

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**ADN ambiental como herramienta para detectar especies marinas
introducidas y comparar diversidad de peces en San Cristóbal,
Galápagos.**

Diana Lissett Moreta Analuisa

Licenciatura en Gestión Ambiental

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Licenciada en Gestión Ambiental

Puerto Baquerizo Moreno, 21 de mayo de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**ADN ambiental como herramienta para detectar especies marinas
introducidas y comparar diversidad de peces en San Cristóbal,
Galápagos.**

Diana Lissett Moreta Analuisa

Nombre del profesor, Título académico

Diana Pazmiño, PhD.

Puerto Baquerizo Moreno, 21 de mayo de 2023

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Diana Lissett Moreta Analuisa

Código: 00212546

Cédula de identidad: 2000116174

Lugar y fecha: Puerto Baquerizo Moreno, 21 de mayo de 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La Reserva Marina de Galápagos alberga una gran diversidad de especies de interés para actividades turísticas y comerciales. La conservación de la biodiversidad del archipiélago es clave, ya que alrededor del 85% de su población depende del turismo. El propósito de este estudio fue determinar la sensibilidad del ADN ambiental (eDNA) como herramienta para detectar la presencia de especies marinas introducidas, así como comparar la composición de especies de peces entre lugares con alto impacto humano ubicados cerca del puerto (Playa de los Marineros y La Predial) y lugares con bajo impacto que se encuentran alejados del puerto (La Tortuga) en la Isla San Cristóbal. Se recolectaron tres muestras de agua en cada localidad y se extrajo ADN de cada muestra. Posteriormente se amplificó y secuenció el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) para catalogar la diversidad de cada localidad mediante técnicas de meta-barcoding. Se determinó la presencia de cuatro especies marinas introducidas y nueve criptogénicas (especies no definidas como introducidas o nativas). La Predial fue el sitio con mayor cantidad de especies introducidas (n=3), probablemente por ser un puerto de carga y desembarque, por lo que es más susceptible a introducciones. La composición de peces fue similar (50 %) entre los tres sitios de estudio con pocas especies únicas para cada localidad (5 – 10 %). Esto podría deberse a que los tres lugares son ecosistemas costeros localizados en la costa occidental de la misma isla. A nivel de especies, no se encontraron coincidencias con especies de Galápagos previamente reportadas en datazone de especies de Galápagos. Sin embargo, a nivel de género, sinónimo, nomenclatura antigua y familia sí hubo concordancia con la diversidad reportada en las islas. Esto puede ser explicado por la reducida cantidad de especies secuenciadas para Galápagos lo cual limita la capacidad de identificación, y resalta la necesidad de una base de datos genética para las islas. Este estudio verificó la sensibilidad de esta herramienta y su potencial aplicación en los

diferentes ecosistemas de las islas, brindando la posibilidad de mejorar los esfuerzos de conservación, prevención y manejo de especies.

Palabras clave: ADN ambiental, COI, Galápagos, especies introducidas, biodiversidad, actividades humanas.

ABSTRACT

The Galapagos Marine Reserve hosts a great diversity of species of interest for tourist and commercial activities. The conservation of the archipelago's biodiversity is key, since around 85% of its population depends on tourism. The purpose of this study was to determine the sensitivity of environmental DNA (eDNA) as a tool to detect the presence of introduced marine species, as well as to compare the composition of fish species between places with high human impact located near the port (Playa de los Marineros and La Predial) and places with low impact that are far from the port (La Tortuga) on San Cristóbal Island. Three water samples were collected at each location and DNA was extracted from each sample. Subsequently, the mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COI) gene was amplified and sequenced to catalog the diversity of each location using meta-barcoding techniques. The presence of four introduced and nine cryptogenic marine species (species not defined as introduced or native) was determined. La Predial was the site with the highest number of introduced species (n=3), probably because it is a loading and unloading port, therefore, susceptible to introductions. Fish composition was similar (50%) among the three study sites with few species unique to each location (5 – 10%). This could be because the three places are similar coastal ecosystems located on the western coast of the same island. At the species level, no matches were found with Galapagos species previously reported in the Galapagos species list. However, matches were found at the genus, synonym, old nomenclature, and family level. This can be explained due to the small number of species sequenced for Galapagos, which limits identification capacity, and highlights the need for a genetic database for the islands. This study verified the sensitivity of this tool and its potential application in the different ecosystems of the islands, offering the possibility of improving conservation, prevention, and species management efforts.

Key words: environmental DNA, COI, Galapagos, introduced species, biodiversity, human activities, San Cristobal.

TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	12
	Ecosistemas Marinos de Galápagos	12
	ADN ambiental (eDNA) como herramientas de monitoreo y conservación	14
2.	OBJETIVOS	21
3.	MÉTODOS	22
3.1.	Recolección de muestras.....	22
3.2.	Procesamiento de muestras en el laboratorio.....	24
3.2.1.	Extracción y cuantificación de ADN	25
3.2.2.	Amplificación de ADN mediante PCR.....	26
3.2.3.	Secuenciamiento de ADN	27
3.2.3.1.	<i>Barcoding PCR</i>	<i>28</i>
3.2.3.2.	<i>Reparación de ADN y preparación de los extremos</i>	<i>28</i>
3.2.3.3.	<i>Ligadura y limpieza de adaptadores.....</i>	<i>28</i>
3.2.3.4.	<i>Cebado y carga de la celda de flujo SpotON.....</i>	<i>29</i>
3.2.3.5.	<i>Secuenciamiento y análisis de datos.....</i>	<i>29</i>
4.	RESULTADOS	30
4.1.	Colección de muestras	30
4.2.	Procesamiento de laboratorio	30
4.2.1.	Extracción de ADN	30
4.2.2.	Amplificación y secuenciamiento de ADN.....	32
4.2.3.	Especies introducidas	33
4.2.4.	Diversidad de peces óseos	35
5.	DISCUSIÓN.....	38
	Limitaciones y recomendaciones	41

6. CONCLUSIONES	43
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
8. ANEXOS	50
<i>Anexo 1: Materiales recolección de muestras.</i>	50
<i>Anexo 2: Materiales para la filtración de muestras en el laboratorio.</i>	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Listado de especies introducidas y criptogénicas en la RMG (tomada de Carlton et al., 2019)</i>	16
Tabla 2. <i>Listado de especies potencialmente no nativas (tomada de Keith, 2016).</i>	19
Tabla 3. <i>Detalle de las muestras colectadas en este estudio.</i>	24
Tabla 4. <i>Detalle de primers utilizados en la amplificación de ADN (Leray et al., 2013).</i>	27
Tabla 5. <i>Detalle de la cantidad y calidad de ADN obtenida para las 18 muestras cuantificadas.</i>	31
Tabla 6. <i>Cuantificación de ADN de las muestras durante el proceso de preparación de de la librería: post-segunda PCR, post-lavado 1, post -lavado 2 y post-lavado 3.</i>	32

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Sitios de recolección de las muestras en la Isla San Cristóbal.</i>	22
<i>Figura 2. Proceso de recolección de muestras en el sitio La Tortuga. a) Introducción de botella Niskin para recolección de muestras, b) Recolección de muestra de agua, y c) Obtención de la primera réplica y traspaso a una botella esterilizada (1 litro).</i>	23
<i>Figura 3. Proceso de filtración. a) Filtración de las muestras de la localidad La Tortuga. b) Bomba Geopump peristáltica easy-load II usada para este proceso.</i>	25
<i>Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los sitios muestreados en la Isla San Cristóbal. a) 11 muestras correspondientes al primer grupo. b) nueve muestras con BSA correspondientes al segundo grupo y dos controles negativos.</i>	33
<i>Figura 5. Especies introducidas y criptogénicas encontradas para cada sitio de estudio al 95% de identidad.</i>	34
<i>Figura 6. Top 30 de géneros encontrados para cada sitio de estudio con el 95% de identidad.</i>	35
<i>Figura 7. Diagrama de Venn representando el número de géneros únicos por localidad y compartidos.</i>	36

1. INTRODUCCIÓN

Ecosistemas Marinos de Galápagos

El archipiélago de Galápagos es conocido a nivel mundial debido a la amplia biodiversidad que alberga en cada una de sus islas, islotes y rocas (Guime, 2003). En las Islas Galápagos, el 97% del territorio corresponde al área protegida del Parque Nacional Galápagos (PNG), y el 3% restante es zona urbana (Guime, 2003). De acuerdo con Steel (2014), el archipiélago en sus áreas naturales aún mantiene condiciones prístinas debido a la conservación del 95% de las especies originarias. Este manejo ha permitido mantener su alto endemismo, por lo que es posible encontrar especies únicas y de gran importancia para estudios evolutivos (Hennessy & McCleary, 2011).

Galápagos cuenta actualmente con tres áreas protegidas: el Parque Nacional Galápagos (PNG) creado en el año 1959 y que comprende los ecosistemas terrestres (Salcedo, 2008), la Reserva Marina de Galápagos (RMG) creada en 1998 (Ministerio del Ambiente, s.f.), y desde el 2022 la Reserva Marina Hermandad (RMH) que conecta el Norte del archipiélago con la Isla del Coco en Costa Rica (MAATE, 2022).

En la RMG se han identificado varios ecosistemas marino-costeros que poseen un valor considerable en términos de biodiversidad y economía. Entre ellos se encuentran los ecosistemas de humedales como manglares y lagunas costeras; ecosistemas litorales como costas rocosas, playas arenosas y acantilados; ecosistemas submareales como fondos rocosos y paredes verticales, colonias de coral y fondos arenosos; ecosistemas oceánicos como aguas abiertas y bajos oceánicos; y ecosistemas transzonal como comunidades pioneras, sistemas acuáticos y aforamientos (CGREG, 2016).

Los ecosistemas marino-costeros son fuente de productos de consumo para la comunidad local y visitantes, así como de productos de exportación (Salvador, 2015). Por ejemplo, el bacalao es un producto de consumo local, pero también es exportado como producto seco-salado o fresco hacia el Ecuador continental (incluso a Estado Unidos, aunque en poca demanda) (Danulat & Graham, 2002). Adicionalmente, estos ecosistemas representan un valor económico aún más alto asociado a las actividades de turismo. Esto se debe a que cada año ingresan cientos de miles de personas motivadas principalmente por el interés en la naturaleza, su flora y fauna (Carvache-Franco et al., 2020). Solamente en 2022 ingresaron 267.688 visitantes a las Islas Galápagos (DPNG, s.f.).

Las actividades que se desarrollan dentro de la RMG y el PNG se encuentran reguladas por la Dirección del Parque Nacional Galápagos (DPNG), y se enfocan en la investigación y conservación de sus ecosistemas. Sin embargo, el crecimiento acelerado de la población local y de las actividades turísticas traen consigo grandes desafíos para la biodiversidad del archipiélago como para la salud de sus ecosistemas. La amplia diversidad de flora y fauna endémica que alberga la Reserva Marina de Galápagos representa el principal atractivo turístico, destacando actividades como el turismo de buceo y snorkel (Moity et al., 2013).

En la RMG se han identificado más de 2.900 especies marinas de las cuales alrededor de 430 corresponden a peces óseos y cartilagosos (CGREG, 2016). Es importante mencionar que un 25% de esta diversidad corresponde a especies endémicas (únicas) de las Islas Galápagos (MAATE, s.f.). Cabe destacar que, a nivel global, los peces óseos representan el grupo de vertebrados más diverso y constituyen un eje clave para monitorear el estado de salud ambiental en los ecosistemas marinos (Thomsen et. al, 2012). A pesar de ello, se conoce que al menos 20% de las especies de peces de Galápagos aún no han sido descritas en detalle como es el caso de *Scorpaenodes* sp. y *Gobiomuros*

sp., dos especies descubiertas en los últimos años (MAATE, s.f.). Además, se conoce poco sobre su distribución y patrones de biodiversidad local.

A pesar de la importancia de los ecosistemas marinos, las actividades antropogénicas están provocando cambios irreversibles a nivel global, y acelerando la pérdida de biodiversidad en los mismos (Cardinale, 2012). En Galápagos, las principales amenazas incluyen: (1) la contaminación por plásticos debido al daño físico en el hábitat y en las especies. Los plásticos ocasionan lesiones serias en la megafauna marina, pero también son una fuente potencial de transporte de sustancias químicas, especies introducidas, y patógenos (Jones et al., 2021). (2) El cambio climático y los riesgos asociados como la acidificación de los océanos, aumento de la temperatura y subida del nivel del mar (CAF, 2022). (3) Las prácticas inadecuadas e insostenibles como la sobrepesca y la pesca ilegal, no declarada y no reglamentada, así como el mal uso energético en el sector turístico y aumento de especies introducidas (CAF, 2022).

ADN ambiental (eDNA) como herramientas de monitoreo y conservación

Tomando en cuenta lo expuesto anteriormente, es evidente la necesidad de un mecanismo de monitoreo rápido que permita medir las fluctuaciones en la riqueza de especies, así como la detección de especies introducidas para desarrollar estrategias de conservación informadas (Kelly, 2014). En las últimas décadas, la ciencia ha desarrollado herramientas que permiten llevar a cabo ésta y otras tareas de manera eficiente y relativamente barata. Un ejemplo de ello es el ADN ambiental (eDNA por sus siglas en inglés). Esta herramienta surgió originalmente con la idea de obtener ácidos nucleicos de microbios directamente de muestras ambientales (Ogram et al., 1987). El descubrimiento de fragmentos de ADN de diferentes microorganismos estableció un enfoque

verdaderamente relevante para la conservación, y su eficiencia se ha probado en varios entornos, terrestres y acuáticos (Thomsen et al., 2015).

El ADN ambiental aprovecha el hecho de que a medida que las especies interactúan con el medio ambiente, expulsan continuamente ADN a su entorno (Thomsen et al., 2015). Este ADN puede provenir de células, tejidos y secreciones excretados como la orina, heces, pelos y piel en el caso de organismos con mayor masa muscular, o de ADN que puede existir predominantemente dentro de las mitocondrias o células pequeñas que se degradan al estar expuestos en el ambiente (Thomsen & Willerslev, 2015).

Para el análisis del ADN ambiental usualmente se examina el contenido de una muestra ambiental (ej. agua, suelo) a través de la extracción del mismo, seguido de la amplificación de un fragmento de ADN de interés a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se pueden efectuar ya sea con cebadores específicos con enfoque en una sola especie o con cebadores genéricos con un enfoque en múltiples especies, y finalmente el secuenciamiento del fragmento de ADN (Thomsen et al., 2015).

Además de ser una herramienta efectiva de monitoreo, el ADN ambiental se ha usado ampliamente para detectar especies introducidas (Northern Rocky Mountain Science Center, 2020). Este es un tema clave para la conservación de las Islas Galápagos, donde actualmente se reconocen al menos 33 especies de flora y fauna marinas catalogadas como introducidas y en el mismo listado se encuentran 53 especies criptogénicas (Tabla 1) (Carlton et al., 2019), éstas son aquellas que no están definidas de manera exacta como especies nativas o exóticas (Pérez et al., 2009). Además, existen al menos 18 potenciales especies no nativas en la RMG (Tabla 2.) (Keith, 2016). Estas especies invasoras pueden convertirse en amenazas serias para los ecosistemas y la biodiversidad (Ruppert, 2019).

Tabla 1. Listado de especies introducidas y criptogénicas en la RMG (tomada de Carlton et al., 2019)

Especie	Introducida	Criptogénica	Secuencia en GenBank
<i>Bougainvillia muscus</i>		x	SI
<i>Bimeria vestita</i>	x		SI
<i>Cirrhovenia tetranema</i>	x		NO
<i>Clytia elongata</i>		x	NO
<i>Clytia thornelyi</i>		x	NO
<i>Clytia hummelincki</i>		x	SI
<i>Obelia dichotoma</i>	x		SI
<i>Obelia oxydentata</i>		x	NO
<i>Halecium labiatum</i>		x	NO
<i>Nemalecium lighti</i>		x	NO
<i>Pennaria disticha</i>	x		NO
<i>Kirchenpaueria halecioides</i>	x		SI
<i>Halopteris alternata</i>		x	SI
<i>Tubastraea coccinea</i>	x		SI
<i>Exaiptasia diaphana</i>	x		SI
<i>Capitella sp.</i>	x		SI
<i>Myrianida pachycera</i>		x	SI
<i>Naineris setosa</i>		x	NO
<i>Branchiomma bairdi</i>		x	SI
<i>Branchiomma sp.</i>		x	SI
<i>Pseudobranchiomma schizogenica</i>		x	NO
<i>Dipolydora armata</i>		x	NO
<i>Hydroides elegans</i>		x	SI
<i>Hydroides sanctaecrucis</i>		x	SI
<i>Janua heterostropha</i>		x	NO
<i>Simplaria pseudomilitaris</i>	x		NO
<i>Protolaeospira capensis</i>	x		NO
<i>Leiosolenus aristatus</i>		x	NO

<i>Bankia gouldi</i>		x	NO
<i>Bankia carinata</i>		x	SI
<i>Lyrodus medilobatus</i>		x	NO
<i>Lyrodus pedicellatus</i>		x	SI
<i>Teredo bartschi</i>		x	NO
<i>Teredo furcifera</i>		x	NO
<i>Teredo triangularis</i>		x	NO
<i>Xestoleberis setouchiensis</i>	x		NO
<i>Megabalanus coccopoma</i>		x	SI
<i>Ligia baudiniana</i>	x		SI
<i>Limmoria tripunctata</i>		x	NO
<i>Cardisoma crassum</i>		x	NO
<i>Anoplodactylus monotrema</i>		x	NO
<i>Polyxylobates diversiporosus</i>	x		NO
<i>Issaniella mograbin</i>	x		NO
<i>Axelsonia littoralis</i>	x		NO
<i>Atissa luteipes</i>	x		NO
<i>Hecamede brasiliensis</i>		x	NO
<i>Clasiopella uncinata</i>		x	NO
<i>Psilopa girschneri</i>	x		SI
<i>Anisolabis maritima</i>		x	SI
<i>Pentacora sphacelata</i>	x		SI
<i>Aetea curta</i>	x		NO
<i>Beania klugei</i>		x	NO
<i>Bugula neritina</i>		x	SI
<i>Bugulina stolonifera</i>		x	NO
<i>Caulibugula cf. dendrograpta</i>		x	SI
<i>Hippopodina tahitiensis</i>		x	SI
<i>Celleporaria inaudita</i>		x	SI
<i>Biflustra irregularata</i>		x	NO
<i>Savignyella lafontii</i>	x		NO
<i>Schizoporella pingens</i>		x	SI
<i>Watersipora subtorquata</i>		x	SI

<i>Nolella stipata</i>	x	SI
<i>Amathia verticillata</i>		x SI
<i>Didemnum perlucidum</i>		x SI
<i>Didemnum cineraceum</i>	x	SI
<i>Diplosoma listerianum</i>		x SI
<i>Polyclinum constellatum</i>		x SI
<i>Aplidium californicum</i>	x	SI
<i>Aplidium solidum</i>	x	NO
<i>Cystodytes dellechiaiei</i>	x	SI
<i>Ascidia ceratodes</i>	x	NO
<i>Ascidia sydneyensis</i>		x SI
<i>Botrylloides giganteus</i>		x SI
<i>Botrylloides niger</i>		x SI
<i>Botryllus tuberatus</i>	x	NO
<i>Polyandrocarpa zorritensis</i>		x SI
<i>Styela canopus</i>		x SI
<i>Symplegma brakenhielmi</i>		x SI
<i>Symplegma rubra</i>		x SI
<i>Halocynthia dumosa</i>	x	NO
<i>Microcosmus exasperatus</i>		x SI
<i>Pyura haustor</i>	x	SI
<i>Caulerpa chemnitzia</i>	x	NO
<i>Caulerpa racemosa</i>	x	NO
<i>Asparagopsis "taxiformis"</i>	x	SI
<i>Batis maritima</i>	x	NO

Un estudio realizado por la Fundación Charles Darwin (s.f.) liderado por Inti Keith en 2019 señala que la mayoría de especies introducidas marinas en Galápagos son traídas por embarcaciones o incluso contenedores u objetos que flotan y terminan varados en las islas. Asimismo, un estudio de la misma institución que consistió en la instalación de placas de asentamiento de PVC que fueron ubicadas en lugares transitados por navíos que

ingresan y salen de las islas entre 2015 y 2016, confirmó la presencia de dos invertebrados invasores conocidos globalmente como: el “briozoo spaghetti” del Caribe *Amathia verticillata* y la ascidia asiática *Ascidia sydneiensis* (Fundación Charles Darwin, s.f.).

Tabla 2. Listado de especies potencialmente no nativas (tomada de Keith, 2016).

Nombre común	Nombre científico
Estrella del Pacífico Norte	<i>Asterias amurensis</i>
Percebe caribeño	<i>Chthamalus proteus</i>
Mejillón rayado negro	<i>Mytilopsis sallei</i>
Alga marina japonesa (wakame)	<i>Undaria pinnatifida</i>
Coral copo de nieve	<i>Carijoa riisei</i>
Alga uva	<i>Caulerpa cylindracea</i>
Dedos de mar verde	<i>Codium fragile</i>
Hierba de arpón rojo	<i>Asparagopsis armata</i>
Alga roja	<i>Gracilaria salicornia</i>
Hierba de gancho	<i>Hypnea musciformis</i>
Alga espinosa	<i>Acanthophora spicifera</i>
Joyero frondoso	<i>Chama macerophylla</i>
Anémona de mar verde con rayas anaranjadas	<i>Diadumene lineata</i>
Didemnido blanco	<i>Didemnum candidum</i>
Espona azul del Caribe	<i>Haliclona caerulea</i>
Cangrejo verde europeo	<i>Carcinus maenas</i>
Pargo rayado azul común	<i>Lutjanus kasmira</i>
Pez león colorado	<i>Pterois volitans</i>

Por lo tanto, el uso y aplicación de eDNA como técnica de monitoreo es clave tanto para monitoreos de diversidad a largo plazo como para la detección pronta de especies introducidas debido a su eficiencia y que puede generar alertas tempranas al identificar especies introducidas dentro de un ecosistema (Reyes, 2018) incluso si el muestreo identifica solo unos cuantos individuos no autóctonos en el medio (NISC, 2022). De esta

forma, brinda la posibilidad de generar líneas de trabajo oportunas que permitan adoptar estrategias enfocadas en la conservación y manejo (Reyes, 2018).

En este sentido, este trabajo pretende verificar la sensibilidad de la herramienta, ADN ambiental, con el propósito de innovar en nuevos mecanismos que fortalezcan las medidas de monitoreo y control de especies.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la eficiencia y sensibilidad del ADN ambiental (eDNA) para detectar especies marinas introducidas y diversidad de peces en sitios con alta y baja actividad humana en la Isla San Cristóbal.

Objetivos específicos

Determinar la presencia de especies marinas introducidas en tres sitios de la Isla San Cristóbal: Playa de los Marineros, La Predial y La Tortuga, mediante el uso de ADN ambiental.

Comparar la diversidad de peces óseos y cartilagosos en los tres sitios de estudio de la Isla San Cristóbal.

3. MÉTODOS

La investigación tiene un enfoque cuantitativo y comprende cuatro componentes: revisión bibliográfica para sustentar los procesos e información hasta ahora conocida, colecta de muestras, trabajo de laboratorio y análisis de datos. A continuación, se detallan los tres últimos componentes.

3.1. Recolección de muestras

La recolección de muestras se realizó en el transcurso de dos días. Durante el primer día (18 de septiembre de 2022, aprox. 13:00 pm) se visitó el sitio La Tortuga, sitio alejado de Puerto Baquerizo Moreno, con el uso de una lancha de pesca. Durante el segundo día (24 de septiembre de 2022, aprox. 11:00 am) se visitó dentro del Puerto la Playa de los Marinos usando un taxi acuático y La Predial (Figura 1, Tabla 3). El muestreo se realizó desde la embarcación para La Tortuga y Playa de los Marinos, pero en La Predial fue desde la orilla del muelle.



Figura 1. Sitios de recolección de las muestras en la Isla San Cristóbal.

Con la ayuda de la botella Niskin se recolectaron nueve muestras de 1 litro de agua cada una correspondiente a tres réplicas por cada lugar (Tabla 3). Se inició limpiando la botella Niskin con toallas de cloro para desinfectar superficies usando guantes y con un GPS se registró la ubicación exacta del sitio de muestreo.

Posteriormente, se vertió el contenido en botellas previamente esterilizadas, etiquetadas con el nombre del lugar y número de réplica (Figura 2). La primera réplica se realizó a la profundidad máxima del sitio de colecta, la segunda réplica se tomó a profundidad media y la tercera réplica se tomó en superficie a 30 centímetros aproximadamente. Se registró la fauna observada durante la colección de muestras. Finalmente, las muestras fueron llevadas al Laboratorio de microbiología y biología molecular del Galapagos Science Center (GSC) para continuar con la fase de laboratorio.

Los materiales empleados para la recolección de muestras se detallan en el Anexo 1.

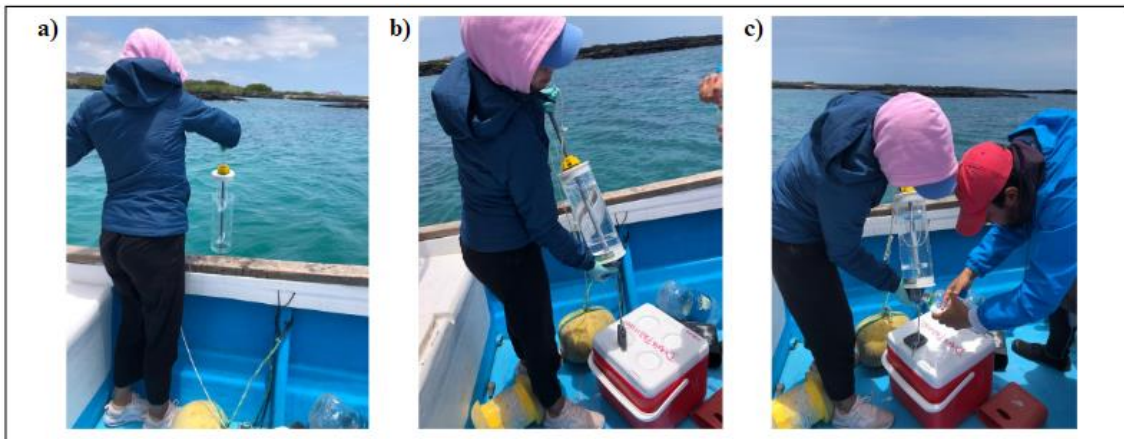


Figura 2. Proceso de recolección de muestras en el sitio La Tortuga. a) Introducción de botella Niskin para recolección de muestras, b) Recolección de muestra de agua, y c) Obtención de la primera réplica y traspaso a una botella esterilizada (1 litro).

Tabla 3. *Detalle de las muestras colectadas en este estudio.*

Nombre de la muestra	Abreviatura del nombre	Ubicación/Coordenadas		Profundidad (m)		
		Latitud	Longitud	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3
La Tortuga	LT	S -00.71795	W -089.39121	15	7	superficie
Playa de los Marinos	PM	S -00.90089	W -089.61349	5	3.5	superficie
La Predial	LP	S -00.89348	W -089.61185	3	1	superficie

3.2. Procesamiento de muestras en el laboratorio

Las nueve muestras recolectadas en el campo fueron llevadas al laboratorio de microbiología y biología molecular del Galapagos Science Center, donde fueron filtradas (Figura 3a) con una bomba peristáltica Geotech Geopump easy-load II (Figura 3b) en los mismos días que fueron recolectadas.

Las muestras se procesaron utilizando filtros estériles Sterivex GP 022 um en un ambiente desinfectado y limpio. El primer filtrado se realizó para las tres primeras muestras del sitio La Tortuga el 18 de septiembre de 2022 y el segundo filtrado se realizó con las tres muestras del sitio Playa de los Marinos y las tres muestras del sitio La Predial el 24 de septiembre de 2022. Posteriormente, se colocó buffer ATL en cada filtro para preservar las muestras y luego se cerraron ambos extremos del mismo con sus respectivas tapas asegurándolas con Parafilm, cada muestra fue etiquetada con su nombre y fecha, y fueron envueltas en papel aluminio para evitar que la luz degrade el ADN.

Los equipos, materiales y reactivos usados para este proceso se detallan en el Anexo 2.

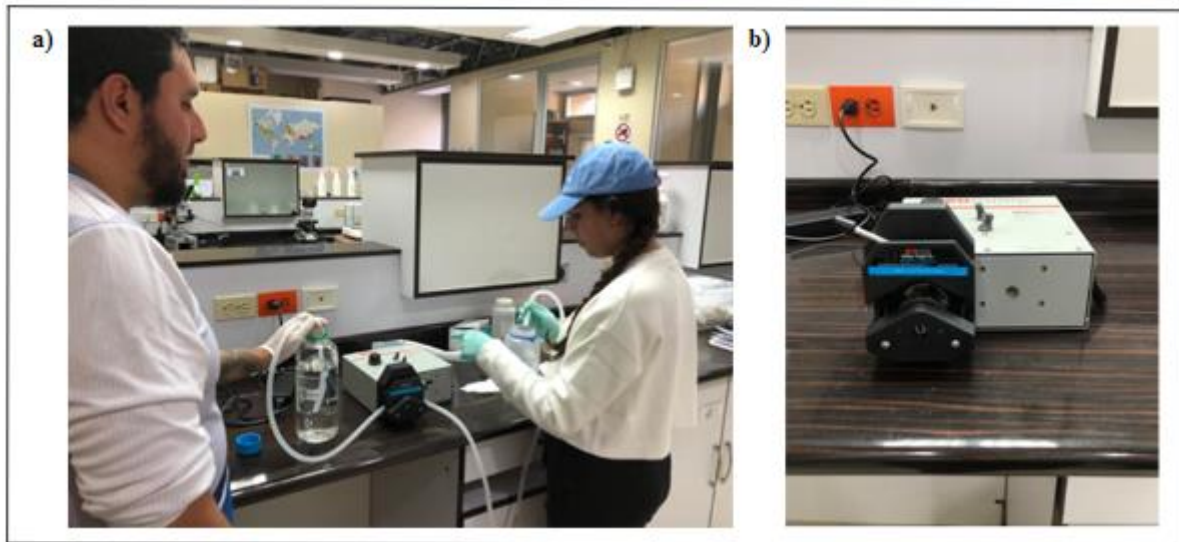


Figura 3. Proceso de filtración. a) Filtración de las muestras de la localidad La Tortuga. b) Bomba Geopump peristáltica easy-load II usada para este proceso.

3.2.1. Extracción y cuantificación de ADN

Para la extracción de ADN se siguió el protocolo del kit comercial Qiagen Dneasy Blood and Tissue (Jeunen et. al, 2018), el cual fue optimizado para extracción de muestras de agua en el laboratorio del GSC. Cada una de las muestras filtradas fue repartida en dos tubos eppendorf: uno correspondiente a la muestra de la cápsula (que contiene el filtro) y uno a la muestra del buffer ATL. Para el primer proceso, se centrifugaron las muestras a 6000 revoluciones por minutos (rpm) durante 30 minutos. Se sacó el líquido conservando el pellet, se añadieron 180 uL de ATL, 40 uL de Proteinasa K, se pasó por vortex y las muestras se incubaron durante 24 horas a 56°C. Para el segundo proceso, al filtro seco se añadió 700 uL de Buffer ATL, 100 uL de Proteinasa K, se pasó por vortex, se colocó parafilm en las tapas y se incubó a 56° C por 24 horas. Así, se realizó un total de 18 extracciones.

Para la precipitación de proteínas y pasos de lavados, ya sea del buffer o cápsula, se realizó una mezcla en relación 1:1:1 (muestra: buffer AL: etanol frío). Posteriormente, se agregó 500 mL de Buffer AW1 en cada tubo, se centrifugó a 8.000 rpm por un minuto y al spin column conservado se agregó Buffer AW1 y se centrifugó por tres minutos y medio a 13.300 rpm. Posteriormente, se etiquetó los tubos eppendorf, se agregó Buffer AE y se dejó reposar por 10 minutos antes de llevarlos a centrifugación a 8.000 rpm durante dos minutos. Finalmente se conservó la extracción a -20°C en ambos tipos (buffer y cápsula).

La cuantificación de ADN se realizó con la ayuda del Nanodrop 2000 utilizando la técnica de espectrofotometría. Para determinar la pureza del ADN se utilizó la relación de absorbancia A 280/260 para determinar su pureza (Banco ADN, s.f.). El índice de pureza de ADN aceptable es mayor a 1,8 (Banco ADN, s.f.). De esta forma, se evaluó la concentración (ng/uL) y calidad de cada muestra usando 1 uL de ADN de cada tubo de extracción y al finalizar se conservaron las muestras a - 20° C. Además, se determinó la integridad del ADN por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%. Como dye fluorescente se utilizó 2 uL de Syber Safe en 100mL de agarosa (1%), y el gel corrió en la cámara de electroforesis a 100 V por 45 minutos. La imagen del gel se visualizó con la ayuda del Molecular Imager Gel Doc. Posteriormente, se escogieron las nueve mejores muestras reflejadas en la imagen obtenida.

3.2.2. Amplificación de ADN mediante PCR

El gen amplificado en este estudio fue el gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI).

Para esto se usaron los primers detallados en la Tabla 4.

Tabla 4. *Detalle de primers utilizados en la amplificación de ADN (Leray et al., 2013).*

Primer	Secuencia
mICOLintF	5'TTTCTGTTGGTGCTGATATTGCGGWACWGGWTGAACWGT WTAYCC-3'
mICOLintR	5'ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTCTAAACTTCAGGGTGACCAA ARAYCA-3'

El proceso de PCR se realizó a través de una mezcla compuesta por 2.5 uL de GoTaq colorless Master Mix, 0.6 uL de Primer Forward, 0.6 uL de Primer Reverse, y agua de PCR en un volumen total de 25 uL por reacción. La Taq Master Mix utilizada ya contenía dNTPs, MgCL₂ y Go taq buffer. El volumen de agua PCR usado se colocó dependiendo la concentración de cada muestra. Además, en caso de requerir el reactivo BSA (1 – 1.5 uL, dependiendo la muestra; (Figura 4b), este volumen se consideró dentro del volumen final de los 25 uL. El termociclador inició con un ciclo de 95 °C durante 4 minutos, 35 ciclos de 94° C durante 30 segundos, 35 ciclos de 50° C durante 40 segundos, dos veces 35 ciclos de 68° C durante 1 minuto por ciclo y luego un ciclo a la misma temperatura durante 5 minutos, y finalmente por duración extendida a 4° C. Finalmente, se realizó cuantificación de las nueve muestras en Nanodrop 2000.

3.2.3. Secuenciamiento de ADN

La preparación de la librería y el secuenciamiento se realizó siguiendo el protocolo PCR Barcoding Expansion 96 (EXP-PBC096) de Oxford Nanopore Technologies (ONT) (Versión: PBAC96_9069_v109_revO_14Aug2019) en el dispositivo MinION MK1C de ONT. Se realizaron modificaciones específicas para este estudio. El protocolo del

fabricante es extenso, de esta manera a continuación se detallan únicamente las modificaciones realizadas en este estudio:

3.2.3.1. Barcoding PCR

Una vez amplificadas exitosamente las PCR el gen COI mediante una primera PCR, se realizó una segunda PCR para añadir un barcode específico para cada muestra. Un barcode constituye una secuencia corta de ADN y funciona a modo de diferenciador entre las muestras, lo que permite identificar cada muestra una vez que se combinan en una sola librería. Con este proceso de PCR se inicia la preparación de la librería para el secuenciamiento. En este proceso utilizamos GoTaq Colorless Master Mix en lugar de LongAmp Taq 2X Master Mix como se sugiere en el manual.

3.2.3.2. Reparación de ADN y preparación de los extremos

Una vez colocados los barcodes en cada muestra, es necesario preparar los extremos de los fragmentos de ADN y prepararlos para añadir el adaptador que requieren para el secuenciamiento. Para ello, se siguió el protocolo de nanopore con dos modificaciones puntuales: (1) se usó una concentración de 1x de Magnetic Beads debido al tamaño del fragmento de COI (aproximadamente 450 pb); (2) se realizó un único paso de limpieza, eliminando así el paso 13 descrito en el protocolo.

3.2.3.3. Ligadura y limpieza de adaptadores

En este proceso se añade un adaptador para que los poros reconozcan las secuencias de la librería, y se llevan a cabo pasos de limpieza. Las modificaciones fueron: uso de Short Fragment Buffer (SFB) en lugar de Long Fragment Buffer (LFB) debido a que el fragmento de interés en este estudio no tiene más de 3 kb. Por esta razón, no se realizó el

paso 4 y 14 del protocolo. Al finalizar se diluyó la muestra a una concentración de 0.5 – 1.5 ng/uL.

3.2.3.4. Cebado y carga de la celda de flujo SpotON

Para este proceso se siguieron los pasos establecidos en el protocolo sin ninguna alteración. Este proceso consiste en cargar la librería previamente preparada por goteo usando pipeta en el puerto SpotON de la celda de flujo.

3.2.3.5. Secuenciamiento y análisis de datos

Para el secuenciamiento se utilizó el dispositivo portátil MinION MK1C para el último paso de secuenciamiento. El dispositivo de secuenciamiento MinION crea archivos FAST5 y FASTQ, a la vez elabora basecalling y demultiplexing. Posteriormente, revisando el tamaño y calidad de las muestras analizadas es posible determinar el éxito o no del proceso. Con ello, basándose en los archivos FASTQ se genera una tabla que presenta los resultados en cuanto al tamaño y calidad promedio.

Los datos obtenidos del MinION fueron analizados por apoyo externo en bioinformática. Se realizó una limpieza de los reads para mantener solo aquellos entre 400 y 800 pares de bases. De la misma manera se filtró los reads “unclassified” que no correspondían a los barcodes usados. Luego, se buscó coincidencias entre las secuencias de este estudio con secuencias disponibles en la base de datos de Genbank con un umbral del 95% de identidad.

4. RESULTADOS

4.1. Colección de muestras

Se recolectaron nueve muestras correspondientes a tres localidades costeras distribuidas en la costa occidental de la Isla San Cristóbal (tres réplicas por localidad correspondientes a tres diferentes profundidades; Tabla 3). Durante el muestreo en los sitios se registró la fauna observada. En La Tortuga se observaron aves marinas incluyendo fragatas, gaviotas de lava y piqueros de patas azules. En La Predial se observaron lobos marinos y tiburones punta negra. En Playa de los Marinos se observó una tortuga verde.

4.2. Procesamiento de laboratorio

4.2.1. Extracción de ADN

En total se realizaron 18 extracciones de ADN (dos extracciones por muestra): nueve extracciones de cápsula y nueve de buffer. El ADN genómico mostró una concentración entre 3.90 ng/uL a 28. 0 ng/uL (Tabla 5). Todas las muestras presentaron valores aceptables de pureza (>1.8 en el rango de absorbancia A260/280; Tabla 5), y solamente una muestra LT2c presentó un valor aceptable (entre 2 – 2.2 en el rango de absorbancia A260/230; Tabla 5).

Tabla 5. *Detalle de la cantidad y calidad de ADN obtenida para las 18 muestras cuantificadas.*

Localidad	Réplica	Submuestras	Código	Ácido nucleico (ng/uL)	A260/280	A260/230
Playa de los Marinos	Réplica 1	Cápsula	PM1c	10.50	2.74	0.49
		Buffer	PM1b	10.90	1.93	0.48
	Réplica 2	Cápsula	PM2c	12.00	2.66	0.38
		Buffer	PM2b	5.30	2.87	0.56
	Réplica 3	Cápsula	PM3c	15.00	2.54	1.16
		Buffer	PM3b	6.50	2.36	0.18
La Predial	Réplica 1	Cápsula	LP1c	8.50	3.28	0.65
		Buffer	LP1b	4.10	2.90	1.56
	Réplica 2	Cápsula	LP2c	6.40	3.16	0.58
		Buffer	LP2b	3.90	2.51	0.38
	Réplica 3	Cápsula	LP3c	9.10	3.22	1.12
		Buffer	LP3b	4.20	2.78	1.13
La Tortuga	Réplica 1	Cápsula	LT1c	28.00	2.45	0.79
		Buffer	LT1b	7.60	2.61	0.57
	Réplica 2	Cápsula	LT2c	27.00	2.39	2.24
		Buffer	LT2b	6.70	2.49	0.60
	Réplica 3	Cápsula	LT3c	22.70	2.38	1.36
		Buffer	LT3b	6.60	2.90	0.30

4.2.2. Amplificación y secuenciamiento de ADN

De las 18 extracciones de ADN, se amplificó exitosamente el gen Citocromo Oxidasa I (COI) para 11 muestras, cuatro de ellas con ayuda de BSA (Figura 4a, 4b). El tamaño del fragmento para las muestras se encuentra entre 400-500 pares de bases. Para el secuenciamiento, se seleccionaron las tres mejores extracciones por localidad en cuanto a concentración y calidad (total: 9 muestras secuenciadas). Este proceso de selección fue realizado sin distinción de la profundidad de las muestras obtenidas en cada localidad ya que análisis previos no muestran diferencias en la diversidad de organismos encontrada entre réplicas de muestras marinas (Diana Pazmiño, comunicación personal). Así, se usaron LP1c, LP2c, LP3c para el sitio la Predial, LT1b, LT2b, LT3b para el sitio La Tortuga y PM1b, PM2b, PM3b para la Playa de los Marineros (Tabla 6). La concentración de ADN posterior a los lavados realizados en este proceso fue: (1) post primer lavado entre 76.3 ng/uL a 144.2 ng/uL, (2) post segundo lavado de 24.7 ng/uL y (3) post tercer lavado 4 ng/uL (Tabla 6). Después del primer lavado, todas las muestras fueron combinadas (librería), de esta manera los valores presentados corresponden a la concentración de la librería.

Tabla 6. *Cuantificación de ADN de las muestras durante el proceso de preparación de la librería: post-segunda PCR, post-lavado 1, post-lavado 2 y post-lavado 3.*

Código de muestras	Cuantificación (ng/uL)			
	Post-segunda PCR	Post lavado 1	Post lavado 2	Post lavado 3
LP1c	539.1	81.6		
LP2c	586.8	76.3		
LP3c	571.6	83.0		

LT1b	616.7	91.7		
LT2b	603.9	83.6	24.7	4
LT3b	626.7	101.9		
PM1b	617.6	132.4		
PM2b	562.2	144.2		
PM3b	342.2	97.6		

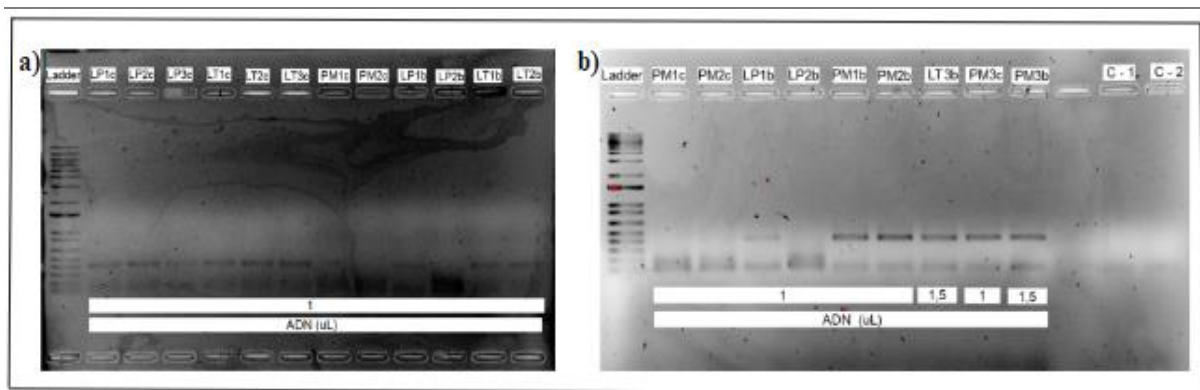


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los sitios muestreados en la Isla San Cristóbal. a) 11 muestras correspondientes al primer grupo. b) nueve muestras con BSA correspondientes al segundo grupo y dos controles negativos.

Se secuenciaron exitosamente las nueve muestras de ADN (tres por localidad) en el dispositivo MinION (Tabla 6). En total, se generaron 298.946 reads para las nueve muestras. Después del análisis de calidad y filtrado de las secuencias, se mantuvieron 78.947 reads.

4.2.3. Especies introducidas

Se compararon las secuencias producidas en este estudio con secuencias de especies confirmadas como introducidas y criptogénicas en el estudio en el estudio de Carlton et al. (2019). Cabe recalcar que no todas las especies de esta lista cuentan con secuencias de

COI publicadas en GenBank, por lo que para esta comparación seleccionamos solamente 45 especies que si cuentan con secuencias de COI en Genbank. Se pudo identificar la presencia de cuatro especies introducidas: *Didemnum cineraceum* (ascidia), *Psilopa girschneri* (insecto), *Obelia dichotoma* (cnidario) y *Kirchenpaueria halecioides* (cnidario) y nueve especies criptogénicas: *Anisolabis marítima*, *Halopteris alternata*, *Clytia hummerlincki*, *Watersipora subtorquata*, *Polyandrocarpa zorritensis*, *Myrianida pachycera*, *Celleporaria inaudita*, *Bougainvillia muscus* y *Botrylloides niger* (Figura 5). La mayor cantidad de estas especies se muestran en el sitio La Predial (11), siendo tres de ellas introducidas y ocho criptogénicas. En el sitio La Tortuga se encontró cuatro especies criptogénicas y una especie introducida. Y en el sitio Playa de los Marinos se encontró una especie introducida y tres criptogénicas.

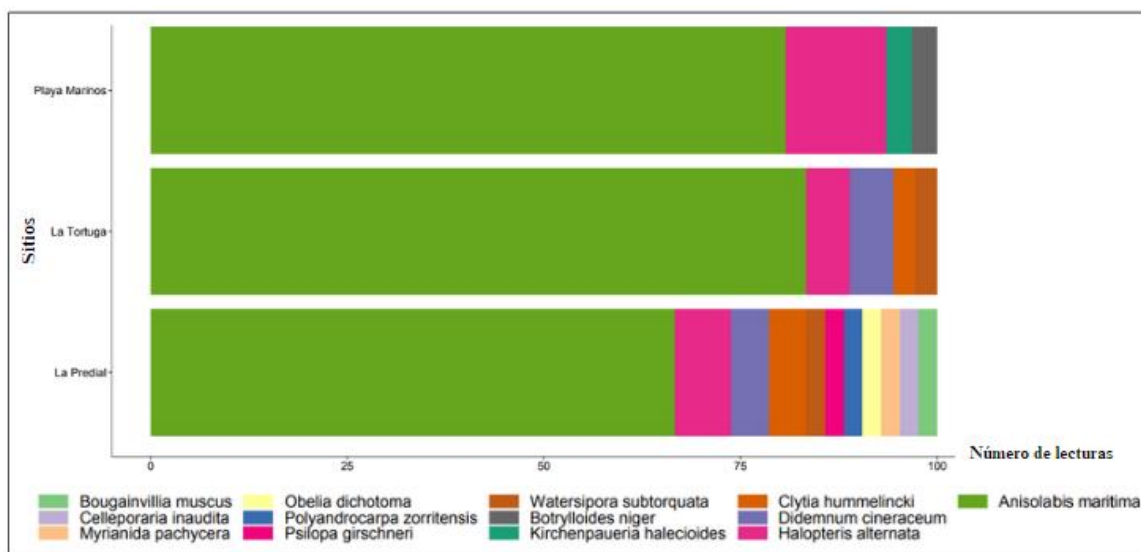


Figura 5. Especies introducidas y criptogénicas encontradas para cada sitio de estudio al 95% de identidad.

4.2.4. Diversidad de peces óseos

Mediante el uso de un pipeline desarrollado específicamente para este proyecto se realizó un BLAST usando una base de datos que incluye 200.834 secuencias de COI para peces óseos, elasmobranquios, tortugas y delfines disponibles en National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para propósito de esta comparación, se revisó el top de 30 géneros y especies para los 3 sitios de estudio (Figura 6). Se registró una sola especie por cada género identificado. En adelante se describe los análisis a nivel de género únicamente.

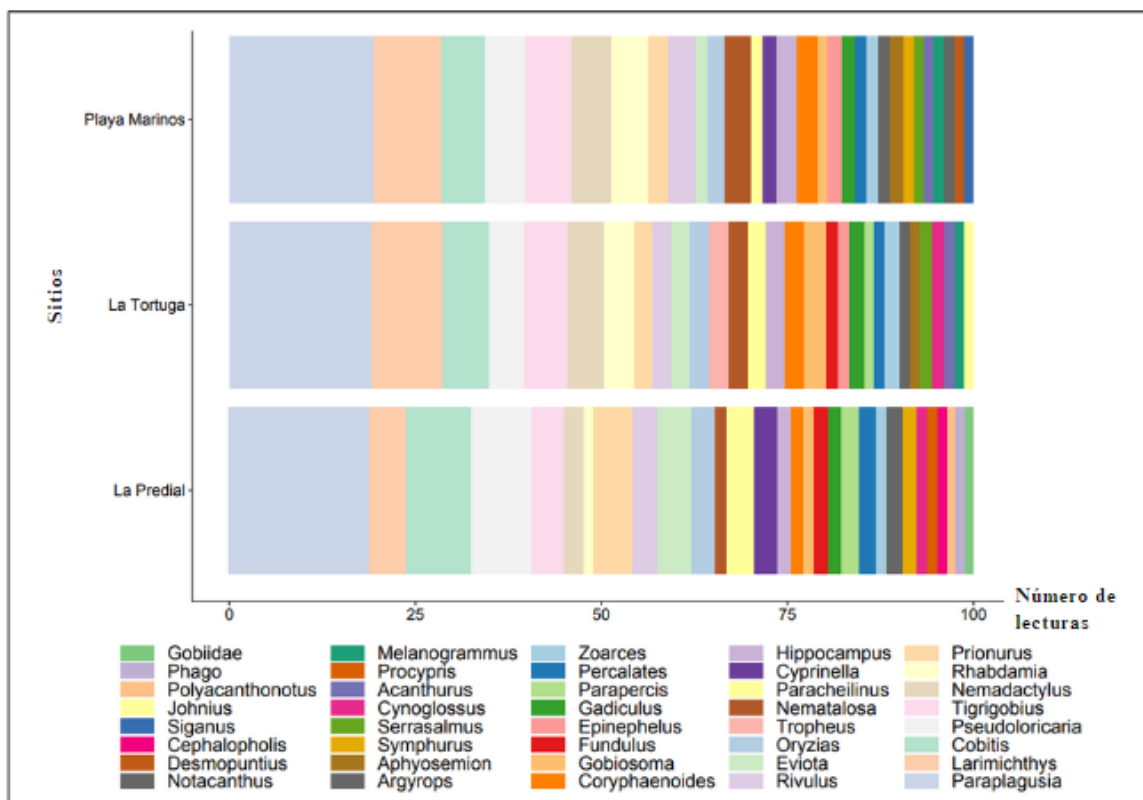


Figura 6. Top 30 de géneros encontrados para cada sitio de estudio con el 95% de identidad.

Las localidades presentan entre 5 – 10% de géneros únicos para cada localidad, mientras que comparten 50% de géneros entre las tres localidades. La localidad La Tortuga comparte un 60% de géneros tanto con Playa de los Marinos como con La Predial,

mientras que solamente el 55% se comparte entre Playa de los Marinos y La Predial (Figura 7).

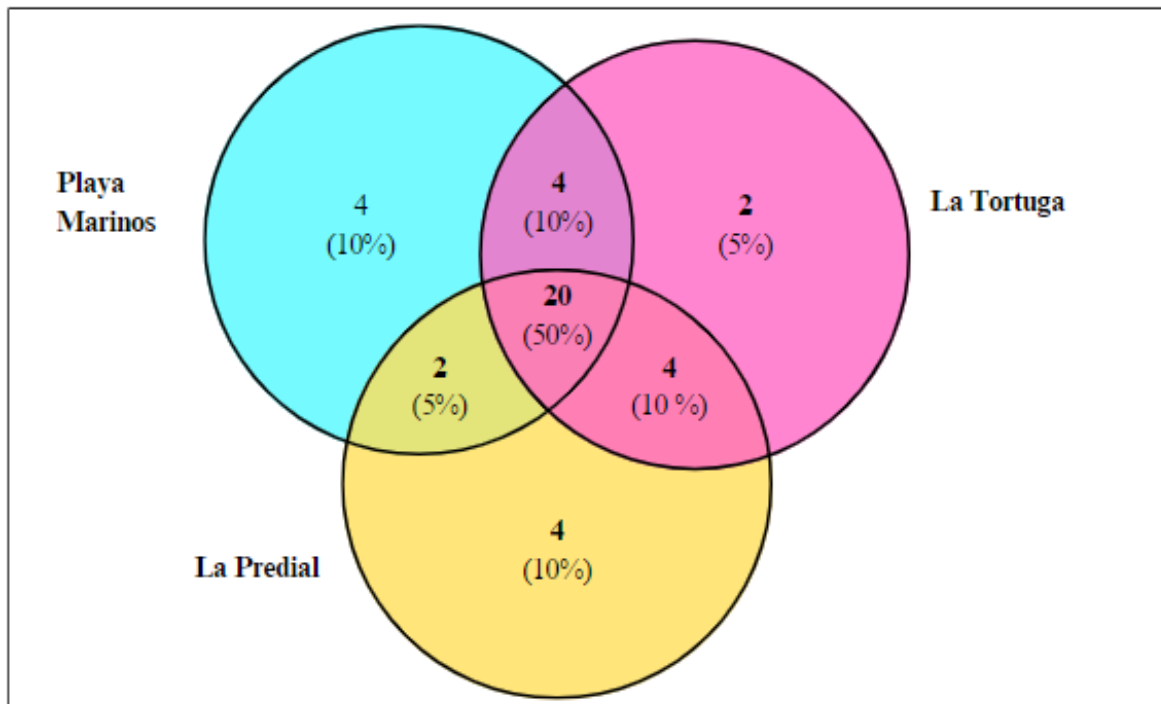


Figura 7. Diagrama de Venn representando el número de géneros únicos por localidad y compartidos.

Se encontró que 30 de los 47 géneros reportados en este análisis no están registrados en el Datazone de la Fundación Charles Darwin (FCD) (*ver discusión*). Al revisar detenidamente los 17 taxones restantes se pudo observar que: (1) tres de los géneros identificados mediante eDNA (*Echenesis*, *Hippocampus* y *Acanthurus*) corresponden a géneros que sí están reportados en Galápagos; (2) al menos cinco de los géneros encontrados con eDNA (*Tigrigobius*, *Gobiesox*, *Pseudanthias*, *Rastrelliger* y *Alepes*) tienen sinónimos o nombres anteriores que coinciden con géneros reportados en Galápagos (*Elacatinus*, *Arcos*, *Serranus*, *Scomber* y *Caranx*, respectivamente); (3) dos familias detectadas mediante eDNA (Tripterygiidae y Gobiidae) corresponden a familias que sí se reportan para Galápagos. La familia Tripterygiidae en las islas cuenta con una sola especie, *Lepidonectes corallicola*. La familia Gobiidae cuenta con siete especies

descritas en Galápagos: *Lythrypnus gilberti*, *Bathygobius lineatus*, *Coryphopterus urospilus*, *Elacatinus nesiotes*, *Chriolepsis tagus*, *Lythrypnus dalli* y *Lythrypnus rhizophora*; (4) siete géneros encontrados con eDNA (*Nematalosa*, *Percalates*, *Siganus*, *Dascyllus*, *Gobiosoma*, *Favonigobius* y *Crystallogobius*) tienen sinónimos que corresponden con nomenclatura antigua de géneros y/o familias actualmente reportados en Galápagos con otro nombre (*Sardinops*, *Kuhlia*, *Acanthurus*, Pomacentridae, *Lythrypnus*).

5. DISCUSIÓN

Este trabajo, usó por primera vez ADN ambiental como método de detección de especies marinas introducidas en la Isla San Cristóbal, así como también para comparar la diversidad de especies de peces óseos entre lugares con alto y bajo impacto humano.

De un total de 86 reportadas como introducidas y criptogénicas en la literatura para Galápagos (Carlton et al., 2019), se encontró secuencias para 45 especies (15 introducidas y 30 criptogénicas) con el gen COI en los registros de GenBank (15 especies introducidas y . La herramienta BLAST permitió identificar 13 especies de este tipo en las secuencias producidas en este estudio. Los resultados reflejan un nivel considerable de detección en San Cristóbal tanto de especies introducidas (4/15; 26.66%) como de especies criptogénicas (9/30; 30%) en base al total de estas especies reportado para Galápagos.

El uso de esta técnica (eDNA) para detección de especies introducidas se ha realizado a nivel mundial. En Reino Unido, se realizó una comparación de composición de la comunidad a través de meta-barcoding del gen COI y 18S en sitios costeros artificiales a partir de muestras de sedimento y agua; se detectaron varias especies no autóctonas y algunas de ellas correspondían a introducciones recientes (Holman et al., 2019). También, en México, Valdez-Moreno et al. (2019) realizaron una investigación donde utilizó eDNA en muestras de agua y sedimentos en lagos: Bacalar y sus ríos adyacentes. Ésa fue la primera vez que se usó esta herramienta en México con la finalidad de bio monitorear la comunidad de peces de dicho lago donde detectaron secuencias para seis especies no registradas previamente (Valdez-Moreno et al., 2019). Es así como, el ADN ambiental se muestra como una herramienta costo-eficiente para el monitoreo de especies marinas y desarrollo de líneas de trabajo y respuesta oportunas.

A pesar de los esfuerzos puestos para entender los riesgos y efectos de las especies marinas introducidas, todavía existen vacíos de información (UICN, 2019). En parte, por la poca evidencia sobre algunas especies, pero también por la limitada capacidad de detectar eventos de invasiones en etapas tempranas (Noble, 2011). Los datos obtenidos en este estudio corroboran la sensibilidad del ADN ambiental para detectar especies introducidas y criptogénicas a partir de un volumen reducido de agua (13L).

El sitio La Predial alberga la mayor cantidad de especies marinas introducidas (Figura 5), lo que podría explicarse dado el uso del sitio. La Predial al ser un muelle de carga constituye uno de los principales puntos de posibles introducciones ya que las especies ajenas al sitio pueden llegar a través de los barcos, sus cascos y aguas de lastres (Alfaro et al., 2014). Por el contrario, el sitio La Tortuga se encuentra aproximadamente a unos 35 km de Puerto Baquerizo Moreno y es un sitio con escasa literatura disponible. No obstante, es conocido que en este sitio no está permitido realizar actividades turísticas, por lo que es un sitio con bajo impacto humano.

Las especies introducidas pueden generar daños irreparables en el entorno marino y afectar el gran valor biológico y económico que representan para el archipiélago y sus habitantes (Martínez & Causton, 2007). En este sentido, se recalca la importancia de usar herramientas sensibles como el ADN ambiental para identificar especies de las islas, y a través de ello generar líneas de trabajo enfocadas en el monitoreo, prevención y control de las mismas. Los resultados de este estudio sugieren que el área de La Predial debe ser considerada como el primer punto de posibles introducciones futuras en San Cristóbal, y así planes de control y prevención deben ser enfocados en esta área. Sin embargo, este es un estudio preliminar y se recomienda un uso cauteloso de los resultados, así como un análisis más detallado de las muestras para una confirmación definitiva. Además, se recomienda combinar el uso de eDNA con herramientas de monitoreo convencionales (ej.

Muestreos visuales) que permitan obtener información de abundancia de las especies de interés.

En cuanto a la composición de especies de peces óseos, los resultados indican de manera general que los tres sitios de estudio: La Predial, Playa de los Marinos y La Tortuga comparten un porcentaje alto de especies de peces óseos. En ninguno de los sitios se detectó la presencia de peces cartilaginosos. La zona de Bahía Naufragio donde se encuentra la Playa de los Marinos presenta problemas de contaminación a causa de reparaciones de embarcaciones, descarga de aguas grises y residuos de productos químicos como pinturas tóxicas (Barreno, 2015).

De la misma forma, el sitio La Predial constituye una zona de alto impacto humano debido a que es el puerto de desembarque de carga de los insumos que llegan desde el continente. Resulta interesante que el sitio La Tortuga, que se encuentra alejado del puerto y sujeto a un menor impacto humano en general, comparta los mismos géneros (cuatro) con las dos localidades cercanas al puerto (Playa de los Marinos y La Predial), mientras que entre los dos últimos aún al estar geográficamente cerca (alrededor de 960 m), apenas comparten dos géneros. Esto podría deberse a que las tres localidades son ecosistemas marinos, todos ubicados en la zona occidental y de la misma isla.

La mayor parte de las especies de peces óseos identificadas en este estudio coincidieron a nivel de género, sinónimo o nomenclatura antigua de género y familia con taxones descritos previamente en las islas. Cabe recalcar que la mayor parte de especies de peces registradas en las islas no han sido secuenciadas, por tanto, no existe una base de referencia genética apropiada para identificación. Esto limita la capacidad de identificación y caracterización de biodiversidad, y resalta la necesidad de una base de datos genética que refleje la biodiversidad real de Galápagos.

Limitaciones y recomendaciones

Los análisis de los procesos de laboratorio las nueve muestras extraídas manifestaron buena pureza de ADN en el nivel absorbancia 260/280, aunque no sucede lo mismo en el nivel de absorbancia 260/230 donde una sola muestra se encuentra dentro del rango estipulado por este parámetro. El nivel de absorbancia 260/230 es usualmente considerado una medida secundaria para el análisis de la pureza de ADN (Lucena et al., 2016). Las 17 muestras con bajos valores en este segundo nivel podrían estar relacionadas con la presencia de fenoles residuales (Matlock, s.f.), carbohidratos, proteínas o absorbancia de sales a 230 nm (Lucena et al., 2016). Sin embargo, no fue una limitante para continuar con el procedimiento.

A pesar de la sensibilidad del ADN ambiental, cabe mencionar que también presenta varias limitaciones. Por ejemplo, la información que brinda no contempla la abundancia de especies del sitio, sino que se limita a determinar la presencia o ausencia de especies (Ruppert et al., 2019).

Considerando esto, se sugiere complementar estos análisis con estimaciones de la abundancia de cada especie usando otros métodos. Así, será posible determinar si el impacto antropogénico tiene algún efecto negativo en la abundancia de las especies en estas zonas.

Durante el muestreo, en el sitio La Predial se observó lobos marinos y tiburones punta negra y en el sitio Playa de los Marinos se observó una tortuga verde. Sin embargo, en ninguno de los casos se encontró secuencias de estas especies, a pesar de haberlas observado. Esto podría deberse a la poca concentración de ADN que liberaron las especies al momento de realizar el muestreo o que simplemente las muestras de agua colectadas no contuvieron ADN de estas especies. Sin embargo, es importante continuar registrando

las especies observadas como parte del protocolo debido a que complementará los resultados obtenidos después del análisis del eDNA, ya que la abundancia de especies podría influir en la detección o no de las mismas.

Al ser un estudio preliminar, se sugiere ampliar las variables y complementarlo con técnicas tradicionales de monitoreo tales como registro de especies observadas, captura y marcaje, uso de transectos, cámaras submarinas, identificación de principales amenazas, recolectar muestras del sedimento, entre otros. Además, expandir los sitios de estudios alrededor de todo el archipiélago, permitiendo impulsar el desarrollo de nuevas estrategias que ayuden a conservar las especies únicas y su hábitat puesto que son recursos valiosos.

6. CONCLUSIONES

Se identificó 13 especies, de las cuales cuatro son especies catalogadas como introducidas y nueve corresponden a especies criptogénicas; y también que los tres sitios de estudio comparten entre ellos el 50% de los géneros de peces óseos encontrados en este trabajo. De esta forma, se visualizó que el ADN ambiental es una técnica lo suficientemente sensible en la detección de especies introducidas, un tema clave para prolongar el buen estado de conservación de la biodiversidad única del archipiélago, y a su vez impulsar esfuerzos dirigidos al manejo de las mismas. Esta investigación mostró resultados bastante preliminares por lo que se sugiere realizar más estudios e incorporar en el análisis del listado de potenciales especies invasoras en la Reserva Marina de Galápagos.

Además, este estudio resaltó la importancia de contar con una base de datos genéticos de las especies de Galápagos puesto que es indispensable para una mejor detección tanto de especies introducidas como para comprender de mejor manera la composición de diversidad de peces en los ecosistemas marinos costeros. A largo plazo, se recomienda extender las áreas de muestreo a otras islas pobladas y no pobladas para levantar información para todo el archipiélago. Finalmente, se recomienda un uso prudencial de los datos presentados en este trabajo.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alfaro, R. M., Ramírez-Martínez, C., González, C. A., & del Castillo, M. E. M. (2014). Principales vías de introducción de las especies exóticas. *Mendoza, R. & Koleff, P.(coords.) Especies acuáticas invasoras en México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México*, 43-73.
- Banco ADN. (s.f). PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN. Recuperado de: <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>
- Barreno, O. (2015). ACTUALIZACIÓN DEL PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL DEL CANTÓN SAN CRISTÓBAL 2014 – 2019. https://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/2060000230001_Diagn%C3%B3stico%20SC_27-10-2015_10-32-46.pdf
- CAF. (marzo de 2022). *El cambio climático: El nuevo reto evolutivo de las Galápagos*. https://www.caf.com/media/3042414/evaluacion-social-y-ambiental-galapagos_marzo-2021.pdf
- Cardinale, B.J., Duffy Gonzalez, A, Hooper, DU, Perrings, C, Venail, P, Wardle, DA., Kinzig, AP., Daily, GC., Loreau, M., Grace, JB., Larigauderie, A., Srivastava, DS., Naeem, S. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature* 486: 59-67. DOI: [10.1038/nature11148](https://doi.org/10.1038/nature11148)
- Carlton, JT, Keith, I. y Ruiz, GM (2019). Evaluación de las invasiones biológicas marinas en las Islas Galápagos: implicaciones para la biología de la conservación y las áreas marinas protegidas. *Invasiones acuáticas* , 14 (1). <https://doi.org/10.3391/ai.2019.14.1.01>

- Carvache-Franco, W., Carvache-Franco, M., & Hernández-Lara, AB (2021). De la motivación a la segmentación en destinos costeros y marinos: un estudio de las Islas Galápagos, Ecuador. *Temas Actuales en Turismo* , 24 (16), 2325-2341.
- Consejo de Gobierno del Régimen Especial de Galápagos. (2016). Plan de Desarrollo Sustentable y Ordenamiento Territorial del Régimen Especial de Galápagos. –Plan Galápagos. Puerto Baquerizo Moreno, Galápagos, Ecuador.
https://www.gobiernogalapagos.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/04/Plan-Galapagos-2015-2020_12.pdf
- Danulat, E. & Graham J. (eds.) (2002). Reserva Marina de Galápagos. Línea Base de la Biodiversidad. Fundación Charles Darwin/Servicio Parque Nacional Galápagos, Santa Cruz, Galápagos, Ecuador. 484 pp.
https://www.researchgate.net/profile/Vanessa-Francisco/publication/233390688_Comunidades_Submareales_Rocosas_I_Organismos_Sesiles_y_Mesoinvertebrados_moviles/links/554bb9650cf29f836c98eec/Comunidades-Submareales-Rocosas-I-Organismos-Sesiles-y-Mesoinvertebrados-moviles.pdf
- Dirección del Parque Nacional Galápagos. Informe anual ingreso de visitantes a las áreas protegidas de Galápagos del año 2022. Galápagos - Ecuador.
- Fundación Charles Darwin. (s.f.). *Invasive Marine Species in the Galapagos Marine Reserve*. <https://www.darwinfoundation.org/en/research/projects/invasive-marine-species>
- Guime, M. P. (2003). La reserva marina de Galápagos.
- Hennessy, E. y McCleary, AL (2011). ¿Edén de la naturaleza? La producción y los efectos de la naturaleza 'prístina' en las Islas Galápagos. *Island Studies Journal*, 6 (2), 131-156.

- Holman, L. E., de Bruyn, M., Creer, S., Carvalho, G., Robidart, J., & Rius, M. (2019). Detection of introduced and resident marine species using environmental DNA metabarcoding of sediment and water. *Scientific reports*, 9(1), 11559.
- Jeunen, G. J., Knapp, M., Spencer, H. G., Taylor, H. R., Lamare, M. D., Stat, M., ... & Gemmell, N. J. (2019). Species-level biodiversity assessment using marine environmental DNA metabarcoding requires protocol optimization and standardization. *Ecology and evolution*, 9(3), 1323-1335.
<https://doi.org/10.1002/ece3.4843>
- Jones, J. S., Porter, A., Muñoz-Pérez, J. P., Alarcón-Ruales, D., Galloway, T. S., Godley, B. J., ... & Lewis, C. (2021). Plastic contamination of a Galapagos Island (Ecuador) and the relative risks to native marine species. *Science of The Total Environment*, 789, 147704.
- Keith, I. (2016). *Marine invasive species in the Galapagos marine reserve* (Doctoral dissertation, University of Dundee).
- Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., Martone, R. G., Lowell, N., Thomsen, P. F., Mach, M. E., Bennett, M., Prahler, E., Caldwell, M. R., & Crowder, L. B. (2014). Environmental monitoring. Harnessing DNA to improve environmental management. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6191), 1455–1456.
<https://doi.org/10.1126/science.1251156>
- Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., ... & Machida, R. J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in zoology*, 10(1), 1-14.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, AM, Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Avila, JA, López-Guerrero, JA, & Aguilar-Quesada, R. (2016). Selección de fuentes de ADN

para aplicaciones posteriores basadas en el análisis de indicadores de calidad del ADN. *Biopreservación y Biobancos* , 14 (4), 264-270.

Martínez, J. D., & Causton, C. (2007). Análisis del Riesgo Asociado al Movimiento Marítimo hacia y en el Archipiélago de Galápagos. *Puerto Ayora, isla Santa Cruz-Galápagos: Fundación Charles Darwin*.

Matlock, B. (s.f.). Assessment of Nucleic Acid Purity. Thermo Fisher Scientific. Recuperado de: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>

Ministerio del Ambiente. (s.f.). Sistema Nacional de Áreas protegidas. Reserva Marina de Galápagos. <http://areasprotegidas.ambiente.gob.ec/es/areas-protegidas/reserva-marina-gal%C3%A1pagos#:~:text=Los%20ecosistemas%20marinos%20de%20Gal%C3%A1pagos,o%20grandes%20card%C3%BAmenes%20de%20peces>.

Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. (s.f.). *Dos nuevas especies marinas se identifican en la Reserva Marina de Galápagos*. <https://www.ambiente.gob.ec/dos-nuevas-especies-marinas-se-identifican-en-la-reserva-marina-de-galapagos/>

Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica. (15 de marzo de 2022). *Reserva Marina Hermandad incrementa 5,5% de superficie marina nacional bajo conservación*. <https://www.ambiente.gob.ec/reserva-marina-hermandad-incrementa-55-de-superficie-marina-nacional-bajo-conservacion/>

Moity, N., Espinosa, N., & Toulkeridis, T. (2013). Benthic impacts of recreational divers in the Galapagos Marine Reserve. https://www.researchgate.net/publication/276207563_Benthic_impacts_of_recreational_divers_in_the_Galapagos_Marine_Reserve

- National Invasive Species Council. (2022). Environmental DNA as a Tool for Invasive Species Detection and Management. <https://doi.gov/sites/doi.gov/files/nisc-edna-white-paper-2022-final.pdf>
- Noble, M. (1 de abril de 2011). Cryptogenic Species: Using History and Genetics to Solve Invasion Mysteries. <https://serc.si.edu/labs/marine-invasions-research/feature-story/cryptogenic-species-using-history-and-genetics-solve>
- Northern Rocky Mountain Science Center. (12 de noviembre de 2020). Environmental DNA (eDNA): Combining Technology and Biology to Detect Aquatic Invasive Species and Pathogens. [https://www.usgs.gov/centers/norock/science/environmental-dna-edna-combining-technology-and-biology-detect-aquatic#:~:text=Science-Environmental%20DNA%20\(eDNA\)%3A%20Combining%20Technology%20and%20Biology%20to%20Detect,Invasive%20Species%20and%20Pathogens%20Active&text=Using%20DNA%2C%20USGS%20researchers%20are,invasive%20species%20in%20aquatic%20ecosystems.](https://www.usgs.gov/centers/norock/science/environmental-dna-edna-combining-technology-and-biology-detect-aquatic#:~:text=Science-Environmental%20DNA%20(eDNA)%3A%20Combining%20Technology%20and%20Biology%20to%20Detect,Invasive%20Species%20and%20Pathogens%20Active&text=Using%20DNA%2C%20USGS%20researchers%20are,invasive%20species%20in%20aquatic%20ecosystems.)
- Ogram, A., Sayler, G. S., & Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods*, 7(2-3), 57-66. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90025-X)
- Pérez, J. E., Alfonsi, C., Salazar, S. K., Macsotay, O., Barrios, J., & Martínez Escarbassiere, R. (2007). Especies marinas exóticas y criptogénicas en las costas de Venezuela.
- Reyes Vargas, L. C. (2018). ADN ambiental (eDNA) como método de evaluación de diversidad en ecosistemas acuáticos. <http://hdl.handle.net/1992/39537>

- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, *17*, e00547.
- Salcedo, Adriana. Galápagos: conflictos en el paraíso. Quito: Universidad Andina Simón Bolívar, Sede Ecuador; Corporación Editora Nacional; Ediciones Abya Yala, 2008. 102 p. Serie Magíster, No. 83. <http://hdl.handle.net/10644/1160>
- Salvador, G. (2015). *Análisis del sistema de producción y abastecimiento de alimentos en Galápagos* (Master's thesis, Quito, Ecuador: Flacso Ecuador).
- Steel, S. (2014). Sewage Waste on San Cristobal Island: It's Not Just a Numbers Game. <https://doi.org/10.17615/kpp0-dc11>
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Moller PR, Rasmussen M, Willerslev E (2012) Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLoS ONE* 7(8): e41732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732>
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological conservation*, *183*, 4-18.
- UICN. (2019). Guía para la planificación y gestión de especies invasoras en islas. Cambridge, Reino Unido y Gland, Suiza.
- Valdez-Moreno, M., Ivanova, N. V., Elias-Gutierrez, M., Pedersen, S. L., Bessonov, K., & Hebert, P. D. (2019). Using eDNA to biomonitor the fish community in a tropical oligotrophic lake. *PLoS One*, *14*(4), e0215505. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215505>

8. ANEXOS

Anexo 1: Materiales recolección de muestras.

Botella Niskin

Paños de cloro

Guantes

Cooler

9 botellas de 1 litro

Anexo 2: Materiales para la filtración de muestras en el laboratorio.

Equipos

Bomba Geopump peristáltica easy-load II

Reactivos

Buffer ATL Tissue lysis buffer

Materiales

Manguera para Geopump

Lysol paños desinfectantes

Filter Unit without Filling Bell (Sterivex GP 022 um)

Tapas Luer lock

Jeringa descartable (5 ml/cc)

Papel aluminio

Parafilm