

Elaboró: Adrian Munguia-Vega
airdrian@arizona.edu
28 Junio 2021

Reporte final

ANÁLISIS DE MUESTRAS DE ADN AMBIENTAL MARINO EN AGREGACIONES REPRODUCTIVAS DE MERO ESTRIADO (*Epinephelus striatus*) EN SIAN KA AN DURANTE EL 2020



Antecedentes

Como parte de las actividades del proyecto, realicé una visita de 1 semana a la comunidad de Punta Allen en Quintana Roo del 13 al 20 de Enero 2020 donde se llevo a cabo una capacitación en la toma y filtrado de muestras de agua para análisis de ADN ambiental para el personal de COBI y pescadores locales. Debido al mal tiempo fue posible realizar tan solo una inmersión scuba en la agregación reproductiva dentro del refugio pesquero de Niche Habin el día 19 Enero 2020. Durante la inmersión la visibilidad no era buena (<5 m) y aunque fue posible observar algunas decenas de meros estriados en el sitio se desconoce cuantos individuos había en ese momento en la agregación. Se recolectaron 3 replicas de 1 Litro cada una a 25 m de profundidad y un control negativo que fueron analizados.

El 17 de Febrero del 2020 el equipo de COBI junto con los pescadores locales realizaron un muestreo adicional en la agregación reproductiva en Niche Habin. Durante esa inmersión estimaron una abundancia de 1400 meros y una visibilidad de almenos 25 m. Registraron coloración bicolor, pálido, y negros, así como conducta de cortejo aunque no presenciaron el desove. Se colectaron 3 muestras de agua de 1 L a 25 metros de profundidad.

Adicionalmente, los pescadores de Punta Allen ayudaron en la colecta de 19 muestras individuales de aleta de mero estriado, las cuales fueron recibidas entre Noviembre del 2020 y Marzo del 2021. Las muestras fueron utilizadas para diseñar la prueba de PCR específica para medir presencia, abundancia y conectividad genética del mero estriado. A continuación se describen las actividades realizadas y los principales resultados y sus implicaciones.

1) Diseño de prueba de PCR para detectar presencia y medir diversidad y conectividad genética empleando la región control mitocondrial de *E. striatus*

Métodos: Se realizó la extracción de ADN de 19 muestras individuales de mero estriado con el kit DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN), y la amplificación mediante PCR de la región control mitocondrial completa o D-loop (~1,500 pb) con los primers A forward (Lee et al. 1995) y Simt12 (Kuriwa et al. 2007). Se incluyeron dos muestras de mero rojo (*E. morio*) y una muestra de cabrilla colorada (*E. guttatus*), las cuales son las dos especies filogenéticamente más cercanas a *E. striatus* (Craig & Hastings 2007), con el objetivo de asegurarse que las pruebas diseñadas no amplificaran en especies cercanas. Estas muestras de *E. morio* y *E. guttatus* fueron identificadas previamente mediante la amplificación del gen COI en un estudio independiente (Munguia-Vega 2019). Las amplificaciones fueron secuenciadas en un secuenciador Sanger Applied Biosystems 3730 XL. Las secuencias resultantes fueron editadas, alineadas con el software CLC genomics workbench en presencia de las secuencias disponibles en GenBank de 5 especies relativamente cercanas del género *Epinephelus* y empleadas para diseñar 12 juegos de primers en 6 regiones únicas del D-loop (Fig. 1). Los primers fueron sintetizados y probados con ADNs de *E. striatus*, *E. morio* y *E. guttatus*, así como con las muestras de ADN ambiental colectadas en Enero y Febrero del 2020.

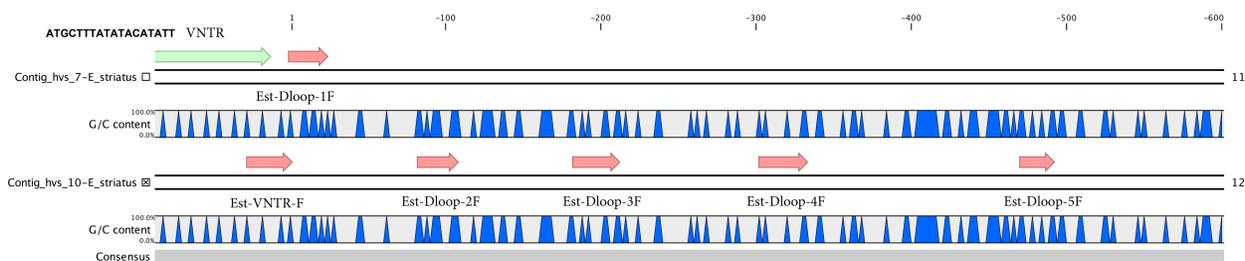


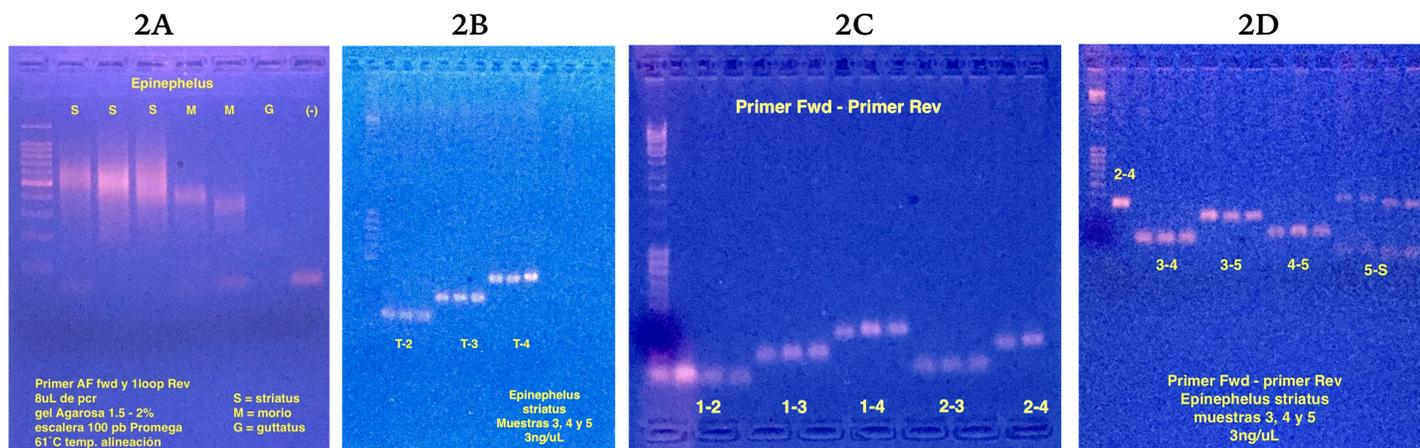
Fig. 1. Mapa de la región control mitocondrial (D-loop) de *E. striatus* mostrando la ubicación de los primers diseñados.

Resultados: Se identificó la presencia de un número variable de repeticiones en tandem (VNTR) con la secuencia $(ATGCTTTATATACATATT)_n$ al inicio del D-loop de *E. striatus* y abarcando ~600 pb (Fig. 1). La amplificación de esta región con los primers AF y D-loop 1 muestra que existen diferencias en el número de repeticiones presentes entre individuos de *E. striatus*, así como diferencias en *E. morio* y *E. guttatus* que muestran productos de amplificación entre 100-200 pb mas cortos (Fig. 2A). Aunque esta región es demasiado grande (~600 pb) para ser amplificada a partir del ADN fragmentado que se encuentra en las muestras de ADN ambiental, si podría ser utilizado para identificar individuos de *E. striatus* y distinguirlos de especies cercanas, como se ha propuesto para otras especies de *Epinephelus* empleando el VNTR característico de cada especie (Han et al. 2011). Todos los pares de primers diseñados fueron exitosamente amplificados mediante PCR en muestras de tejido de *E. striatus*, generando productos de PCR entre ~100 y ~400 pb (Fig. 2B-D). Sin embargo, algunas de las

combinaciones de primers no fueron completamente específicas para *E. striatus* pues amplificaban también ADN de *E. morio* y en menor medida *E. striatus* (e.g. combinación 1-2 en Fig. 3A). Al final, se obtuvieron 5 combinaciones de primers para amplificar regiones entre 100-300 pb en muestras ambientales que mostraron ser específicas para el D-loop de *E. striatus* y que no muestran amplificación en presencia de ADN de *E. morio* ni *E. guttatus*. Finalmente, se probaron estas 5 combinaciones en las muestras de ADN ambiental colectadas en Niche Habin en Enero y Febrero del 2020, y se corroboró que al menos dos de estas combinaciones (1-4 y 2-4, 330 pb y 230 pb, respectivamente, Fig. 3B), permiten la identificación de la presencia de ADN de *E. striatus* en muestras ambientales. Las secuencias de los nuevos primers diseñados se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los nuevos primers diseñados para la amplificación del D-loop de *E. striatus* en muestras de ADN ambiental.

Nombre del primer	Orientación 5-3'
Est-VNTR-F	GCTTTATATACATATTACTATTGAAGTGCG
Est-Dloop-1F	GCGTAAATACTCGAACAGTAAGAACC
Est-Dloop-2F	GACTTACATACAGTGAAGTATTCTGGC
Est-Dloop-3F	GGTATTCATTCTATTCATTACTCAACATGCC
Est-Dloop-4F	GGTAGGATTAATTTATTAGCTTACATAACTGG
Est-Dloop-5F	CCCAAGAAGTTC AAGTAATGGCG
Est-VNTR-R	CGCACTTCAATAGTAATATGTATATAAAGC
Est-Dloop-1R	GGTCTTACTGTTGAGTATTTACGC
Est-Dloop-2R	GCCAGAATAGTTCACTGTATGTAAGTC
Est-Dloop-3R	GGCATGTTGAGTAATGAATAGAATGAATACC
Est-Dloop-4R	CCAGTTATGTAAGCTAATAAATTAATCCTACC
Est-Dloop-5R	CGCCATTACTTGAAGTCTTGGG



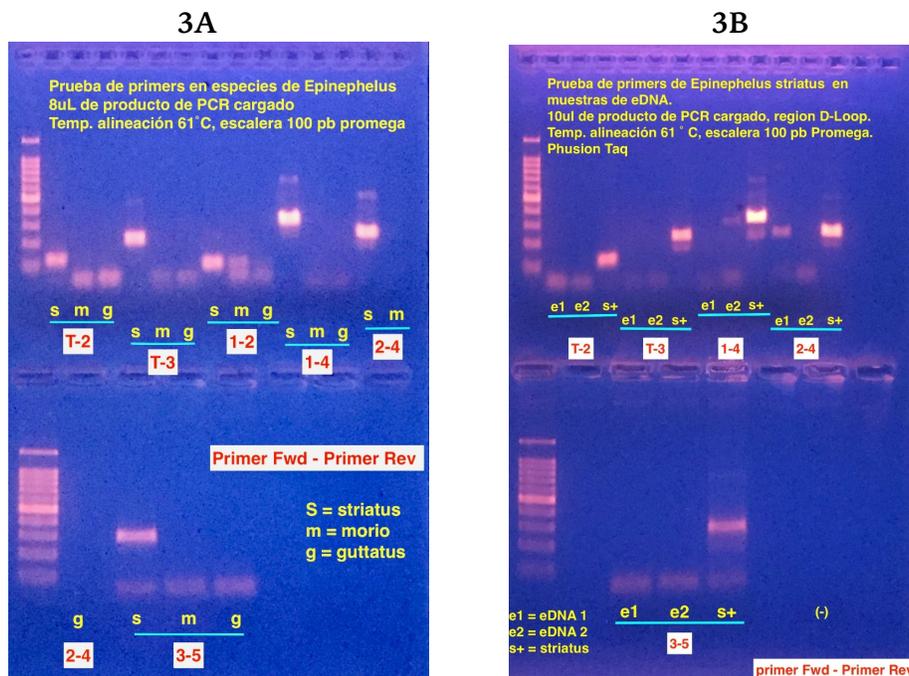


Fig. 2 y 3. Geles de agarosa mostrando las amplificaciones que se mencionan en el texto con las diferentes combinaciones de primers a partir de ADN de tejido y ADN ambiental.

Conclusiones y recomendaciones: Se cuenta con al menos 2 combinaciones de primers específicos (1-4 y 2-4), que permiten la identificación de la presencia/ausencia de ADN de *E. striatus* en muestras de ADN ambiental mediante la amplificación por PCR de 230-330 pb del D-loop. Aunque estas pruebas no amplificaron con ADN de 3 individuos de las 2 especies más cercanas presentes en la región del Caribe Mexicano (*E. morio* y *E. guttatus*), se recomienda coleccionar más muestras de estas especies para corroborar la especificidad de las pruebas diseñadas. Las pruebas diseñadas permitirán detectar la presencia/ausencia de individuos de *E. striatus* en muestras filtradas de agua de mar, dando una idea de la abundancia de individuos de acuerdo a la intensidad de las amplificaciones obtenidas. Para cuantificar de manera más exacta el número de moléculas de ADN de *E. striatus* presente en cada muestra, se podría: 1) construir librerías genómicas seguidas de secuenciación Illumina para determinar el número de lecturas obtenidas de cada muestra, lo cual además de brindar información sobre abundancia generaría información sobre los haplotipos o secuencias únicas presentes en cada uno de los sitios. 2) transferir las combinaciones de primers a una plataforma de PCR cuantitativa (qPCR) en presencia de un colorante fluorescente que permita cuantificar el número exacto de moléculas presente en cada muestra a un menor costo que la secuenciación Illumina (Wood et al. 2019). En ambos casos, se recomienda contar con muestras control de ADN ambiental donde existan estimaciones visuales de la abundancia de meros en el sitio, para poder realizar una curva de calibración. Aunque se encontró muy poca variación (i.e. solo 2 mutaciones) en la región del D-loop amplificada en los 19 individuos de *E. striatus* coleccionados y secuenciados, es muy probable que exista variación en el D-loop en otros individuos, especialmente si se obtienen muestras de ADN ambiental de diferentes agregaciones y distintas temporadas.

2) Diversidad de especies de peces óseos en sitios de agregación durante 2020

Métodos: A partir de las muestras de ADN ambiental colectadas en Enero y Febrero del 2020, se realizó la extracción de ADN y construcción de librerías genómicas para ~100 pb del gen mitocondrial 12S ribosomal, empleando primers universales para peces y siguiendo métodos y protocolos descritos recientemente de manera detallada (Valdivia-Carrillo et al. 2021) y amplificando cada muestra de ADN individual por triplicado. La librería fue secuenciada en la plataforma Illumina Next-Seq 150pb x 2, obteniendo ~200,000 lecturas pareadas para cada una de las 8 muestras secuenciadas (3 replicas y 1 control negativo de Enero 2020, 3 replicas y 1 control negativo de Febrero 2020). Las secuencias resultantes fueron analizadas con el software Usearch V11 (Edgar 2010). En resumen, las secuencias fueron filtradas para eliminar secuencias o bases de baja calidad, así como eliminar secuencias inusualmente cortas o largas. Las secuencias forward y reverse fueron ensambladas en una secuencia concenso y los primers fueron eliminados de las secuencias. Se eliminaron las secuencias que fueron observadas una sola vez pues podrían representar errores de secuenciación o contaminación, y se eliminaron secuencias que fueron identificadas como quimeras o artefactos. Finalmente, se obtuvo la lista de secuencias con una frecuencia ≥ 2 dentro de cada muestra que pasaron todos los filtros de calidad, y se realizó la asignación taxonómica de cada secuencia mediante el algoritmo BLAST y empleando la base de referencia de secuencias de ADN de GenBank (NCBI).

Resultados: Las secuencias de peces que pasaron todos los filtro de calidad y que fueron exitosamente asignadas a algún nivel taxonómico fueron 292,190 del 19 Enero 2020 y 274,165 del 17 Febrero 2020. En Enero del 2020, se identificaron un total de 67 distintos taxa pertenecientes a al menos 21 generos diferentes (Tabla 2). En contraste, la diversidad de peces fue menor en Febrero del 2020, donde se identificaron solo 52 taxa, pertenecientes a al menos 15 generos (Tabla 3). En ambas fechas, las secuencias mas abundantes correspondieron al mero estriado *E. striatus* (85,033 y 64,079 secuencias, respectivamente). En Enero 2020, las especies más abundantes con $\geq 10,000$ moléculas de ADN amplificadas y secuenciadas fueron *Lutjanus campechanus* (Huachinango del Golfo 2, con 24,627 secuencias), una especie de Serranido (Serranidae sp. 1, 23,124), una especie del género *Scarus* (*Scarus* sp. 1, pez perico, 15,956), *Brotula barbata* (Brotula o lengua, 15,006) y una especie del género *Lutjanus* (*Lutjanus* sp. 2, pargo, 12,154). En Febrero 2020, los taxa mas abundantes fueron otra secuencia del mero estriado *E. striatus* (Mero estriado 2, con 39,901 secuencias), una especie de Serranido (Serranidae sp. 1, 28,999), atún ojo grande (*Thunnus obesus*, 17490), una especie de *Seriola* (*Seriola* sp. 2, jurel, 16,899), y una especie de cirujano (*Acanthurus* sp 1, 10,385). En ambas fechas, destacan varias especies de peces arrecifales de los géneros *Abudefduf*, *Acanthurus*, *Balistes*, *Bodianus*, *Haemulon*, *Helichoeres*, *Lutjanus*, *Rypticus*, *Scarus* y especies de la familia *Serranidae*. Sin embargo, dentro de las especies detectadas se encuentran también peces pelágicos de los géneros *Seriola* (jurel), *Thunnus* (atún), *Kajikia* (marlin), *Ophistonema* (sardina) e *Istiophorus* (pez vela), varias especies demersales de lenguas dentro de la familia *Ophidiidae* (como la lengua *Brotula barbata*), el pez vidrio de la familia *Amarsipidae* y el tiburón duende (*Mitsukurina owstoni*). También se detectaron especies de peces crípticos arrecifales de tamaño

pequeño dentro de los géneros *Helichoeres* (señoritas), *Stegastes* (damiselas) y *Amblycirrhitus pinos* (Halcón rayadito).

Tabla 2. Especies identificadas en muestras de DNA ambiental en Niche Habin el 19 Enero 2020, número de secuencias de cada taxa y especies probables			
Taxa #	Especie identificada	Nombre común o especies probables presentes en el área	Total secuencias
1	Abudefduf sp. 1	A. saxatilis, A. taurus	3995
2	Abudefduf sp. 2		6
3	Acanthurus sp. 1	A. chirurgus, A. coeruleus, A. guttatus, A. pyroferus, A. sohal, A. tractus	1199
4	Acanthurus sp. 2		2
5	Acanthurus sp. 3		822
6	Amblycirrhitus pinos 1	Halcón rayadito 1	768
7	Amblycirrhitus pinos 2	Halcón rayadito 2	10
8	Balistes sp. 1	B. capricus, B. vetula	3
9	Balistes sp. 2		3605
10	Balistes sp. 3		1970
11	Balistes sp. 4		3
12	Balistes vetula 1	Cochino 1	3942
13	Balistes vetula 2	Cochino 2	2672
14	Balistes vetula 3	Cochino 3	3
15	Bodianus sp. 1	B. pulchellus, B. rufus	4
16	Brotula barbata	Brotula o Lengua	15006
17	Epinephelus striatus 1	Mero estriado 1	111
18	Epinephelus striatus 2	Mero estriado 2	85033
19	Epinephelus striatus 3	Mero estriado 3	9565
20	Epinephelus striatus 4	Mero estriado 4	16
21	Epinephelus striatus 5	Mero estriado 5	3708
22	Epinephelus striatus 6	Mero estriado 6	13
23	Epinephelus striatus 7	Mero estriado 7	8927
24	Epinephelus striatus 8	Mero estriado 8	4
25	Gymnothorax sp. 1	G. conspersus, G. funebris, G. hubbsi, G. kolpos, G. maderensis, G. miliaris, G. moringa, G. nigromarginatus, G. ocellatus, G. polygonius, G. saxicola, G. vicinus	2
26	Haemulon sp. 1	H. album, H. aurolineatum, H. bonariense, H. boshmae, H. carbonarium, H. steindachneri, H. flavolineatum, H. macrostomum, H. melanurum, H. parra, H. plumierii, H. sciurus, H. striatum, H. vittatum	2
27	Haemulon sp. 2		2556
28	Haemulon sp. 3		1762
29	Haemulon sp. 4		4
30	Halichoeres garnoti	Doncella cabeciamarilla	4309
31	Halichoeres sp. 1	H. bathyphilus, H. bivittatus, H. burekae, H. caudalis, H. cyanocephalus, H. garnoti, H. maculipinna, H. pictus, H. poeyi, H. radiatus, H. socialis	6651
32	Istiophorus platypterus	Pez vela	9627
33	Kajikia albida	Marlin blanco	11
34	Lujanus griseus 1	Pargo mulato 1	8534
35	Lujanus griseus 2	Pargo mulato 2	8
36	Lujanus griseus 3	Pargo mulato 3	1697
37	Lujanus sp. 1	L. analis, L. apodus, L. buccanella, L. cyanopterus, L. jocu, L. mahogoni, L. purpureus, L. synagris, L. vivanus	19
38	Lujanus sp. 2		12154
39	Lujanus sp. 3		2
40	Lujanus sp. 4		605
41	Lujanus sp. 5		2489
42	Lutjanus campechanus 1	Huachinango del Golfo 1	45
43	Lutjanus campechanus 2	Huachinango del Golfo 2	24627
44	Ophidiidae 1	40 sp. de lenguas presentes en el área	18
45	Rypticus sp. 1	R. bistrispinus, R. bornoi, R. carpenteri, R. maculatus, R. randalli, R. saponaceus, R. subbifrenatus	4
46	Rypticus sp. 2		2
47	Scarus sp. 1	S. coelestinus, S. coeruleus, S. guacamaia, S. iseri, S. taeniopterus, S. vetula	15956
48	Scarus sp. 2		4
49	Scarus vetula	Pez loro real	14
50	Seriola rivoliana 1	Pez fuerte 1	10
51	Seriola sp. 1	S. dumerili, S. fasciata, S. zonata	6668
52	Seriola sp. 2		2235
53	Serranidae sp. 1	Serranus sp., Hypoplectrus sp., Centropristis sp, Epinephelus sp. etc, entre 102 species presentes	23124
54	Serranidae sp. 2		36
55	Serranidae sp. 3		7
56	Serranidae sp. 4		4516
57	Stegastes sp. 1	S. adustus, S. diencaeus, S.leucostictus, S. otophorus, S. partitus, S. pictus, S. planifrons, S. xanthurus	6178
58	Stegastes sp. 2		5
59	Thunnus alalunga 1	Atún albacora 1	754

60	Thunnus alalunga 2	Atún albacora 2	1055
61	Thunnus albacares 1	Atún aleta amarilla 1	8737
62	Thunnus albacares 2	Atún aleta amarilla 2	1951
63	Thunnus atlanticus	Atún aleta negra	3033
64	Thunnus obesus	Atún ojo grande	10
65	Thunnus obesus	Atún ojo grande	1378
66	Thunnus thynnus	Atún aleta azul del Atlántico	2
67	Trachurus lathami	Charrito garretón	2
Total			292190

Conclusiones y recomendaciones: Los resultados de la secuenciación de ADN ambiental mostraron que es posible caracterizar la comunidad de peces en los sitios de agregación en términos de número de especies o taxa presentes así como su abundancia relativa. El elenco de especies recuperadas incluye especies arrecifales, crípticas, pelágicas y demersales, demostrando la capacidad del ADN ambiental de caracterizar ecosistemas marinos complejos. Esto es posible aún cuando las condiciones de visibilidad del sitio no eran buenas, como en el caso de las muestras del 19 Enero 2020. Una limitante importante es la falta de secuencias en las bases de datos de GenBank de especies del Caribe Mexicano, lo cual ocasionó que pocos taxa fueran identificados a nivel de especie, y que en su mayoría la identificaciones se realizaran solamente a nivel de género o familia. Frecuentemente, la secuencia más parecida presente en las bases de datos de GenBank fue una especie hermana presente en el Pacífico Mexicano incluida en la base de referencia construida recientemente en mi laboratorio por Valdivia-Carrillo et al. (2021). Se recomienda comenzar a coleccionar tejidos de especies comerciales o de interés ecológico del Caribe Mexicano, para poder construir una base de referencia local de secuencias que permitan mejorar las identificaciones a nivel de especie. En la Tabla 2 y 3 se incluyen las principales especies probables que se encuentran presentes en el Caribe Mexicano para cada uno de los géneros identificados de acuerdo a un catálogo para peces de la región (Robertson & Van Tassel 2019).

Tabla 3. Especies identificadas en muestras de DNA ambiental en Niche Habin el 17 Febrero 2020, número de secuencias de cada taxa y especies probables

Taxa #	Especie identificada	Nombre común o especies probables presentes en el área	Total secuencias
1	Abudefduf sp. 1	A. saxatilis, A. taurus	4
2	Abudefduf sp. 2		3035
3	Acanthurus sp. 1	A. chirurgus, A. coeruleus, A. guttatus, A. pyroferus, A. sohal, A. tractus	10385
4	Acanthurus sp. 2		1887
5	Acanthurus sp. 3		8
6	Amarsipidae 1	Amarsipa o pez de vidrio	5442
7	Amblycirrhitus pinos	Halcón rayadito	2
8	Balistes vetula	Cochino	982
9	Epinephelus striatus 1	Mero estriado 1	54
10	Epinephelus striatus 10	Mero estriado 10	8
11	Epinephelus striatus 11	Mero estriado 11	2163
12	Epinephelus striatus 2	Mero estriado 2	64079
13	Epinephelus striatus 3	Mero estriado 3	39901
14	Epinephelus striatus 4	Mero estriado 4	51
15	Epinephelus striatus 5	Mero estriado 5	8112
16	Epinephelus striatus 6	Mero estriado 6	7
17	Epinephelus striatus 7	Mero estriado 7	4340
18	Epinephelus striatus 8	Mero estriado 8	2181
19	Epinephelus striatus 9	Mero estriado 9	7
20	Haemulon sp 1	H. album, H. aurolineatum, H. bonariense, H. boshmae, H. carbonarium, H. steindachneri, H. flavolineatum, H. macrostomum, H. melanurum, H. parra, H. plumierii, H. scirus, H. striatum, H. vittatum	3489
21	Haemulon sp. 2		11
22	Haemulon sp. 3		4622
23	Halichoeres sp. 1	H. bathyphilus, H. bivittatus, H. burekae, H. caudalis, H. cyanocephalus, H. garnoti, H. maculipinna, H. pictus, H. poeyi, H. radiatus, H. socialis	10

24	Halichoeres sp. 2		3275
25	Lujanus griseus 1	Pargo mulato 1	6
26	Lujanus griseus 2	Pargo mulato 2	5266
27	Lujanus griseus 3	Pargo mulato 3	3246
28	Lujanus sp. 1	L. analis, L. apodus, L. buccanella, L. cyanopterus, L. jocu, L. mahogoni, L. purpureus, L. synagris, L. vivanus	11
29	Lujanus sp. 2		7046
30	Lujanus sp. 3		2
31	Lujanus sp. 4		1969
32	Lutjanus campechanus 1	Huachinango del Golfo 1	4763
33	Lutjanus campechanus 2	Huachinango del Golfo 2	15
34	Lutjanus campechanus 3	Huachinango del Golfo	5203
35	Mitsukurina owstoni	Tiburón duende	2
36	Ophidiidae 1	40 sp. de lenguas presentes en el area	9909
37	Ophidiidae 2		10
38	Ophidiidae 3		539
39	Opisthonema oglinum 1	Sardina del Atlántico 1	3929
40	Opisthonema oglinum 2	Sardina del Atlántico 2	6
41	Scarus sp. 1	S. coelestinus, S. coeruleus, S. guacamaia, S. iseri, S. taeniopterus, S. vetula	8
42	Scarus sp. 2		4357
43	Scarus sp. 3		2532
44	Seriola rivoliana	Pez fuerte	22
45	Seriola sp. 1	S. dumerili, S. fasciata, S. zonata	2228
46	Seriola sp. 2		16899
47	Serranidae sp. 1	Serranus sp., Hypoplectrus sp., Centropristis sp, Epinephelus sp. etc, entre 102 species presentes	28999
48	Serranidae sp. 2		26
49	Serranidae sp. 3		2
50	Thunnus albacares	Atún aleta amarilla	26
51	Thunnus atlanticus	Atun aleta negra	5599
52	Thunnus obesus	Atún ojo grande	17490
Total			274165

3) Variación intraespecífica y conectividad de *E. striatus* en sitios de agregación durante 2020

Métodos: A partir de la secuenciación genómica de ADN ambiental descrita anteriormente, se realizó un análisis enfocado en las secuencias asignadas al mero estriado *E. striatus* en las 2 fechas de colecta en Enero y Febrero del 2020 en Niche Habin. Se caracterizaron las secuencias únicas (i.e. haplotipos) presentes en cada sitio así como su abundancia y los haplotipos que estuvieron presentes en cada fecha de colecta.

Resultados: Durante el muestreo de Enero y Febrero se encontró un total de 15 diferentes secuencias o haplotipos distintos asignados a la especie *E. striatus* (Tabla 4). En Enero 2020, se registraron 8 haplotipos distintos, y durante Febrero 2020 se detectó un número mayor (11 haplotipos diferentes). Solamente 4 haplotipos estuvieron presentes en ambas fechas de muestreo. En la colecta de Enero 2020, cuando se observaron pocas decenas de individuos de mero estriado debido a una mala visibilidad durante el buceo, se obtuvieron 107,377 secuencias de ADN asignadas a *E. striatus*, lo que representa el 36.7% del total de las secuencias de peces obtenidas en esa fecha. El haplotipo más común en Enero fue el Epst-3 seguido del Epst-2 y Epst-7. En comparación, en Febrero del 2020, cuando se documentaron ~1,400 individuos de mero estriado, se obtuvieron 120,903 secuencias de *E. striatus*, representando un 44% del total de las secuencias de peces obtenidas en esa fecha. Los haplotipos más frecuentes en Febrero también fueron el Epst-3 y Epst-2, seguidos por Epst-6 (Tabla 4).

Tabla 4. Haplotipos distintos de <i>E. striatus</i> y su frecuencia encontrados en Niche Habin				
Fecha de muestreo	Enero 2020	Febrero 2020		
Abundancia de peces estimada visualmente	100-?	1,400		
# Haplotipo	Número de secuencias	Número de secuencias	Total	% total
Epst-1	111	54	165	0.07
Epst-2	9,565	39,901	49,466	21.66
Epst-3	85,033	64,079	149,112	65.31
Epst-4	16	51	67	0.02
Epst-5	3,708		3,708	1.62
Epst-6		8,112	8,112	3.55
Epst-7	8,927		8,927	3.91
Epst-8	13		13	0.005
Epst-9		8	8	0.003
Epst-10	4		4	0.001
Epst-11		7	7	0.003
Epst-12		4,340	4,340	1.90
Epst-13		2,181	2,181	0.95
Epst-14		7	7	0.003
Epst-15		2,163	2,163	0.94
Total	107,377	120,903	228,280	100

Conclusiones y recomendaciones: La agregación reproductiva de meros estriados en Niche Habin se caracteriza por la presencia de 2 haplotipos mitocondriales principales (Epst-3 y Epst-2) que juntos representan 87% del total y que estuvieron presentes durante Enero y Febrero del 2020. Adicionalmente existen 13 haplotipos en mucho menor frecuencia ($\leq 3.9\%$). De acuerdo al número de haplotipos y la cantidad de secuencias recuperadas de *E. striatus*, es probable que en Enero 2020 estuvieran presentes $\sim 1,000$ individuos en la agregación, aun cuando no fueron observados. Sin embargo, una mayor diversidad genética observada en el sitio en términos del número de haplotipos presentes en Febrero 2020, aunado a un mayor número de secuencias asignadas a *E. striatus* respecto al total, sería consistente con una mayor abundancia de individuos en Febrero 2020 comparado a Enero 2020. Con base en la presencia de haplotipos, que representan linajes heredados por vía materna, es posible suponer que la mayoría de los individuos pertenecientes a los linajes más frecuentes estuvieron presentes en ambas fechas de colecta (Epst1-4). También existe evidencia de un recambio significativo de individuos en distintas fechas de agregación, pues algunos linajes maternos solamente estuvieron presentes en Enero (e.g. Epst-5, 7, 8 y 10), mientras que otros linajes estuvieron presentes solo en Febrero (e.g. Epst-6, 9, 11-15). Se recomienda la toma de muestras de ADN ambiental y la caracterización de linajes maternos en sitios de agregación adicionales que permitirán estimar los movimientos de individuos entre sitios al comparar la similitud de los linajes maternos presentes y sus frecuencias por sitio. También se recomienda la estimación simultánea de la abundancia y/o biomasa de individuos mediante censos visuales junto con la colecta de ADN ambiental, con el fin de realizar una curva de calibración entre abundancia/biomasa y número de secuencias asignadas a *E. striatus*, con el fin de predecir la abundancia/biomasa en sitios donde solamente se tenga la información de ADN ambiental. Cabe mencionar que existe la posibilidad que alguno de los haplotipos identificados como *E. striatus* pudieran pertenecer a otras especies locales de *Epinephelus* o el género más cercano que es

Mycteroperca (Craig & Hastings 2007), que estuvieran presentes en el sitio de la agregación durante la colecta del ADN ambiental. Se recomienda la colecta de muestras provenientes de las pesquerías de individuos dentro de estos dos géneros (*Epinephelus* y *Mycteroperca*), lo que permitirá en un futuro asegurarse de excluir cualquier secuencia de estas especies relacionadas.

Referencias

- Craig MT, Hastings PA. 2007. A molecular phylogeny of the groupers of the subfamily Epinephelinae (Serranidae) with a revised classification of the Epinephelini. *Ichthyological Research* 54:1-17.
- Edgar RC. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than Blast. *Bioinformatics* 26:2460-2461.
- Han J, Lv F, Cai H. 2011. Detection of species-specific long VNTRs in mitochondrial control region and their application to identifying sympatric hong kong grouper (*Epinephelus akaara*) and yellow grouper (*Epinephelus awoara*). *Molecular Ecology Resources* 11:215-218.
- Kuriwa K, Hanzawa N, Yoshino T, Kimura S, Nishida M. 2007. Phylogenetic relationships and natural hybridization in rabbitfishes (teleostei: Siganidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45:69-80.
- Lee WJ, Conroy J, Howell WH, Kocher TD. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution* 41:54-66.
- Munguia-Vega A. 2019. Estudio genético sobre sustitución de especies en el comercio de pescados en México. <https://doi.org/10.31230/osf.io/49wka>. p 34.
- Robertson DR, Van Tassel J. 2019. Shorefishes of the greater caribbean: Online information system. Version 2.0. *Smithsonian Tropical Research Institute, Balboa, Panamá* <https://biogeodbstrisiedu/caribbean/en/>.
- Valdivia-Carrillo T, Rocha-Olivares A, Reyes-Bonilla H, Francisco Dominguez-Contreras J, Munguia-Vega A. 2021. Integrating eDNA metabarcoding and simultaneous underwater visual surveys to describe complex fish communities in a marine biodiversity hotspot. *Molecular Ecology Resources* 21:1558-1574.
- Wood, S. A., Pochon, X., Laroche, O., von Ammon, U., Adamson, J., & Zaiko, A. 2019. A comparison of droplet digital polymerase chain reaction (PCR), quantitative PCR and metabarcoding for species-specific detection in environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 19: 1407–1419.