



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS



**IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES EN LA
COMUNIDAD DEL ICTIOPLANCTON A TRAVÉS
DEL ANÁLISIS MOLECULAR MASIVO
METABARCODING**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

PRESENTA

DEL SOCORRO NADIA LUDMILA GERALDO SAVIN

LA PAZ, B.C.S., MARZO DEL 2021



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de **La Paz, B.C.S.** siendo las **12:00** horas del día **31** del mes de **Marzo** del **2021** se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado de: **CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS** para examinar la tesis titulada: **"IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES EN LA COMUNIDAD DEL ICTIOPLANCTON A TRAVÉS DEL ANÁLISIS MOLECULAR MASIVO METABARCODING"** del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	GERALDO	Apellido Materno:	SAVÍN	Nombre (s):	DEL SOCORRO NADIA LUDMILA
-------------------	---------	-------------------	-------	-------------	---------------------------

Número de registro: **A 1 9 0 4 7 7**

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene **11** % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI** **NO** **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: *(Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)*

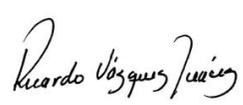
Con todas las referencias comparadas resultó <1% de similitud, excepto con una que resultó el 2% (www.repositoriodigital.ipn.mx).

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

"SATISFACE LOS REQUISITOS SEÑALADOS POR LAS DISPOSICIONES REGLAMENTARIAS VIGENTES"

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

 DR. NOÉ DÍAZ VILORIA Director de Tesis Nombre completo y firma	 DR. JAIME GÓMEZ GUTIÉRREZ Nombre completo y firma	 DR. JOSÉ LUIS ORTIZ GALINDO Nombre completo y firma
 DR. RICARDO VÁZQUEZ JUÁREZ Director de Tesis Nombre completo y firma	 DRA. SYLVIA PATRICIA ADELHEID JIMÉNEZ ROSENBERG Nombre completo y firma	DR. SERGIO HERNÁNDEZ TRUJILLO Nombre completo y firma PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 26 del mes de Abril del año 2021

El (la) que suscribe ING. DEL SOCORRO NADIA LUDMILA GERALDO SAVÍN Alumno (a) del Programa
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS

con número de registro A190477 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS

manifiesta que es autor(a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de:

DR. NOÉ DÍAZ VILORIA y DR. RICARDO VÁZQUEZ JUÁREZ

y cede los derechos del trabajo titulado:

“IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES EN LA COMUNIDAD DEL ICTIOPLANCTON A TRAVÉS DEL ANÁLISIS
MOLECULAR MASIVO METABARCODING”

al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Éste, puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: dgeraldos1900@alumno.ipn.mx - ndiaz@ipn.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

ING. DEL SOCORRO NADIA LUDMILA GERALDO SAVÍN

Nombre y firma del alumno



ESCRITO DE TESIS Del S. Nadia L. Geraldo Savin MARZO 2021.pdf

Mar 30, 2021

29877 palabras/159207 caracteres

Mario Alberto Castillo Soria

ESCRITO DE TESIS Del S. Nadia L. Geraldo Savin MARZO 2021.pdf

Resumen de fuentes

11%

SIMILITUD GENERAL

1	www.repositoriodigital.ipn.mx INTERNET	2%
2	www.cicimar.ipn.mx INTERNET	<1%
3	imecocal.cicese.mx INTERNET	<1%
4	es.scribd.com INTERNET	<1%
5	hdl.handle.net INTERNET	<1%
6	www.researchgate.net INTERNET	<1%
7	prezi.com INTERNET	<1%
8	www.mag.go.cr INTERNET	<1%
9	repositorio.lamolina.edu.pe INTERNET	<1%
10	worldwidescience.org INTERNET	<1%
11	www.conabio.gob.mx INTERNET	<1%
12	www.fauquier.com INTERNET	<1%
13	revistas.ecosur.mx INTERNET	<1%
14	aprenderly.com INTERNET	<1%
15	biotaxa.org INTERNET	<1%
16	aabadia.com INTERNET	<1%

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi luz, mi fuerza y mi más grande fuente de inspiración.

A mis hijas Sofía y Beatriz, a mi esposo José Ramón y a mi madre María Esther, por su entrañable amor, paciencia y apoyo en todo momento.

A mi padre Bernabé, a mis hermanos Héctor, Darío y Bernabé, por estar presentes y ser ejemplo de perseverancia en la vida para mí.

A mi abuela Beatriz, por su amor incondicional.

A mi amiga Reyna, por animarme siempre a continuar.

A la memoria de mi más entrañable amigo Roger por creer en mí y por su gran amistad a pesar del tiempo, la distancia y el espacio.

A todos los amigos que están, a los que ya se han ido y a los que siguen a distancia.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional y al Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, por permitirme formar parte de los alumnos de su institución.

Al CONACYT por el apoyo de la beca de Maestría durante el período 2019-2020

Al programa institucional de formación de investigadores del IPN-CICIMAR y a los siguientes proyectos:

Al proyecto SIP Multidisciplinario: IDENTIFICACIÓN DE HUEVOS Y LARVAS DE PECES MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES EN EL SUR DEL GOLFO DE CALIFORNIA Y REGIÓN ADYACENTE DEL PACÍFICO MEXICANO (Módulos Nos. 20170290, 20180339), al proyecto SIP Individual: ESTUDIO DE LAS POBLACIONES DE PARGO (FAMILIA LUTJANIDAE) PARA SU APROVECHAMIENTO Y REGULACIÓN (No. 20195461) y al proyecto CONACYT Ciencia Básica: CONECTIVIDAD LARVARIA DEL HUACHINANGO (*Lutjanus peru*) EN EL SUR DEL GOLFO DE CALIFORNIA (CB-2015-1-257019) a cargo del Dr. Noé Díaz Vilorio, por permitirme tener una Beca "BEIFI".

Al Instituto de Biología de la UNAM por la donación de tejido de peces.

Al Dr. Adrián Felipe González Acosta por la donación de tejido de peces.

A todos mis asesores por su gran apoyo, paciencia y atenciones.

A todos mis profesores por su tiempo y por compartir ese gran tesoro de sabiduría conmigo, les agradezco todas sus enseñanzas.

De manera muy especial al Dr. José de la Cruz Agüero, a quien admiro y respeto mucho, a quien de alguna manera le debo haber continuado en esta línea de trabajo con peces, debido al gran amor, entrega y entusiasmo que siempre transmite por esta ciencia que se dedica a estudiarlos; con su carisma y ánimo me hizo más amenas las horas en el laboratorio de Ictiología Especial mientras me presentaba el fascinante mundo de los peces.

Al Laboratorio de Genómica y Bioinformática del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.

Al Dr. Óscar Eduardo Juárez Valdez por su asesoría en el Análisis Bioinformático.

A los M.C Nicole Reguera, José Manuel Morales y Tania Valdivia por brindarme su apoyo incondicional y por siempre responder mis preguntas.

Al Dr. Adrián Munguía por permitirme trabajar en su laboratorio y brindarme su apoyo.

A todos mis compañeros del @Lab, gracias porque de todos he aprendido algo.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS.....	V
GLOSARIO.....	VII
RESUMEN	X
ABSTRACT	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1. Identificación morfológica de huevos y larvas de peces	5
2.2. Identificación molecular de huevos y larvas de peces	6
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. HIPÓTESIS	11
5. OBJETIVOS	11
5.1. Objetivo general.....	11
5.2. Objetivos específicos	11
6. ÁREA DE ESTUDIO.....	12
7. MATERIALES Y MÉTODOS	13
7.1. Muestreo	13
7.2. Identificación morfológica de huevos y larvas de peces	14
7.3. Identificación molecular de huevos y larvas de peces	14
7.3.1 Extracción de ADN.....	14
7.3.2. Preparación de librerías de amplicones de ADN por metabarcoding.....	15
7.3.3. Análisis de secuencias.....	22
7.3.4. Asignación taxonómica	25

7.3.5. Análisis de los datos	27
8. RESULTADOS	28
8.1. Identificación morfológica.....	28
8.1.1. Número de larvas y huevos totales en las estaciones de muestreo.	28
8.1.2. Comunidades presentes en las estaciones de muestreo.....	28
8.2. Identificación molecular.....	35
8.2.1. Preparación de librerías de amplicones de ADN de comunidades del ictioplancton por metabarcoding	35
8.2.2. Análisis de secuencias.....	39
8.2.3. Asignación taxonómica	46
8.2.4. Comparación descriptiva entre identificación morfológica e identificación molecular	60
8.2.5. Control positivo mock.....	62
8.2.6. Análisis de diversidad	64
9. DISCUSIÓN	69
9.1. Asignación taxonómica	71
9.2. Algunos casos particulares en la identificación molecular	73
9.3. Descripción de diversidad	80
10. CONCLUSIONES.....	82
11. RECOMENDACIONES	83
12. LITERATURA CITADA.....	84
ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudio: El Sur del Golfo de California y el Pacífico Mexicano adyacente, hasta la zona de Cabo Corrientes entre los 18° y 25° de latitud N y 105° a 110° de longitud O. Imagen tomada de Godínez et al. (2016).	12
Figura 2. Red de 28 estaciones con sus nombres (puntos rojos), en donde se recolectaron muestras de zooplancton para estudios genéticos. Muestreo que formó parte de la campaña oceanográfica MARIAS1603.....	13
Figura 3. Proceso de la preparación de 26 librerías de amplicones de ADN a partir de muestras de huevos y larvas de peces.	18
Figura 4. Proceso de la preparación de dos librerías de la comunidad artificial (mock) como control positivo.....	21
Figura 5. Resumen del flujo de trabajo utilizado para el análisis bioinformático de los resultados de la secuenciación masiva, Illumina HiSeq. (Modificado de Boyer et al., 2016).	24
Figura 6. Número de larvas y huevos presentes en las 28 muestras que corresponden a las 28 estaciones. Los datos corresponden a las larvas (L) totales (línea color azul) y los huevos (H) totales identificados morfológicamente, en 30 diferentes tipos de Huevo (línea color anaranjado).	34
Figura 7. Segunda y tercera réplica de los productos de la primera amplificación por PCR, verificados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, a un peso molecular aproximadamente de 270pb. El número que se presenta en cada banda, corresponde al número de muestra (comunidad de huevos y larvas de peces de 26 de las 28 estaciones de muestreo). MM: marcador de peso molecular de 100pb.	35
Figura 8. Tres réplicas (1, 2 y 3) de los productos de la segunda amplificación por PCR, verificados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, a un peso molecular aproximadamente de 370pb. El número que se presenta en el primer renglón, después de la R (Réplica) representa el número de réplica. Los números en el siguiente renglón corresponden al número de muestra (comunidad de huevos y larvas de peces de 26 de las 28 estaciones de muestreo). CP: control positivo; CN: control negativo; MM: marcador de peso molecular de 100pb.	36

Figura 9. Limpieza y purificación con perlas AmpureXP (concentración 0.8X y en algunas muestras también a 0.5X), de las tres réplicas (1, 2 y 3) de los productos de la segunda amplificación por PCR (amplicones de ADN) verificados por electroforesis en geles de agarosa al 2%. El número que se presenta en el primer renglón (después de la R) representa el número de réplica. Los números en el siguiente renglón corresponden al número de muestra (comunidad de huevos y larvas de peces). CP: control positivo; CN: control negativo; MM: marcador de peso molecular de 100pb; R: réplica..... 37

Figura 10. Productos de la amplificación por PCR de las 20 especies que conforman el mock, verificados por electroforesis en geles de agarosa al 2%. El número que se presenta corresponde a cada una de las especies de peces de acuerdo a su procedencia. Gel 1: doce especies donadas a la Colección Ictiológica de CICIMAR-IPN; Gel 2: cuatro especies del Instituto de Biología de la UNAM y cuatro especies de la Colección personal del Dr. Adrián González Acosta. Gel 3: Productos de la segunda amplificación por PCR (indexado) del mock. Se presenta por triplicado (1, 2 y 3), dos veces, como control positivo CP1 y CP2. CN: control negativo; MM: marcador de peso molecular de 100pb..... 38

Figura 11. Representación gráfica de Raw Data: total de lecturas absolutas, obtenidas directamente de la secuenciación masiva paired-end (2X150pb) HiSeq; NA: total de las lecturas no asignadas a $\geq 99\%$ de similitud; A: total de las lecturas asignadas a $\geq 99\%$ de similitud; A-CN: lecturas asignadas menos el control negativo. 42

Figura 12. Porcentaje de lecturas: Raw Data (datos crudos), lecturas no asignadas (NA), lecturas asignadas (A) y lecturas asignadas menos el control negativo (A-CN) de las 26 muestras de zooplancton analizadas..... 43

Figura 13. Porcentaje de MOTUs totales asignados para huevos y larvas de peces de las 26 muestras de zooplancton de acuerdo a su distribución de hábitat de peces adultos (FishBase). 54

Figura 14. Porcentaje de MOTUs totales asignados, de acuerdo a su composición de especies de diferentes hábitats de adultos (FishBase), por cada una de las 26 estaciones de muestreo. 56

Figura 15. Número de lecturas totales (transformación con Log10) en las 26 estaciones de muestreo, correspondientes a los 27 MOTUs asignados (Unidades Taxonómicas Operacionales Moleculares).	57
Figura 16. Presencia de los 27 MOTUs asignados de acuerdo a su grado de recurrencia en las 26 estaciones de muestreo.	58
Figura 17. Abundancia relativa de lecturas y riqueza de MOTUs por estación de muestreo. Resultados obtenidos usando 12S ARNr en ictioplancton de 26 estaciones de muestreo al Sur del Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano.	59
Figura 18. Frecuencia relativa que muestran: a) el total de todos los huevos y larvas recolectadas en las 28 estaciones de muestreo; b) identificación morfológica solo de larvas en Orden, Familia, Género y Especie; c) identificación molecular del total (inciso a) en los cuatro niveles taxonómicos; d) coincidencias en los distintos niveles taxonómicos de la identificación por método morfológico (larvas) y molecular (ictioplancton).	61
Figura 19. Frecuencia relativa de la asignación taxonómica al $\geq 99\%$ de identidad de la comunidad artificial (mock) de 20 especies de peces óseos.	63
Figura 20. Curva de acumulación de especies por el método de rarefacción. La riqueza es representada con el número de MOTUs en cada una de las 26 estaciones de muestreo recolectadas al Sur del Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza.	64
Figura 21. Curvas de rarefacción de la acumulación de MOTUs por número de lecturas (transformadas con Logaritmo base 10) para cada estación de muestreo, estandarizadas a un valor máximo de 15 para las lecturas y la presencia de 8 MOTUs como máximo por estación.	65
Figura 22. Índice de similitud de Bray Curtis con los datos de la presencia de los MOTUs en cada estación de muestreo. La línea roja indica un corte hecho aproximadamente al 75% de similitud para agrupar a todas las estaciones en cuatro grupos (recuadros rojos), de acuerdo a su similitud o distancia.	66

Figura 23. Resultados de la distancia de Bray Curtis en un NMDS de dos dimensiones para los datos de los números de lecturas transformados con logaritmo base 10. ... 67

Figura 24. Comparación descriptiva a través de una fotografía del Huevo Tipo 3, clasificado morfológicamente en la estación C07 y la fotografía del huevo de la especie de *X. gladius* identificado a través de barcoding de ADN en ECOSUR, Unidad Chetumal. 76

Figura 25. Comparación descriptiva a través de una fotografía, del Huevo Tipo 1, clasificado morfológicamente en la estación C07 y la fotografía del huevo de la familia Exocoetidae identificado a través de barcoding de ADN en ECOSUR, Unidad Chetumal. 78

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores y adaptadores (Adapt.) propuestos por Miya et al. (2015) para la región 12S ARNr (~170 pb).....	15
Tabla 2. Cebadores con adaptadores propuestos por Miya et al. (2015). Región 12S ARNr (~270 pb) y el adaptador ilumina correspondiente (Forward P5 y Reverse P7)	17
Tabla 3. Número total de larvas, huevos, embriones, huevos sin embrión, así como huevos y larvas destruidos presentes en las muestras de las 28 estaciones de muestreo.	28
Tabla 4. Comunidad de larvas y huevos de peces, identificados mediante caracteres morfológicos diagnósticos al menor nivel taxonómico posible por estación de muestreo. Estación: Número y nombre de cada una de las estaciones de muestreo; Sec.: Secuencial de muestreo (Lance).....	29
Tabla 5. Resumen de resultados totales, porcentaje de datos crudos y después de OBITools a $\geq 99\%$ de similitud.	40
Tabla 6. Número de lecturas obtenidas después de OBITools, de los resultados de la secuenciación masiva (Illumina HiSeq). Estación: Estación muestreada; RawData: Datos crudos demultiplexados obtenidos directamente del proveedor Illumina; NA: Lecturas no asignadas; A: Lecturas asignadas; 100%: Total de la suma de lecturas NA y A; %NA: Porcentaje que corresponde a lecturas no asignadas; %A: porcentaje que corresponde a lecturas asignadas; A-CN: Lecturas asignadas corregidas con el control negativo; CP1 y CP2: Control positivo; CN: Control negativo.	41
Tabla 7. Número de MOTUs de acuerdo a una asignación taxonómica $\geq 99\%$ de identidad pareada. Estación: Estación muestreada (26 estaciones de muestreo); MOTU NA: MOTUs no asignados; MOTU A: MOTUs asignados; MOTU TOTAL: sumatoria MOTU NA Y MOTU A; MOTU A MENOS CN: MOTUs asignados menos el control negativo.	45
Tabla 8. Lista de 27 MOTUs de peces adultos asignados, correspondientes a 13 Ordenes, 18 Familias, 20 Géneros y 17 Especies, de acuerdo a la clasificación de	

Nelson et al. (2016); con su respectivo número de identificación taxonómica en NCBI (National Center for Biotechnology Information)..... 46

Tabla 9. Comunidad de MOTUs de larvas y huevos de peces, asignados por metabarcoding a $\geq 99\%$ de similitud con secuencias de GenBank, al menor nivel taxonómico posible por estación de muestreo. Sec.: Secuencial de muestreo (Lance); Estación: Número y nombre de cada una de las estaciones de muestreo..... 47

Tabla 10. Lista de 27 MOTUs asignados (correspondientes a 13 Ordenes, 18 Familias, 20 Géneros y 17 Especies), con la referencia de hábitat y afinidad de peces adultos de acuerdo a FishBase. 55

Tabla 11. Porcentajes de identificación en cuatro niveles taxonómicos de los métodos morfológico y molecular, y de sus coincidencias..... 62

Tabla 12. Relación de los cuatro grupos de acuerdo a su porcentaje de similitud (promedio) entre las estaciones de muestreo, así como de la distribución de MOTUs dentro de la comunidad del ictioplancton. 68

GLOSARIO

ADN mitocondrial: El ácido desoxirribonucleico (ADN o DNA por sus siglas en inglés) se encuentra en el genoma mitocondrial (ADNmt) en el organelo de la mitocondria, que genera energía para la célula. Material genético circular cerrado de doble cadena que se localiza en el interior de las mitocondrias.

ARN ribosomal: El ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal (ARNr o rRNA por sus siglas en inglés) es un ARN que forma parte de los ribosomas y es esencial para la síntesis proteica en todos los seres vivos. Los ARNr forman el armazón de los ribosomas y se asocian a proteínas específicas para formar las pre-subunidades ribosomales. Es el material más predominante en el ribosoma, que en peso consiste de aproximadamente 60% de ARNr y 40% de proteína.

Barcoding: Herramienta molecular para la identificación de una especie en particular (enfoque específico de la especie metazoario) a través de un código de barras genético (DNA Barcode), basado en el marcador molecular mitocondrial de aproximadamente 648pb del gen citocromo c oxidasa subunidad I (COI) altamente variable en algunos grupos de metazoos.

Biodiversidad: Diversidad de especies vegetales y animales que viven en un espacio determinado.

Cebador: El partidor, iniciador o “primer” es una cadena de ácido nucleico o de una molécula relacionada que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.

Comunidad: La comunidad en biología, también conocida como biocenosis, es un conjunto de poblaciones de diferentes especies que comparten un lugar común en el hábitat.

Electroforesis: Técnica para la separación de moléculas según la movilidad de éstas en un campo eléctrico. La separación puede realizarse sobre la superficie hidratada de un soporte sólido (por ejemplo, electroforesis en papel o en acetato de celulosa), a través de una matriz porosa (electroforesis en gel), o bien en disolución (electroforesis

libre). Dependiendo de la técnica usada, la separación obedece en distinta medida a la carga eléctrica de las moléculas y a su masa.

Fenotipo: Cualidades físicas observables en un organismo, incluyendo su morfología, fisiología y conducta a todos los niveles de descripción. Las propiedades observables de un organismo.

Flexión del notocordio: Proceso de formación de los elementos de la aleta caudal, inicia con la formación inicial de los soportes de la aleta (hipurales y parahipurales) y se completa, cuando los radios caudales están desarrollados y se encuentran en posición longitudinal y el margen posterior de la(s) placa(s) hipúrica es completamente vertical.

Genotipo: Factores hereditarios internos de un organismo, sus genes y por extensión su genoma. Conjunto de los genes que existen en cada organismo.

Ictioplancton: Los huevos y larvas de los peces que desovan en el ecosistema pelágico. Durante estas fases iniciales de vida su capacidad de natación es limitada, por lo que derivan con las masas de agua y por consecuencia integran comunidades del plancton.

Larva con saco vitelino: La fase de desarrollo de peces de transición, entre la eclosión hasta la completa absorción del saco vitelino y es la primera fase larval.

Larva postflexión: Fase larvaria, que comprende de la completa formación de la placa hipúrica hasta la completa formación de los elementos de las aletas pares e impares.

Larva preflexión: Fase larvaria, que comprende a partir de la completa absorción del saco vitelino hasta antes del inicio de la flexión del notocordio.

Marcador molecular: Biomolécula que se puede relacionar con un rasgo genético, como las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida).

Metabarcoding de ADN: Identificación de alto rendimiento de múltiples especies (enfoque multiespecífico) utilizando el ADN total o degradado extraído de una muestra ambiental o de muestras a granel de organismos completos.

Mock: Comunidad artificial de especies, construida a partir de ADN de especies conocidas en concentración equimolar, es decir, con igual concentración cada una.

MOTU (Molecular Operational Taxonomic Unit): Unidad taxonómica operacional molecular que es sinónimo a un taxa identificado molecularmente.

MOTUs: Plural de MOTU.

Notocordio: Cordón cartilaginoso longitudinal que soporta el eje del cuerpo.

PCR (Polymerase Chain Reaction): Reacción en cadena de la polimerasa.

Quimeras: Productos híbridos entre múltiples secuencias parentales que pueden ser falsamente interpretadas como organismos nuevos, sobreestimando así la diversidad.

Secuenciación de alto rendimiento: Secuenciación masiva en paralelo, donde se generan millones de secuencias; gran cantidad de fragmentos de ADN en una sola reacción. Proceso que permite el análisis de múltiples muestras a la vez, con una reducción del costo y el tiempo.

Singleton: Secuencias raras que están representadas una sola vez debido a que no se parece a ninguna otra.

RESUMEN

El conocimiento de la diversidad de peces permite hacer un manejo adecuado de estos recursos marinos con la finalidad de lograr una administración sustentable de estos. Durante la última década, a través de métodos moleculares bajo el enfoque de metabarcoding de ADN, se ha logrado contribuir en el conocimiento de especies de peces marinos de interés ecológico y comercial. A partir de 28 muestras de zooplancton recolectadas en marzo del 2016 en el Sur del Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano se identificaron 41 taxa de peces representados por sus larvas en diferentes fases de desarrollo, y se identificaron al nivel taxonómico más preciso posible a 30 tipos diferentes de huevos de peces mediante métodos taxonómicos tradicionales. A partir de estas muestras de ictioplancton se generaron librerías de amplicones de ADN de un fragmento de aproximadamente 170 pb del gen mitocondrial 12S ARNr y se identificaron por análisis molecular masivo, a través de metabarcoding. Las librerías de 26 de las 28 estaciones de muestreo fueron doblemente indexadas y secuenciadas exitosamente en plataforma Illumina HiSeq. Los análisis bioinformáticos de los datos de secuenciado masivo reflejaron riqueza en ictioplancton, con una asignación taxonómica basada en un criterio de $\geq 99\%$ de identidad pareada por estación de muestreo en la región de estudio. Los resultados mostraron 27 unidades taxonómicas operativas moleculares (MOTUs) asignadas a peces óseos del área de estudio, con baja superposición con respecto a la identificación por el método tradicional, demostrando una diferente capacidad de detección por ambos métodos. Atribuyéndose esto a la falta de información en la base de datos de referencia de secuencias para peces óseos de la región.

ABSTRACT

The adequate management and sustainable administration of fish marine resources requires precise estimations of diversity. During the last decade diversity of marine fish species of ecological and commercial interest have been investigated through molecular methods under the DNA metabarcoding approach. Zooplankton samples were collected in March 2016 in the southern Gulf of California and the adjacent to Mexican Pacific region. A total of 41 taxa of fish larvae at different development stages and 30 different types of fish eggs were identified using traditional taxonomic methods. DNA amplicon libraries of a fragment of approximately 170 bp of the mitochondrial 12S rRNA gene were generated from these ichthyoplankton samples and identified using massive molecular analysis through metabarcoding. The libraries of 26 of the 28 sampling stations were double indexed and successfully sequenced on the Illumina HiSeq platform. The bioinformatic analyzes of the massive sequencing data showed richness in ichthyoplankton with a taxonomic assignment based on a criterion of $\geq 99\%$ paired identity, per sampling station in the study area. This molecular data complemented the data obtained throughout traditional methods through 27 molecular operational taxonomic units (MOTUs) corresponding to bony fish in the study area with low overlap with respect to identification by traditional method, demonstrating a different detection capacity by both methods. I attribute this to the lack of information in the sequence reference database for bony fish in the region.

1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad marina debe ser estudiada para conocer la estructura de la comunidad en los ecosistemas y establecer mejores medidas para el uso, manejo y conservación de los recursos de interés ecológico y comercial. La combinación de la taxonomía tradicional y molecular incrementan la precisión de la biodiversidad marina, necesaria para comprender la comunidad biológica de los ecosistemas y establecer líneas de base de biodiversidad así como investigar los cambios a largo plazo (Valentinni *et al.*, 2016; Wangensteen *et al.*, 2018).

Para estimar la biodiversidad se requiere conocer la riqueza de especies mediante la identificación taxonómica correcta de las mismas. Existen más de 18,000 especies nominales de peces marinos. Se estima que al menos falta 20% de especies aún por describir. Esta falta de conocimiento de la diversidad de peces marinos es un problema vital en la ecología marina a nivel mundial, siendo este conocimiento fundamental para el manejo, la conservación y la comprensión del desarrollo ecológico de los ecosistemas marinos (Nelson *et al.*, 2016; Yamamoto *et al.*, 2017).

La ecología y biología de los peces en sus fases de vida más tempranas, ofrecen más información respecto a su distribución y temporadas de desove y la composición de la comunidad pelágica. La fase ictioplanctónica ofrece una única oportunidad para evaluar la biodiversidad local de peces debido a que en las comunidades del ictioplancton confluyen peces demersales, asociados a arrecifes, epipelágicos oceánicos así como mesopelágicos en una misma muestra de zooplancton (Aceves-Medina *et al.*, 2004; Collet *et al.*, 2017; Ahern *et al.*, 2018).

La identificación de especies de peces en etapas tempranas de vida (huevos y larvas), se ha llevado a cabo hasta ahora, principalmente a través de las características morfológicas y merísticas con patrones de pigmentación (Moser, 1996; Teletchea, 2009; Azmir *et al.*, 2017). Sin embargo, esto implica un gran reto debido a su diminuto tamaño, así como en ocasiones, la falta de características diagnósticas evidentes, sobre todo en huevos y larvas en preflexión. Las larvas de peces tienen un cuerpo que a menudo se daña durante la recolección y fijación causando la pérdida del patrón de pigmentación, una de las características morfológicas utilizadas en la identificación

taxonómica. En los huevos de peces esta tarea se vuelve prácticamente imposible de realizar, debido a la falta de características diagnósticas visibles en la mayoría de los huevos y la falta de claves taxonómicas disponibles (Azmir *et al.*, 2017). Este impedimento taxonómico y la presencia de especies crípticas, en larvas en preflexión y flexión, hacen su reconocimiento taxonómico altamente complejo e incluso ambiguo utilizando métodos exclusivamente basados en la morfología (Ochoa-Muñoz *et al.*, 2018; Wangensteen *et al.*, 2018).

El Norte y Sur del Golfo de California tiene alta diversidad de larvas de peces y productividad marina. La diversidad de especies de peces representados por sus larvas, identificadas a partir de 40 años de estudios a través de métodos tradicionales en la región del Golfo de California, región adyacente al Pacífico Mexicano, y región de Cabo Corrientes, Jalisco es elevada (Aceves-Medina *et al.*, 2004; Avendaño-Ibarra *et al.*, 2014). A pesar de esto aún quedan grandes vacíos en el reconocimiento en algunos niveles taxonómicos, que es de vital importancia resolver para poder estimar la riqueza con precisión.

Las técnicas moleculares se han desarrollado para complementar y, en algunos casos, resolver aquellos vacíos que puedan quedar en la información que se obtiene con métodos tradicionales de taxonomía (Hebert *et al.*, 2003; Teletchea, 2009). Las herramientas moleculares han resuelto de manera alternativa y eficiente la identificación de especies en larvas de peces, bajo el enfoque del código de barras (barcoding) por medio de marcadores moleculares mitocondriales estandarizados como el fragmento del gen citocromo c oxidasa subunidad I (COI). Las especies crípticas son difíciles de identificar sin la evidencia que provee los métodos moleculares (Hebert *et al.*, 2003), como las larvas de *Auxis rochei* y *Auxis thazard*, escómbridos de interés comercial y abundantes en el Golfo de California (Ochoa-Muñoz *et al.*, 2018) o la detección de periodos de desoves de numerosas especies de peces a partir de sus huevos y larvas tempranas (Ahern *et al.*, 2018).

El desarrollo de técnicas moleculares en los últimos años, bajo el enfoque de metabarcoding de ADN, permite la identificación de múltiples especies (enfoque

multiespecífico) mediante secuenciación masiva (alto rendimiento o también denominada como secuenciación de siguiente generación, NGS por sus siglas en inglés). Esta técnica identifica simultáneamente varias taxa de una muestra ambiental sin conocimiento *a priori* de las especies que probablemente estarán presentes en el ecosistema muestreado (Taberlet *et al.*, 2012, citado en Pavan-Kumar *et al.*, 2015 y Valentini *et al.*, 2016).

Esto ha revolucionado la evaluación de la biodiversidad, usando extractos de ADN total o degradado de muestras ambientales o de muestras a granel de organismos completos (Miya *et al.*, 2015; Leray *et al.*, 2013; 2014; Lobo *et al.*, 2017; Wangensteen *et al.*, 2018). A partir de estudios realizados con muestras de ADN ambiental (eDNA: ADN presente en el ambiente acuático o terrestre) así como de comunidades de organismos se ha empleado con éxito el método molecular bajo el enfoque de metabarcoding de ADN para caracterizar organismos de distintas comunidades marinas (Valentini *et al.*, 2016; Wangensteen *et al.*, 2018). Del mismo modo, ha sido propuesto como un enfoque de métodos moleculares masivos de alto rendimiento, con potencial para convertirse en el futuro en una metodología estándar para el monitoreo de comunidades de peces (Miya *et al.*, 2015; Valentini *et al.*, 2016; Yamamoto *et al.*, 2017; Ushio *et al.*, 2018; Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021).

Los métodos moleculares masivos de alto rendimiento (tecnología NGS) ofrecen una solución eficiente de costo y esfuerzo para procesar grandes cantidades de muestras con alto porcentaje de confiabilidad. Por la misma eficiencia del método se requiere usar marcadores moleculares con fragmentos cortos de ciertos genes nucleares ó mitocondriales. La amplia gama de marcadores, procesos y equipos disponibles deben adaptarse al objetivo de investigación. El gen mitocondrial 12S del ARN ribosomal es otro marcador utilizado para la identificación de vertebrados por metabarcoding (Riaz *et al.*, 2011). Este se caracteriza por presentar la variabilidad necesaria para discriminar entre diferentes especies biológicas debido a sus características en la estructura secundaria, ya que este gen presenta regiones hipervariables en los bucles y regiones conservadas en los tallos (Satoh *et al.*, 2016). Estas características hacen

que el gen mitocondrial 12S del ARN sea un marcador eficiente para análisis bajo el enfoque de metabarcoding de ADN.

El marcador mitocondrial 12S ARN ribosomal ha sido usado con éxito en la identificación de especies de peces (Miya *et al.*, 2015). Mediante análisis de metabarcoding de ADN de comunidades de peces con el gen 12S ARN es frecuente encontrar incluso especies que no se han logrado distinguir mediante censos visuales (Valentini *et al.*, 2016; Yamamoto *et al.*, 2018; Fuji *et al.*, 2019; Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021).

La región hipervariable del gen 12S ARN se ha empleado con éxito para la identificación de especies de peces óseos bajo el enfoque de metabarcoding, y el uso de un par de cebadores universales para peces que reconocen sitios altamente conservados para una amplificación eficiente. Este marcador se caracteriza por presentar al mismo tiempo una alta hipervariabilidad, permitiendo un alto porcentaje de discriminación entre especies, así como estar flanqueado por regiones altamente conservadas para el buen funcionamiento de los cebadores empleados durante la amplificación por PCR (Miya *et al.*, 2015).

El presente trabajo complementa la identificación taxonómica tradicional con el análisis molecular masivo, bajo el enfoque de metabarcoding de ADN de comunidades del ictioplancton marino de especies de peces óseos en el Golfo de California. Esto se realizó utilizando un fragmento de aproximadamente 170 pb del gen mitocondrial 12S ARN ribosomal como marcador molecular propuesto y empleado con éxito por Miya *et al.* (2015), así como secuenciación de alto rendimiento. Este esfuerzo se realizó para conocer la riqueza de especies en la comunidad del ictioplancton y contribuir al conocimiento generado a partir de los estudios morfológicos del Sur del Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano. Cabe destacar que el presente trabajo es pionero en estudios de comunidades del ictioplancton a través de metabarcoding de ADN que se realiza en el Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano.

2. ANTECEDENTES

2.1. Identificación morfológica de huevos y larvas de peces

La identificación basada en características morfológicas es considerada como la metodología tradicional de identificación taxonómica. En el caso de la identificación de especies de peces adultos, ésta se basa en sus características morfológicas externas, incluyendo forma del cuerpo, patrones de color, talla, así como de todo aquello que pueda ser contado (merística), posición relativa de aletas, número y tipo de radios en las aletas y varias medidas morfológicas relativas del cuerpo (Teletchea, 2009).

En el caso de huevos y larvas de peces, la identificación morfológica tradicional implica un reto por la dinámica de los caracteres diagnósticos distintivos debido a las adaptaciones a la vida en el zooplancton durante su temprano desarrollo. El diminuto tamaño de los huevos y larvas y la falta de series de desarrollo completas provocan descripciones larvarias parciales y escasas.

Investigación como la realizada por Moser *et al.* (1974) sobre la composición del ictioplancton en el Golfo de California a partir de muestreos realizados en 1957, contribuyó en gran medida a la taxonomía de larvas de peces. Éste progreso ha permitido analizar más detalladamente al ictioplancton en términos de composición de especies, patrones de distribución y ensamblajes de especies resultando así un mejor entendimiento del ecosistema pelágico (Aceves-Medina *et al.*, 2003, 2004).

La identificación basada en características morfológicas de huevos y larvas de peces marinos ha llevado a generar gran parte de lo que ahora se conoce en cuanto a diversidad en el Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano; reconociendo además sitios de desove y áreas de reproducción de múltiples especies.

Avendaño-Ibarra *et al.* (2014) hicieron una revisión de la diversidad de especies de peces integrando información de estudios realizados a lo largo de 40 años en el Golfo de California (Moser *et al.*, 1974; Franco-Gordo *et al.*, 1999; Aceves-Medina *et al.*, 2003; Ávalos-García *et al.*, 2003; Franco-Gordo *et al.*, 2003; Sala *et al.*, 2003; Sánchez-Velasco *et al.*, 2004, 2007; González-Armas *et al.*, 2008; Peguero-Icaza *et al.*, 2008; Silva-Segundo *et al.*, 2008; Avendaño-Ibarra *et al.*, 2009; León-Chávez *et al.*, 2010; Contreras-Catala *et al.*, 2012). Ellos reportan especies de peces

representados por sus larvas de numerosos hábitats e información sobre las condiciones ambientales locales, sitios de desove de peces así como de crianza y alta productividad.

Dados los retos que presenta el trabajo de identificación tradicional en huevos y larvas de peces, el uso auxiliar de métodos moleculares como herramientas complementarias al conocimiento de la taxonomía del ictioplancton ha permitido avanzar en el conocimiento de la biodiversidad en diversas regiones oceánicas.

2.2. Identificación molecular de huevos y larvas de peces

Hebert *et al.* (2003), propusieron estandarizar los diversos métodos utilizados en la identificación de especies de metazoarios mediante el establecimiento de un sistema de código de barras de ADN (barcoding), similar en la práctica a un código de barras de supermercado, para todas las especies de animales, basado en una secuencia única de 648 pb del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI).

Vázquez-Yeomans *et al.* (2011) combinaron el análisis de código de barras con análisis a partir de características morfológicas y de esta manera identificaron y describieron una larva en postflexión del pez león *Pterois volitans*, especie invasora del Indo-Pacífico en aguas de Yucatán mediante el uso de la fracción COI.

Estudios moleculares realizados en los últimos años para la identificación de especies en el Golfo de California han llegado a ser complementarios de aquellos estudios realizados a través de identificaciones tradicionales y han llegado a contribuir en gran medida a la información acerca de la riqueza de especies.

Díaz-Viloria *et al.* (2013), identificaron molecularmente dos morfotipos larvarios como *Cynoscion reticulatus* y *Totoaba macdonaldi* distribuidos en el Alto Golfo de California, utilizando la fracción 16S del ADNmt y describieron morfológicamente las larvas en preflexión de ambas especies.

Camacho-Gastélum *et al.* (2017), utilizaron dos marcadores mitocondriales, una secuencia parcial de COI y una secuencia para la subunidad 16S de ARN ribosomal distinguiendo cuatro morfotipos de larvas de la familia Sciaenidae en el Alto Golfo de California, preclasificadas a través de sus características merísticas y de pigmentación

como: *Micropogonias megalops*, *Cynoscion othonopterus*, *C. reticulatus* y *Menticirrhus nasus*. El uso de estos marcadores moleculares logró diferenciar a cada una de las especies reportadas en este trabajo. Sugiriendo el uso de marcadores moleculares para las larvas en preflexión de *C. othonopterus* y *C. reticulatus*.

Ochoa-Muñoz *et al.* (2018), lograron identificar con éxito larvas de las dos especies del género *Auxis* en especímenes sin evidentes caracteres morfológicos diagnósticos en sus estadios tempranos, a través del uso del marcador molecular COI que discriminó a estas dos especies en *A. rochei* y *A. thazard* en el Sur del Golfo de California.

Ahern *et al.* (2018), lograron identificar huevos y larvas de peces en el Sur del Golfo de California, en el Parque Nacional de Cabo Pulmo mediante identificaciones morfológicas y moleculares bajo el enfoque de barcoding (código de barras) se usó el marcador COI, obteniendo como resultado 157 unidades taxonómicas operativas (OTU). Destacaron mediante técnicas moleculares la identificación de especies raras mesopelágicas como el pez remo *Regalecus glesne* y especies de importancia comercial como el barrilete negro *Euthynnus lineatus* y el atún aleta amarilla *Thunnus albacares*. Además en este estudio se encontraron 47 especies entre larvas y huevos de peces, que no se habían previamente reportado mediante censos visuales en el Parque Nacional de Cabo Pulmo, lo que muestra las bondades de la técnica molecular bajo el enfoque de barcoding, así como su alta sensibilidad para la detección y discriminación de especies, que de otra manera no hubiese sido posible identificar.

Recientemente las características diagnósticas de las larvas de tres especies de *Caranx* se validaron mediante análisis del gen COI en el noroeste de México (Silva-Segundo en prensa). Por primera vez, se confirmó la asignación morfológica taxonómica de larvas de peces de *C. caballus* utilizando con una similitud genética >99,8%. Sin embargo, la evidencia molecular demostró que las larvas de peces descritas anteriormente como *C. sexfasciatus* tenían una alta similitud genética (99,7% -100%) y una baja distancia genética (<1%) con los adultos de *Caranx caninus*. Un morfotipo larvario no descrito recolectado en ese estudio fueron genéticamente

comparables (100%) con secuencias COI de adultos de *C. sexfasciatus*. Por lo tanto, la combinación de características de diagnóstico y evidencia de códigos de barras de ADN permitió la discriminación y validación de larvas de *C. caballus*, *C. caninus* y *C. sexfasciatus*. Aún quedan por investigar las características diagnósticas y las secuencias de COI de las larvas de *Caranx lugubris* y *Caranx melampygyus*, que también se distribuyen en el Pacífico centro-oriental (Silva-Segundo en prensa).

En la última década investigadores aplican metabarcoding de ADN que a diferencia del barcoding (código de barras), permite la identificación de múltiples especies a la vez, presentes en una muestra de ADN ambiental (eDNA) o muestras de ADN total a través de tecnología de secuenciación de alto rendimiento y un conjunto de cebadores universales (Taberlet *et al.*, 2012; Kelly *et al.*, 2014; Miya *et al.*, 2015; Yamamoto *et al.*, 2017; Ushio *et al.*, 2018).

Miya *et al.* (2015) detectaron más de 230 especies de peces marinos en un solo estudio mediante metabarcoding de eDNA y el uso de cebadores universales para peces (cebadores MiFish) con un fragmento hipervariable de aproximadamente 170 pb del gen 12S de ARN ribosomal a partir de muestras de agua en tanques de acuario y aguas marinas naturales de la parte subtropical del Pacífico Norte. Las especies detectadas fueron taxonómicamente diversas y distribuidas en 70 familias y 152 géneros.

Por otro lado Valentini *et al.* (2016) demostraron el rendimiento y fiabilidad del metabarcoding de eDNA para monitorear peces y anfibios en muestras de agua con una fracción de aproximadamente 106 pb del gen 12S de ARN ribosomal. Se evaluó *in silico*, *in vitro* e *in situ*, para que los resultados obtenidos se utilizaran en estudios ecológicos y de biodiversidad complementando de esta manera los métodos tradicionales de identificación taxonómica de estos taxones.

De igual manera Yamamoto *et al.* (2017), sugirieron que debido a la longitud del amplicón (aproximadamente 170 pb), propuesto por Miya *et al.* (2015), la región objetivo podía amplificarse por PCR incluso a partir de material genético degradado, así mismo los amplicones cortos son adecuados para la secuenciación paralela

masiva. Con base a esto realizaron una investigación en comunidades de peces marinos en la Bahía de Maizuru, Japón, detectando un total de 128 especies de peces en las muestras de agua. Estos estudios indican el gran potencial del metabarcoding de eDNA como una herramienta útil para la estimación de la biodiversidad.

En consecuencia, el enfoque de metabarcoding de eDNA se ha convertido en un enfoque económicamente rentable y laboralmente efectivo para estimar biodiversidad acuática (Ushio *et al.*, 2018).

Fuji *et al.* (2019), usaron análisis de metabarcoding de eDNA, para evaluar comunidades de peces al mismo tiempo que lo validaban con métodos tradicionales, comparando datos de comunidades de peces con siete métodos de captura convencionales. Los resultados mostraron que las comunidades de peces detectadas fueron similares entre los dos métodos, con una superposición del 70%.

Valdivia-Carrillo *et al.* (2021), compararon patrones de composición comunitaria y similitud en peces óseos de arrecifes rocosos y montes submarinos del Norte y Centro del Golfo de California, por medio de metabarcoding de eDNA y censos visuales. Sus resultados mostraron que ambos métodos tenían diferentes capacidades de detección, presentándose bajo grado de superposición; encontrando que el 79% de las especies (OTU) detectadas con metabarcoding de eDNA no se registró durante los censos visuales. Esto demostró el grado de sensibilidad de detección de este método molecular sobre el tradicional mediante censos visuales.

Hasta ahora el estudio Valdivia-Carrillo *et al.* (2021) y la presente tesis son los primeros trabajos que usan el gen 12S ARN ribosomal para identificar especies de peces en el Golfo de California.

3. JUSTIFICACIÓN

Conocer la biodiversidad marina existente en un ecosistema aporta información relevante para hacer un mejor manejo de los recursos marinos. Debido al uso de métodos que hasta hoy han sido confiables y seguros de manera tradicional para la identificación de especies más precisa posible, es que se ha logrado dar confiabilidad al estudio de biodiversidad en peces. Sin embargo, en estadios tempranos de vida aún quedan vacíos en la información, debido a que es más complicado por su diminuto tamaño, la falta de características diagnósticas evidentes y las series incompletas de desarrollo larvales (Díaz-Viloria *et al.*, 2013; Camacho-Gastélum *et al.*, 2017; Ochoa-Muñoz *et al.*, 2018; Silva-Segundo *et al.*, en prensa).

Incluir métodos moleculares para complementar los estudios taxonómicos y ecológicos tradicionales en identificación de especies de peces es necesario para ayudar a tomar medidas adecuadas en preservación y manejo del recurso, además que favorece el conocimiento de la ecología del ictioplancton.

Los métodos moleculares masivos, como el uso de metabarcoding, permite identificar comunidades enteras del ictioplancton, lo que también favorece a la implementación de este tipo de métodos como alternativa de monitoreo de huevos y larvas de peces en zonas de muestreo. El metabarcoding permite obtener resultados en menor tiempo, disminuyendo en gran medida los costos que se generan en el proceso, al mismo tiempo que se complementa la información generada por métodos tradicionales.

4. HIPÓTESIS

El análisis molecular masivo de huevos y larvas de peces mostrará una riqueza de especies igual o mayor que la obtenida mediante identificación de especies por caracteres diagnósticos morfológicos en el Sur del Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano, lo que permitirá complementar los resultados de riqueza de especies mediante identificación morfológica.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Identificar especies en la comunidad del Ictioplancton recolectado en el Sur del Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano mediante el análisis molecular masivo metabarcoding para complementar el conocimiento de la biodiversidad.

5.2. Objetivos específicos

1. Construir y secuenciar librerías de amplicones de ADN del gen mitocondrial 12S ARN ribosomal (ARNr) a través de metabarcoding del ictioplancton recolectado en el Sur del Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano.
2. Construir y secuenciar el marcador 12S ARNr en una comunidad artificial (mock) de peces del Golfo de California para ser usada como control positivo en análisis posteriores de metabarcoding.
3. Adaptar un flujo de trabajo bioinformático (pipeline) para análisis de librerías de metabarcoding usando el marcador 12S ARNr.
4. Construir una base de datos personalizada de las secuencias de referencia disponibles en GenBank del marcador 12S ARNr de peces óseos con asignación taxonómica.
5. Generar tablas de MOTUs a partir del análisis de las secuencias obtenidas para cada una de las librerías, así como su asignación taxonómica correspondiente, para análisis de biodiversidad posteriores en los sitios de muestreo.

6. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio cubre del Sur del Golfo de California y el Pacífico Mexicano adyacente, hasta la zona de Cabo Corrientes entre los 18° y 25° de latitud N y 105° a 110° de longitud O. Esta región se caracteriza por presentar una dinámica complejidad hidrográfica (Fig. 1). La región de transición norte del Pacífico Oriental Tropical Mexicano (POTM) es donde concurren al menos dos condiciones hidrográficas, originadas por agua de la Corriente de California (Kessler, 2006) y agua de origen tropical (Lavín *et al.*, 2006). Dentro de los primeros 150 m de profundidad del POTM, se encuentra la profundidad somera del límite superior de la zona del mínimo de oxígeno (ZMO). La ZMO es una franja del océano con gran influencia en la distribución de organismos pelágicos y bentónicos (Morrison *et al.*, 1999, Codispoti *et al.*, 2001, Escribano *et al.*, 2004, Helly y Levin 2004, Karstensen *et al.*, 2008; citados en Cepeda-Morales *et al.*, 2009).

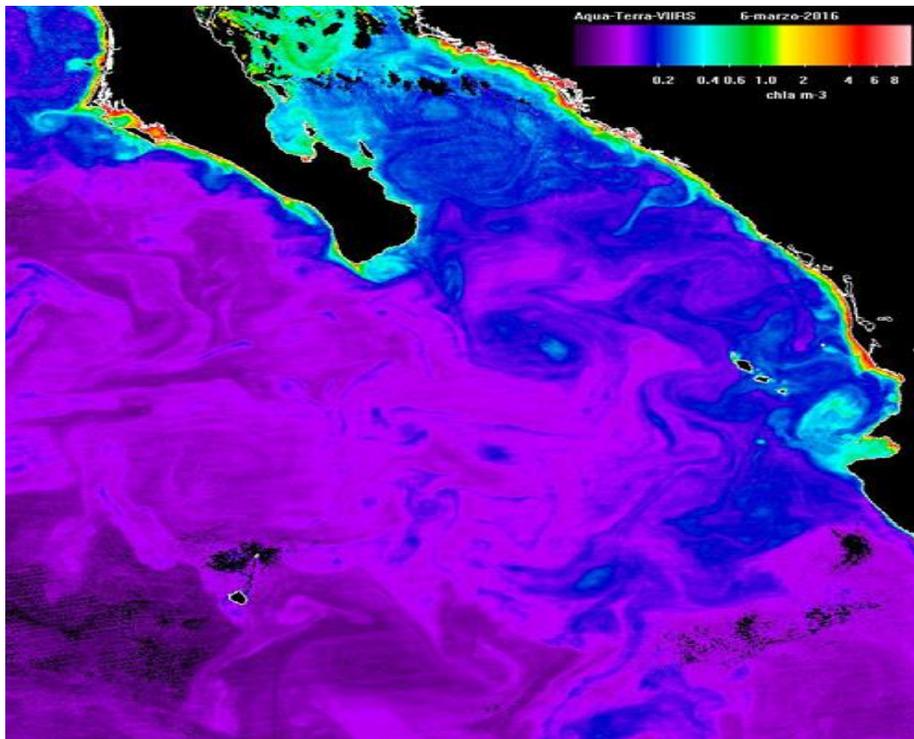


Figura 1. Área de estudio: El Sur del Golfo de California y el Pacífico Mexicano adyacente, hasta la zona de Cabo Corrientes entre los 18° y 25° de latitud N y 105° a 110° de longitud O. Imagen tomada de Godínez *et al.* (2016).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Muestreo

Se recolectaron 28 muestras de zooplancton, a bordo del “Buque Oceanográfico Alpha Helix”, durante la campaña oceanográfica MARIAS 1603 realizada del 02 al 08 de marzo de 2016; en diferentes estaciones de la zona Sur del Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano (Fig. 2). Las muestras se recolectaron mediante arrastres verticales con una red de diámetro de boca de 0.5 m y una apertura de malla de 180 μm , siguiendo la metodología de Smith *et al.* (1985). Estos arrastres se realizaron de la base de la oxiclina hacia la superficie a una velocidad de 1m/seg. Todas las muestras fueron tamizadas (180 μm) y preservadas en etanol al 80%, para su posterior identificación morfológica y molecular.

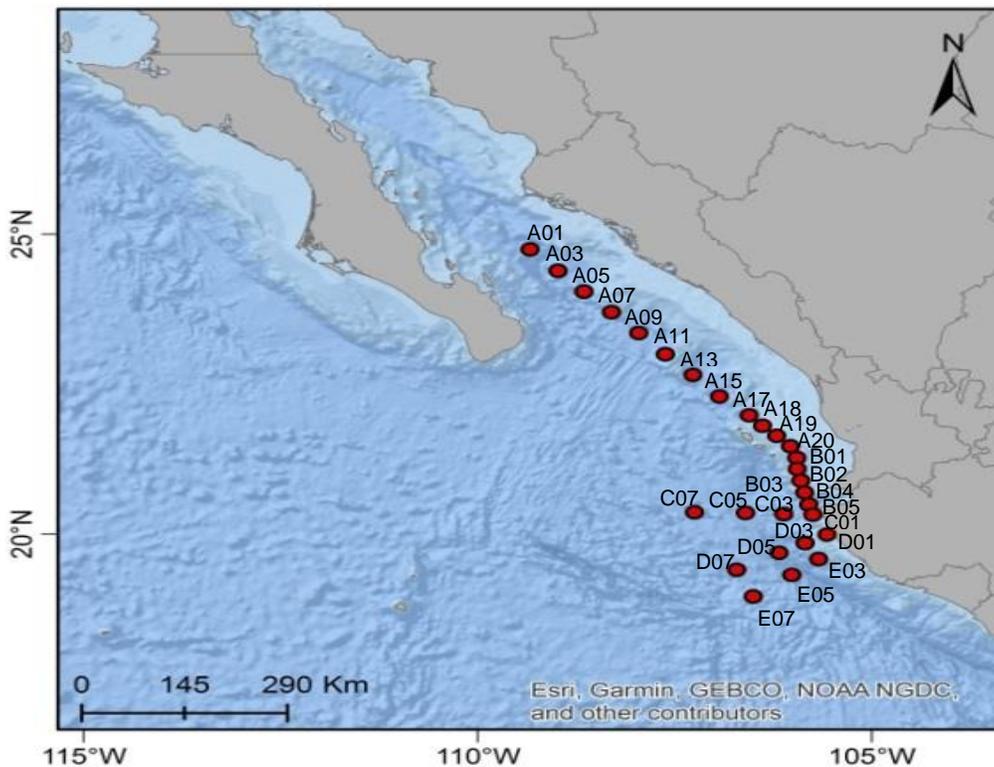


Figura 2. Red de 28 estaciones con sus nombres (puntos rojos), en donde se recolectaron muestras de zooplancton para estudios genéticos. Muestreo que formó parte de la campaña oceanográfica MARIAS1603.

Las 28 estaciones de muestreo en el Sur del Golfo de California y del Pacífico Tropical Mexicano se encuentran entre los 18° a 25° de latitud Norte y 105° a 110° de longitud Oeste. Los muestreos se llevaron a cabo a diferentes horas de día y de noche durante siete días de muestreo. En el Anexo A se detalla la ubicación geográfica precisa de cada estación de muestreo, así como datos de hora y fecha de colecta.

7.2. Identificación morfológica de huevos y larvas de peces

Una vez en el Laboratorio de zooplancton del Departamento de Plancton y Ecología Marina del Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR-IPN), se separaron los huevos y larvas de peces de las muestras de zooplancton.

El ictioplancton de las muestras fue identificado morfológicamente por personal especializado. Los estadios de desarrollo reportados tomaron en cuenta, para las larvas, la base de la flexión de la notocorda; estadio de larva preflexión, que inicia a partir de la absorción completa de las reservas endógenas y termina antes del inicio de la flexión de la notocorda; larva flexión que inicia a partir de la flexión de la notocorda y termina hasta la formación completa de la placa hipúrica; y larva post-flexión que inicia al estar formada completamente la placa hipúrica y termina con la formación completa de los elementos de las aletas pares e impares (Kendall *et al.*, 1984).

Se tomaron fotografías digitales de larvas y huevos como evidencia (Anexo B). Se contabilizaron larvas y huevos por estación de muestreo, de cada especie o Morfotipo reportado respectivamente.

7.3. Identificación molecular de huevos y larvas de peces

7.3.1 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN del conjunto de larvas y huevos (así como aquellos sin embrión y los destruidos) de cada una de las 28 estaciones de muestreo. Se utilizó el protocolo de precipitación con sales de Lopera-Barrero *et al.* (2008). Primero se mezclaron todos los huevos y larvas de peces de una misma estación por microtubo (1.6 mL) para incubar la muestra con 400 µL de buffer lisis (5M de NaCl, 1M Tris pH 8, 0.5M EDTA pH 8 y 10% SDS) y 20 µL de proteinasa K (20 mg/mL) a 56°C en baño maría durante toda la noche (aproximadamente 12 h).

Terminado el período de incubación, se agitó cada tubo vigorosamente en vortex; inmediatamente después se añadieron 200 μ L de NaCl saturado (~6M) y se agitó nuevamente. Se incubó en hielo 10 min (gradilla en congelador) luego se centrifugó a 10,000 rpm, 10 min. Se transfirió el sobrenadante (500 – 600 μ L) a un tubo con 1 mL de etanol absoluto (frio). Se invirtió el tubo varias veces para precipitar el ADN. Cuando el ADN fue visible en etanol se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min. Se decantó el alcohol y se dejó invertido el tubo en una servilleta de papel hasta que se volatilizó todo el alcohol y el precipitado de ADN fue transparente.

El ADN se resuspendió en 50 μ L de TE. Se verificó la extracción de ADN por electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 80 Volt durante 45 min. El gel se visualizó en un transiluminador (UV). La concentración de ADN se evaluó por fluorescencia con un kit de ensayo HS para fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen, CA, EE.UU.) y la concentración de ADN de cada extracto se estandarizó a 3 ng/ μ L, para la posterior amplificación por PCR.

7.3.2. Preparación de librerías de amplicones de ADN por metabarcoding

Se amplificó por PCR un fragmento de la región 12S de ARNr del ADNmt. La construcción de las librerías consistió en dos pasos de PCR.

Para el primer PCR se amplificó un fragmento de aproximadamente 170 pb del gen 12S ARNr; se utilizaron los cebadores universales descritos en Miya *et al.* (2015), con adaptadores para la segunda PCR (Tabla 1).

Tabla 1. Cebadores y adaptadores (Adapt.) propuestos por Miya et al. (2015) para la región 12S ARNr (~170 pb).

Nombre	Secuencias 5' – 3'	
MiFish U	Forward	Reverse
Cebador	GTCGGTAAACTCGTGCCAGC	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
Adapt.	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAG AGACAG	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG

La PCR se realizó por triplicado en un volumen final de 25 μ L, de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción: 2 μ L de ADN (3 ng/ μ L), 2.5 μ L de solución amortiguadora PCR

para Taq polimerasa High Fidelity 10X, 1 μ L de MgSO₄ 50 mM (para una concentración final de 2 mM), 0.5 μ L de solución dNTP'S mix 10 mM (para una concentración final de 0.2 mM), 0.5 μ L de cada cebador 10 μ M (para una concentración final de 0.2 μ M), 0.1 μ L de 5U/ μ L de Taq HiFi (Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity) y 17.9 μ L de agua grado molecular. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguida de (38 ciclos) desnaturalización a 94°C por 30 s, acoplamiento a 55°C por 30 s y extensión a 68°C por 30 s, con una extensión final a 68°C por 3 min, seguida por una última etapa que consiste en un paso a 10°C por 4 min.

Los productos de PCR de cada muestra (con mezcla de huevos y larvas) se verificaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% (40 mL de TAE 1X/0.8 g de Agarosa) con buffer TAE 1X y buffer de tinción Orange G 10X, a 80 Volt, durante 1 h. Se visualizaron en un transiluminador UV.

Una vez verificados los productos anteriores de cada réplica, a un peso molecular aproximadamente de 270 pb en el gel de agarosa (electroforesis), se procedió a diluir cada muestra diez veces con agua grado molecular, para continuar con la preparación de las librerías.

Para la segunda amplificación por PCR del producto del primer PCR del fragmento 12S ARNr (~270 pb), se preparó la mezcla de reacción con las mismas condiciones que la PCR anterior, solo que esta vez se utilizó como templado 2 μ L del producto del primer PCR diluido diez veces. Se usaron los cebadores propuestos por Miya *et al.* (2015) para el primer PCR, solo que esta vez adicionados con secuencias doblemente indexadas (índex de 8 pb) más un adaptador Illumina (Tabla 2). Las estaciones A20 y C03 (muestra 12 y 26) no tuvieron resultados positivos; por esta razón, éstas no fueron consideradas en los análisis moleculares posteriores quedando 26 de las 28 muestras analizadas. Por lo tanto, se etiquetaron 26 de las 28 muestras iniciales. Cada una de las 26 muestras con combinaciones distintas de etiquetas (índex de 8 pb) se detalló en el Anexo C.

Tabla 2. Cebadores con adaptadores propuestos por Miya et al. (2015). Región 12S ARNr (~270 pb) y el adaptador illumina correspondiente (Forward P5 y Reverse P7)

Nombre	Secuencias 5' – 3'	
MiFish U	Forward	Reverse
Cebador	GTCGGTAAAACTCGTGCCAGC	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG
Adaptador	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG
2da PCR		
Adaptador Illumina	P5 AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC	P7 CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT
Index 8 pb	Anexo C	Anexo C

Las condiciones de la segunda amplificación por PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, seguida de (12 ciclos) desnaturalización a 94°C por 30 s, acoplamiento a 55°C por 30 s y extensión a 68°C por 30 s y una extensión final a 68°C por 3 min, seguida por una última etapa que consiste en un paso a 10°C por 4 min.

Los productos de la segunda PCR de cada muestra se verificaron por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE 1X y con buffer de tinción Orange G 10X, a 80 Volt, durante 1 h. Se visualizaron en un transiluminador UV.

Una vez verificados los productos anteriores de cada réplica, a un peso molecular aproximadamente de 370 pb, por electroforesis en gel de agarosa al 2%, se procedió a la limpieza y purificación de cada muestra (por réplica) por medio de un volumen de perlas AmpureXP a 0.8X, para eliminar la presencia de bandas inespecíficas menores a 370 pb y en algunos casos se adicionó una limpieza más con perlas AmpureXP a 0.5X para la eliminación de la presencia de bandas inespecíficas mayores a 370 pb (Beckman y Coulter).

Después de la limpieza y purificación de los amplicones de ADN, con perlas AmpureXP, se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% para observar las bandas en el gel libres de contaminación de bandas inespecíficas.

Una vez verificados los productos por electroforesis en gel de agarosa de la segunda PCR (etiquetado) y limpios con perlas para todas las librerías, se procedió a unir en un solo microtubo las tres réplicas de cada una, es decir, 26 microtubos totales correspondientes a las 26 librerías de amplicones.

Cada una de las librerías fue cuantificada por fluorescencia con el HS kit de ensayo para Qubit. Una vez obtenida la cuantificación esta se estandarizó a una concentración final de 3 ng/μL, para cada una de las 26 librerías (Fig. 3)

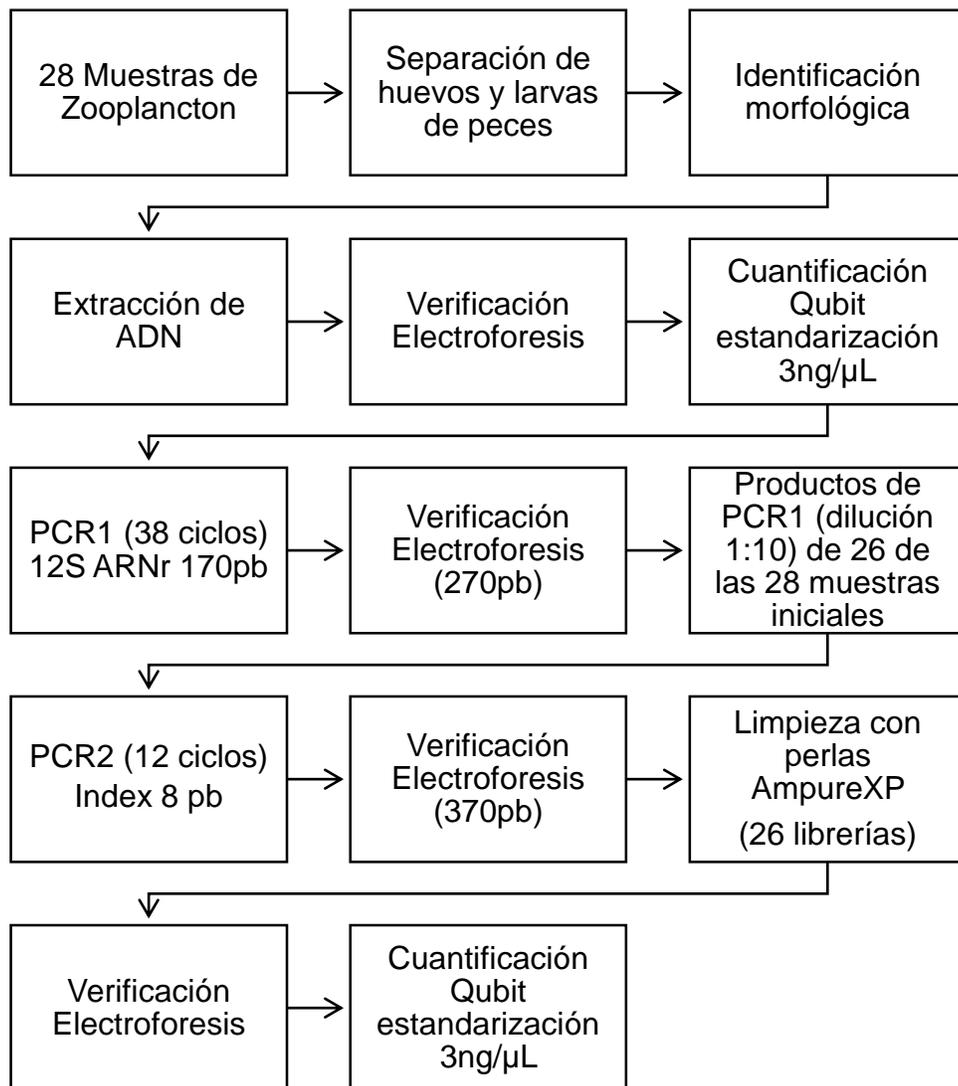


Figura 3. Proceso de la preparación de 26 librerías de amplicones de ADN a partir de muestras de huevos y larvas de peces.

7.3.2.1. Preparación de comunidad artificial (mock) como control positivo.

Para la preparación de un control positivo, se construyó una comunidad artificial (mock) de 20 especies de peces del Golfo de California de diferentes familias de especímenes adultos (Anexo D), a una concentración de ADN igual para cada especie.

Inicialmente se extrajo el ADN de tejido de músculo y de aleta de peces adultos de especies conocidas (identificadas morfológicamente), de trece muestras donadas por parte del Instituto de Biología de la UNAM (IB UNAM), trece muestras de una colección personal del Dr. Adrián Felipe González Acosta de CICIMAR y quince muestras obtenidas durante la recolección de especímenes para el curso de Ictiología Especial (IE) en CICIMAR (donados a la colección ictiológica de CICIMAR). Para la extracción de las muestras del control positivo se utilizó el kit de extracción de ADN DNeasy Blood & Tissue Kit QIAGEN (siguiendo el protocolo del fabricante).

Se verificó la presencia de ADN en los extractos, a través de electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Todas las muestras fueron cuantificadas por fluorescencia con un kit de ensayo HS para fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen, CA, EE.UU.). Se escogieron las que presentaron mayor concentración de ADN. Fueron 20 especies diferentes las que conformaron la comunidad artificial (Anexo D). Estas últimas se llevaron a una concentración final estandarizada de 3 ng/μL cada una.

Se continuó con una amplificación por PCR (con las mismas condiciones descritas para las 26 muestras procesadas anteriormente: mezcla de reacción y programa de PCR) esto con el fin de comprobar que el ADN de todas las especies escogidas y estandarizadas a una misma concentración para construir el mock, amplificáran con éxito el ADN utilizando el par de cebadores propuestos por Miya *et al.* (2015), con sus respectivos adaptadores (Tabla 1). Los productos de esta amplificación por PCR fueron verificados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%. Una vez comprobado el éxito obtenido en la amplificación del ADN, para cada una de las 20 especies, se continuó con la preparación del pool de ADN de las 20 especies de especímenes adultos.

Se tomaron 5 μL de cada una de las 20 muestras de ADN de peces adultos, estandarizadas a 3 ng/μL, se fueron agregando a un mismo microtubo, hasta obtener

un volumen final de 100 μL de la mezcla de las 20 especies de especímenes adultos. De esta mezcla de 100 μL , se tomaron 2 μL como templado para un primer PCR, esto se hizo por triplicado. Se conservaron las mismas condiciones de la mezcla de reacción así como el mismo proceso de PCR descrito en el subcapítulo 7.3.2

Después del primer PCR de la mezcla de las 20 especies se verificaron los productos por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, a un peso aproximadamente de 270pb. Una vez verificados, se procedió a la dilución 1:10 del producto de PCR de las tres réplicas, para esto se tomaron 3 μL de la mezcla del primer PCR y se agregaron 27 μL de agua grado molecular.

De la dilución anterior se tomaron 2 μL como templado (de cada réplica), para proceder al etiquetado con index a través de una segunda amplificación por PCR.

El protocolo para la segunda amplificación por PCR, para el etiquetado, es el mismo empleado para las 26 muestras de las diferentes estaciones. Una vez obtenidos los productos de la amplificación de la segunda PCR, por triplicado, a un peso molecular aproximadamente de 370pb se procedió de igual manera a la verificación por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Inmediatamente después la limpieza y purificación de cada réplica de la mezcla, por medio de un volumen de perlas AmpureXP a 0.8X, para eliminar la presencia de bandas inespecíficas menores a 370pb (Beckman y Coulter).

Después de la limpieza y purificación de los amplicones de ADN, con perlas AmpureXP, se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% para observar las bandas en el gel libres de contaminación por bandas inespecíficas. Una vez verificados los productos de la segunda PCR (etiquetado) por electroforesis en gel de agarosa y limpios con perlas, para todas las réplicas, se procedió a unir en un solo microtubo las tres réplicas de la mezcla. El mock se hizo por duplicado, es decir, dos controles positivos iguales, pero con etiqueta diferente al momento de indexar. Cada uno de los dos controles positivos fue cuantificado por fluorescencia con el HS kit de ensayo para Qubit. Una vez obtenida la cuantificación esta se estandarizó a una concentración final de 3ng/ μL , para cada uno de los dos controles positivos (Fig. 4)

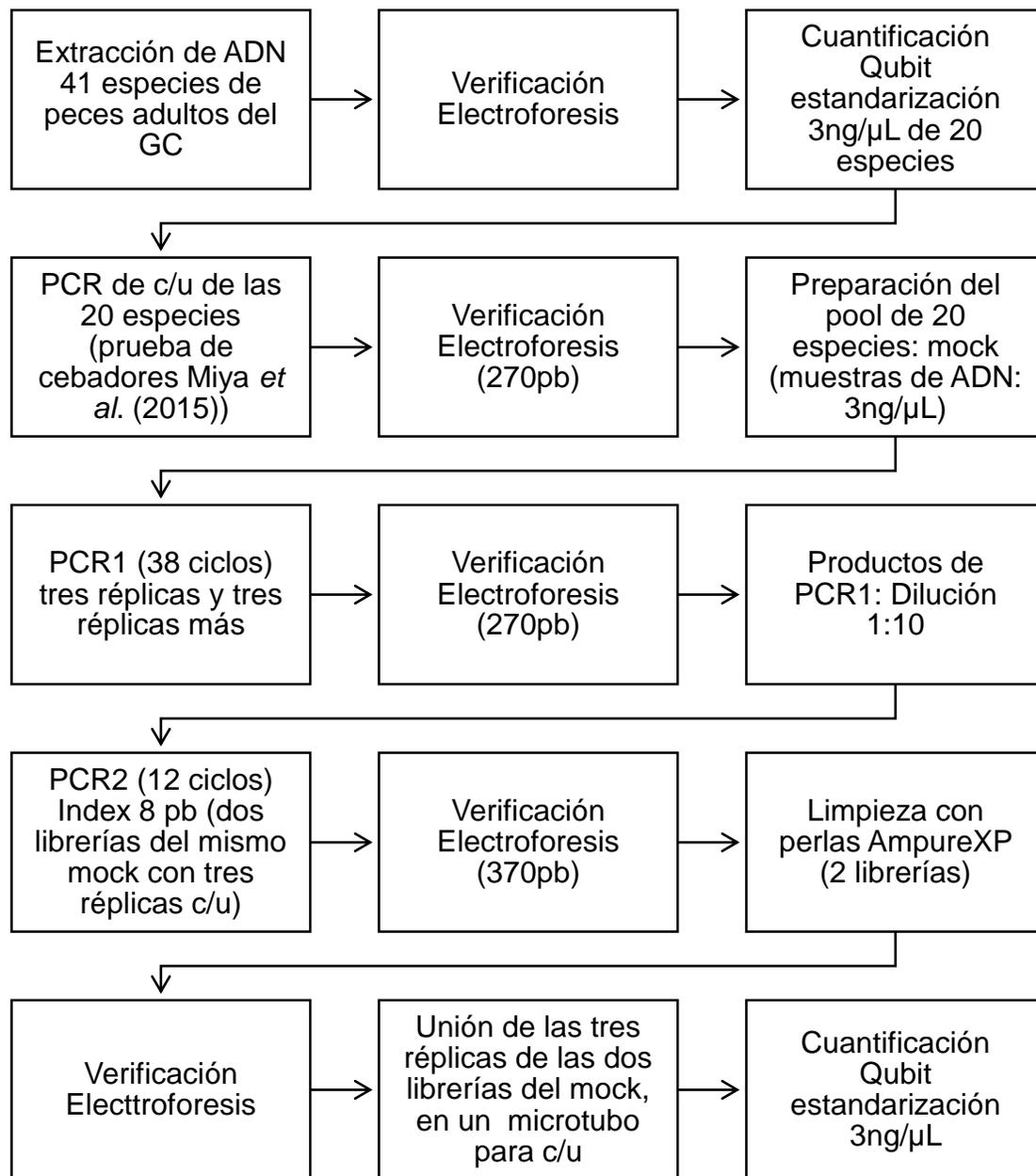


Figura 4. Proceso de la preparación de dos librerías de la comunidad artificial (mock) como control positivo.

Finalmente las 26 librerías, las dos librerías del control positivo (mock) y un control negativo se unieron en un solo grupo (un solo microtubo de 1.6mL), en un volumen de 100 μ L totales estandarizados a una concentración final equimolar de 5nM (suponiendo que 1pb es igual a 660 g/mol, Miya *et al.*, 2015) y se enviaron al servicio

de secuenciado masivo a Novogene, en California E.U.A, para la plataforma Illumina Hiseq paired end 2x150pb.

7.3.3. Análisis de secuencias

Pipeline Metabarcoding de ADN (Modificado de Wangenstein *et al.*, 2018)

Los archivos con las secuencias demultiplexadas (separadas por las etiquetas o index en cada carpeta) se recibieron por parte del proveedor (Anexo E) y se procedió a utilizar como herramientas bioinformáticas el paquete de OBITools versión más actual de Boyer *et al.* (2016). Este software es de código abierto disponible en el sitio web: <http://metabarcoding.org/obitools>; utilizado para el proceso de datos obtenidos por secuenciación de siguiente generación (NGS) (modificado en algunas partes, para adecuarlo a los datos obtenidos). Las lecturas contenidas en las 29 carpetas correspondientes a cada librería (26 estaciones, 2 controles positivos y un control negativo), presentaron los datos de las dos secuencias, es decir, Forward_1.fq y Reverse_2.fq, (fq: formato fastq).

El flujo de trabajo bioinformático se siguió como se muestra de manera resumida en la Fig. 5. Este flujo de trabajo se llevó a cabo en el servidor del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) con asesoría del Dr. Óscar E. Juárez Valdez.

Los cebadores (forward y reverse) se recortaron de las secuencias, (antes de ser ensambladas por Illuminapairedend ya que una vez ensambladas sería más difícil hacerlo), vía “Quality Trimmer” de la paquetería de FASTX_toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/), software que no es parte del paquete de OBITools.

Las secuencias redujeron su tamaño una vez sin cebadores (cebadores con una longitud para el forward de 21 bases y para el reverse de 27 bases), por lo que el análisis se agilizó. Después de esto se procedió a ensamblar las secuencias, a través del enfoque de extremo emparejado (paired-end) que se basa en la alineación de las lecturas forward y reverse para reconstruir la secuencia consenso de longitud de amplicón completa, todo esto por medio de la función Illuminapairedend.

Al mismo tiempo se adecuó un filtro de calidad (obigrep) considerando un valor mayor a 30, es decir, que todas las colas de baja calidad de cada lectura, que esten debajo de este valor de 30 son cortadas; así como un filtro (obigrep) de longitud a las lecturas asignadas (tomando como límite inferior 165pb y como límite superior 185pb), y uno más (obigrep) para filtrar mismatches (desajustes) del alineamiento, siendo aceptado un valor < 1 , es decir, aceptando cero mismatches para generar la secuencia consenso; así como filtrar bases ambiguas (Ns), es decir todas aquellas que no sean A, T, G o C.

Con la función obiuniq las lecturas fueron agrupadas, se contaron las secuencias repetidas (idénticas) y las secuencias únicas (singleton). Las secuencias quiméricas fueron detectadas y eliminadas a través del algoritmo uchime_denovo implementado en Vsearch, versión más actual (Rognes *et al.*, 2016). Previo a este paso se cambió el formato OBITools a formato Vsearch a través del siguiente scrip: `owi_obisample2vsearch -i`; esto con el fin de poder trabajar con el algoritmo de eliminación de quimeras. Después de eliminar quimeras, el formato del archivo de salida vuelve al formato original. El siguiente paso se dio a través de la función obiannotate, mediante la cual se colocó un identificador en cada secuencia representativa y el formato de salida con extensión .fasta; enseguida se crearon las tablas de abundancias de las secuencias representativas con la función obitab, con formato de salida .tab.

Se regresó al formato Vsearch a través del siguiente scrip: `owi_obifasta2vsearch -i`, usando los nuevos identificadores (para cada secuencia representativa), esto con el fin de poder trabajar con la función Swarm, la cual agrupo las secuencias en MOTU y una vez agrupadas se contaron. Después se quitaron los singletons, por medio de un filtro obigrep, al que se le especifica que todas aquellas secuencias que presenten una sola lectura sean eliminadas, ya que estas pueden representar errores de secuenciación; quedando al final todos aquellos MOTU con más de una lectura de secuencia.

Por medio de la función obitab, se generaron tablas de abundancia de MOTU en cada muestra, con un formato de salida con extensión .tab.

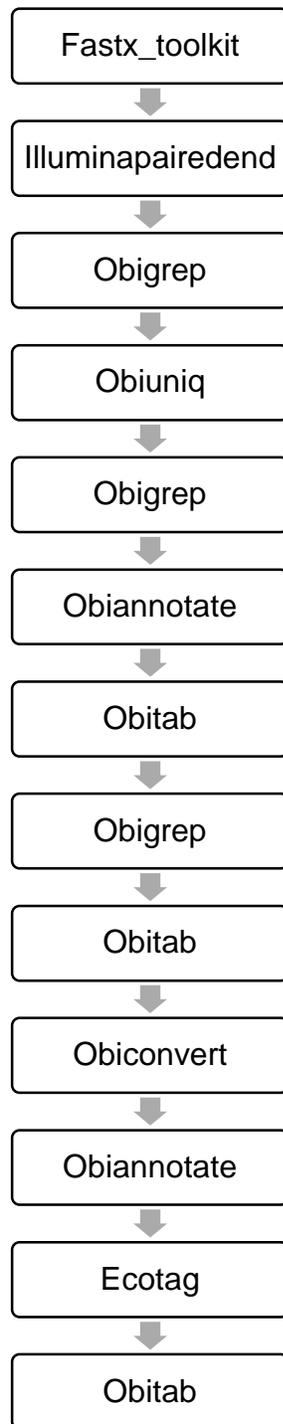


Figura 5. Resumen del flujo de trabajo utilizado para el análisis bioinformático de los resultados de la secuenciación masiva, Illumina HiSeq. (Modificado de Boyer et al., 2016).

7.3.4. Asignación taxonómica

La asignación taxonómica de las secuencias representativas para cada MOTU fue realizada utilizando la función Ecotag (Boyer *et al.*, 2016); para esto se creó una base de datos de referencia local basada en árboles filogenéticos (utilizando la taxonomía NCBI: Centro Nacional de Información Biotecnológica) para asignar secuencias sin un emparejamiento perfecto. Ecotag busca el mejor éxito en la base de datos de referencia y construye un conjunto de secuencias en la misma, las cuales son al menos tan similares al mejor resultado como es la secuencia de consulta.

Posteriormente, los MOTUs se asignan al ancestro común más reciente de todas estas secuencias en el árbol de taxonomía NCBI. Con este procedimiento, el rango taxonómico asignado varía según la similitud de las secuencias de consulta y la densidad de la referencia de la base de datos (Wangensteen *et al.*, 2018).

Para la asignación taxonómica se trabajó con la base de datos del GenBank (NCBI) repositorio público de libre acceso <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, con la mayor base de secuencias a nivel mundial, con referencias de especies razonablemente bien identificadas. Solo se trabajó para el grupo de peces óseos.

Como primer paso se descargaron todas las secuencias de referencia disponibles en el repositorio público de GenBank (NCBI) del gen 12S ARN ribosomal (incluyendo los fragmentos reportados así como mitogenomas completos), de todos los peces óseos registrados, para construir la base local de secuencias de referencia (no se agregó ninguna secuencia nueva para construir la base de datos de referencia personalizada). Se incluyeron alrededor de 30,000 registros de secuencias disponibles registradas previamente en el repositorio en formato GeneBank (.gb). La base de datos se creó como un archivo de salida en formato GenBank, guardado como: 12SrRNA_fish_genbank.gb. De igual manera, se descargó la taxonomía completa del GenBank (URL: <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/taxonomy/taxdump.tar.gz>, en el formato OBITools) para lo cual se creó un nuevo directorio nombrado TAXO, donde se guardó la información.

Como siguiente paso, la información de la taxonomía que se descargó del Gen Bank, almacenada dentro de la carpeta TAXO se incluyó dentro de la base de datos local de

peces óseos, es decir de la 12SrRNA_fish_genbank.gb, para generar una nueva base de datos nombrada Fish_12S, con formato de salida .ecopcrdb que se utilizó para correr un PCR in silico por medio del software ecoPCR (Ficetola *et al.*, 2010). Donde se especificó el tamaño del fragmento buscado (165 – 185pb), así como el par de iniciadores (MiFish U/F/R) utilizado. Una vez obtenidos los resultados, en formato de salida .ecopcr, se creó el archivo con las secuencias de referencia solo con los productos amplificados de la PCR in silico. A través de la función obiconvert del paquete OBITools, se convirtió de formato .ecopcr, a un formato de salida .fasta. Después de la ecoPCR esta base de datos resultó con más de 8,600 secuencias de referencia en formato .fasta, para poder utilizarla para comparar con los archivos procesados sin singletons de cada muestra.

Con la función obiannotate se crearon etiquetas únicas para la secuencias de referencia, es decir un ID único, para evitar errores de duplicación de nombres al momento de la asignación.

Finalmente se llevó a cabo la asignación taxonómica con Ecotag y se generó la tabla de especies para cada una de las estaciones de muestreo. A la función Ecotag se le especificó el filtro de similitud mínima utilizado, que en este caso fue de 0.99, de esta manera la función tomo los datos de referencia de la base de datos local creada en los pasos anteriores (base de datos: Fish_12S) y los comparó con todas las secuencias de cada archivo, generado con el flujo de trabajo (pipeline) descrito anteriormente. Aquí se generó un archivo de salida .fasta, que contenía la asignación taxonómica correspondiente. Cabe aclarar que ecotag, realiza asignaciones taxonómicas desde nivel especie a orden, es decir, especie, género, familia y orden.

Para presentar los resultados finales, fue a través de la función obitab, que se generó un archivo de salida en formato .tab, es decir una tabla con los resultados de los datos correspondientes a la asignación.

Los detalles del pipeline para metabarcoding de ADN, modificado de Wangenstein *et al.* (2018) (utilizando el fragmento del marcador 12S de aproximadamente 170pb así como el par de iniciadores MiFish de Miya *et al.*, 2015) se describen en el Anexo F.

7.3.5. Análisis de los datos

Después de la asignación taxonómica se llevó a cabo una corrección de los datos restándole a estos lo que resulto en el control negativo, es decir el número de lecturas de cada MOTU menos las lecturas presentadas en el control negativo, para cada MOTU correspondiente. Todos los números de lecturas asignadas, después del análisis bioinformático procesado con herramientas OBITools (modificadas de Boyer *et al.*, 2016), fueron consideradas para los análisis posteriores.

Todas las secuencias fueron consideradas como resultados positivos para un posible MOTU; es decir, en este análisis los datos presentados no tienen corrección para falsos positivos debido a que la asignación taxonómica fue basada en un alto criterio de similitud $\geq 99\%$ de identidad pareada. El proceso fue estricto en los criterios de calidad y de filtrados considerados por parte de las herramientas de OBITools, correspondientes a los análisis bioinformáticos por estación de muestreo; así como también los resultados se presentan de manera descriptiva, tanto para los datos de la identificación morfológica como la identificación molecular.

Una vez corregidos los resultados con el control negativo, el número de lecturas fueron transformadas utilizando logaritmo base 10, debido a una gran diferencia en el número de lecturas entre MOTUs. Una vez transformados los resultados se procedió a realizar una curva entre número de MOTUs y número total de estaciones de muestreo, siguiendo el método de rarefacción, con el paquete *vegan* en RStudio v 3.6.1., así como la obtención de curvas de rarefacción para cada estación de muestreo por medio de la función *rarecurve* del mismo paquete. Se obtuvieron los porcentajes de similitud de Bray Curtis para el cluster por medio del software Biodiversity Pro versión 2 y se realizó un análisis NMDS de distancia de Bray Curtis mediante la función *metaMDS*, del paquete *vegan* en R.

8. RESULTADOS

8.1. Identificación morfológica

8.1.1. Número de larvas y huevos totales en las estaciones de muestreo.

El número total de larvas y huevos que se recolectaron en las 28 estaciones de muestreo, al Sur del Golfo de California y Región adyacente del Pacífico Mexicano, se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Número total de larvas, huevos, embriones, huevos sin embrión, así como huevos y larvas destruidos presentes en las muestras de las 28 estaciones de muestreo.

Estadios	Total
Larvas	670
Huevos	222
Embriones	68
Sin embrión	100
Destruídos (2 larvas y 14 huevos)	16
Total	1 076

En el Anexo B, se presenta la lista taxonómica del ictioplancton identificado mediante caracteres diagnósticos morfológicos, especificando el número total de los mismos, así como la fotografía correspondiente.

En el caso de las larvas, se identificaron 16 Órdenes, 25 Familias, 32 Géneros y 19 Especies. Los huevos se identificaron en 30 morfotipos diferentes.

8.1.2. Comunidades presentes en las estaciones de muestreo.

Las comunidades del ictioplancton, se distribuyeron en cada una de las estaciones de muestreo como se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Comunidad de larvas y huevos de peces, identificados mediante caracteres morfológicos diagnósticos al menor nivel taxonómico posible por estación de muestreo. Estación: Número y nombre de cada una de las estaciones de muestreo; Sec.: Secuencial de muestreo (Lance).

Estación	Sec	FAMILIA	NÚMERO DE LARVAS Y MORFOTIPOS DE HUEVOS DE PECES
1 A01	1	PHOSICHTHYIDAE	11 <i>Vinciguerria lucetia</i>
		MYCTOPHIDAE	4 <i>Benthoosema panamense</i>
		MYCTOPHIDAE	8 <i>Diogenichthys laternatus</i>
		MYCTOPHIDAE	1 <i>Triphoturus mexicanus</i>
		BREGMACEROTIDAE	3 <i>Bregmaceros bathymaster</i>
		GOBIIDAE	3 Gobiidae tipo 2
		-	1 Embrión
		-	6 Sin embrión
-	1 Huevo Tipo 4		
2 A03	3	PHOSICHTHYIDAE	4 <i>Vinciguerria lucetia</i>
		MYCTOPHIDAE	1 <i>Benthoosema panamense</i>
		MYCTOPHIDAE	2 <i>Diogenichthys laternatus</i>
		-	12 Sin embrión
		-	1 Huevo Tipo 24
		-	1 Huevo Tipo 25
		-	1 Huevo Tipo 26
3 A05	5	STERNOPTYCHIDAE	1 Sternoptychidae tipo 1
		MYCTOPHIDAE	5 <i>Diogenichthys laternatus</i>
		GOBIIDAE	1 <i>Rhinogobiops nicholsii</i>
		MUGILIDAE	1 <i>Mugil</i> sp 1
		-	35 Sin embrión
4 A07	7	MYCTOPHIDAE	11 <i>Protomyctophum</i> sp 1
		BREGMACEROTHIDAE	1 <i>Bregmaceros bathymaster</i>
		-	4 Sin embrión
		-	3 Huevos destruidos
5 A09	9	PHOSICHTHYIDAE	5 <i>Vinciguerria lucetia</i>
		MYCTOPHIDAE	1 <i>Diaphus pacificus</i>
		MYCTOPHIDAE	4 <i>Diogenichthys laternatus</i>
		BREGMACEROTHIDAE	2 <i>Bregmaceros bathymaster</i>
		OPHIDIIDAE	1 <i>Chilara</i> sp 1
		PARALICHTHYDAE	2 <i>Syacium</i> sp. 1
		-	3 Sin embrión
		-	1 Huevo Tipo 29
		-	1 Huevo destruido
6 A11	11	PHOSICHTHYIDAE	4 <i>Vinciguerria lucetia</i>
		MYCTOPHIDAE	4 <i>Diogenichthys laternatus</i>

		BREGMACEROTHIDAE	13 <i>Bregmaceros bathymaster</i>
		-	3 Sin embrión
7	13	PHOSICHTHYIDAE	1 <i>Vinciguerria lucetia</i>
A13		MYCTOPHIDAE	1 <i>Diogenichthys laternatus</i>
		-	1 Huevo Tipo 5
		-	1 Huevo Tipo 6
8	15	PHOSICHTHYIDAE	11 <i>Vinciguerria lucetia</i>
A15		MYCTOPHIDAE	6 <i>Diogenichthys laternatus</i>
		BREGMACEROTHIDAE	92 <i>Bregmaceros bathymaster</i>
		OPHIDIIDAE	3 <i>Chilara</i> sp 1
		-	45 Huevos Tipo 28
		-	1 Huevo Tipo 30
9	17	CLUPEIDAE	1 <i>Sardinops sagax</i>
A17		PHOSICHTHYIDAE	12 <i>Vinciguerria lucetia</i>
		SYNODONTIDAE	1 <i>Synodus lucioceps</i>
		MYCTOPHIDAE	1 <i>Diogenichthys laternatus</i>
		BREGMACEROTHIDAE	65 <i>Bregmaceros bathymaster</i>
		SERRANIDAE	1 <i>Serranus</i> sp 1
		-	28 Embriones
		-	6 Sin embrión
10	18	ENGRAULIDAE	1 <i>Engraulis mordax</i>
A18		CLUPEIDAE	2 <i>Sardinops sagax</i>
		BREGMACEROTHIDAE	3 <i>Bregmaceros bathymaster</i>
		GOBIIDAE	1 Gobiidae tipo 1
		CARANGIDAE	8 <i>Chloroscombrus orqueta</i>
		PARALICHTHYDAE	2 Paralichthyidae tipo 1
		GERREIDAE	3 <i>Diapterus</i> sp 1
		HAEMULIDAE	1 Haemulidae tipo 1
		-	2 Embriones
		-	6 Sin embrión
11	19	PHOSICHTHYIDAE	1 <i>Vinciguerria lucetia</i>
A19		BREGMACEROTHIDAE	69 <i>Bregmaceros bathymaster</i>
		PARALICHTHYDAE	1 <i>Citharichthys platophrys</i>
		-	2 Huevos destruidos
12	20	SCOMBRIDAE	2 <i>Auxis</i> spp
A20		-	20 Embriones
		-	2 Huevos Tipo 28
13	21	PHOSICHTHYIDAE	8 <i>Vinciguerria lucetia</i>
B01		MYCTOPHIDAE	2 <i>Diaphus pacificus</i>
		MYCTOPHIDAE	3 <i>Diogenichthys laternatus</i>
		BREGMACEROTHIDAE	46 <i>Bregmaceros bathymaster</i>
		SCOMBRIDAE	2 <i>Auxis</i> spp
		SCORPAENIDAE	1 <i>Scorpaenodes</i> sp 1
14	22	PHOSICHTHYIDAE	4 <i>Vinciguerria lucetia</i>

B02		MYCTOPHIDAE	2	<i>Diogenichthys laternatus</i>
		BREGMACEROTHIDAE	16	<i>Bregmaceros bathymaster</i>
		LABRIDAE	1	<i>Halichoeres semicinctus</i>
		-	1	Huevo destruido
15 B03	23	MYCTOPHIDAE	1	<i>Benthoosema panamense</i>
		MYCTOPHIDAE	1	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		BREGMACEROTHIDAE	82	<i>Bregmaceros bathymaster</i>
		OPHIDIIDAE	1	<i>Lepophidium</i> sp 1
		PARALICHTHYDAE	1	<i>Syacium</i> sp 1
		CYNOGLOSSIDAE	2	<i>Symphurus</i> sp 1
		-	3	Embriones
		-	1	Huevo Tipo 28
	-	1	Larva destruida	
16 B04	24	BREGMACEROTHIDAE	5	<i>Bregmaceros bathymaster</i>
		NOMEIDAE	1	<i>Psenes pellucidus</i>
		LABRIDAE	1	Labridae tipo 2
		-	1	Embrión
		-	3	Sin embrión
17 B05	25	PHOSICHTHYIDAE	1	<i>Vinciguerria lucetia</i>
		MYCTOPHIDAE	1	<i>Diaphus pacificus</i>
		BREGMACEROTHIDAE	6	<i>Bregmaceros bathymaster</i>
		SCOMBRIDAE	3	<i>Auxis</i> spp
		SCORPAENIDAE	1	<i>Scorpaenodes</i> sp 1
		-	1	Embrión
	-	14	Huevos Tipo 28	
18 C01	26	PHOSICHTHYIDAE	2	<i>Vinciguerria lucetia</i>
		BREGMACEROTHIDAE	11	<i>Bregmaceros bathymaster</i>
		SCOMBRIDAE	1	<i>Auxis</i> spp
		-	6	Embriones
	-	4	Huevos destruidos	
19 D01	27	PARALEPIDIDAE	1	<i>Lestidiops</i> sp 1
		MYCTOPHIDAE	1	<i>Benthoosema panamense</i>
		SCOMBRIDAE	3	<i>Scomber japonicus</i>
		NOMEIDAE	2	<i>Psenes pellucidus</i>
		-	2	Embriones
		-	4	Sin embrion
		-	47	Huevos Tipo 27
		-	1	Larva destruida
20 E03	30	GONOSTOMATIDAE	1	<i>Diplophos</i> sp 1
		PHOSICHTHYIDAE	3	<i>Vinciguerria lucetia</i>
		PARALEPIDIDAE	4	Paralepididae tipo 1
		MYCTOPHIDAE	1	<i>Diaphus pacificus</i>
		MYCTOPHIDAE	1	<i>Lampanyctus parvicauda</i>
		-	5	Sin embrión

21 E05	32	PHOSICHTHYIDAE	2 <i>Vinciguerria lucetia</i>
		STOMIIDAE	1 <i>Idiacanthus antrostomus</i>
		PARALEPIDIDAE	1 Paralepididae tipo 1
		MYCTOPHIDAE	1 <i>Diaphus pacificus</i>
		MYCTOPHIDAE	2 <i>Diogenichthys laternatus</i>
		-	2 Embriones
		-	2 Huevos Tipo 7
		-	3 Huevos Tipo 11
		-	2 Huevos Tipo 12
		-	1 Huevo Tipo 13
		-	2 Huevos Tipo 14
		-	1 Huevo Tipo 15
		-	3 Huevos Tipo 16
		-	1 Huevo Tipo 17
-	10 Huevos Tipo 18		
22 E07	34	LABRIDAE	1 Labridae tipo 1
		-	1 Huevo Tipo 8
		-	1 Huevo Tipo 10
23 D07	37	PHOSICHTHYIDAE	2 <i>Vinciguerria lucetia</i>
		MYCTOPHIDAE	1 <i>Diaphus pacificus</i>
		MYCTOPHIDAE	3 <i>Diogenichthys laternatus</i>
		MYCTOPHIDAE	3 <i>Lampanyctus parvicauda</i>
		HEMIRAMPHIDAE	1 <i>Hyporhamphus</i> sp 1
		SCOMBRIDAE	1 <i>Auxis</i> spp
		NOMEIDAE	1 <i>Cubiceps pausiradius</i>
		SCORPAENIDAE	1 <i>Scorpaenodes</i> sp 1
		-	3 Sin embrión
24 D05	39	PHOSICHTHYIDAE	14 <i>Vinciguerria lucetia</i>
		BREGMACEROTHIDAE	5 <i>Bregmaceros bathymaster</i>
		-	3 Sin embrión
		-	11 Huevos Tipo 4
		-	4 Huevos Tipo 6
		-	2 Huevos Tipo 7
		-	1 Huevo Tipo 8
		-	2 Huevos Tipo 9
25 D03	41	MYCTOPHIDAE	1 <i>Diaphus pacificus</i>
		MYCTOPHIDAE	1 <i>Diogenichthys laternatus</i>
		SCOMBRIDAE	1 <i>Scomber japonicus</i>
		NOMEIDAE	2 <i>Cubiceps pausiradius</i>
		-	1 Huevo Tipo 20
		-	5 Huevos Tipo 21
		-	1 Huevo Tipo 22
		-	1 Huevo destruido
26	44	PHOSICHTHYIDAE	7 <i>Vinciguerria lucetia</i>

C03		MYCTOPHIDAE	1	<i>Diogenichthys laternatus</i>
		HEMIRAMPHIDAE	1	<i>Hemiramphidae</i> tipo 1
		-	1	Embrión
27	46	OPHICHTHIDAE	1	<i>Ophichthus zophochir</i>
C05		MYCTOPHIDAE	1	<i>Diogenichthys laternatus</i>
		BREGMACEROTHIDAE	2	<i>Bregmaceros bathymaster</i>
		SCOMBRIDAE	1	<i>Auxis</i> spp
		-	1	Embrión
		-	5	Sin embrión
		-	4	Huevos Tipo 23
		-	1	Huevo destruido
28	48	PHOSICHTHYIDAE	2	<i>Vinciguerria lucetia</i>
C07		MYCTOPHIDAE	1	<i>Diaphus pacificus</i>
		MYCTOPHIDAE	2	<i>Protomyctophum</i> sp 1
		HEMIRAMPHIDAE	1	<i>Hyporhamphus</i> sp 1
		-	2	Sin embrión
		-	1	Huevo Tipo 1
		-	2	Huevos Tipo 2
		-	2	Huevos Tipo 3
		-	41	Huevos Tipo 4
		-	1	Huevo destruido

Los huevos que se presentaron sin embrión y los que se presentaron destruidos, así como las larvas destruidas, también fueron considerados parte de la comunidad del ictioplancton para el análisis molecular (Tabla 4).

En la Fig. 6, se presenta el número de larvas y huevos totales recolectados en cada estación (de acuerdo a los datos presentados en la Tabla 4), en donde logra apreciarse mayor abundancia de ambos en la estación A15, con presencia de 112 larvas y 46 huevos totales; correspondiendo 92 de las 112 larvas a la especie *Bregmaceros bathymaster* y 45 de los 46 huevos a Huevo Tipo 28.

Para otras estaciones como A17, A19, B01 y B03 se observa alta presencia de larvas más no de huevos, sobresaliendo también en este caso la especie *B. bathymaster* en las cuatro estaciones de muestreo mencionadas; siendo en otras como la estación B05, D01, E05, D05 y C07 las que se destacan por mayor presencia de huevos más no de larvas.

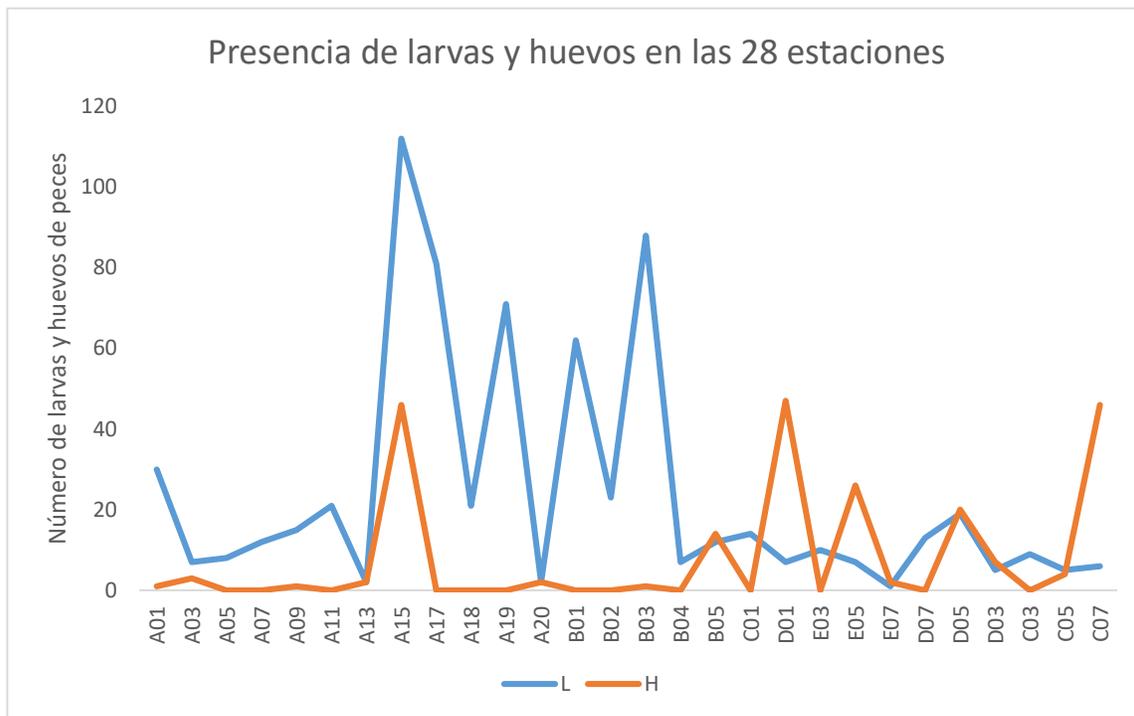


Figura 6. Número de larvas y huevos presentes en las 28 muestras que corresponden a las 28 estaciones. Los datos corresponden a las larvas (L) totales (línea color azul) y los huevos (H) totales identificados morfológicamente, en 30 diferentes tipos de Huevo (línea color anaranjado).

En la estación B05 se obtuvieron 14 huevos Tipo 28, la D01 tuvo 47 huevos Tipo 27, en la E05 se obtuvieron 25 huevos en total de 9 tipos diferentes, destacando 10 huevos de Tipo 18. En la estación D05 se obtuvieron 20 huevos totales de 5 tipos diferentes destacando 11 de Tipo 4 y por último en la estación C07 tuvo 46 huevos totales de 4 tipos diferentes, destacan 41 huevos determinados como Tipo 4.

8.2. Identificación molecular

8.2.1. Preparación de librerías de amplicones de ADN de comunidades del ictioplancton por metabarcoding

Las estaciones A20 y C03 (muestra 12 y 26) no tuvieron resultados positivos; por esta razón, éstas no fueron consideradas en los análisis moleculares posteriores quedando 26 de las 28 muestras analizadas. En las figuras 7 y 8 se muestran los productos de la primera y segunda amplificación del PCR respectivamente, de las librerías de amplicones de ADN, verificados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y visualizados en un transiluminador UV.

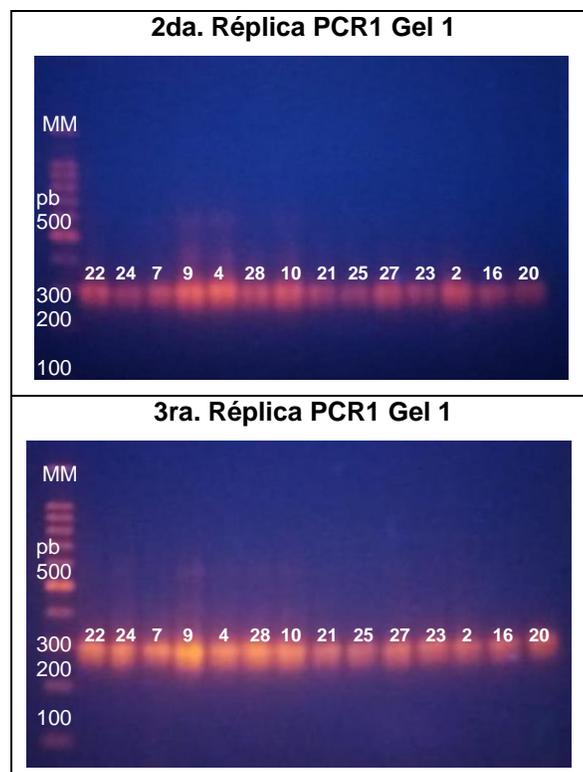


Figura 7. Segunda y tercera réplica de los productos de la primera amplificación por PCR, verificados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, a un peso molecular aproximadamente de 270pb. El número que se presenta en cada banda, corresponde al número de muestra (comunidad de huevos y larvas de peces de 26 de las 28 estaciones de muestreo). MM: marcador de peso molecular de 100pb.

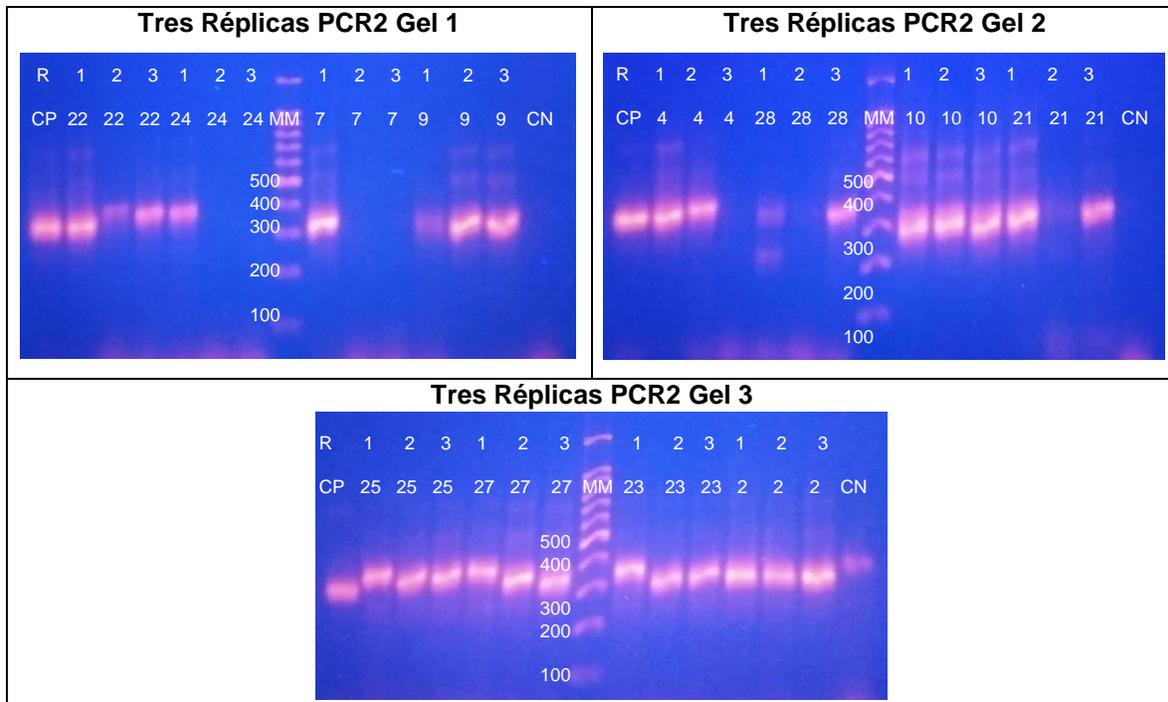


Figura 8. Tres réplicas (1, 2 y 3) de los productos de la segunda amplificación por PCR, verificados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, a un peso molecular aproximadamente de 370pb. El número que se presenta en el primer renglón, después de la R (Réplica) representa el número de réplica. Los números en el siguiente renglón corresponden al número de muestra (comunidad de huevos y larvas de peces de 26 de las 28 estaciones de muestreo). CP: control positivo; CN: control negativo; MM: marcador de peso molecular de 100pb.

En la Fig. 9 se muestran los geles de agarosa con los productos de PCR, amplicones de ADN una vez limpios y purificados con perlas AmpureXP.

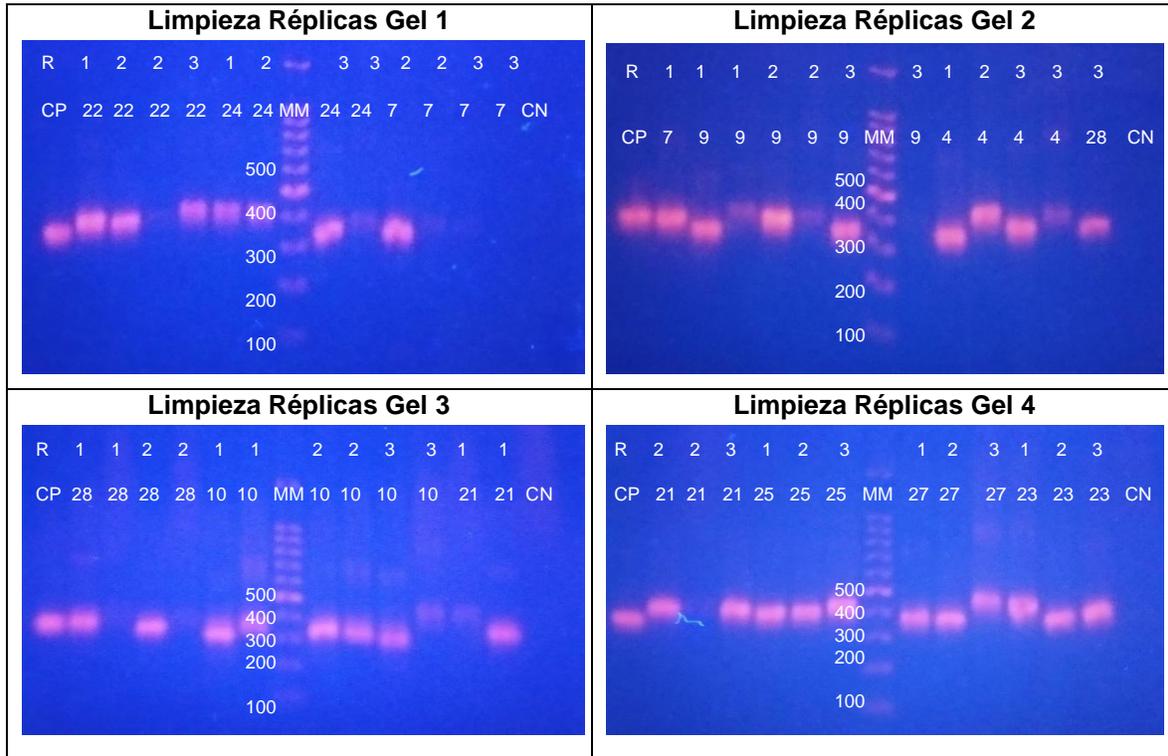


Figura 9. Limpieza y purificación con perlas AmpureXP (concentración 0.8X y en algunas muestras también a 0.5X), de las tres réplicas (1, 2 y 3) de los productos de la segunda amplificación por PCR (amplicones de ADN) verificados por electroforesis en geles de agarosa al 2%. El número que se presenta en el primer renglón (después de la R) representa el número de réplica. Los números en el siguiente renglón corresponden al número de muestra (comunidad de huevos y larvas de peces). CP: control positivo; CN: control negativo; MM: marcador de peso molecular de 100pb; R: réplica.

La Fig. 10 presenta los resultados de la amplificación por PCR de cada una de las 20 especies por separado, que se escogieron para conformar la comunidad artificial (mock), esto con el fin de verificar que todas estaban amplificando bien con el par de cebadores MiFish (Miya *et al.*, 2015) y las condiciones de reacción estandarizadas. Se presentan también los productos de la segunda amplificación por PCR del mock de las 20 especies (mezcla) verificados por electroforesis en gel de agarosa. El mock se

corrió dos veces (por triplicado) considerandolo como dos controles positivos (CP1 y CP2) con etiquetas distintas cada uno.

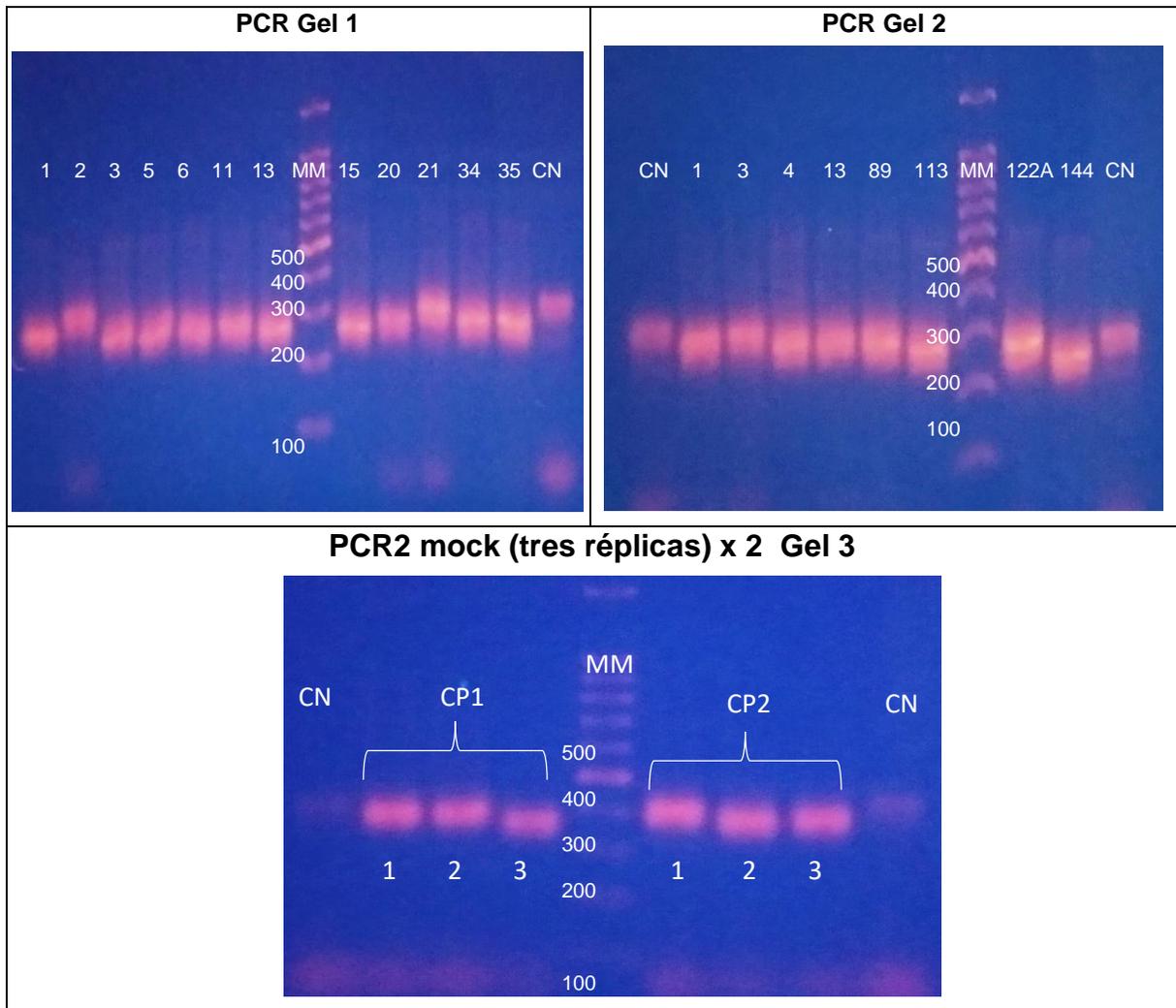


Figura 10. Productos de la amplificación por PCR de las 20 especies que conforman el mock, verificados por electroforesis en geles de agarosa al 2%. El número que se presenta corresponde a cada una de las especies de peces de acuerdo a su procedencia. Gel 1: doce especies donadas a la Colección Ictiológica de CICIMAR-IPN; Gel 2: cuatro especies del Instituto de Biología de la UNAM y cuatro especies de la Colección personal del Dr. Adrián González Acosta. Gel 3: Productos de la segunda amplificación por PCR (indexado) del mock. Se presenta por triplicado (1, 2 y 3), dos veces, como control positivo CP1 y CP2. CN: control negativo; MM: marcador de peso molecular de 100pb.

Se obtuvieron por metabarcoding con el marcador 12S ARN ribosomal, los resultados de 26 muestras del ictioplancton de las estaciones de muestreo al Sur del Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano, así como dos controles positivos, comunidad artificial (mock) y un control negativo. En total se prepararon 29 librerías.

Se recibieron los archivos con las secuencias demultiplexadas (es decir sin las etiquetas - index) por parte del proveedor. Los resultados de la secuenciación de extremos emparejados (paired-end) HiSeq (2x150pb) se recibieron como archivos, datos crudos, siendo estos los datos totales de salida del secuenciador sin procesar (167.8 G), con un total de 816 359 828 lecturas, contenidas en las 29 carpetas correspondientes a las librerías (26 estaciones, 2 controles positivos y un control negativo). Cada carpeta contenía los datos de las dos secuencias, es decir, Forward_1.fq y Reverse_2.fq, (fq: formato fastq).

El reporte de calidad de los resultados del secuenciador por parte de Novogene, indico un promedio del 87% para un valor de Q30, es decir, puntaje de calidad Phred (Q-scores) de 30 considera como máximo una base equivocada (llamada incorrectamente) de cada 1000 bases leídas durante el proceso de secuenciación en plataforma Illumina (Anexo E), lo que indica una precisión del llamado de base de 99.9%; de acuerdo a esto, fue una ejecución altamente exitosa así como de buena calidad en las secuencias obtenidas (considerando que los puntajes de calidad que especifica Illumina son más del 80%).

8.2.2. Análisis de secuencias

Después del análisis bioinformático (procedimientos de filtrado con OBITools) siguiendo el pipeline correspondiente (Anexo F), el conjunto de datos finales para el marcador 12S, comprendió un total de 260,105,766 lecturas para las 26 estaciones, representando este valor un 33.7% del total de datos crudos (Raw Data).

Derivándose del filtrado total de OBITools, en 225,524,297 lecturas no asignadas (86.7%) y 34,581,469 lecturas asignadas (13.3%) a una similitud pareada de $\geq 99\%$ (Tabla 5).

Una vez corregidos los datos, correspondiente a las lecturas asignadas, con el control negativo, comprendió un total de 33,716,696 lecturas, con un promedio de 1,296,796 lecturas por muestra (con un rango de 3,687 a 8,211,991).

En el caso de los controles positivos (mock: CP1 y CP2), presentaron 2,107,439 lecturas para el CP1 y 2,320,278 lecturas para el CP2 (después de la corrección con el control negativo). Por su parte el control negativo presentó 1,155,825 lecturas totales (Tabla 6; Fig. 9).

Tabla 5. Resumen de resultados totales, porcentaje de datos crudos y después de OBITools a $\geq 99\%$ de similitud.

	LECTURAS	%Datos crudos	% OBITools
Datos crudos	771,752, 434	100	-
OBITools	260,105,766	33.7	100
NA	225,524,297	29.2	86.7
A	34,581,469	4.5	13.3
A-CN	33,716,696	4.4	13.0

En la Tabla 6 se presentan los datos de las lecturas tal como se recibieron por parte del proveedor en datos crudos (Raw Data), después de la secuenciación masiva, Illumina HiSeq; así como los datos después de OBITools (Boyer *et al.*, 2016), para cada una de las 26 estaciones de muestreo para inferir la riqueza de la comunidad de huevos y larvas de peces, así como los dos controles positivos y el control negativo.

Tabla 6. Número de lecturas obtenidas después de OBITools, de los resultados de la secuenciación masiva (Illumina HiSeq). Estación: Estación muestreada; RawData: Datos crudos demultiplexados obtenidos directamente del proveedor Illumina; NA: Lecturas no asignadas; A: Lecturas asignadas; 100%: Total de la suma de lecturas NA y A; %NA: Porcentaje que corresponde a lecturas no asignadas; %A: porcentaje que corresponde a lecturas asignadas; A-CN: Lecturas asignadas corregidas con el control negativo; CP1 y CP2: Control positivo; CN: Control negativo.

Estación	Raw Data	LECTURAS 100%	LECTURAS NA	LECTURAS A	% NA	% A	A-CN
A01	22,615,492	7,480,913	6,256,073	1,224,840	83.63	16.37	1,145,001
A03	34,230,726	10,692,887	10,058,345	634,542	94.07	5.934	618,095
A05	34,695,904	11,280,787	6,736,368	4,544,419	59.72	40.28	4,453,091
A07	31,195,472	9,447,702	9,307,985	139,717	98.52	1.479	116,269
A09	23,463,102	7,878,446	7,857,931	20,515	99.74	0.26	3,687
A11	32,367,926	10,418,126	10,372,005	46,121	99.56	0.443	18,029
A13	29,400,214	10,207,834	10,107,800	100,034	99.02	0.98	22,823
A15	31,107,410	10,790,927	10,727,102	63,825	99.41	0.591	29,942
A17	26,004,998	9,070,506	8,981,270	89,236	99.02	0.984	44,535
A18	31,525,328	11,154,290	10,922,068	232,222	97.92	2.082	214,733
A19	31,729,368	11,293,487	11,155,107	138,380	98.77	1.225	117,421
B01	33,701,176	11,778,554	10,778,333	1,000,221	91.51	8.492	969,375
B02	33,970,962	11,744,807	11,691,729	53,078	99.55	0.452	20,021
B03	17,934,448	6,334,156	6,017,583	316,573	95	4.998	299,861
B04	35,638,944	12,732,760	12,149,024	583,736	95.42	4.585	547,420
B05	28,958,750	10,184,936	6,473,977	3,710,959	63.56	36.44	3,673,428
C01	27,538,250	9,660,893	6,916,375	2,744,518	71.59	28.41	2,713,861
D01	45,311,250	16,357,973	8,101,147	8,256,826	49.52	50.48	8,211,991
E03	29,587,260	8,993,986	8,908,474	85,512	99.05	0.951	44,089
E05	30,449,472	8,823,122	8,738,272	84,850	99.04	0.962	67,593
E07	28,115,478	9,446,474	9,404,776	41,698	99.56	0.441	24,445
D07	30,607,724	9,495,255	9,238,317	256,938	97.29	2.706	229,145
D05	24,183,914	8,368,959	8,265,041	103,918	98.76	1.242	76,006
D03	25,490,184	8,778,118	2,245,379	6,532,739	25.58	74.42	6,511,723
C05	28,882,248	9,679,141	6,169,106	3,510,035	63.74	36.26	3,489,003
C07	23,046,434	8,010,727	7,944,710	66,017	99.18	0.824	55,109
SUMA	771,752,434	260,105,766	225,524,297	34,581,469	86.7	13.3	33,716,696
CONTROL							
CP1	20,044,906	7,023,614	4,844,296	2,179,318	68.97	31.03	2,107,439
CP2	21,116,884	7,770,540	5,378,424	2,392,116	69.22	30.78	2,320,278
CN	3,445,604	1,155,825	1,056,457	99,368	91.4	8.597	

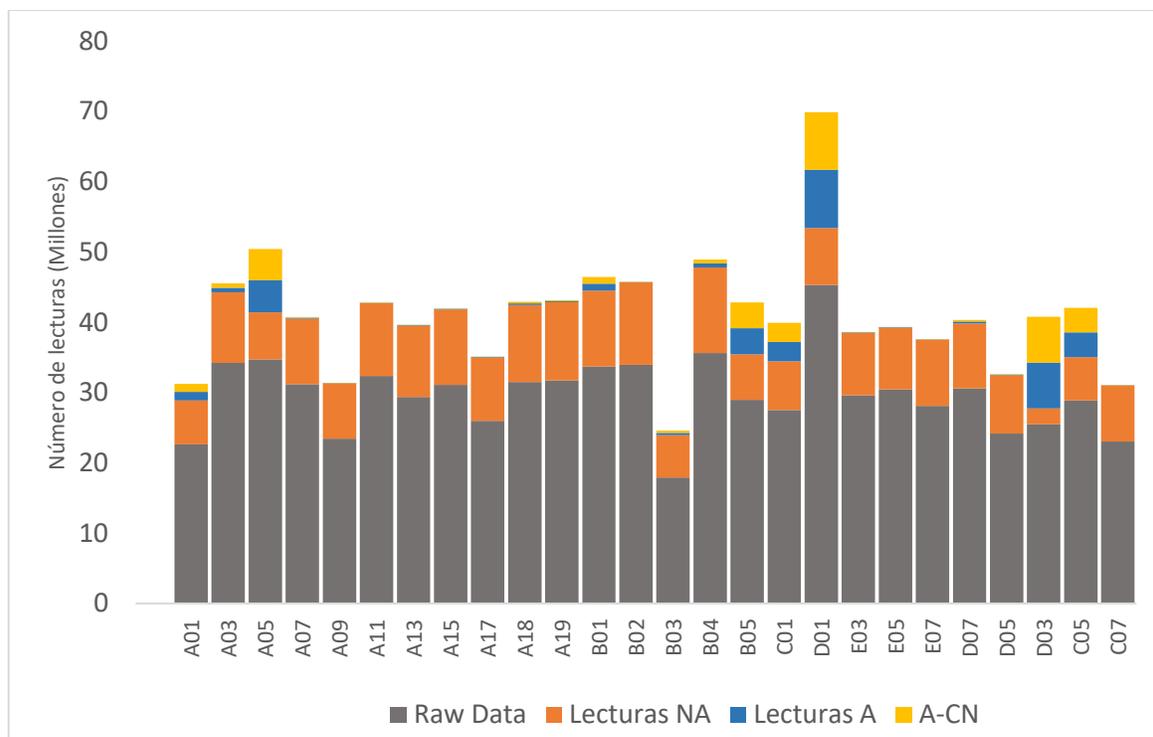


Figura 11. Representación gráfica de Raw Data: total de lecturas absolutas, obtenidas directamente de la secuenciación masiva paired-end (2X150pb) HiSeq; NA: total de las lecturas no asignadas a $\geq 99\%$ de similitud; A: total de las lecturas asignadas a $\geq 99\%$ de similitud; A-CN: lecturas asignadas menos el control negativo.

Existe diferencia entre las estaciones de muestreo en cuanto a los resultados en las abundancias de lecturas absolutas. La estación D01 sobresalió por que presento el mayor número de datos crudos (Raw Data) de todas las estaciones, 45,311,250 lecturas como datos crudos (Raw Data), así mismo se distingue por la cantidad de lecturas A (después del proceso de filtrado con OBITool's), 8,256,826 (50.5%) que fue mayor que en todas las demás estaciones conservándose de manera proporcional con las lecturas NA (49.5%) dentro de la misma estación (Fig. 11, Tabla 6).

Por el contrario, la estación B03 fue la que presento el menor número de lecturas crudas 17,934,448 (Raw Data) de las 26 estaciones. Así mismo, la cantidad de lecturas A se presentó en $< 5.0\%$, pero en este caso si comparte esta característica con otras estaciones, que de igual manera presentaron una mínima asignación aunque fuera mayor su número de lecturas totales; en el caso de la estación D03 con 25,490,184 lecturas como datos crudos (Raw Data), se distinguió por tener una mayor cantidad de

lecturas A (74.4%) en comparación con las NA (25.6%) dentro de la misma estación, a pesar de que no se distinguió por ser la que presentara mayor cantidad de lecturas crudas (Raw Data) entre las 26 estaciones.

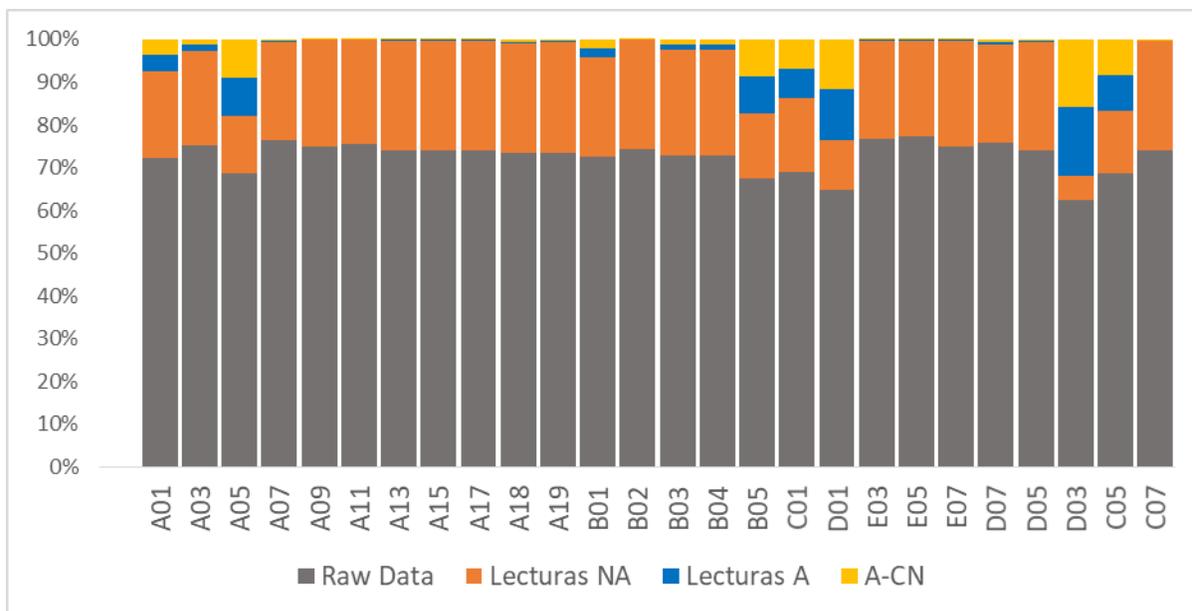


Figura 12. Porcentaje de lecturas: Raw Data (datos crudos), lecturas no asignadas (NA), lecturas asignadas (A) y lecturas asignadas menos el control negativo (A-CN) de las 26 muestras de zooplancton analizadas.

El porcentaje de las lecturas procesadas desde que se recibieron los datos del secuenciado masivo (Raw Data), así como los porcentajes de los datos procesados con las herramientas bioinformáticas hasta su asignación taxonómica a $\geq 99\%$ de identidad pareada son mostradas en la Fig. 12.

Los Raw Data sobresalen en el porcentaje siendo cerca del 70% de los resultados, lo que coincide con el 33.7% de rendimiento en los resultados de los datos procesados por OBITools. Para el caso de las lecturas NA son aproximadamente del 30%, para la mayoría de las estaciones; siendo las lecturas A y A-CN, las que logran observarse en menor porcentaje solo en algunas estaciones, como A03, B01, B03 y B04; por otro lado se aprecia en una medida intermedia este porcentaje de asignación taxonómica en las estaciones A01, B05, C01 y C05; distinguiéndose en mayor medida las estaciones A05, D01 y D03, en cuanto a asignación taxonómica. Por el contrario las

estaciones de la A07 a la A19 y la B02, así como de la E03 a la D05 y la C07, se observa una disminución del porcentaje de asignación taxonómica; después de los filtrados con herramientas bioinformáticas, la mayoría de las lecturas resultaron no asignadas en estas últimas 15 estaciones.

Por otro lado el número de secuencias de 12S (posibles MOTUs) totales detectados en las 26 muestras por agrupación bayesiana fue de 74,738, que incluye el total de los MOTUs asignados y no asignados para el marcador 12S. De los cuales 74,236 (99.33%) no se asignó a algún taxa previamente secuenciado, es decir, MOTUs no asignados (NA) y 502 (0.67%) son los MOTUs asignados (A), a nivel familia o inferior de acuerdo a una asignación taxonómica $\geq 99\%$ de identidad pareada. Una vez corregidos los MOTUs A, es decir menos el control negativo (A MENOS CN), resulto un total de 251 MOTUs (0.34%) totales en las 26 estaciones (Tabla 7).

Tabla 7. Número de MOTUs de acuerdo a una asignación taxonómica $\geq 99\%$ de identidad pareada. Estación: Estación muestreada (26 estaciones de muestreo); MOTU NA: MOTUs no asignados; MOTU A: MOTUs asignados; MOTU TOTAL: sumatoria MOTU NA Y MOTU A; MOTU A MENOS CN: MOTUs asignados menos el control negativo.

Estación	MOTU NA	MOTU A	MOTU TOTAL	MOTU A MENOS CN
A01	3886	17	3903	15
A03	3226	16	3242	8
A05	4221	19	4240	17
A07	2525	18	2543	11
A09	1776	15	1791	10
A11	2455	16	2471	8
A13	2936	20	2956	17
A15	2034	16	2050	7
A17	3436	20	3456	17
A18	3828	15	3843	7
A19	1344	17	1361	8
B01	1853	16	1869	7
B02	2332	17	2349	8
B03	1674	16	1690	8
B04	2341	15	2356	8
B05	1917	15	1932	8
C01	2215	16	2231	7
D01	3098	17	3115	11
E03	2734	16	2750	8
E05	2358	17	2375	8
E07	1942	16	1958	7
D07	2026	14	2040	8
D05	2577	18	2595	11
D03	1914	14	1928	9
C05	2511	16	2527	9
C07	2803	17	2820	9
TOTAL	74236	502	74738	251

8.2.3. Asignación taxonómica

Después de la asignación taxonómica (con criterio de $\geq 99\%$ de similitud), la riqueza de especies encontrada en las 26 estaciones de muestreo incluyó 27 MOTUs asignados a los diferentes niveles taxonómicos para peces óseos, de acuerdo a Nelson *et al.* (2016); 13 Ordenes, 18 Familias, 20 Géneros y 17 Especies (Tabla 8).

Tabla 8. Lista de 27 MOTUs de peces adultos asignados, correspondientes a 13 Ordenes, 18 Familias, 20 Géneros y 17 Especies, de acuerdo a la clasificación de Nelson *et al.* (2016); con su respectivo número de identificación taxonómica en NCBI (National Center for Biotechnology Information)

#	13 ORDENES	18 FAMILIAS	20 GÉNEROS /17 ESPECIES	NCBI txid
1	ANGUILLIFORMES	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i> (Jordan & Gilbert 1882)	319751
2	STOMIIFORMES	STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i> Garman 1899	320411
3	MYCTOPHIFORMES	MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i> (Gilbert 1890)	242287
4	GOBIIFORMES	POMACENTRIDAE	<i>Stegastes rectifraenum</i> (Gill, 1862)	1268096
5	MUGILIFORMES	MUGILIDAE	<i>Mugil curema</i> Valenciennes, 1836	48194
6	BELONIFORMES	EXOCOETIDAE	<i>Exocoetus volitans</i> Linnaeus, 1758	143332
7	BELONIFORMES	EXOCOETIDAE		76072
8	CARANGIFORMES	NEMATISTIIDAE	<i>Nematistius pectoralis</i> Gill 1862	173244
9	CARANGIFORMES	ECHENEIDAE	<i>Phtheichthys lineatus</i> (Menzies, 1791)	641294
10	CARANGIFORMES	CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i> (Bloch 1793)	146146
11	CARANGIFORMES	CARANGIDAE	<i>Seriola rivoliana</i> Valenciennes, 1833	173321
12	ISTIOPHORIFORMES	XIPHIIDAE	<i>Xiphias gladius</i> Linnaeus, 1758	8245
13	SYNGNATHIFORMES	FISTULARIIDAE	<i>Fistularia commersonii</i> Rüppell 1838	215343
14	SCOMBRIFORMES	GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i> Cuvier 1829	13543
15	SCOMBRIFORMES	SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i> (Risso, 1810)	217026
16	SCOMBRIFORMES	SCOMBRIDAE	<i>Auxis</i> spp.	13352
17	SCOMBRIFORMES	SCOMBRIDAE	<i>Thunnus</i> spp.	8234
18	SCOMBRIFORMES	SCOMBRIDAE	<i>Scomberomorus sierra</i>	99346
19	SCOMBRIFORMES	NOMEIDAE	<i>Cubiceps</i> sp.	316138
20	PERCIFORMES	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus guttatus</i> (Steindachner 1869)	455479
21	PERCIFORMES	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp1	40493
22	PERCIFORMES	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp2	40493
23	PERCIFORMES	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp3	40493
24	SCORPAENIFORMES	SCORPAENIDAE	<i>Sebastes</i> sp1	34820
25	SCORPAENIFORMES	SCORPAENIDAE	<i>Sebastes</i> sp2	34820
26	TETRAODONTIFORMES	BALISTIDAE		31024
27	TETRAODONTIFORMES	TETRAODONTIDAE	<i>Sphoeroides annulatus</i> (Jenyns 1842)	168377

Los resultados de la Tabla 8, corresponden a peces óseos adultos presentes en el área del Sur del Golfo de California y Región adyacente al Pacífico Mexicano según FishBase: <https://www.fishbase.se/search.php>. De igual manera también fueron comparados en cuanto a presencia de especies en identificación de larvas en el área de estudio en las listas de riqueza de especies presentadas según Avendaño-Ibarra *et al.* (2014) cuya riqueza fue inferida a partir de análisis morfológicos tradicionales; así como con las listas de MOTUs presentadas según Ahern *et al.* (2018), obtenidas por análisis molecular bajo el enfoque de barcoding de ADN; estas dos listas para el Golfo de California hasta Cabo Corrientes, Jalisco y sureste del Golfo de California respectivamente.

8.2.3.1 Comunidades de MOTUs asignadas por metabarcoding a $\geq 99\%$ de similitud

Las comunidades del ictioplancton se presentaron en cada una de las estaciones de muestreo como se indica en la Tabla 9, de acuerdo a su asignación taxonómica al $\geq 99\%$ de similitud con secuencias de GenBank.

Tabla 9. Comunidad de MOTUs de larvas y huevos de peces, asignados por metabarcoding a $\geq 99\%$ de similitud con secuencias de GenBank, al menor nivel taxonómico posible por estación de muestreo. Sec.: Secuencial de muestreo (Lance); Estación: Número y nombre de cada una de las estaciones de muestreo.

Estación	Sec	FAMILIA	MOTUs
1 A01	1	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		EXOEOETIDAE	<i>Exocoetus volitans</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		FISTULARIIDAE	<i>Fistularia commersonii</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Scomberomorus sierra</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus guttatus</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp3</i>
		SCORPAENIDAE	<i>Sebastes sp1</i>
		BALISTIDAE	-
TETRAODONTIDAE	<i>Sphoeroides annulatus</i>		

2 A03	3	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp1</i>
3 A05	5	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		MUGILIDAE	<i>Mugil curema</i>
		EXOCOETIDAE	<i>Exocoetus volitans</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		FISTULARIIDAE	<i>Fistularia commersonii</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Scomberomorus sierra</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp1</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp3</i>
		SCORPAENIDAE	<i>Sebastes sp1</i>
		SCORPAENIDAE	<i>Sebastes sp2</i>
BALISTIDAE	-		
		TETRAODONTIDAE	<i>Sphoeroides annulatus</i>
4 A07	7	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		POMACENTRIDAE	<i>Stegastes rectifraenum</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis spp</i>
		NOMEIDAE	<i>Cubiceps sp</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus guttatus</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp1</i>
5 A09	9	STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		EXOCOETIDAE	<i>Exocoetus volitans</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		FISTULARIIDAE	<i>Fistularia commersonii</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis spp</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp3</i>
		SCORPAENIDAE	<i>Sebastes sp1</i>

		BALISTIDAE	-
		TETRAODONTIDAE	<i>Sphoeroides annulatus</i>
6	11	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
A11		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp1</i>
7	13	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
A13		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		POMACENTRIDAE	<i>Stegastes rectifraenum</i>
		EXOCOETIDAE	<i>Exocoetus volitans</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		FISTULARIIDAE	<i>Fistularia commersonii</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis spp</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Scomberomorus sierra</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp1</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp2</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp3</i>
		SCORPAENIDAE	<i>Sebastes sp1</i>
		BALISTIDAE	-
		TETRAODONTIDAE	<i>Sphoeroides annulatus</i>
8	15	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
A15		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
9	17	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
A17		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		EXOCOETIDAE	<i>Exocoetus volitans</i>
		NEMASTISTIIDAE	<i>Nematistius pectoralis</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		FISTULARIIDAE	<i>Fistularia commersonii</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis spp</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Scomberomorus sierra</i>

		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp1
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp3
		SCORPAENIDAE	<i>Sebastes</i> sp1
		SCORPAENIDAE	<i>Sebastes</i> sp2
		BALISTIDAE	-
		TETRAODONTIDAE	<i>Sphoeroides annulatus</i>
10	18	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
A18		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
11	19	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
A19		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis</i> spp
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp1
12	20		
A20		-	-
13	21	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
B01		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
14	22	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
B02		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		CARANGIDAE	<i>Seriola rivoliana</i>
		XIPHIIDAE	<i>Xiphias gladius</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
15	23	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
B03		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		EXOCOETIDAE	<i>Exocoetus volitans</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>

		FISTULARIIDAE	<i>Fistularia commersonii</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis</i> spp
		SCOMBRIDAE	<i>Scomberomorus sierra</i>
		SCORPAENIDAE	<i>Sebastes</i> sp1
		TETRAODONTIDAE	<i>Sphoeroides annulatus</i>
16	24	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
B04		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis</i> spp
		NOMEIDAE	<i>Cubiceps</i> sp
17	25	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
B05		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
		NOMEIDAE	<i>Cubiceps</i> sp
18	26	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
C01		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
19	27	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
D01		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Thunnus</i> spp
		NOMEIDAE	<i>Cubiceps</i> sp
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus guttatus</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp1
20	30	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
E03		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>

		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp1</i>
21	32	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
E05		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		EXOCOETIDAE	-
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis spp</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp1</i>
22	34	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
E07		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis spp</i>
23	37	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
D07		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		EXOCOETIDAE	-
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
		NOMEIDAE	<i>Cubiceps sp</i>
24	39	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
D05		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		POMACENTRIDAE	<i>Stegastes rectifraenum</i>
		EXOCOETIDAE	-
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>
		NOMEIDAE	<i>Cubiceps sp</i>
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp1</i>
25	41	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
D03		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis spp</i>

		NOMEIDAE	<i>Cubiceps</i> sp
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus guttatus</i>
26	44		
C03		-	-
27	46	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
C05		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis</i> spp
		NOMEIDAE	<i>Cubiceps</i> sp
		LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp1
28	48	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
C07		STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>
		MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
		EXOCOETIDAE	<i>Exocoetus volitans</i>
		ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>
		CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>
		XIPHIIDAE	<i>Xiphias gladius</i>
		GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
		SCOMBRIDAE	<i>Auxis</i> spp

De acuerdo a los datos de hábitats de adultos registrados en FishBase, el 40.7% del total de MOTUs asignados (Tabla 9) son asociados a arrecifes rocosos, 25.9% son epipelágicos oceánicos, 14.8% batipelágicos, 7.4% demersales, 7.4% pelágico nerítico y 3.7% mesopelágico (Fig. 13).

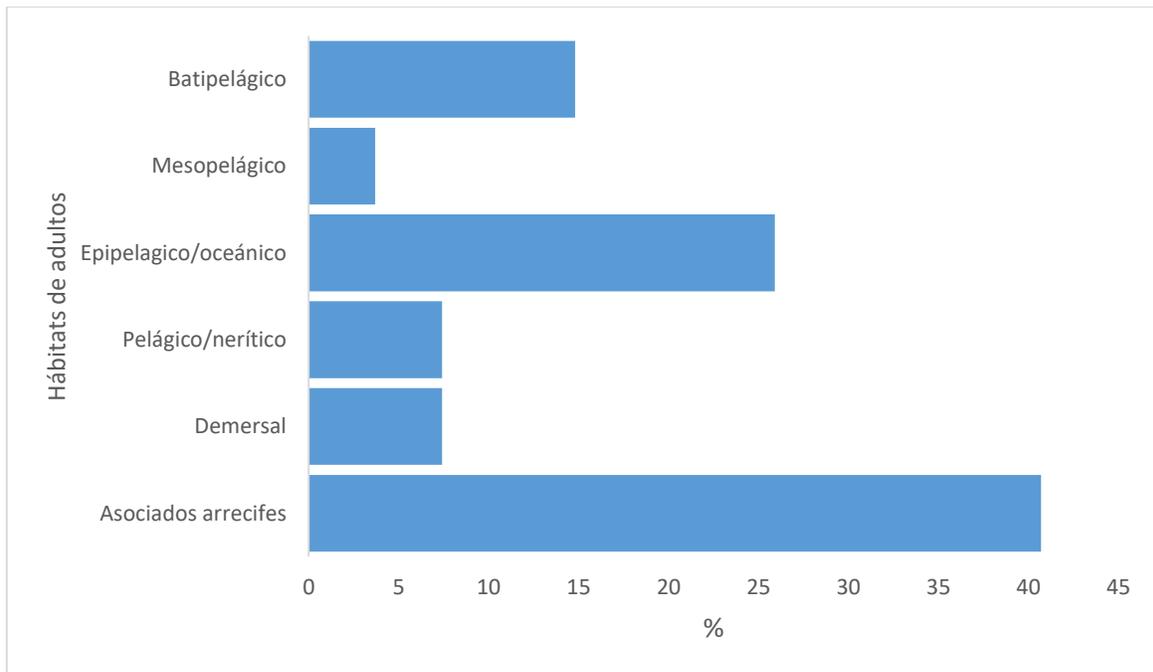


Figura 13. Porcentaje de MOTUs totales asignados para huevos y larvas de peces de las 26 muestras de zooplancton de acuerdo a su distribución de hábitat de peces adultos (FishBase).

Tabla 10. Lista de 27 MOTUs asignados (correspondientes a 13 Ordenes, 18 Familias, 20 Géneros y 17 Especies), con la referencia de hábitat y afinidad de peces adultos de acuerdo a FishBase.

#	FAMILIA	MOTUS	FISHBASE	
			HÁBITAT	AFINIDAD
1	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>	Demersal	tropical/subtropical
2	STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>	Batipelágico	tropical/subtropical
3	MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>	Mesopelágico	subtropical
4	POMACENTRIDAE	<i>Stegastes rectifraenum</i>	Asociados arrecifes	subtropical
5	MUGILIDAE	<i>Mugil curema</i>	Asociados arrecifes	subtropical
6	EXOCOETIDAE	<i>Exocoetus volitans</i>	Epipelagico/oceánico	
7	EXOCOETIDAE		Epipelagico/oceánico	tropical/subtropical
8	NEMATISTIIDAE	<i>Nematistius pectoralis</i>	Demersal	tropical/subtropical
9	ECHENEIDAE	<i>Phtheirichthys lineatus</i>	Epipelagico/oceánico	subtropical
10	CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>	Asociados arrecifes	tropical/subtropical
11	CARANGIDAE	<i>Seriola rivoliana</i>	Asociado arrecife	subtropical
12	XIPHIIDAE	<i>Xiphias gladius</i>	Epipelagico/oceánico	tropical/subtropical
13	FISTULARIIDAE	<i>Fistularia commersonii</i>	Asociados arrecifes	tropical
14	GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>	Epipelagico/oceánico	tropical/subtropical
15	SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>	Pelágico/nerítico	tropical
16	SCOMBRIDAE	<i>Auxis</i> spp	Pelágico/nerítico	
17	SCOMBRIDAE	<i>Thunnus</i> spp	Epipelagico/oceánico	
18	SCOMBRIDAE	<i>Scomberomorus sierra</i>	Epipelagico/oceánico	
19	NOMEIDAE	<i>Cubiceps</i> sp.	Batipelágico	tropical
20	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus guttatus</i>	Asociados arrecifes	tropical
21	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp1	Asociados arrecifes	tropical
22	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp2	Asociados arrecifes	tropical
23	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp3	Asociados arrecifes	tropical
24	SCORPAENIDAE	<i>Sebastes</i> sp1	Batipelágico/batideme	templado/subártico
25	SCORPAENIDAE	<i>Sebastes</i> sp2	Batipelágico/batideme	templado/subártico
26	BALISTIDAE		Asociados arrecifes	
27	TETRAODONTIDAE	<i>Sphoeroides annulatus</i>	Asociados arrecifes	tropical/subtropical

La composición de especies de diferentes hábitats para los huevos y larvas recolectadas en cada estación de muestreo es mostrada en la Fig. 14.

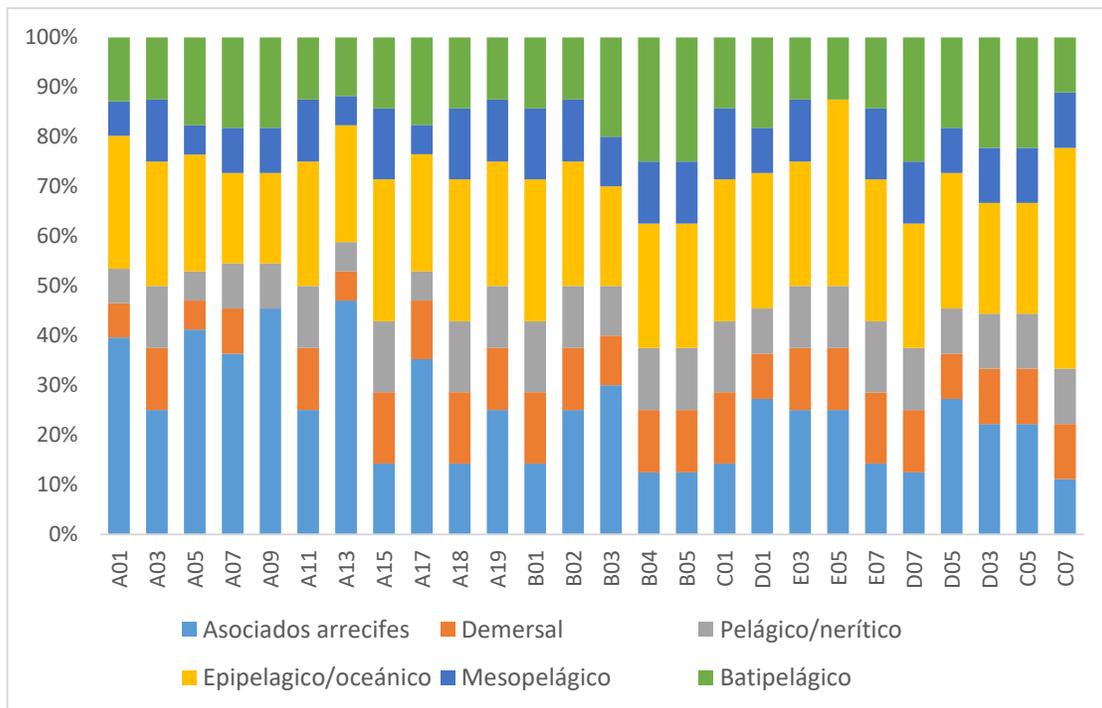


Figura 14. Porcentaje de MOTUs totales asignados, de acuerdo a su composición de especies de diferentes hábitats de adultos (FishBase), por cada una de las 26 estaciones de muestreo.

Se aprecia una distribución relativamente uniforme entre las especies de distintos hábitats en cada estación de muestreo. Sin embargo también se aprecia la ausencia de especies demersales, para la estación A09, así como una menor presencia de pelágicas neríticas como demersales para las estaciones A05 y A13, en comparación con todas las demás estaciones (Fig. 14) Observándose a su vez disminuidas las asociadas a arrecifes en las estaciones A15, A18, B01, B04, B05, C01, E07, D07 y C07.

La mayoría de los MOTUs presenta afinidad tropical y subtropical (FishBase); siendo solamente el caso de *Sebastes* sp1 y *Sebastes* sp2 de afinidad templado/subártico (Tabla 10).

De acuerdo al número de lecturas totales (transformadas con Logaritmo base 10), el MOTU que correspondió a *Cubiceps* sp es el que presentó el mayor número de lecturas en todas las estaciones de muestreo. Siendo *Nematistius pectoralis* el que se presentó con el menor número de las lecturas (Fig. 15).

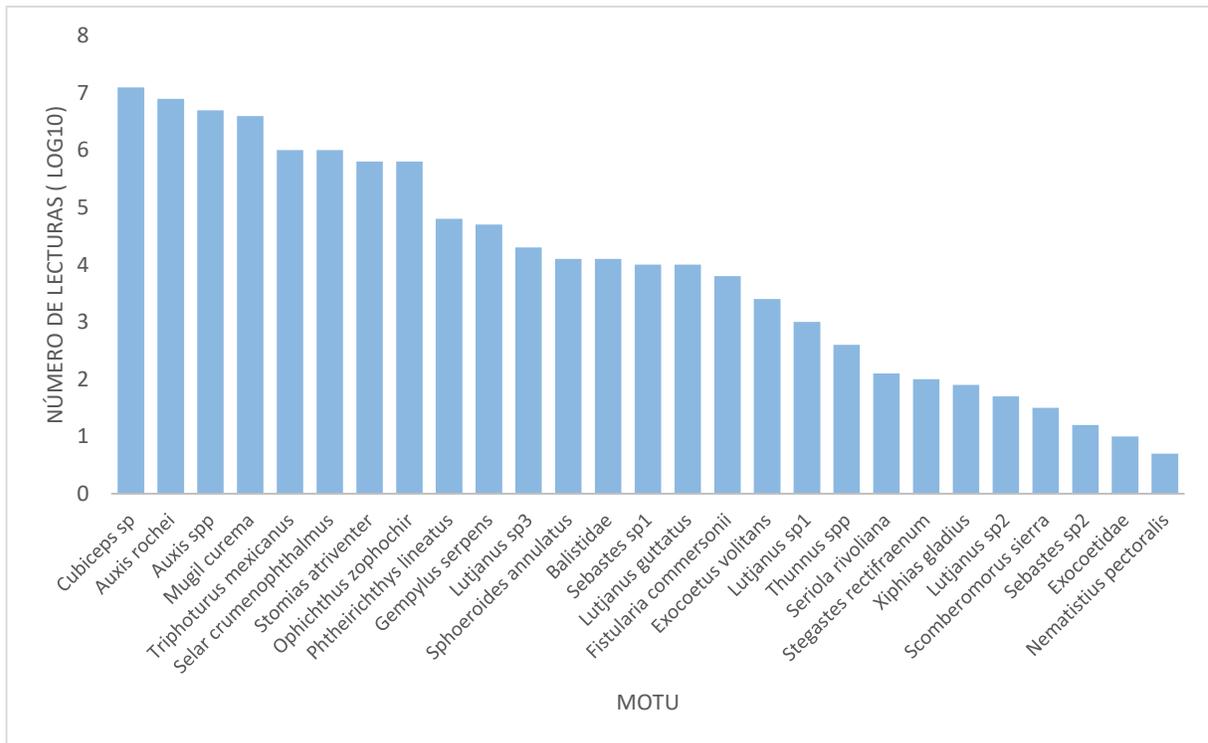


Figura 15. Número de lecturas totales (transformación con Log10) en las 26 estaciones de muestreo, correspondientes a los 27 MOTUs asignados (Unidades Taxonómicas Operacionales Moleculares).

Por otro lado los MOTUs correspondientes a *Selar crumenophthalmus* y *Stomias atriventer*, se presentaron consistentemente en las 26 estaciones (Fig.16); teniendo a su vez un número de lecturas correspondientes a los valores de 6 y 5.8 (que corresponden al Log base 10) respectivamente, situándose al mismo tiempo dentro de los MOTUs que presentaron el mayor número de lecturas totales (Fig. 15).

Para el caso de los MOTUs, *Thunnus* spp., *Seriola rivoliana*, *Nematistius pectoralis*, *Mugil curema* y *Lutjanus* sp2, solo estuvieron presentes en una estación (Fig. 16). Siendo a su vez los que presentan abundancias de lecturas en Log base 10 de 2.6, 2.1, 0.7, 6.6 y 1.7, respectivamente (Fig. 15). Cabe destacar el caso de *M. curema*,

que se presentó en una única estación de muestreo, en la A05, pero con una alta abundancia de lecturas, que la sitúa entre las más abundantes (Fig. 15), pero no entre las más recurrentes como son *S. crumenophthalmus* y *S. atriventer* (Fig. 16).

Los MOTUs que se presentan en todas o en casi todas las estaciones, así como aquellos que solo están en una o dos estaciones de manera general se observan en la Fig. 16.

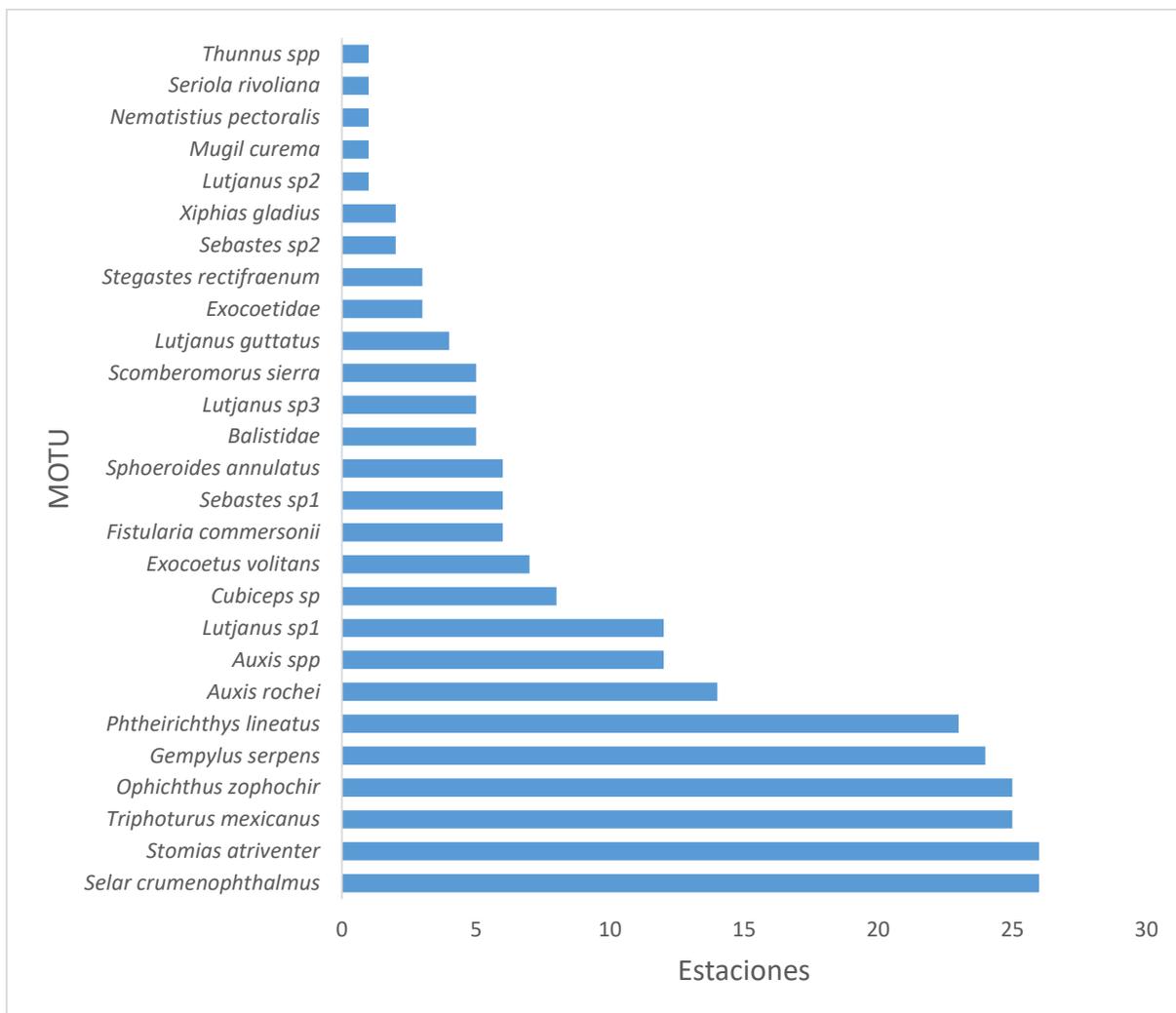


Figura 16. Presencia de los 27 MOTUs asignados de acuerdo a su grado de recurrencia en las 26 estaciones de muestreo.

8.2.3.2 Patrones de composición de las comunidades en las estaciones de muestreo según la asignación taxonómica de $\geq 99\%$.

Cada estación de muestreo representa una comunidad del ictioplacton (riqueza alfa). En la Fig. 17 se presenta la riqueza de MOTUs con su respectiva abundancia relativa de lecturas.

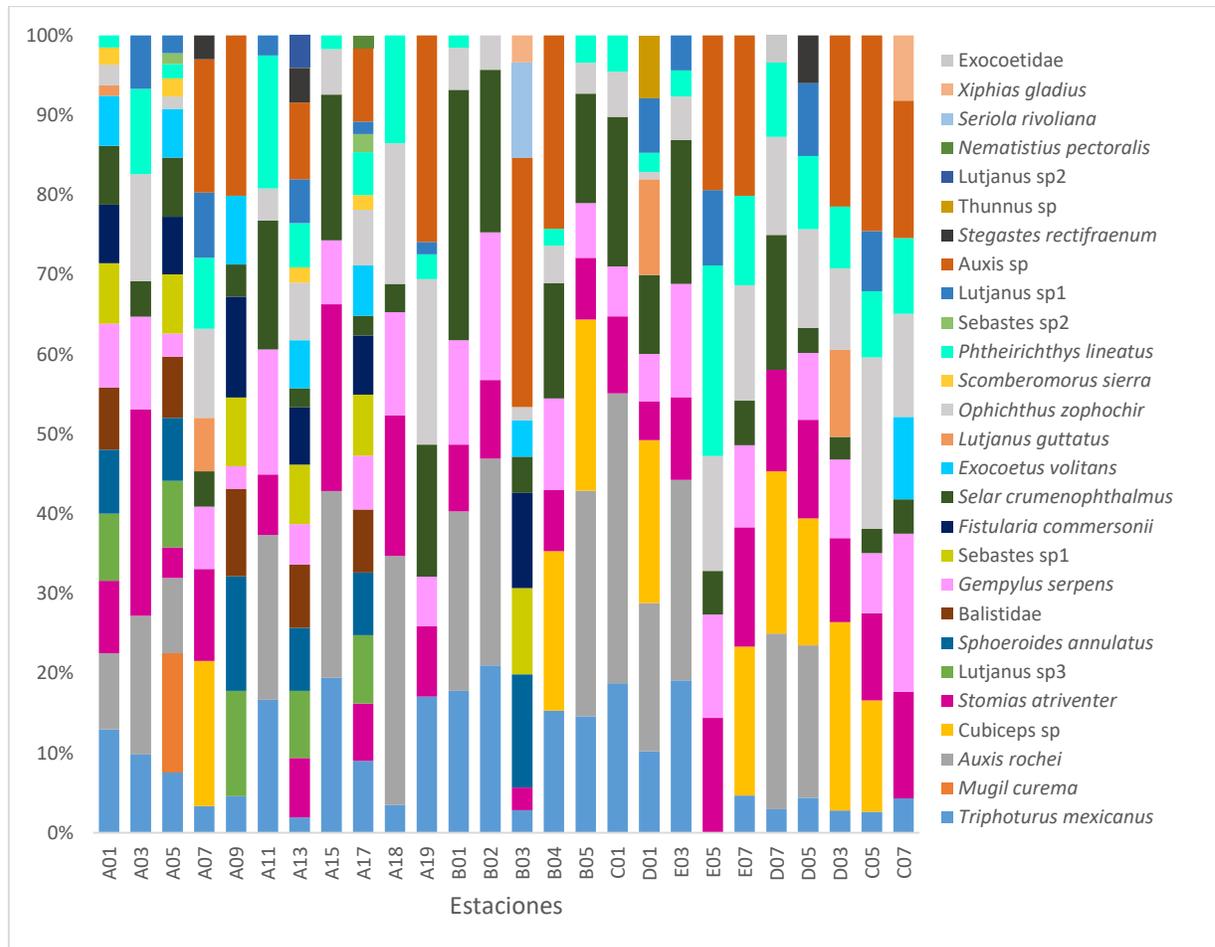


Figura 17. Abundancia relativa de lecturas y riqueza de MOTUs por estación de muestreo. Resultados obtenidos usando 12S ARNr en ictioplacton de 26 estaciones de muestreo al Sur del Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano.

8.2.4. Comparación descriptiva entre identificación morfológica e identificación molecular

De acuerdo a los resultados de la identificación morfológica con base a claves de identificación taxonómica, así como los resultados obtenidos después de la asignación taxonómica usando como marcador el fragmento de 12S ARN ribosomal, se compararon los resultados de ambas listas (Anexo H).

Al comparar de manera descriptiva, los resultados de los dos métodos empleados, morfológico y molecular, para la identificación de comunidades del ictioplancton se muestran solo algunas coincidencias (Anexo H, Fig. 18 d)). Recordando que el criterio de asignación taxonómica fue estricto ($\geq 99\%$), para el análisis molecular de huevos y larvas de peces y para el caso morfológico solo se comparan las larvas que fueron las que lograron identificarse al nivel más preciso posible.

Existen diferencias entre los distintos niveles taxonómicos así como coincidencias en los dos métodos de identificación; en el caso del nivel de especie resultaron solo ser dos las coincidencias (*O. zopochir* y *T. mexicanus*). Para el nivel género son cinco (*Ophichthus* sp., *Triphoturus* sp., *Mugil* sp., *Auxis* spp. y *Cubiceps* sp.). Para el nivel familia son ocho (Mugilidae, Myctophidae, Ophichthidae, Carangidae, Scombridae, Nomeidae, Scorpaenidae y Stomiidae) en las que coinciden ambos análisis y en el caso del nivel orden, fueron más similares compartiendo diez ordenes entre las dos (Anexo H).

El total de lo que se presento en el muestreo de las 28 estaciones las larvas las más representativas (62%) son mostradas en la Fig. 18a. La identificación morfológica en cuatro niveles taxonómicos solo de las larvas, presentando el mayor porcentaje de identificación a nivel género (35%) (Fig. 18b). La identificación por el método molecular y corresponde al total presentado en la Fig. 18a, es decir: a larvas, huevos, embriones, sin embrión y destruidos son mostradas en la Fig. 18c. En el método molecular también se destaca el mayor porcentaje de identificación al género (29%). En cuanto a los demás niveles taxonómicos se presentan en un porcentaje muy similar entre los dos métodos de identificación (Tabla 11). La mayor proporción de coincidencias entre los dos métodos es a niveles superiores (Orden y Familia) y va disminuyendo a niveles

más bajos (Género y Especie) (Fig. 18d). El porcentaje en el que coinciden los dos métodos de acuerdo a los diferentes niveles taxonómicos se presenta en la Tabla 11.

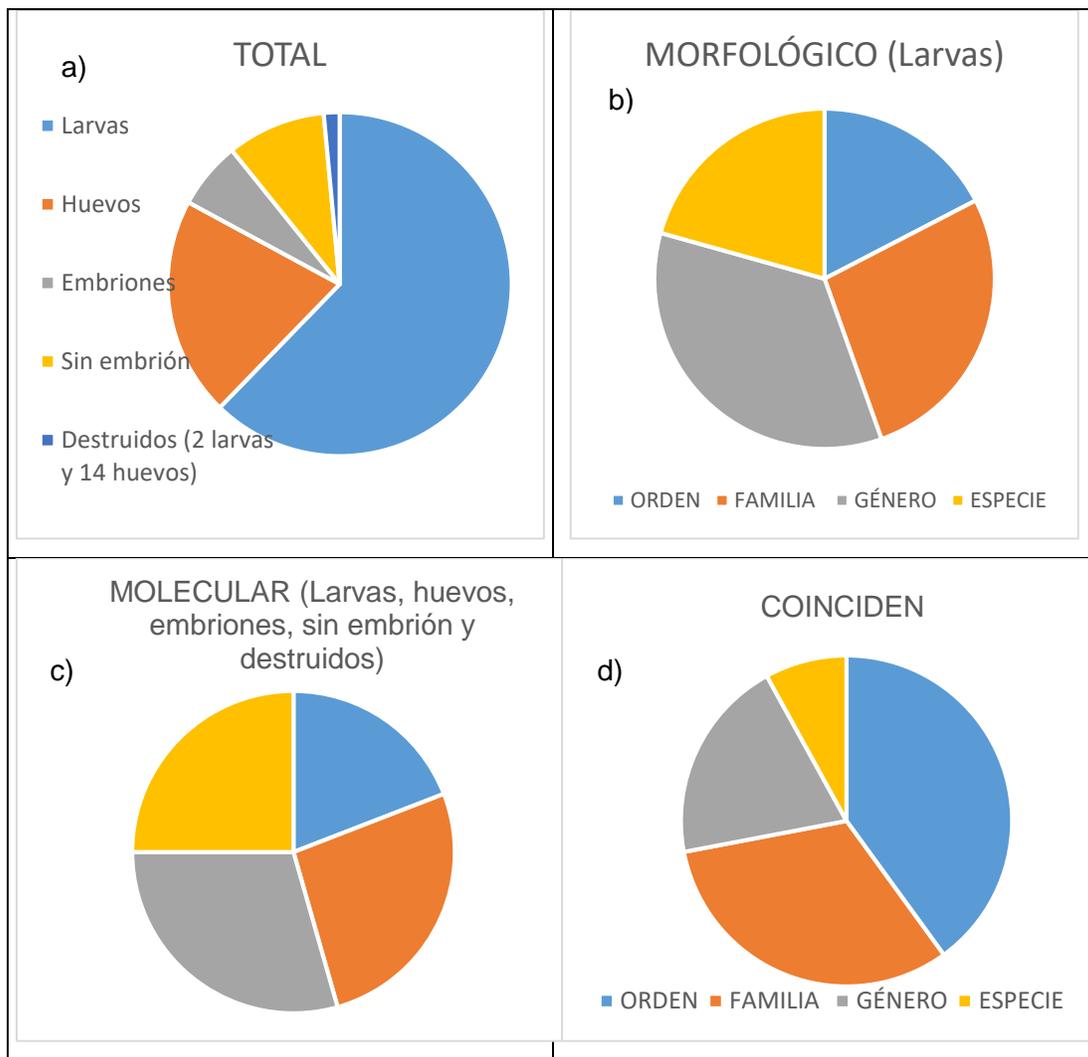


Figura 18. Frecuencia relativa que muestran: a) el total de todos los huevos y larvas recolectadas en las 28 estaciones de muestreo; b) identificación morfológica solo de larvas en Orden, Familia, Género y Especie; c) identificación molecular del total (inciso a) en los cuatro niveles taxonómicos; d) coincidencias en los distintos niveles taxonómicos de la identificación por método morfológico (larvas) y molecular (ictioplancton).

Tabla 11. Porcentajes de identificación en cuatro niveles taxonómicos de los métodos morfológico y molecular, y de sus coincidencias.

%	Morfológico	Molecular	Coinciden
Orden	17	19	40
Familia	27	26	32
Género	35	29	20
Especie	21	25	8

8.2.5. Control positivo mock

En el caso de la asignación taxonómica a $\geq 99\%$ que corresponde para los controles positivos CP1 y CP2 (mock), se encontraron 9 falsos negativos. Es decir el 45% del total de la base de referencia de las 20 especies que conforman el mock identificados morfológicamente. Por otro lado se presentaron 17 falsos positivos, con un número reducido de lecturas, que representaron el 57% del resultado total asignado al mock (MOTUs) obtenido por el método molecular con 12S.

Solo tres (*Mugil cephalus*, *M. curema* y *Sphoeroides annulatus*) de las 20 especies que conformaron el mock son las que presentan el registro de su genoma mitocondrial completo en la base de datos GenBank. Por el contrario son siete (*Ophioscion scierus*, *Oligoplites saurus*, *Pareques viola*, *Urobatis halleri*, *Syngnathus auliscus*, *Anchoa nasus* y *Prognichthys tringa*) de las 20, las que no tienen ningún registro en GenBank del genoma mitocondrial completo, así como del marcador 12S ARN ribosomal, por lo tanto no se asignaron.

De las 10 especies restantes, ocho (*Labrisomus xantii*, *Lutjanus viridis*, *Balistes polylepis*, *Pomacanthus zonipectus*, *Mulloidichthys dentatus*, *Etropus crossotus*, *Eucinostomus currani* y *Diapterus brevirostris*) si tienen registro de secuencias de 12S, solo que es otro fragmento, no el que se utilizó en Miya *et al.* (2015); las últimas dos especies (*Sebastes saxicola* y *Exocoetus monocirrhus*) si cuentan con el registro de 12S del fragmento usado por Miya *et al.* (2015), solo que sin el registro del los cebadores MiFish, por lo tanto tampoco se asignaron taxonómicamente a nivel especie (Fig. 19).

De acuerdo a lo anterior solo el caso de *M. curema* y *S. annulatus* fueron asignados a nivel especie. Sin embargo los resultados se consideraron como positivos a niveles taxónomicos superiores como fue a nivel género a *Mugil* sp., *Sebastes* sp., *Lutjanus* sp., *Mulloidichthys* sp. y *Exocoetus* sp., y nivel familia para Carangidae, Balistidae, Pomacanthidae y Exocoetidae, presentes en los resultados de la asignación taxonómica al $\geq 99\%$ con 12S.

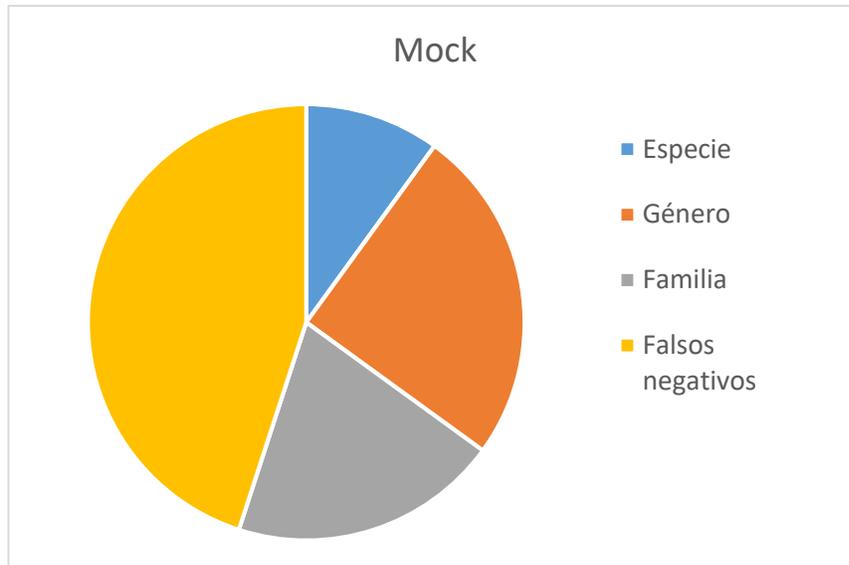


Figura 19. Frecuencia relativa de la asignación taxonómica al $\geq 99\%$ de identidad de la comunidad artificial (mock) de 20 especies de peces óseos.

8.2.6. Análisis de diversidad

Se obtuvo la curva de acumulación de especies para los MOTUs asignados a $\geq 99\%$ de similitud pareada, por el método de rarefacción, para las 26 estaciones de muestreo (Fig. 20).

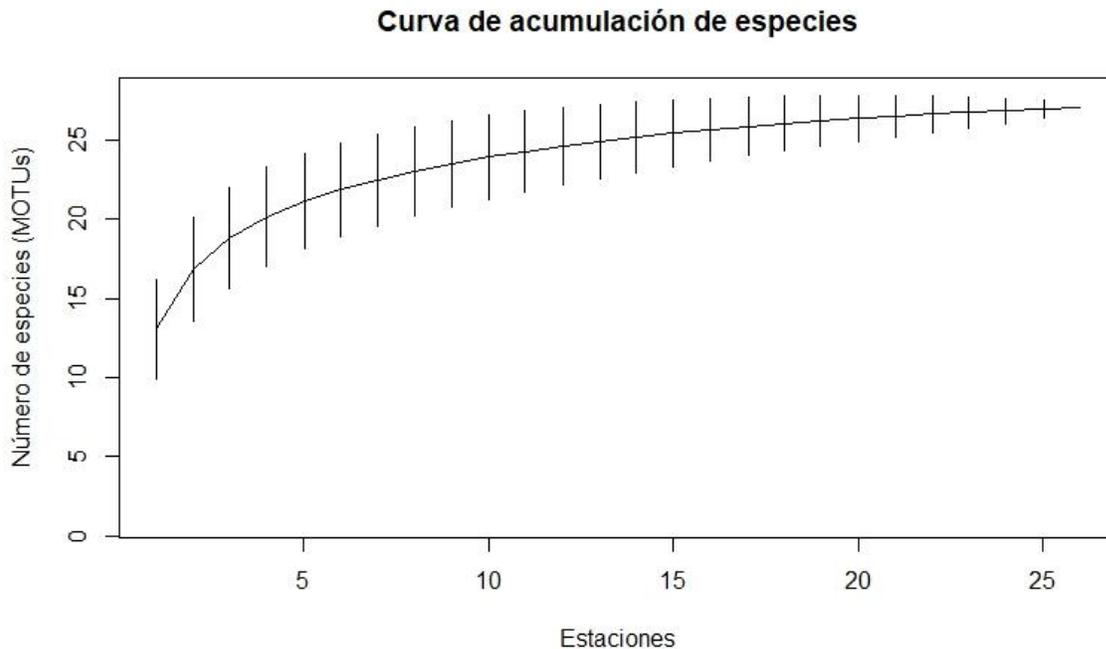


Figura 20. Curva de acumulación de especies por el método de rarefacción. La riqueza es representada con el número de MOTUs en cada una de las 26 estaciones de muestreo recolectadas al Sur del Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano. Las líneas verticales representan el intervalo de confianza.

La asíntota se va obteniendo a partir que aumentan las estaciones de muestreo y así van aumentando también los MOTUs, llegando a las 26 estaciones de muestreo con 27 MOTUs distintos (Fig.20)

Con base a la estación que dio el mínimo número de lecturas, en este caso B03, después de la transformación de los resultados con logaritmo base 10 de las lecturas, se obtuvieron las curvas de rarefacción para cada una de las estaciones de muestreo (Fig. 21)

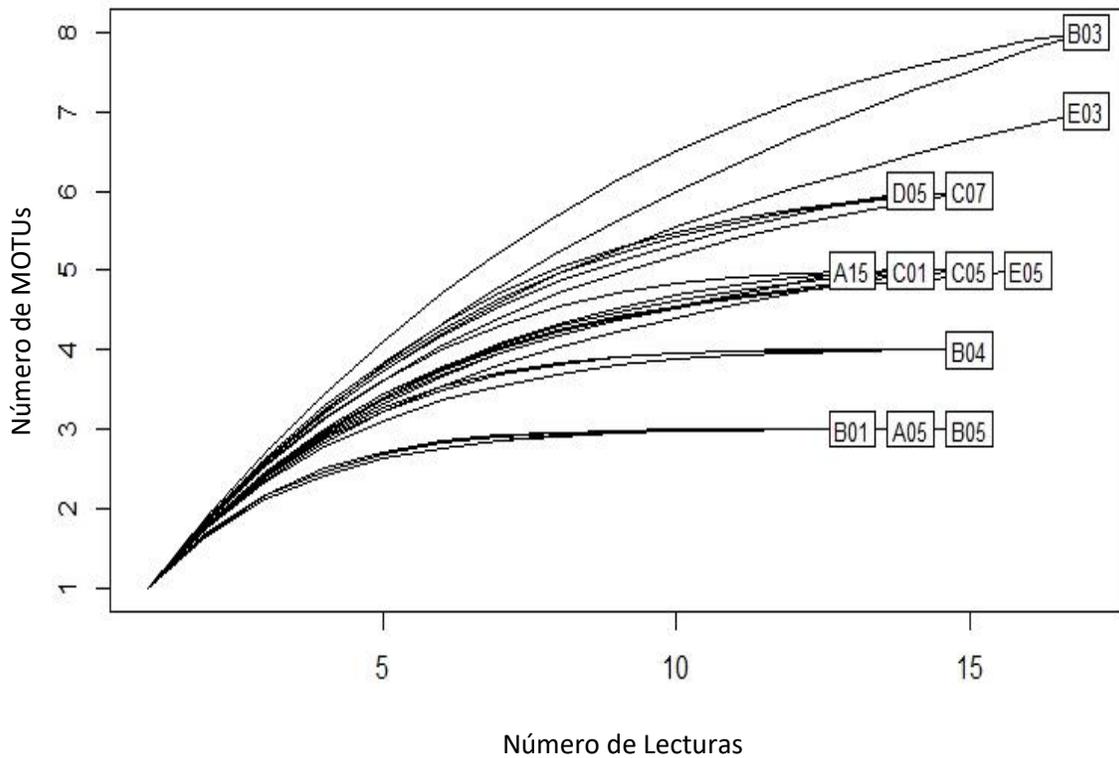


Figura 21. Curvas de rarefacción de la acumulación de MOTUs por número de lecturas (transformadas con Logaritmo base 10) para cada estación de muestreo, estandarizadas a un valor máximo de 15 para las lecturas y la presencia de 8 MOTUs como máximo por estación.

En la Fig. 21 se observa en las curvas de rarefacción para cada una de las estaciones de muestreo que solo son tres las estaciones que no alcanzan la asíntota, sugiriendo que en estas no fue suficiente la profundidad de secuenciación para capturar la riqueza de especies (MOTUs).

Se obtuvo el Índice de similitud de Bray Curtis, que nos dice a través de un agrupamiento, el porcentaje de similitud de acuerdo a los MOTUs presentes o ausentes en cada una de las estaciones de muestreo. La Fig. 22, muestra el índice de similitud de Bray-Curtis.

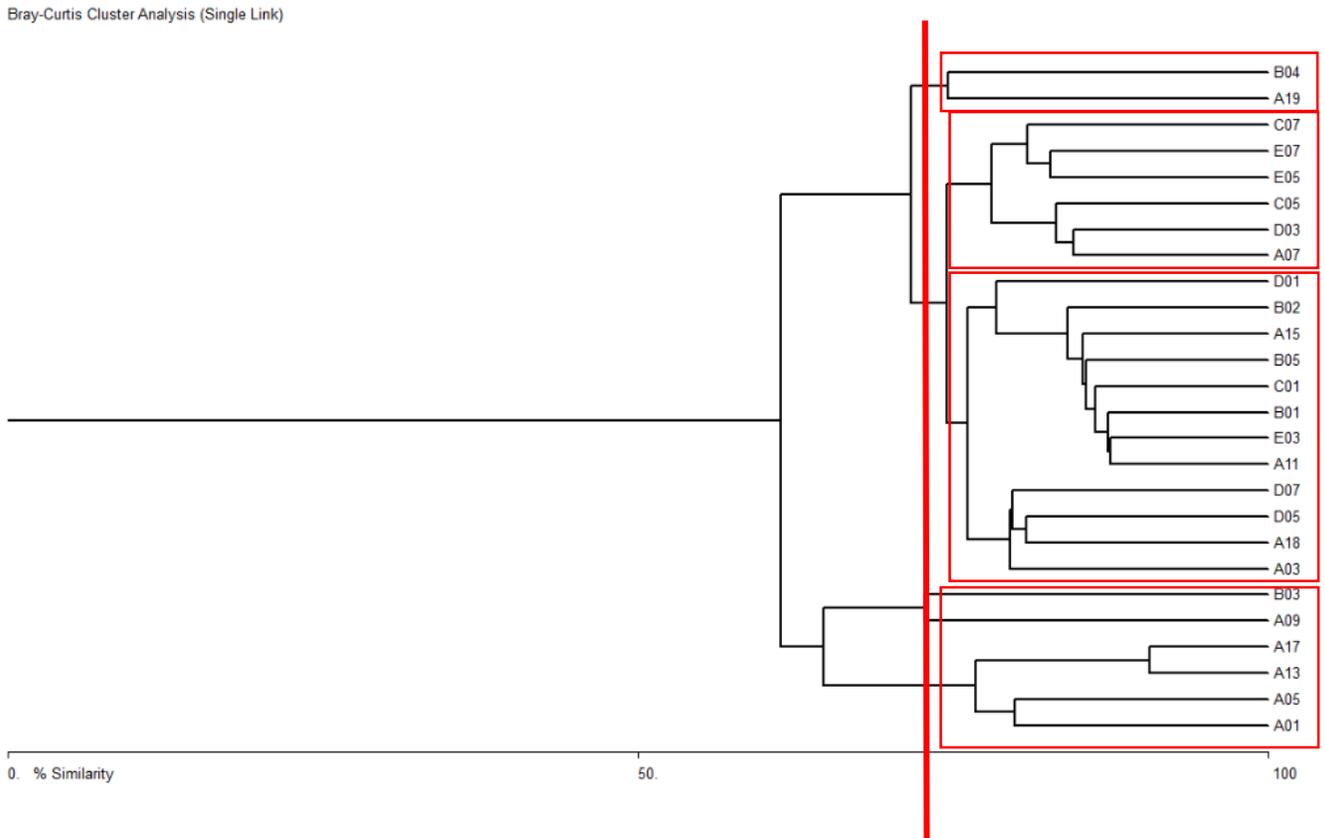


Figura 22. Índice de similitud de Bray Curtis con los datos de la presencia de los MOTUs en cada estación de muestreo. La línea roja indica un corte hecho aproximadamente al 75% de similitud para agrupar a todas las estaciones en cuatro grupos (recuadros rojos), de acuerdo a su similitud o distancia.

En este caso se aprecia en la Fig. 22 para todas las estaciones de muestreo, la agrupación en cuatro grupos a un 75% aproximadamente de acuerdo a la similitud o distancia entre ellas.

Por otro lado en la Fig. 23 se representa la similitud entre comunidades a través de la distancia de Bray Curtis, que representa la diferencia total del número de los MOTUs entre dos estaciones, dividida para el número total en cada estación; a través de un

escalamientos multidimensional no métrico (NMDS) de dos dimensiones, como otra forma de representar las similitudes o distancias entre estaciones.

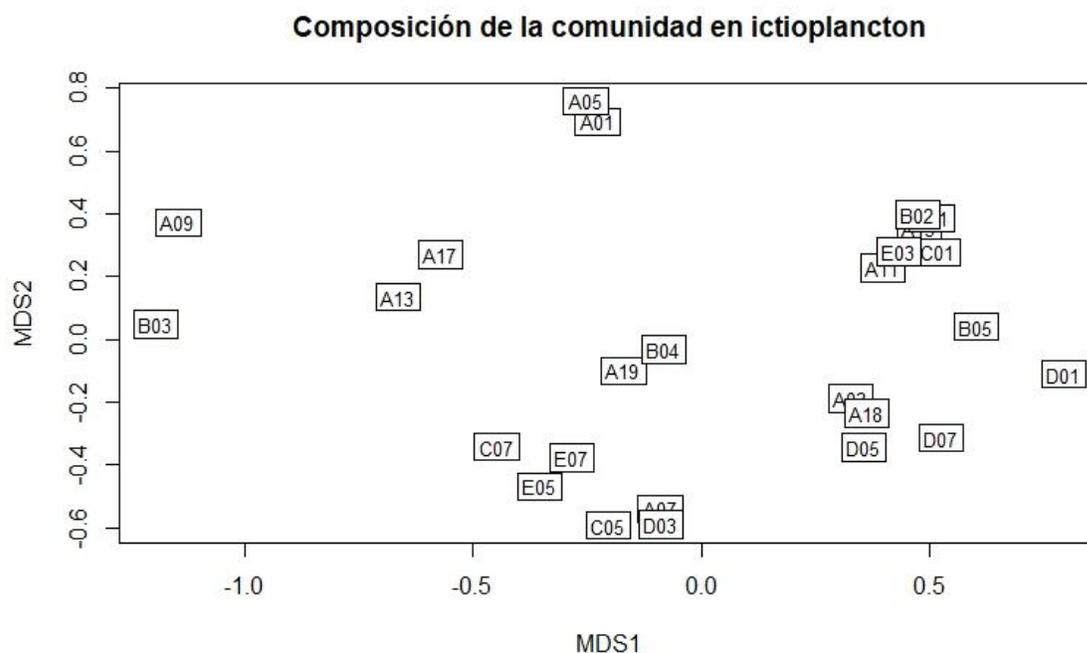


Figura 23. Resultados de la distancia de Bray Curtis en un NMDS de dos dimensiones para los datos de los números de lecturas transformados con logaritmo base 10.

Estas agrupaciones se presentaron de acuerdo al porcentaje de similitud o distancia en la composición de MOTUs. Al observarse más cerca un sitio de otro por medio de las etiquetas en el gráfico NMDS se refiere al contenido de los mismos MOTUs tanto abundantes como raros (Fig. 23). Así como entre más alejado un sitio de otro indica mucha diferencia entre ellos. Resultando la distribución de MOTUs de las comunidades del ictioplancton como se describe en la Tabla 12.

Tabla 12. Relación de los cuatro grupos de acuerdo a su porcentaje de similitud (promedio) entre las estaciones de muestreo, así como de la distribución de MOTUs dentro de la comunidad del ictioplancton.

Grupo	Estación	%	Comunidad
1	A01, A05, A13, A17, A09 y B03	80	<i>Triphoturus mexicanus</i> , <i>Mugil curema</i> , <i>Auxis rochei</i> , <i>Stomias atriventer</i> , <i>Lutjanus</i> sp3, <i>Sphoeroides annulatus</i> , Balistidae, <i>Gempylus serpens</i> , <i>Sebastes</i> sp1, <i>Fistularia commersonii</i> , <i>Selar crumenophthalmus</i> , <i>Exocoetus volitans</i> , <i>Auxis</i> spp.
2	A03, A18, D05, D07, A11, E03, B01, C01, B05, A15, B02 y D01	80	<i>T. mexicanus</i> , <i>A. rochei</i> , <i>Cubiceps</i> sp., <i>S. atriventer</i> , <i>G. serpens</i> , <i>S. crumenophthalmus</i> , <i>Ophichthus zophochir</i> , <i>Phtheirichthys lineatus</i> , <i>Lutjanus</i> sp1, <i>Seriola rivoliana</i> , <i>Xiphias gladius</i> , <i>Thunnus</i> spp.
3	A07, D03, C05, E05, E07 y C07	83	<i>T. mexicanus</i> , <i>Cubiceps</i> sp., <i>S. atriventer</i> , <i>G. serpens</i> , <i>S. crumenophthalmus</i> , <i>L. guttatus</i> , <i>E. volitans</i> , <i>O. zophochir</i> , <i>P. lineatus</i> , <i>Lutjanus</i> sp1, <i>Auxis</i> spp.
4	A19 y B04	75	<i>T. mexicanus</i> , <i>Cubiceps</i> sp., <i>S. atriventer</i> , <i>G. serpens</i> , <i>S. crumenophthalmus</i> , <i>Lutjanus</i> sp1, <i>Auxis</i> spp.

De acuerdo a los tipos de diversidad biológica que existe en la región de estudio, en este trabajo se presenta el resultado correspondiente a la diversidad Alfa (alpha α), es decir presencia de riqueza y frecuencia relativa de MOTUs de la comunidad del ictioplancton presente en cada una de las estaciones de muestreo al Sur del Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano (Tabla 9, Fig. 17). La diversidad Beta es el conjunto de especies encontradas en las 26 estaciones de muestreo (Tabla 8) y la diversidad Gamma es el número de especies conocidas para la región observadas en este y estudios previos (Anexo B, G y H).

9. DISCUSIÓN

Los resultados nos llevan a contestar la pregunta inicial de conocer la riqueza de especies de peces en el área correspondiente al Sur del Golfo de California y región adyacente Cabo Corrientes durante el período muestreado encontrando una riqueza comparable entre los dos métodos utilizados. Además de complementar los resultados obtenidos por métodos basados en morfología de peces, ya que se logró mantener un grado de complementariedad entre los resultados obtenidos por los dos métodos, el morfológico y el molecular. En cuanto a las coincidencias en la identificación de especies presentaron < 10% entre ambos métodos, debido a la falta de información en las bases de datos de secuencias de referencia para una asignación taxonómica molecular con el marcador 12S más exitosa.

Los resultados obtenidos con secuenciación masiva, son única y exclusivamente descriptivos de la riqueza de especies, a través de una lista de MOTUs que corresponden a especies de peces óseos en la zona de muestreo obtenidos por medio de un enfoque de metabarcoding de ADN de comunidades del Ictioplancton.

Por lo tanto, la relevancia del presente trabajo recae en las bondades de la técnica molecular de detección de especies en dichas muestras para detectar especies previamente reportadas en el área de estudio por Avendaño-Ibarra *et al.* (2014), Ahern *et al.* (2018) y Valdivia-Carrillo *et al.* (2021) a excepción de *Phtheirichthys lineatus* (Echeneidae) y *Xiphias gladius* (Xiphiidae); demostrando así que el método molecular, sugiere una opción alternativa para emplearlo en un futuro como un método (estandarizado) de monitoreo de la biodiversidad de comunidades del ictioplancton marino del Golfo de California y otras regiones del mundo.

La elevada cantidad de secuencias generadas (12S) que aún no ha sido posible asignar por falta de referencias en la base de datos (GenBank) para hacer “match”, pueden estar representando la mayoría, si no todas, las especies que se encuentran en el área de muestreo que no han sido reportadas anteriormente por métodos tradicionales (censos visuales, pesca, identificación morfológica de huevos y larvas).

El método de metabarcoding aún no tiene la precisión a la que potencialmente puede llegar y aún existen sesgos. Lo ideal es probar, iniciar con la aplicación del método, para comenzar a adecuarlo a las poblaciones de organismos en estudio.

Los datos de metabarcoding pueden estar sesgados y los conjuntos de datos resultantes ser diferentes de los resultados morfológicos. Sin embargo, es necesario señalar que los métodos morfológicos no están exentos de sus propios sesgos metodológicos altamente dependientes de la experiencia del taxónomo y por la presencia de especies crípticas (Wangensteen *et al.*, 2018). Por ejemplo, en Cabo Pulmo, Ahern *et al.* (2018) identificaron huevos y larvas de peces mediante caracteres morfológicos, merísticos y de pigmentación (método tradicional), siendo ocho huevos de peces identificados como una sola especie, *Lutjanus peru*, mientras que el método molecular a través de barcoding usando COI, detectó que estos huevos eran en realidad ocho especies de peces de diferentes géneros e incluso familias. Los métodos moleculares evolucionan para ser cada vez más precisos y para complementar los métodos tradicionales, sobre todo en la identificación de huevos de peces, donde aún existen muchos vacíos de información en la taxonomía.

Habrá que considerar aspectos positivos del método molecular, así como algunos aspectos en contra. El sesgo del cebador al momento de la amplificación puede provocar resultados que sobreestiman los datos con la presencia de falsos positivos (especies detectadas pero no incluidas), lo que de acuerdo a Zhang *et al.*, (2018) es más común cuando se trabaja con poblaciones (como en este estudio que en las 26 librerías analizadas se detectaron falsos positivos con bajo número de lecturas). Esto varía según las especies y los fragmentos en las librerías de las poblaciones. También se pueden considerar fallidos por los falsos negativos (especies incluidas pero no detectadas) que también se deben a la falta de información en los bancos de datos como GenBank.

No todas las muestras se amplifican con la misma eficacia debido al sesgo del cebador, como en el caso de este estudio, que se tuvo que descartar a dos estaciones de muestreo (A20 y C03) debido a que no amplificaron en la primera amplificación de PCR, a pesar de que se usó el mismo par de cebadores estandarizados y probados

con éxito en peces óseos marinos en el trabajo de Miya *et al.* (2015). Se trabajó con tejidos de huevos y larvas de peces enteros (muestras a granel) todo en conjunto, variando en tamaño los especímenes procesados, lo que implica mucha variedad en biomasa de cada especie y en cada estación de muestreo.

En este estudio, tomando en cuenta los resultados como descriptivos, se corrigió cada MOTU presente en las muestras a partir de una resta de las lecturas presentes en el control negativo. Este criterio se tomó de acuerdo a que esta asignación taxonómica es a un porcentaje de similitud pareada bastante alto ($\geq 99\%$) así como bajo un estricto análisis bioinformático en cuanto a la astringencia de los parámetros utilizados. Por ello, se consideraron emplear todas las lecturas presentadas por cada MOTU, para los subsecuentes análisis.

9.1. Asignación taxonómica

De acuerdo a las bases de referencias, nos percatamos que aún falta mucha información de secuencias de especies utilizando el marcador 12S para peces en la base de datos utilizada (GenBank) y sobre todo del área del Golfo de California. Esto impidió la asignación de las especies bien conocidas y comunes de la región que se capturaron en mayor cantidad a lo largo de todo el muestreo, por ejemplo, las 421 larvas de *Bregmaceros bathymaster* de la familia Bregmacerothidae, según la identificación tradicional presente en 16 de las 28 estaciones de muestreo no existió un apareamiento de secuencias. Solo existen 5 secuencias en total de nucleótidos registradas en el GenBank para esta especie y corresponden a un fragmento del gen COI. Actualmente no existen registros de 12S para *B. bathymaster*, por lo tanto, no hubo asignación taxonómica molecular.

Diogenichtys laternatus es otra especie de pez mesopelágico bien caracterizada morfológicamente de la familia Mycthopidae, y altamente frecuente y abundante en el área de estudio, de la cual se identificaron 44 larvas en 15 de las 28 estaciones de muestreo. En GenBank, solo se encontraron de esta especie 7 registros de secuencias de nucleótidos, siendo una de estas correspondiente al fragmento de 12S (GenBank: LC146366.1) de Miya *et al.* (2015). Sin embargo, este registro no fue encontrado como referencia en GenBank, por la amplificación PCR in silico que se llevó a cabo por medio

de ecoPCR, para la construcción de la base de datos local, ya que el fragmento no cuenta con las regiones que corresponden a los cebadores (MiFish) usados en el análisis. El mismo caso para *Protomyctophum* sp1, que fue identificado morfológicamente presente en la estación A07 y presenta dos secuencias registradas en GenBank para 12S, fracción de Miya *et al.* (2015) de 173 pb (GenBank: LC145979.1) y 174 pb (GenBank: LC145978.1), solo que estas no contienen el fragmento de los cebadores MiFish, por lo que no fue posible su asignación taxonómica con ecotag (Obitools). Sin embargo por medio de un BLAST manual si se asignó la secuencia a los MOTUs correspondientes. Lo que indica que es posible que otras secuencias más puedan llegar a asignarse exitosamente de esta forma.

Otro de los casos notables fue *Vinciguerria lucetia*, de la familia Phosichthyidae, con 94 larvas identificadas por el método tradicional en 18 de las 28 estaciones de muestreo, con solo dos secuencia nucleotídicas registradas en el GenBank, las cuales corresponden a un fragmento de COI (GenBank: HQ010067.1) y un fragmento de 16S (GenBank: HQ127632.1). Actualmente no existen registros de 12S para *V. lucetia*, por lo tanto no hubo asignación taxonómica molecular.

Cabe señalar que ninguna de las tres últimas especies mencionadas cuenta con el registro de su genoma mitocondrial completo en la base de datos publicas de GenBank. Por lo que se considera de gran importancia robustecer esta base de datos sobre todo de las especies más comunes y frecuentes presentes en el Golfo de California y región adyacente del Pacífico Mexicano.

Por otro lado, existen algunas familias de peces que no son detectadas con el marcador 12S (fragmento MiFish) debido a que la resolución taxonómica del marcador no pudo discriminarlas. Esto se debe a la falta de divergencia genética en el ADN mitocondrial. Un ejemplo de esto es la familia Engraulidae (Miya *et al.*, 2015). Esta puede ser la razón de que en este estudio no se detectó a *Engraulis mordax* cuya larva fue presente en una estación (A18) y aún teniendo su genoma mitocondrial completo registrado en la base de datos (GenBank) no fue posible su detección, a través del par de cebadores MiFish para 12S; para lo que se sugeriría en estos casos utilizar al mismo tiempo un marcador nuclear.

9.2. Algunos casos particulares en la identificación molecular

Auxis spp

La identificación de larvas del género *Auxis* no ha sido posible de realizar usando exclusivamente características diagnósticas morfológicas y merísticas en este estudio y en Ochoa-Muñoz *et al.* (2018). Hasta ahora no es posible distinguir solo con rasgos morfológicos larvas de las dos especies de *Auxis*, presentes en el Pacífico Oriental Tropical (Fisher *et al.*, 1995b). Solo mediante técnicas moleculares se han podido evidenciar la presencia de larvas de las dos especies.

En este estudio, se identificó la especie de *Auxis rochei* por medio del marcador 12S, con una asignación taxonómica del 100% de identidad pareada la cual se reporta en 14 de las 26 estaciones. En las 12 estaciones restantes solo se llegó a nivel género (igual que el método morfológico) es decir, *Auxis* spp con una asignación del 99.4% de identidad pareada, no lográndose discriminar entre *A. rochei* y *A. thazard* a este porcentaje de asignación. El género *Auxis* se presentó en todas las 26 estaciones en el análisis molecular, no siendo así para el análisis morfológico en el cual solo se presentó en 6 de las 28 estaciones de muestreo: A20 (no se presentan resultados moleculares, ya que no dio resultados de amplificación por PCR), B01, B05, C01, D07 y C05; en todas estas estaciones fue identificado en larvas en estadio de preflexión.

Cabe señalar que los resultados del análisis molecular son de la mezcla (en pool) de larvas, huevos, embriones, huevos sin embrión y de las larvas y los huevos destruidos de cada estación, lo que podría ser la razón de la presencia del género *Auxis* en todas las estaciones. Ya que donde no se encontraba como larva posiblemente estaba como embrión, o como huevo, sin embrión o destruido.

En búsquedas recientes en el banco de datos GenBank, a través de un BLAST, una de las secuencias asignadas como *Auxis* spp., fue identificada al 100% de identidad con *Auxis thazard*. Es decir, en todas aquellas estaciones donde se presentaron secuencias que no lograron identificarse a nivel especie en cuanto al género *Auxis*, en búsquedas recientes se han logrado identificar a nivel específico. Esto es por la referencia más actualizada de la secuencia de 12S de esta especie en el Banco de

datos (GenBank: MK801690.1; del día 16 de junio de 2020), que ha sido registrada en fechas posteriores a esta asignación taxonómica.

Lo anterior nos indica que es posible que incluso dentro de los MOTUs presentes en cada una de las estaciones de muestreo que fueron no asignados (NA) en este análisis a una similitud $\geq 99\%$, podrían ser asignadas en posteriores búsquedas en GenBank. Esto debido a la velocidad con que crece la información dentro de bancos de datos genómicos públicos como lo es GenBank, que se están actualizando constantemente y haciendo más robusta su información. En cuanto a fragmentos del gen 12S, el mismo gen completo o el genoma mitocondrial completo, están siendo reportados y registrados para más especies de peces.

Xhipias gladius

Este MOTU estuvo presente solo en dos de las estaciones (B02 y C07) en el análisis molecular con un bajo número de lecturas, 4 y 71 lecturas respectivamente. El análisis morfológico no lo reporta, por lo menos como larva, ya que en el caso de huevos no se logró identificar ninguno de los huevos totales de todas las estaciones, solo se les clasifico como Huevo Tipo.

A pesar del bajo número de lecturas presentadas, se decidió no eliminar este MOTU como un falso positivo, debido a la presencia permanente de esta secuencia, incluso después de un estricto análisis bioinformático a través de filtros basados en diferentes parámetros, siendo en algunos casos más altos que el estándar establecido. Esta secuencia que permaneció sin ser eliminada en pasos anteriores, se asignó con un emparejamiento del 100% de similitud en la estación CO7 y 99.4% de similitud en B02, con la secuencia registrada en GenBank del genoma mitocondrial completo de *X. gladius*. Además cabe destacar que no ha sido reportado como larva en listas de estudios anteriores, tanto por métodos morfológicos como moleculares en esta región (Anexo G) (Avendaño-Ibarra *et al.*, 2014; Ahern *et al.*, 2018; Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021).

Esta es una prueba más de la eficiencia de la información presente en las bases de datos, sobre todo si se encuentra registrada la secuencia completa de peces, ya que

de esta manera la identificación se da incluso al 100% de identidad pareada. Es de esperar que este MOTU sea con certeza *X. gladius* debido al porcentaje de similitud de la secuencia presentado con Ecotag, además de que es ampliamente reconocido como la única especie de la Familia Xhipiidae distribuida en la región (Fisher *et al.*, 1995b).

Asumiendo que la secuencia de *X. gladius* con 71 lecturas, pertenece a uno de los huevos presentes en la muestra de la estación C07 (donde se presentaron dos huevos Tipo 3 Anexo B, Tabla B) y de acuerdo a la fotografía tomada a uno de estos huevos Tipo 3, se encontró parecido a los huevos de peces identificados como *X. gladius* en ECOSUR (El Colegio de la Frontera Sur) en 2005 a través de barcoding de ADN (Código de barras de la vida). Al comparar fotografías, posiblemente se trate de la misma especie, aclarando que estos resultados son únicamente descriptivos (Fig. 24).

Para el caso de la estación B02, donde también estuvo presente esta secuencia en menor número (solo 4 lecturas), se reportó la presencia de un solo huevo destruido en esta estación. Es importante señalar que debido al fragmento de 12S empleado el cual es exitoso en muestras de ADN ambiental (Miya *et al.*, 2015), es decir, en muestras que se presentan con ADN fragmentado y dañado, tiene la sensibilidad suficiente para detectarlo; sumando además la capacidad de la tecnología empleada de alto rendimiento HiSeq para la secuenciación masiva.

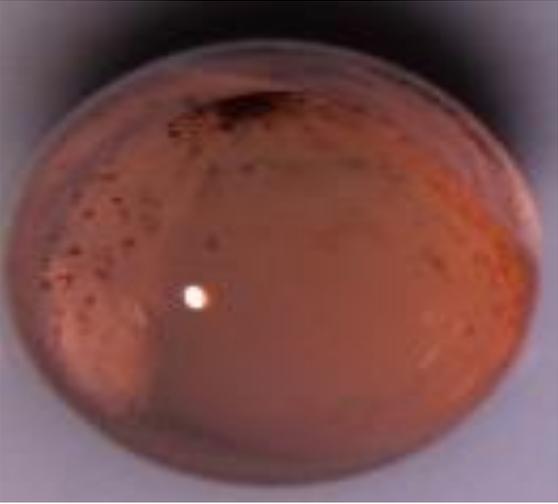
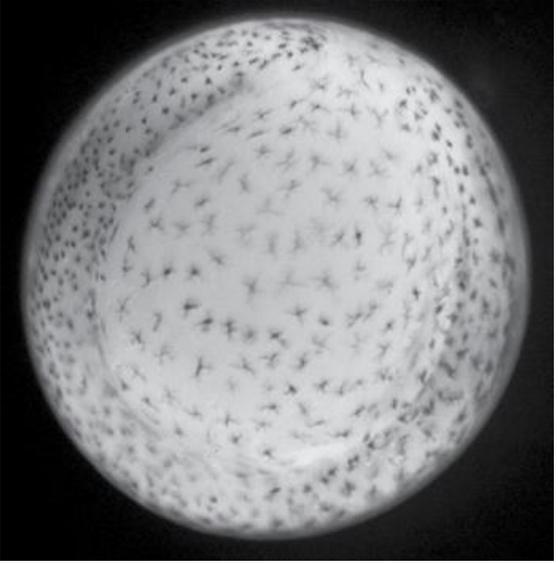
Descripción	Foto
<p>Huevo Tipo 3 (con manchas en el cuello).</p> <p>Identificación morfológica en la estación B02 (1 huevo destruido) y C07 (2 huevos Tipo3)</p>	
<p>Huevo de pez, especie <i>Xiphias gladius</i>, pez espada</p> <p>El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Chetumal de ECOSUR;</p> <p>Ecofronteras, 2017, Vol21, num. 59, pp. 17-18, ISSN 2007-4549</p> <p>Licencia CC (no comercial, no obras derivadas); notificar reproducciones a llopez@ecosur.mx</p>	

Figura 24. Comparación descriptiva a través de una fotografía del Huevo Tipo 3, clasificado morfológicamente en la estación C07 y la fotografía del huevo de la especie de *X. gladius* identificado a través de barcoding de ADN en ECOSUR, Unidad Chetumal.

Exocoetidae

En los resultados del análisis molecular para ictioplancton de la familia Exocoetidae, este MOTU se presentó en tres estaciones (E05, D07 y D05) y como *Exocoetus volitans* en siete estaciones (A01, A05, A09, A13, A17, B03 y C07). La familia Exocoetidae no fue identificada con caracteres morfológicos en ninguna estación de muestreo. Considerando por otro lado la presencia de un huevo clasificado como Tipo 1, en la estación C07, que de acuerdo a su foto (Anexo B, Tabla B.1) muestra un gran parecido morfológico con una fotografía de un huevo de la familia Exocoetidae, reportada por ECOSUR (El Colegio de la Frontera Sur) en 2005 e identificado a través de barcoding de ADN (Código de barras de la vida), esta comparación realizada solamente comparando fotografías. Considerándolo como una posibilidad entre los resultados descriptivos (Fig. 25).

Cabe notar que en todas las estaciones mencionadas anteriormente se encuentra la presencia de embriones solamente asignado por tipo, de huevos sin embrión y huevos destruidos, lo que podría indicar que en alguno de estos podría encontrarse una especie de la misma familia (Exocoetidae). Descartando la posibilidad de que se refiera a *E. volitans* debido a que esta especie (de la misma familia) se caracteriza por no presentar filamentos coriónicos como lo menciona Collette *et al.* (1984).

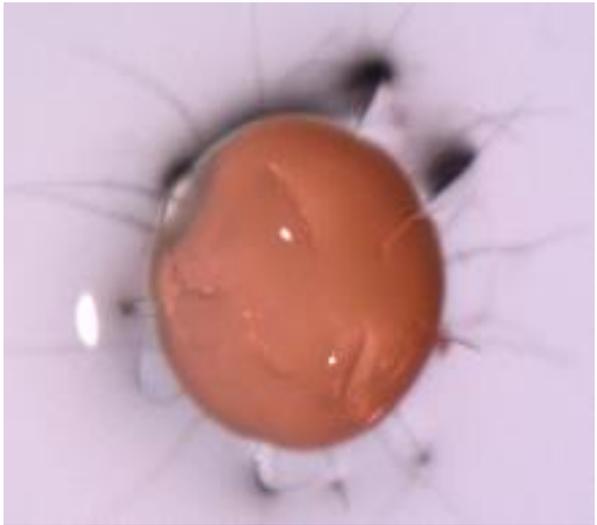
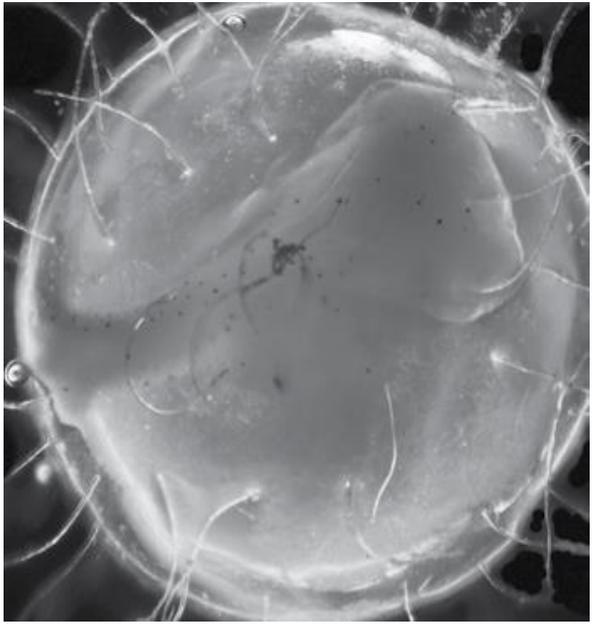
Descripción	Foto
<p>Huevo Tipo 1.</p> <p>Identificación morfológica en la estación C07 (1 huevo Tipo1)</p>	
<p>Huevo de pez, de la familia Exocoetidae, peces voladores.</p> <p>El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad Chetumal de ECOSUR;</p> <p>Ecofronteras, 2017, Vol21, num. 59, pp. 17-18, ISSN 2007-4549</p> <p>Licencia CC (no comercial, no obras derivadas); notificar reproducciones a llopez@ecosur.mx</p>	

Figura 25. Comparación descriptiva a través de una fotografía, del Huevo Tipo 1, clasificado morfológicamente en la estación C07 y la fotografía del huevo de la familia Exocoetidae identificado a través de barcoding de ADN en ECOSUR, Unidad Chetumal.

Lo anterior sugiere un estudio más detallado en los huevos de peces, empleando métodos moleculares ya que los resultados obtenidos por el método molecular son considerablemente más sensibles y pueden detectar con precisión taxones que en estadio de huevo no ha sido detectado por la identificación tradicional.

En general el éxito en la amplificación depende del grupo de especies del que se trate (Zhang *et al.*, 2018) y en el caso de metabarcoding de ADN donde lo que se intenta es la amplificación de numerosos grupos de diferentes familias de peces óseos en este caso de estudio, por ejemplo, es aquí donde pueden presentarse los falsos negativos como se explico en la familia Engraulidae.

Otros factores involucrados son la longitud del amplicón requerido o de interés (Zhang *et al.*, 2018), o si el ADN tiene calidad deficiente (degradado) como lo es el uso de ADN ambiental que requiere amplicones cortos. Se esperaría que en el caso de ADN de comunidades este sea de mejor calidad, es decir, menos degradado y mayor cantidad ya que es extraído directamente de tejido, aunque en este caso habría que considerar, la presencia de larvas y huevos destruidos, o el tiempo que el tejido tiene fijado en etanol así como si se han dado los recambios adecuados de etanol mientras es procesada la muestra.

Se debe considerar por igual que la tecnología de secuenciación masiva que se está utilizando es de alto rendimiento, también llamada de siguiente generación NGS (Next Generating Sequence) en plataforma illumina Hiseq, y requiere el uso de amplicones cortos para optimizar su rendimiento. La ventaja de haber utilizado una plataforma HiSeq, que es una de las más potentes actualmente en el mercado de la tecnología NGS, es que se genera la suficiente información como para poder depurar los datos con las herramientas bioinformáticas adecuadas, además de un alto grado de confianza de obtener resultados fidedignos.

9.3. Descripción de diversidad

En este estudio fue realizado como un muestreo de oportunidad enfocado originalmente a la captura de huevos de peces siendo así adicional la captura y análisis de las larvas. Sin embargo, a pesar de que la captura de larvas posiblemente menos eficiente que otras artes de captura (red Bongo), estuvo más representada en las muestras del ictioplancton pudiendo ser identificadas al menor nivel taxonómico posible a través de claves de identificación morfológica (no siendo el caso para los huevos, debido a que solo se llegó a tipo de huevo).

De acuerdo a esto resulta difícil describir la diversidad del ictioplancton en cada una de las estaciones de muestreo o incluso de manera general en toda el área muestreada. Ya que aparte de los factores mencionados anteriormente (único muestreo, con una red diseñada para captura de huevos de peces no para larvas de peces), la muestra se analizó por metabarcoding en conjunto (pool) incluyendo tanto huevos como larvas de diferentes tallas, así como huevos y larvas destruidos, embriones y huevos sin embrión. Lo que de principio representa una diversidad muy diferente a la que se puede obtener con el método morfológico (con la información únicamente de las larvas).

Para los índices basados en riqueza se necesita tener un método de muestreo específico, que nos ayude a relativizar las mediciones de la biodiversidad o de esos índices de riqueza y debido a que en este estudio el muestreo no fue diseñado para captura de larvas de peces sino solo para captura de huevos de peces, no se podría relativizar la diversidad del ictioplancton del área de muestreo. Además no existe un punto de comparación con otros trabajos por la diferencia en los métodos de captura. Por esta razón, no se presentan índices de diversidad en este estudio.

Además de acuerdo a los resultados en la asignación taxonómica molecular no se logró identificar ninguna de las especies más abundantemente representadas por sus larvas (análisis morfológico), debido a la falta de información de la secuencia 12S en la base de datos pública de GenBank.

Por lo anterior cualquier análisis de diversidad realizado con los resultados moleculares obtenidos en este estudio, sería sesgado a la disponibilidad de

secuencias asignadas a taxas específicos. Es decir, no provee una representación precisa de la diversidad presente en el área de estudio, así como durante la época de muestreo.

Sin embargo, los resultados moleculares presentaron una riqueza de especies de acuerdo a la lista que se presenta con la riqueza de MOTUs (Tabla 8), siendo esta el número total de MOTUs obtenidos en este muestreo que lograron asignarse con 12S a $\geq 99\%$ de identidad pareada. Esta riqueza en MOTUs fue comparativamente menor con lo que se ha reportado anteriormente en otros estudios basados en identificación estrictamente morfológica como de Aceves-Medina (2003, 2004), Avendaño-Ibarra *et al.* (2014) y con la riqueza inferida en la región de Cabo Pulmo con métodos del código de barras Ahern *et al.* (2018), así como metabarcoding de ADN ambiental en muestras de agua de mar Valdivia-Carrillo *et al.* (2021) para el Golfo de California y zona adyacente al Pacífico Mexicano (Anexo G).

De esta manera nos referimos a la riqueza de especies de acuerdo a la lista de la riqueza de MOTUs (Tabla 8) como un componente de la diversidad de secuencias de 12S encontradas en las 26 estaciones de muestreo.

Los análisis de similitud de Bray Curtis mostraron aproximadamente en un 75% de similitud a cuatro grupos formados por las estaciones de muestreo debido a su composición similar en MOTUs abundantes y raras (de acuerdo al número de lecturas y recurrencia en las estaciones de muestreo). La mayoría de los MOTUs, estaban representados por pocas lecturas como *Nematistius pectoralis* el que se presentó en una sola estación y con el menor número de lecturas considerándolo como uno de los MOTUs raros. Predominando *Cubiceps* sp con mayor cantidad de lecturas pero presente solamente en ocho estaciones de muestreo (Fig. 15 y 16).

La mayoría de las estaciones de muestreo estuvieron numéricamente dominadas por la presencia de una mayor cantidad de lecturas hacia un solo MOTU. Posiblemente porque este MOTU, se encontraba en la muestra en mayor número (huevos, larvas, embriones), tanto como que era un individuo de mayor talla que los demás, haciendo menos equitativa la amplificación por PCR o por presentar alto o bajo éxito en la amplificación específica por PCR con el marcador 12S.

10. CONCLUSIONES

Este trabajo demostró que el uso de metabarcoding de ADN para identificación de especies de peces óseos en la comunidad del ictioplancton (huevos y larvas) es notablemente más sensible en el grado de detección que el método tradicional, incluso de organismos que no lograron identificarse morfológicamente (como larvas de peces). La desventaja es que el metabarcoding de ADN es altamente dependiente de la librería de secuencias de especies identificadas previamente a partir de adultos. Este problema es más notable en el caso de huevos de peces donde queda la mayor incertidumbre porque no existe una referencia morfológica para la comparación, teniendo la secuencia pero desconociendo a que especie debe asignársele ese MOTU. En este caso se tendrá que utilizar primero un método de identificación por barcoding de ADN para huevos y larvas de especies conocidas (por ejemplo incubadas en laboratorio o a partir de secuencias conocidas de adultos).

Con las condiciones actuales de la librería de referencia se rechazó la hipótesis de trabajo, siendo esto un problema operacional porque en realidad molecularmente se detectó mayor número de MOTUs que los que se pudieron identificar con métodos tradicionales, aunque aún no se pudo asignar a un género o especie numerosos MOTUs.

En este estudio se obtuvo considerablemente más información de la que se esperaba, en cuanto a número de lecturas totales. Se decidió trabajar con un criterio de $\geq 99\%$ de identidad pareada para la asignación taxonómica que es un filtro estricto, para presentar los datos referidos con un alto grado de confianza. Los MOTUs no asignados a $\geq 99\%$ de identidad, ofrecen información que puede aprovecharse para estudios posteriores de diversidad de peces en el área estudiada, debido a que, a una identidad pareada entre el 97 al 98% se considera aún confiable en asignación taxonómica para peces teleósteos.

Así mismo, los MOTUs no asignados se podrán ir descifrando a medida que la información en los bancos de datos de referencia para este marcador molecular (12S) en el área del Golfo de California y del Pacífico Mexicano vaya incrementando el número de secuencias.

11. RECOMENDACIONES

El presente trabajo es el segundo en su tipo para la región del Golfo de California y servirá de base para la identificación de especies de futuros trabajos de monitoreo a partir de análisis moleculares del ictioplancton en el Golfo. De igual manera, complementará con mayor precisión estudios y trabajos referentes a identificación morfológica y evaluación de la diversidad de peces presentes en el área, siendo posible adecuar y extender el protocolo empleado a otros grupos dentro del zooplancton.

Es necesario utilizar un método adecuado de muestreo para huevos y larvas de peces, para comparar las técnicas de identificación por análisis molecular masivo con el análisis de identificación taxonómica tradicional. Así mismo, la comparación de la comunidad para un adecuado análisis de la riqueza regional.

Para el análisis de metabarcoding, al momento de hacer la extracción de ADN del ictioplancton realizar esta por separado los análisis de huevos y larvas de peces (si se requiere tener la información de la identificación de especies), así como todo el procedimiento de metabarcoding de ADN. Después de hacer las librerías con doble etiquetado, unir en conjunto (pool) al momento de mandar secuenciar.

Considerar el uso de más de un marcador molecular, con la suficiente resolución taxonómica que permita discriminar la mayor cantidad de taxa de peces, mediante metabarcoding en el estudio de diversidad del ictioplancton, y además que cuente con una base de datos con mayor número de secuencias de referencia para poder obtener una mayor proporción de asignación taxonómica.

Se propone la construcción de una base de datos local para marcadores mitocondriales en especial para peces (12S ribosomal), al igual que se ha ido desarrollando para la fracción COI de ADNmt; o de genoma mitocondrial completo de las especies de peces de interés comercial y ecológico en la región del Golfo de California y Pacífico Mexicano.

12. LITERATURA CITADA

- Aceves-Medina, G., Jiménez-Rosenberg, S.P.A., Hinojosa-Medina, A., Funes-Rodríguez, R., Saldierna, R.J., Lluch-Belda, D., Smith, P.E & Watson W. 2003. Fish larvae from the Gulf of California. *SCI. MAR.*, 67 (1): 1-11.
- Aceves-Medina, G., Jiménez-Rosenberg, S.P.A., Hinojosa-Medina, A., Funes-Rodríguez, R., Saldierna, R.J. & Smith P.E. 2004. Fish larvae assemblages in the Gulf of California. *J. Fish Biol.*, 65: 832-847 doi:10.1111/j.1095-8649.2004.00490.x
- 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-Arvizu, D.I. & 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. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 592: 159-179. <https://doi.org/10.3354/meps12446>
- Avendaño-Ibarra R., Aceves-Medina G., Godínez-Domínguez E., De Silva-Dávila R., Jiménez-Rosenberg S.P.A., Urias-Leyva H. & Robinson C.J. 2014. Fish larvae from the Gulf of California to Colima, México: An update. *Check List* 10(1): 106-121.
- Azmir, I.A., Esa, Y., Amin, S.M.N., Md Yasin I.S. & Md Yusof, F.Z. 2017. Identification of larval fish in mangrove areas of Peninsular Malaysia using morphology and DNA barcoding methods. *J. Appl. Ichthyol.*, 33: 998- 1006
- Boyer, F., Mercier, C., Bonin, A., Le Bras, Y., Taberlet, P. & Coissac E. 2016. OBITOOLS: a UNIX-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol. Ecol. Res.*, 16: 176-182. doi:10.1111/ 1755-0998.12428.
- Bucciarelli, G., Golani, D. & Bernardi, G. 2002. Genetic cryptic species as biological invaders: the case of a Lessepsian fish migrant, the hardyhead silverside *Atherinomorus lacunosus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 273: 143–149. doi:10.1016/S0022-0981(02)00138-7
- Camacho-Gastélum, R., Díaz-Viloria, N., Sánchez-Velasco L., Jiménez-Rosenberg S.P.A. & Pérez-Enríquez R. 2017. Molecular identification and morphological description of *Micropogonias megalops*, *Cynoscion othonopterus*, *C. reticulatus*

- and *Menticirrhus nasus* larvae, collected in the upper Gulf of California during Summer 2012. *Mitochondrial DNA Part A*, 28(3): 416-423. <http://doi.org/10.3109/19401736.2015.113602>.
- Collet, A., Durand, J.D., Desmarais, E., Cerqueira, F., Cantinelli, T., Valade P. & Ponton D. 2017. DNA barcoding post-larvae can improve the knowledge about fish biodiversity: an example from La Reunión, SW Indian Ocean, *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 19(6): 905-918. <https://doi.org/10.1080/24701394.2017.1383406>.
- Díaz-Viloria, N., L. Sánchez-Velasco, R. Pérez-Enríquez & S.P.A. Jiménez-Rosenberg. 2013. Molecular identification and morphological description of *Totoaba macdonaldi* and curvina *Cynoscion reticulatus* preflexion larvae (Perciformes: Sciaenidae). *Ichthyol. Res.*, 60(4): 390-395.
- Fischer W., F. Krupp, W. Schneider, C. Sommer, K.E. Carpenter & V.H. Niem. 1995a. Guía FAO para la identificación de peces para los fines de pesca. Pacífico Centro-Oriental. Vol. II. Vertebrados, Parte 1: 647-1200. FAO, Roma.
- Fischer W, F Krupp, W Schneider, C Sommer, KE Carpenter & VH Niem. 1995b. Guía FAO para la identificación de peces para los fines de pesca. Pacífico Centro-Oriental. Vol. III. Vertebrados, Parte 2: 1201-1813. FAO, Roma.
- Godínez, V. M., Sánchez Velasco, L., Beier, E. & Santamaría del Ángel, E. 2016. Datos hidrográficos en la región sur del Golfo de California: Campaña *MARIAS 1603* (2 al 11 de marzo del 2016). Informe técnico 20783. Departamento de Oceanografía Física, CICESE. 66 pp.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball S.L. & deWaard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *P. Roy. Soc. Lond. B*, 270: 313-321. doi 10.1098/rspb.2002.2218
- Hebert, P.D.N., S. Ratnasinghan & deWaard J.R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B (Suppl.)*, 270: S96-S99. doi 10.1098/rsbl.2003.0025
- Hubert, N., Delrieu-Trottin, E., Irisson, J-O., Meyer, C. & Planes, S. 2010. Identifying coral reef fish larvae through DNA barcoding: a test case with the families Acanthuridae and Holocentridae. *Mol. Phyl. Evol.*, 55: 1195–1203.

- Hubert, N., Espiau, B., Meyer, C. & Planes, S. 2015. Identifying the ichthyoplankton of a coral reef using DNA barcodes. *Mol. Ecol. Res.*, 15: 57–67.
- Hyde, J.R., E. Lynn, R. Humphreys, M. Jr. Musyl, A.P. West & R. Vetter. 2005. Shipboard identification of fish eggs and larvae by multiplex PCR, and description of fertilized eggs of blue marlin, shortbill spearfish, and wahoo. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 286:269-277.
- Kelly, R.P., Port, J.A., Yamahara, K.M. & Crowder, L.B. 2014. Using environmental DNA to census marine fishes in a large meso- cosm. *PLoS ONE*, 9: e86175.
- Kendall, A.W., Ahlstrom, E.H. & Moser, H.G. 1984. Early life history stages of fishes and their characters. In: Moser HG, WJ Richards, DM Cohen, MP Fahay, AW Kendall Jr & SL Richardson (eds). *Ontogeny and systematics of fishes*. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Special Publication 1: 11-22. Allen Press, Lawrence.
- Leray, M., Yang, J.Y., Meyer, C.P., Mills, S.C., Agudelo N., Ranwez, V., Boehm, J.T. & 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 Zool.*, 10: 34. <http://www.frontiersinzoology.com/content/10/1/34>
- Leray, M. & Knowlton, N. 2015. DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity. *PNAS*, 112(7): 2076-2081. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1424997112
- Lobo, J., Shokralla, S., Costa, M.H., Hajibabaei, M. & Oliveira-Costa F. 2017. DNA metabarcoding for high-throughput monitoring of estuarine macrobenthic communities. *Sci. Rep.*, 7:15618. <https://doi:10.1038/s41598-017-15823-6>
- Lopera-Barrero, N.M., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Gomes, P.C., Jacometo, C.B. & da Silva-Lopes, T. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. *Cien. Inv. Agr.*, 35(1): 77-86.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J.Y., Sato, K., Minamoto, T., Yamamoto, S., Yamanaka, H., Araki, H., Kondoh, M. & Iwasaki, W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA

- from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.*, 2: 150088.
- Moser, H.G. 1996. The early stages of the fishes in the California Current region. California Coop. Oceanic Fisheries Investigation Atlas No.33. Allen Press, Inc., Lawrence, Kansas.
- Ochoa-Muñoz, M.J., Díaz-Viloria, N., Sánchez-Velasco, L., Jiménez-Rosenberg, S.P.A., & Pérez-Enríquez R. 2018. Molecular identification of *Auxis* spp. larvae (Pisces: Scombridae) from the Gulf of California: Solving morphological identification limits. *Rev. Biol. Mar. y Oceanogr.* 53, 2: 159-171.
- Pavan-Kumar, A., Gireesh-Babu, P. & Lakra WS. 2015. DNA metabarcoding: A new approach for rapid biodiversity assessment. *J. Cell Sci. Molecul. Biol.*, 2(1): 111.
- Ríaz, T., Shehzad, W., Viari, A., Pompanon, F., Taberlet, P. & Coissac E. 2011. ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res.*, 39(21): e145. <https://doi:10.1093/nar/gkr732>.
- Richardson, D.E., D.J. Vanwyne., M.A. Exum., K.R. Cowen & L.D. Crawford. 2007. High throughput species identification: from DNA isolation to bioinformatics. *Mol. Ecol. Notes*, 7: 199-207.
- Satoh, T. P., Miya, M., Mabuchi, K. & Nishida, M. 2016. Structure and variation of the mitochondrial genome of fishes. *BMC Genomics*, 17: 719. <https://doi:10.1186/s12864-016-3054-y>
- Silva-Segudo, C., Funes-Rodríguez, R., Gómez-Gutiérrez, J., Gallegos-Simental, G., Hernández-Trujillo, S. & Blanco-Jarvio, A. En prensa. DNA barcoding and taxonomic validation of *Caranx* spp. larvae. *J. Mar. Biol. Ass. UK*.
- Teletchea, F. 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 19: 265–293.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Møller, P.R., Rasmussen, M. & Willerslev, E. 2012. Detection of a diverse marine fish fauna using eDNA from sea water samples. *PLoS ONE*, 7: e41732.
- Ushio, M., Murakamis, H., Masudas, R., Sado, T., Miya, M., Sakurai, S., Yamanaka, H., Minamoto, T. & Kondoh, M. 2018. Quantitative monitoring of multispecies

- fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2: 1-15, <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.23297>
- Valdivia-Carrillo, T., Rocha-Olivares, A., Reyes-Bonilla, H., Domínguez-Contreras, F. & Munguía-Vega, A. 2021. Integrating eDNA metabarcoding and simultaneous underwater visual surveys to describe complex fish communities in a marine biodiversity hotspot. *Mol. Ecol. Res.* doi: <http://dx.doi.org/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., Oliver, A., Acqueberge, M, Le Brun, M., Møller, P.R., Willerslev, E. & Dejean, T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol. Ecol.*, 25: 929-942, <https://doi.org/10.1111/mec.13428>
- Vásquez-Yeomans, L., Carrillo, L., Morales, S., Malca, E., Morris, Jr. J.A., Schultz, T. & Lamkin, J.T. 2011. First larval record of *Pterois volitans* (Pisces: Scorpaenidae) collected from the ichthyoplankton in the Atlantic. *Biol. Invasions*, 13: 2635–2640.
- Wangensteen, O. S., Palacín, C., Guardiola, M. & Turon X. 2018. DNA metabarcoding of littoral hardbottom communities: high diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ*, 6: e4705. <https://doi.org/10.7717/peerj.4705>.
- Yamamoto, S., Masuda, R., Sato, Y., Sado, T., Araki H., Kondoh M., Minamoto, T. & Miya, M. 2017. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Sci. Rep.*, 7: 40368. <https://doi.org/10.1038/srep40368>.
- Zhang, G.K., Chain, F.J.J., Abbott, C.L. & Cristescu, M.E. 2018. Metabarcoding using multiplexed markers increases species detection in complex zooplankton communities. *Evol. Appl.* 11: 1901-1914. <https://doi.org/10.1111/eva.12694>.

ANEXOS

Anexo A

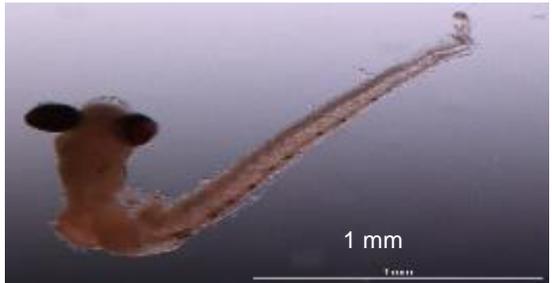
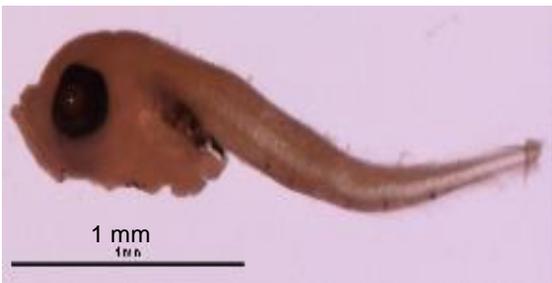
Tabla A. Localización geográfica de las estaciones durante la campaña MARIAS- 1603. Se muestra el número secuencial del lance de CTD, el nombre de la estación, posición geográfica, hora y fecha.

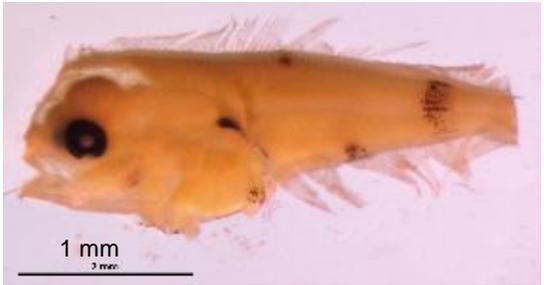
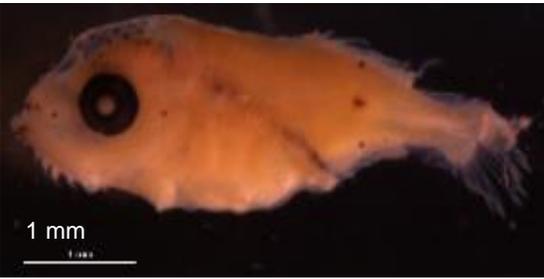
	Lance	Estación	Latitud (°N)	Longitud (°W)	Hora (UT)	Fecha (d/m/a)
1	1	A01	24° 44.60'	109° 19.96'	02:53	2/ 3/2016
2	3	A03	24° 23.37'	108° 58.68'	10:00	2/ 3/2016
3	5	A05	24° 2.29'	108° 38.99'	16:18	2/ 3/2016
4	7	A07	23° 41.81'	108° 18.05'	23:33	2/ 3/2016
5	9	A09	23° 20.94'	107° 57.37'	06:05	3/ 3/2016
6	11	A11	22° 59.74'	107° 36.88'	12:52	3/ 3/2016
7	13	A13	22° 39.07'	107° 15.94'	19:20	3/ 3/2016
8	15	A15	22° 17.67'	106° 55.66'	02:26	4/ 3/2016
9	17	A17	21° 58.60'	106° 33.23'	09:16	4/ 3/2016
10	18	A18	21° 48.20'	106° 22.89'	13:28	4/ 3/2016
11	19	A19	21° 38.04'	106° 12.09'	17:25	4/ 3/2016
12	20	A20	21° 27.60'	106° 1.62'	21:04	4/ 3/2016
13	21	B01	21° 16.05'	105° 56.90'	00:43	5/ 3/2016
14	22	B02	21° 5.20'	105° 56.60'	03:56	5/ 3/2016
15	23	B03	20° 53.26'	105° 53.72'	07:12	5/ 3/2016
16	24	B04	20° 41.54'	105° 50.71'	10:18	5/ 3/2016
17	25	B05	20° 29.52'	105° 47.85'	13:24	5/ 3/2016
18	26	C01	20° 19.31'	105° 44.71'	16:35	5/ 3/2016
19	27	D01	19° 59.51'	105° 33.84'	21:16	5/ 3/2016
20	30	E03	19° 34.93'	105° 40.18'	04:58	6/ 3/2016
21	32	E05	19° 18.90'	106° 0.62'	11:35	6/ 3/2016
22	34	E07	18° 57.50'	106° 30.11'	19:02	6/ 3/2016
23	37	D07	19° 24.17'	106° 42.78'	08:16	7/ 3/2016
24	39	D05	19° 41.05'	106° 10.38'	15:21	7/ 3/2016
25	41	D03	19° 50.97'	105° 50.58'	20:58	7/ 3/2016
26	44	C03	20° 19.91'	106° 6.81'	06:51	8/ 3/2016
27	46	C05	20° 21.20'	106° 36.05'	13:14	8/ 3/2016
28	48	C07	20° 21.84'	107° 14.61'	22:07	8/ 3/2016

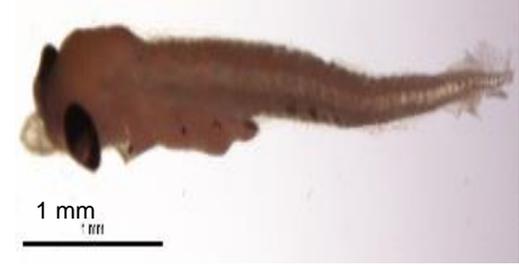
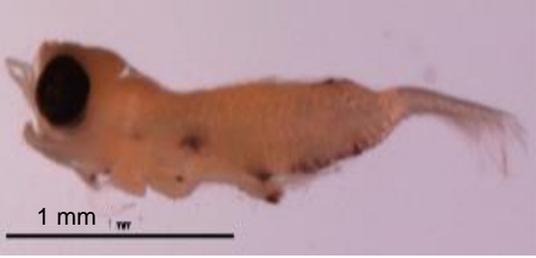
Godínez, Víctor M., Laura Sánchez Velasco, Emilio Beier y Eduardo Santamaría del Ángel. 2016. Datos hidrográficos en la región sur del Golfo de California: Campaña *MARIAS 1603* (2 al 11 de marzo del 2016). Informe técnico 20783. Departamento de Oceanografía Física, CICESE. 66 pp. (Tabla I Modificada)

Anexo B

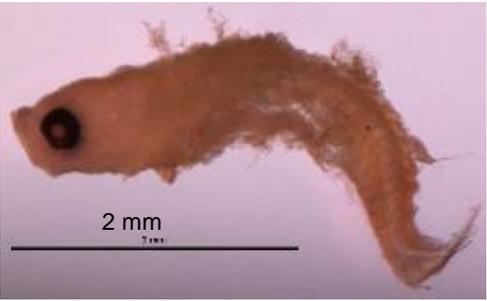
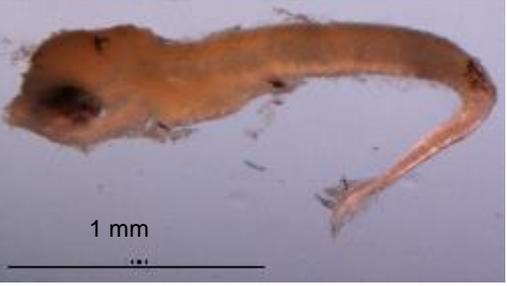
Tabla B. Nombre de la especie, número de larvas y fotos.

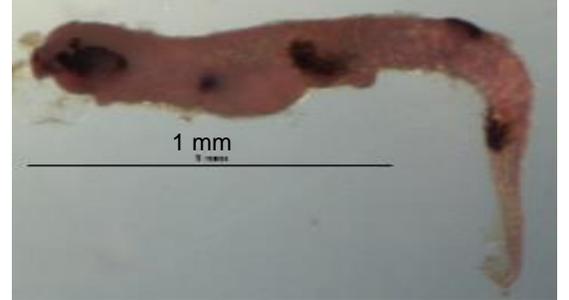
No.	Especie	No.larvas	Foto
1	<i>Auxis</i> spp	10	
2	<i>Benthoosema panamense</i>	7	
3	<i>Bregmaceros bathymaster</i>	421	
4	<i>Chilara</i> sp1	4	

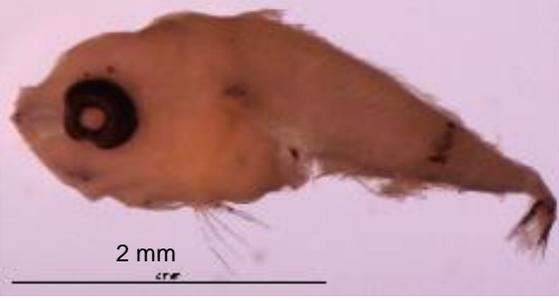
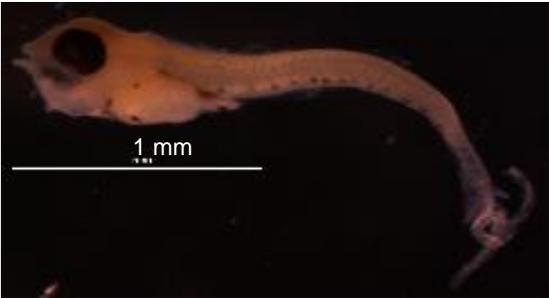
5	<i>Chloroscombrus orqueta</i>	8	
6	<i>Citharichthys platophrys</i>	1	
7	<i>Cubiceps pausiradiatus</i>	3	
8	<i>Diaphus pacificus</i>	9	
9	<i>Diapterus</i> sp1.	3	

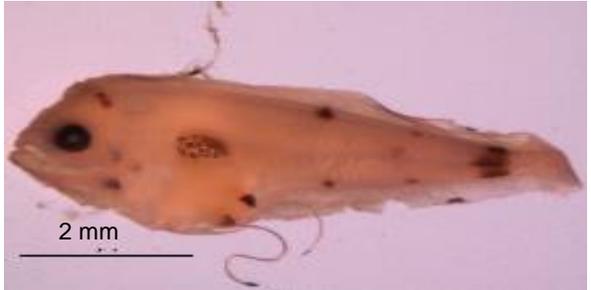
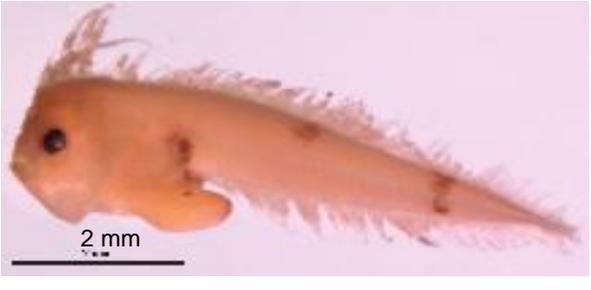
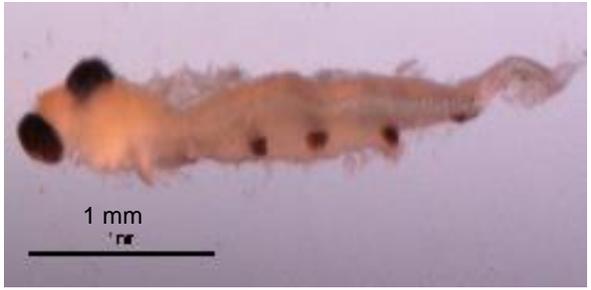
10	<i>Diogenichthys laternatus</i>	44	
11	<i>Diplophos</i> sp1	1	
12	<i>Engraulis mordax</i>	1	
13	Gobiidae tipo 1	1	
14	Gobiidae tipo 2	3	

15	Haemulidae sp1	1	
16	<i>Halichoeres semicinctus</i>	1	
17	Hemiramphidae tipo 1	1	
18	<i>Hyporhamphus</i> sp1.	2	
19	<i>Idiacanthus antrostomus</i>	1	

20	Labridae tipo 1	1	
21	Labridae tipo 2	1	
22	<i>Lampanyctus parvicauda</i>	4	
23	<i>Lepophidium</i> sp1.	1	
24	<i>Lestidiops</i> sp1	1	

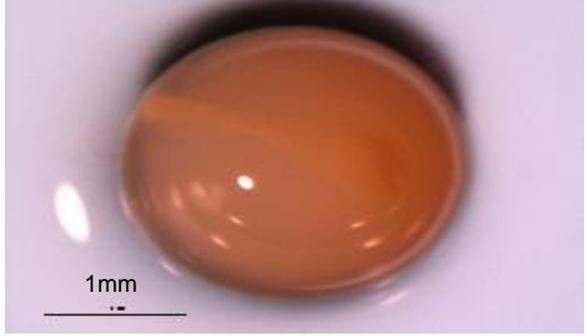
25	<i>Mugil</i> sp1.	1	
26	<i>Ophichthus zophochir</i>	1	
27	Paralepididae tipo 1	5	
28	Paralichthyidae tipo 1	2	
29	<i>Protomyctophum</i> sp1	13	

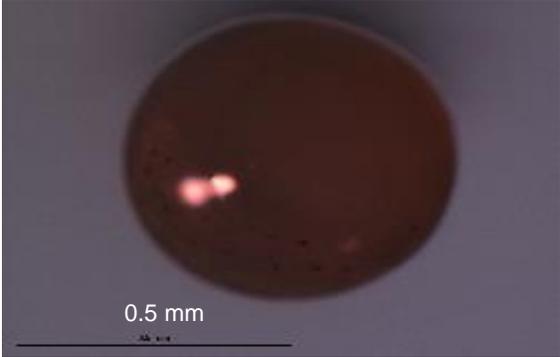
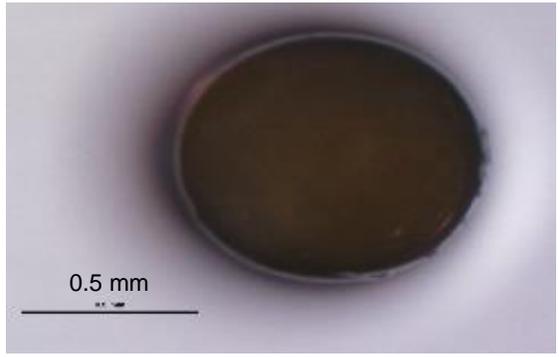
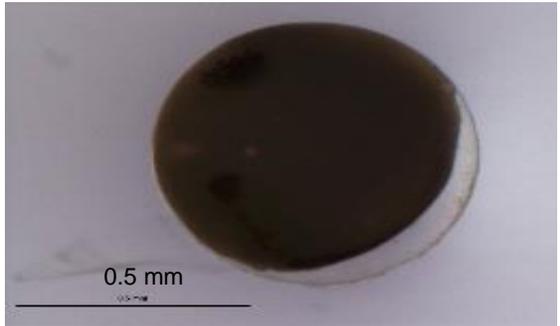
30	<i>Psenes pellucidus</i>	3	
31	<i>Rhinogobiops nicholsii</i>	1	
32	<i>Sardinops sagax</i>	3	
33	<i>Scomber japonicus</i>	4	
34	<i>Scorpaenodes sp1</i>	3	

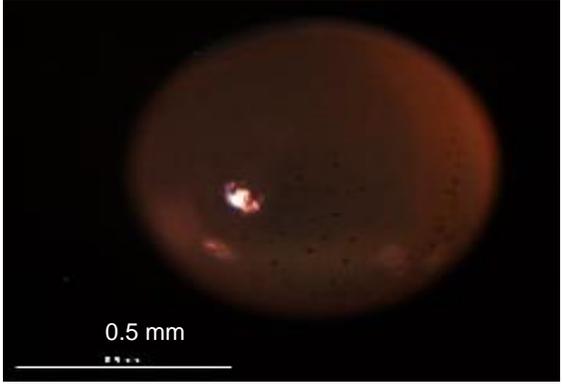
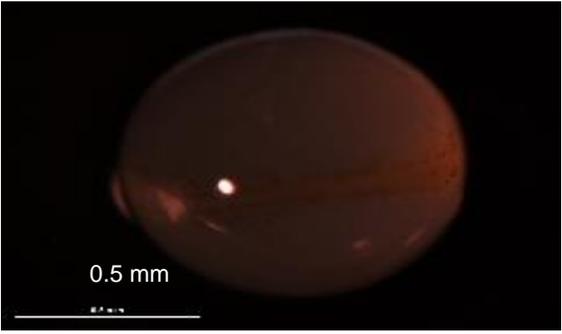
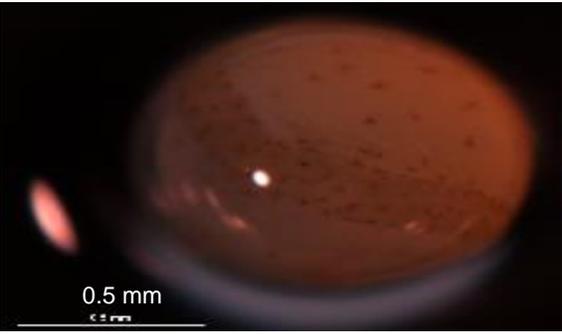
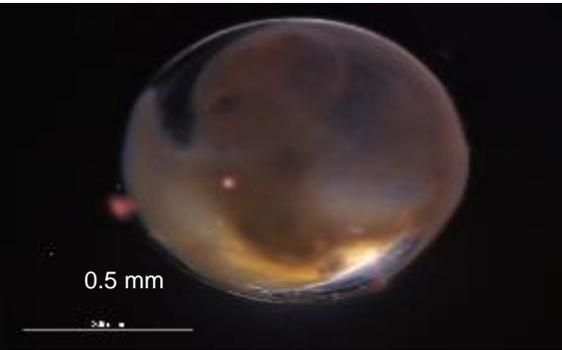
35	<i>Serranus</i> sp1.	1	
36	Sternoptychidae tipo 1	1	
37	<i>Syacium</i> sp1	3	
38	<i>Symphurus</i> sp 1	2	
39	<i>Synodus lucioceps</i>	1	

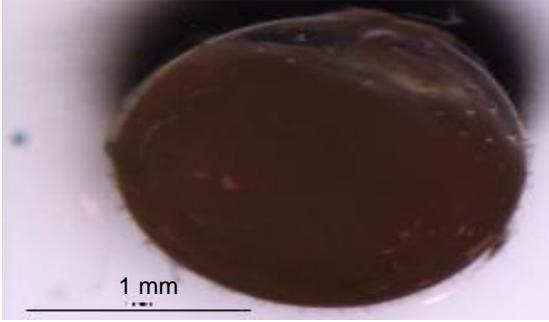
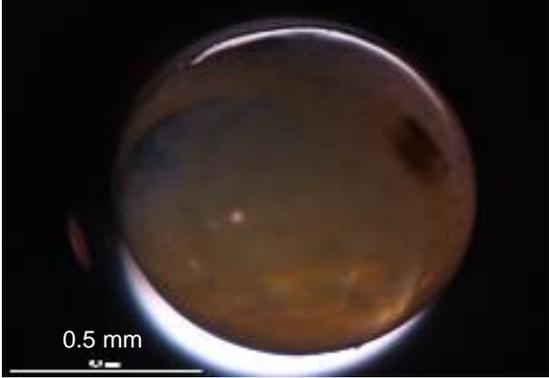
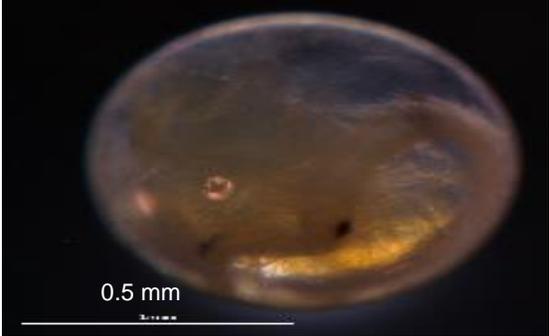
40	<i>Triphoturus mexicanus</i>	2	
41	<i>Vinciguerria lucetia</i>	94	
	Total	670	

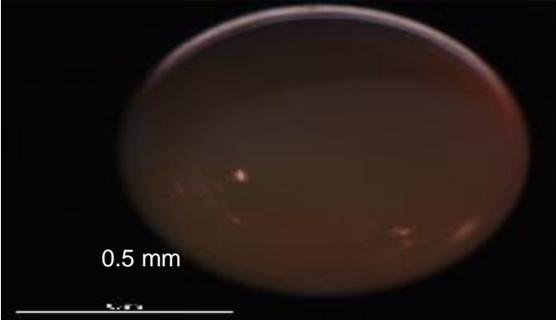
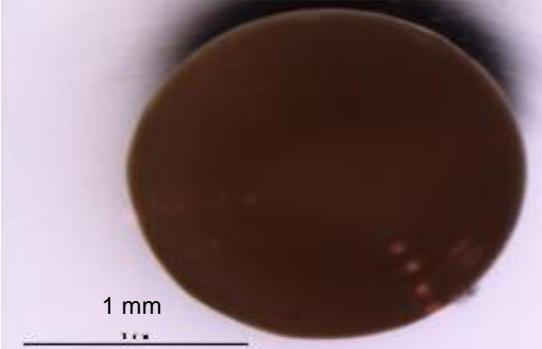
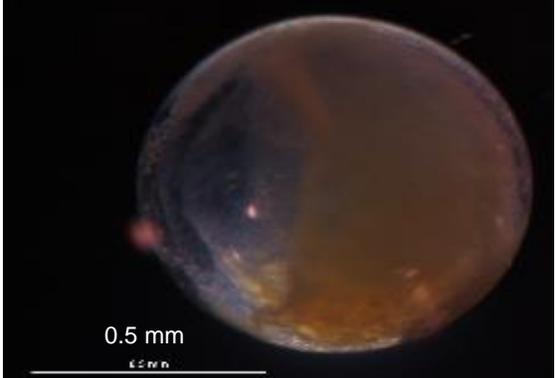
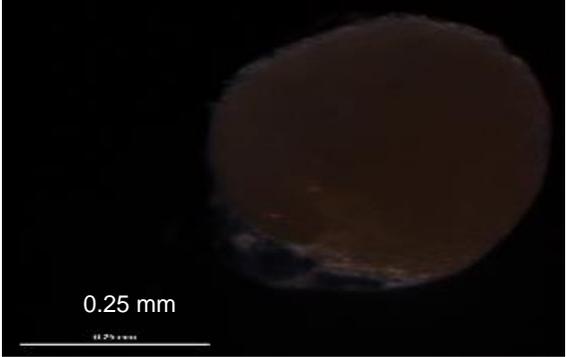
Tabla B.1. Número de huevos Tipo y fotos

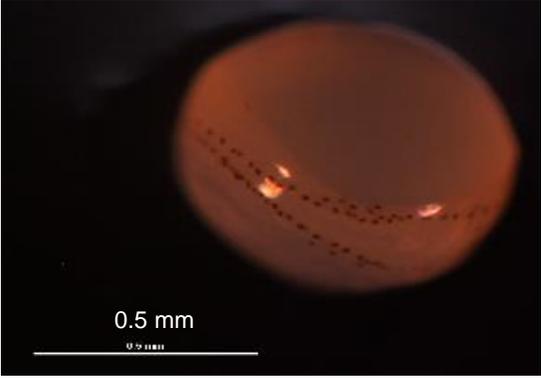
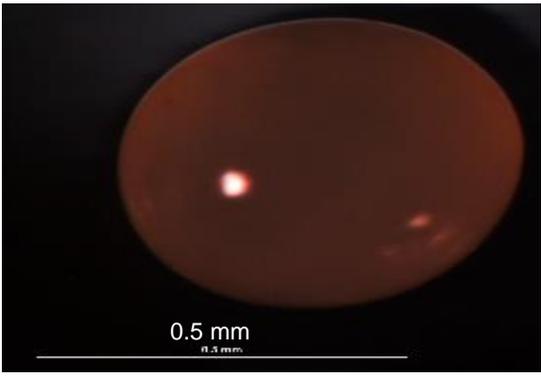
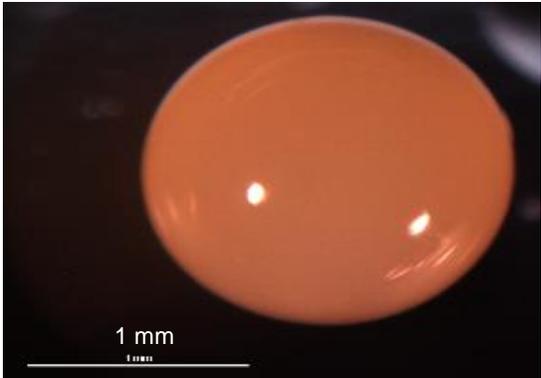
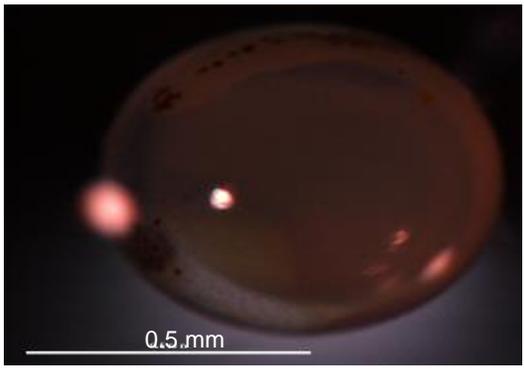
No.	Tipo	No. huevos	Foto
1	Tipo 1 (con filamentos)	1	
2	Tipo 2 (sin espacio perivit)	2	
3	Tipo 3 (con mancha en el cuello)	2	

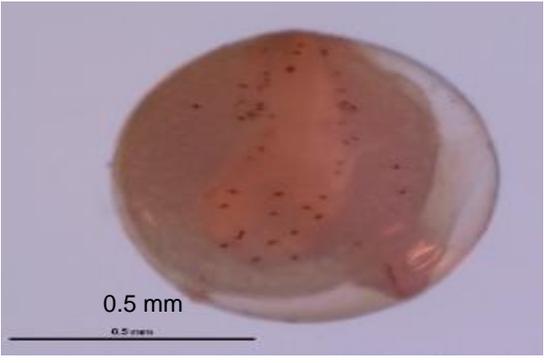
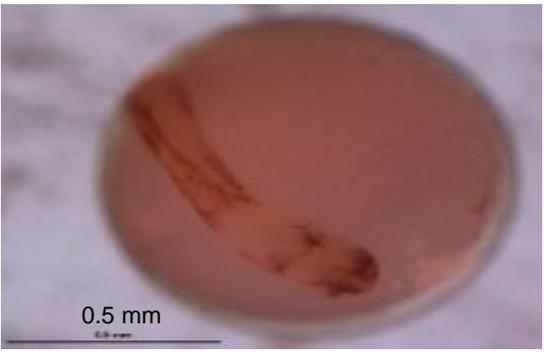
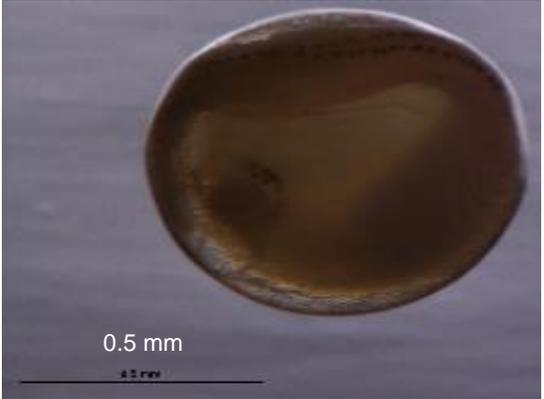
4	<p>Tipo 4 (chicos con doble línea en embrión)</p>	53	
5	<p>Tipo 5 (sin espacio perivit, chico)</p>	1	
6	<p>Tipo 6 (embrión con línea negra dorsal)</p>	5	
7	<p>Tipo 7 (glóbulo pigmentado)</p>	4	SIN FOTO

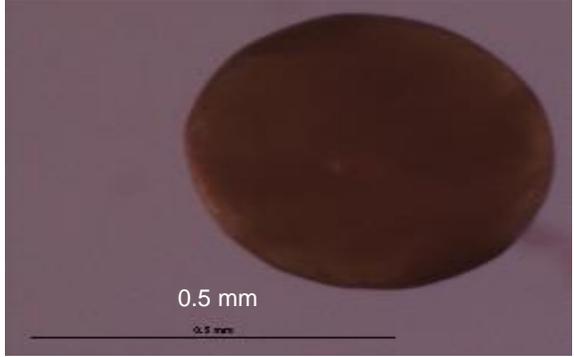
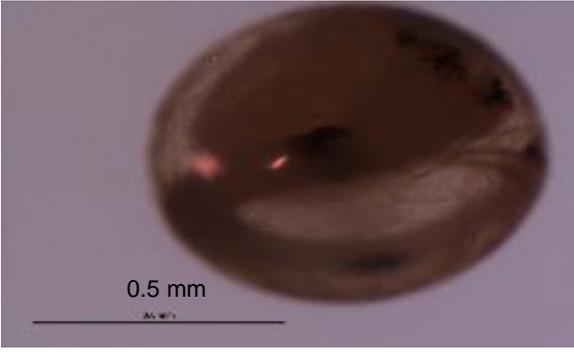
8	<p>Tipo 8 (pigmentos en todo el corión)</p>	2	
9	<p>Tipo 9 (pigmentos en doble línea)</p>	2	
10	<p>Tipo 10 (pigmentos dispersos en todo el corión, mediano)</p>	1	
11	<p>Tipo 11 (con 3 bandas en el cuerpo)</p>	3	

12	<p>Tipo 12 (con espículas chicas, grande)</p>	2	
13	<p>Tipo 13 (con espículas grandes, grande)</p>	1	
14	<p>Tipo 14 (corión pigmentado y banda)</p>	2	
15	<p>Tipo 15 (sin corión pigmentado y banda)</p>	1	

16	<p>Tipo 16 (sin pigmentos)</p>	3	
17	<p>Tipo 17 (sin pigmentos, grande)</p>	1	
18	<p>Tipo 18 (cabeza pigmentada)</p>	1	
19	<p>Tipo 19 (sin pigmento, chico)</p>	10	

20	<p>Tipo 20 (posible <i>Scomber</i>)</p>	1	
21	<p>Tipo 21 (mini-<i>Scomber</i>)</p>	5	
22	<p>Tipo 22 (grande)</p>	1	
23	<p>Tipo 23 (chico con glóbulo y dorso pigmentado)</p>	4	

24	Tipo 24 (chico)	1	
25	Tipo 25 (mediano)	1	
26	Tipo 26 (grande)	1	
27	Tipo 27 (<i>Scomber japonicus</i>)	47	

28	Tipo 28 (<i>Vinciguerrria lucetia</i>)	62	
29	Tipo 29 (bandas)	1	
30	Tipo 30 (chico con manchas)	1	
	Total	222	
	Sin embrión	100	
	Destruído	14	

Anexo C

Tabla C. Se construyó una librería con los productos de PCR1, a partir de las diluciones 1:10, utilizando los siguientes índices como etiquetas:

kit index 8 bases	
Index i5	Base sequence
FD	CCACTAAG
FE	TGTTCCGT
FG	AGCCGTAA
Index i7	Base sequence
R1	TCACCTAG
R2	CAAGTCGT
R3	CTGTATGC
R4	AGTTCGCA
R5	ATCGGAGA
R6	AAGTCCTC
R7	TGGATGGT
R8	AGGTGTTG
R9	GACGAACT
R10	GTTCTTCG
R11	TTCGCCAT
R12	CAACTCCA

Tabla C.1. Las combinaciones para cada estación (muestra) son las siguientes: Combinaciones de primer's F y R con Index para la 2da. PCR, para secuenciación en plataforma Illumina de las 26 muestras de Marías1603, más dos controles positivos (CP) y un control negativo (CN).

Muestra	Forward Index 8bp i5	Reverse Index 8bp i7
1	FD	R1
2	FD	R2
3	FD	R3
4	FD	R4
5	FD	R5
6	FD	R6
7	FD	R7
8	FD	R8
9	FD	R9
10	FD	R10
11	FD	R11
13	FD	R12

14	FE	R1
15	FE	R2
16	FE	R3
17	FE	R4
18	FE	R5
19	FE	R6
20	FE	R7
21	FE	R8
22	FE	R9
23	FE	R10
24	FE	R11
25	FE	R12
26	FG	R1
27	FG	R2
CP	FG	R3
CP	FG	R4
CN	FG	R5

NOTA: *La muestra 12 y 28 no se incluyeron, ya que no dieron resultados positivos en análisis de PCR. En esta ocasión se correrá como control positivo (CP), la comunidad artificial (Mock) que se construyó a partir de organismos de la región del Golfo de California y zona adyacente al Pacífico Mexicano.

Anexo D

Tabla C. Lista de 20 especies que conforman la comunidad artificial (mock) como control positivo, que se construyó a partir de organismos de la región del Golfo de California y zona adyacente al Pacífico Mexicano. Especies donadas: del número 1 al 4: Instituto de Biología de la UNAM; del 5 al 8: Colección personal del Dr. Adrián Felipe González Acosta (CICIMAR-IPN); del 9 al 20: Colección del Curso de Ictiología Especial (CICIMAR-IPN).

LISTA DE 20 ESPECIES DEL CONTROL POSITIVO (MOCK)			
No.	ORDEN	FAMILIA	GÉNERO/ESPECIE
1	MUGILIFORMES	MUGILIDAE	<i>Mugil cephalus</i>
2	CARANGIFORMES	CARANGIDAE	<i>Oligoplites saurus</i>
3	SCORPAENIFORMES	SCORPAENIDAE	<i>Sebastes saxicola</i>
4	ACANTHURIFORMES	SCIAENIDAE	<i>Ophioscion scierus</i>
5	BLENNIIFORMES	LABRISOMIDAE	<i>Labrisomus xanti</i>
6	PERCIFORMES	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus viridis</i>
7	ACANTHURIFORMES	SCIAENIDAE	<i>Pareques viola</i>
8	TETRAODONTIFORMES	BALISTIDAE	<i>Balistes polylepis</i>
9	RAJIFORMES	UROLOPHIDAE	<i>Urobatis halleri</i>
10	CLUPEIFORMES	ENGRAULIDAE	<i>Anchoa nasus</i>
11	MUGILIFORMES	MUGILIDAE	<i>Mugil curema</i>
12	BELONIFORMES	EXOCOETIDAE	<i>Prognichthys tringa</i>
13	BELONIFORMES	EXOCOETIDAE	<i>Exocoetus monocirrus</i>
14	PLEURONECTIFORMES	PARALICHTHYDAE	<i>Etropus crossotus</i>
15	SYNGNATHIFORMES	SYNGNATHIDAE	<i>Syngnathus auliscus</i>
16	PERCIFORMES	GERREIDAE	<i>Diapterus brevirostris</i>
17	PERCIFORMES	GERREIDAE	<i>Eucinostomus currani</i>
18	PERCIFORMES	MULLIDAE	<i>Mulloidichthys dentatus</i>
19	PERCIFORMES	POMACANTHIDAE	<i>Pomacanthus zonipectus</i>
20	TETRAODONTIFORMES	TETRAODONTIDAE	<i>Sphoeroides annulatus</i>

1-4 IB UNAM

5-8 DR.ADRIAN F. GONZALEZ ACOSTA

9-20 COLECCIÓN ICTIOLOGIA JUNIO 2019

Anexo E

Reporte por parte de Novogene

1. Control de Calidad de la librería

1.1 Se emplearon tres métodos para verificar el control de calidad de la librería:

- (1) Qubit 2.0: prueba la concentración de la librería preliminarmente.
- (2) Agilent 2100: prueba el tamaño del inserto.
- (3) Q-PCR: cuantifica la concentración efectiva de la librería con precisión.

1.2 Las librerías calificadas se introdujeron al secuenciador de Illumina después de agruparlas de acuerdo con su concentración efectiva y el volumen de datos esperados.

2. Control de Calidad de datos

2.1 Distribución de la calidad de secuenciación

La "e" representa la tasa de error de secuencia y Qphred representa el valor de calidad base, $Q_{phred} = -10\log_{10}(e)$. La relación entre la tasa de error de secuenciación (e) y el valor de calidad base (Qphred) es el siguiente:

Phred score	error base	right base	Q-score
10	1/10	90%	Q10
20	1/100	99%	Q20
30	1/1000	99.9%	Q30
40	1/10000	99.99%	Q40

Los resultados se encontraron entre Q30 y Q20, no siendo menor el valor de la calidad al 80%. Q30 significa que existe una probabilidad de que 1 de cada 1000 bases se haya colocado incorrectamente en el momento de la secuenciación. La distribución de los score a lo largo de las lecturas para cada muestra (estación de muestreo), se aprecian en la Tabla de resumen de calidad de datos.

Resumen de la información de secuencia de datos

La salida total de datos en el secuenciador: datos sin procesar 167.8 G.

Las estadísticas detalladas para la calidad de los datos de secuenciación se muestran en la siguiente tabla

Tabla: Resumen de calidad de datos

Sample	Library	Flowcell/ Lane	Raw reads	Raw data (G)	Effective (%)	Error (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
FGR5	CKDL20014828 5-1a-5UDI219- 7UDI250	H7TL3C CX2_L7	3445604	0.5	99.99	0.02	93.96	87.17	46.14
FDR5	CKDL20014828 5-1a-5UDI219- AK4235	H7TL3C CX2_L7	31195472	4.7	99.99	0.02	94.06	86.76	50.73
FER5	CKDL20014828 5-1a-5UDI219- AK4236	H7TL3C CX2_L7	45311250	6.8	99.99	0.02	94.99	89.04	49.71
FGR3	CKDL20014828 5-1a-5UDI265- 7UDI250	H7TL3C CX2_L7	20044906	3.0	99.99	0.02	94.20	86.98	47.17
FDR3	CKDL20014828 5-1a-5UDI265- AK4235	H7TL3C CX2_L7	29400214	4.4	99.99	0.02	94.28	86.70	49.54
FER3	CKDL20014828 5-1a-5UDI265- AK4236	H7TL3C CX2_L7	34695904	5.2	99.99	0.02	93.72	85.91	49.25
FGR1	CKDL20014828 5-1a-AK2831- 7UDI250	H7TL3C CX2_L7	23463102	3.5	99.99	0.02	94.36	87.28	51.23
FDRI	CKDL20014828 5-1a-AK2831- AK4235	H7TL3C CX2_L7	28115478	4.2	99.99	0.02	94.49	88.00	45.84
FER1	CKDL20014828 5-1a-AK2831- AK4236	H7TL3C CX2_L7	35638944	5.3	99.99	0.02	94.64	88.47	46.95
FGR2	CKDL20014828 5-1a-AK5426- 7UDI250	H7TL3C CX2_L7	17934448	2.7	99.99	0.02	94.28	87.76	38.39
FDR2	CKDL20014828 5-1a-AK5426- AK4235	H7TL3C CX2_L7	24183914	3.6	99.99	0.02	94.02	86.73	43.24

FER2	CKDL20014828 5-1a-AK5426- AK4236	H7TL3C CX2_L7	29587260	4.4	99.99	0.02	93.96	85.87	52.38
FDR12	CKDL20014828 5-1a-AK6249- AK4235	H7TL3C CX2_L7	34230726	5.1	99.99	0.02	94.36	86.74	49.76
FER12	CKDL20014828 5-1a-AK6249- AK4236	H7TL3C CX2_L7	31107410	4.7	99.99	0.02	94.30	87.57	43.68
FDR9	CKDL20014828 5-1a-AK6296- AK4235	H7TL3C CX2_L7	25490184	3.8	99.99	0.02	94.63	88.06	50.57
FER9	CKDL20014828 5-1a-AK6296- AK4236	H7TL3C CX2_L7	28958750	4.3	99.99	0.02	94.41	87.71	47.62
FDR8	CKDL20014828 5-1a-AK7085- AK4235	H7TL3C CX2_L7	30449472	4.6	99.99	0.03	92.96	84.26	52.28
FER8	CKDL20014828 5-1a-AK7085- AK4236	H7TL3C CX2_L7	32367926	4.9	99.99	0.03	93.01	84.95	45.48
FDR6	CKDL20014828 5-1a-AK763- AK4235	H7TL3C CX2_L7	23046434	3.5	99.99	0.02	94.64	87.86	49.02
FER6	CKDL20014828 5-1a-AK763- AK4236	H7TL3C CX2_L7	33970962	5.1	99.99	0.02	94.16	87.64	40.83
FGR4	CKDL20014828 5-1a-AK840- 7UDI250	H7TL3C CX2_L7	21116884	3.2	99.99	0.02	94.78	88.45	47.02
FDR4	CKDL20014828 5-1a-AK840- AK4235	H7TL3C CX2_L7	26004998	3.9	99.99	0.02	93.98	87.34	39.12
FER4	CKDL20014828 5-1a-AK840- AK4236	H7TL3C CX2_L7	22615492	3.4	99.99	0.02	93.92	86.64	48.53
FDR7	CKDL20014828 5-1a-AK8571- AK4235	H7TL3C CX2_L7	31525328	4.7	99.99	0.02	94.42	87.66	45.48
FER7	CKDL20014828 5-1a-AK8571- AK4236	H7TL3C CX2_L7	27538250	4.1	99.99	0.02	94.19	87.67	41.99

FDR11	CKDL20014828 5-1a-AK9170- AK4235	H7TL3C CX2_L7	30607724	4.6	99.99	0.02	93.95	86.41	52.19
FER11	CKDL20014828 5-1a-AK9170- AK4236	H7TL3C CX2_L7	33701176	5.1	99.99	0.02	94.06	87.34	40.88
FDR10	CKDL20014828 5-1a-AK9404- AK4235	H7TL3C CX2_L7	28882248	4.3	99.99	0.02	94.12	87.17	46.36
FER10	CKDL20014828 5-1a-AK9404- AK4236	H7TL3C CX2_L7	31729368	4.8	99.99	0.02	94.14	87.76	37.63
Undeter mined_L 7	Undetermined_L 7	H7TL3C CX2_L7	30291252 2	45.4					

Sample: nombre de la muestra

Raw Reads: Lecturas sin procesar; se toman cuatro filas como una unidad para calcular la cantidad total de read1 y read2 en archivos de datos sin procesar

Bases sin procesar: (lecturas sin procesar totales) * (longitud de secuencia), calculando en G

Tasa de error: tasa de error base

Q20, Q30: (Recuento base del valor de Phred > 20 o 30) / (Recuento base total)

Contenido de GC: (recuento base G&C) / (recuento base total)

Anexo F

Pipeline Metabarcoding de ADN (Modificado Wangenstein *et al.*, 2018)

1. Recorte de primers

##Forward

```
fastx_trimmer -f 22 -i FDR10_CKDL200148285-1a-AK9404-AK4235_H7TL3CCX2_L7_1.fq -o  
FDR10_np_R1.fq
```

Reverse

```
fastx_trimmer -f 28 -i FDR10_CKDL200148285-1a-AK9404-AK4235_H7TL3CCX2_L7_2.fq -o  
FDR10_np_R2.fq
```

2. Alineamiento de lecturas, filtro por calidad, longitud y bases ambiguas

```
illuminapairedend -r /var/novogene/FDR10/FDR10_np_R2.fq  
/var/novogene/FDR10/FDR10_np_R1.fq | obigrep -p 'score>30.00' | obigrep -l 165 -L 185 -s  
'^[ACGT]+$' --fasta-output > FDR10_filtered_length.fasta
```

3. Filtrar mismatches del alineamiento

```
obigrep -p 'seq_a_mismatch<1' -p 'seq_b_mismatch<1' FDR10_filtered_length.fasta >  
./mismatch_filter/FDR10_nm.fasta
```

4. Juntar y contar secuencias repetidas, reporta secuencias representativas y su abundancia

```
obiuniq FDR10_nm.fasta > FDR10_nm_unique.fasta
```

5. Contar las secuencias de un archivo fasta

```
grep -c '>' FDR10_nm_unique.fasta
```

6. Cambiar a formato VSEARCH

```
owi_obisample2vsearch -i FDR10_nm_unique.fasta
```

se obtiene: FDR10_nm_unique.vsearch.fasta

7. Detección de quimeras

```
vsearch --uchime_denovo FDR10_nm_unique.vsearch.fasta --sizeout --minh 0.90 --
nonchimeras FDR10.nonchim.fasta --chimeras FDR10.chim.fasta --uchimeout
FDR10.uchimeout.txt
```

8. Crear identificador para cada secuencia representativa

```
obiannotate --seq-rank FDR10_nm_unique.fasta | obiannotate --set-identifier
"'FDR10'_%07d" % seq_rank' > ./annotated/FDR10_annot.fasta
```

9. Crear tabla de abundancia de las secuencias representativas

```
obitab -o FDR10_annot.fasta > FDR10_annot.tab
```

10. Regresar a formato VSEARCH usando los nuevos identificadores

```
owi_obifasta2vsearch -i FDR10_annot.fasta -o ../SWARM/FDR10_annot_vsearch.fasta
tr -d 'c' <FDR10_annot_vsearch.fasta> FDR10_correct_vsearch.fasta
```

11. Correr SWARM

```
swarm -d 1 -f -z -t 20 -o FDR10d1_output -s FDR10d1_stats -w FDR10d1_seeds.fasta
FDR10_correct_vsearch.fasta
```

12. Contar número de seeds

```
wc -l FDR10d1_stats
```

13. Quitar singletons y recontar

```
sed -i 's/size/ size/g' FDR10d1_seeds.fasta
obigrep -p 'size>1' FDR10d1_seeds.fasta > FDR10d1_nonsingleton.fasta
grep -c '>' FDR10d1_nonsingleton.fasta
```

14. Generar tablas de abundancia de MOTUS en cada muestra

```
obitab -o FDR10d1_nonsingleton.fasta > FDR10d1_ns.tab
```

15. Crear base de datos

```
### 15.1. Descargar secuencias de genbank: 12SrRNA "bony fishes", formato genbank
### Guardado como 12SrRNA_fish_genbank.gb
### 15.2. Descargar taxonomía completa de genbank
mkdir TAXO
cd TAXO/
wget ftp://ftp.ncbi.nih.gov/pub/taxonomy/taxdump.tar.gz
tar -zxvf taxdump.tar
### 15.3. Crear base de datos para ecoPCR
obiconvert -t TAXO/ --ecopcrdb-output Fish_12S --skip-on-error 12SrRNA_fish_genbank.gb
### 15.4. Correr ecoPCR
ecoPCR -d Fish_12S -e 2 -l 165 -L 185 GTCGGTAAACTCGTGCCAGC
CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG > nadia_pcr.ecopcr
### 15.5. Crear archivo con secuencias de referencia usando solo los genes 'amplificados'
obiconvert -d Fish_12S --ecopcr --fasta-output nadia_pcr.ecopcr > nadia_pcr.fasta
### 15.6. Crear etiquetas unicas para las secuencias de referencia
obiannotate --uniq-id nadia_pcr.fasta > nadia_unique.fasta

### 16. Asignación taxonómica con ecotag y generar tabla de especies
ecotag -d ../Fish_12S -R ../nadia_unique.fasta --sort=size -m 0.99 -r
../mismatch_filter/SWARM/nonsingleton/FDR10d1_nonsingleton.fasta >
FDR10_ecotag_99.fasta
obitab -o FDR10_ecotag_99.fasta > FDR10_ecotag_99.tab
```

Anexo G

Tabla G. Lista de especies de peces identificadas en este estudio a través de metabarcoding de ADN de comunidades del ictioplancton. Comparadas con otros estudios basados en identificación estrictamente morfológica de larvas de peces (Avendaño-Ibarra *et al.*, 2014), identificación molecular por barcoding de ADN de huevos y larvas de peces (Ahern *et al.*, 2018) y metabarcoding de ADN ambiental en muestras de agua de mar (Valdivia-Carrillo *et al.*, 2021) registradas en el Golfo de California y zona adyacente al Pacífico Mexicano.

TAXA	18	20 GENEROS/ 17 ESPECIES	TAXID	Avendaño- Ibarra <i>et al.</i> (2014)	Ahern <i>et al.</i> (2018)	Valdivia- Carrillo <i>et al.</i> (2021)
MOTUs	FAMILIA	Riqueza motu				
1	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>	319751	X		
2	STOMIIDAE	<i>Stomias atriventer</i>	320411	X		
3	MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>	242287	X	X	
4	POMACENTRIDAE	<i>Stegastes rectifraenum</i>	1268096	X	X	X
5	MUGILIDAE	<i>Mugil curema</i>	48194	X	X	X
6	EXOCOETIDAE	<i>Exocoetus volitans</i>	143332	X		
7	EXOCOETIDAE		76072	X		
8	NEMATISTIIDAE	<i>Nematistius pectoralis</i>	173244	X	X	
9	ECHENEIDAE	<i>Phtheichthys lineatus</i>	641294			
10	CARANGIDAE	<i>Selar crumenophthalmus</i>	146146	X	X	X
11	CARANGIDAE	<i>Seriola rivoliana</i>	173321	X	X	
12	XIPHIIDAE	<i>Xiphias gladius</i>	8245			
13	FISTULARIIDAE	<i>Fistularia commersonii</i>	215343	X	X	X
14	GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>	13543	X		
15	SCOMBRIDAE	<i>Auxis rochei</i>	217026	X	X	X
16	SCOMBRIDAE	<i>Auxis</i> spp	13352	X	X	X
17	SCOMBRIDAE	<i>Scomberomorus sierra</i>	99346	X		X
18	SCOMBRIDAE	<i>Thunnus</i> spp	8234	X	X	X
19	NOMEIDAE	<i>Cubiceps</i> sp	316138	X	X	X
20	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus guttatus</i>	455479	X	X	
21	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp1	40505	X	X	X
22	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp2	40505	X	X	X
23	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus</i> sp3	396787	X	X	X
24	SCORPAENIDAE	<i>Sebastes</i> sp1	34820	X		X
25	SCORPAENIDAE	<i>Sebastes</i> sp2	34820	X		X
26	BALISTIDAE		31024	X		X
27	TETRAODONTIDAE	<i>Sphoeroides annulatus</i>	168377	X		X

Anexo H

Tabla H. Lista de especies identificadas por el método morfológico (a) y el método molecular (b). ND: no detectadas.

a) Método tradicional morfológico

b) Método molecular

#a	FAMILIA	ESPECIES	#b	FAMILIA	ESPECIES
1	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>	1	OPHICHTHIDAE	<i>Ophichthus zophochir</i>
2	STOMIIDAE	<i>Idiacanthus antrostomus</i>		STOMIIDAE	ND
		ND	2		<i>Stomias atriventer</i>
3	MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>	3	MYCTOPHIDAE	<i>Triphoturus mexicanus</i>
4		<i>Benthoosema panamense</i>			ND
5		<i>Diaphus pacificus</i>			ND
6		<i>Diogenichthys laternatus</i>			ND
7		<i>Lampanyctus parvicauda</i>			ND
8		<i>Protomyctophum</i> sp1			ND
9	MUGILIDAE	<i>Mugil</i> spp.	4	MUGILIDAE	ND
		ND			<i>Mugil curema</i>
10	CARANGIDAE	<i>Chloroscombrus orqueta</i>		CARANGIDAE	ND
		ND	5		<i>Seriola rivoliana</i>
		ND	6		<i>Selar crumenophthalmus</i>
11	SCOMBRIDAE	<i>Auxis</i> spp	7	SCOMBRIDAE	<i>Auxis</i> spp
12		<i>Scomber japonicus</i>			ND
		ND	8		<i>Auxis rochei</i>
		ND	9		<i>Thunnus</i> spp
		ND	10		<i>Scomberomorus sierra</i>
13	NOMEIDAE	<i>Cubiceps pausiradiatus</i>		NOMEIDAE	ND
		ND	11		<i>Cubiceps</i> sp.
14		<i>Psenes pellucidus</i>			ND
15	SCORPAENIDAE	<i>Scorpaenodes</i> spp		SCORPAENIDAE	ND
		ND	12		<i>Sebastes</i> sp1
		ND	13		<i>Sebastes</i> sp2
16	ENGRAULIDAE	<i>Engraulis mordax</i>			ND
17	CLUPEIDAE	<i>Sardinops sagax</i>			ND
18	GONOSTOMATIDAE	<i>Diplophos</i> spp			ND

19	STERNOPTYCHIDAE	-	ND
20	PHOSICHTHYIDAE	<i>Vinciguerria lucetia</i>	ND
21	SYNODONTIDAE	<i>Synodus lucioceps</i>	ND
22	PARALEPIDIDAE	<i>Lestidiops</i> spp	ND
23		-	ND
24	BREGMACEROTHIDAE	<i>Bregmaceros bathymaster</i>	ND
25	OPHIDIIDAE	<i>Chilara</i> spp	ND
26		<i>Lepophidium</i> sp.	ND
27	GOBIIDAE	<i>Rhinogobiops nicholsii</i>	ND
28		-	ND
29		-	ND
30	HEMIRAMPHIDAE	<i>Hyporhamphus</i> spp	ND
31		-	ND
32	PARALICHTHYIDAE	<i>Citharichthys platophrys</i>	ND
33		<i>Syacium</i> sp1	ND
34		-	ND
35	CYNOGLOSSIDAE	<i>Symphurus</i> sp	ND
36	LABRIDAE	<i>Halichoeres semicinctus</i>	ND
37		-	ND
38		-	ND
39	GERREIDAE	<i>Diapterus</i> spp	ND
40	SERRANIDAE	<i>Serranus</i> spp	ND
41	HAEMULIDAE	-	ND
		ND	14 POMACENTRIDAE <i>Stegastes rectifraenum</i>
		ND	15 EXOCOETIDAE <i>Exocoetus volitans</i>
		ND	16 -
		ND	17 NEMATISTIIDAE <i>Nematistius pectoralis</i>
		ND	18 ECHENEIDAE <i>Phtheirichthys lineatus</i>
		ND	19 XIPHIIDAE <i>Xiphias gladius</i>
		ND	20 FISTULARIIDAE <i>Fistularia commersonii</i>

ND	21	GEMPYLIDAE	<i>Gempylus serpens</i>
ND	22	LUTJANIDAE	<i>Lutjanus sp1</i>
ND	23		<i>Lutjanus sp2</i>
ND	24		<i>Lutjanus sp3</i>
ND	25		<i>Lutjanus guttatus</i>
ND	26	BALISTIDAE	-
ND	27	TETRAODONTIDAE	<i>Sphoeroides annulatus</i>
