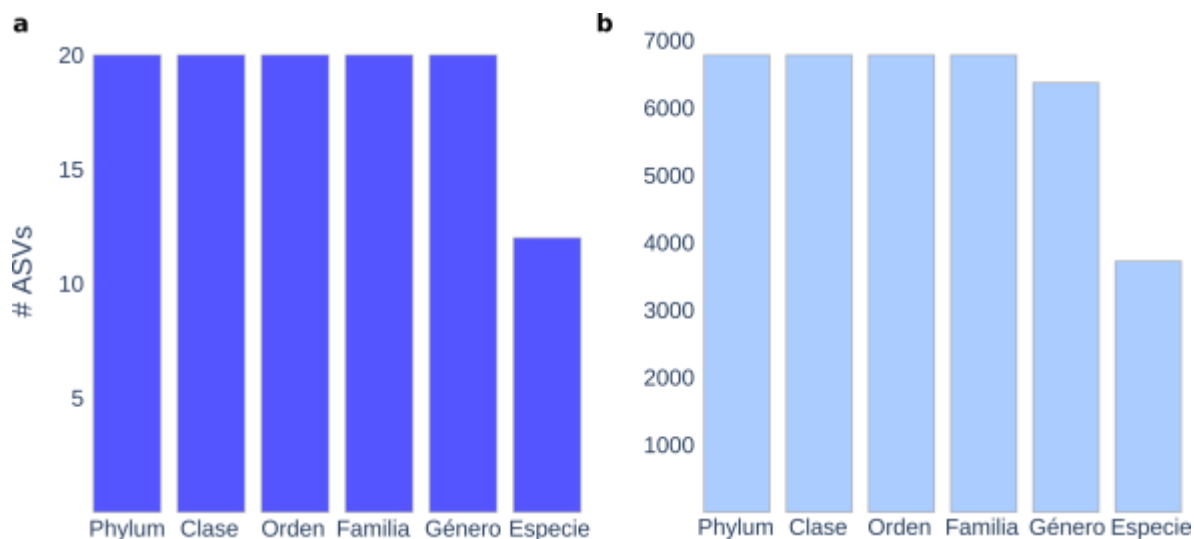
taxonómica, abarcando el 91% de las secuencias obtenidas en la muestra. No se recuperaron anotaciones a nivel especie. Sin embargo, solo cinco de los 25 taxa contaron con una referencia genética del metabarcoteo 18S. De las 23 especies esperadas, se identificaron 5 a nivel género (*Lepas*, *Stegastes*, *Pinctada*, *Atrina* y *Pinna*), dos a nivel familia (Paguridae y Cidaridae), 7 a nivel orden (Decápoda, Anthoathecata, Pectinida, Cycloneritida y Neogastropoda). Los dos taxa esperados restantes, identificados morfológicamente a clase (Malacostraca) y phylum (Sipuncula), fueron recuperados a igual rango (Tabla 6). Múltiples ASVs fueron identificados dentro de cada taxa esperado, y la distribución de secuencias fue muy dispar, desde 0.001% hasta 53% de lecturas asociadas a un taxa esperado.

**Tabla 6.** Comunidad *mock*. Diversidad taxonómica de taxa esperados en la comunidad *mock*, señalando en color verde el nivel taxonómico al cual fueron identificados mediante metabarcoding de 18S.

Phylum	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Arthropoda	Hexanauplia	Pedunculata	Lepadidae	<i>Lepas</i>	<i>L. anserifera</i>
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Diogenidae	<i>Calcinus</i>	<i>C. californiensis</i>
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Portunidae	<i>Callinectes</i>	<i>C. bellicosus</i>
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Paguridae	<i>Manucomplanus</i>	<i>M. varians</i>
Arthropoda	Malacostraca				
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Chaetodontidae	<i>Johnrandallia</i>	<i>J. nigrirostris</i>
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Pomacanthidae	<i>Holacanthus</i>	<i>H. passer</i>
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Pomacentridae	<i>Stegastes</i>	<i>S. rectifraenum</i>
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Serranidae	<i>Paralabrax</i>	<i>P. auroguttatus</i>
Chordata	Actinopteri	Perciformes	Serranidae	<i>Paranthias</i>	<i>P. colonus</i>
Cnidaria	Anthozoa	Antipatharia	Antipathidae	<i>Antipathes</i>	<i>A. galapagensis</i>
Cnidaria	Hydrozoa	Anthoathecata	Hydractiniidae	<i>Janaria</i>	<i>J. mirabilis</i>
Echinodermata	Echinoidea	Camarodonta	Toxopneustidae	<i>Toxopneustes</i>	<i>T. roseus</i>
Echinodermata	Echinoidea	Cidaroida	Cidaridae	<i>Eucidaris</i>	<i>E. thouarsii</i>
Echinodermata	Ophiuroidea	Ophiurida	Ophiocomidae	<i>Ophiocoma</i>	<i>O. aethiops</i>
Mollusca	Bivalvia	Ostreida	Margaritidae	<i>Pinctada</i>	<i>P. mazatlanica</i>
Mollusca	Bivalvia	Pectinida	Spondylidae	<i>Spondylus</i>	<i>S. limbatus</i>
Mollusca	Bivalvia	Pectinida	Spondylidae	<i>Spondylus</i>	<i>S. princeps</i>
Mollusca	Bivalvia	Pterioida	Pinnidae	<i>Atrina</i>	<i>A. maura</i>
Mollusca	Bivalvia	Pterioida	Pinnidae	<i>Pinna</i>	<i>P. rugosa</i>
Mollusca	Gastropoda	Cycloneritida	Neritidae	<i>Nerita</i>	<i>N. scabricosta</i>
Mollusca	Gastropoda	Neogastropoda	Muricidae	<i>Plicopurpura</i>	<i>P. columellaris</i>
Mollusca	Gastropoda	Nudibranchia	Glaucidae	<i>Glaucus</i>	<i>G. atlanticus</i>
Mollusca	Gastropoda	Pleurobranchomorpha	Pleurobranchidae	<i>Berthellina</i>	<i>B. ilisima</i>
Sipuncula					

Durante el curado de la taxonomía y clasificación de peces detectados por ADN<sub>12S</sub>, se identificó una pequeña proporción de 20 ASVs adjudicados a peces crípticos, mientras que 6,784 ASVs fueron de peces conspicuos (Fig. 10). De acuerdo con estos valores, solo un 0.04% de las secuencias y 0.29% de los ASVs identificadas por metabarcoding de ADN ambiental 12S fueron de peces crípticos. Todos los ASVs crípticos fueron identificados hasta género, con 12 (60%) de ellos anotados también a nivel especie. Todos los ASVs conspicuos fueron identificados a nivel familia, con 6,374 (94%) ASVs anotados a género y 3,726 (55%) a especie. Cabe destacar que, investigando la contribución de la referencia local de peces en la anotación de 12S, se detectaron valores de *bootstrap* entre 30 y 50 en aquellos casos en que la referencia resultó indistinguible entre dos o

tres especies emparentadas (por ejemplo, géneros *Paraclinus* y *Stegastes*), mientras que aquellas referencias discriminables contaron con valores de *bootstrap* del 100% o cercanos.



**Figura 10.** Resolución taxonómica de ADNa12S. Número de ASVs anotados a cada rango taxonómico (de phylum a especie) para (a) peces crípticos y (b) peces conspicuos.

### 7.2.2 Censos visuales submarinos

El procesamiento de censos visuales para eucariotas se realizó reteniendo 8 transectos al azar en cada sitio donde se muestreó ADN ambiental. Partiendo de 71,460 ocurrencias crudas de censos visuales de peces y macro-invertebrados, se retuvieron 28,269 (82%) dentro de 316 transectos realizados simultáneamente con el muestreo de ADNa18S, con ocurrencias adjudicadas un 79% a vertebrados (peces) y 21% a invertebrados (Tabla 4). Los 167 taxa identificados en total fueron anotados en su mayoría (83%) a nivel especie, de los cuales 96 fueron vertebrados y 71 invertebrados.

La clasificación de censos visuales enfocada a peces fue más inclusiva que eucariotas, utilizando un umbral de distancia entre todos los censos visuales disponibles y sitios de ADNa12S. A partir de 56,375 ocurrencias iniciales de peces, la misma clasificación resultó para los dos umbrales de distancia evaluados (~11 y ~28 km), reteniendo un total de 47,366 (84%) de ocurrencias (Tabla 5) dentro de 293 transectos adjudicados a los 25 sitios finales ADNa12S (Figura 8). El rango de agrupación fue de seis transectos en el Bajo Seco Sur (BSS), a 24 en San Pedro Nolasco (SPN), con un promedio de 12 y desvío estándar de 4 transectos. Las anotaciones taxonómicas de censos

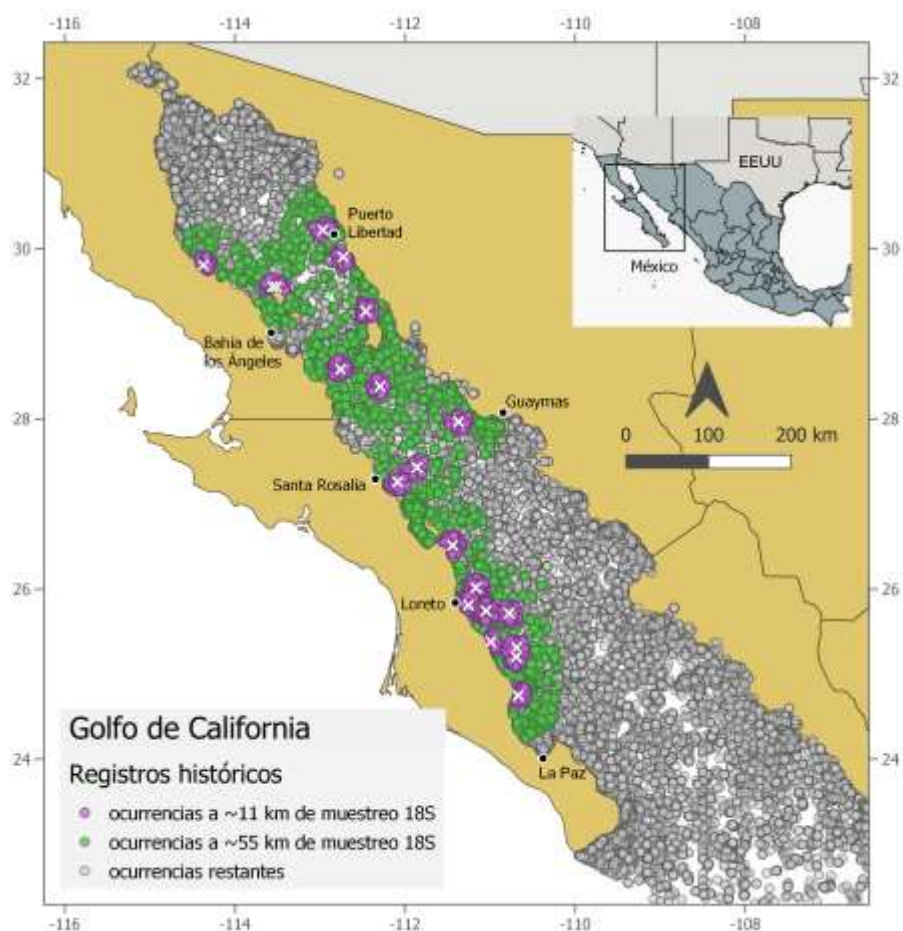
visuales llegaron en su mayoría a especie, con la excepción de un taxa críptico y 6 conspicuos identificados hasta género. En los censos visuales, solo el 0.42% de las ocurrencias fueron adjudicadas a peces crípticos.

### **7.2.3 Capturas de peces**

Bajo el umbral de distancia de ~11 km de los sitios de ADN<sub>a</sub>12S, 871 (20%) de 4,274 individuos fueron descartados, quedando solo 7 sitios con información de capturas. En cambio, bajo el umbral de inclusión de ~28 km, el porcentaje de individuos descartado disminuyó a 13% (Tabla 5), y un total de 12 sitios del muestreo de 12S resultaron con datos de capturas. También se incorporó a Bahía de los Ángeles (BLA) al análisis, el único sitio restante dentro del área geográfica de estudio, localizado a 65 km de distancia del ADN<sub>a</sub>12S más cercano. A pesar de no caer en el criterio de inclusión, en este sitio se dio un gran esfuerzo de capturas, incluyendo 13 cuadrantes, 366 individuos capturados y dos especies exclusivas, con un aporte sustancial a la caracterización del Golfo Norte, ya que los otros sitios norteños solo cuentan con 3 a 6 cuadrantes, y niveles de diversidad notablemente menores. Posterior a la clasificación, se retuvo el criterio más inclusivo de agrupación, recuperando desde tres cuadrantes en isla Tiburón (TIB) e isla San Lorenzo (LOR), hasta 16 cuadrantes en el Bajo Seco Sur (BSS), con un promedio de 9 y desvío estándar de 5 cuadrantes por sitio. La mayoría de los peces capturados fueron identificados a nivel especie, excepto dos anotaciones a nivel género. En este caso, el 96% de los organismos capturados fueron crípticos.

### **7.2.4 Registros históricos**

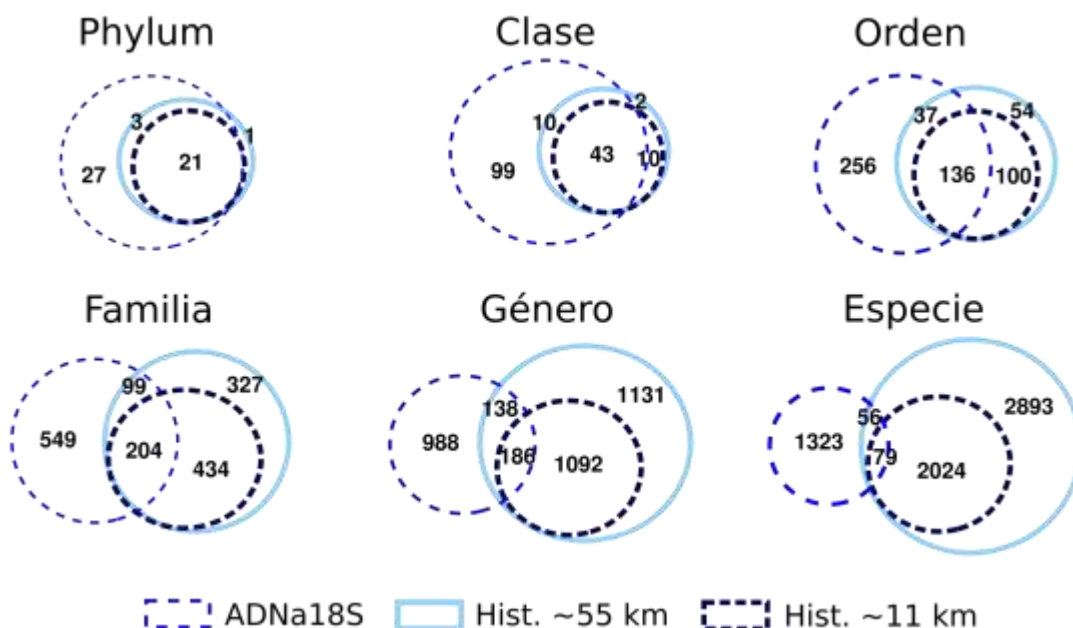
Con respecto a grandes grupos de eucariotas, la unión de ocurrencias históricas a sitios de monitoreo bajo dos umbrales de distancia (~11 km y ~55 km) resultó en diferentes grados de retención de datos (Fig. 11). Bajo el umbral de ~11 km se retuvieron solo 5,892 ocurrencias (8% del total) de 2,103 especies distintas. Al ampliar el umbral espacial, se incluyeron 131,980 ocurrencias (46% del total) de la base original (Tabla 4), correspondientes a 5,052 especies. La distribución de ocurrencias bajo este criterio fue de 58.19% vertebrados, seguido por invertebrados (25.89%), algas (13.09%), otros eucariotas (2.77%), y pocos hongos (0.05%).



**Figura 11.** Mapeo de ocurrencias históricas a sitios monitoreados. Mapa de ocurrencias históricas individuales georreferenciadas, clasificadas de acuerdo con un umbral de ~11 km y ~55 km de los sitios de monitoreo de ADNa18S.

El nivel de coincidencias taxonómicas incrementó al ampliar el criterio de inclusión (Fig. 12), especialmente para niveles taxonómicos bajos, mostrando un incremento de 41% de especies compartidas, 43% de géneros y 33% de familias compartidas. A mayores niveles el incremento fue de 21% para órdenes, 19% para clases y 12% para phyla compartidos.





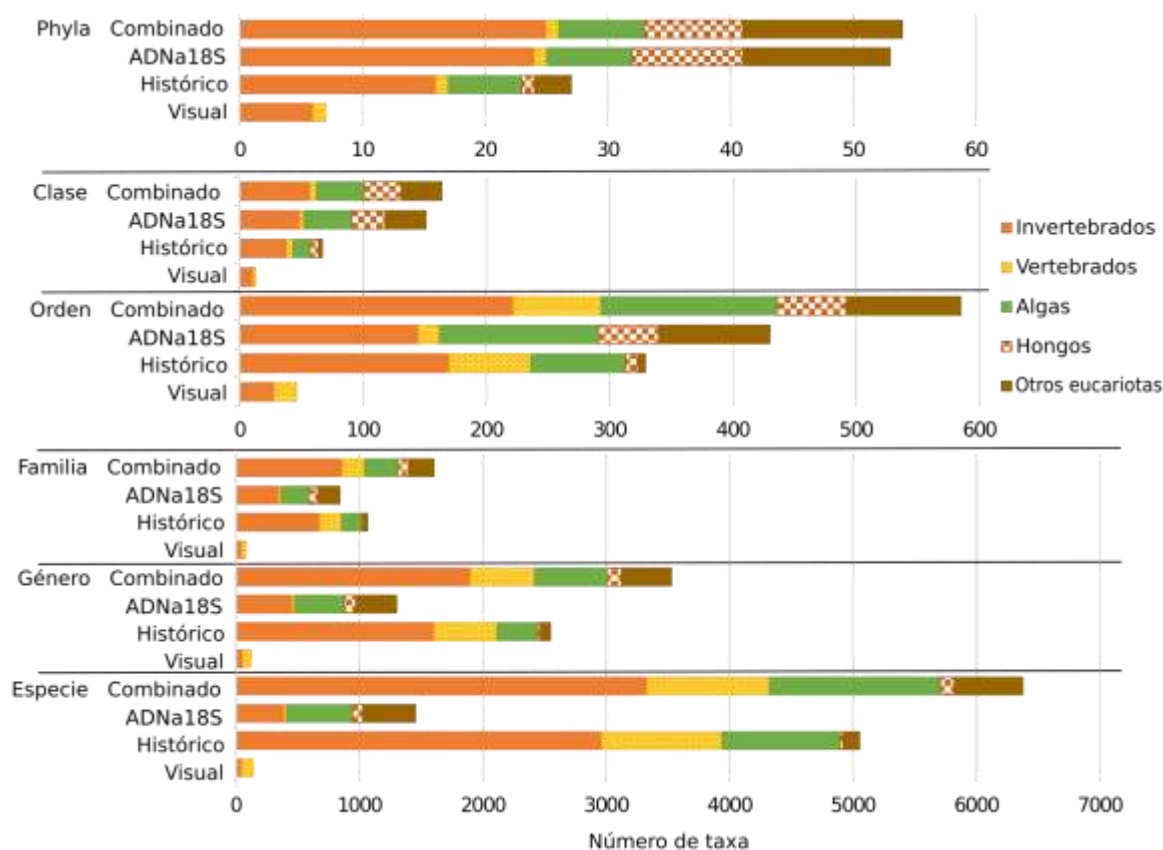
**Figura 12.** Inclusión de de ocurrencias históricas de acuerdo con distancia de ADNa18S. Diagrama de Venn mostrando coincidencias taxonómicas, de phylum a especie, entre ADNa18S y el criterio angosto (~11 km) y amplio (~55 km) de clasificación de ocurrencias históricas.

Con respecto a peces, el filtrado taxonómico de la base de datos históricos de vertebrados, con 76,801 ocurrencias iniciales, resultó en un total de 65,137 (85% de vertebrados) ocurrencias adjudicadas a peces óseos y cartilaginosos (Tabla 5). Las anotaciones taxonómicas de datos históricos fueron en su totalidad a nivel especie. Para los datos históricos, el 18% de las ocurrencias fueron de peces crípticos.

### 7.3 Biodiversidad por método y grupo taxonómico

#### 7.3.1 Grandes grupos de eucariotas

El nuevo compilado global de eucariotas generado mediante la combinación de ADNa18S, censos visuales y datos históricos, para la región geográfica abarcada del Golfo de California, incluyó al menos 52 phyla (considerando el agrupamiento de múltiples linajes independientes en tres grupos, Algae NA, dino NA para dinoflagelados, y otros NA), 160 clases, 577 órdenes, 1,599 familias, 3,525 géneros y 6,375 especies (Fig. 13).

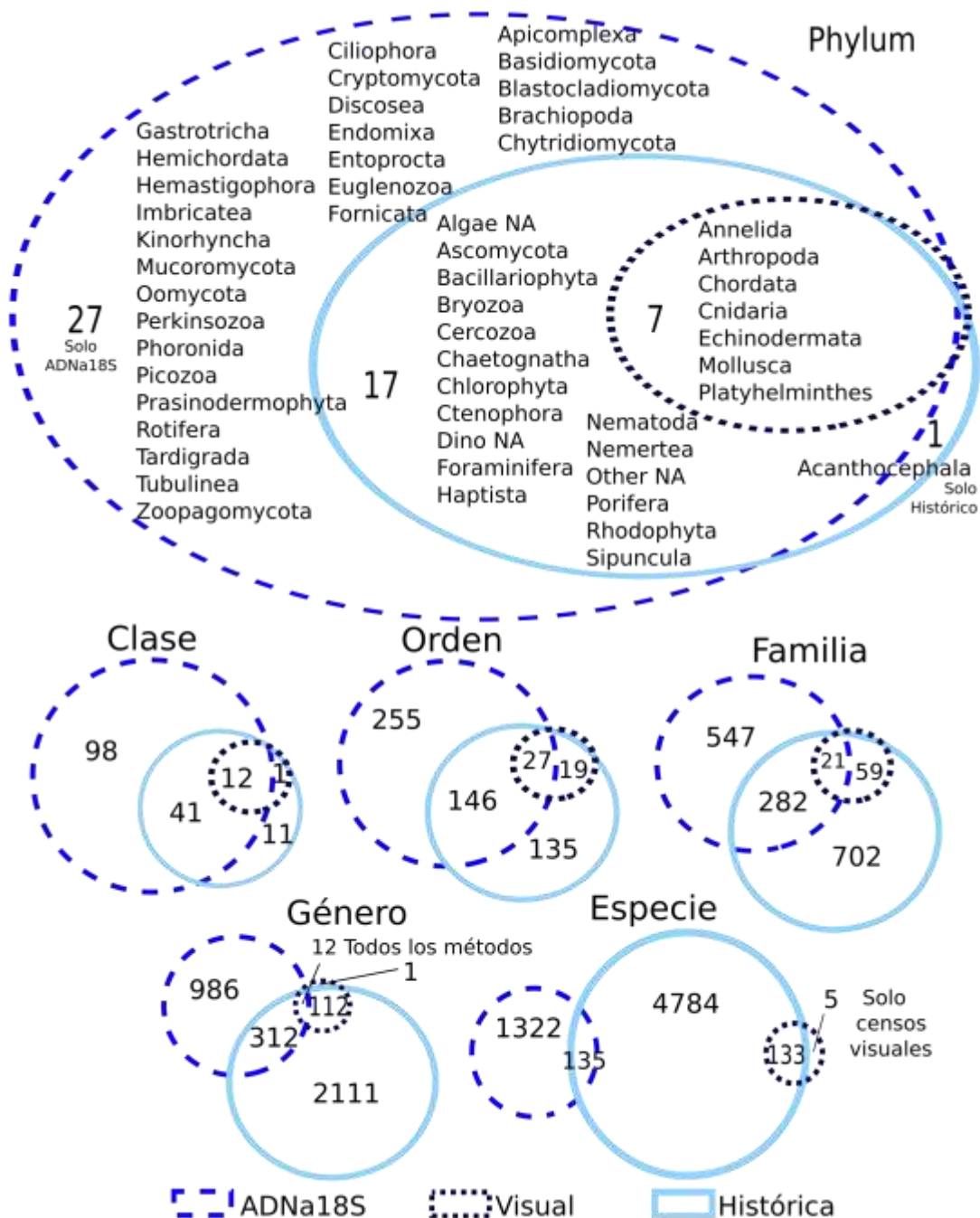


**Figura 13.** Riqueza taxonómica de eucariotas de las regiones Norte y Central del Golfo de California. Diagrama de barras apiladas con número de taxa, de phylum a especie, recuperados por método (ADNa18S, censos visuales y datos históricos) y por grupo de eucariotas (invertebrados, vertebrados, algas, hongos y otros eucariotas).

La contribución de cada método a los niveles de riqueza detectados globalmente varió de acuerdo con el rango taxonómico y grupo de eucariotas objetivo. A mayores niveles taxonómicos (phylum, clase y orden), ADNa18S representó la principal contribución, con 98% de todos los phyla, 93% de clases y 73% de los órdenes recuperados. Los registros históricos fueron el segundo contributivo, con 48% de los phyla, 41% de clases, y 57% de órdenes reportados. Los censos visuales recuperaron el 13% de phyla y 8% de todas las clases y órdenes. En cambio, para niveles taxonómicos menores (de familia a especie), los datos históricos tuvieron el principal aporte, con 67% de familias a 79% de las especies recuperadas, mientras que en la base de ADNa18S se recuperaron 52% de las familias a 23% de las especies totales, y censos visuales recuperaron desde 5% de las familias a 2% de todas las especies (Fig. 13).

En cuanto a composición, la comparación taxonómica resultó en un patrón de traslape decreciente en taxa compartidos entre 18S e históricos, de mayor a menor rango taxonómico. Se

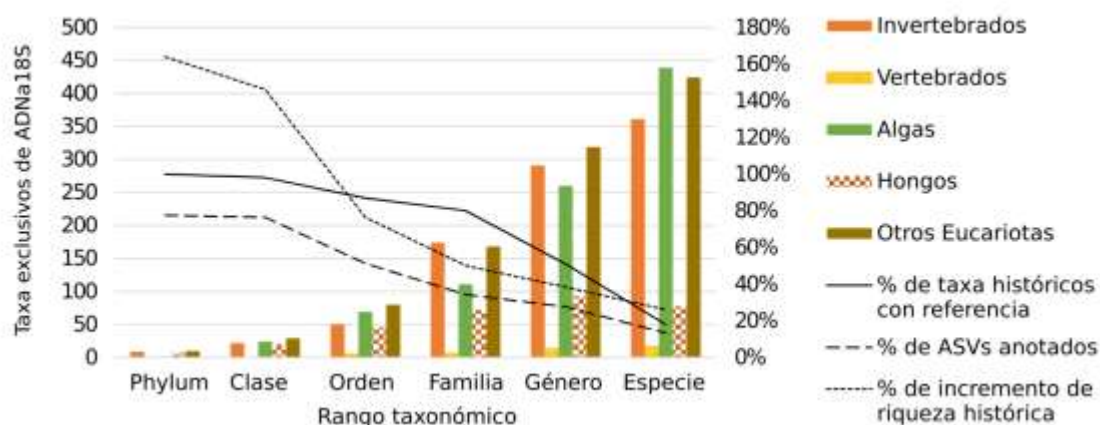
detectó un 46% de phyla y 33% de clases compartidas, mientras que solo hubo 9% de géneros y 2% de especies en común (Fig. 14). La diversidad recuperada por ADNa18S destacó diversos grupos taxonómicos microscópicos poco conocidos. El aporte de al menos 27 phyla incluye 10 micro-eucariotas, 9 invertebrados, 7 hongos, y dos phyla de algas (Fig. 14). Al menos otros 15 linajes con filogenia no resuelta fueron identificados dentro de los supergrupos SAR, Holozoa, Viridiplantae y CRuMS. En cuanto a caracterización trófica y hábitat, se detectaron mayoritariamente organismos fagotróficos pertenecientes al plankton, con menor incidencia de organismos osmotróficos, simbioses, mixótrofos o parasíticos, y organismos del bentos (Anexo C).



**Figura 14.** Contribución por método a la diversidad taxonómica de eucariotas del Centro y Norte del Golfo de California. Diagrama Venn de riqueza taxonómica, de phylum a especie, comparando ADNa18S, censos visuales y datos históricos.

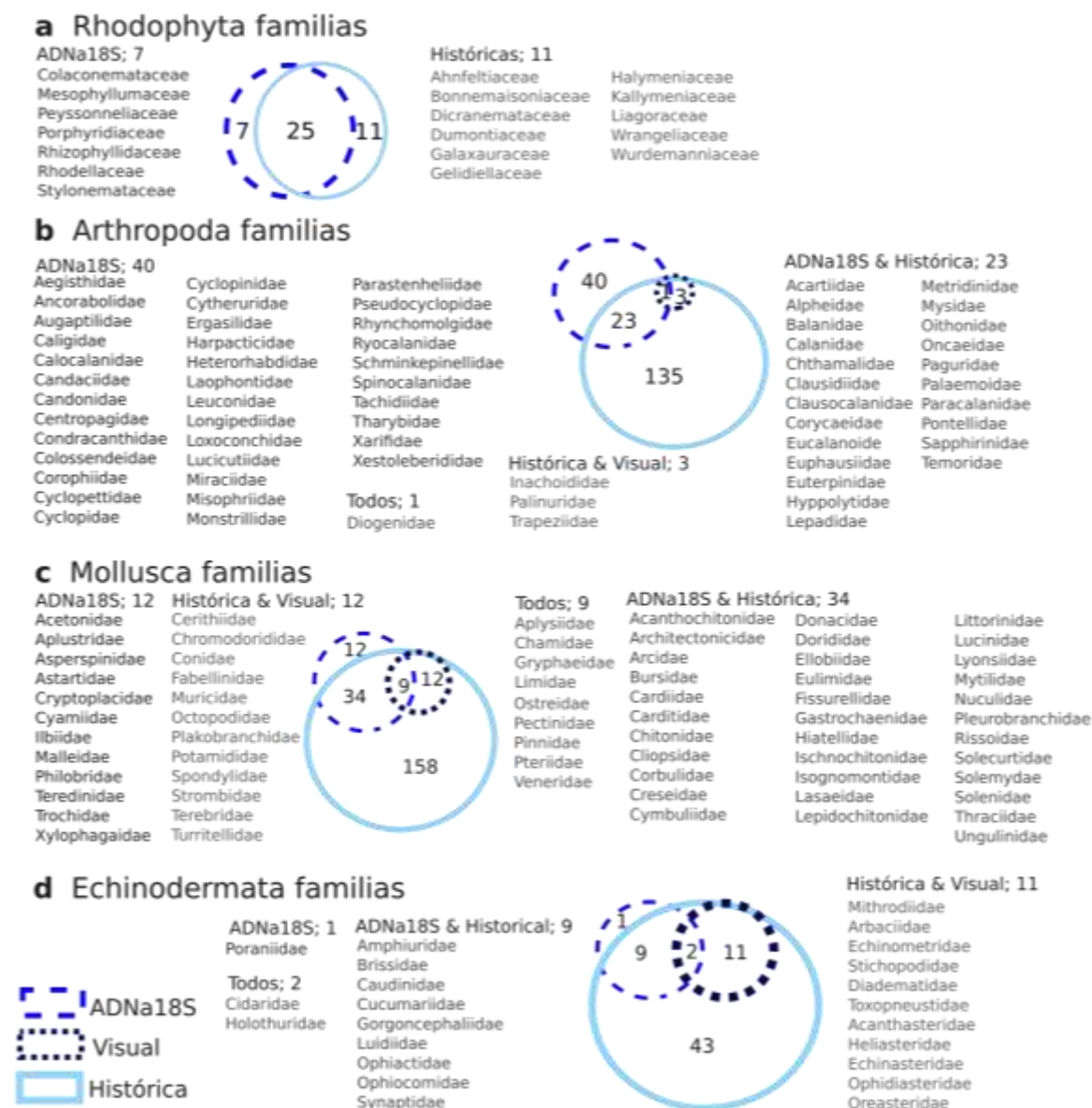
Mientras que los censos visuales aportaron cinco especies y un género al compilado histórico (Fig. 14), los aportes por parte de ADNa18S denotaron un incremento de 164% a nivel phylum, un

146% de incremento de clases, 76% de órdenes, 51% de familias, 38% de géneros y 26% de incremento en la diversidad de especies históricas (Fig. 15). A su vez, se identificó una tendencia similar en el porcentaje de representación de riqueza histórica en los repositorios GenBank y ENA, con un 100% de representación a nivel phylum, 98% de clases incluidas, 87% de órdenes y 80% de familias, disminuyendo a 51% para géneros y tan solo 18% de las especies históricas del Golfo con una referencia disponible (Fig. 15).



**Figura 15.** Contribución taxonómica exclusiva de ADN18S. Diagrama de barras con número de taxa (eje y principal, izquierda) aportados por el ADN18S al compilado histórico, de phylum a especie, para cada grupo de eucariotas. La línea sólida indica el porcentaje de taxa históricos con referencia genética disponible. La línea punteada gruesa muestra el porcentaje de ASVs anotados taxonómicamente para cada rango, y la línea punteada fina muestra el porcentaje de incremento al nivel histórico de riqueza (eje % secundario, derecha).

La comparación de métodos a nivel familia ejemplifica diferencias entre los métodos comparados. Con respecto a Rhodophyta, se observó una mayoría de familias compartidas (25) y aportes exclusivos comparables entre ADN18S (7) y datos históricos (11) (Fig. 16). En cambio, la contribución de ADN18S fue menor para invertebrados mejor estudiados, con 40 familias de artrópodos y 12 familias de moluscos (quienes poseen más de 200 familias históricamente cada uno). En este caso, los censos visuales aportaron cuatro y 21 familias, todas presentes en el registro histórico. El resultado fue diferente para equinodermos, un grupo de organismos macroscópicos y de fácil identificación en campo (66 familias en total), en donde una sola familia de las 10 detecciones fue exclusiva de ADN18S, y censos visuales aportaron 13 familias presentes en el registro histórico.

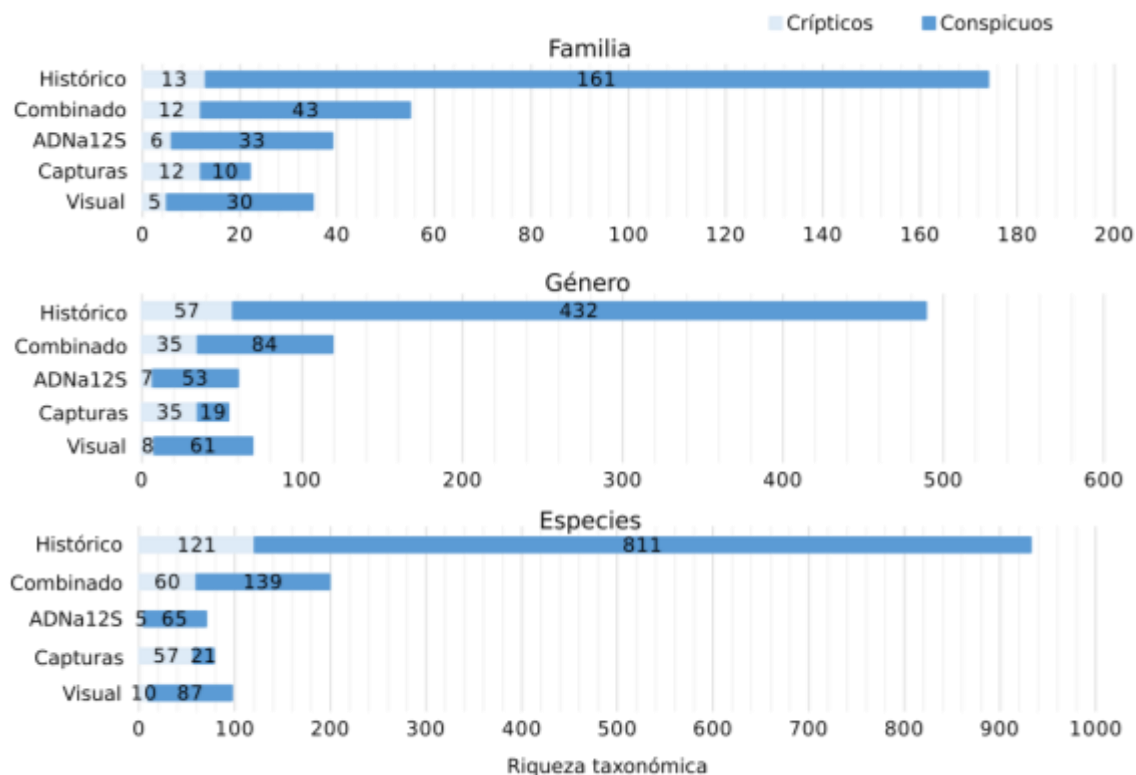


**Figura 16.** Composición de familias de algas rojas e invertebrados selectos. Diagrama de Venn de familias de (a) Rhodophyta, (b) Arthropoda, (c) Mollusca y (d) Echinodermata. Todas las familias excepto las exclusivamente históricas se muestran en la figura.

### 7.3.2 Peces crípticos versus conspicuos

Mediante la combinación de ADNa12S, censos visuales simultáneos y capturas con anestésico, se detectaron 12 familias, 35 géneros y 60 especies de peces crípticos. Los peces conspicuos tuvieron una riqueza de 43 familias, 84 géneros y 139 especies (Fig. 17). En cambio, el registro histórico incluyó 13 familias, 57 géneros y 121 especies de peces crípticos, y 161 familias, 432 géneros y 811 especies de peces conspicuos. Las familias más especiosas, tanto detectadas como históricas,

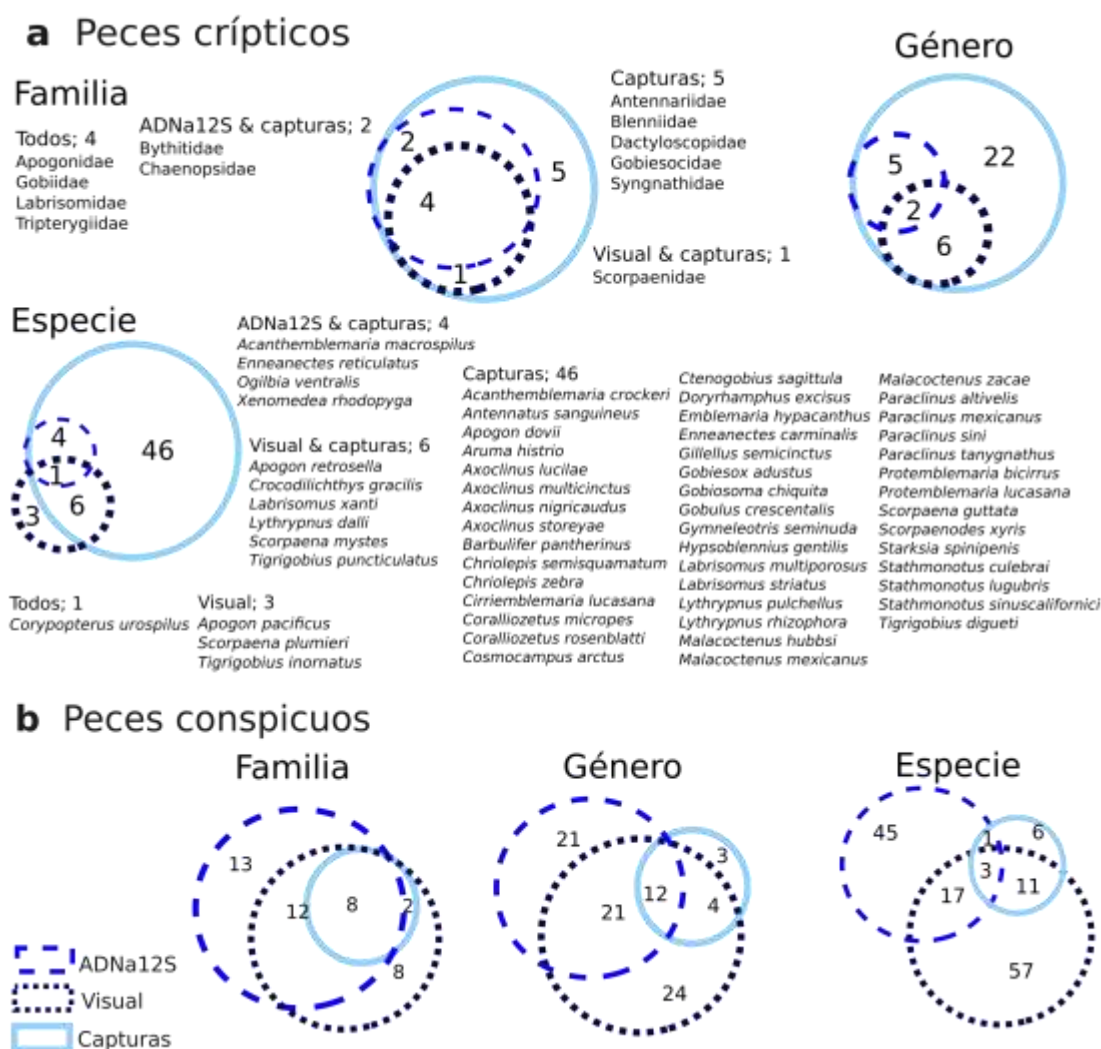
fueron Labrisomidae y Gobiidae para peces crípticos, y Serranidae y Labridae para peces conspicuos. Otras familias muy ricas en el registro histórico fueron Carangidae, Sciaenidae y Haemulidae.



**Figura 17.** Riqueza taxonómica de peces crípticos y conspicuos del Norte y Centro del Golfo de California. Diagrama de barras apiladas de número de familias, géneros y especies recuperadas a partir del ADNa12S, censos visuales y capturas, mediante métodos combinados e individuales, y valores de registros históricos de cada grupo de peces.

El aporte mayoritario a peces crípticos fue por parte de capturas con uso de anestesia, detectando cinco familias, 22 géneros y 46 especies exclusivamente (Fig. 18). Los censos visuales detectaron cinco familias, 8 géneros y tres especies presentes también en otros métodos. Entre las secuencias de ADNa12S se detectaron cinco especies crípticas no exclusivas. Cuatro de ellas, *Ogilbia ventralis*, *Acanthemblemaria macrospilus*, *Xenomedeia rhodopyga* y *Enneanectes reticulatus* también fueron capturadas, mientras que *Coryphopterus urospilus* y el género *Apogon* aparecieron en los tres métodos. Los censos visuales detectaron a *Apogon pacificus*, *Scorpaena plumieri* y *Tigrigobius inornatus*, además de 6 especies compartidas con las capturas, incluyendo a frecuentes y abundantes *Lythrypnus dalli*, *Crocodilichthys gracilis*, *Tigrigobius puncticulatus* y

*Apogon retrosella*, además de dos detecciones raras en capturas, *Scorpaena mystes* y *Labrisomus xanti* (Fig.18).



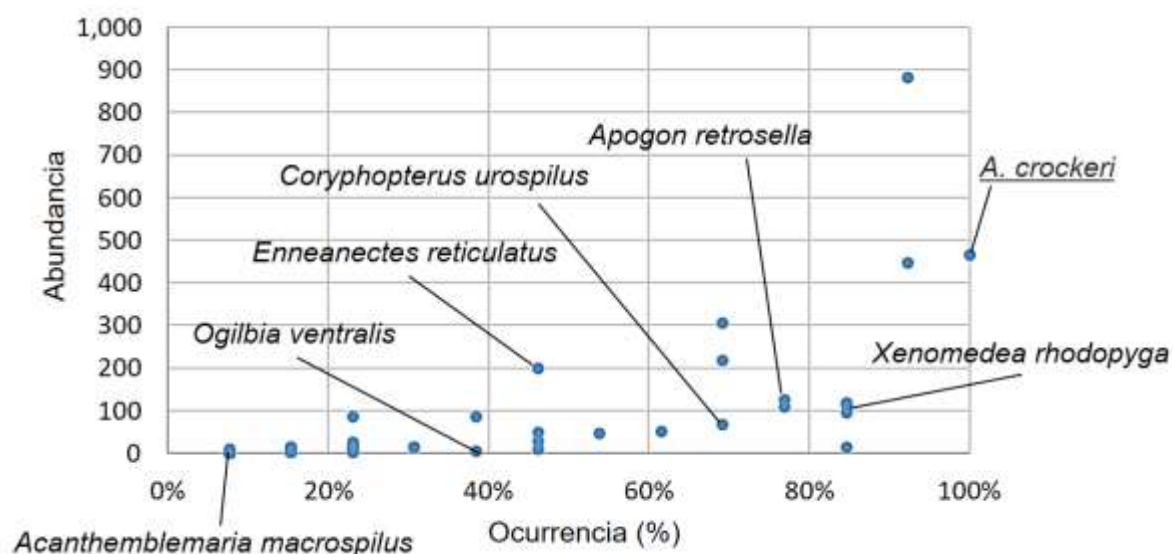
**Figura 18.** Contribución taxonómica por método a (a) peces crípticos y (b) conspicuos. Diagramas de Venn comparando composición de familias, géneros y especies detectadas vía ADNa12S, censos visuales y capturas. Los taxa crípticos detectados se incluyen en la figura.

La contribución de métodos a la diversidad de peces conspicuos fue diferente a crípticos. En este caso, ADNa12S y censos visuales fueron equiparables, con un aporte secundario hecho por capturas (Fig. 18). Tres especies aparecieron en todos los métodos, *Abudefduf troscheli*, *Cirrhilichthys oxycephalus* y *Halichoeres melanotis*. Los censos visuales detectaron 57 especies exclusivamente. A partir de ADNa12S se detectaron 45 especies exclusivas, y una compartida con capturas, *Pareques fuscovittatus*. En cambio, las capturas detectaron 6 especies ausentes en otros



métodos, *Anarchias galapagensis*, *Gymnothorax panamensis*, *Mycteroperca olfax*, *Pseudogramma thaumasia*, *Synodus lacertinus* y *Uropterygius microcephalus*.

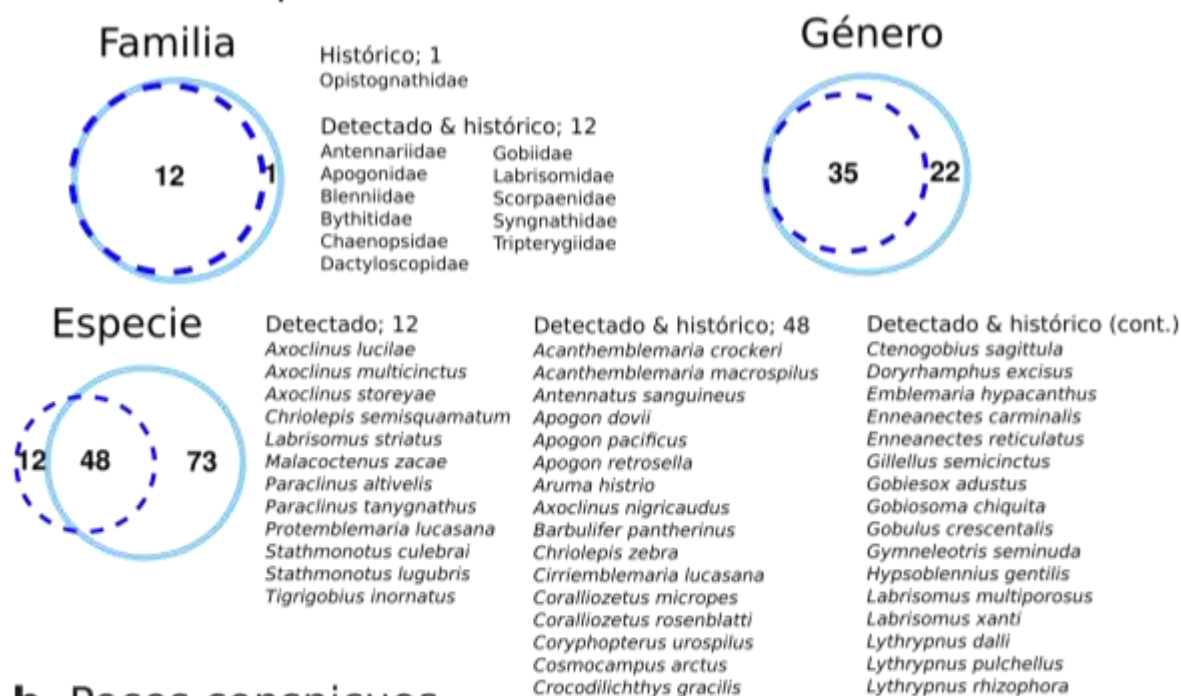
Las pocas detecciones crípticas de ADNa12S tuvieron 38-100% de frecuencia de detección e incluyen especies muy abundantes, de acuerdo con los datos de capturas (Fig. 19).



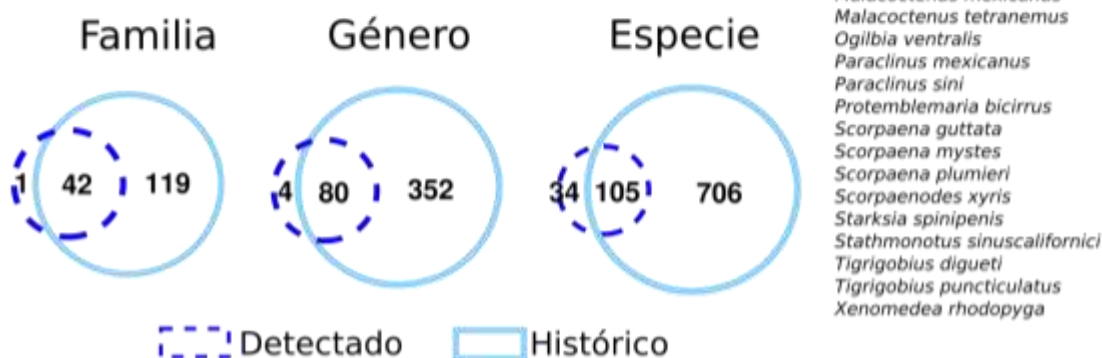
**Figura 19.** Detecciones de ADNa12S señaladas sobre diagrama de frecuencia-ocurrencia de especies de peces crípticos capturados. Las especies detectadas por ADNa12S se denotan sobre la figura, con la adición de *Acanthemblemaria crockeri*, especie congénérica, frecuente y abundante, de la especie rara detectada *A. macrospilus*.

La comparación entre los inventarios taxonómicos combinados de ADNa12S, censos visuales y capturas (i.e. detecciones) y los registros históricos, reveló diferencias entre peces crípticos y conspicuos (Fig. 20). Las detecciones incluyeron 12 de 13 familias crípticas presentes en el registro histórico, con excepción de Opistognathidae, y recuperaron el 61% de todos los géneros y 39% de las especies históricas. Las detecciones contribuyeron, a su vez, 12 especies crípticas ausentes en el registro histórico (Fig. 20).

## a Peces crípticos



## b Peces conspicuos



**Figura 20.** Diversidad taxonómica de (a) peces crípticos y (b) conspicuos según detecciones y registros históricos. Diagrama de Venn comparando familias, géneros y especies detectadas (vía ADN<sub>a</sub>12S, censos visuales y capturas combinadas) contra registros históricos. Para peces crípticos, todas las familias y las especies detectadas se mencionan en la figura (para especies conspicuas agregadas al compilado histórico, ver Tabla 7).

Para peces conspicuos, en cambio, los niveles históricos son mucho mayores a los detectados, recuperando 26% de familias, 18% de géneros y 13% de especies conspicuas históricas. Las detecciones aportaron la nueva familia Percidae, cuatro géneros, *Anarchias*, *Caesio*, *Dorosoma* y *Lactoria*, y 34 especies al compilado histórico (Fig. 20, Tabla 7).

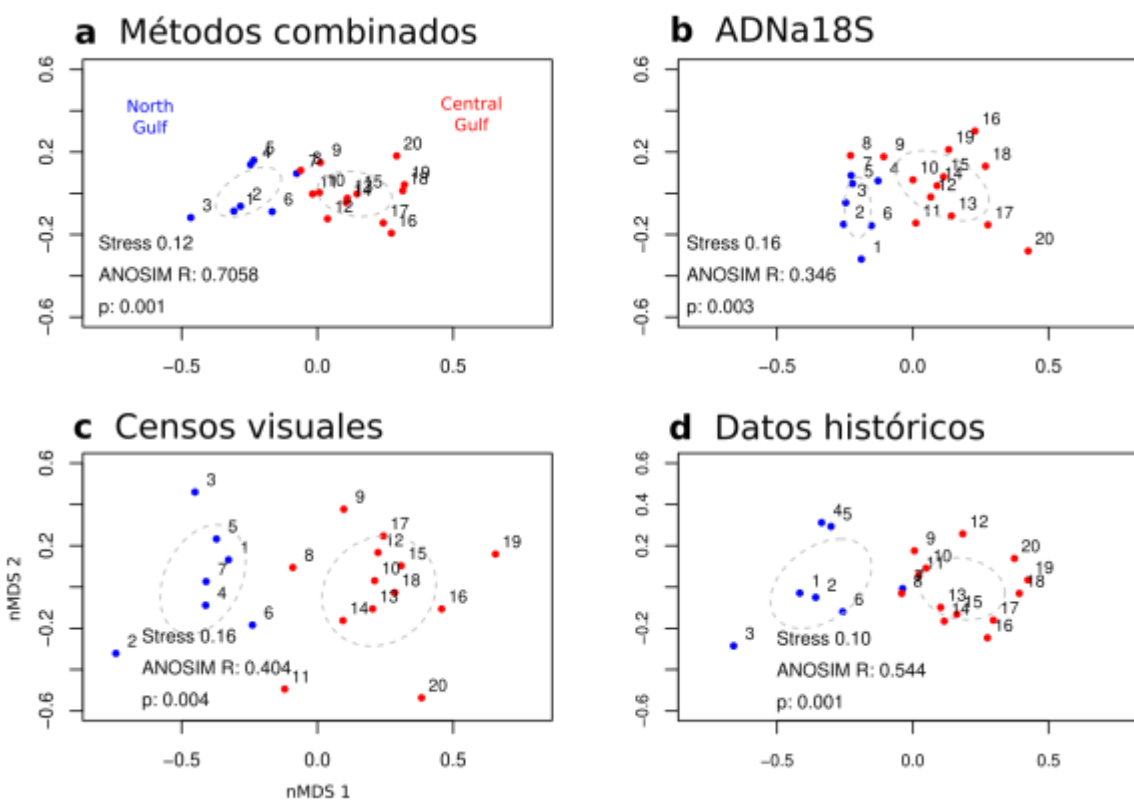
**Tabla 7.** Especies conspicuas detectadas que no se encontraron en el compilado histórico.

<i>Acanthurus bahianus</i>	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>
<i>Acanthurus blochii</i>	<i>Lutjanus indicus</i>
<i>Anarchias galapagensis</i>	<i>Lutjanus lutjanus</i>
<i>Balistes vetula</i>	<i>Lutjanus rivulatus</i>
<i>Bodianus rufus</i>	<i>Lutjanus stellatus</i>
<i>Caesio lunaris</i>	<i>Mulloidichthys vanicolensis</i>
<i>Canthigaster jactator</i>	<i>Mycteroperca olfax</i>
<i>Carangoides orthogrammus</i>	<i>Myripristis adusta</i>
<i>Cephalopholis urodeta</i>	<i>Nicholsina usta</i>
<i>Chromis alpha</i>	<i>Pomacanthus sexstriatus</i>
<i>Dorosoma petenense</i>	<i>Prionurus scalprum</i>
<i>Epinephelus bruneus</i>	<i>Seriola quinqueradiata</i>
<i>Euthynnus affinis</i>	<i>Thalassoma amblycephalum</i>
<i>Gymnothorax panamensis</i>	<i>Thunnus alalunga</i>
<i>Kyphosus cornelii</i>	<i>Thunnus maccoyii</i>
<i>Kyphosus labriformis</i>	<i>Thunnus thynnus</i>
<i>Lactoria diaphana</i>	<i>Urobatis maculatus</i>

## 7.4 Patrones regionales de biodiversidad

### 7.4.1 Patrones regionales de familias de eucariotas

La composición de familias considerando los inventarios taxonómicos completos de cada método, y el inventario global, coincidieron en la distinción de la región norte y central del Golfo de California (Fig. 21), con lazos débiles en los diagramas de nMDS (rango de stress = 0.10-0.16). El ANOSIM recabó diferencias significativas entre regiones para todos los métodos, con mejor acuerdo en los registros histórico (Fig. 21).



**Figura 21.** Estructura meta-comunitaria de familias de eucariotas por región. Diagramas nMDS y estadísticos de ANOSIM basados en la matriz de distancia de Jaccard de composición taxonómica entre regiones norte (azul) y centro (rojo) del Golfo de California para (a) métodos combinados, (b) ADNa18S, (c) censos visuales, y (d) registros históricos. Las elipses representan desviación estándar de puntos, y los números se corresponden con la Fig. 7.

Al evaluar la estructura meta-comunitaria de familias para combinaciones específicas de método y grupo, algunos conjuntos no fueron analizados por la baja diversidad recuperada. Este fue el caso para vertebrados detectados por ADNa18S (Tabla 7) y hongos de datos históricos (Tabla 8) en donde se detectaron 0-7 familias por sitio, mientras que para otros eucariotas de datos históricos no existen registros al norte de isla San Lorenzo (LOR; Tabla 8).

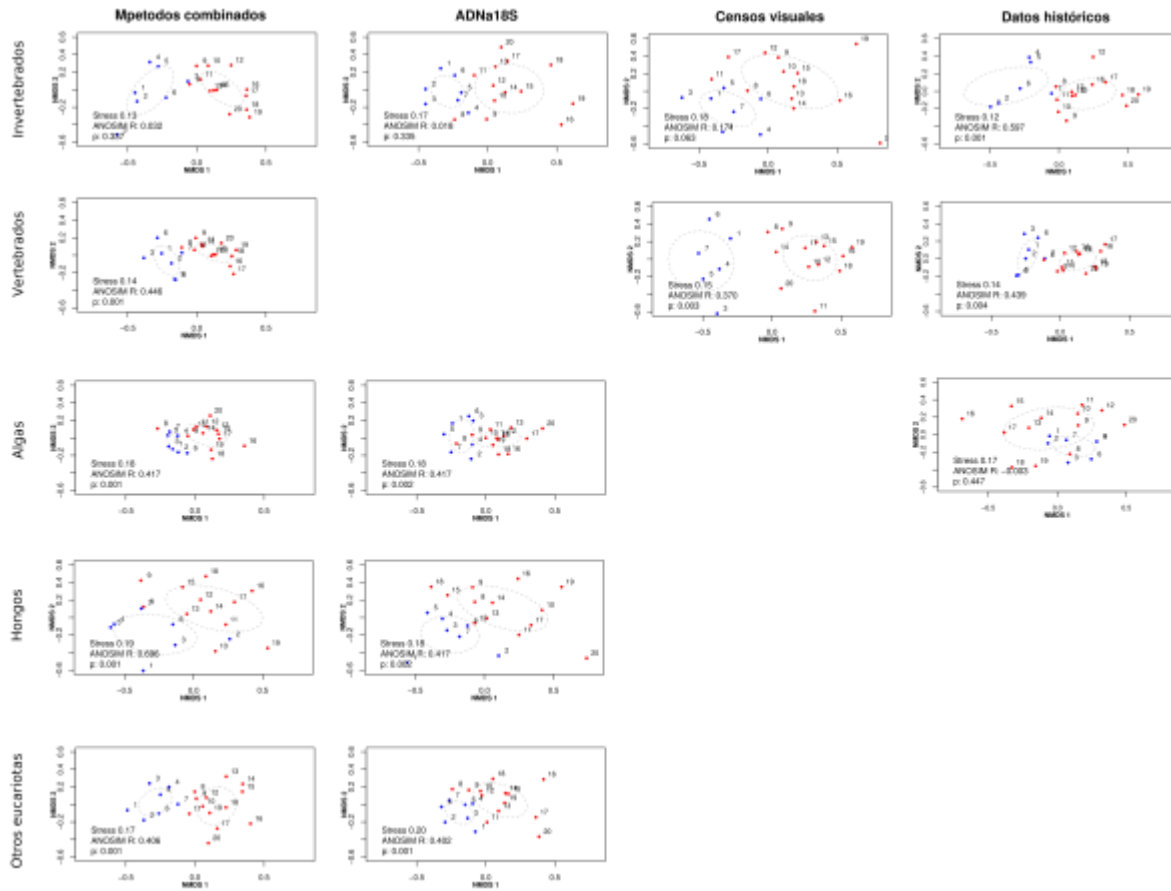
**Tabla 8.** Riqueza de familias de eucariotas, invertebrados y vertebrados por sitio. Número de familias detectadas mediante métodos combinados (com), ADN<sub>18S</sub> (ADN), censos visuales (vis) y datos históricos (hist) por sitio (ID) y región (R; N por Norte y C por Central). Metadata de sitios disponible en Tabla 1.

ID	R	Eucariotas				Invertebrados				Vertebrados			
		Com	ADN	Vis	Hist	Com	ADN	Vis	Hist	Com	ADN	Vis	Hist
PLO	N	573	289	31	341	269	107	18	182	98	6	13	95
PLI	N	570	263	26	352	248	72	14	191	99	2	12	98
SLG	N	503	251	23	292	196	70	14	134	93	2	9	92
AGU1	N	590	263	31	376	249	68	16	193	97	3	15	96
AGU2	N	596	275	29	387	268	84	17	204	98	6	12	96
PAT	N	546	245	31	361	239	74	18	188	93	1	13	92
LOR	N	712	265	35	519	371	81	19	318	107	1	16	106
SPM	C	696	266	41	496	366	90	22	300	113	2	19	112
SPN	C	743	230	36	576	388	75	20	338	128	3	16	125
TOR	C	727	268	38	529	361	89	20	299	123	2	18	122
MAR	C	707	284	30	502	337	100	18	270	124	0	12	124
PUL	C	654	261	37	464	293	69	20	254	104	1	17	103
CAR	C	736	348	31	476	351	114	13	281	108	6	18	106
DAN	C	653	247	33	463	312	71	18	265	102	1	15	102
MON	C	687	245	38	506	346	70	20	307	109	2	18	108
CAT	C	518	186	35	362	241	39	15	211	101	2	20	100
MAT	C	569	280	27	344	242	88	12	183	92	2	15	92
CRU	C	640	251	34	442	308	68	16	255	117	1	18	117
DIE	C	607	220	30	435	277	50	11	242	118	3	19	116
POR	C	742	251	22	569	367	84	7	318	127	2	15	127

**Tabla 9.** Riqueza de familias de algas, hongos y otros eucariotas por sitio. Número de familias detectadas mediante métodos combinados (com), ADN<sub>a</sub>18S (ADN) y datos históricos (hist) por sitio (ID) y región (R; N por Norte y C por Central). Metadata de sitios en Tabla 1.

ID	R	Algas			Hongos			Otros euk.		
		Com	ADN	Hist	Com	ADN	Hist	Com	ADN	Hist
PLO	N	130	100	64	15	15	0	65	65	0
PLI	N	130	96	63	22	22	0	73	73	0
SLG	N	123	89	65	18	17	1	75	75	0
AGU1	N	141	96	80	21	14	7	85	85	0
AGU2	N	139	101	80	23	16	7	70	70	0
PAT	N	132	90	79	17	15	2	68	68	0
LOR	N	138	96	79	20	16	4	78	73	12
SPM	C	124	90	68	19	16	3	77	71	13
SPN	C	140	79	91	25	18	7	65	58	15
TOR	C	152	95	93	20	20	0	74	64	16
MAR	C	155	101	97	16	16	0	77	69	11
PUL	C	160	107	90	19	16	3	81	71	14
CAR	C	140	116	59	18	17	1	122	98	30
DAN	C	136	96	66	18	17	1	87	64	30
MON	C	128	95	60	18	16	2	90	66	30
CAT	C	105	85	36	15	14	1	58	48	14
MAT	C	132	96	57	25	24	1	81	73	11
CRU	C	123	101	55	25	25	1	70	59	14
DIE	C	121	86	62	22	21	1	71	62	14
POR	C	156	84	110	23	22	1	71	61	13

Para las combinaciones método-grupo que contaron con niveles de riqueza comparable, se recuperaron mayoritariamente diferencias significativas entre norte y centro, excepto por algunos métodos dentro de invertebrados y algas (Fig. 22). Para invertebrados, solo los datos históricos mostraron diferencias significativas entre regiones (ANOSIM  $R = 0.597$ ,  $p = 0.001$ ), mientras que ADN<sub>a</sub>18S (ANOSIM  $R = 0.018$ ,  $p = 0.335$ ), censos visuales (ANOSIM  $R = 0.171$ ,  $p = 0.063$ ), y la base de métodos combinados (ANOSIM  $R = 0.032$ ,  $p = 0.337$ ) fueron no significativas. Para algas, en cambio, las diferencias fueron significativas para ADN<sub>a</sub>18S (ANOSIM  $R = 0.417$ ,  $p = 0.002$ ) pero no para datos históricos (ANOSIM  $R = -0.003$ ,  $p = 0.447$ ).



**Figura 22.** Estructura meta-comunitaria a nivel familia para cada combinación método-grupo entre el Norte y Centro del Golfo de California. Diagramas de nMDS (Jaccard) y estadísticos ANOSIM para toda métodos combinados e independientes (ADNa18S, censos visuales y datos históricos), y grupo de eucariotas (invertebrados, vertebrados, algas, hongos y otros eucariotas), separando norte (azul) y centro (rojo) del golfo. Las elipses representan la desviación estándar de los puntos y los números de sitios se corresponden con la Fig. 7.

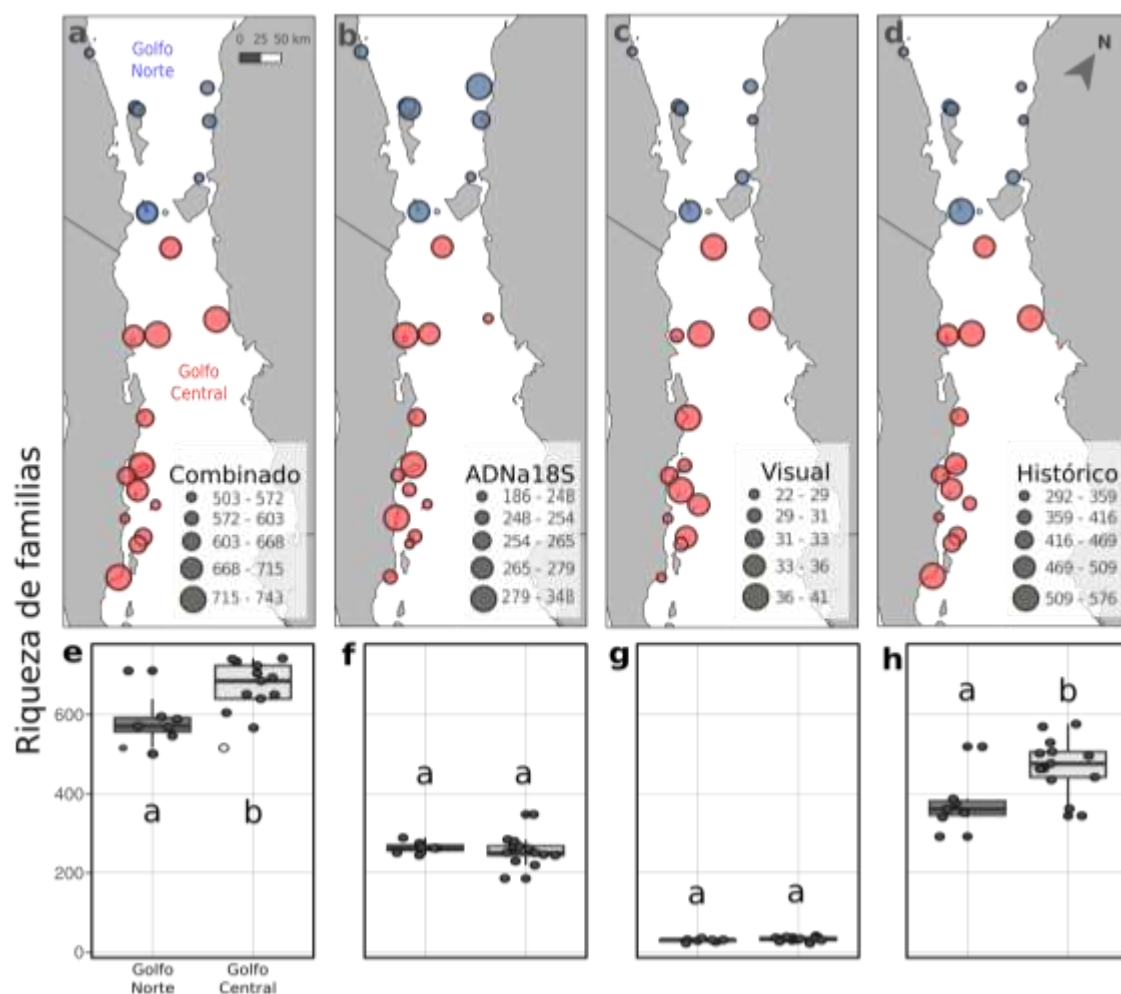
El análisis estadístico de riqueza regional detectó diferencias significativas entre cada método individualmente, y los métodos combinados (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 72.655$ ,  $df = 3$ ,  $p$ -valor =  $1.153e-15$ ; Tabla 9).

**Tabla 10.** Prueba de Kruskal-Wallis comparando la riqueza regional de familias entre cada método individual, y la base de de métodos combinados (p-valores ajustados con el método de Holm).

Comparación	Z	P.no ajustado	P. ajustado
Combinado-ADNa18S	5.307819	1.11E-07	4.44E-07
Combinado-histórico	2.511007	1.20E-02	1.20E-02
ADNa18S – histórico	-2.796812	5.16E-03	1.55E-02
Combinado-visual	8.050192	8.27E-16	4.96E-15
ADNa18S –visual	2.742373	6.10E-03	1.22E-02
histórico –visual	5.539185	3.04E-08	1.52e-07

El mapa de riqueza de familias de métodos combinados para todos los eucariotas presentó un rango de 503 a 473 familias por sitio (Fig. 23a). La riqueza resultó significativamente mayor en el Golfo Central (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 5.465$ ,  $df = 1$ , p-valor = 0.019; Fig. 23e). A partir de ADNa18S, se detectaron 186 a 348 familias por sitio (Fig. 23b), sin diferencias significativas entre regiones (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 0.631$ ,  $df = 1$ , p-valor = 0.427; Fig. 23f). Los censos visuales (Fig. 23c) recuperaron 22 a 41 familias, con diferencias no significativas entre regiones (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 2.665$ ,  $df = 1$ , p-valor = 0.103; Fig. 23g). Los registros históricos (Fig. 8d) tuvieron el principal aporte a la riqueza global de familias, y su distribución geográfica fue la más semejante a aquella de métodos combinados, con 292 a 576 detecciones por sitio, y niveles significativamente mayores en el Golfo Central (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 4.749$ ,  $df = 1$ , p-valor = 0.029; Fig. 23h).

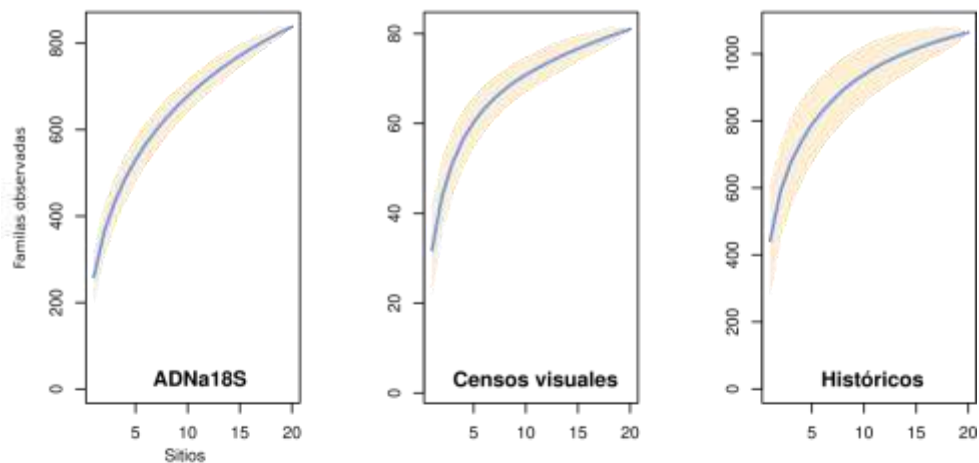




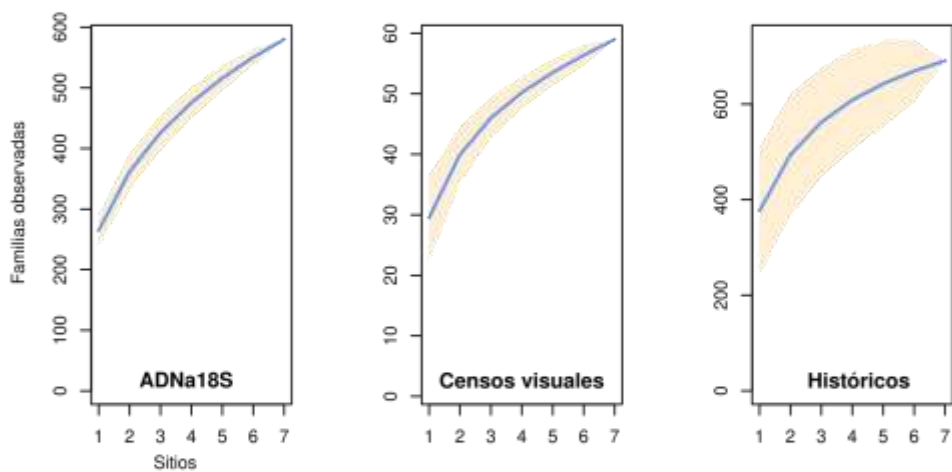
**Figura 23.** Distribución geográfica de diversidad taxonómica de familias de eucariotas para el Norte (azul) y Centro (rojo) del Golfo de California. Número de familias por sitio de acuerdo con cinco categorías cuantiles de tamaño, y diagrama de cajas (min-Q1-median-Q3-max) por región para: (a, e) métodos combinados, e individualmente para: (b, f) ADNa18S; (c, g) censos visuales; (d, h) datos históricos. Las letras del diagrama de cajas indican el resultado de la prueba Kruskal-Wallis de diferencias entre regiones dentro de cada método.

Las curvas de acumulación de familias para cada método, considerando el área de estudio completa o cada región independientemente, no alcanzaron el plateau en ningún caso (Fig. 24). El Golfo Norte ( $n = 7$ ) acumuló un 34% de las secuencias de ADNa18S, 25% de detecciones de censos visuales y 21% de ocurrencias históricas, mientras que el 66% de lecturas de ADNa18S, 75% de censos visuales, y 79% de ocurrencias históricas ocurrieron en el Golfo Central ( $n = 13$ ).

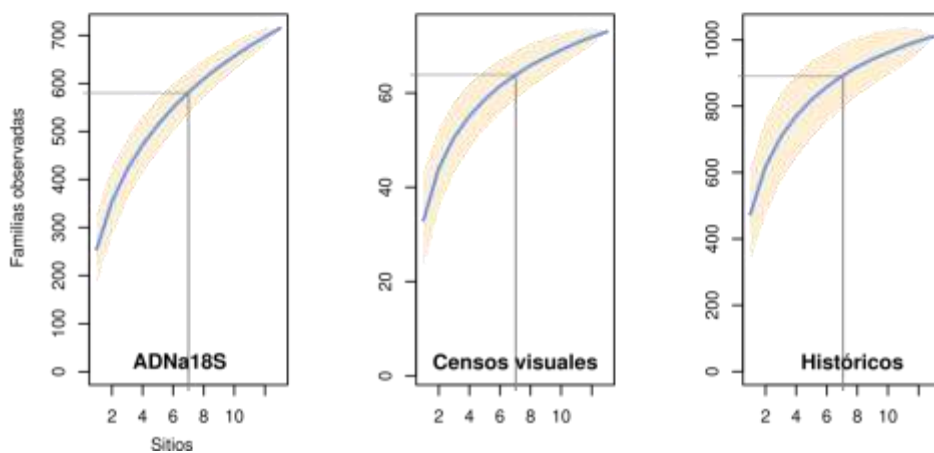
**a** Todos los sitios



**b** Golfo Norte



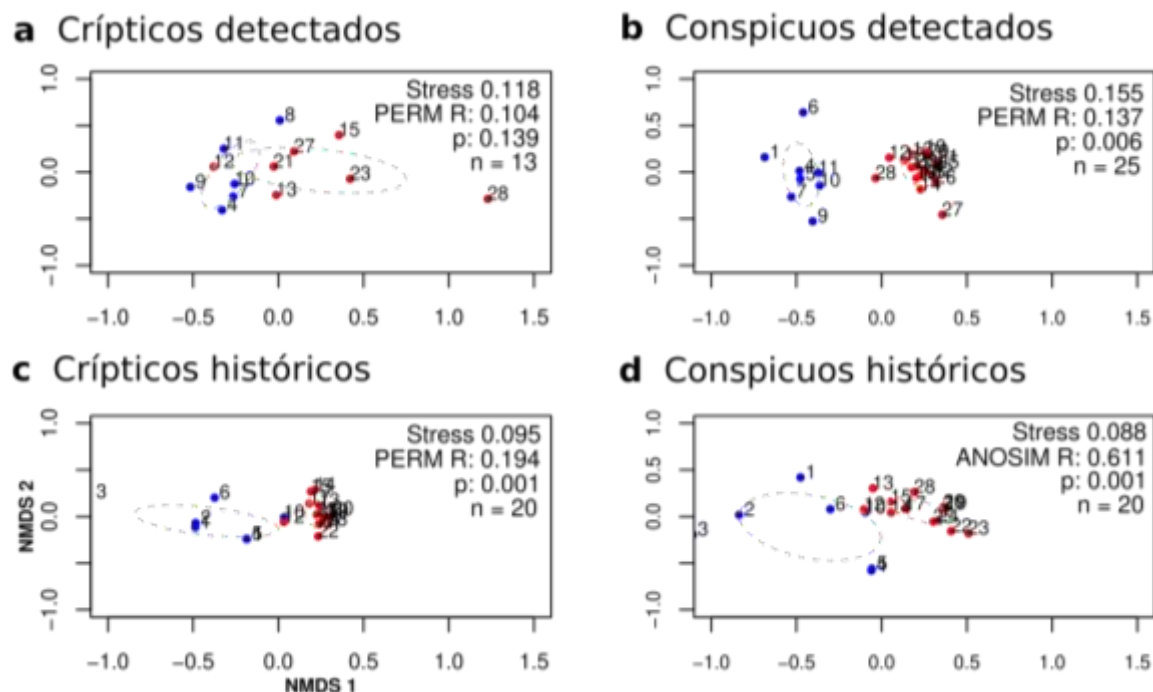
**c** Golfo Central



**Figura 24.** Curvas de acumulación de familias para ADNa18S, censos visuales y datos históricos para (a) todos los sitios, (b) región Norte y (c) región Central del Golfo de California.

### 7.4.2 Patrones regionales de especies de peces

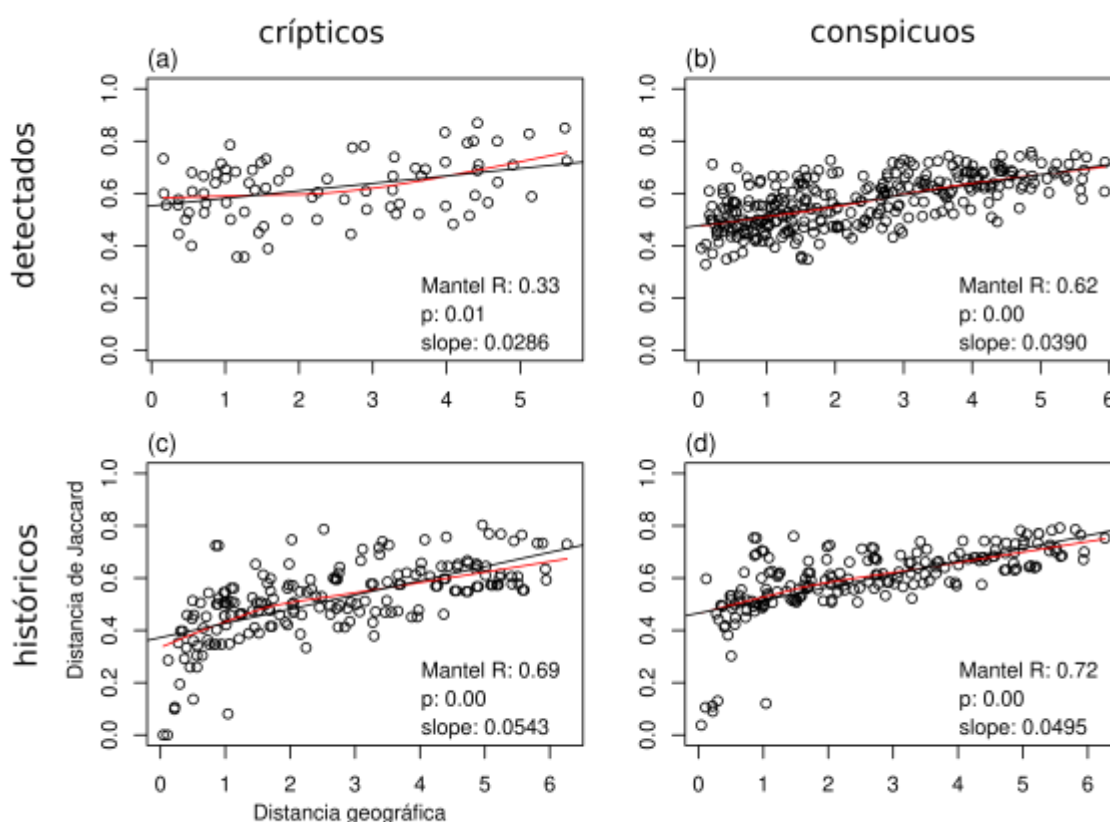
Los gráficos de nMDS mostraron segregación entre las regiones para los 4 conjuntos de datos: peces crípticos y conspicuos, para niveles detectados (mediante combinación de ADN<sub>a</sub>12S, censos visuales y capturas) e históricos (Fig. 25).



**Figura 25.** Diversidad beta detectada e histórica de peces crípticos y conspicuos entre regiones Norte y Central del Golfo de California. Gráficos de nMDS de peces crípticos detectados (a) e históricos (c), así como peces conspicuos detectados (b) e históricos (d), y estadísticas de pruebas PERMANOVA o ANOSIM basadas en la distancia de Jaccard de la composición de especies entre las regiones Norte (azul) y Central (rojo). Las elipses representan la desviación estándar de los puntos y los números de sitios se corresponden con la Fig. 8.

La comparación estadística de diversidad beta mostró diferencias significativas entre las regiones Norte y Central para los conjuntos de datos históricos de crípticos (PERMANOVA  $r^2 = 0.19$ , p-valor = 0.01) e históricos de conspicuos (ANOSIM R = 0.61, p-valor = 0.01), así como para los peces conspicuos detectados (PERMANOVA  $r^2 = 0.14$ , p-valor = 0.01), pero no para los peces crípticos detectados (PERMANOVA  $r^2 = 0.12$ , p-valor = 0.14). Sin embargo, los altos niveles de estrés en nMDS y una baja proporción de varianza explicada en las pruebas de PERMANOVA sugieren diferencias sutiles entre las regiones (Fig. 25).

La prueba de Mantel de correlación entre distancia geográfica y variación de la composición comunitaria (Fig. 26) mostró resultados significativos de tendencia similar en todos los casos, con una correlación más débil para los peces crípticos detectados (Mantel  $R = 0.33$ ,  $p$ -valor = 0.01), que para peces conspicuos detectados (Mantel  $R = 0.62$ ,  $p$ -valor = 0.00), peces crípticos históricos (Mantel  $R = 0.69$ ,  $p$ -valor = 0.00) y especies de peces conspicuos históricos (Mantel  $R = 0.72$ ,  $p$ -valor = 0.00).



**Figura 26.** Prueba de Mantel de correlación entre distancia geográfica y diferenciación comunitaria (Jaccard) de peces crípticos y conspicuos, detectados e históricos, en el Golfo de California. La línea recta indica la regresión modelada entre las matrices de distancia, y la línea suavizada en rojo sigue la dispersión de los datos sin procesar. Se indican el estadístico  $R$  de Mantel y el  $p$ -valor.

Al comparar la variación en la riqueza de especies se encontró que, en ausencia de capturas, los niveles de peces crípticos detectados variaban de cero a cuatro especies, mientras que se encontraron de 11 a 38 especies en sitios con capturas (Tabla 10).

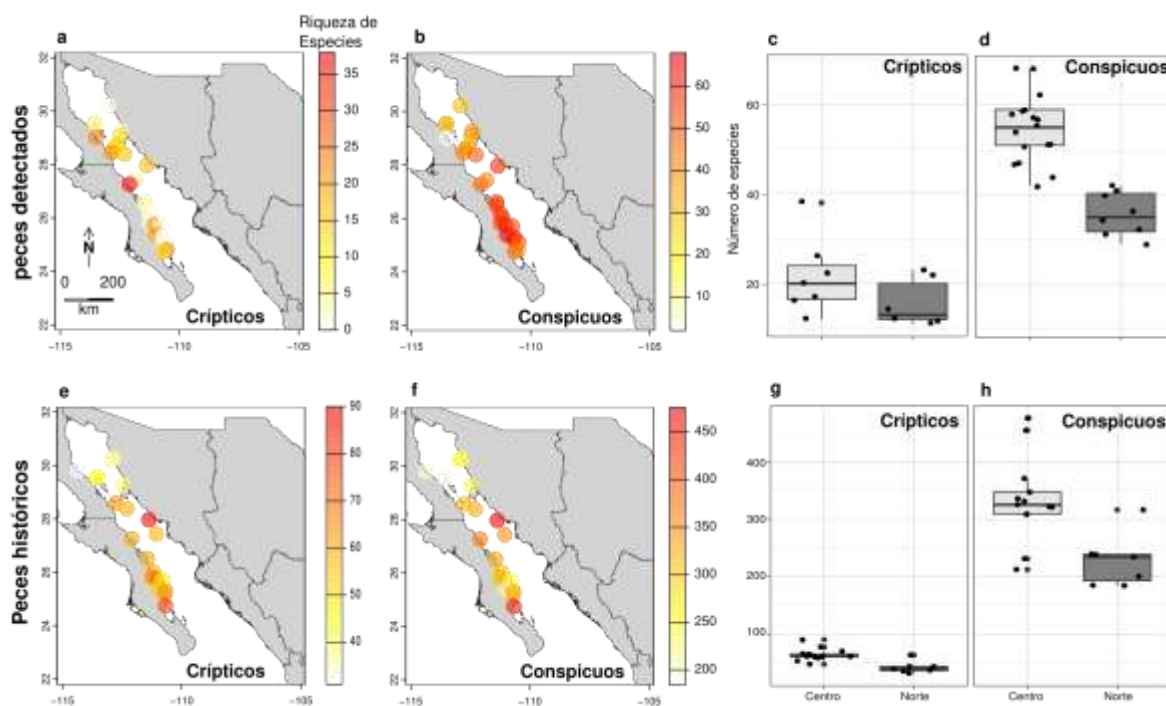
**Tabla 11.** Valores de riqueza de especies de peces crípticos y conspicuos, detectados e históricos. Número de especies por sitio considerando las detecciones de métodos combinados (ADNa12S, censos visuales y capturas) y registros históricos. Metadata de sitios en Tabla 1.

Región	Código sitio	Crípticos		Conspicuos	
		Detectados	Históricos	Detectados	Históricos
Norte	PLO	1	35	31	239
Norte	PLI		37		238
Norte	SLG		31		200
Norte	AGU1	11	43	34	185
Norte	AGU2	2	43	32	184
Norte	PAT	1	39	40	234
Norte	TIB	12		36	
Norte	BLA	22		2	
Norte	EST	14		29	
Norte	LOR	12	63	42	316
Norte	SFN	23		41	
Central	SPM	16	60	51	331
Central	SPN	17	90	59	476
Central	TOR	3	58	44	347
Central	MAR	38	61	47	371
Central	IDE	1		51	
Central	PUL	4	61	59	336
Central	COR	1		57	
Central	CAR	1	60	57	308
Central	DAN	1	65	58	309
Central	MON	22	70	62	322
Central	CAT	0	47	55	231
Central	MAT	20	53	68	212
Central	CRU	1	64	54	321
Central	DIE	1	64	68	325
Central	ANI	0		51	
Central	BSS	26		42	
Central	POR	12	77	47	455

La riqueza de peces crípticos históricos triplicó los valores detectados, oscilando entre 31 y 90 especies por sitio (Tabla 10). La riqueza de especies conspicuas varió de 31 a 68 especies por sitio, mientras que los valores históricos fueron de un orden de magnitud más alto, oscilando entre 212 y 476 especies por sitio (Tabla 10).

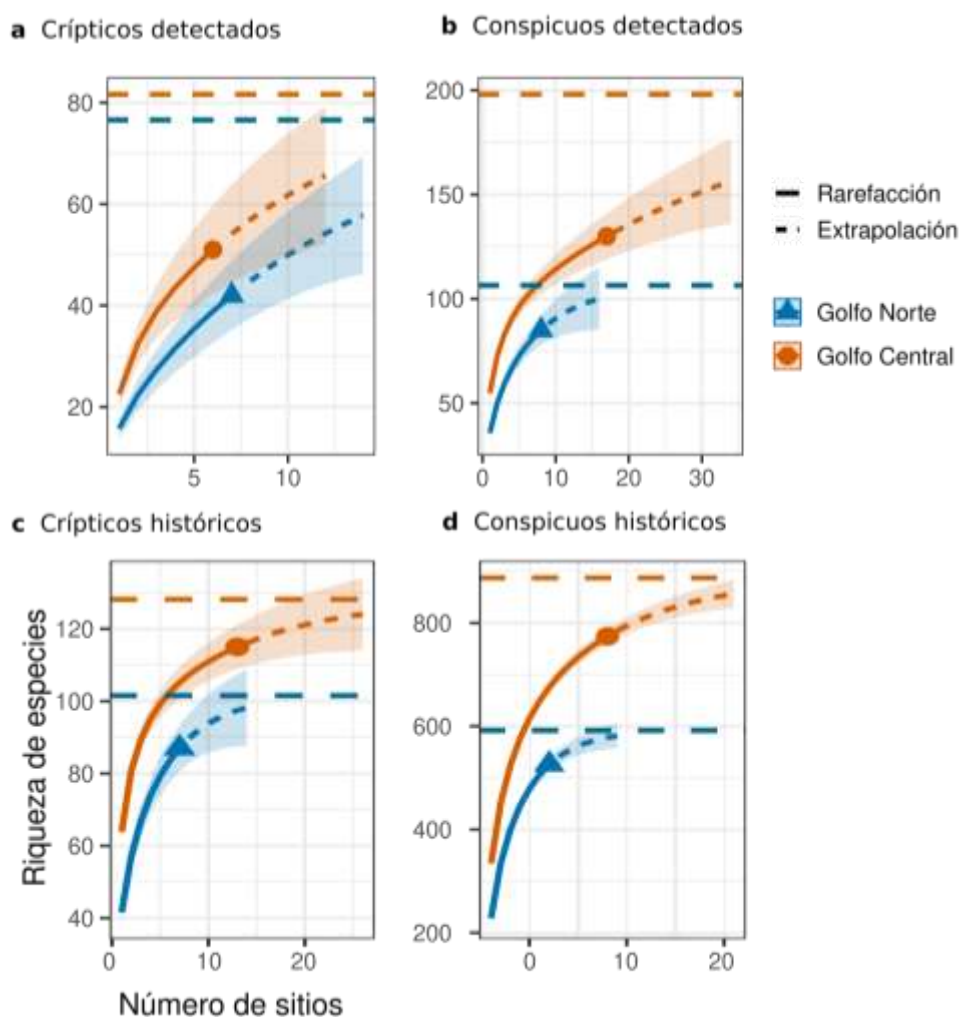
El patrón espacial esperado de disminución de riqueza desde el Golfo Central hacia los sitios del norte solo es evidente para los peces conspicuos detectados. A su vez, los peces crípticos detectados y ambos conjuntos de datos históricos muestran uno o dos sitios con una mayor

riqueza ubicados cerca de la zona de transición entre regiones, y en el rango sur de su alcance de muestreo (Fig. 27). Siguiendo la misma tendencia que la estructura meta-comunitaria, la variación a escala regional en la riqueza de especies reveló que solo los peces crípticos detectados difirieron del patrón esperado (Fig. 27). Para las especies detectadas, el análisis de varianza reveló diferencias significativas entre riqueza de peces crípticos y conspicuos ( $F = 155.8$ ,  $p = 0.000$ ) y diferencias entre cada región ( $F = 35.8$ ,  $p\text{-valor} = 0.000$ ), así como un efecto de interacción significativo ( $F = 7.2$ ,  $p\text{-valor} = 0.01$ ). La prueba *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples de medias encontró una riqueza de especies significativamente mayor para los peces conspicuos en el Golfo Central (diferencia media = 19.1,  $p\text{-valor} = 0.000$ ), pero no para los peces crípticos (diferencia media = 5.9,  $p\text{-valor} = 0.436$ ). Considerando la riqueza histórica, se encontraron diferencias estadísticas entre regiones, tanto para peces crípticos ( $\text{Chi}^2$  de Kruskal-Wallis = 9.3358,  $p\text{-valor} = 0.002$ ), como para peces conspicuos ( $\text{Chi}^2$  de Kruskal-Wallis = 7.9137,  $p\text{-valor} = 0.0049$ ; Fig. 27).



**Figura 27.** Variación detectada e histórica en la riqueza de especies para peces crípticos y conspicuos del Golfo de California Norte y Central. Número de especies por sitio mapeado en una escala continua de colores, y diagrama de cajas de distribución regional (mínimo-Q1-mediana-Q3-máximo) para peces crípticos detectados (a,c) e históricos (e,g), y conspicuos detectados (b,d) e históricos (f,h).

Las curvas de acumulación de especies no alcanzaron el plateau en ningún caso (Fig. 28). Se encontraron pequeñas diferencias entre regiones para la riqueza de especies de peces crípticos detectados, mientras que los datos históricos de peces crípticos y ambos conjuntos de datos conspicuos mostraron una mayor riqueza de especies en el Golfo Central. Considerando los valores de riqueza de crípticos detectados (42 en el Norte, 51 en el Golfo Central) versus históricos (87 en el Norte, 115 en el Golfo Central), se logró un 42% de cobertura de la riqueza histórica del Norte y un 44% del Golfo Central con los inventarios combinados de métodos. Para peces conspicuos, los valores de riqueza detectados (85 en el Norte, 130 en el Golfo Central) versus históricos (526 en el Norte, 774 en el Golfo Central) indicaron una cobertura del 16% de la riqueza histórica del Norte y un 17% del Golfo Central (Fig. 28).



**Figura 28.** Curvas de acumulación de especies, detectadas e históricas, de peces crípticos y conspicuos en el Golfo Norte y Central de California. Los valores de extrapolación se graficaron hasta duplicar el tamaño de la muestra en cada caso. El área sombreada muestra los intervalos de confianza del 95%.

## 8. DISCUSIÓN

El metabarcoding de ADN ambiental ha revolucionado la comprensión de la biodiversidad marina al ofrecer una escala, velocidad y resolución sin precedentes en inventarios taxonómicos. El presente estudio integró datos históricos de biodiversidad con métodos de muestreo tradicionales y metabarcoding de ADN ambiental dirigido a eucariotas (18S) y peces (12S). Se encontró que la biodiversidad eucariota marina en el Golfo de California (GC) es mucho mayor a estimaciones previas. El metabarcoding de ADN ambiental hizo un notable aporte al componente microscópico a pequeño, históricamente en desventaja con respecto a la macrofauna de la región. A su vez, el metabarcoding de ADN ambiental reveló macrofauna complementaria a métodos tradicionales, contribuyendo paralelamente a la diversidad de grupos bien estudiados, en conformidad con la hipótesis planteada. Sin embargo, un componente que permaneció elusivo fueron los peces crípticos, destacando a las capturas con uso de anestésico como el medio más efectivo de monitoreo, habiendo recuperado poca diversidad vía ADNa12S y censos visuales. La investigación de patrones espaciales emergentes de riqueza y composición comunitaria iluminó un sesgo histórico hacia macrofauna, que ha influenciado el paradigma del arreglo espacial regional de la diversidad del Golfo de California. Sin embargo, contrario a la segunda hipótesis planteada, al comparar simultáneamente patrones históricos y contemporáneos de distintos grupos taxonómicos, se detectaron diferencias. Los resultados destacan los beneficios de integrar el metabarcoding de ADN ambiental en las evaluaciones de biodiversidad, por su complementariedad a métodos tradicionales, y destacan los desafíos asociados con la creación de estrategias de muestreo integrales.

### 8.1 Biodiversidad por método y grupo taxonómico

La contribución del ADNa18S al conjunto de datos históricos compilados alcanzó su punto máximo en rangos taxonómicos superiores de eucariotas (Fig. 14, Anexo C). Los protistas (algas y otros micro-eucariotas) representaron el 80% de todas las secuencias taxonómicamente asignadas, similar a otros estudios de diversidad eucariota marina que utilizan métodos de metabarcoding similares (de Vargas *et al.*, 2015; Bakker *et al.*, 2019).



Los taxa novedosos incluyeron phyla de micro-invertebrados (Kinorhyncha, Entoprocta, Phoronida, Tardigrada, Hemichordata, Gastrotricha, Rotifera) y hongos microscópicos (Basidiomycota, Oomycota, Blastocladiomycota, Zoopagomycota, Chytridiomycota, Mucoromycota, Cryptomycota). Una gran fracción de diversidad revelada fue dentro de los micro-eucariotas, incluidos muchos phyla reconocidos junto a una larga lista de linajes con relaciones filogenéticas de alto rango no resueltas en NCBI-GenBank, como los supergrupos SAR (Stramenopiles, Alveolata, Rhizaria) y Holozoa.

Estos grupos filogenética y ecológicamente diversos han sido descritos en campañas globales de metabarcoding (de Vargas *et al.*, 2015; Cordier *et al.*, 2022), y representan una fracción grande pero poco comprendida de la biodiversidad marina, con roles críticos en los ciclos de nutrientes y energía (Biard *et al.*, 2016; Cohen, 2022). Por ejemplo, existen organismos mixotróficos dentro de Stramenopiles capaces de alternar entre metabolismo foto y heterotrófico de acuerdo con las condiciones nutrimentales, quienes cumplen un rol clave en la captura de carbono mediante sedimentación y su transferencia a niveles tróficos superiores (Cohen, 2022).

El ADN<sub>18S</sub> también identificó 145 familias no detectadas en otros inventarios, dentro de Metazoa, principalmente de Arthropoda, Cnidaria, Bryozoa, Foraminifera, Mollusca, Platyhelminthes, Annelida, Porifera y Nemertea (Anexo D). Estas adiciones, conocidas por incluir grandes proporciones de especies no descritas a nivel mundial (Appeltans *et al.*, 2012), consisten principalmente en especies planctónicas (copépodos, ostrácodos, hidrozoarios, anémonas, y ctenóforos), parasíticas (ácaros, trematodos, y nematodos), infaunales, o de hábitats inaccesibles o profundos (por ej. anémonas Actinostolidae y bivalvos Xylophagaidae), lo que los hace difíciles para monitoreos tradicionales.

El número total de familias de eucariotas detectadas por ADN<sub>18S</sub> (850 familias), específicamente la región V7 del gen 18S, fue superior a estudios costeros similares. Estas diferencias pueden reflejar diferencias reales entre comunidades costeras, aunque también existen sesgos dado por la selección de metabarcoding que conlleva a diferentes eficiencias de amplificación (i.e., *primer bias*), que se combinan con sesgos espacio-temporales, batimétricos, experimentales y bioinformáticos, entre otros (Kelly *et al.*, 2016; Collins *et al.*, 2019; DiBattista *et al.*, 2019). Utilizando la región V9 dentro del gen 18S, con mejor resolución taxonómica reportada en

literatura (Taberlet *et al.*, 2018), un estudio en el Mar Negro reportó 259 familias a una escala espacial similar pero mucho más amplia en batimetría, y con mayor replicación (Zhang *et al.*, 2020). También se han detectado 498 familias con la región V1 de 18S en una escala espacial de ~100 m en Okinawa, Japón (DiBattista *et al.*, 2020). Estas comparaciones deben ser cautelosas, dado que múltiples factores técnicos de los estudios, aunado a la diversidad de hábitats y gradientes ambientales entre regiones, interfieren en los niveles recuperados. Sin embargo, la riqueza de este estudio refuerza la magnitud de la diversidad en océanos tropicales y subtropicales (Rogers *et al.*, 2022).

La oportunidad de comparar distintos grupos de eucariotas reveló que ningún método por sí mismo tiene la capacidad que poseen en conjunto (Tablas 7 & 8). Los censos visuales dependen de la presencia visible de características diagnósticas de las especies, y de las condiciones ambientales al momento del buceo. Los censos visuales se enfocaron en peces y macroinvertebrados, cubriendo solo 7 de los 25 phyla reportados históricamente. Estos phyla fueron Chordata, Arthropoda, Mollusca, Echinodermata, Annelida, Cnidaria y Platyhelminthes.

El metabarcoding de ADN<sub>18S</sub> tuvo especialmente pobre representación de vertebrados, con solo el 0.4% de los ASVs, mismo grupo que fue protagonista en censos visuales y datos históricos. Una gran parte de los vertebrados, los peces, fueron sin embargo detectados mediante el ADN<sub>12S</sub>, quien tuvo una contribución equiparable a la de censos visuales de peces óseos (Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021), aunque pocas detecciones de crípticos (Fig. 10). Solo el 0,04% de las secuencias se identificaron a 20 ASVs (0.29%) de cinco especies crípticas dentro de 7 géneros y 6 familias, detectadas también por métodos tradicionales. Los resultados coinciden con uno de pocos estudios comparables, en donde capturas de peces y metabarcoding de ADN ambiental se aplicaron simultáneamente detectando solo 4 especies crípticas con 0.6% de las secuencias dentro del gen COI, en el reino de Tonga del océano Pacífico (Gómez-Buckley *et al.*, 2023).

El compilado histórico del Golfo de California (Morzaria-Luna *et al.*, 2018) para la región geográfica abarcada está compuesto en su mayoría por peces (43% de ocurrencias), con una gran diversidad también de macroinvertebrados y algas, que provienen de múltiples fuentes a lo largo de varias décadas, con una representación mucho menor de hongos y otros micro-eucariotas. El ADN ambiental y los censos visuales representan, en cambio, una fotografía de un momento en

el tiempo. Conocer y comparar niveles históricos y contemporáneos tiene múltiples utilidades, como identificar tendencias espacio-temporales (Gallego *et al.*, 2020), evaluar desempeño de áreas naturales protegidas (Gold *et al.*, 2021) y muchas otras. Sin embargo, evaluar tendencias temporales no sería posible si los inventarios de base no tienen representación de los grupos taxonómicos monitoreados, destacando la relevancia de incrementar esfuerzos para mejorar el conocimiento de base de la distribución de la biodiversidad (Caldwell *et al.*, 2024).

La comparación de la composición taxonómica de peces detectados e históricos identificó 12 especies crípticas y 34 especies conspicuas como novedosas (Fig. 20), lo que puede relacionarse a varios factores. Un factor clave es el criterio de inclusión de especies del Golfo de California usado para ADN<sub>12S</sub>, que incluyó a cualquier congénico de especies con reportes en el golfo. Esta decisión disminuye el número de ASVs que serían descartados por no contar con registros en el Golfo, pero considera que especies locales que no cuentan con una referencia genética serían identificadas a una especie hermana, quizás fuera de la región. Para ejemplificar, a partir de las mismas secuencias de ADN se identificó a la especie local *Thalassoma lucasanum* en el trabajo con MOTUs realizado por Valdivia-Carrillo *et al.* (2021), cuya referencia existe en GenBank (un registro). En cambio, bajo el protocolo bioinformático aplicado aquí, la especie identificada fue *T. amblycephalum*, un congénico del Indo-Pacífico. Definitivamente no se espera que *T. amblycephalum* haya aparecido en el Golfo de California. Sin embargo, es interesante que habiendo una referencia genética para *T. lucasanum*, la asignación taxonómica resolvió que se trata de *T. amblycephalum*, revelando quizás diversidad críptica dentro del género o la especie.

Otra posibilidad es que la nomenclatura taxonómica haya sido modificada, generando conflictos de sinonimias que no hayan sido detectados en la curación taxonómica (Miya y Nishida, 2014; Ruggiero *et al.*, 2015). Sesgos metodológicos aparte, es posible que las especies identificadas hayan sido reportadas más al sur del área de estudio en el compilado histórico, por un sesgo meramente metodológico, o quizás representen un cambio con respecto a su distribución histórica debido al calentamiento del océano (Lenoir *et al.*, 2020).

La proporción de asignaciones por rango taxonómico disminuyeron de phylum a especie para el metabarcoding 18S (Fig. 9), determinado principalmente por la disponibilidad de referencias y la baja tasa mutacional de 18S. A rangos taxonómicos altos, los porcentajes de asignación

taxonómica tuvieron de 33% a 66% de phylum a familias sin anotación, posiblemente por la falta de referencias orientadas a discriminar grandes ramas de la evolución para el metabarcoding 18S. Dichas ramas pueden ser el foco de estudio, para generar referencias en los sitios estratégicamente identificados. En compromiso con la vasta riqueza de alto rango detectada por ADN<sub>a</sub>18S, la baja tasa mutacional compromete la resolución a rangos taxonómicos bajos (de familia a especie) en organismos filogenéticos emparentados o de divergencia reciente. Para identificar en un dado metabarcoding, aquellos rangos taxonómicos y linajes que resultan indistinguibles por su divergencia reciente, de aquellos indistinguibles por ausencia de referencias, es necesario mejorar la disponibilidad de referencias, y en dado caso utilizar múltiples metabarcodings complementarios (Zhang *et al.*, 2020; Holman *et al.*, 2021; Questel *et al.*, 2021).

La disponibilidad de referencias del metabarcoding 18S en el Golfo de California (18% en base a registros históricos; Fig. 15) resultó pobre comparada con otras regiones, aunque pocos estudios han considerado un grupo taxonómico tan amplio como este estudio, con más de 5,000 especies de línea base. En el Mar del Norte se registró una cobertura de 36% para el metabarcoding 18S y 50% para COI, solo considerando 1,800 especies de macrofauna (Hestetun *et al.*, 2020). Otro estudio reportó coberturas de 36% para 18S y 50% para COI, con una línea base de 900 metazoos en el Ártico canadiense (Lacoursière-Roussel *et al.*, 2018). La cobertura taxonómica de COI fue evaluada también para metazoos en cinco puntos calientes de biodiversidad marina, detectando entre 37 y 62% de especies representadas (Mugnai *et al.*, 2021).

Las diferencias entre el foco taxonómico del metabarcoding 18S (altos rangos taxonómicos) y métodos tradicionales (orientados a especies dentro de un menor número de linajes; Fig. 14), resultó en la selección de familias como el rango de comparación y análisis, igual que en estudios similares (DiBattista *et al.*, 2020). Así, la contribución de ADN<sub>a</sub>18S fue equiparable a la de datos históricos, con un 43% de secuencias anotadas a nivel familia y 80% de cobertura de familias históricas en GenBank, contribuyendo a un total de 1,599 familias detectadas por métodos combinados (Fig. 13).

La inclusión de un segundo metabarcoding al presente estudio permitió ejemplificar la versatilidad del metabarcoding de ADN ambiental, en cuanto al efecto combinado de disponibilidad de referencias y tasa mutacional sobre la resolución taxonómica. El metabarcoding 12S posee una tasa

mutacional más rápida que 18S, resultando idóneo para discriminar al interior de los vertebrados. Los porcentajes de asignación taxonómica fueron de 94-100% de phylum a género, y de 55% a nivel especie. En un estudio previo de las secuencias de 12S (Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021) re-analizadas aquí, se generaron referencias para 67 especies, mejorando la representación (previamente 5% en GenBank) de ~800 especies de teleósteos en el Golfo de California, con pocos casos de pobre discriminación de especies para el metabarcoding, dentro la familia Serranidae y los géneros *Scarus* y *Thunnus*. La contribución actual contribuyó duplicar las referencias de peces crípticos locales en GenBank. Se lograron referencias para el 63% de las especies criptobentónicas capturadas, agregando 29 especies dentro de 12 familias, cuatro de las cuales no tenían registros previos en GenBank (Antennariidae, Chaenopsidae, Dactyloscopidae y Microdesmidae). La resolución taxonómica del metabarcoding 12S también resultó comprometida dentro de la familia Labrisomidae para los géneros *Malacotenus* y *Paraclinus*, así como los géneros *Stegastes* y *Scarus* reportados previamente.

A pesar de la contribución significativa de referencias locales, la proporción de especies crípticas detectadas en el muestreo del metabarcoding 12S fue pobre (Fig. 18). La selección de metabarcoding fue uno de los aspectos limitantes clave mencionado por el estudio previo, comparando capturas y censos en el reino de Tonga con resultados similares (Gómez-Buckley *et al.*, 2023). Allí, una alta proporción de lecturas se asignaron a taxa no objetivo, un contratiempo bien documentado al trabajar con el metabarcoding COI, que posiblemente "ahogó" el ADN críptico de baja abundancia (Leray *et al.*, 2013; Collins *et al.*, 2019).

Más allá de la resolución del metabarcoding, el análisis de ADN<sub>12S</sub> destaca otros aspectos metodológicos a considerar. El principal factor influyente fue probablemente la baja cantidad de ADN críptico inicialmente capturado. Una primera cuestión considerable es la ubicación específica de la colecta y el volumen muestreado. Mientras este estudio tomó muestras de agua a ~2 m sobre el sustrato, explicando potencialmente la baja abundancia de ADN críptico, Gómez-Buckley *et al.* (2023) obtuvieron resultados similares a pesar de muestrear directamente en los intersticios del arrecife, o adyacentes al sustrato. En cambio, el presente estudio coincide con el antecedente en el volumen muestreado, de entre 0.2 y 1.2 L por sitio (total 13.9 L), equiparable al presente diseño de 1 L por sitio (total 28 L).

Más allá de diferencias esperables en riqueza debidas a los gradientes biogeográficos a nivel global (Chaudhary *et al.*, 2016; Blowes *et al.*, 2019), los mejores casos de detección de crípticos han filtrado más de 100 L de agua, o incrementado el esfuerzo de secuenciación, ambos posibles caminos para mejorar la eficiencia de detección de especies raras (revisado por Gómez-Buckley *et al.*, 2023)). Por ejemplo, Marwayana *et al.*, (2021) tomaron 114L de agua de mar a 1 m del sustrato, lo que resultó en 62 especies crípticas en arrecifes de coral de Indonesia. En otro caso, un gran aumento en el esfuerzo de secuenciación (300 millones de lecturas, uno o dos órdenes de magnitud por encima de la mayoría de los estudios) también resultó en la detección de 59 especies crípticas a partir de 18 L a media agua en el Indo-Pacífico (Juhel *et al.*, 2020). Sin embargo, un gran volumen no es garantía de riqueza, dado que muestreos de 134 L a 20 cm por encima del bentos solo resultaron en 13 especies crípticas en el Caribe (Nguyen *et al.*, 2020), y 250 L tomados a nivel de superficie identificaron solo 18 especies crípticas en Australia (West *et al.*, 2020).

Los peces crípticos se caracterizan por su pequeño tamaño, y aunque son altamente abundantes en el Golfo de California (hasta un 95% a 5m de profundidad; Galland *et al.*, 2017), su contribución de biomasa a las comunidades de peces es pequeña. Su pequeño tamaño está asociado con altas tasas de mortalidad, altas tasas metabólicas específicas de masa, y fecundidad por cohorte limitada (Brandl *et al.*, 2018), por lo que conservar energía podría acarrear una limitada liberación de ADN al medio. Las pocas detecciones crípticas en este estudio incluyen especies altamente frecuentes y abundantes en capturas (Fig. 19). Una excepción notable fue el blénido tubícola *Acanthemblemaria macrospilus*, una especie hermana de baja abundancia e infrecuente de *A. crockeri*, presente en todos los sitios y cuya referencia no se pudo generar, incluso utilizando múltiples individuos y protocolos de PCR. En general, considerando el conjunto limitado de estudios comparables y las múltiples variables involucradas, parece que muestrear un alto volumen de agua (o un alto esfuerzo de secuenciación) no garantiza altas tasas de detección, pero las detecciones de peces crípticos son poco probables en volúmenes más pequeños debido a su pequeña contribución al ADN ambiental, con respecto a otros peces. Estudios que han evaluado la eficiencia de detección para peces aconsejan muestrear el volumen más alto técnicamente posible (Bessey *et al.*, 2020), por ejemplo, 300 L para el Triángulo de Coral (Marwayana *et al.*, 2021).

Dos limitantes para el procesamiento de ambos metabarcodes (18S y 12S) fueron el grado de replicación por sitio y el número de controles negativos, lo que dificultó la identificación de contaminación en campo o durante la extracción de ADN ambiental en el laboratorio. Sin embargo, una elevada proporción de ASVs se encontraron únicamente en un solo sitio (70% para 18S y 47% para 12S), lo que sugiere que la contaminación cruzada no sería un gran problema. A su vez, la remoción de toda secuencia presente en el pool de controles negativos permitió descartar secuencias de *Homo sapiens* y hongos asociados, plantas y animales terrestres, y otros taxa provenientes de posible contaminación en laboratorio.

Otro desafío que surgió al combinar distintas fuentes de biodiversidad fue la escala espacial y temporal de los distintos métodos. Los censos visuales y capturas de peces, basados en observaciones directas, tuvieron una resolución espacial y nivel de replicación por sitio variable, impactando los niveles de riqueza detectados, con una huella temporal precisa. Los datos históricos también derivan en su mayoría de observaciones directas y acumulan los sesgos mencionados de los métodos tradicionales, pero no poseen información temporal, por lo que comparar patrones espaciales basados en esos niveles de riqueza puede representar una posible sobreestimación de los niveles históricos de riqueza. El ADN ambiental es un método indirecto de detección que depende de la interacción de dinámicas biológicas y ambientales, en donde tasas de producción, transporte y degradación específicas para cada grupo taxonómico incidirán en la huella espacial de detección (Barnes y Turner, 2016; Harrison *et al.*, 2019; Wood *et al.*, 2020). De acuerdo con los resultados obtenidos, el nivel de detecciones de taxa históricos fue mayor rondando los 50 km a la redonda de sitios de colecta, aunque futuros estudios podrían precisar esta información mediante modelos que consideren explícitamente el transporte de ADN ambiental con el flujo de corrientes al momento del muestreo.

Un último factor que dificultó la combinación de fuentes de biodiversidad fue el curado taxonómico de los inventarios de eucariotas. La base histórica de especies del Golfo de California representa un enorme trabajo de compilación, cuya magnitud representó un desafío al momento de comparar la diversidad taxonómica. Incluso habiendo utilizado un software específico para unificar taxonomía, cierto nivel de incertidumbre permanece debido a errores humanos y al flujo constante entre relaciones filogenéticas (Miya y Nishida, 2014; Ruggiero *et al.*, 2015). Más allá del

esfuerzo de unificación, es posible que taxa mencionados aquí como nuevos o exclusivos de ADN ambiental, hayan sido reportados previamente en estudios más específicos o en literatura gris, llevando a la sobreestimación del aporte del ADN ambiental.

Muchas de las limitaciones del metabarcoding de ADN ambiental mencionadas en esta sección ya cuentan con alternativas en la literatura enfocadas a mejorar el desempeño de la técnica. Uno de ellos es el uso de múltiples metabarcodes, ejemplificado en este estudio, en el que el metabarcode 12S aportó resolución taxonómica dentro de vertebrados, poco representados en el metabarcode 18S. Otras estrategias incluyen el uso de secuenciación de fragmentos más largos (Patin y Goodwin, 2022), la secuenciación de mitogenomas completos amplificados mediante PCR de largo rango (Deiner *et al.*, 2017b), o el uso de métodos libres de taxonomía (Apothéloz-Perret-Gentil *et al.*, 2017; Marques *et al.*, 2020). Más aún, la relación entre abundancia de secuencias de ADN ambiental está siendo cada vez mejor aproximada a abundancia de organismos, con resultados prometedores utilizando coeficientes alométricos de escalamiento en peces (Yates MC *et al.*, 2020), o incorporando estándares de concentración inicial conocida (Harrison *et al.*, 2020; Tsuji *et al.*, 2022).

Si el uso frecuente y la disminución en costos persisten, los análisis moleculares de biodiversidad podrían convertirse en un recurso utilizado rutinariamente para la toma de decisiones y para la actualización continua de líneas base de biodiversidad, escalando el grado de resolución, desde miles de especies, a decenas de miles de ASVs con resolución taxonómica variable.

## **8.2 Patrones regionales de biodiversidad**

Los diferentes arreglos taxonómicos recuperados por cada método de monitoreo pueden ser los principales responsables de los diferentes patrones espaciales de biodiversidad emergentes. La estructura meta-comunitaria a nivel familia recuperó un patrón consistente de diferenciación entre Golfo Norte y Central, entre ADN<sub>18S</sub>, censos visuales y datos históricos (Fig. 21), de acuerdo con estudios previos realizados sobre distintos taxa (Brusca *et al.*, 2005; Ulate *et al.*, 2016; Galland *et al.*, 2017; Olivier *et al.*, 2018). Las diferencias en las condiciones ambientales han sido identificadas como limitantes de especies de afinidad tropical hacia el Golfo Norte, y como



limitante de peces de afinidad templada hacia el sur, causando mayores niveles de riqueza en la zona transicional del Golfo Central (Brusca *et al.*, 2005; Munguia-Vega *et al.*, 2018a).

Sin embargo, las familias de invertebrados detectados por el metabarcoding 18S y censos visuales resultaron más similares entre regiones, en contraste a datos históricos (Fig. 22). De modo similar, un estudio comparando macroinvertebrados bentónicos a escala regional encontró que la estructuración comunitaria se vio para taxa sésiles, mas no para taxa móviles. Tampoco se detectaron diferencias entre la magnitud de decaimiento geográfico de la composición de la comunidad (Fig. 26). Este patrón es compartido con el único artículo previo que compara peces crípticos y conspicuos en la misma región (Galland *et al.*, 2017).

Este patrón de no diferenciación, compartido por invertebrados (mayoría de invertebrados planctónicos revelados por ADN18S, e invertebrados móviles detectados en censos visuales) y pequeños peces crípticos detectados contradijo las hipótesis planteadas de homogeneidad de patrones espaciales regionales, y de mayor estructuración de comunidades de peces crípticos con respecto a conspicuos.

Los quiebres biogeográficos pueden tener efectos distinguibles en diferentes grupos taxonómicos, debido a características biológicas relacionadas con el potencial demográfico, de dispersión y/o adaptación. Las diferencias entre macroinvertebrados sésiles y móviles encontradas en el golfo se han relacionado a la capacidad de especies móviles de evadir condiciones desfavorables en sus sitios de reclutamiento, mientras que los taxa sésiles no tienen esa posibilidad (Ulate *et al.*, 2016).

Los peces crípticos se describen como especialistas de micro-hábitats por tener requisitos de nicho más específicos que los peces más grandes (Depczynski y Bellwood, 2004), y se ha planteado que una menor movilidad (Goatley *et al.*, 2020) los haría más vulnerables a alteraciones ambientales (Goatley *et al.*, 2016; Brandl *et al.*, 2018). A escala local, un estudio encontró una mayor partición del hábitat entre 25 especies crípticas de la Bahía de Loreto (Golfo Central de California) que entre 66 especies de la Isla de Lagarto (Gran Barrera de Coral), así como diferencias tróficas entre regiones, con los peces australianos siendo más omnívoros y los peces del golfo teniendo dietas más específicas planctívoras (González-Cabello y Bellwood, 2009).

Estos efectos mencionados no necesariamente aplican a escala regional. Considerando la naturaleza advectiva del Golfo de California (Lluch-Cota *et al.*, 2007; Santiago-García *et al.*, 2014), es posible que el tiempo generacional menor de peces crípticos (generalmente 1-2 años; con respecto a conspicuos y una fase larval móvil siendo transportada por días a semanas (Brandl *et al.*, 2018), produzcan suficiente flujo de migrantes como para homogeneizar las comunidades de peces crípticos, quienes con su movilidad limitada post-reclutamiento, aún pueden evitar condiciones desfavorables en los sitios de arribo. A su vez, la abundante conectividad del Golfo de California y el potencial adaptativo de este grupo podría explicar, en tiempos evolutivos, el elevado nivel de endemismo alcanzado con respecto a peces conspicuos, de 40% vs. 10%, respectivamente (Galland *et al.*, 2017).

Sin embargo, el patrón mostrado por los registros históricos para los peces crípticos tuvo una mayor similitud con los peces conspicuos, en los cuales las ubicaciones del Golfo Central formaban un grupo más compacto que los sitios del Norte, y la riqueza de especies era significativamente mayor en el Golfo Central. Los peces crípticos detectados fueron la excepción al patrón a pesar de alcanzar una mejor cobertura de su composición histórica (43% de crípticos versus 16% de conspicuos fueron detectados).

Al comparar cualquier estudio individual contra un registro histórico, que integra décadas de estudios independientes, los efectos de sub-muestreo ya mencionados (evidentes en las curvas de acumulación; Fig. 28) no pueden ser descartados. Más aún, tampoco se considera específicamente la diversidad de hábitats peri-arrecifales, como arrecifes mesofóticos, fondos blandos o hábitats pelágicos, presentes en los registros históricos por integración espacial de aproximadamente ~55 km a la redonda de los sitios monitoreados. Considerando el tamaño de réplica más pequeño alcanzado para los peces crípticos (13 sitios, en oposición a 25 sitios para los peces conspicuos y 20 sitios para los registros históricos), también podrían haberse pasado por alto especies endémicas con rangos de distribución estrechos, característica de especies crípticas (Goatley *et al.*, 2016) que afectan las probabilidades de detección (revisado por Brandl *et al.*, (2018).

Estudios comparando quiebres biogeográficos en el mundo han devuelto resultados variados. Un estudio previo ha reportado resultados mixtos en el Mar de Omán, donde un quiebre

biogeográfico conocido fue más evidente en especies de peces de cebo (por ej. sardinas), y compartido por invertebrados (corales, esponjas y otros eucariotas), pero fue menos evidente para las comunidades de peces arrecifales (DiBattista *et al.*, 2022). En cambio, en las costas de Sudáfrica se encontró que animales, protistas y bacterias comparten la misma estructura biogeográfica (Holman *et al.*, 2021).

En términos de distribución de la riqueza de familias de eucariotas, se encontraron también distintos patrones a discutir. Los datos históricos recuperaron el patrón esperado de mayor riqueza en el Golfo Central que en el Norte (Fig. 23), como ha sido reportado en la literatura (Morzaria-Luna *et al.*, 2018; Munguia-Vega *et al.*, 2018a). Dado que la proporción de ocurrencias históricas fue mayor en el Golfo Central (79%), la mayor riqueza allí puede representar un sesgo de esfuerzo de monitoreo, debido a mejor accesibilidad histórica al Golfo Central que al Golfo Norte. Sin embargo, compartiendo el sesgo espacial con datos históricos, ni el ADN<sub>a</sub>18S ni censos visuales encontraron diferencias de riqueza entre regiones (Fig. 23), diferencias que sí fueron posteriormente identificadas al seleccionar dentro de censos visuales a especies de peces conspicuos (Fig. 27). Es necesario destacar que, más allá de las diferencias, las curvas de acumulación de familias no alcanzaron el plateau bajo ningún escenario, especialmente para el metabarcoding 18S. Esto indica que el grado de replicación por región (20 muestras) y el esfuerzo de observación/secuenciación (promedio 800 mil secuencias por muestra y 8 transectos por sitio de censos visuales) fue insuficiente para describir la riqueza de la región, por lo que no se pueden descartar limitaciones de muestreo como principal responsable de los niveles similares de riqueza.

## 9. CONCLUSIONES

El presente estudio proporciona una visión holística de los hallazgos y desafíos encontrados en el estudio de la biodiversidad marina del Golfo de California. A partir de una combinación de métodos tradicionales de muestreo, datos históricos y la técnica emergente de metabarcoding de ADN ambiental, se ha revelado un panorama complejo de la biodiversidad marina en la región.

Este trabajo demuestra claramente que el metabarcoding de ADN ambiental, especialmente dirigido a eucariotas, ha abierto nuevas perspectivas en la comprensión de la biodiversidad marina de la región. Se ha demostrado que la diversidad eucariota en el Golfo de California es mucho mayor de lo que se estimaba anteriormente, con la tecnología de metabarcoding proporcionando una ventana única para explorar la diversidad microscópica que anteriormente ha sido subestimada. Además, se ha demostrado que el metabarcoding complementa los métodos tradicionales de muestreo, revelando grupos de organismos que no se capturan fácilmente mediante técnicas convencionales.

Un componente de mayor tamaño, pero igualmente en desventaja en métodos tradicionales fueron los peces crípticos, una parte significativa a menudo pasada por alto de la biodiversidad marina. Aunque su detección sigue siendo un desafío, se ha contribuido nuevo entendimiento a la capacidad y limitaciones del metabarcoding de ADN ambiental para discriminar peces crípticos, y se han identificado factores técnicos clave para mejorar sus detecciones en el futuro.

Además, el estudio destaca la importancia de combinar datos históricos con métodos contemporáneos para comprender los cambios en la biodiversidad a lo largo del tiempo. Al comparar patrones históricos y contemporáneos, se han identificado diferencias significativas en los arreglos espaciales de la diversidad, lo que subraya la importancia de estudios integrados para obtener una imagen completa de la biodiversidad marina.

Los diferentes métodos de monitoreo revelaron patrones espaciales de biodiversidad complejos y a veces contradictorios en el Golfo de California. Aunque no se han podido descartar efectos de sub-muestreo, los resultados sugieren que los quiebres biogeográficos pueden tener efectos distinguibles en diferentes grupos taxonómicos, lo que destaca la importancia de considerar múltiples enfoques de monitoreo para comprender plenamente la biodiversidad de una región.

En resumen, este estudio ha demostrado el potencial del metabarcoding de ADN ambiental para transformar la comprensión de la biodiversidad marina. Aunque se enfrenta a desafíos técnicos y metodológicos, esta tecnología ofrece una herramienta poderosa para investigar y conservar los ecosistemas marinos, y su uso continuo promete revelar aún más secretos sobre la vida en los océanos. A su vez, se destaca la importancia de abordar la biodiversidad desde múltiples perspectivas y utilizando una variedad de métodos de monitoreo para obtener una comprensión más completa de los patrones espaciales y temporales de la biodiversidad en el Golfo de California.

## 10. LITERATURA CITADA

- Ackerman, J.L. y Bellwood, D.R. (2000). Reef fish assemblages: a re-evaluation using enclosed rotenone stations. *Marine Ecology Progress Series*, 206(1954): 227–237. doi: 10.3354/meps206227.
- Ahern, A.L.M., Gómez-Gutiérrez, J., Aburto-Oropeza, O., Saldierna-Martínez, R.J., Johnson, A.F., Harada, A.E., Sánchez-Uvera, A.R., Erisman, B., Castro Arvizú, D.I. y Burton, R.S. (2018). DNA sequencing of fish eggs and larvae reveals high species diversity and seasonal changes in spawning activity in the southeastern Gulf of California. *Marine Ecology Progress Series*, 592: 159–179. doi: 10.3354/meps12446.
- Alberdi, A., Aizpurua, O., Gilbert, M.T.P. y Bohmann, K. (2018). Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(1): 134–147. doi: 10.1111/2041-210X.12849.
- Aljanabi, S.M. y Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22): 4692–4693. doi: 10.1093/nar/25.22.4692.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Version v0.11.8. Babraham Bioinformatics. Disponible en: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Antich, A., Palacin, C., Wangensteen, O.S. y Turon, X. (2021). To denoise or to cluster, that is not the question: optimizing pipelines for COI metabarcoding and metaphylogeography. *BMC Bioinformatics*, 22(1): 1–24. doi: 10.1186/s12859-021-04115-6.
- Apothéloz-Perret-Gentil, L., Cordonier, A., Straub, F., Iseli, J., Esling, P. y Pawlowski, J. (2017). Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. *Molecular Ecology Resources*, 17(6): 1231–1242. doi: 10.1111/1755-0998.12668.
- Appeltans, W., Ah Yong, S.T., Anderson, G., Angel, M.V., Artois, T., Bailly, N., Bamber, R., Barber, A., Bartsch, I., Berta, A., Błażewicz-Paszkowycz, M., Bock, P., Boxshall, G., Boyko, C.B., Brandão, S.N., Bray, R.A., Bruce, N.L., Cairns, S.D., Chan, T.-Y., Cheng, L., Collins, A.G., Cribb, T., Curini-Galletti, M., Dahdouh-Guebas, F., Davie, P.J.F., Dawson, M.N., De Clerck, O., De Cock, W., De Grave, S., de Voogd, N.J., Domning, D.P., Emig, C.C., Erséus, C., Eschmeyer, W., Fauchald, K., Fautin, D.G., Feist, S.W., Fransen, C.H.J.M., Furuya, H., Garcia-Alvarez, O., Gerken, S., Gibson, D., Gittenberger, A., Gofas, S., Gómez-Daglio, L., Gordon, D.P., Guiry, M.D., Hernandez, F., Hoeksema, B.W., Hopcroft, R.R., Jaume, D., Kirk, P., Koedam, N., Koenemann, S., Kolb, J.B., Kristensen, R.M., Kroh, A., Lambert, G., Lazarus, D.B., Lemaitre, R., Longshaw, M., Lowry, J., Macpherson, E., Madin, L.P., Mah, C., Mapstone, G., McLaughlin, P.A., Mees, J., Meland, K., Messing, C.G., Mills, C.E., Molodtsova, T.N., Mooi, R., Neuhaus, B., Ng, P.K.L., Nielsen, C., Norenburg, J., Opresko, D.M., Osawa, M., Paulay, G., Perrin, W., Pilger, J.F., Poore, G.C.B., Pugh, P., Read, G.B., Reimer, J.D., Rius, M., Rocha, R.M., Saiz-Salinas, J.I., Scarabino, V., Schierwater, B., Schmidt-Rhaesa, A., Schnabel, K.E., Schotte, M., Schuchert, P., Schwabe, E., Segers, H., Self-Sullivan, C., Shenkar, N., Siegel, V., Sterrer, W., Stöhr, S., Swalla, B., Tasker, M.L., Thuesen, E.V., Timm, T., Todaro, M.A., Turon, X., Tyler, S., Uetz, P., van der Land, J., Vanhoorne, B., van Ofwegen, L.P., van Soest, R.W.M., Vanaverbeke, J., Walker-Smith, G., Walter, T.C., Warren, A., Williams, G.C., Wilson, S.P. y Costello, M.J. (2012). The magnitude of global marine species diversity. *Current Biology*, 22(23): 2189–2202. doi: 10.1016/j.cub.2012.09.036.
- Baker, C. (2016). entrez\_qiime v2.0. [https://github.com/bakerccm/entrez\\_qiime/releases](https://github.com/bakerccm/entrez_qiime/releases). doi: 10.5281/zenodo.159607.

- Bakker, J., Wangensteen, O.S., Baillie, C., Buddo, D., Chapman, D.D., Gallagher, A.J., Guttridge, T.L., Hertler, H. y Mariani, S. (2019). Biodiversity assessment of tropical shelf eukaryotic communities via pelagic eDNA metabarcoding. *Ecology and Evolution*, 9(24): 14341–14355. doi: 10.1002/ece3.5871.
- Barnes, M.A. y Turner, C.R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1): 1–17. doi: 10.1007/s10592-015-0775-4.
- Bar-On, Y.M., Phillips, R. y Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(25): 6506–6511. doi: 10.1073/pnas.1711842115.
- Bernardi, G., Findley, L. y Rocha-oljvares, A. (2003). Vicariance and dispersal across Baja California in disjunct marine fish populations. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 57(7): 1599–1609. doi: 10.1111/j.0014-3820.2003.tb00367.x.
- Bessey, C., Jarman, S.N., Berry, O., Olsen, Y.S., Bunce, M., Simpson, T., Power, M., Mclaughlin, J., Edgar, G.J. y Keesing, J. (2020). Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding. *Environmental DNA*, 2(4): 1–12. doi: 10.1002/edn3.74.
- Biard, T., Stemann, L., Picheral, M., Mayot, N., Vandromme, P., Hauss, H., Gorsky, G., Guidi, L., Kiko, R. y Not, F. (2016). In situ imaging reveals the biomass of giant protists in the global ocean. *Nature*, 532(7600): 504–507. doi: 10.1038/nature17652.
- Blowes, S.A., Supp, S.R., Antão, L.H., Bates, A., Bruelheide, H., Chase, J.M., Moyes, F., Magurran, A., McGill, B., Myers-Smith, I.H., Winter, M., Bjorkman, A.D., Bowler, D.E., Byrnes, J.E.K., Gonzalez, A., Hines, J., Isbell, F., Jones, H.P., Navarro, L.M., Thompson, P.L., Vellend, M., Waldock, C. y Dornelas, M. (2019). The geography of biodiversity change in marine and terrestrial assemblages. *Science*, 366(6463): 339–345. doi: 10.1126/science.aaw1620.
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P. y Coissac, E. (2016). Obitools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1): 176–182. doi: 10.1111/1755-0998.12428.
- Brandl, S.J., Goatley, C.H.R., Bellwood, D.R. y Tornabene, L. (2018). The hidden half: ecology and evolution of cryptobenthic fishes on coral reefs. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 93(4): 1846–1873. doi: 10.1111/brv.12423.
- Brusca, R.C., Findley, L.T., Hastings, P.A., Hendrickx, M.E., Torre-Cosio, J. y Van Der Heiden, A.M. (2005). Macrofaunal diversity in the Gulf of California. En: Cartron J, Ceballos G, Felger RS (eds). *Biodiversity, ecosystems and conservation in northern Mexico*. Oxford University Press, New York, pp 72–95.
- Bucklin, A., Peijnenburg, K.T.C.A., Kosobokova, K.N., O'Brien, T.D., Blanco-Bercial, L., Cornils, A., Falkenhaus, T., Hopcroft, R.R., Hoshia, A., Laakmann, S., Li, C., Martell, L., Questel, J.M., Wall-Palmer, D., Wang, M., Wiebe, P.H. y Weydmann-Zwolicka, A. (2021). Toward a global reference database of COI barcodes for marine zooplankton. *Marine Biology*, 168:1–26. doi: 10.1007/s00227-021-03887-y.
- Calderón-Sanou, I., Münkemüller, T., Boyer, F., Zinger, L. y Thuiller, W. (2019). From environmental DNA sequences to ecological conclusions: how strong is the influence of methodological choices? *Journal of Biogeography* 47(1): 1–14. doi: 10.1111/jbi.13681.
- Caldwell, I.R., Hobbs, J.-P.A., Bowen, B.W., Cowman, P.F., DiBattista, J.D., Whitney, J.L., Ahti, P.A., Belderok, R., Canfield, S., Coleman, R.R., Iacchi, M., Johnston, E.C., Knapp, I., Nalley, E.M., Staudle, T.M. y Láruson, Á.J. (2024). Global trends and biases in biodiversity conservation research. *Cell Reports Sustainability*, 1(5): 100082. doi: 10.1016/j.crsus.2024.100082.

- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. y Holmes, S.P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7): 581–583. doi: 10.1038/nmeth.3869.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J. y Holmes, S.P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12): 2639–2643. doi: 10.1038/ismej.2017.119.
- Casey, J.M., Ransome, E., Collins, A.G., Mahardini, A., Kurniasih, E.M., Sembiring, A., Schiettekatte, N.M.D., Cahyani, N.K.D., Anggoro, A.W., Moore, M., Uehling, A., Belcaid, M., Barber, P.H., Geller, J.B. y Meyer, C.P. (2021). DNA metabarcoding marker choice skews perception of marine eukaryotic biodiversity. *Environmental DNA*, 3(6): 1229–1246. doi: 10.1002/edn3.245.
- Chao, A., Gotelli, N.J., Hsieh, T.C., Sande, E.L., Ma, K.H., Colwell, R.K. y Ellison, A.M. (2014). Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecological Monographs*, 84:45–67. doi: 10.1890/13-0133.1.
- Chaudhary, C., Saeedi, H. y Costello, M.J. (2016). Bimodality of latitudinal gradients in marine species richness. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(9): 670–676. doi: 10.1016/j.tree.2016.06.001.
- Cilleros, K., Valentini, A., Allard, L., Dejean, T., Etienne, R., Grenouillet, G., Iribar, A., Taberlet, P., Vigouroux, R. y Brosse, S. (2019). Unlocking biodiversity and conservation studies in high-diversity environments using environmental DNA (eDNA): a test with Guianese freshwater fishes. *Molecular Ecology Resources*, 19(1): 27–46. doi: 10.1111/1755-0998.12900.
- Cohen, N.R. (2022). Mixotrophic plankton foraging behaviour linked to carbon export. *Nature Communications*, 13(1): 1–3. doi: 10.1038/s41467-022-28868-7.
- Collins, R.A., Bakker, J., Wangensteen, O.S., Soto, A.Z., Corrigan, L., Sims, D.W., Genner, M.J. y Mariani, S. (2019). Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(11): 1985–2001. doi: 10.1111/2041-210X.13276.
- Convention on Biological Diversity. (1992). Biodiversity Outlook - United Nations Treaty Series. Rio de Janeiro, United Nations. Disponible en: <http://www.cbd.int/convention/text/> (consultado en octubre 2016).
- Cordier, T., Angeles, I.B., Henry, N., Lejzerowicz, F., Berney, C., Morard, R., Brandt, A., Cambon-Bonavita, M.-A., Guidi, L., Lombard, F., Arbizu, P.M., Massana, R., Orejas, C., Poulain, J., Smith, C.R., Wincker, P., Arnaud-Haond, S., Gooday, A.J., de Vargas, C. y Pawlowski, J. (2022). Patterns of eukaryotic diversity from the surface to the deep-ocean sediment. *Science Advances*, 8(5): eabj9309. doi: 10.1126/sciadv.abj9309.
- Curd, E.E., Gold, Z., Kandlikar, G.S., Gomer, J., Ogden, M., O’Connell, T., Pipes, L., Teia M. Schweizer., Rabichow, L., Lin, M., Shi, B., Barber, P.H., Kraft, N., Wayne, R. y Meyer, R.S. (2019). Anacapa Toolkit: an environmental DNA toolkit for processing multilocus metabarcode datasets. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(9): 1469–1475. doi: 10.1111/2041-210X.13214.
- de Vargas, C., Audic, S., Henry, N., Decelle, J., Mahé, F., Logares, R., Lara, E., Berney, C., Bescot, N.L., Probert, I., Carmichael, M., Poulain, J., Romac, S., Colin, S., Aury, J.-M., Bittner, L., Chaffron, S., Dunthorn, M., Engelen, S., Flegontova, O., Guidi, L., Horák, A., Jaillon, O., Lima-Mendez, G., Lukeš, J., Malviya, S., Morard, R., Mulo, M., Scalco, E., Siano, R., Vincent, F., Zingone, A., Dimier, C., Picheral, M., Searson, S., Kandels-Lewis, S., Null, N., Acinas, S.G., Bork, P., Bowler, C., Gorsky, G., Grimsley, N., Hingamp, P., Iudicone, D., Not, F., Ogata, H., Pesant, S., Raes, J., Sieracki, M.E., Speich, S., Stemann, L., Sunagawa, S., Weissenbach, J., Wincker, P., Karsenti, E., Boss, E., Follows, M., Karp-Boss, L., Krzic, U., Reynaud, E.G., Sardet, C., Sullivan, M.B. y Velayoudon, D.



- (2015). Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science*, 348(6237). doi: 10.1126/science.1261605.
- Deiner, K., Bik, H.M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D.M., de Vere, N., Pfrender, M.E. y Bernatchez, L. (2017a). Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21): 5872–5895. doi: 10.1111/mec.14350.
- Deiner, K., Renshaw, M.A., Li, Y., Olds, B.P., Lodge, D.M. y Pfrender, M.E. (2017b). Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(12): 1888–1898. doi: 10.1111/2041-210X.12836.
- Depczynski, M. y Bellwood, D.R. (2004). Microhabitat utilisation patterns in cryptobenthic coral reef fish communities. *Marine Biology*, 145(3): 455–463. doi: 10.1007/s00227-004-1342-6.
- Depczynski, M., Fulton, C.J., Marnane, M.J. y Bellwood, D.R. (2007). Life history patterns shape energy allocation among fishes on coral reefs. *Oecologia*, 153(1): 111–120. doi: 10.1007/s00442-007-0714-2.
- DiBattista, J., Reimer, J.D., Stat, M., Masucci, G.D., Biondi, P., De Brauwer, M., Wilkinson, S.P., Chariton, A.A. y Bunce, M. (2020). Environmental DNA can act as a biodiversity barometer of anthropogenic pressures in coastal ecosystems. *Scientific Reports*, 10(1): 1–15. doi: 10.1038/s41598-020-64858-9.
- DiBattista, J.D., Berumen, M.L., Priest, M.A., De Brauwer, M., Coker, D.J., Sinclair-Taylor, T.H., Hay, A., Bruss, G., Mansour, S., Bunce, M., Goatley, C.H.R., Power, M. y Marshall, A. (2022). Environmental DNA reveals a multi-taxa biogeographic break across the Arabian Sea and Sea of Oman. *Environmental DNA*, 4(1): 206–221. doi: 10.1002/edn3.252.
- DiBattista, J.D., Reimer, J.D., Stat, M., Masucci, G.D., Biondi, P., De Brauwer, M. y Bunce, M. (2019). Digging for DNA at depth: rapid universal metabarcoding surveys (RUMS) as a tool to detect coral reef biodiversity across a depth gradient. *PeerJ*, 7: e6379. doi: 10.7717/peerj.6379.
- Djurhuus, A., Closek, C.J., Kelly, R.P., Pitz, K.J., Michisaki, R.P., Starks, H.A., Walz, K.R., Andruszkiewicz, E.A., Olesin, E., Hubbard, K., Montes, E., Otis, D., Muller-Karger, F.E., Chavez, F.P., Boehm, A.B. y Breitbart, M. (2020). Environmental DNA reveals seasonal shifts and potential interactions in a marine community. *Nature Communications*, 11(1): 1–9. doi: 10.1038/s41467-019-14105-1.
- Edgar, R.C. y Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics*, 31(21): 3476–3482. doi: 10.1093/bioinformatics/btv401.
- El Khattabi Salazar, S. (2019). Estructura de la comunidad y preferencia de hábitat de peces crípticos en la costa oeste del Golfo de California. *Tesis de Maestría*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S.
- Fernández-Rivera Melo, F.J., Reyes-Bonilla, H., Ramírez-Ortiz, G. y Álvarez-Filip, L. (2018). Latitudinal variation in structure and function of conspicuous reef fish assemblages along the western Gulf of California. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89(4): 1154–1166. doi: 10.22201/ib.20078706e.2018.4.2231.
- Froese, R. y Pauly, D. (2002). FishBase: A Global Information System on Fishes. Disponible en: [www.fishbase.org](http://www.fishbase.org) [consultado: el 5 de enero de 2024].
- Galland, G.R., Erisman, B.E., Aburto-Oropeza, O. y Hastings, P.A. (2017). Contribution of cryptobenthic fishes to estimating community dynamics of sub-tropical reefs. *Marine Ecology Progress Series*, 584: 175–184. doi: 10.3354/meps12364.

- Gallego, R., Jacobs-Palmer, E., Cribari, K. y Kelly, R.P. (2020). Environmental DNA metabarcoding reveals winners and losers of global change in coastal waters. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 287(1940): 20202424. doi: 10.1098/rspb.2020.2424.
- Goatley, C.H.R., Brandl, S.J., Wroe, S. y Bellwood, D.R. (2020). Simple larvae sustain the world's smallest marine vertebrates. *Coral Reefs*. doi: 10.1007/s00338-020-02016-3.
- Goatley, C.H.R., González-Cabello, A. y Bellwood, D.R. (2016). Reef-scale partitioning of cryptobenthic fish assemblages across the Great Barrier Reef, Australia. *Marine Ecology Progress Series*, 544: 271–280. doi: 10.3354/meps11614.
- Gold, Z., Sprague, J., Kushner, D.J., Marin, E.Z. y Barber, P.H. (2021). eDNA metabarcoding as a biomonitoring tool for marine protected areas. *PloS One*, 16: 1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0238557.
- Gómez-Buckley, M.C., Gallego, R., Arranz, V., Halafih, T., Stone, K., Erdmann, M. y Tornabene, L.M. (2023). Comparing anesthetic stations and environmental DNA sampling to determine community composition of cryptobenthic coral reef fishes of Vava'u, Kingdom of Tonga. *Coral Reefs*, 42(3): 785–797. doi: 10.1007/s00338-023-02375-7.
- González-Cabello, A. y Bellwood, D.R. (2009). Local ecological impacts of regional biodiversity on reef fish assemblages. *Journal of Biogeography*, 36(6): 1129–1137. doi: 10.1111/j.1365-2699.2008.02065.x.
- Gordon, A. y Hannon, G.J. (2010). Fastx-toolkit. FASTQ/A Short-Reads Preprocessing Tools. Disponible en: [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html).
- Grosberg, R.K., Vermeij, G.J. y Wainwright, P.C. (2012). Biodiversity in water and on land. *Current Biology*, 22(21): R900-3. doi: 10.1016/j.cub.2012.09.050.
- Guardiola, M., Uriz, M.J., Taberlet, P., Coissac, E., Wangensteen, S. y Turon, X. (2015). Deep-sea, deep-sequencing: metabarcoding extracellular DNA from sediments of marine canyons. *PloS One*, 10(10): e0139633. doi: 10.5061/dryad.520gq.
- Harrison, J.B., Sunday, J.M. y Rogers, S.M. (2019). Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 286(1915): 20191409. doi: 10.1098/rspb.2019.1409.
- Harrison, J.G., Calder, J., Shuman, B., Buerkle, A. y Harrison, J.G. (2020). The quest for absolute abundance: the use of internal standards for DNA-based community ecology. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.13247.
- Hastings, P.A., Findley, L.T. y Van Der Heiden, A.M. (2010). Fishes of the Gulf of California. En R.C. Brusca (ed.). *The Gulf of California: biodiversity and conservation*. University of Arizona Press, Arizona, pp. 96-118.
- Hestetun, J.T., Bye-Ingebrigtsen, E., Nilsson, R.H., Glover, A.G., Johansen, P.-O. y Dahlgren, T.G. (2020). Significant taxon sampling gaps in DNA databases limit the operational use of marine macrofauna metabarcoding. *Marine Biodiversity*, 50(5): 70. doi: 10.1007/s12526020-01093-5.
- Hijmans, R.J., Bivand, R., Pebesma, E. y Sumner, M.D. (2023). R package terra. Version 1.765. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/terra/terra.pdf>.
- Holman, L.E., de Bruyn, M., Creer, S., Carvalho, G., Robidart, J. y Rius, M. (2021). Animals, protists and bacteria share marine biogeographic patterns. *Nature Ecology and Evolution*. doi: 10.1038/s41559-021-01439-7.
- Hsieh, T.C., Ma, K.H. y Chao, A. (2022). iNEXT: Interpolation and Extrapolation for Species Diversity. Disponible en: [http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software\\_download/](http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/).

- Illumina. (2018). bcl2fastq2 Conversion Software v2.20. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, 20(February): 495–511. doi: 10.1016/j.jmoldx.2018.03.007.
- Inkscape Project. (2020). Inkscape. Version 0.92.5. Disponible en: <https://inkscape.org>.
- Jerde, C.L., Wilson, E.A. y Dressler, T.L. (2019). Measuring global fish species richness with eDNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 19(1): 19–22. doi: 10.1111/1755-0998.12929.
- Juhel, J.-B., Utama, R.S., Marques, V., Vimono, I.B., Sugeha, H.Y., Kadarusman, Pouyaud, L., Dejean, T., Mouillot, D. y Hocdé, R. (2020). Accumulation curves of environmental DNA sequences predict coastal fish diversity in the coral triangle. *Proceedings Biological Sciences*, 287(1930): 20200248. doi: 10.1098/rspb.2020.0248.
- Kanz, C., Aldebert, P., Althorpe, N., Baker, W., Baldwin, A., Bates, K., Browne, P., van den Broek, A., Castro, M., Cochrane, G., Duggan, K., Eberhardt, R., Faruque, N., Gamble, J., Garcia Diez, F., Harte, N., Kulikova, T., Lin, Q., Lombard, V., Lopez, R., Mancuso, R., McHale, M., Nardone, F., Silventoinen, V., Sobhany, S., Stoehr, P., Tuli, M.A., Tzouvara, K., Vaughan, R., Wu, D., Zhu, W. y Apweiler, R. (2005). The EMBL nucleotide sequence database. *Nucleic Acids Research*, 33: 21–26. doi: 10.1093/nar/gki098.
- Keck, F., Blackman, R.C., Bossart, R., Brantschen, J., Couton, M., Hürlemann, S., Kirschner, D., Locher, N., Zhang, H. y Altermatt, F. (2022). Meta-analysis shows both congruence and complementarity of DNA and eDNA metabarcoding to traditional methods for biological community assessment. *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/mec.16364.
- Kelly, R.P., O'Donnell, J.L., Lowell, N.C., Shelton, A.O., Samhoury, J.F., Hennessey, S.M., Feist, B.E. y Williams, G.D. (2016). Genetic signatures of ecological diversity along an urbanization gradient. *PeerJ*, 4: e2444. doi: 10.7717/peerj.2444.
- Kelly, R.P., Shelton, A.O. y Gallego, R. (2019). Understanding PCR Processes to Draw Meaningful Conclusions from Environmental DNA Studies. *Scientific Reports*, 9(1): 1–14. doi: 10.1038/s41598-019-48546-x.
- Lacoursière-Roussel, A., Howland, K., Normandeau, E., Grey, E.K., Archambault, P., Deiner, K., Lodge, D.M., Hernandez, C., Leduc, N. y Bernatchez, L. (2018). eDNA metabarcoding as a new surveillance approach for coastal Arctic biodiversity. *International Journal of Business Innovation and Research*, 17(3): 7763–7777. doi: 10.1002/ece3.4213.
- Langmead, B. y Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4): 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. y Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948. doi: 10.1093/bioinformatics/btm404.
- Lenoir, J., Bertrand, R., Comte, L., Bourgeaud, L., Hattab, T., Murienne, J. y Grenouillet, G. (2020). Species better track climate warming in the oceans than on land. *Nature Ecology and Evolution*, 4(8): 1044–1059. doi: 10.1038/s41559-020-1198-2.
- Leray, M., Yang, J.Y., Meyer, C.P., Mills, S.C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J.T. y Machida, R.J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 10: 1-34. doi: 10.1186/1742-9994-10-34.
- Lluch-Cota, S.E., Aragón-Noriega, E.A., Arreguín-Sánchez, F., Auriol-Gamboa, D., Bautista-Romero, J.J., Brusca, R.C., Cervantes-Duarte, R., Cortés-Altamirano, R., Del-Monte-Luna, P., Esquivel-Herrera, A., Fernández, G., Hendrickx, M.E., Hernández-Vázquez, S., Herrera-Cervantes, H., Kahru,

- M., Lavín, M., Lluch-Belda, D., Lluch-Cota, D.B., López-Martínez, J., Marinone, S.G., Nevárez-Martínez, M.O., Ortega-García, S., Palacios-Castro, E., Parés-Sierra, A., Ponce-Díaz, G., Ramírez-Rodríguez, M., Salinas-Zavala, C.A., Schwartzlose, R.A. y Sierra-Beltrán, A.P. (2007). The Gulf of California: Review of ecosystem status and sustainability challenges. *Progress in Oceanography*, 73(1): 1–26. doi: 10.1016/j.pocean.2007.01.013.
- Mac Loughlin, C., Valdivia-Carrillo, T., Valenzuela-Quíñonez, F., Reyes-Bonilla, H., Brusca, R.C. y Munguia-Vega, A. (2024). eDNA metabarcoding warms up a hotspot of marine biodiversity: revealing underrepresented taxa in visual surveys and historical records from the Gulf of California. *Marine Biodiversity*, 54(22): 1-20. doi: 10.1007/s12526-024-01415-x.
- Macher, T.H., Beermann, A.J. y Leese, F. (2021). TaxonTableTools: A comprehensive, platform-independent graphical user interface software to explore and visualise DNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources*, 21(5): 1705–1714. doi: 10.1111/1755-0998.13358.
- Manel, S., Guerin, P.-E., Albouy, C., Pellissier, L., Mouillot, D., Blanchet, S. y Velez, L. (2020). Global determinants of freshwater and marine fish genetic diversity. *Nature Communications*, 11(1): 1–9. doi: 10.1038/s41467-020-14409-7.
- Marques, V., Guérin, P.-É., Rocle, M., Valentini, A., Manel, S., Mouillot, D. y Dejean, T. (2020). Blind assessment of vertebrate taxonomic diversity across spatial scales by clustering environmental DNA metabarcoding sequences. *Ecography*, 43(12): 1779–1790. doi: 10.1111/ecog.05049.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1): 10. doi: 10.14806/ej.17.1.200.
- Marwayana, O.N., Gold, Z., Meyer, C.P. y Barber, P.H. (2021). Environmental DNA in a global biodiversity hotspot: Lessons from coral reef fish diversity across the Indonesian archipelago. *Environmental DNA*, (February): 1–17. doi: 10.1002/edn3.257.
- Miya, M. (2022). Environmental DNA Metabarcoding: A Novel Method for Biodiversity Monitoring of Marine Fish Communities. *Annual Review of Marine Science*, 14(1): 161–185. doi: 10.1146/annurev-marine-041421-082251.
- Miya, M., Gotoh, R.O. y Sado, T. (2020). MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fisheries Science*, 86(6): 939-970. doi: 10.1007/s12562-020-01461-x.
- Miya, M. y Nishida, M. (2014). The mitogenomic contributions to molecular phylogenetics and evolution of fishes: a 15-year retrospect. *Ichthyological Research*, 62(1): 29–71. doi: 10.1007/s10228-014-0440-9.
- Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B. y Worm, B. (2011). How many species are there on Earth and in the ocean? *PLoS Biology*, 9(8): e1001127. doi: 10.1371/journal.pbio.1001127.
- Morzaria-Luna, H.N., Cruz-Piñón, G., Brusca, R.C., López-Ortiz, A.M., Moreno-Báez, M., Reyes-Bonilla, H. y Turk-Boyer, P. (2018). Biodiversity hotspots are not congruent with conservation areas in the Gulf of California. *Biodiversity and Conservation*, 27(14): 3819–3842. doi: 10.1007/s10531-018-1631-x.
- Mugnai, F., Megléc, E., Abbiati, M., Bavestrello, G., Bertasi, F., Bo, M., Capa, M., Chenuil, A., Colangelo, M.A., De Clerck, O., Gutiérrez, J.M., Lattanzi, L., Leduc, M., Martin, D., Matterson, K.O., Mikac, B., Plaisance, L., Ponti, M., Riesgo, A., Rossi, V., Turicchia, E., Waeschenbach, A., Wangensteen, O.S. y Costantini, F. (2021). Are well-studied marine biodiversity hotspots still blackspots for animal barcoding? *Global Ecology and Conservation*, 32: e01909. doi: 10.1016/j.gecco.2021.e01909.

- Munguia-Vega, A., Green, A.L., Suarez-Castillo, A.N., Espinosa-Romero, M.J., Aburto-Oropeza, O., Cisneros-Montemayor, A.M., Cruz-Piñón, G., Danemann, G., Giron-Nava, A., Gonzalez-Cuellar, O., Lasch, C., del Mar Mancha-Cisneros, M., Marinone, S.G., Moreno-Báez, M., Morzaria-Luna, H.N., Reyes-Bonilla, H., Torre, J., Turk-Boyer, P., Walther, M. y Weaver, A.H. (2018). Ecological guidelines for designing networks of marine reserves in the unique biophysical environment of the Gulf of California. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 28(4): 749–776. doi: 10.1007/s11160-018-9529-y.
- Munguia-Vega, A., Marinone, S.G., Paz-Garcia, D.A., Giron-Nava, A., Plomozo-Lugo, T., Gonzalez-Cuellar, O., Weaver, A.H., García-Rodríguez, F.J. y Reyes-Bonilla, H. (2018). Anisotropic larval connectivity and metapopulation structure driven by directional oceanic currents in a marine fish targeted by small-scale fisheries. *Marine Biology*, 165(1): 1-16. doi: 10.1007/s00227-017-3267-x.
- Munguia-Vega, A., Terrazas-Tapia, R., Dominguez-Contreras, J.F., Reyna-Fabian, M. y Zapata-Morales, P. (2022). DNA barcoding reveals global and local influences on patterns of mislabeling and substitution in the trade of fish in Mexico. *PLoS One*, 17(4): e0265960. doi: 10.1371/journal.pone.0265960.
- Munguía-Vega, A., Torre, J., Turk-Boyer, P., Marinone, S.G., Lavín, M.F., Pfister, T., Shaw, W., Danemann, G., Raimondi, P., Castillo-López, A., Cinti, A., Duberstein, J.N., Moreno-Báez, M., Rojo, M., Soria, G., Sánchez-Velasco, L., Morzaria-Luna, H.N., Bourillón, L., Rowell, K. y Cudney-Bueno, R. (2015). PANGAS: An Interdisciplinary Ecosystem-Based Research Framework for Small-Scale Fisheries in the Northern Gulf of California. *Journal of the Southwest*, 57(2/3): 337–390. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/26310171>.
- Munguia-Vega, A., Weaver, A.H., Domínguez-Contreras, J.F. y Peckham, H. (2021). Multiple drivers behind mislabeling of fish from artisanal fisheries in La Paz, Mexico. *PeerJ*, 9: e10750. doi: 10.7717/peerj.10750.
- Nguyen, B.N., Shen, E.W., Seemann, J., Correa, A.M.S., O'Donnell, J.L., Altieri, A.H., Knowlton, N., Crandall, K.A., Egan, S.P., McMillan, W.O. y Leray, M. (2020). Environmental DNA survey captures patterns of fish and invertebrate diversity across a tropical seascape. *Scientific Reports*, 10(1): 1–14. doi: 10.1038/s41598-020-63565-9.
- Ogle, D.H., Doll, J.C., Wheeler, A.P. y Dinno, A. (2023). FSA: Simple Fisheries Stock Assessment Methods. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=FSA>.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H. y Wagner, H. (2018). Package 'vegan' version 2.5-2. ISBN 0-387-95457-0. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>.
- Olivier, D., Loiseau, N., Petatán-Ramírez, D., Trujillo-Millan, O., Suárez-Castillo, A.N., Torre, J., Munguia-Vega, A. y Reyes-Bonilla, H. (2018). Functional-biogeography of the reef fishes of the islands of the Gulf of California: Integrating functional divergence into marine conservation. *Global Ecology and Conservation*, 16: 1–15. doi: 10.1016/j.gecco.2018.e00506.
- Patin, N.V. y Goodwin, K.D. (2022). Long-Read Sequencing Improves Recovery of Picoeukaryotic Genomes and Zooplankton Marker Genes from Marine Metagenomes. *mSystems*, 7(6): e0059522. doi: 10.1128/msystems.00595-22.
- Pawlowski, J., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Mächler, E. y Altermatt, F. (2020). Environmental DNA applications in biomonitoring and bioassessment of aquatic ecosystems: Guidelines. First ed. Federal Office for the Environment. doi: 10.5167/uzh-187800. Link.
- Pawlowski, J., Kelly-Quinn, M., Altermatt, F., Apothéloz-Perret-Gentil, L., Beja, P., Boggero, A., Borja, A., Bouchez, A., Cordier, T., Domaizon, I., Feio, M.J., Filipe, A.F., Fornaroli, R., Graf, W., Herder, J.,

- van der Hoorn, B., Iwan Jones, J., Sagova-Mareckova, M., Moritz, C., Barquín, J., Piggott, J.J., Pinna, M., Rimet, F., Rinkevich, B., Sousa-Santos, C., Specchia, V., Trobajo, R., Vasselon, V., Vitecek, S., Zimmerman, J., Weigand, A., Leese, F. y Kahlert, M. (2018). The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *The Science of the Total Environment*, 637–638: 1295–1310. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.002.
- Peguero-Icaza, M., Sánchez-Velasco, L., Lavin, M.F. y Marinone, S.G. (2008). Larval fish assemblages, environment and circulation in a semienclosed sea (Gulf of California, Mexico). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79(2008): 277–288. doi: 10.1016/j.ecss.2008.04.008.
- Pinsky, M.L., Selden, R.L. y Kitchel, Z.J. (2020). Climate-Driven Shifts in Marine Species Ranges: Scaling from Organisms to Communities. *Annual Review of Marine Science*, 12(1): 153–179. doi: 10.1146/annurev-marine-010419-010916.
- Pörtner, H.-O., Roberts, D.C., Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Tignor, M., Poloczanska, E., Mintenbeck, K., Algeria, A., Nicolai, M., Okem, A., Petzold, J., Rama, B. y Weyer, N.M. (2019). IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a changing Climate. Disponible en: [http://www.ipcc.ch/publications\\_and\\_data/ar4/wg2/en/spm.html](http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg2/en/spm.html).
- Pruitt, K.D., Tatusova, T. y Maglott, D.R. (2005). NCBI Reference Sequence (RefSeq): A curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Research*.doi: 10.1093/nar/gki025.
- QGIS Development Team. (2009). QGIS Geographic Information System. Disponible en: <http://qgis.osgeo.org>.
- Questel, J.M., Hopcroft, R.R., DeHart, H.M., Smoot, C.A., Kosobokova, K.N. y Bucklin, A. (2021). Metabarcoding of zooplankton diversity within the Chukchi Borderland, Arctic Ocean: improved resolution from multi-gene markers and region-specific DNA databases. *Marine Biodiversity*, 51(1): 1-19. doi: 10.1007/s12526-020-01136-x.
- R Core Team. (2018). The R Project for Statistical Computing. Disponible en: <https://www.r-project.org/>.
- Rambaut, A. (2010). FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. Version 1.3.1. Disponible en: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Ribeiro, B., Velasco, S., Guidoni-Martins, K., Tessarolo, G. y Jardim, L. (2022). bdc: Biodiversity Data Cleaning. Version 1.0.0. Disponible en: <https://github.com/brunobrr/bdc>.
- Roberts, C.M., McClean, C.J., Veron, J.E.N., Hawkins, J.P., Allen, G.R., McAllister, D.E., Mittermeier, C.G., Schueler, F.W., Spalding, M., Wells, F., Vynne, C. y Werner, T.B. (2002). Marine Biodiversity Hotspots and Conservation Priorities for Tropical Reefs. *Science*, 295: 1280–1285. doi: 10.1126/science.1067728.
- Robertson, D.R. y Allen, G.R. (2015). Shorefishes of the Tropical Eastern Pacific: online information system. Version 2.0. Disponible en: <https://biogeodb.stri.si.edu/sftep/en/pages>.
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Zinger, L., Kinziger, A., Bik, H.M., Bonin, A., Coissac, E., Emerson, B.C., Lopes, C.M., Pelletier, T.A., Taberlet, P. y Narum, S. (2021). Biodiversity monitoring using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 21(5): 1405–1409. doi: 10.1111/1755-0998.13399.
- Rogers, A.D., Appeltans, W., Assis, J., Ballance, L.T., Cury, P., Duarte, C., Favoretto, F., Hynes, L.A., Kumagai, J.A., Lovelock, C.E., Miloslavich, P., Niamir, A., Obura, D., O’Leary, B.C., Ramirez-Llodra, E., Reygondeau, G., Roberts, C., Sadovy, Y., Steeds, O., Sutton, T., Tittensor, D.P., Velarde, E., Woodall, L. y Aburto-Oropeza, O. (2022). Discovering marine biodiversity in the 21st century. *Advances in Marine Biology*, 93: 23–115. doi: 10.1016/bs.amb.2022.09.002.

- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D. y Kirk, P.M. (2015). A higher level classification of all living organisms. *PLoS One*, 10(4): e0119248. doi: 10.1371/journal.pone.0119248.
- Saenz-Agudelo, P., Delrieu-Trottin, E., Dibattista, J.D., Martínez-Rincon, D., Morales-González, S., Pontigo-Gonzalez, F., Ramírez, P., Silva, A., Soto, M. y Correa, C. (2021). Monitoring vertebrate biodiversity of a protected coastal wetland using eDNA metabarcoding. (December 2020): 1–16. doi: 10.1002/edn3.200.
- Sánchez-Velasco, L., Beier, E., Godínez, V.M., Barton, E.D., Santamaría-del-Ángel, E., Jiménez-Rosemberg, S.P.A. y Marinone, S.G. (2017). Hydrographic and fish larvae distribution during the “Godzilla El Niño 2015-2016” in the northern end of the shallow oxygen minimum zone of the Eastern Tropical Pacific Ocean. *Journal of Geophysical Research, C: Oceans*, 122(3): 2156–2170. doi: 10.1002/2016jc012622.
- Santiago-García, M.W., Marinone, S.G. y Velasco-Fuentes, O.U. (2014). Three-dimensional connectivity in the Gulf of California based on a numerical model. *Progress in Oceanography*, 123: 64–73. doi: 10.1016/j.pocean.2014.02.002.
- Sawaya, N.A., Djurhuus, A., Closek, C.J., Hepner, M., Olesin, E., Visser, L., Kelble, C., Hubbard, K. y Breitbart, M. (2019). Assessing eukaryotic biodiversity in the Florida Keys National Marine Sanctuary through environmental DNA metabarcoding. *Ecology and Evolution*, 9(3): 1029–1040. doi: 10.1002/ece3.4742.
- Schroeter, J.C., Maloy, A.P., Rees, C.B. y Bartron, M.L. (2019). Fish mitochondrial genome sequencing: expanding genetic resources to support species detection and biodiversity monitoring using environmental DNA. *Conservation Genetics Resources*, 12(3): 433–446. doi: 10.1007/s12686-019-01111-0.
- Sevellec, M., Lacoursière-Roussel, A., Bernatchez, L., Normandeau, E., Solomon, E., Arreak, A., Fishback, L. y Howland, K. (2020). Detecting community change in Arctic marine ecosystems using the temporal dynamics of environmental DNA. *Environmental DNA*, (September 2019): 1–18. doi: 10.1002/edn3.155.
- Seymour, M., Edwards, F.K., Cosby, B.J., Kelly, M.G., de Bruyn, M., Carvalho, G.R. y Creer, S. (2020). Executing multi-taxa eDNA ecological assessment via traditional metrics and interactive networks. *The Science of the Total Environment*, 729: 138801. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138801.
- Sigsgaard, E.E., Nielsen, I.B., Bach, S.S., Lorenzen, E.D., Robinson, D.P., Knudsen, S.W., Pedersen, M.W., Jaidah, M.A., Orlando, L., Willerslev, E., Møller, P.R. y Thomsen, P.F. (2017). Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution*, 1(1): 1–4. doi: 10.1038/s41559-016-0004.
- Stat, M., Huggett, M.J., Bernasconi, R., Dibattista, J.D., Berry, T.E., Newman, S.J., Harvey, E.S. y Bunce, M. (2017). Ecosystem biomonitoring with eDNA: Metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Scientific Reports*, 7(1): 1-11. doi: 10.1038/s41598-017-12501-5.
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L. y Coissac, E. (2018). Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. Oxford University Press. doi: 10.1093/oso/9780198767220.001.0001.
- Taberlet, P., Coissac, E., Brochmann, C., Pompanon, F. y Willerslev, E. (2012). Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21: 2045–2050. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x.
- Takahashi, M., Saccò, M., Kestel, J.H., Nester, G., Campbell, M.A., van der Heyde, M., Heydenrych, M.J., Juskiewicz, D.J., Nevill, P., Dawkins, K.L., Bessey, C., Fernandes, K., Miller, H., Power, M.,

- Mousavi-Derazmahalleh, M., Newton, J.P., White, N.E., Richards, Z.T. y Allentoft, M.E. (2023). Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *The Science of the Total Environment*, 873: 162322. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.162322.
- Technelysium. (1996). Chromas Pro v2.1.10. DNA Sequencing Software. Disponible en: <https://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22): 4673–4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673.
- Thomson, D.A., Findley, L.T. y Kerstitch, A.N. (2000). *Reef Fishes of the Sea of Cortez: The Rocky-Shore Fishes of the Gulf of California*. University of Texas Press, Austin, Texas.
- Tsuji, S., Inui, R., Nakao, R., Miyazono, S., Saito, M., Kono, T. y Akamatsu, Y. (2022). Quantitative environmental DNA metabarcoding shows high potential as a novel approach to quantitatively assess fish community. *Scientific Reports*, 12(1): 1–11. doi: 10.1038/s41598-022-25274-3.
- Ulate, K., Sánchez, C., Sánchez-Rodríguez, A., Alonso, D., Aburto-Oropeza, O. y Huato-Soberanis, L. (2016). Latitudinal regionalization of epibenthic macroinvertebrate communities on rocky reefs in the Gulf of California. *Marine Biology Research*, 12(4): 389-401. doi: 10.1080/17451000.2016.1143105.
- Valdivia-Carrillo, T., Rocha-Olivares, A., Reyes-Bonilla, H., Domínguez-Contreras, J.F. y Munguia-Vega, A. (2021). Integrating eDNA metabarcoding and simultaneous underwater visual surveys to describe complex fish communities in a marine biodiversity hotspot. *Molecular Ecology Resources*, 21(5): 1558-1574. doi: 10.1111/1755-0998.13375.
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G.H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.M., Peroux, T., Crivelli, A.J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P.R., Willerslev, E. y Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4): 929–942. doi: 10.1111/mec.13428.
- Walker, B.W. (1960). The Distribution and Affinities of the Marine Fish Fauna of the Gulf of California. *Systematic Zoology*, 9(3/4): 123–133. doi: 10.2307/2411961.
- Wangensteen, O.S., Palacín, C., Guardiola, M. y Turon, X. (2018). DNA metabarcoding of littoral hardbottom communities: High diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ*, 6(5): e4705. doi: 10.7717/peerj.4705.
- West, K.M., Stat, M., Harvey, E.S., Skepper, C.L., DiBattista, J.D., Richards, Z.T., Travers, M.J., Newman, S.J. y Bunce, M. (2020). eDNA metabarcoding survey reveals fine-scale coral reef community variation across a remote, tropical island ecosystem. *Molecular Ecology*, 29(6): 1069–1086. doi: 10.1111/mec.15382.
- Wood, S.A., Biessy, L., Latchford, J.L., Zaiko, A., von Ammon, U., Audrezet, F., Cristescu, M.E. y Pochon, X. (2020). Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system. *The Science of the Total Environment*, 704: 135314. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135314.
- Yates, M.C., Glaser, D., Post, J., Cristescu, M.E., Fraser, D.J. y Derry, A.M. (2020). Allometric scaling strengthens the relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature. *Molecular Ecology*. doi: 10.1111/mec.15543.
- Zhang, Y., Pavlovska, M., Stoica, E., Prekrasna, I., Yang, J., Slobodnik, J., Zhang, X. y Dykyi, E. (2020). Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: From



bacteria to marine mammals. *Environment International*, 135(October 2019): 105307. doi: 10.1016/j.envint.2019.105307.

## 11. ANEXOS

## ANEXO A. Parámetros de ANACAPA utilizados.

MODULE	step	Parameter info				
		name	description	default (range)	18S	12S
CRUX	ecoPCR	s	Shortest amplicon expected (e.g. 100 bp shorter than the average amplicon length)	custom	50	20
		m	Longest amplicon expected (e.g. 100 bp longer than the average amplicon length)	custom	450	180
		k	Chunk size for breaking up blast seeds	500	"	"
		e	Maximum number of mismatch between primers and EMBL database sequences	3	"	"
		g	Maximum number of allowed errors for filtering and trimming the BLAST seed sequences with cutadapt	0.3	"	"
		t	The number of threads to launch for the first round of BLAST	10	"	"
	blastn	v	The minimum accepted value for BLAST hits in the first round of BLAST	0.00001	"	"
		i	The minimum percent ID for BLAST hits in the first round of BLAST	50	"	"
		c	Minimum percent of length of a query that a BLAST hit must cover	100	"	"
		a	Maximum number of BLAST hits to return for each query	10,000	"	"
		z	BLAST gap opening penalty	1	"	"
		y	BLAST gap extension penalty	1	"	"
		w	The minimum accepted value for BLAST hits in the first round of BLAST	0.00001	"	"
		p	The minimum percent ID for BLAST hits in the first round of BLAST	70	"	"
		q	Minimum percent of length of a query that a BLAST hit must cover	70	"	"
		QC-ASV	CUTADAPT. Remove adapters and primers, except those used for sorting	c	To modify the allowed cutadapt error for 3' adapter and 5' primer adapter trimming	0.3 (0-1)
CUTADAPT. Sort reads by metabarcoding primer and remove remaining primers	ERROR_PS		To modify max mismatch when primer sorting	3(1-inf)	"	"
	p		To modify the allowed cutadapt error for 3' primer sorting and trimming	0.3 (0-1)	"	"
	x		To modify the additional 5' trimming of forward reads	10(0-300)	0	0
	y	To modify the additional 5' trimming of reverse reads	25(0-300)	0	0	

FASTXTOOLKIT	q	To modify the minimum quality score allowed	35(0-40)	"	"
	m	minimun read length retained	100(0-300)	50	40
PYTHON. Check_paired.py	# Make directories for the soon to be sorted reads. Reads will be sorted by primer and then by paired or unpaired read status.				
	# For each sample and each metabarcode, this python script checks to see if the forward and reverse files have read pairs, or singleton F or R reads. Reads are then sorted into the directories generated above.				
dada2. Filter	e	File path to a list of minimum length(s) required for paired F and R reads to overlap	100(0-inf)	40	20
	maxEE	Sets the maximum number of "expected errors" allowed in a read, which is a better filter than simply averaging quality scores.	2,2(1-inf)	"	"
	max	ambiguous nuceotides are not admitted	0(0-inf)	"	"
	minLen	Remove reads with length less than minLen	10(1-inf)	40	40
	truncQ	Truncate reads at the first instance of a quality score less than or equal to truncQ.	0	"	0
DADA2	# Check for cases where the filtering step left zero sequences in the output file----				
DADA2	# Learn errors and save plots----- learnErrors(filtered_seqs_name, multithread=TRUE)				
DADA2	# Dereplicate sequences ----- derepFastq(filtered_seqs_name, verbose=TRUE)				
DADA2	# Run dada on the dereplicated sequences ----- dada(derep_seqs, err=error_profile, multithread=TRUE)				
DADA2. Merge F and R reads (for paired subset)	minOverlap	minimum overlap for alignment	20	"	"
	maxMismatch	maximum number of mismatches for alignment	2	"	"
DADA2	# Remove chimeras ---- removeBimeraDenovo(seqtab, method="consensus", multithread=TRUE, verbose=TRUE)				
DADA2	# Make output FASTA files and abundance tables for the processed reads-----				
DADA2	b	To modify the number of occurrences required to keep an ASV	0(0-inf)	"	"
DADA2	# If working with unpaired reads, this is the end! -----				
	# grab the correct F and R reads from the dadaF and dadaR files -----				

	R. Process paired reads that didn't align: unmerged	# add sequence length for forwards and reversed to unmerged dereplicated data				
		# add expected length of amplicon				
		# Get the reverse complement of the R sequence				
		# Spread the dataframe, and sum up the abundances per id				
		# Run bimeras detection on unmerged reads and discard bimeras ----				
		# Reformat data for Bowtie2 -----				
		# make output files				
Classifier	bowtie2. ASV files are mapped to CRUX reference libraries	end-to-end	global alignment mode only considers full length alignments. Those not aligned are then locally aligned.			
		local	This mode does not require the hit to be the entire length of the query. This includes partial matches to full length references, or full matches to short references.			
		k	max number of best hits	100	"	"
		no-hd/no-sq	suppress the header lines			
		no-unal	do not add unaligned reads to the sam file (output)			
		very-sensitive	preset option in bowtie2 is slow but designed to be more accurate and sensitive			
	BLCA. Assign Taxonomy	b	Percent of mismatch allowed between the query and subject for BLCA	0.8(0-1)	"	"
		p	Minimum percent of length of the subject relative to the query for BLCA	0.8(0-1)	"	"
		c	bootstrap cutoff levels	40-100	"	"
		n	BLCA number of times to bootstrap	100(2-inf)	"	"
		x	score for muscle alignment matches	1	"	"
		f	penalty for muscle alignment mismatches	-2.5	"	"
		g	Muscle alignment gap penalty	-2	"	"

## ANEXO B. Código genético del metabarcote teleo del gen 12S de las especies de peces locales del presente estudio.

Familia	Especie	Secuencia del metabarcote <i>teleo</i> del gen ribosomal 12S
Antennariidae	<i>Antennatus sanguineus</i>	CCCCAAAATCTAATTATTTTTACCTAAACCTAATTGTCTGATTAACCTAAGGGGAGAGAAAGTCGAA AA
Apogonidae	<i>Apogon retrosella</i>	CACTCTCCCAAGTTTAAAACCTTACCATTAATTAAACATTAATACTACAAAGGGGAGGCAAG TCTTAACA
Belonidae	<i>Tylosorus crocodilus</i>	CCCCAAACAAATAATTTAAATAATTAATAAGCCAAACAAACAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Bythitidae	<i>Ogilbia ventralis</i>	CCCCAAGCTCTTACCACATATACCTAAAAAGATATAAATGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Carangidae	<i>Caranx caballus</i>	CCCCAAGCAACTGGACCTAAAATTTCTTTAAACCTAACCAACCGGAAGGAGAGGAAAGTCGT AA
Carangidae	<i>Caranx caninus</i>	CCCCAAGCAGCTGGTCTGAATTTTTCTTAAACCTAACCAATCGCGAAGGAGAGGAAAGTCGT AA
Carangidae	<i>Selar crumenophthalmus</i>	CCCGTCCCGTAACTGATGGCTACTGGGTATGTAAGAGGTAACATTAAGTAAGGGGAGGCAAG TCGTAACA
Chaenopsidae	<i>Acanthemblemaria macrospilus</i>	CCCCTAGCTTATTTACTATAACTAATAAACGCCTCTAGCAAAGGGGAGGCAAGTCATAA
Chaenopsidae	<i>Chaenopsis alepidota</i>	CCCCGAGCTAGAATTAACGATAATTAATAAGCACTTTAAGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Chaenopsidae	<i>Cirriemblemaria lucasana</i>	TCACTCTCCCGAATAATATTAATCTATACATAATCCGTTTACCAAACAAAGGGGAGGCAAGTC GGAACA
Chaenopsidae	<i>Coralliozetus micropes</i>	CACTCTCCCAAGCTACCTTATTTCTTAACTAAAAACAACCTCAAGCAAAGGGGAGGCAAGTCG TAACA
Chaenopsidae	<i>Emblemaria hypacanthus</i>	CACTCTCCCAAGCATACTTATTTCTTAACTAAAAACAACCTCGAGCAAAGGGGAGGCAAGTCG TAACA
Cirrhitidae	<i>Cirrhichthys oxycephalus</i>	CCCCGAGCTAACCTGTCAACGTAATTAACACTAACGCTGCACGAGGGGAGGCAAGATCGTA A
Dactyloscopidae	<i>Gillellus semicinctus</i>	CCCCGAGCTAAAAACAAAAATACATTATAAACCTCACAAGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Dasyatidae	<i>Dasyatis brevis</i>	TCACTCTCTCGAAAAAATCATTATAAATTATATAAAAAAATTTTCAACAAGAGGAGGCAAGT CGTAACA
Gobiesocidae	<i>Gobiesox adustus</i>	CTCCAAGCTATTAATTTTTATTTCTAATATAAGCTAGAAGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Gobiidae	<i>Aruma histrio</i>	CCCCAACGAAATCTTAAGCAATAAATAATGACAATTAATCATAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Gobiidae	<i>Barbulifer pantherinus</i>	CCCCAAGGTCTACAAAAATAATTAATAATCAACCCGCCACAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Gobiidae	<i>Chriolepis semisquamata</i>	CCCCAAGGCTACAAAAATAATTAATAATCAACCCGCCACAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Gobiidae	<i>Chriolepis zebra</i>	TTCACTCGTCCCAAGGCCACAAAAATAATTAATAAACCGCCAGCCACAAAGGGGAGGCA AGTACTAANN
Gobiidae	<i>Ctenogobius sagittula</i>	ATCACTCTCCCAAGGTGCTACCAAAGAATAATTAATAATCAACCCGCCACAAAGGGGAGGCA AGTACGTAACA
Gobiidae	<i>Gobiosoma chiquita</i>	CCCCAATGGCACCCTAATAACTAATAAACCTCACGCCGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Gobiidae	<i>Gobulus crescentalis</i>	CCCCAAGCCCGCCATAAATAAATAATACCCAGCCGCCACAAAGGGGAGGCAAGTCNTAA
Gobiidae	<i>Lythrypnus dalli</i>	CCCCAACCGTTTATTATCCCGTGCTATTTAATGCACGTGATAGAATATCAAATTTATAATTAG ATACTTGGCCACTGGGGAGGCAAGTCGTAA
Gobiidae	<i>Tigrigobius digueti</i>	CCCCAACGGCCACACTCATAATTAATACCAACATGCCATAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA

Kyphosidae	<i>Kyphosus labriformis</i>	CCCCAAACATATCTTTCTCAACCTATTTTAAAAACCTTTCATCAATGAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Labridae	<i>Halichoeres chierchia</i>	CTCCGAGCTAGTCGAAACTACCATTACTAATAAGCCAGAGCTGCTAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Labridae	<i>Halichoeres melanotis</i>	CCCCGAGCAGAAAAACTCTTACCTAAAAAACCAAAGAATGTAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Labrisomidae	<i>Labrisomus xanti</i>	ACNCCGTCCTCCTACTCTNCCCNNGGCTTCGACCNATNNNCTTAGGNANNACACATACANAA NCTAGNGNCG
Labrisomidae	<i>Malacoctenus hubbsi</i>	CCCCAAGCTTTTTATTAATTAATTAACAAAAACAAAAACAAGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Labrisomidae	<i>Malacoctenus mararitae</i>	CCCCAAGCTTACAAAGACTAGTAACTAAAACACAATACAAGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Labrisomidae	<i>Malacoctenus mexicanus</i>	CCCCAAGGCTTACAAAGACTAGTAACTAAAACACAATACAAGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Labrisomidae	<i>Malacoctenus zaca</i>	CCCCAAGCTTTTTATTAATTAATTAACAAAAACAAAAACAAGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Labrisomidae	<i>Paraclinus altivelis</i>	CCCCAAGCTAACAACTTTTAGACTACCTAACATCAACAAGAAGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Labrisomidae	<i>Paraclinus beebei</i>	CCCCAAGCTAACAACTTTTAGACTACCTAACATCAACAAGAAGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Labrisomidae	<i>Paraclinus sini</i>	CCCCAAGCTAACAACTTTTAGACTACCTAACATCAACAAGAAGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Labrisomidae	<i>Starksia spinipenis</i>	GTCACTCTCCCCAAGCGACAATTAATAACTATAACTAATACCTTTACAGCAGAGGGGAGGCAAG TCGGAACA
Labrisomidae	<i>Stathmonotus culebrai</i>	GTCACTCTCTCAAGCTGCCTGAAGCCATAATTAATAAGAGTCAACAAGCTAAGGGGAGACA AGTCGTAACA
Labrisomidae	<i>Stathmonotus sinuscalifornici</i>	CTCCAAGCTGCCTGAAGCCATAATTAATATGAGTCAACAAGCTAAGGGGAGACAAGTCGTAA
Labrisomidae	<i>Xenomedeia rhodopyga</i>	CCCCAAGCGAACGAAGAAAATAACCTAATACTTTAAACAAGCACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Merlucciidae	<i>Merluccius productus</i>	CCCCAACAAACCAACATCTGGTAAATAACAAGACAGCAGCNACAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Microdesmidae	<i>Microdesmus incertae sedis</i>	GTCNCTCTCTCAAGCTGCCGTGAAGNCCATAATNAATATGAGNCAACAAGCTAAGGGGAGAC NAGCCNTAACA
Muraenidae	<i>Anarchias galapagensis</i>	CCTCGAAAGAATACCCTAATACATAATACCTGAAACAGATAGAGAGGAGGCAAGTCGTAA
Muraenidae	<i>Uropterygius macrocephalus</i>	CCTCGAAAGAACAAGACAGATATATAATAACTTAAGCAGATAAAGAGGAGGCAAGTCGTAA
Nematistiidae	<i>Nematistius pectoralis</i>	CCCCTAAGTATGGTACTGGGTATGTAAGAGGTAGCATTAAAGTAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Paralichthyidae	<i>Paralichthys woolmani</i>	CCCCAAGCTCTCAAAAACAAAATAACTAAAAACAACAACCCGCGAAGGGGAGGAAAGTCCCAA
Pomacentridae	<i>Chromis atrilobata</i>	CCCCGAGCAAAAATTTATATGTACCTAAAAACCCACATCTGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Pomacentridae	<i>Stegastes acapulcoensis</i>	CTCCAAATCACATTAATAATTTTTTAATAATTACACAAATTAAGGTGAGGCAAGTCGTAA
Pomacentridae	<i>Stegastes flavilatus</i>	CCCCTAATGACCATCTAACAGTATTTAAAAACAATACCAATAGAGGGGAGACAAGTCGTAA
Sciaenidae	<i>Pareques fuscovittatus</i>	CCCCAACTAATTAACCCAATTAATAAAAACTCGCCGTAGTAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Scorpaenidae	<i>Scorpaenodes xyris</i>	CCCCAGGCTTTAGCTATATGCTTAATTTAAGCCTACTCCGCTATACATTTAGGGGAGGCAAGTC GTAA
Serranidae	<i>Cephalopholis panamensis</i>	CCCCGAGCATCTCTTCAATTTAATTTAAGACCCCTAAGCAGCAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA

Syngnathidae	<i>Cosmocampus arctus</i>	CCCCAACATTACCCGCATTATATAAAACATTAGAAAATATAAGGGGAGGCAAGATCGTAA
Syngnathidae	<i>Doryrhamphus excisus</i>	CCCCTCGCACACAAACAACCTAAATAAACAAACAACCAGCTAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Tetraodontidae	<i>Canthigaster punctatissima</i>	CTCCCCGAACCAACCAACCAAAACAACAATAACTAATACAATATTACACATATTAAGGAGGC AAGTCTTAACA
Triakidae	<i>Mustelus henlei</i>	CCTCAAAAACACTTATTTTTTTTCATAAATATATTTCTTTAACAAGAGGAGGCAAGTCGTAA
Tripterygiidae	<i>Axoclinus nigricaudus</i>	CCCCAAGCTTATTTATTCTAATAACTAATAACCTGTTTTTAGNAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA
Tripterygiidae	<i>Enneanectes carminalis</i>	TCACTCTCCCAAGCTTATTTATTCTAATAACTAATAACCTGTTTTAGTAACAGGGGAGGCAAGT CGTAACA
Tripterygiidae	<i>Enneanectes reticulatus</i>	CCCCAAGCTTATTTATTCTAATAACTAATAACCTGTTTTAGTAAAGGGGAGGCAAGTCGTAA

---

**ANEXO C. Lista de 26 Filos y 15 linajes principales exclusivos de los ADN<sub>18S</sub>, agrupados dentro de "Otros NA".**

ID	Linaje o gran grupo	Phyla	Linaje	Modo trófico conocido	Habitat
1	Amoebozoa	Discosea		fagotrófico	planctónico
2	Amoebozoa	Tubulinea		fagotrófico	planctónico
3	Discoba	Euglenozoa		fagotrófico / fototrófico / mixotrófico / osmotrophic	planctónico
4	Eukaryota incertae sedis	Picozoa		fagotrófico / mixotrófico ?	planctónico
5	Fungi	Basidiomycota		osmotrophic / parasítico / symbiotic	planctónico
6	Fungi	Blastocladiomycota		osmotrophic / parasítico / symbiotic	planctónico
7	Fungi	Chytridiomycota		osmotrophic / parasítico	planctónico
8	Fungi	Cryptomycota		osmotrophic / parasítico / symbiotic	planctónico
9	Fungi	Mucoromycota		osmotrophic / parasítico / symbiotic	planctónico
10	Fungi	Oomycota		osmotrophic / parasítico	planctónico
11	Fungi	Zoopagomycota		osmotrophic / parasítico / symbiotic	planctónico
12	Fungi	Other NA	Aphelidea	fagotrófico / parasítico	planctónico
13	Holozoa	Other NA	Choanoflagellata	fagotrófico	planctónico
14	Holozoa	Other NA	Filasterea	parasítico	
15	Holozoa	Other NA	Ichthyosporea	parasítico	
16	incerta sedis	Other NA	Telonemia	fagotrófico	planctónico
17	Metamonada	Fornicata		fagotrófico / parasítico / simbionte	planctónico
18	Metazoa	Entoprocta		fagotrófico	bentónico
19	Metazoa	Gastrotricha		fagotrófico	
20	Metazoa	Hemichordata		fagotrófico	bentónico
21	Metazoa	Kinorhyncha		fagotrófico	bentónico
22	Metazoa	Phoronida		fagotrófico	bentónico
23	Metazoa	Rotifera		fagotrófico	planctónico / bentónico
24	Metazoa	Tardigrada		fagotrófico	
25	other	Hemimastigophora		fagotrófico	planctónico
26	SAR-Alveolata	Apicomplexa		mostly parasítico / some fagotrófico, simbionte or mixotrófico	planctónico
27	SAR-Alveolata	Ciliophora		fagotrófico / mixotrófico / some simbionte or parasítico	planctónico abundante
28	SAR-Alveolata	Perkinsozoa		parasítico	planctónico
29	SAR-Rhizaria	Endomyxa		fagotrófico	planctónico
30	SAR-Rhizaria	Imbriccatea		fagotrófico	planctónico
31	SAR-Rhizaria	Other NA	Acantharea	fagotrófico / mixotrófico	planctónico Abundant
32	SAR-Stramenopiles	Other NA	Bigyra	fagotrófico / symbiotic	



33	SAR-Stramenopiles	Other NA	Developea	fagotrófico / fototrófico / mixotrófico / some osmotrophic	planctónico
34	SAR-Stramenopiles	Other NA	Pirsoniales	parasítico	planctónico
35	SAR-Stramenopiles	Other NA	Sticholonchida	fagotrófico / fototrófico / mixotrófico / some osmotrophic	planctónico
36	SAR-Stramenopiles	Other NA	Nassellaria	fagotrófico / mixotrófico	planctónico Abundant
37	SAR-Stramenopiles	Other NA	Spumellaria	fagotrófico / mixotrófico	planctónico Abundant
38	SAR-Stramenopiles	Other NA	Collodaria	fagotrófico / mixotrófico	planctónico Abundant
39	Viridiplantae	Prasinodermophyta		fototrófico / mixotrófico	planctónico
40		Other NA	Ancyromonadida	fagotrófico	planctónico
41	CRuMs	Other NA	Rigifilida	fagotrófico	planctónico / bentónico

---

**ANEXO D. Familias de metazoos adicionadas al compilado histórico por ADN18S dentro de linajes representativos.**

ID	Phylum	Familia	Descripción breve
1	Annelida	Apistobranchidae	poliquetos
2	Annelida	Enchytraeidae	oligoquetos
3	Annelida	Gastrostomobdellidae	anélidos
4	Annelida	Glossiphoniidae	sangijuelas
5	Annelida	Naididae	oligoquetos
6	Annelida	Nerillidae	poliquetos
7	Annelida	Piscicolidae	sangijuelas
8	Annelida	Polygordiidae	poliquetos
9	Annelida	Protodrilidae	poliquetos
10	Annelida	Psammodrilidae	
11	Arthropoda	Aegisthidae	copépodos
12	Arthropoda	Ancorabolidae	copépodos
13	Arthropoda	Calocalanidae	copépodos
14	Arthropoda	Candonidae	ostrácodos
15	Arthropoda	Cyclopettidae	copépodos
16	Arthropoda	Cyclopidae	copépodos
17	Arthropoda	Cyclopinidae	copépodos
18	Arthropoda	Cytheruridae	ostrácodos
19	Arthropoda	Ergasilidae	copépodos
20	Arthropoda	Halacaridae	ácaros marinos
21	Arthropoda	Harpacticidae	copépodos
22	Arthropoda	Laophontidae	copépodos
23	Arthropoda	Leuconidae	camarones encapuchados
24	Arthropoda	Loxoconchidae	ostrácodos
25	Arthropoda	Miraciidae	copépodos
26	Arthropoda	Misophriidae	copépodos
27	Arthropoda	Monstrillidae	copépodos
28	Arthropoda	Parastenheliidae	copépodos
29	Arthropoda	Peltidiidae	copépodos
30	Arthropoda	Pseudocyclopiidae	copépodos
31	Arthropoda	Rhynchomolgidae	copépodos
32	Arthropoda	Ryocalanidae	copépodos
33	Arthropoda	Schminkepinellidae	copépodos
34	Arthropoda	Spinocalanidae	copépodos
35	Arthropoda	Tachidiidae	copépodos
36	Arthropoda	Tetranychidae	ácaros
37	Arthropoda	Tharybidae	copépodos
38	Arthropoda	Xarifiidae	copépodos
39	Arthropoda	Xestoleberididae	ostrácodos
40	Brachiopoda	Craniidae	
41	Brachiopoda	Kraussinidae	
42	Brachiopoda	Terebratellidae	
43	Bryozoa	Aeteidae	briozoarios
44	Bryozoa	Beaniidae	briozoarios
45	Bryozoa	Bugulidae	
46	Bryozoa	Candidae	
47	Bryozoa	Cellariidae	
48	Bryozoa	Chorizoporidae	
49	Bryozoa	Crepidacanthidae	
50	Bryozoa	Crisiidae	
51	Bryozoa	Crisuliporidae	
52	Bryozoa	Densiporidae	

53	Bryozoa	Heteroporidae	
54	Bryozoa	Plagioeciidae	
55	Bryozoa	Smittinidae	
56	Bryozoa	Tubuliporidae	
57	Bryozoa	Vesiculariidae	
58	Chordata	Hexacrobylidae	tunicados bentónicos
59	Chordata	Molgulidae	tunicados
60	Chordata	Oikopleuridae	tunicados
61	Chordata	Pycnoclavellidae	tunicados
62	Chordata	Salpidae	salpas
63	Cnidaria	Actinostolidae	anémonas de mar profundo
64	Cnidaria	Boloceroiidae	anémonas marinas
65	Cnidaria	Clytiidae	hidrozoarios
66	Cnidaria	Coeloplanidae	meduzas peine
67	Cnidaria	Edwardsiidae	anémonas marinas
68	Cnidaria	Haliclystidae	stalked jellyfish
69	Cnidaria	Hebellidae	hidrozoarios
70	Cnidaria	Kirchenpaueriidae	hidrozoarios
71	Cnidaria	Lucernariidae	stalked jellyfish
72	Cnidaria	Mitrocomidae	hidrozoarios
73	Cnidaria	Obeliidae	hidrozoarios
74	Cnidaria	Parvicapsulidae	myxosporeanos parasíticos
75	Cnidaria	Pennariidae	hidrozoarios
76	Cnidaria	Phascolionidae	hidrozoarios
77	Cnidaria	Phymanthidae	anémonas marinas
78	Cnidaria	Tiaropsidae	Leptomedusae
79	Cnidaria	Tubiporidae	coral marino
80	Ctenophora	Beroidae	ctenóforos
81	Ctenophora	Mertensiidae	
82	Ctenophora	Ocyropsidae	
83	Ctenophora	Pleurobrachiidae	
84	Echinodermata	Poraniidae	estrellas marinas
85	Entoprocta	Barentsiidae	entoproctos
86	Entoprocta	Loxosomatidae	
87	Foraminifera	Allogromiidae	foraminíferos bentónicos
88	Foraminifera	Discorbidae	foraminíferos bentónicos
89	Foraminifera	Nummulitidae	foraminíferos bentónicos
90	Foraminifera	Planorbulinidae	foraminíferos bentónicos
91	Foraminifera	Saccamminidae	
92	Foraminifera	Soritidae	foraminíferos bentónicos
93	Foraminifera	Textulariidae	foraminíferos bentónicos
94	Foraminifera	Trochamminidae	foraminíferos bentónicos
95	Gastroticha	Chaetonotidae	
96	Gastroticha	Turbanellidae	
97	Hemichordata	Harrimaniidae	acorn worms
98	incertae sedis	Picomonadidae	protista
99	Kynorhyncha	Zelinkaderidae	
100	Mollusca	Acteonidae	caracoles marinos pequeños
101	Mollusca	Aplustridae	caracoles marinos
102	Mollusca	Asperspinidae	babosas marinas
103	Mollusca	Astartidae	bivalvos
104	Mollusca	Cryptoplacidae	quitones
105	Mollusca	Cyamiidae	bivalvos
106	Mollusca	Ilbiidae	opisthobranchios
107	Mollusca	Malleidae	hammer oysters

108	Mollusca	Philobryidae	saltwater clams
109	Mollusca	Xylophagidae	bivalvos de mar profundo
110	Nematoda	Axonolaimidae	nematodos de vida libre
111	Nematoda	Chromadoridae	
112	Nematoda	Cucullanidae	nematodos parasíticos
113	Nematoda	Diplogasteridae	
114	Nematoda	Monhysteridae	
115	Nemertea	Baseodiscidae	gusanos nemertinos
116	Nemertea	Carinomidae	gusanos nemertinos
117	Nemertea	Cephalothricidae	gusanos nemertinos
118	Nemertea	Cerebratulidae	
119	Nemertea	Hubrechtidae	
120	Nemertea	Prosorhochmidae	
121	Nemertea	Tetrastemmatidae	
122	Nemertea	Tubulanidae	
123	Other	Other	
124	Platyhelminthes	Aporocotylidae	trematodos
125	Platyhelminthes	Dolichomacrostomidae	gusanos planos
126	Platyhelminthes	Leptoplanidae	
127	Platyhelminthes	Macrostomidae	gusanos planos
128	Platyhelminthes	Microphallidae	trematodos
129	Platyhelminthes	Microstomidae	
130	Platyhelminthes	Opisthorchiidae	trematodos
131	Platyhelminthes	Plagiosomidae	
132	Platyhelminthes	Promesostomidae	
133	Platyhelminthes	Prosthiostomidae	
134	Platyhelminthes	Stylochidae	
135	Platyhelminthes	Uteriporidae	
136	Porifera	Achramorphidae	esponjas calcáreas
137	Porifera	Clathrinidae	esponjas calcáreas
138	Porifera	Corallistidae	Desmospongia
139	Porifera	Dictyodendrillidae	
140	Porifera	Heteropiidae	esponjas marinas
141	Porifera	Ianthellidae	
142	Porifera	Lelapiidae	esponjas calcáreas
143	Porifera	Oscarellidae	
144	Porifera	Sycettidae	esponjas calcáreas
145	Tardigrada	Batillipedidae	tardígrados

---