



UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

TESIS DE GRADO DE OPCIÓN AL TRABAJO DE GRADUACIÓN

**METABARCODING DE ADN AMBIENTAL DEL GEN MITOCONDRIAL 12S ARNr
PARA EL ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE PECES
ARRECIFALES DEL PACÍFICO DE PANAMÁ**

ELABORADOR POR:

CARLOS MURILLO ORTIZ

C.I.P. 8-922-995

**TRABAJO DE GRADUACIÓN COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR POR
EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA CON ORIENTACIÓN EN
GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

PANAMÁ

DICIEMBRE, 2025

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

TRIBUNAL EXAMINADOR

TÍTULO

**METABARCODING DE ADN AMBIENTAL DEL GEN MITOCONDRIAL 12S ARNr
PARA EL ANÁLISIS DE COMPOSICIÓN Y ESTRUCTURA DE PECES
ARRECIFALES DEL PACÍFICO DE PANAMÁ**

Por Carlos Murillo Ortiz

C.I.P. 8-922-995

Asesora Principal: Mgter. Alana Domingo

Asesor: Dr. Edgardo Castro

Asesora: Dra. Magaly Sánchez de Chial

Asesor externo: Matthieu Leray, PhD (STRI)

Fecha: _____

AGRADECIMIENTO

Agradezco a aquel niño de 16 años lleno de entusiasmo y curiosidad por realizar ciencias que ayude a comprender nuestro mundo, por dar esa perseverancia y resiliencia necesarias para culminar esta etapa importante. Agradezco a todas las personas que de forma directa e indirecta fueron un soporte importante durante este proyecto de tesis y también de licenciatura.

A la Universidad de Panamá y al Departamento de Biología Molecular y Genética la formación académica brindada. A mi asesora principal, Alana Domingo, por su invaluable mentoría durante la realización tanto de la propuesta como del manuscrito, en aspectos de diseño y estructura de la tesis acorde al enfoque de biología molecular, además de revisiones y sugerencias del manuscrito. Agradezco, al profesor asesor Edgardo Castro por sus importantes aportes y correcciones al manuscrito. Al Dr. Matthieu Leray por permitirme colaborar en el Programa Rohr de Resiliencia de los Arrecifes (RRR) en el Laboratorio de Resiliencia y Simbiosis del Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI), mediante este proyecto de investigación como tesis de grado. Agradezco su mentoría invaluable durante la elaboración del proyecto. Agradezco a los miembros del Leray Lab, en especial al segundo mentor principal, Helio Quintero, por compartir sus conocimientos y habilidades en ADN ambiental, preparación de librerías genómicas y análisis bioinformático, sobre todo por su constante paciencia y habilidad para enseñar. Igualmente, agradezco a los pasantes y técnicos de laboratorio: María Sánchez, María Chachón, Yaliana Chicaco, María Lacayo, Angélica Estrada, Marta Vargas, por enseñarme técnicas de biología molecular de preparación de librerías. Agradezco a la mentora Mgter. Vivian Ali y Mgter. Luisa Meister, por compartir sus conocimientos en el análisis de datos genómicos. Similarmente, al Dr. Christopher Lawrance del Heliconius Lab, por su importante mentoría en metodologías de diseño experimental y en la organización del proyecto. Agradezco a la Fundación Mark y Rachel Rohr que, dentro del Programa Rohr de Resiliencia de los Arrecifes (RRR), permitió el financiamiento del trabajo de campo y de laboratorio de esta tesis. Finalmente, agradezco al personal administrativo de STRI, Crew RRR, capitanes y cocineras que permitieron que este proyecto fuera posible.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	16
OBJETIVOS	17
Objetivo General	17
Objetivos Específicos	17
CAPÍTULO I: REVISIÓN LITERARIA	18
1. ADN ambiental (eDNA)	18
2. <i>Barcoding</i> de ADN ambiental	19
3. <i>Metabarcoding</i> de ADN ambiental	21
4. Aplicaciones de eDNA Metabarcoding en ecosistemas marinos	21
5. Pacífico Oriental Tropical	23
5.1. Ecorregión	23
5.2. Características oceanográficas del POT, Golfo de Panamá y Golfo de Chiriquí	24
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA	27
1. Procesamiento de muestras de ADN ambiental	27
2. Extracción y cuantificación de ADN	29
3. Preparación de Librería Genómica Illumina MiSeq	29

3.1. Primera Amplificación por PCR: Amplificación del Gen 12S ARNr	32
3.2. Visualización, limpieza y normalización de la concentración de amplicones	33
3.3. Segunda Amplificación por PCR: Adición de Índices	34
3.4. Selección del fragmento y preparación final de la librería	35
3.5. Secuenciación Illumina MiSeq	35
4. Análisis bioinformático.....	36
4.1. Inferencia de variantes de secuencia de amplicones	37
4.4. Asignación Taxonómica	41
4.5. Análisis filogenético.....	43
5. Análisis de datos	44
5.1. Composición taxonómica y tratamiento de datos crudos (Pregunta 1).....	44
5.2. Variación espaciotemporal en la diversidad y estructura comunitaria de variantes de secuencias de amplicones (Pregunta 2).....	45
CAPÍTULO III: RESULTADOS	51
1. Datos crudos de secuenciación	51
Pregunta 1: Composición taxonómica de ASV.....	56
2. Composición y coherencia de la asignación taxonómica de secuencias de variantes de amplicones	56
Pregunta 2: Variación espaciotemporal de ASV	60
3. Composición de la abundancia relativa de ASV	60
4. Diversidad Alfa	63
5. Estructura Comunitaria de Variantes de Secuencia de Amplicón (ASV).....	66
5.2. Estructura Comunitaria Temporal General (Estación–Año)	67
5.4. Estructura Comunitaria Temporal del Archipiélago de Las Perlas	69
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	71
1. Resolución y composición taxonómica de amplicones del gen 12S ARNr.....	71
1.1. Eficacia el cebador MiFish-U y marcador 12S ARNr mitocondrial	71
1.2. Composición taxonómica de peces recuperada por Metabarcoding de ADN ambiental	74

2. Efectos de las variaciones espaciotemporales sobre variantes de amplicones	75
2.1. Variación en la estructura comunitaria de ASV entre estación seca y lluviosa.....	76
2.2. Variación en la estructura de ASV entre año 2022 y 2023	79
3.Ecología del ADN Ambiental	81
4. Limitaciones.....	83
CONCLUSIONES.....	86
BIBLIOGRAFÍA	87
S1- ANEXO DE MATERIALES SUPLEMENTARIOS	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de muestreo de ADN ambiental en arrecifes de coral.....	28
Figura 2. Preparación de la librería genómica Illumina MiSeq	31
Figura 3. Esquema general del flujo bioinformático y análisis de datos (diagrama de flujo realizado mediante BioRender).	36
Figura 4. Objeto clase «phyloseq» (McMurdie & Holmes, 2013).	40
Figura 5. Cambios en el conteo de lecturas de secuencias de ADN en cada paso del flujo de DADA2.....	52
Figura 6. Tamaño de la librería: distribución del número de lecturas por muestra por localidad.	53
Figura 7. Curvas de rarefacción de ASV por localidad, año y estación.	55
Figura 8. Árbol filogenético de ASV: visualización general de la diversidad genética de ASV detectados a nivel taxonómico de familia mediante árbol filogenético de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood).	59
Figura 9. Parque Nacional Coiba. Perfiles de cambios espaciotemporales de composición de la abundancia relativa de ASV asignados a nivel taxonómico de orden de peces de arrecifes coralinos	61
Figura 10. Archipiélago de Las Perlas. Perfiles de cambios espaciotemporales de composición de la abundancia relativa de ASV asignados a nivel taxonómico de orden de peces de arrecifes coralinos.....	62
Figura 11. Diversidad alfa: Riqueza observada ($q=0$) de ASV	64
Figura 12. Diversidad alfa. Índice de Chao1 de ASV estandarizado a presencia y ausencia...	65
Figura 13. NMDS de la estructura comunitaria general espacial y temporal de variantes de secuencias de amplicones (ASV).	68

Figura 14. NMDS Bray-Curtis comparando estructura comunitaria de abundancia de ASV entre estación seca y estación lluviosa.	70
Figura 15. Visualización de gel de agarosa al 2% de la PCR I. Plato 1/2, réplica 2/3 de los amplicones 12S (primer MiFishU_IL). En rojo las muestras de control de extracción. .	107
Figura 16. Visualización en gel de agarosa al 2% de la Index PCR del plato 1.....	108
Figura 17. Perfiles de calidad de secuenciación de las secuencias Forward.....	109
Figura 18. Perfiles de calidad de secuenciación de las secuencias <i>Reverse</i>	110
Figura 19. Tasas de errores. Secuencias <i>Forward</i>	111
Figura 20. Tasas de errores. Secuencias <i>Reverse</i>	111
Figura 21. Prevalencia de contaminantes en muestras y controles negativos de PCR y extracción.	112
Figura 22. Heatmap de presencia y ausencia de lecturas de ASV a nivel de orden.	121
Figura 23. Perfiles generales de temperaturas de la estación de colecta de ADN ambiental 2023.	122

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Total de Muestras Colectadas	27
Tabla 2. Secuencias completas de los cebadores de la PCR 1. La cual incluye las secuencias adaptadoras de Illumina y las versiones del cebador MiFish-U IL y ILN.....	33
Tabla 3. Resumen del cambio de número de lecturas en el flujo bioinformático de DADA2.	113
Tabla 4. Asignación taxonómica máxima obtenida de las variantes de secuencias de amplicones (ASV) para la clase Chondrichthyes	113
Tabla 5. Asignación taxonómica máxima obtenida de variantes de secuencias de amplicones (ASV) para la clase Actinopteri.....	114
Tabla 6. Supuestos de normalidad y análisis de ANOVA de riqueza de ASV	122

LISTA DE ABREVIATURAS

Inglés, español

ASV : amplicon sequence variants; variantes de secuencias de amplicon.

OTU : operational taxonomic unit, unidad taxonómica operacional.

MOTU: molecular operational taxonomic unit, unidad de taxonomía operacional molecular.

DADA2: divisive amplicon denoising algorithm versión 2, algoritmo de eliminación de ruido de amplicones divisivos versión 2.

UVC: underwater visual census, censo visual subacuático.

EDNA: environmental dna, ADN ambiental.

ARNr : ácido ribonucleico ribosómico.

NMDS: non-metric multidimensional scaling, escalamiento multidimensional no métrico.

ANOVA : analysis of variance, análisis de varianza.

PERMANOVA: permutational multivariate analysis of variance, análisis multivariado permutacional de varianza.

LCA : lowest common ancestor, ancestro común cercano.

BRUVS: *baited remote underwater video station*, estación de vídeo subacuática remota con cebo.

POT: Pacífico Oriental Tropical.

RESUMEN

Los arrecifes coralinos del Pacífico de Panamá albergan gran relevancia ecológica y diversidad biológica; sin embargo, estos enfrentan presiones crecientes por el cambio climático y condiciones oceanográficas cambiantes. Por lo que el monitoreo de las comunidades biológicas marinas requiere sistemas de cuantificación continuos y aplicables a gran escala. Como complemento a los métodos tradicionales, herramientas moleculares precisas y no invasivas como el ADN ambiental (environmental DNA, **eDNA**) permiten monitorear la diversidad biológica al identificar organismos a partir de material genético detectable en el agua. Aquí aplicamos eDNA Metabarcoding del gen mitocondrial 12S ARNr, utilizando cebadores universales MiFish-U y secuenciación masiva (Illumina), para analizar la diversidad y estructura comunitaria de peces de arrecifes coralinos del Parque Nacional Coiba y el Archipiélago de Las Perlas durante las estaciones secas y lluviosas de los años 2021 y 2022. Además, mediante el análisis bioinformático de DADA2, el cual modela y corrige errores de secuenciación para reconstruir secuencias biológicas exactas (ASV), logramos (i) identificar un total 1,294 ASV que revelaron una composición taxonómica de 144 géneros distribuidos en 74 familias, a la vez distribuidas en 38 órdenes de peces óseos y cartilagosos, (ii) captar variaciones estacionales en la riqueza de ASV, siendo mayor en la estación seca que la lluviosa, (iii) la estructura comunitaria de amplicones sugieren estar influenciadas por variaciones locales y estacionales. Estos hallazgos validan el eDNA Metabarcoding como una herramienta robusta y complementaria para el monitoreo de la ictiofauna, capaz de detectar variaciones en la estructura comunitaria vinculadas a dinámicas oceanográficas complejas, estableciendo así una línea base para comprender la resiliencia de los ecosistemas arrecifales y orientar estrategias de conservación ante la pérdida de biodiversidad global.

Palabras clave: ADN ambiental (eDNA), Metabarcoding, MiFish-U, 12S ARNr, diversidad alfa, estructura comunitaria

ABSTRACT

Panama's Pacific coral reefs are of great ecological importance and harbor significant biological diversity; however, they face increasing pressures from climate change and shifting oceanographic conditions. Therefore, monitoring marine biological communities requires continuous quantification systems that can be applied on a large scale. As a complement to traditional methods, precise and non-invasive molecular tools such as environmental DNA (eDNA) allow for the monitoring of biological diversity by identifying organisms based on genetic material detectable in the water. Here, we applied eDNA Metabarcoding of the mitochondrial 12S rRNA gene, using MiFish-U universal primers and NGS sequencing (Illumina), to analyze the diversity and community structure of fish in the coral reefs of Coiba National Park and the Las Perlas Archipelago during the dry and rainy seasons of 2021 and 2022. Furthermore, using the DADA2 bioinformatics analysis, which models and corrects sequencing errors to reconstruct exact biological sequences (ASV), we were able to (i) identify a total of 1,294 ASV that revealed a taxonomic composition of 144 genera distributed across 74 families, which in turn were distributed across 38 orders of bony and cartilaginous fishes; (ii) detect seasonal variations in ASV richness, revealing higher richness during the dry season than the rainy season; and (iii) the community structure of amplicons suggests it is influenced by local and seasonal variations. These findings validate eDNA Metabarcoding as a robust and complementary tool for monitoring ichthyofauna, capable of detecting variations in community structure linked to complex oceanographic dynamics, thus establishing a baseline for understanding the resilience of reef ecosystems and guiding conservation strategies in the face of global biodiversity loss.

Keywords: environmental DNA (eDNA), Metabarcoding, MiFish-U, 12S ARNr, alpha diversity, community structure.

INTRODUCCIÓN

Los arrecifes de coral son ecosistemas vitales que sustentan una inmensa diversidad biológica y brindan servicios esenciales a las comunidades humanas; sin embargo, estos experimentan un incremento de amenazas por factores tanto locales como globales antropogénicos y fenómenos oceanográficos que disminuyen sus funciones ecológicas (Good & Bahr, 2021; Randall et al., 2020). Por lo tanto, un biomonitoreo eficaz y eficiente puede respaldar la gestión e iniciativas de conservación en los arrecifes de coral (Edmunds, 2024). De esta forma, ayudando a comprender la conexión entre la diversidad biológica, el estado de conservación y la función ecológica de los ecosistemas marinos (Lotze, 2021). En esencia, el monitoreo biológico requiere la identificación precisa de las especies presentes en su entorno, de tal forma que ayuda a responder cómo y por qué las poblaciones de especies cambian en el tiempo (Thomsen y Willerslev, 2015).

En Panamá, el Parque Nacional Coiba (PNC) en el Golfo de Chiriquí y el Archipiélago de Las Perlas (Zona Especial de Manejo) en el Golfo de Panamá poseen ecosistemas de arrecifes de coral altamente vulnerables con condiciones oceanográficas contrastantes; el Golfo de Panamá experimenta un fuerte afloramiento estacional, mientras que el Golfo de Chiriquí se caracteriza por un afloramiento más débil y regímenes térmicos más cálidos y estables (Randall et al., 2020; Crawford et al., 2024). En estas regiones, la composición y la diversidad marina se han estudiado primordialmente con métodos tradicionales (Dominici-Arosemena & Wolff, 2006). Sin embargo, estos métodos enfrentan limitaciones documentadas, como las técnicas de censo visual subacuático (UVC) que dependen de la presencia directa del observador, están sujetas a sesgos por el comportamiento evasivo o críptico de muchas especies y presentan variabilidad según el nivel de experiencia de los buzos (Usseglio, 2015; Williams et al., 2006). Además, requieren un esfuerzo logístico considerable y frecuentemente excluyen especies raras, crípticas o de baja abundancia (Gold et al., 2023; MacNeil et al., 2008).

El muestreo de ADN ambiental (“eDNA” por las siglas en inglés de “Environmental DNA”), es decir el material genético que los organismos liberan al entorno (p. ej., sangre, moco, desechos,

escamas, etc.), puede complementar las técnicas de estudio tradicionales y, además de proporcionar un enfoque eficaz y repetible para evaluar la biodiversidad (Bohmann et al., 2014; Ruppert et al., 2019). A nivel molecular, esta técnica implica la extracción de ADN de muestras ambientales, como agua o sedimentos, seguida de la amplificación de marcadores genéticos taxonómicos específicos (DNA barcode) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de alto rendimiento para identificar múltiples especies simultáneamente en bases de datos de referencia (Miya, 2022; Rozanski et al., 2024; Taberlet et al., 2012; Thomsen et al., 2012).

En ecosistemas marinos, el ADN liberado por organismos como peces, crustáceos y cnidarios se incorpora al medio a través de la excreción, secreciones mucosas, células epiteliales y tejidos en descomposición, integrándose a la columna de agua y a los sedimentos (Barnes & Turner, 2016). La persistencia de estas moléculas en el océano depende de variables como la temperatura, la radiación UV, la salinidad y la actividad microbiana, con tiempos de degradación que pueden oscilar entre pocas horas y varios días dependiendo del contexto físicoquímico (Collins et al., 2018). En estudios experimentales, se ha documentado que el ADN de peces puede ser detectado en agua marina hasta siete días después de su liberación, aunque con concentración decreciente y mayor fragmentación (Thomsen et al., 2012). Esta dinámica hace posible utilizar el ADN ambiental como una fuente indirecta de información sobre la presencia y distribución de especies en el océano, a partir de este material genético, se aplican técnicas como el código de barras genético (barcoding) y el Metabarcoding para identificar los organismos presentes (Andruszkiewicz et al., 2017; Wood et al., 2020).

Si bien estos estudios moleculares se han realizado con éxito en otras regiones marinas tropicales para detectar una amplia diversidad de vertebrados (Juhel et al., 2020; Valdivia-Carrillo et al., 2021), en la costa del Pacífico de Panamá la ictiofauna sigue estando poco caracterizada mediante ADN ambiental para el monitoreo continuo de arrecifes coralinos. A pesar de la utilidad demostrada de esta tecnología, existe una brecha clara en su aplicación en estos arrecifes coralinos del Pacífico de Panamá, específicamente en los arrecifes del Parque Nacional Coiba y el Archipiélago de Las Perlas, ya que no se han realizado estudios de biomonitoreo de diversidad

marina espaciotemporal mediante ADN ambiental para evaluar la composición taxonómica de los peces o sus cambios espaciotemporales.

Este estudio evaluó la composición taxonómica y las variaciones espaciotemporales de las comunidades de peces arrecifales a escalas espaciales a nivel de variantes de secuencias de amplicones (ASV) entre localidades, estaciones y años distintos. Para ello, en el Parque Nacional Coiba y el Archipiélago de Las Perlas aplicamos Metabarcoding de ADN ambiental al amplificar una región del gen mitocondrial 12S ARNr mediante el cebador universal MiFish-U para la caracterización de la comunidad de peces de arrecifes de coral. Empleamos el análisis bioinformático de DADA2, el cual modela y corrige errores de secuenciación para reconstruir secuencias biológicas exactas conocidas como secuencias de amplicones de variantes (ASV), y obtuvimos sus asignaciones taxonómicas. Evaluamos cambios locales y temporales de los ASV en función de su:

- Abundancia relativa de los taxones asignados a los ASV.
- Comparamos la diversidad alfa de los ASV estadísticamente mediante la prueba de ANOVA.
- Estructura comunitaria local y temporal mediante Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) y prueba estadística paramétrica PERMANOVA.

Los análisis condujeron a la caracterización de un total de 1,294 variantes de secuencias de amplicones (ASV) en el Parque Nacional Coiba y la Zona Especial de Manejo del Archipiélago de Las Perlas. El 77.2 % de ASV pertenecían a la clase *Actinopterygi* (peces óseos) y 19 ASV a la clase *Chondrichthyes* (rayas y tiburones). Más allá de la composición de especies, el análisis de estos ASV permitió detectar patrones ecológicos de alta resolución que a menudo pasan desapercibidos por métodos tradicionales, revelando una estructura comunitaria de amplicones de peces influenciada en cierto grado por la variabilidad temporal de estación seca y lluviosa; y cambios anuales en ambas localidades. Nuestros hallazgos presentan las limitaciones actuales en referencias de secuencias locales y validan el uso del Metabarcoding de ADN ambiental para la detección eficaz de peces arrecifales y rastrear la respuesta de las comunidades marinas ante cambios ambientales dinámicos temporales e interanuales.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuál es la composición taxonómica de peces de arrecifes coralinos del Parque Nacional Coiba y del Archipiélago de Las Perlas detectada mediante Metabarcoding de ADN ambiental de variantes de secuencias de amplicones (ASV), empleando el gen 12S ARNr y el cebador mitocondrial universal MiFish-U?

Hipótesis Nula (H_0): Las variantes de secuencias de amplicones (ASV) de Metabarcoding de ADN ambiental del gen 12S ARNr **no** permiten identificar taxones de peces en arrecifes de corales del Parque Nacional Coiba y el Archipiélago de Las Perlas.

Hipótesis Alternativa (H_1):

Las variantes de secuencias de amplicones (ASV) de Metabarcoding de ADN ambiental del gen 12S ARNr **permiten** identificar taxones de peces en arrecifes de corales del Parque Nacional Coiba y el Archipiélago de Las Perlas.

2. ¿Existe variación espacial y/o temporal en la composición taxonómica, la diversidad y la estructura comunitaria de secuencias de variantes de amplicones (ASV) de peces de arrecifes coralinos entre las estaciones seca y lluviosa en el Parque Nacional Coiba y el Archipiélago de Las Perlas detectadas mediante Metabarcoding de ADN ambiental ?

Hipótesis Nula (H_0): No existe variación espacial ni temporal en la composición taxonómica, la diversidad y la estructura comunitaria de las Variantes de Secuencias de Amplicones (ASV) de peces arrecifales entre las estaciones seca y lluviosa en el Parque Nacional Coiba y el Archipiélago de Las Perlas, detectadas mediante Metabarcoding de ADN ambiental.

Hipótesis Alternativa (H_1): Existe variación espacial y temporal en la composición taxonómica, la diversidad y la estructura comunitaria de las Variantes de Secuencias de Amplicones (ASV) de peces arrecifales entre las estaciones seca y lluviosa en el Parque Nacional Coiba y el Archipiélago de Las Perlas, detectadas mediante Metabarcoding de ADN ambiental.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la composición taxonómica y variaciones espaciotemporales de variantes de secuencias de amplicones (ASV) del gen 12S ARNr mitocondrial de peces de arrecifes coralinos del Parque Nacional Coiba y del Archipiélago de Las Perlas mediante Metabarcoding de ADN ambiental.

Objetivos Específicos

1. Determinar la asignación taxonómica y filogenia de variantes de secuencias de amplicones (ASV) del gen 12S ARNr de peces de arrecifes coralinos en el Parque Nacional Coiba y el Archipiélago de Las Perlas.
2. Comparar los perfiles de abundancia relativa de ASV entre la estación *seca* y la estación *lluviosa* del Parque Nacional Coiba y el Archipiélago de Las Perlas en los años 2022 a 2023.
3. Comparar la diversidad alfa de ASV de cada estación, localidad y año.
4. Evaluar la estructura comunitaria de ASV de peces de arrecifes coralinos de cada estación, localidad y año.

CAPÍTULO I: REVISIÓN LITERARIA

1. ADN ambiental (eDNA)

El ADN ambiental o eDNA, por las siglas en inglés de “Environmental DNA”, se puede definir como el material genético extraído directamente de muestras ambientales (suelo, sedimento, agua, otros) sin aislar o capturar el o los organismos que producen el material biológico (Thomsen & Willerslev, 2015). Inicialmente, el concepto surge como un método para extraer ácidos nucleicos microbianos directamente de muestras de suelo (Ogram et al., 1987; Olsen et al., 1986). Esta innovación permitió acceder a la diversidad genética de comunidades no cultivables, dando origen a la metagenómica en microbiología (Brock, 1987; Gagic et al., 2015).

El ADN ambiental o eDNA por las siglas en inglés de “Environmental DNA”, se puede definir como el material genético extraído directamente de muestras ambientales (suelo, sedimento, agua, otros) sin aislar o capturar el o los organismos que producen el material biológico (Thomsen, 2015). Inicialmente, el concepto surge como un método para extraer ácidos nucleicos microbianos directamente de muestras de suelo (Ogram et al., 1987; Olsen et al., 1986). Esta innovación permitió acceder a la diversidad genética de comunidades no cultivables, dando origen a la metagenómica en microbiología (Brock, 1987; Gagic et al., 2015).

Los organismos superiores al interactuar con su hábitat expulsarán ADN mediante las células o tejidos excretados, como la orina (Valiere & Taberlet, 2000), las heces (Poinar et al., 1998; Ragot & Villemur, 2022), los pelos y la piel (Bunce et al., 2005; Lydolph et al., 2005) y, obviamente, de los individuos muertos que pierdan material genético (Thomsen, 2015). Por consiguiente, el ADN ambiental es una mezcla compleja de ADN genómico procedente de muchos organismos o microorganismos diferentes y con posible degradación (es decir, las moléculas de ADN se cortan en pequeños fragmentos) (Taberlet et al., 2012). Sin embargo, el descubrimiento de que el ADN de macroorganismos puede persistir en distintos ambientes y ser analizado ha revolucionado la conservación al ofrecer una herramienta eficaz para estudiar la

biodiversidad en contextos terrestres y acuáticos, tanto antiguos como actuales (Deiner et al., 2021).

En ambientes marinos, el ADN liberado por organismos como peces, crustáceos y cnidarios se incorpora al medio a través de la excreción, secreciones mucosas, células epiteliales y tejidos en descomposición, integrándose a la columna de agua y a los sedimentos (Barnes & Turner, 2016). La persistencia de estas moléculas en el océano depende de variables como la temperatura, la radiación UV, la salinidad y la actividad microbiana, con tiempos de degradación que pueden oscilar entre pocas horas y varios días dependiendo del contexto fisicoquímico (Collins et al., 2018). En estudios experimentales, se ha documentado que el ADN de peces puede ser detectado en agua marina hasta 7 días después de su liberación, aunque con concentración decreciente y mayor fragmentación (Thomsen et al., 2012). Esta dinámica hace posible utilizar el ADN ambiental como una fuente indirecta de información sobre la presencia y distribución de especies en el océano. A partir de este material genético, se aplican técnicas como el código de barras genético (barcoding) y el Metabarcoding para identificar los organismos presentes.

2. *Barcoding* de ADN ambiental

Los métodos de identificación taxonómica basados en el ADN se diferencian principalmente en tres aspectos, en primer lugar, el tipo de marcador genético utilizado, que puede ser uno de los códigos de barras de ADN estandarizados (por ejemplo los genes COI para animales (Hebert et al., 2003) y *rbcL* para las plantas (CBOL Plant Working Group et al., 2009)), o bien un fragmento de ADN mucho más corto, un mini código de barras (Hajibabaei et al., 2006), que permite la amplificación de ADN degradado (Andersen et al., 2012; Bylemans et al., 2017; Deiner et al., 2021). En segundo lugar, el nivel de identificación puede variar de un estudio a otro: o bien el marcador utilizado permite identificar a nivel de especie, o bien solo permite identificar niveles taxonómicos superiores, como géneros, familias u órdenes (Taberlet et al., 2012). Y por último, en base a la complejidad y grado de degradación del extracto de ADN a trabajar (Taberlet et al., 2012). Considerando las características mencionadas, los experimentos

con ADN ambiental se han dividido en dos grandes grupos de enfoques analíticos: el *Barcoding* y el *Metabarcoding*. Aquí se ofrece un vistazo a sus diferencias.

El *Barcoding* fue propuesto por primera vez como un método para la identificación taxonómica de especies, basado en la secuenciación de un fragmento del genoma de un único espécimen, utilizando marcadores moleculares estandarizados y diagnósticos, conocidos como código de barras o *barcode* (Hebert et al., 2003). En sentido estricto, un *barcode* es una o varias secuencias genéticas cortas extraídas de una porción estandarizada del genoma y utilizadas para identificar especies (Kress et al., 2015); dichas secuencias se originan de un ancestro común (genes ortólogos) en lugar de duplicación genética (genes parálogos), con una región poco variable o altamente conservada y otra muy variable durante la evolución del gen (Chac & Thinh, 2023). Por ejemplo, una región de 658 pb del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI) en animales (Hebert et al., 2003), o dos fragmentos de 500-800 pb del gen de la subunidad grande de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (rbcL) en plantas (Hajibabaei et al., 2006).

El proceso para generar *códigos de barras* para especies concretas consiste, en primer lugar, en crear una biblioteca de códigos de barras de ADN de especies conocidas mediante la tecnología de secuenciación Sanger; y, en segundo lugar, en comparar la secuencia del código de barras de ADN de una muestra desconocida con la biblioteca de códigos de barras para su identificación (Kress et al., 2015).

Las aplicaciones y tecnologías empleadas en el análisis de eDNA *barcoding* varían según el objetivo del estudio. La visualización de los productos de la PCR mediante electroforesis en gel puede proporcionar una detección sensible; ejemplo la detección de la presencia de cinco especies de salmónidos mediante el análisis del ADN extraído de muestras de agua analizadas mediante PCR anidada y posteriores digestiones simultáneas con enzimas de restricción (Clusa et al., 2017). Sin embargo, la mayoría de los estudios de DNA Barcoding se basan en la qPCR (reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa), la cual utiliza cebadores específicos para cada especie e indicadores fluorescentes para estimar las concentraciones de copias de genes mediante curvas estándar de control positivo (Andruszkiewicz et al., 2017; Nagarajan et al., 2022; Sahu et al., 2025). El producto de una qPCR se cuantifica a lo largo de muchos ciclos y

este ha sido previamente correlacionado con la densidad (número de individuos) y biomasa en poblaciones de peces (Yates et al., 2021). Otros estudios han implementado ddPCR del inglés Digital Droplet PCR o PCR digital en gotas, que divide las reacciones en miles de unidades independientes para obtener recuentos absolutos de moléculas de ADN sin necesidad de curvas de calibración, además, este método muestra una mayor sensibilidad a bajas concentraciones y una mayor resistencia a los inhibidores ambientales en comparación con la qPCR tradicional (Doi et al., 2015; Nagarajan et al., 2022; Sahu et al., 2025).

3. *Metabarcoding* de ADN ambiental

El *Metabarcoding* es la identificación taxonómica de múltiples especies de una muestra mixta de extractos de ADN comunitario o ambiental que han sido amplificadas mediante PCR y secuenciadas en una plataforma de alto rendimiento (ej. Illumina, Ion Torrent); esta última permite el análisis simultáneo de millones de secuencias, a diferencia de la secuenciación Sanger, que procesa una secuencia a la vez (Deiner et al., 2017; Taberlet et al., 2012). A diferencia del ADN ambiental, el ADN comunitario se aísla directamente a partir de mezclas de organismos extraídas en bloque y separadas de la muestra ambiental (por ejemplo, artrópodos de muestra de suelo o agua) (Deiner et al., 2017).

Uno de los aspectos más importantes en los estudios de Metabarcoding de ADN ambiental es el diseño de los cebadores de PCR, ya que estos definen en gran medida la cobertura taxonómica, resolución y sesgo entre taxones (Ruppert et al., 2019). Los cebadores deben ser lo suficientemente cortos para amplificar muestras degradadas, idénticos dentro de un taxón pero variables entre otros taxones, y flanqueados por regiones altamente conservadas para amplificar una variedad de especies sin sacrificar la especificidad del taxón objetivo (Epp et al., 2012). A veces, estas cebadoras se denominan universales o degeneradas, lo que indica que tienen afinidad de unión con una amplia variedad de moldes de ADN diferentes (Holman, 2021).

4. Aplicaciones de eDNA Metabarcoding en ecosistemas marinos

Las aplicaciones del Metabarcoding difieren de las del barcoding, principalmente debido a su potencial de detectar e identificar una gran diversidad de taxones de forma paralela (a menudo

a nivel de especie) en un grupo taxonómico como el de los peces (Miya et al., 2015) o en muchos grupos dentro de un dominio (Leray et al., 2013).

El eDNA Metabarcoding ha demostrado ser eficaz para caracterizar comunidades ícticas en una amplia variedad de ecosistemas marinos, desde zonas templadas hasta sistemas tropicales de alta biodiversidad (Altermatt et al., 2025). Su sensibilidad permite detectar especies raras, crípticas y con baja biomasa, y su resolución espaciotemporal ha sido validada en estuarios, arrecifes y zonas costeras abiertas (Gold et al., 2021; Gibson et al., 2024).

Estudios recientes en Noruega y el sudeste asiático han documentado cómo la composición de peces cambia entre estaciones y hábitats, revelando respuestas ecológicas a gradientes ambientales como temperatura, salinidad y productividad primaria (Carvalho et al., 2024; Zamani et al., 2022). Estos patrones estacionales también se han observado en zonas tropicales del Indo-Pacífico, donde los cambios fenológicos afectan la estructura de comunidades detectadas por eDNA en ecosistemas de manglares y marino costeros (Djurhuus et al., 2020; Zainal Abidin et al., 2022).

En ecosistemas de arrecifes coralinos, esta técnica ha permitido discriminar ensamblajes de peces en función de su posición geográfica y su exposición a actividades humanas, mejorando la capacidad de monitoreo de áreas protegidas (Gelis et al., 2021; Gold et al., 2023). También ha sido utilizada para comparar resultados con censos visuales simultáneos (UVC) complementando ambos métodos, pero el eDNA Metabarcoding detectó el 49% de taxones, una diversidad biológica ligeramente mayor en escala geográfica y barométrica más amplia que los UVC de 38%. Sin embargo el eDNA captó no solo taxones asociada a arrecifes de corales, también pelágicas, hábitats demersales y estuarinos, mostrando así un rendimiento superior para detectar especies evasivas o nocturnas (Nguyen et al., 2020; Valdivia-Carrillo et al., 2021).

5. Pacífico Oriental Tropical

5.1. Ecorregión

Las Ecorregiones Marinas del Mundo o MEOW (por sus siglas en inglés de *Marine Ecoregions of the World*) constituyen el sistema de clasificación biogeográfica mundial para las zonas costeras y de la plataforma continental, que consiste en un sistema jerárquico compuesto por 12 reinos, 62 provincias y 232 ecorregiones (Spalding et al., 2007). Una provincia se define como una gran zona con una biota distintiva que presenta al menos cierta cohesión a lo largo de los marcos temporales evolutivos. Por otro lado, las ecorregiones constituyen áreas de composición de especies relativamente homogénea, al tiempo que se distinguen claramente de los sistemas adyacentes. Dicha composición de especies es determinada por el predominio de un pequeño número de ecosistemas y/o por características oceanográficas o topográficas locales distintivas; p. ej.: aislamiento, afloramiento, aportes de nutrientes, regímenes de temperatura, sedimentos, corrientes, entre otros (Spalding et al., 2007).

La costa del Pacífico de Panamá se encuentra dentro de la provincia denominada Pacífico Este Tropical (PET) o Pacífico Oriental Tropical (POT) (Spalding et al., 2007). El POT se extiende desde el Golfo de California hasta el norte de Perú, abarcando 21 millones de kilómetros cuadrados, lo que incluye aguas internacionales y las aguas territoriales de 12 estados y los espacios oceánicos comunes (S. L. Martin et al., 2016; Spalding et al., 2007). Las formaciones marinas más grandes del lado del Pacífico de Panamá son el Golfo de Chiriquí (GoC) al oeste y el Golfo de Panamá (GoP) al este; la península de Azuero es una importante formación geográfica entre ambos golfos (Crawford et al., 2023). Más concretamente, la costa del Pacífico de Panamá se encuentra dentro de las ecorregiones de la “Bahía de Panamá” o *Panama Bight* en el Golfo de Panamá y la ecorregión de Nicoya en el Golfo de Chiriquí, esta última compartida con Costa Rica (Marques et al., 2021; Spalding et al., 2007).

En el aspecto ecológico, el POT está relativamente aislado de otras regiones, pero presenta diversidad de ecosistemas y entornos (Glynn, Manzello, et al., 2017). Aunque menos ricos en especies que los de otras regiones tropicales, los arrecifes de corales del POT mantienen la diversidad biológica y salud de los ecosistemas marinos (Cortés et al., 2017). El POT se

considera uno de los océanos más productivos del mundo y con una riqueza biológica que proporciona importantes servicios ecosistémicos. Por ejemplo, la pesca comercial (producción alimentaria) tiene un valor aproximado de 2.000 millones de dólares al año, y entre otros beneficios económicos significativos se incluyen el almacenamiento de carbono y el turismo (S. L. Martin et al., 2016). Adicionalmente, en reconocimiento a los altos niveles de diversidad biológica y presencia de especies endémicas, autóctonas y migratorias, EL POT alberga el Corredor Marino del Pacífico Este Tropical o CMAR por sus siglas en inglés (Enright et al., 2021). CMAR es una iniciativa multinacional de conservación que abarca una red de Áreas Marinas Protegidas a lo largo del POT: Costa Rica (Isla del Coco), Panamá (Parque Nacional Coiba), Colombia (Islas Malpelo y Gorgona) y Ecuador (Parque Nacional Galápagos). Establecido formalmente en 2004, sirve como instrumento de conservación de la biodiversidad marina a todos los niveles a lo largo del corredor (Enright et al., 2021; Guzman et al., 2008). Las AMPs (Áreas Marinas Protegidas) ayudan a mantener la salud de los corales fomentando la biodiversidad de peces (Topor et al., 2019).

5.2. Características oceanográficas del POT, Golfo de Panamá y Golfo de Chiriquí

EL POT se caracteriza por una plataforma peninsular poco profunda que abarca un corredor latitudinal relativamente estrecho, y condiciones oceanográficas variables; incluyendo baja salinidad, bajo pH, altas temperaturas durante El Niño, y bajas temperaturas durante La Niña y afloramientos estacionales (Fiedler & Lavín, 2017). El afloramiento es el fenómeno más importante de variabilidad interanual en muchas zonas del ETP (Fiedler & Lavín, 2017; Poveda et al., 2006; Toth et al., 2015)

Las condiciones relevantes de ENSO, incluyen (a) extremos de temperatura altos y bajos, (b) profundidades de termoclina y nutriclina, (c) niveles altos y bajos del mar, (d) actividad de tormentas, (e) patrones de precipitaciones (y escorrentía terrestre), y (f) desviaciones en la dirección, velocidad y extensión espacial de las corrientes superficiales (Glynn, Manzello, et al., 2017). La nutriclina representa la transición entre dos gradientes de nutrientes distintos, como por ejemplo: nitrato, fosfato y silicato. Este gradiente indica que las aguas superficiales son biológicamente productivas pero pobres en nutrientes, mientras que las aguas profundas son

ricas en nutrientes por diferencias en la producción y el consumo de nutrientes por bacterias y fitopláncton (Richardson & Bendtsen, 2019). La termoclina es la capa oceánica de transición entre las aguas mixtas más cálidas de la superficie y las aguas profundas más frías, que se caracteriza por un cambio brusco de temperatura, donde esta disminuye rápidamente con la profundidad aproximadamente 1 °C cada metro (Morrissey & Sumich, 2012).

La plataforma continental de Panamá está dividida por la península de Azuero en dos grandes zonas: el Golfo de Panamá (con una superficie de 27 175 km²) y el Golfo de Chiriquí (13 119 km²). Dichas regiones presentan regímenes oceanográficos considerablemente distintos. (D’Croz & O’Dea, 2007; O’Dea et al., 2012, 2025; Randall et al., 2020; Sellers et al., 2021). Desde la década de 1970, en el ecosistema coralino de Panamá, los esfuerzos de investigación se centraron rápidamente en comprender los factores físicos y bióticos que determinan la distribución de la diversidad biológica marina, especialmente en relación con las diferentes condiciones oceanográficas de estos dos golfos (Glynn, Alvarado, et al., 2017).

La climatología de ambos golfos está determinada por la Zona de Convergencia Intertropical (ZCIT), cuya posición define el patrón estacional de las precipitaciones y los vientos (D’Croz & O’Dea, 2009). Durante el invierno boreal o en la estación seca de Panamá (de diciembre a mediados de abril), la ITCZ se desplaza hacia el sur del istmo de Panamá, entre los 10° y los 3° N, intensificando los vientos alisios del noreste en toda la región (Alexander et al., 2012; D’Croz & O’Dea, 2007; Poveda et al., 2006). Esto es consecuencia de la intensificación del sistema de corrientes de viento conocido como el chorro de baja cota de Panamá o *Panama Low-Level Jet* (en inglés), situado más al sur y más cerca de Ecuador (Amador, 1998; Ordóñez-Zúñiga et al., 2021).

Estos vientos impulsan el fenómeno conocido como "afloramiento estacional" durante la estación seca en el Golfo de Panamá (D’Croz et al., 2003; D’Croz & O’Dea, 2007; Fiedler & Lavín, 2017; Poveda et al., 2006). Las aguas superficiales son empujadas hacia alta mar y arrastran aguas frías y ricas en nutrientes desde las profundidades hacia la plataforma continental (D’Croz & O’Dea, 2007). Las mediciones oceanográficas directas y los datos satelitales a largo plazo revelaron reducciones rápidas y extremas de la temperatura superficial del mar (SST) de

hasta 10 °C en un plazo de unos pocos días a semanas, así como aumentos en la abundancia de plancton fotosintético que luego constituye la base de ecosistemas altamente productivos (D’Croz & O’Dea, 2009). Esto ha quedado de manifiesto al contrastar las altas concentraciones de clorofila a, (NO₃) y fosfatos (PO₄) disueltos, durante el afloramiento de la estación seca en el Golfo de Panamá, con las bajas concentraciones típicas cerca de la superficie en el Golfo de Chiriquí tanto durante la estación seca como durante la estación lluviosa en el Golfo de Panamá (D’Croz & O’Dea, 2009). Durante el afloramiento estacional, la afluencia de nutrientes estimula la productividad primaria, fomentando floraciones de fitoplancton que sirven de base para niveles tróficos superiores, incluidas las comunidades de peces de arrecife (Castrillón-Cifuentes et al., 2023). Aunque aumenta la productividad primaria, también introduce factores de estrés ambiental como niveles más bajos de oxígeno y rápidas fluctuaciones de temperatura que pueden llevar a algunas especies a sus límites fisiológicos (Stuhldreier et al., 2015). En última instancia, el afloramiento altera los patrones espaciotemporales de la composición y diversidad de la comunidad de peces.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

1. Procesamiento de muestras de ADN ambiental

El muestreo se llevó a cabo en dos localidades, el Parque Nacional Coiba (PNC) y la Zona de Manejo Especial (ZEM) del Archipiélago de las Perlas (ALP). Durante los años 2022 y 2023 se realizaron dos muestreos en ambas localidades, uno en la estación seca entre los meses de marzo y abril; y el otro en la estación lluviosa entre los meses de septiembre y noviembre (**Figura 1**).

En cada localidad se seleccionaron 5 sitios de arrecifes coralinos y se recolectaron en ellos tres muestras (réplicas biológicas) de agua de mar de mínimo 2 L. El total de muestras por sitio o estación de muestreo es de 15 por localidad, estación y año, dando un total de $n = 117$ (Tabla 1, Fig. 1). Con la excepción de un sitio en el que no se pudo muestrear la estación seca de 2022 en el Archipiélago de Las Perlas.

Tabla 1. Total de Muestras Colectadas

Año	Estación	Localidad	No. de Sitios	No. de Réplicas	Total de Muestras
2022	Seca	Perlas	5	3	15
		Coiba	5	3	15
	Lluviosa	Coiba	5	3	15
		Pelas	5	3	15
2023	Seca	Perlas	4	3	12
		Coiba	5	3	15
	Lluviosa	Coiba	5	3	15
		Perlas	5	3	15
Total					117

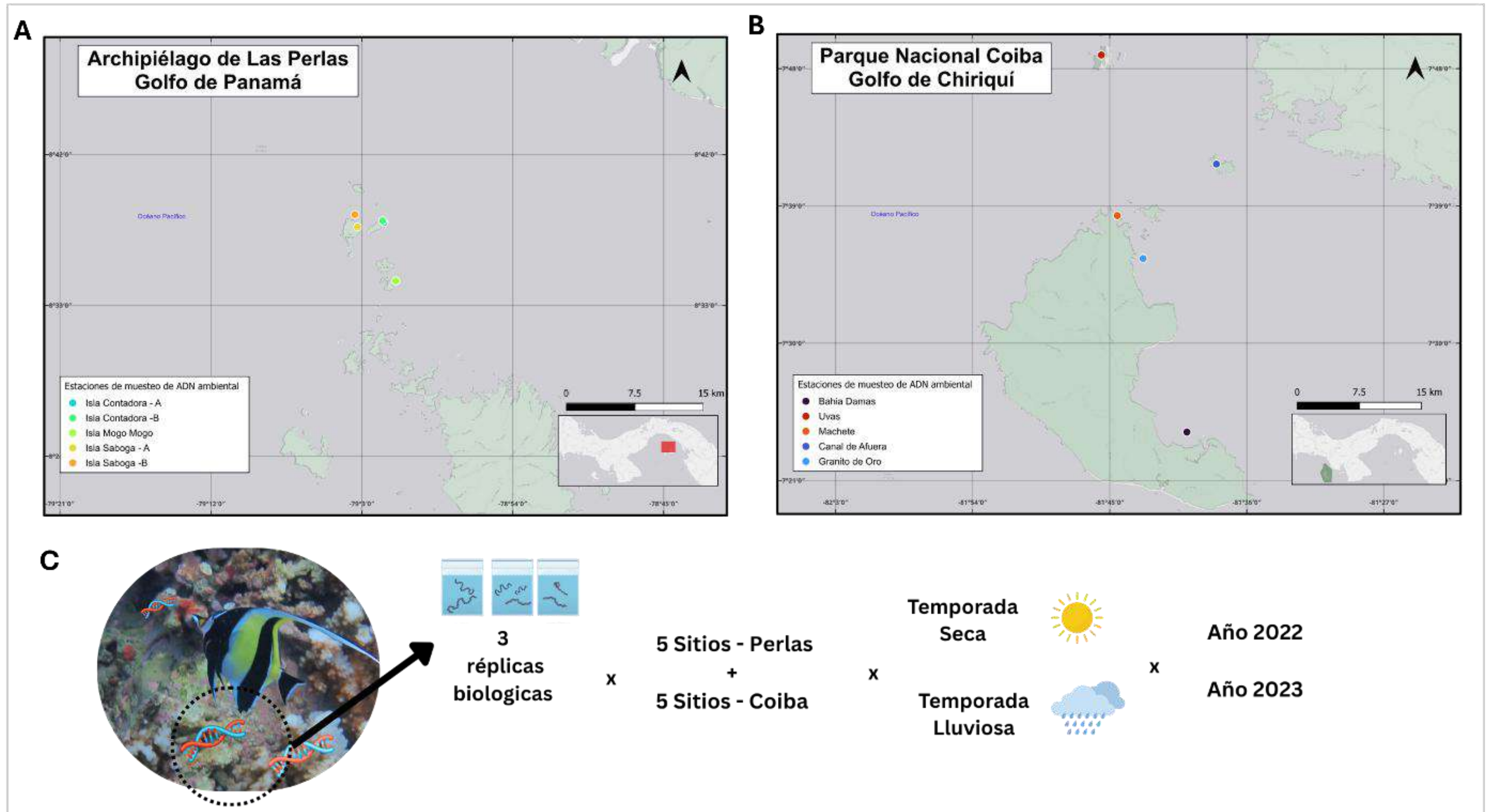


Figura 1. Sitios de muestreo de ADN ambiental en arrecifes de coral. **A.** Golfo de Panamá; **B.** Golfo de Chiriquí. **C.** Esquema del diseño experimental.

El muestreo se realizó mediante apnea o buceo autónomo (SCUBA). Utilizando bolsas estériles Nasco Whirl-Pak®, se procedió a una profundidad de ~1 m sobre el arrecife en posición contracorriente; la apertura de los colectores se realizó in situ para evitar la contaminación cruzada. Se minimizó la perturbación del sustrato bentónico para prevenir la resuspensión de sedimentos, evitando así posibles sesgos en los análisis posteriores derivados de material particulado en suspensión. Las muestras fueron congeladas a -20 °C. Posteriormente, las muestras de agua se filtraron al vacío en filtros estériles de nitrato de celulosa de 47 mm de diámetro y 0,45 µm (GE Life Sciences, Pittsburgh, PA, y Thermo Scientific, Rochester, EE. UU.), con algunas modificaciones, siguiendo el "Environmental DNA Sampling Protocol #2" preparado por el U.S. Geological Survey 48. Los filtros se almacenaron en tubos estériles de 15 mL a -20 °C, y luego se transfirieron a un congelador a -80 °C antes de la extracción de ADN.

2. Extracción y cuantificación de ADN

El procesamiento de las muestras, incluyendo la extracción de ADN, la preparación de la librería genómica y la secuenciación, se realizó en los Laboratorios Marino y Molecular de Naos, Smithsonian Tropical Research Institute (STRI).

La extracción de ADN se llevó a cabo en una campana extractora sin ductos (Sentry Air Systems, Inc., Cypress, TX) a la cual se le invirtió el flujo de aire para evitar la entrada de aire ambiental al espacio de la muestra y evitar la contaminación. Para cada muestra, la mitad del filtro de nitrato de celulosa se corta en trozos de cerca de 1 mm sobre un plato Petri estéril, mientras que la mitad restante del filtro se almacena a -80 °C. Entre cada filtro, las tijeras y pinzas fueron esterilizadas con solución de cloro al 10%, seguidas de etanol al 80% y esterilización en un microincinerador.

Se utilizaron el kit y el protocolo DNeasy PowerSoil Kit Pro (Qiagen, Carlsbad, CA) con las siguientes modificaciones del protocolo del fabricante previas a la extracción. Primero, para homogeneizar mejor las muestras y asegurar una lisis celular completa, además de PowerBeads, se añadieron 20 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) (Qiagen, Carlsbad, CA) en cada tubo; se agitó brevemente en un vórtex. Por último, se incubó en un baño de agua a 65 °C durante 30 min y luego a 95 °C durante 10 min en un Eppendorf™ Thermomixer™ R (Thermo Fisher Scientific, Inc., EE.UU.).

Al terminar la extracción de ADN, cada muestra debidamente etiquetada se sometió inmediatamente a la cuantificación. La concentración de ADN (ng/µl) de cada muestra y control de extracción se estimó mediante el ensayo Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen, Ca, EE. UU.), y el peso molecular aproximado de un número seleccionado de extractos de ADN se visualizó en un gel de TAE agarosa al 1,5% mediante electroforesis.

3. Preparación de Librería Genómica Illumina MiSeq

La identificación taxonómica de los ASV de peces se realizó mediante el Metabarcoding, definido como el etiquetado (tagging), la secuenciación y la identificación simultáneas de

múltiples especies en una sola muestra ambiental (Taberlet et al., 2012). Este enfoque se basa en la amplificación mediante PCR de fragmentos cortos de genes taxonómicamente informativos denominados “códigos de barras”. Dichos amplicones se secuencian en plataformas de alto rendimiento y se comparan con datos de secuencias de referencia para identificar especies con alta resolución (**Figura 2A**) (Hakimzadeh et al., 2024; Miya, 2022; Taberlet et al., 2012).

Empleamos secuenciación masiva paralela por pares en la plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EE.UU.), la cual requiere una librería de amplicones con nuestros fragmentos de interés flanqueados por: (i) sitios de unión del cebador para la secuenciación; (ii) secuencias de doble índice (es decir, código de barras o secuencias únicas por muestra); y (iii) secuencias adaptadoras para la unión a las celdas de flujo de MiSeq. Para lograrlo, empleamos el método de PCR en dos pasos o en inglés *2-step tailed PCR* para construir las bibliotecas de extremos pareados (Miya et al., 2020) . De esta forma, se logra un multiplexado o “multiplexing”, que consiste en la combinación de un gran número de muestras en una sola corrida de secuenciación, lo que permite que sea económicamente viable (Deiner et al., 2017). El *2-step tailed PCR* consistió en dos rondas de PCR. La primera ronda (PCR1) amplificó mediante el cebador MiFish-U un fragmento de aproximadamente 163-185 pb del gen 12S ARNr (ARN ribosomal), además de flanquear los amplicones resultantes con secuencias adaptadoras para sitios de unión del cebador de Illumina (Fig. 2A). La segunda ronda de PCR (PCR 2 o Dual Index PCR) utilizó como molde los amplicones de la PCR 1 y mediante hibridación añadió secuencias de adaptadores de índice dual combinatorio al amplicón. Estos adaptadores poseen una secuencia corta de 8 pb denominada índice dual de secuencia única, denominado índice 1 y 2; estas secuencias se repiten en las filas y columnas de una placa de pocillos para crear un “barcode” o secuencia identificadora única para cada muestra. Además, añaden una secuencia adaptadora para la unión a las celdas de flujo de MiSeq denominadas P5 y P7 (**Figura. 2C**).

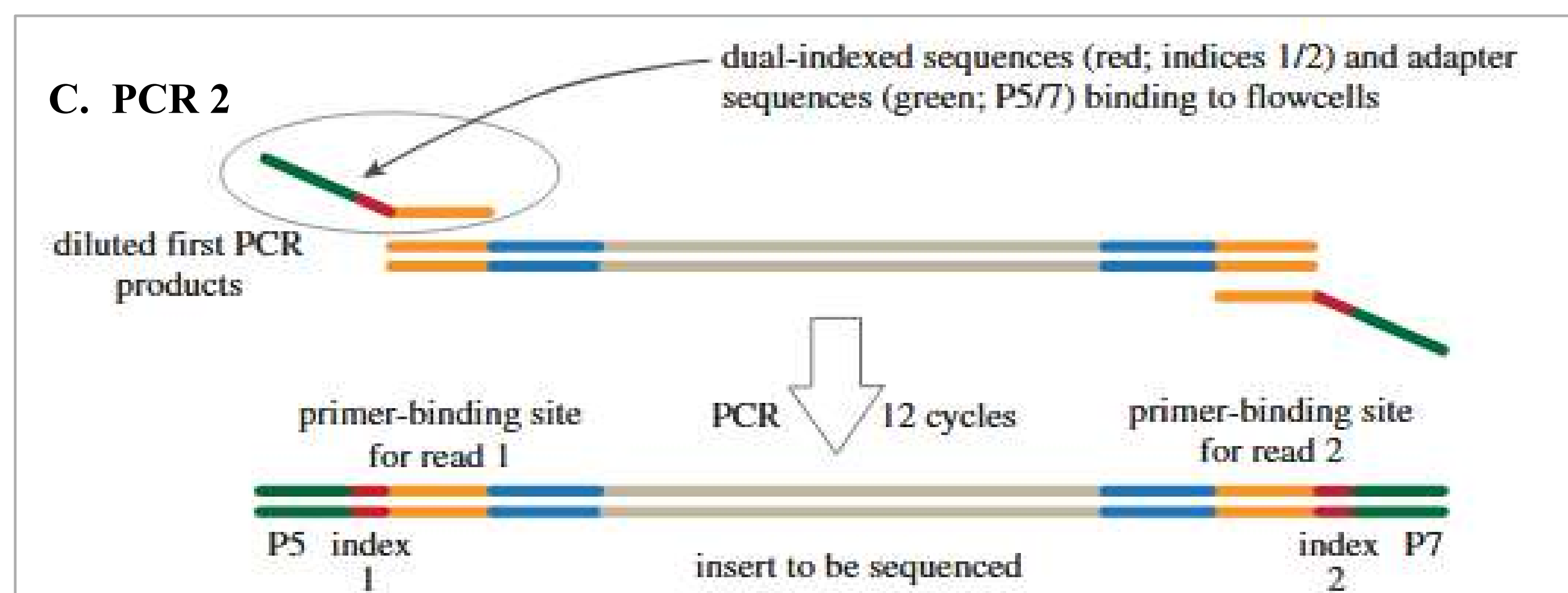
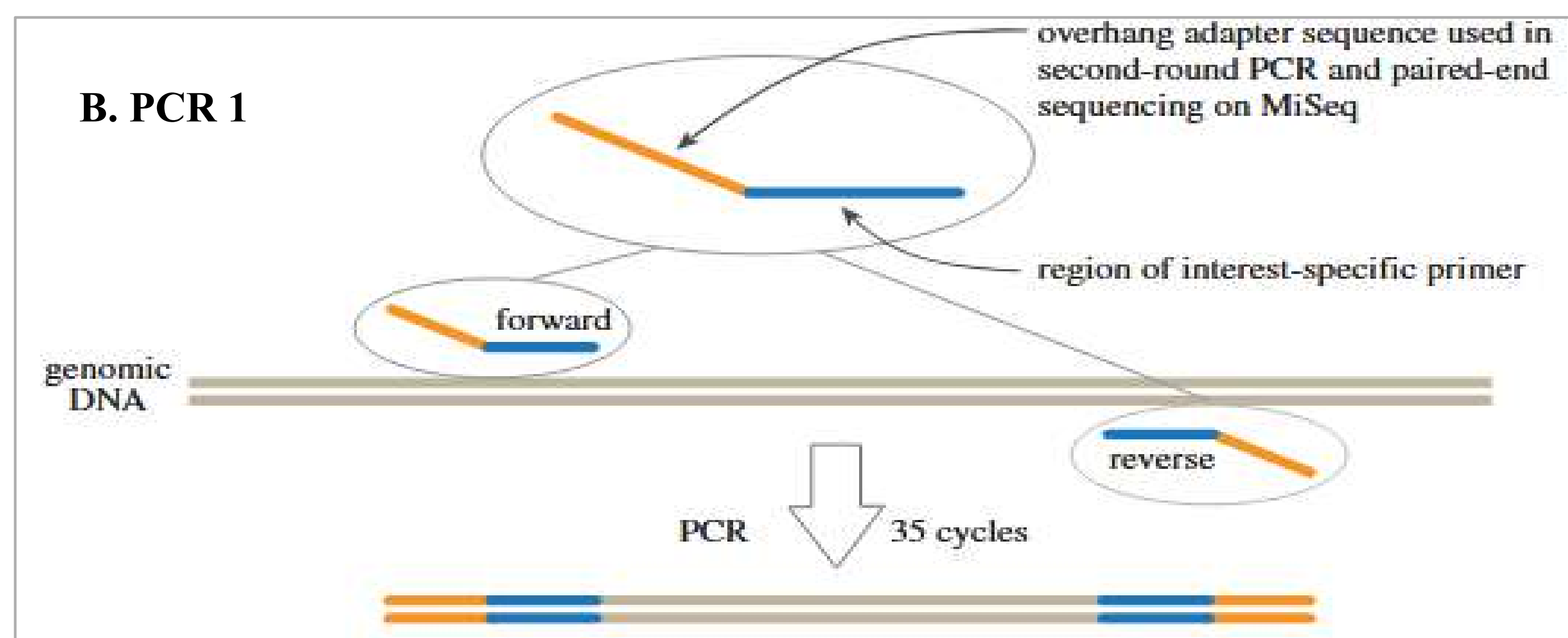
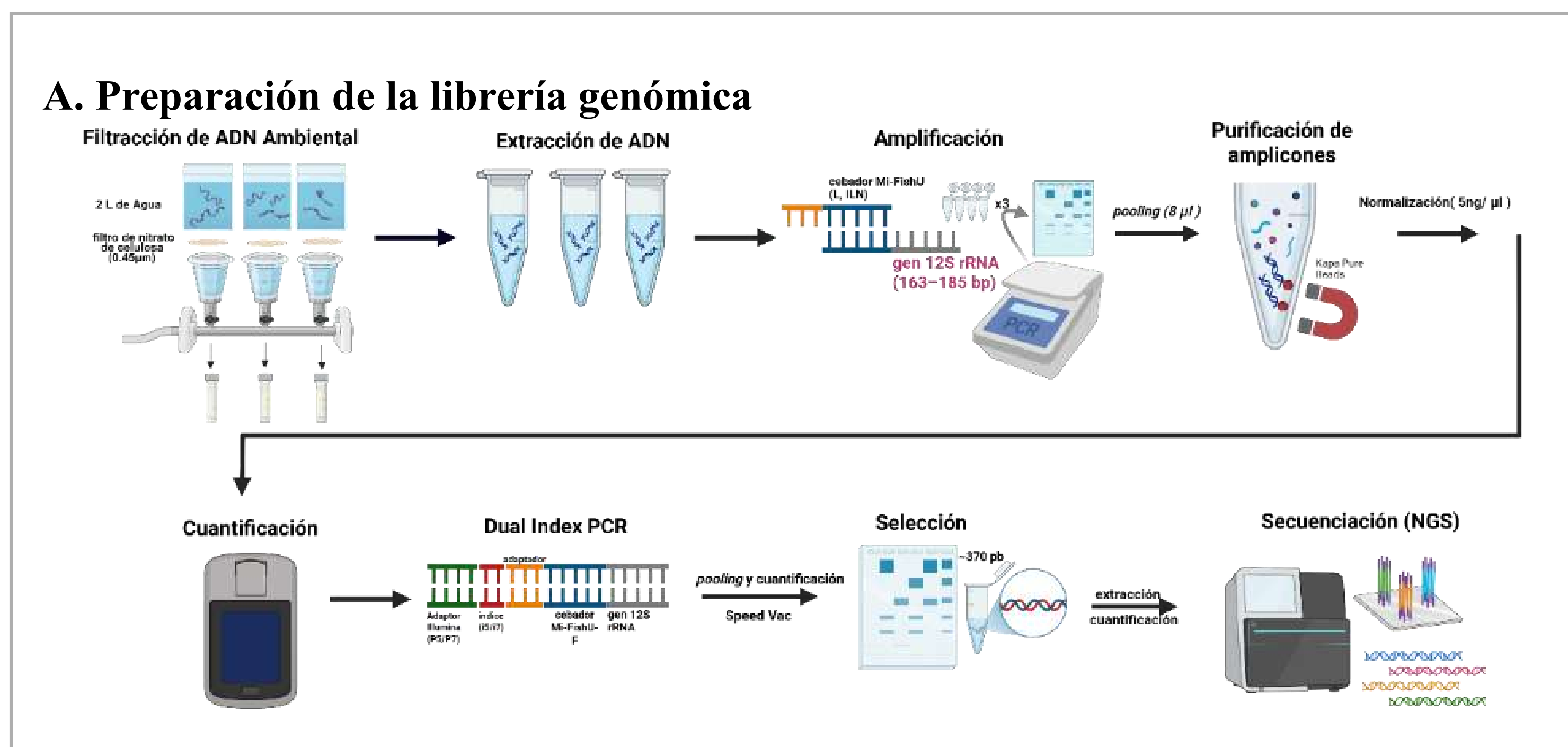


Figura 2. Preparación de la librería genómica Illumina MiSeq **A.** Esquema general (realizado mediante BioRender). **B.** Representación esquemática de la PCR de primera ronda en la

preparación de la biblioteca de extremos emparejados mediante PCR de dos pasos (2-step PCR). C. PCR segunda ronda (Index PCR). Adaptada de Miya et al., 2015.

3.1. Primera Amplificación por PCR: Amplificación del Gen 12S ARNr

Antes de preparar la biblioteca, se esterilizaron el espacio de trabajo , materiales y equipos a utilizar con solución de etanol al 70%, cloro al 10% y radiación UV. Cada experimento de PCR se realizó dentro de una cámara de flujo laminar distinta a la de extracciones de ADN para evitar contaminación cruzada. Se utilizaron puntas de pipeta con filtro en todos los experimentos. También se incluyeron 3 controles negativos por plato de PCR en cada experimento para monitorear la posible contaminación.

La primera ronda de PCR amplificó un fragmento del gen mitocondrial 12S mediante el cebador universal mitocondrial MiFish-U modificado al añadir secuencias de adaptador de Illumina (32-34 pb) en sus extremos 5' (Miya et al.,2015) (Tabla 2). Se utilizaron dos versiones del cebador: IL para el plato 1 y ILN para el plato 2. Dichas versiones difieren en la inclusión de 0 a 10 bases nitrogenadas aleatorias denominadas “N”, spacer o espaciador heterogéneo, localizadas entre las secuencias del adaptador de Illumina y el cebador. De esta forma se garantizó la obtención de secuencias de alta calidad, además de la adición de PhiX, al mantener diversidad de bases en los ciclos iniciales para una identificación eficiente de clústeres en las celdas de flujo y la estimación de la matriz de color en la plataforma de secuenciación Illumina (Naik et al., 2020).

La primera ronda de PCR se llevó a cabo en triplicado, es decir, en cada plato (2) se repitió la PCR tres veces en un solo experimento continuo. Se utilizó el protocolo de “Earth Microbiome Project” modificado por M. Leray y L. Lardinois, 2022 (Ul-Hasan et al., 2019). Cada reacción de PCR 1 consistió en 30 ciclos y volumen de reacción de 12 µl que contenía: 5,0 µl de Invitrogen™ Platinum™ Hot Start PCR Master Mix (2X)(Alcobendas, Madrid, España) , 0,2 µl de cada cebador MiFish-UF/R (5 µM) , 5,1 µl de H2O destilada estéril Milli-Q y 1,5 µl de ADN molde. El perfil del ciclo térmico tras una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C es el siguiente: desnaturalización a 94°C durante 20s; hibridación a 50°C durante 1 min; y extensión a 72°C durante 1 min 30 s, y una elongación final a 72°C durante 10 min y al finalizar, las muestras se mantuvieron a 10 °C para preservar los amplicones.

Tabla 2. Secuencias completas de los cebadores de la PCR 1. La cual incluye las secuencias adaptadoras de Illumina y las versiones del cebador MiFish-U IL y ILN.

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia del Adaptador de Illumina</i>	<i>Longitud (pb)</i>	<i>Space r</i>	<i>Secuencia del cebador MiFish-U</i>	<i>Longitud (pb)</i>
<i>Foward_IL</i>	5'-CAC TCT TTC CCT ACA CGA CGC TCT TCC GAT CT-3'+	32		5'-GTC GGT AAA ACT CGT GCC AGC-3'	21
<i>Foward_ILN</i>	5'-CAC TCT TTC CCT ACA CGA CGC TCT TCC GAT CT-3'+	32	A+	5'-GTC GGT AAA ACT CGT GCC AGC-3'	21
<i>Reverse_IL</i>	5'-GTG ACT GGA GTT C AG ACG TGT GCT CTT CCG AT CT-3'+	34		5'-CAT AGT GGG GTA TCT AAT CCC AGT TTG-3'	27
<i>Reverse_ILN</i>	5'-GTG ACT GGA GTT C AG ACG TGT GCT CTT CCG AT CT-3'+	34	T+	5-CATAGTGG GG TA TCTA ATCCCAGTTT G-3'	27

3.2. Visualización, limpieza y normalización de la concentración de amplicones

El éxito de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Se cargaron 2 µL de cada producto de PCR para confirmar la presencia de una banda del tamaño esperado (~170 pb) y la ausencia de amplificación en los controles negativos (**Figura 15**). Posteriormente, se homogeneizaron las tres réplicas de cada plato de PCR transfiriendo 8 µl de cada triplicado a un nuevo plato, resultando un volumen total de 24 µl por muestra. Luego, se realizó una limpieza de ambas placas de amplicones utilizando el protocolo del fabricante de KAPA Pure Beads, KAPA Biosystems (Roche Sequencing Solutions, Inc., EE.UU.).Por último, se cuantificó la concentración de ADN de cada placa con el ensayo Qubit dsDNA HS Assay (Invitrogen, Ca, EE.UU.) y se normalizó la concentración de todos los productos de PCR a 5ng/µl con agua destilada estéril Milli-Q.

3.3. Segunda Amplificación por PCR: Adición de Índices

La segunda ronda de PCR o “Index” PCR usó los amplicones de la PCR 1 como molde y añadió las secuencias únicas de identificación de cada muestra, *Dual Index*. Se utilizaron dos grupos de combinaciones de cebadores de *Dual Index*: D para el plato 1 y C para el plato 2. Elegidos entre C/D501-508 para los cebadores delanteros y C/D701-712 para los cebadores traseros.

De los cebadores:

- 5' AAT GAT ACG GCG ACC ACC GAG ATC TAC AC XXXX XXXX ACA CTC TTT CCC TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT 3' (Delantero)
- 5' CAA GCA GAA GAC GGC ATA CGA GAT XXXX XXXX GTG ACT GGA GTT CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC T 3' (Reverso)

Las secuencias del extremo 5' de los cebadores son adaptadores que permiten que el producto final se una o hibride con oligonucleótidos cortos en la superficie de la celda de flujo de Illumina (P5 y P7); y las secuencias del extremo 3' son sitios de cebado para la secuenciación MiSeq y complementarias al amplicón de la PCR1 para la hibridación (Miya et al., 2015).

Los segmentos octo-X representan secuencias de doble índice (40 índices únicos en total; ej. A501-508, A701-712 y D501-508, D701-D712; Illumina). Ejemplo para la muestra PI_12S_NU23_ML694, el índice 1 de ID I7_Index_ID: SC701R y de secuencia o barcode I7 CAGTAGGT, y índice 2 con ID: I5_Index_ID: SC501F, y secuencia barcode I5 ACGACGTG. La combinación de dichas secuencias duales permite la identificación molecular de cada pocillo en el plato, y permite la asignación de cada amplicón a su respectiva muestra luego de la secuenciación, proceso bioinformático llamado *demultiplexing*.

La segunda PCR fue de 12 ciclos con un volumen de reacción de 10 µl que contenía: 5,0 µl Invitrogen™ Platinum™ Hot Start PCR Master Mix (2X) (Alcobendas, Madrid, España), 1,0 µl de cada cebador (5 µM), 2,0 µl de H2O destilada estéril Milli-Q y 1,0 µl del producto de PCR1. El perfil del ciclo térmico tras una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C fue el

siguiente: desnaturalización a 94°C durante 45s; hibridación a 50°C durante 1 min y extensión a 72°C durante 1 min 30s y una extensión final a 72°C durante 10 min.

Los amplicones resultantes de la segunda PCR (Index PCR) se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% en TAE junto a amplicones de la primera PCR para confirmar correcta amplificación del Index PCR y comparar el tamaño del fragmento (**Figura 16**).

3.4. Selección del fragmento y preparación final de la librería

La secuenciación de los fragmentos de interés se garantizó al realizar una selección en base al tamaño del fragmento estimado entre 200 y 300 pb mediante un corte de gel, siguiendo el protocolo de Recuperación de Fragmentos y Preparación Final de Librería para Secuenciación Illumina por M. Vargas y H. Quintero, 2024 del EGG.

Primero, 5 µl de los amplicones se colocaron en un plato nuevo y se mezclaron sistemáticamente hasta obtener la librería final en un solo pocillo con volumen final de aproximadamente 200 µl a 300 µl (dependiente de la cantidad de muestras). Sin diluir, se cuantificó la librería final.

Debido a que la concentración final de la librería fue menor a 50 ng/µl, la muestra se concentró mediante The Savant® DNA SpeedVac® Model DNA120 (Thermo Electron Corporation, EE.UU.). La librería se visualizó en un gel de agarosa TAE 2.0% a bajo voltaje, luego se cortó del gel la banda con el tamaño objetivo de la librería (aproximadamente 370 pb) y se purificó utilizando un kit de extracción Gel MinElute (Qiagen, Carlsbad, CA) con un volumen de elución de 12 µl. Por último, la concentración de la biblioteca se estimó nuevamente utilizando un kit de ensayo Qubit dsDNA HS y un fluorómetro Qubit (Life Technologies).

3.5. Secuenciación Illumina MiSeq

Previo a la secuenciación, se realizaron los siguientes ensayos de control de calidad para validar la viabilidad de las bibliotecas: ensayo Qubit dsDNA de alta sensibilidad (concentración de la biblioteca) y ensayo Agilent BioAnalyzer (distribución del tamaño). Los resultados se utilizan para calcular las molaridades y normalizar las bibliotecas antes de agruparlas.

La librería fue secuenciada en un secuenciador Illumina MiSeq con un kit de Illumina MiSeq v3 600-cycle (MiSeq v3 flow cell: 15 to 20 million read-pairs), pero hasta 550 ciclos debido a varias librerías con distintos genes. Finalmente, las muestras fueron demultiplicadas.

4. Análisis bioinformático

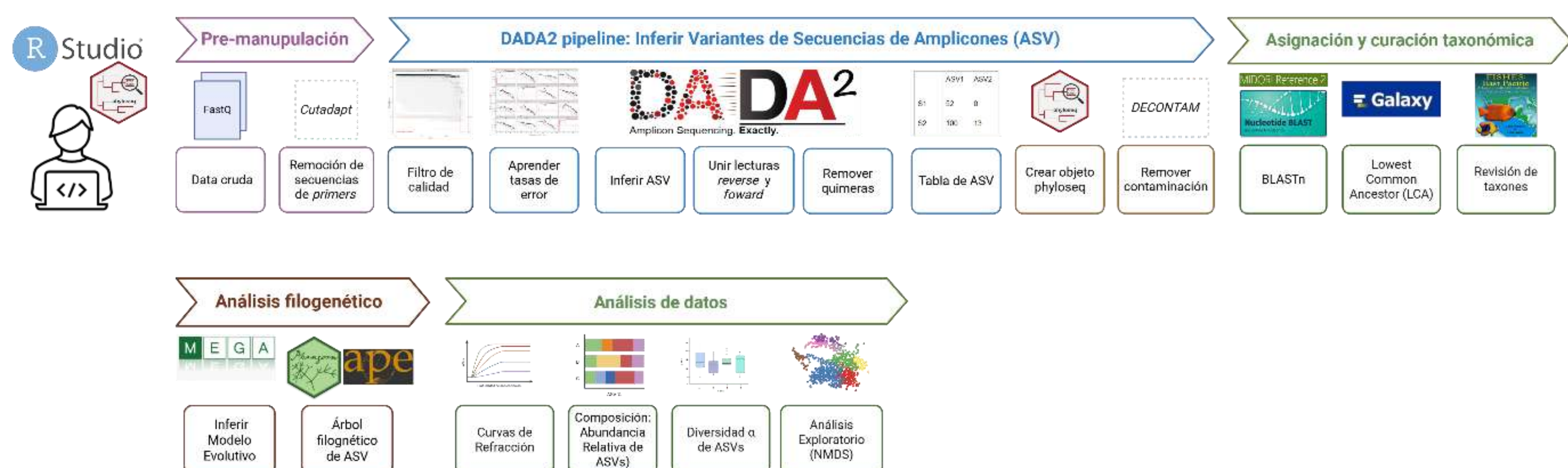


Figura 3. Esquema general del flujo bioinformático y análisis de datos (diagrama de flujo realizado mediante BioRender).

En el proceso de análisis de secuencias se aplicaron varios pasos mediante un conjunto de programas informáticos y algoritmos con el objetivo final de producir una tabla de características precisas con anotaciones de taxones potenciales por muestra (es decir, con metadatos de características) y sus relaciones filogenéticas (**Figura. 3**). En Metabarcoding, las características se refieren a variantes de secuencia de amplicón (ASV), unidades taxonómicas operativas (OTU) o taxones anotados. Su matriz de distribución por muestras puede utilizarse en los análisis bioestadísticos pertinentes.

Los principales programas utilizados fueron: R versión 4.4.0, 2024-04-24 ucrt --"Puppy Cup" Plataforma: x86_64-w64-mingw32/x64 (R Core Team, 2024) en el *Integrated Development Environment* (IDE) de RStudio (Posit team, 2025) bajo sistema operativo de Windows. Algunos otros programas se ejecutaron en sistema operativo Linux mediante Ubuntu versión 24.04.1 LTS (GNU/Linux 5.15.167.4-microsoft-standard-WSL2 x86_64) como lo fueron Python versión 3.12.3 y BLASTn versión 2.16.0+. Por último, algunas tareas relacionadas al análisis de

filogenético se realizaron en Hydra, el Smithsonian Institution High Performance Cluster (Smithsonian Institution, 2025).

4.1. Inferencia de variantes de secuencia de amplicones

Los datos crudos resultantes de secuenciación paralela Illumina MiSeq se recibieron en archivos en formato FASTAQ, dichas secuencias *foward* (R1) y *reverse* (R2) fueron previamente agrupadas por muestra según la secuencia de Index, es decir *demultiplexed* por su concepto en inglés.

Primero se removieron las secuencias de los cebadores utilizando CutAdapt versión 4.4 en Linux (M. Martin, 2011). Posteriormente se utilizó el flujo bioinformático de DADA2 (*Divisive Amplicon Denoising Algorithm 2, en Inglés*) tutorial versión 1.16 modificada por M. Leray, marzo 2023 del paquete de R: [https:// github.com/benjjneb/dada2](https://github.com/benjjneb/dada2). El paquete DADA2 R implementa el flujo de trabajo completo de amplicones: filtrado, desreplicación, inferencia de muestras, identificación de quimeras y fusión de lecturas de extremos emparejados (Callahan et al., 2016). El objetivo principal de este pipeline es obtener como producto final una tabla de variantes de secuencia de amplicones o ASV por sus siglas en Inglés de *Amplicon Sequence Variant*; un análogo de mayor resolución de la tabla OTU tradicional, que registra el número de veces que se observó cada variante de secuencia de amplicones exacta en cada muestra (Callahan et al., 2017a).

Los ASV infieren las secuencias biológicas de la muestra antes de la introducción de errores de amplificación y secuenciación, y distinguen variantes de secuencia que difieren en tan solo un nucleótido; este método pretende explícitamente sustituir a las tradicionales OTU como unidad atómica de análisis (Callahan et al., 2017b). Los ASV han demostrado una sensibilidad y especificidad tan buenas o mejores que los métodos OTU y discriminan mejor los patrones (Eren et al., 2015).

El perfil calidad de la secuenciación de las lecturas *Forward* y *Reverse* se visualizó mediante el “Q-score” del algoritmo de *Phred*. El cual mide la probabilidad de que una base se identifique incorrectamente, donde una base determinada, Q, se define mediante la ecuación

$Q = -10\log_{10}(e)$ donde “e” es la probabilidad estimada de que la identificación de la base sea incorrecta, por tanto las puntuaciones más altas indican una menor probabilidad de error (Ewing et al., 1998)

Luego se filtraron y cortaron las secuencias de la siguiente forma utilizando el comando *filterAndTrim()*:

- Se truncaron las secuencias a en las posiciones 240 pb *Forward* 160 pb *Reverse* [truncLen = c(240,160)], eliminando secuencias con baja calidad, pero longitud suficiente para su alineamiento.
- Se descartaron lecturas con una o más bases nitrogenadas ambiguas “N” (maxN = 0); se filtraron secuencias con umbral de Errores Esperados (EE) por lectura no menor o igual a 2 o a 1% [maxEE = c(2,2)], tanto en la lectura *Forward* como en la *Reverse*. EE es la suma de las probabilidades de error derivadas de las calidades Q de todas las posiciones con relación a la longitud de lectura.
Se truncaron (truncQ= 2) cada lectura en la primera instancia donde se encuentre una base con una puntuación de calidad igual a un Pherd Q score de 2,
- y se eliminaron las lecturas que coincidan con el genoma Phix, el cual se introduce durante la secuenciación (rm.phix = TRUE) con el fin de incrementar la diversidad de secuencias.

La tasa de errores para cada transición de base nitrogenada se estimó mediante el comando *learnErrors*. El algoritmo de DADA2 utiliza un modelo de error paramétrico (err) y cada conjunto de datos de amplicones (o sea, librerías) presenta tasas de errores distintas. El método *learnErrors* aprende este modelo de error a partir de los datos, alternando la estimación de las tasas de error y la inferencia de la composición de la muestra hasta que convergen en una solución conjuntamente consistente (Callahan et al., 2016). Finalmente, se visualizaron las 16 posibles transiciones de tasas de errores (**Figura 19-Figura 20**).

Las lecturas 100% se identificaron, se agruparon y se contabilizó su abundancia. Y supone que cada secuencia única puede ser real o errónea, pero no intenta distinguir entre ambas, este

proceso se conoce como dereplicar o del inglés *dereplicate* (Callahan et al., 2016). Se hizo mediante la función *derepFastq()*, ésta importa un archivo fastq y genera una lista de secuencias únicas sin duplicados, junto con sus abundancias. Además, con *derepFastq()* también se generaron puntuaciones de calidad (Phred Score) posicionales consensuadas para cada secuencia única y sus promedios. Estas puntuaciones consensuadas son utilizadas por el modelo de error de la función *dada()*.

La función *dada()* se utilizó para inferir los amplicones o “*denoise*” (sin ruido) por su terminología en inglés, a partir del modelo de error anterior y las lecturas dereplicadas. Una vez obtenidos los amplicones sin ruidos, se fusionaron o “*merged*” las lecturas *Forward* e *Reverse* para obtener las secuencias completas sin errores. La fusión se realizó alineando las lecturas *Forward* sin ruido con su complemento inverso de las lecturas *reverse*, el resultado es una secuencia contig fusionada, la cual es una representación continua de la región secuenciada con las hebras *forward* y *reverse* que han sido superpuestas y alineadas, denominadas variantes de secuencias de amplicones (ASV).

4.2. Construcción de tabla de OTU-ASV y remoción de quimeras

Con las secuencias contig se construyó la tabla final de ASV, se identificaron y removieron quimeras mediante el algoritmo de DADA2 *removeBimeraDenovo* y se construyó una tabla registrando los cambios de las lecturas para cada paso del flujo. Seguido, se realizó una primera asignación taxonómica a las secuencias de la tabla final de ASV mediante el método clasificador bayesiano ingenuo de DADA2 y como base de datos de referencia a MIDORI2. Esta última, es creada a partir de secuencias curadas de la base de datos del GenBank-NCBI de genes mitocondriales incluyendo nuestro marcador 12S ARNr y los datos están disponibles para su descarga en siete formatos, entre ellos DADA2 y BLAST+ (Leray et al., 2022).

El análisis de secuencias de ADN requiere integrar varios tipos de datos para poder analizarlos e interpretarlos más adelante, por tanto, se utilizó el paquete *Phyloseq*. En R, este paquete permite importar, almacenar, analizar y mostrar gráficamente datos complejos de secuenciación filogenética que ya se han agrupado en unidades taxonómicas operativas, en este caso ASV,

especialmente cuando hay datos de muestras asociados, árboles filogenéticos y/o asignaciones taxonómicas de las OTU (McMurdie & Holmes, 2013).

Se creó un objeto clase Phyloseq. La clase phyloseq es una clase de almacenamiento de datos a nivel experimental definida por el paquete phyloseq para representar datos de secuenciación filogenética. La mayoría de las funciones del paquete phyloseq esperan una instancia de esta clase como argumento principal (McMurdie & Holmes, 2013). En un objeto phyloseq se integró la metadata, la tabla de taxonomía inicial y matriz de abundancia relativa de ASV; cuyos comandos respectivamente son: *sample_data*, *taxonomyTable* y *otu_table*. Un objeto phyloseq puede almacenar hasta cinco tipos de datos, el resto fue agregado más adelante. En la figura 4 se resume por el autor la estructura y componentes de un objeto physeq.

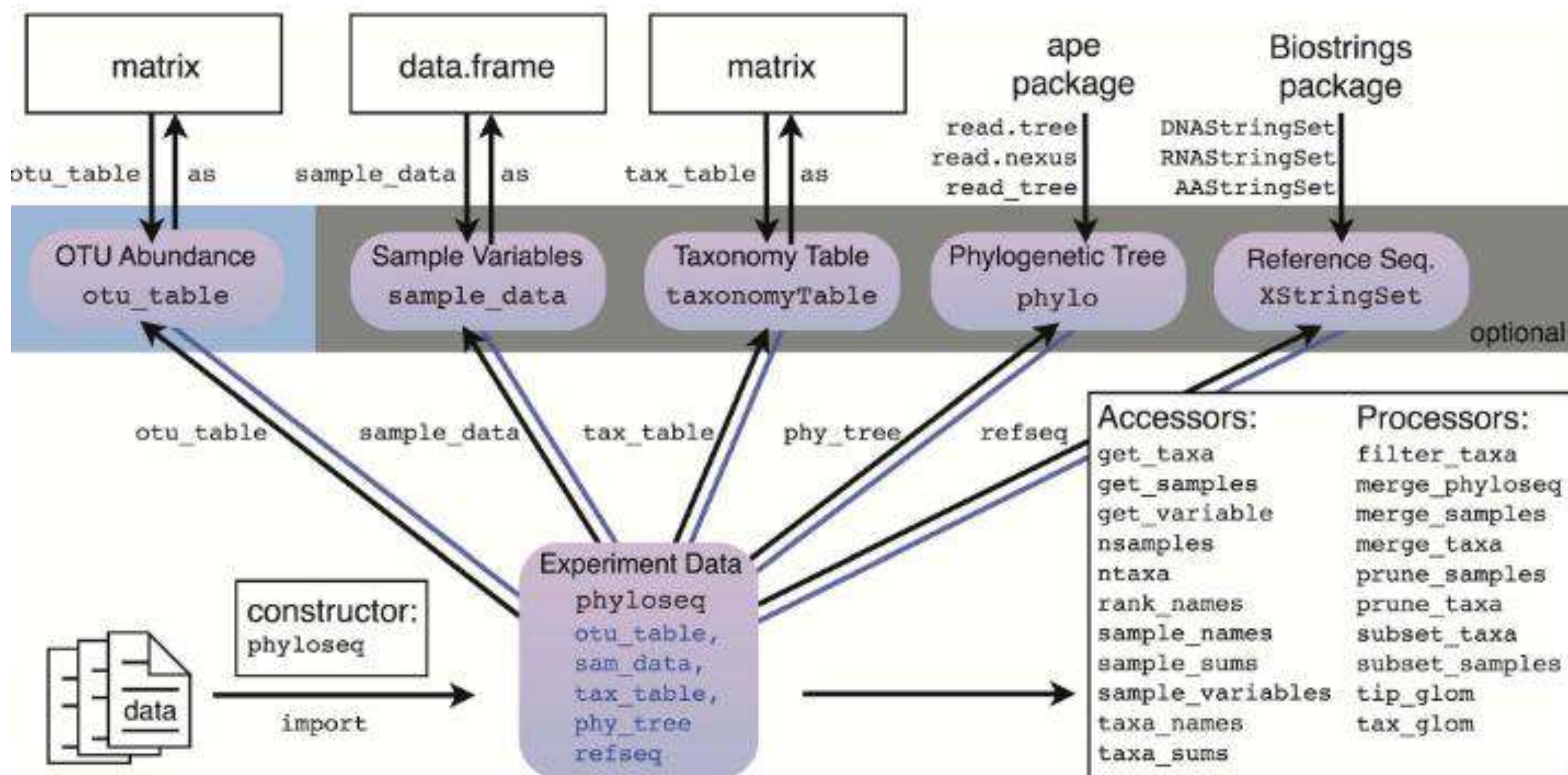


Figura 4. Objeto clase «phyloseq» (McMurdie & Holmes, 2013).

4.3. Remoción de en secuencias contaminantes

Secuencias producto de contaminación externa se identificaron, removieron y visualizaron con el paquete DECONTAM versión 1.24.0. El cual implementa dos métodos de clasificación de Novo basados en firmas ampliamente reproducidas de contaminación externa: (1) Las secuencias de taxones contaminantes probablemente tengan frecuencias que se correlacionan

inversamente con la concentración de ADN de la muestra y (2) las secuencias de taxones contaminantes probablemente tengan una mayor prevalencia en las muestras de control que en las muestras reales (Davis et al., 2018).

Adicionalmente, se revisó si alguna muestra tenía menos de 1,000 lecturas totales y se removieron ASV no presentes en las muestras. Se removieron las muestras de control de extracción y PCR. Finalmente, para facilitar los siguientes análisis y enfocarnos solo en las lecturas de interés, se hizo una subdivisión de la data y se seleccionaron para los análisis subsiguientes solo aquellos ASV cuya primera asignación taxonómica con MIDORI2 fuese de las clases *Actinopteri* y *Chondrichthyes*.

4.4. Asignación Taxonómica

De un objeto de clase phyloseq con datos filtrados y curados se extrajeron las secuencias de ADN de los ASV (n = 1,298) en formato FASTA para la asignación taxonómica final. Los análisis se ejecutaron en *Python 3* desde una terminal Bash en WSL (Linux).

Las secuencias se compararon mediante BLASTn (BLAST+ v2.16.0) contra la base de datos local MIDORI2 *MIDORI2_UNIQ_NUC_GB264_sARNr_BLAST* actualizada hasta 2024-12-14. (Altschul et al., 1990; Leray et al., 2022). Se empleó un E-value ≤ 0.01 (-evaluate 0.01) y un tamaño de palabra de 11 (-word_size 11). Para reducir alineamientos redundantes se aplicó culling (-culling_limit 100), y se limitaron los resultados a los 10 mejores sujetos o “hits” por consulta (-max_target_seqs 10).

Las clasificaciones ambiguas se resolvieron con Galaxy LCA (lowest common ancestor), que identifica el nodo taxonómico compartido más profundo entre los aciertos de BLAST (Beentjes et al., 2019). La asignación se efectuó con el script Galaxy LCA lca.py, galaxy-tool-lca) sobre el archivo tabular de BLAST con los 10 mejores aciertos por consulta. Las referencias candidatas se filtraron exigiendo ≥ 80 % de identidad y ≥ 80 % de cobertura de alineamiento, y se retuvieron siguiendo la estrategia *best_hits_range*, incluyendo todos los aciertos cuyo bit-score estuviera dentro de 8 puntos del mejor acierto. Las coincidencias directas se asignaron inmediatamente cuando la identidad fue ≥ 99 % y la cobertura ≥ 90 %; las consultas restantes se

resolvieron mediante un LCA conservador sobre los aciertos retenidos. Las secuencias que no cumplieron estos criterios o presentaron ambigüedad se etiquetaron como “unknown”, y las asignaciones finales se exportaron en OTU-BLAST_top10.LCA2.txt para su uso posterior (Beentjes et al., 2019).

La revisión final de asignación taxonómica comparó los taxones en base a su distribución geográfica reportada para el Pacífico Oriental Tropical (POT), para ello se utilizó como fuente principal “*Shorefishes of the Tropical Eastern Pacific: online information system*” (Robertson & Allen, 2024) de la cual se exportaron los listados de especies reportadas para el POT a nivel de familia, género y especie. Cuando los taxones comparados no aparecían en *Shorefishes*, se consultaron *Panama Biodiversity Portal / Panama Symbiota* (Gries et al., 2014) y FishBase (Boettiger et al., 2012). En lo sucesivo, se hace referencia abreviada a estas fuentes como *Shorefishes*, *Panama Symbiota* y *FishBase*.

La revisión de las asignaciones taxonómicas finales se realizó en de dos etapas implementadas con scripts en R (RStudio):

(i) Resolución de múltiples asignaciones por ASV. Más de 200 ASV conservaron múltiples etiquetas tras el LCA, esto representaba una duplicación de los ASV con asignaciones posibles. En los casos donde una única asignación está reportada para el POT en *Shorefishes*, se retuvo esa única asignación por ASV a nivel de especie, género o familia. Cuando un ASV presentaba dos especies válidas en el POT, se elevó la asignación al nivel de género (también reportado en el POT), lo mismo para el nivel de género a familia, para evitar conflictos. Las alternativas descartadas no se eliminaron: se registraron como notas por ASV en columnas separadas, junto con la justificación del cambio. Cuando fue necesario, se corroboró con *Panama Symbiota* y *FishBase*.

(ii) Verificación de ASV con asignación única. El 80 % de los ASV tenían una sola asignación. Se verificó su coherencia a nivel de género y familia usando *Shorefishes* como fuente principal. Los géneros no reportados para el POT en las bases consultadas se elevaron a familia; las familias no reportadas se elevaron a orden. En casos dudosos se contrastó con *Panama Symbiota* y *FishBase*. La tabla final ya curada de taxonomía se integró al objeto phyloseq final.

4.5. Análisis filogenético

Las secuencias de ADN se procesaron en R con el paquete *Biostrings* versión 2.72.1 (Pagès et al., 2024). Se agregó una secuencia del delfín moteado pantropical, *Stenella attenuata*, como “outgroup” para realizar la raíz, la cual es evolutivamente distante del conjunto de secuencias y se obtuvo del primer phyloseq que contenía toda la data inicial, sin filtrar por peces o tiburones.

Un primer alineamiento múltiple de secuencias (MSA) ayudó a visualizar aquellas secuencias de ASV con pobre alineamiento; posteriormente, fueron excluidas del análisis filogenético. Estas corresponden a los ASV:1272, 1287, 1268, 1276, 1278, 1280, 1289, 1294, 1296. El conjunto de secuencias curadas y el “outgroup” se alinearon nuevamente con *AlignSeqs* y se ajustaron con *AdjustAlignment*, ambos del paquete DECIPHER V2.0. (E. S. Wright, 2015; E. Wright S., 2016).

Primero, se estimó el mejor modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos mediante un modelo estadístico de máxima verosimilitud (ML, *Maximum Likelihood* en MEGA 12 (Kumar et al., 2024). El modelo óptimo estimado fue Modelo (GTR+G+I): *General Time Reversible* con +G (*Gamma distribution*, heterogeneidad de tasas entre sitios modelada con una distribución gamma) y +I (*Invariant sites*, proporción de sitios invariantes). La razón estadística principal para su elección es que minimizó simultáneamente los criterios de información —Akaike Information Criterion (AIC) $\approx 50\,981.07$, *Akaike Information Criterion, corrected* (AICc) = 51 037.924 y *Bayesian Information Criterion* (BIC) = 77 810.656. Los parámetros estimados incluyeron $\alpha \approx 0.72$ para la heterogeneidad de tasas (+G) y $I \approx 0.11$ para la proporción de sitios invariantes (+I), con sesgo de transición/transversión $R \approx 2.65$ y frecuencias de base $f(A)=0.332$, $f(T)=0.196$, $f(C)=0.241$, $f(G)=0.231$.

Se infirió un árbol de máxima verosimilitud (ML) para las secuencias con R usando los paquetes *ape* versión 5.8.1 y *phangorn* versión 2.12 (Paradis & Schliep, 2019; Schliep et al., 2017). Se generó un árbol inicial de Proximidad de Vecinos o *Neighbour-Joining (NJ)* en inglés, a partir de distancias TN93 (Tamura-Nei) y se ajustó un modelo GTR+G+I con 10 categorías gamma ($\text{gamma_ncat} = 10$), $\alpha = 0.716736149$ y proporción invariante $I = 0.113821138$. Los parámetros se inicializaron con arranques “MEGA-seeded”: frecuencias de base (bf_init , orden A,C,G,T) =

(0.331587758, 0.241200619, 0.231299213, 0.19591241) y tasas relativas (Q_init, orden AC, AG, AT, CG, CT, GT) = (0.0425, 0.1580, 0.0600, 0.0115, 0.2095, 0.0185). La optimización se limitó a NNI por eficiencia (*phangorn*:pml/optim.pml; trace = 0), con set.seed(123), y el árbol final se enraizó con el outgroup “OUTGROUP” (*ape*::root).

El bootstrap de 1000 réplicas se ejecutó en el clúster de supercomputación de STRI (Smithsonian Institution, 2025) mediante *phangorn*::bootstrap.pml con optNni=TRUE y paralelización usando *parallel* (hasta 8 núcleos). Cada árbol bootstrap se enraizó con el mismo outgroup, y el soporte se mapeó sobre el árbol ML con *phangorn*::prop.clades, etiquetándose los nodos en %. Los productos finales fueron un Newick con y sin outgroup. Finalmente, en Interactive Tree of Life (iTOL) v6 en línea se visualizó y anotó el árbol filogenético final (Letunic & Bork, 2024).

5. Análisis de datos

5.1. Composición taxonómica y tratamiento de datos crudos (Pregunta 1)

La evaluación inicial de los datos crudos de secuenciación a partir del procesamiento bioinformático con DADA2, incluyó la revisión del número de lecturas retenidas en cada paso del flujo bioinformático (filtrado, *denoising*, fusión y eliminación de quimeras). Posteriormente, se examinó el tamaño de la librería, es decir, la distribución del número de lecturas por muestra, y se generaron curvas de rarefacción (acumulación de ASV observados por muestra) para evaluar la suficiencia de muestreo. Estas curvas se graficaron por combinación localidad–año–estación, utilizando los paquetes *Ranacapa* (Kandlikar et al., 2018) y *Phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013) en R (v 2025.09.1). Después de esta evaluación inicial, el conjunto de datos de ASV fue depurado al eliminar las muestras sin lecturas y los ASV sin asignación taxonómica al menos al nivel de phylum ($n = 4$). La asignación taxonómica obtenida se resumió al obtener el número total de taxones únicos detectados por rango taxonómico (phylum, clase, orden, familia y género), y el número de ASV asignados a cada género, familia y orden únicos. Además, mediante el árbol filogenético se infirieron relaciones filogenéticas entre los ASV para visualizar los patrones de distribución taxonómica detectados en todas las secuencias.

5.2. Variación espaciotemporal en la diversidad y estructura comunitaria de variantes de secuencias de amplicones (Pregunta 2)

5.2.1. Abundancia Relativa de ASV

Los perfiles de abundancia relativa de ASV se expresaron a nivel taxonómico de orden y se compararon entre 8 subgrupos de datos definidos como la combinación entre la estación seca y la estación lluviosa, sus respectivas localidades de la Zona Especial de Manejo del Archipiélago de Las Perlas y del Parque Nacional Coiba, y entre los años 2022 y 2023.

5.2.2. Diversidad alfa de ASV

Previo al análisis estadístico, se identificó la variable “Localidad” como covariable o variable de confusión. Esta determinación se fundamenta en las disparidades oceanográficas entre ambos sitios de estudio; específicamente, el Archipiélago de Las Perlas está sujeto al fenómeno de afloramiento estacional durante la estación seca, fenómeno no reportado en el Parque Nacional Coiba. Debido a que los parámetros fisicoquímicos vinculados a este proceso (ej. gradientes térmicos, concentración de clorofila) no fueron cuantificados en la presente investigación, se omitió la comparación directa entre localidades, y así evitar interpretaciones erróneas derivadas de variables no controladas. En su lugar, el análisis se centró en evaluar los efectos de la estacionalidad (estación seca vs. estación lluviosa) en cada sitio y año. Este diseño experimental se aplicó de manera independiente en cuatro grupos de datos espaciotemporales: Perlas-2022, Perlas-2023, Coiba-2022, Coiba-2023, tanto en la comparación de la diversidad alfa y evaluación de la estructura comunitaria.

La diversidad alfa se cuantificó para cada uno de los grupos utilizando dos métricas: la riqueza observada de variantes de secuencias de amplicones (número de Hill $q=0$) (Hill, 1973) y el índice Chao1 (Chao, 1984). La riqueza observada es la métrica de diversidad más fundamental; se calculó como el conteo exacto de variantes de secuencias de amplicones (ASV) únicas detectadas por muestra para el grupo de datos (Gotelli & Colwell, 2011). Todas las pruebas estadísticas inferenciales del estudio se basaron en esta matriz de riqueza empírica.

Por su parte, el índice Chao1 es un estimador no paramétrico del número de especies no observadas en una muestra. Estima la riqueza total de especies basándose en el número de especies que aparecen solo una vez (especies únicas o *singletons*) y dos veces (especies dobles o *doubletons*) en la muestra (Chao, 1984). La fórmula para calcular el índice Chao1 es la siguiente:

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{F1^2}{2F2}$$

En este contexto, la variable "Sobs" representa el número de ASV observados, "F1" indica el número de ASV observadas en una sola ocasión y "F2" el número de ASV observadas en dos ocasiones. Este índice se calculó por separado a partir de los datos crudos estandarizados a presencia/ausencia (P/A) por muestra y se reporta únicamente de forma descriptiva, es decir, no se realizó análisis de varianza.

Para evaluar estadísticamente la diversidad alfa entre las estaciones seca y lluviosa de cada grupo, se propuso el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, en este caso, únicamente de la riqueza observada. El ANOVA es una prueba estadística paramétrica empleada para determinar si existen diferencias significativas entre las medias de grupos independientes (Zar, 2014). Sin embargo, la validez de los resultados del ANOVA depende del cumplimiento de dos supuestos paramétricos fundamentales: la normalidad de los residuos y la homogeneidad de las varianzas (homocedasticidad).

Se evaluó la normalidad de los datos de riqueza mediante la prueba de Shapiro-Wilk, la cual contrasta la hipótesis nula de que los datos provienen de una población con distribución normal (Shapiro & Wilk, 1965). Adicionalmente, la homogeneidad de varianza se verificó mediante la prueba de Levene, que evalúa empíricamente si las varianzas poblacionales son iguales entre los grupos comparados (Levene, 1960). Para los grupos de datos que cumplieron ambos supuestos, se utilizó el ANOVA de una vía. En contraste, para los grupos que violaron el supuesto de normalidad o de homocedasticidad, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis como alternativa.

Todos los análisis se realizaron en R (v. 2025.09.1) con los paquetes de phyloseq ((McMurdie & Holmes, 2013).

5.2.3. Estructura comunitaria de ASV

La estructura comunitaria de los peces de arrecifes coralinos se analizó mediante la combinación de la visualización de los datos de ASV por Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) con distintas matrices de disimilitud de Bray-Curtis y Jaccard a nivel de localidad y temporal (año-temporada) y Bray-Curtis para la estructura de ASV a nivel temporal (seca vs lluviosa) de cada localidad, seguida de la PERMANOVA.

El Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) es una técnica de ordenación que representa las muestras en un espacio de pocas dimensiones basándose en el rango de sus disimilitudes o matriz de disimilitud (Kruskal & Shepard, 1974). A diferencia de los métodos lineales, el NMDS no asume relaciones lineales entre las variables, siendo altamente adecuado para datos ecológicos que a menudo son no lineales y contienen muchos ceros (Zuur et al., 2007). La calidad de la ordenación NMDS se evalúa mediante el valor de estrés (Stress), que mide qué tan bien la configuración de baja dimensión (generalmente 2D) reproduce las distancias ecológicas originales. Si su valor está por debajo de 0.2 indican un ajuste bueno o robusto, mientras que valores por debajo de 0.1 se consideran excelentes (Clarke, 1993).

PERMANOVA es un método no paramétrico de análisis de varianza multivariante basado en distancias por pares con pruebas de significancia realizadas mediante permutación (Anderson, 2001). Mientras que el ANOVA cuantifica la variación dentro de un conjunto de datos como la suma de las diferencias al cuadrado entre los puntos y su media o centroide. La idea clave detrás del PERMANOVA es que la variación dentro de un grupo también se puede calcular directamente a partir de una matriz de distancias; específicamente, la suma de las diferencias al cuadrado entre los puntos y su centroide es igual a la suma de las distancias al cuadrado entre puntos dividida por el número de puntos (Anderson, 2001, 2017).

Similar al ANOVA, este método permite realizar pruebas y estimaciones de la magnitud de los efectos principales, términos de interacción, estructuras jerárquicas, componentes aleatorios en modelos mixtos, etc., mientras se conservan simultáneamente propiedades estadísticas robustas de los métodos multivariados no paramétricos basados en rangos, como el análisis de similitudes (ANOSIM); específicamente, (1) la flexibilidad para fundamentar el análisis en una medida de

disimilitud de elección (tales como Bray-Curtis, Jaccard, etc.) y (2) inferencias libres de distribución logradas mediante permutaciones, sin el supuesto de normalidad multivariada (Anderson, 2017).

A continuación describimos algunos estadísticos claves del PERMANOVA a reportar en los siguientes análisis en base a Anderson (2017) y Bakker (2025):

- Pseudo-F: es el estadístico principal, se basa directamente en el estadístico F convencional del ANOVA. Se calcula como una razón entre la variación entre grupos y la variación dentro de los grupos, ponderando el numerador y el denominador según sus grados de libertad (Df). Su valor es cero o positivo, correspondiendo los valores mayores a una mayor importancia proporcional del factor de agrupación. Al igual que con otras técnicas de permutación, la distribución del estadístico de prueba se evalúa cambiando repetidamente el nombre de las unidades de observación (es decir, permutando las identidades de los grupos) y recalculando el estadístico.
- Valor p: representa la significación estadística. Se determina permutando las identidades de los grupos, recalculando el estadístico pseudo-F para cada permutación y comparando el valor observado con la distribución de valores obtenidos mediante la permutación.
- Coeficiente de determinación o R^2 parcial: representa la variación explicada, como la cuantificación del tamaño del efecto de la pseudo-razón F. Se define como uno menos la división entre la suma de cuadrados dentro de cada grupo y la suma total de cuadrados del valor de Pseudo-F.

Una matriz de distancias puede definirse conceptualmente como el cálculo de la distancia entre dos unidades de muestra, que comprime o combina todas las diferencias entre ambas en un solo número. Esta compresión se produce independientemente de si las muestras se comparan con respecto a una sola variable (p. ej., riqueza de especies) o a una medida multivariada (p. ej., composición de la comunidad) (Bakker, 2025). Por lo tanto, en este estudio empleamos las matrices de disimilitudes de Bray-Curtis y Jaccard.

La disimilitud de *Bray-Curtis* utiliza datos de abundancia y su índice refleja la proporción de la abundancia total de especies en la que difieren dos parcelas o muestras y normaliza las diferencias entre especies por la abundancia total de especies en ambas muestras (Bray & Curtis, 1957). Su medida abarca desde 0 (comunidades idénticas) hasta 1 (comunidades completamente diferentes sin especies compartidas) y, lo que es más importante, aborda la "paradoja de Orlóci" al garantizar que dos parcelas sin especies en común sean lo más disímiles posible (Ricotta & Podani, 2017). Por lo tanto, es una de las medidas de disimilitud multivariada más utilizadas en ecología de comunidades (Ricotta & Podani, 2017).

Por otro lado, una matriz de disimilitud de *Jaccard* es una matriz de distancias por pares que cuantifica las diferencias en composición entre muestras utilizando el índice de Jaccard. Este se puede expresar como $\beta_{jac} = 1 - (\text{especies compartidas})/(\text{total de especies distintas})$ (Baselga, 2012; Jaccard, 1912).

Las matrices de disimilitud se calcularon y evaluaron como se describen a continuación:

1. Datos de abundancia relativa de ASV - Distancia Bray–Curtis: La matriz de abundancias de ASV se estandarizó al transformar los datos a Hellinger, definida como la raíz cuadrada de la abundancia relativa de cada muestra, esta es una medida recomendada para la agrupación u ordenación de datos de abundancia de especies (Legendre & Gallagher, 2001). Esto último se realizó para reducir la influencia de ASV dominantes y normalizar el tamaño de la biblioteca (Legendre & Gallagher, 2001). Seguido, se aplicó un Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) con distancias o disimilitud de Bray–Curtis (función *metaMDS*, paquete *vegan*). Se calcularon los valores de estrés y se evaluaron las diferencias entre grupos mediante PERMANOVA (función *adonis2*). Este análisis basado en abundancias relativas de ASV se aplicó para evaluar la estructura comunitaria general a nivel de (i) localidad (Perlas vs Coiba), (ii) a nivel temporal (estación-año), y temporal de cada localidad específica por año, es decir, estación (seca vs lluviosa) de Perlas y Coiba.

2. Datos de presencia/ausencia de ASV - Distancia Jaccard: La matriz de abundancias de ASV se transformó en matriz de distancia de Jaccard de datos binarios, es decir, 0 para ausencia de un ASV en una muestra y 1 para su presencia, para así analizar los cambios composicionales

basados únicamente en la ocurrencia de ASV. Se realizaron análisis NMDS con la distancia de Jaccard y PERMANOVA para evaluar las variaciones temporales en la composición comunitaria. Este método se aplicó para evaluar la estructura comunitaria general a nivel de (i) localidad (Perlas vs Coiba) y (i) temporal (estación-año)

El uso combinado de las métricas Bray–Curtis y Jaccard permite distinguir entre cambios en la abundancia relativa y en la ocurrencia de taxones (Deagle et al., 2019; Legendre & Gallagher, 2001). Mientras que Bray–Curtis refleja modificaciones en la dominancia o rareza de los ASV detectados, Jaccard se centra exclusivamente en la presencia o ausencia, controlando el efecto de posibles diferencias en la detectabilidad entre estaciones. Esta doble aproximación proporciona una visión más robusta de la dinámica ecológica inferida a partir del eDNA, diferenciando las variaciones estructurales debidas a la abundancia de aquellas derivadas de la composición de especies o ASV (Skelton et al., 2022; Hayami et al., 2020).

Todos los análisis se realizaron de manera independiente para cada agrupamiento, con el fin de capturar la variación local y temporal. Dado que el afloramiento ocurre exclusivamente durante la estación seca en Las Perlas, las variables estación y localidad se consideraron covariables interdependientes e interpretadas de forma contextual. Todos los análisis se efectuaron en R (versión 2025.09.2) utilizando los paquetes phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013) y vegan (Oksanen et al., 2022).

CAPÍTULO III: RESULTADOS

1. Datos crudos de secuenciación

La secuenciación resultó en un total de **7,294,878** lecturas pareadas, es decir, lecturas *forward* y *reverse* de amplicones complementarios de secuenciación. Los perfiles de calidad de Q-scores (*Q-profiles*) mostraron valores promedio superiores a Q30 para la mayor parte de las posiciones de lectura, indicando una baja tasa esperada de 0.001 o 1 en 1000 probabilidades de un llamamiento de base incorrecta (**Figura 19-Figura 20**).

1.1. Flujo de DADA2

A lo largo del flujo de procesamiento de DADA2, se observó una retención alta y consistente de lecturas, lo que evidencia una adecuada calidad de las secuencias tras cada paso del flujo bioinformático. Del total inicial de 7,294,878 lecturas pareadas, aproximadamente el 92.6 % se mantuvo después del filtrado de calidad, y porcentajes similares se conservaron tras las etapas de desreplicación y corrección de errores (*denoisedF* y *denoisedR*), con retenciones de 92.4–92.6 % respecto al total de entrada. Posteriormente, la fusión (*merged*) generó cóntigos de las lecturas forward y reverse que redujeron ligeramente el total a 6,649,910 lecturas (91.2% del total inicial), lo cual es esperado debido a la eliminación de secuencias pares que no se solapan adecuadamente. Finalmente, el proceso de eliminación de quimeras retuvo 5,974,280 lecturas no quiméricas, representando un 81.9 % del total inicial y un promedio de 43,928 lecturas por muestra con una mediana de 43,874 lecturas (**Tabla 3**).

Luego de la remoción de quimeras, se identificó mediante DECOTAM una secuencia contaminante, la cual fue removida de las muestras:

CAC CGC GGT TAT ACG AGA GAC CCC AGT TGA TTG AAG CGG CGT AAA GAG TGG
TTA TGG AAC CAT CTC CCT TAA AGC AGA AAA CCT CCC AAA CTG TTA TAC GCA
CCC AGA GGT CTA AAC CCC TTT CAC GAA AGT AGC TTT ATA TTC GCC TAC CAG
AGC CCA CGA AAG CTA GGA CAC AAA CTG GGA TTA GAT ACC CCA CTA TG

Las distribuciones del número de lecturas por muestra reflejan una tendencia general, donde las cajas por localidad y tipo de control muestran variaciones moderadas en el número de lecturas, sin pérdidas abruptas entre pasos consecutivos (**Figura 5**). La estabilidad de las medianas y la baja dispersión observada en la mayoría de los grupos sugieren una uniformidad adecuada en la calidad de secuenciación y eficiencia del pipeline. En conjunto, estos resultados confirman que la depuración y corrección de errores mediante DADA2 conservaron poco más del 80% de las lecturas de alta calidad, proporcionando una base sólida para los análisis posteriores.

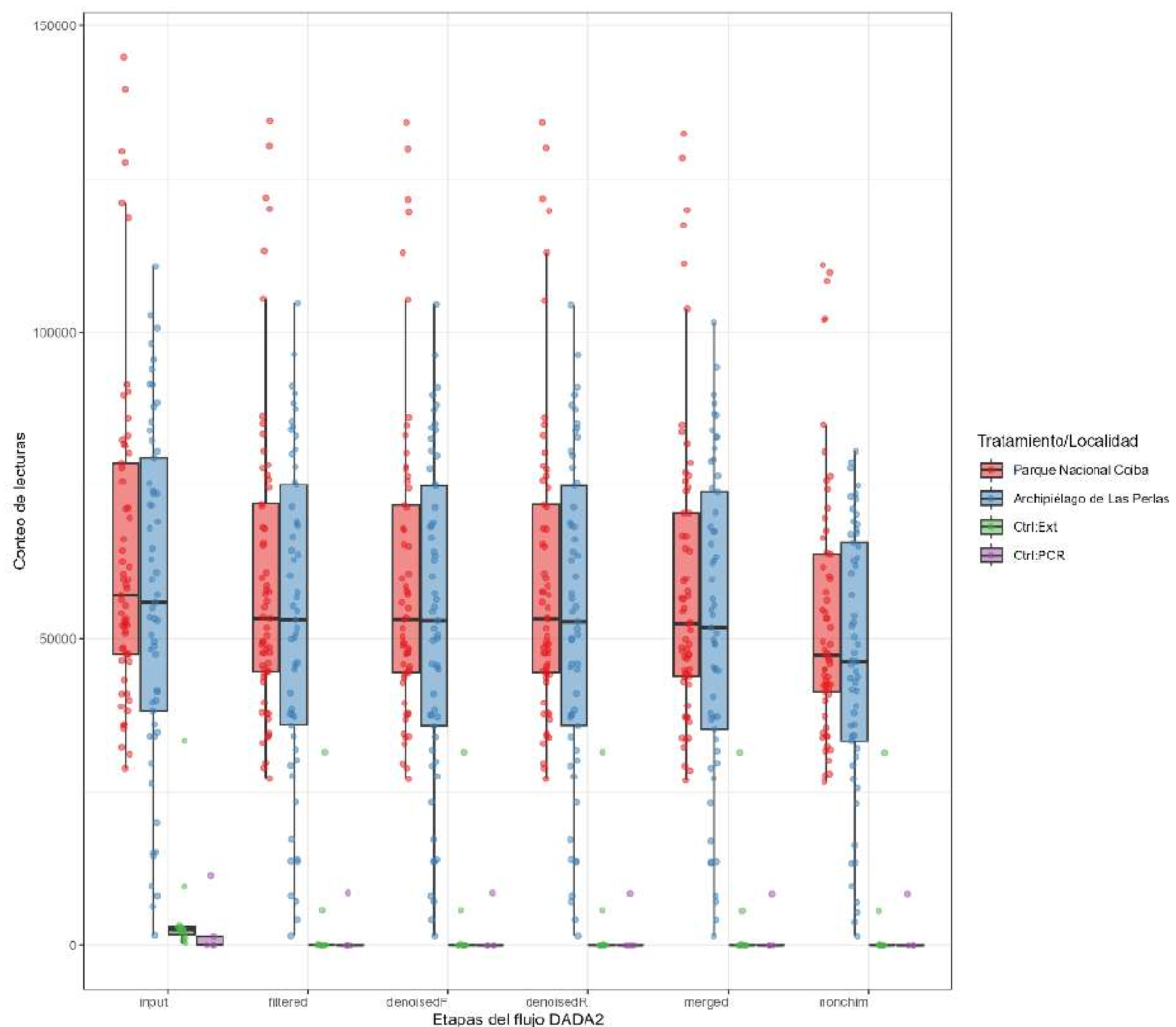


Figura 5. Cambios en el conteo de lecturas de secuencias de ADN en cada paso del flujo de DADA2. Cada punto representa una muestra.

1.2. Tamaño de librería

Luego de retener ASV de interés asignados exclusivamente a las clases *Actinopterygi* y *Chondrichthyes*, y de eliminar secuencias contaminantes y muestras de control, se evaluó el tamaño de la librería final, definido como el número de lecturas por muestra (**Figura 6**). Sin embargo, hacemos distinción de otros conceptos relacionados: la **profundidad de secuenciación**, también conocida como profundidad de lectura o profundidad de cobertura, se refiere al número de veces que se lee una base específica (nucleótido) en el ADN durante el proceso de secuenciación. Mientras que la cobertura de secuenciación es la proporción o porcentaje de un genoma o fragmento que se ha secuenciado a una profundidad determinada. (Sims et al., 2014)

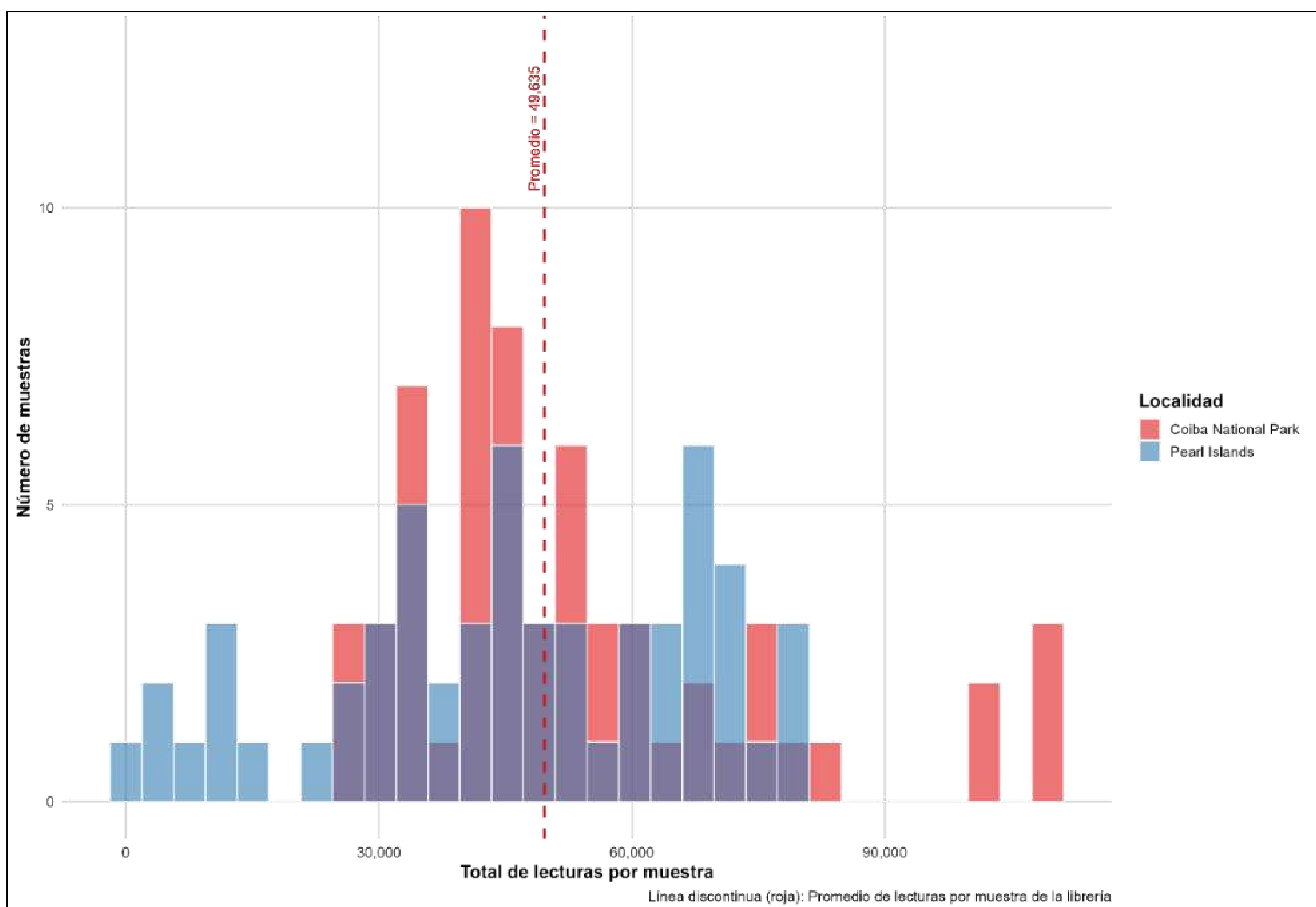


Figura 6. Tamaño de la librería: distribución del número de lecturas por muestra por localidad.

El tamaño de la librería final fue de 5,856,889 lecturas distribuidas en 118 muestras. Es decir que se logró retener un 98% de las lecturas asignadas a peces, tomando como referencia 5,974,280 de lecturas curadas, y un 88.2% usando como referencia las 7,294,878 lecturas pareadas iniciales no curadas, previo a DADA2. El tamaño de librería por muestra presentó un rango amplio entre 20,000 y 80,000 lecturas de amplicones y un promedio de 49,635 lecturas por muestra; ninguna muestra se reportó con menos de 1,000 lecturas. Un número reducido de muestras (< 20) presentó menos de 30,000 lecturas, mientras que algunas superaron las 90,000. En general, las muestras del Parque Nacional Coiba mostraron mayores tamaños de librería que las del Archipiélago de Las Perlas, lo que refleja ligeras variaciones en el rendimiento de secuenciación entre localidades.

1.3. Curvas de rarefacción

Aunque el tamaño de la librería refleja la magnitud del esfuerzo de secuenciación por muestra, este valor no permite determinar si la diversidad de ASV presente fue completamente capturada. Las curvas de refracción o acumulación determinaron la relación entre el número de lecturas secuenciadas y el número de variantes de secuencia de amplicón (ASV) detectadas por muestra, permitiendo visualizar la suficiencia del esfuerzo de secuenciación del gen 12S para la detección tanto de ASV abundantes como de baja frecuencia (Gotelli & Colwell, 2001). En la **Figura 7**, el eje x representa el número total de lecturas, mientras que el eje y representa el número de ASV observados. La acumulación de ASV observados en muestras presentadas por una curva coloreada del sitio al que pertenece, en relación con el número de lecturas totales en la muestra. La relación entre ambas variables genera una curva de acumulación por muestra, donde la presencia de una meseta indica saturación de la diversidad detectada (Gotelli & Colwell, 2001).

En el Parque Nacional Coiba, las curvas de rarefacción fueron en general homogéneas entre estaciones y años muestreados. La mayoría de las muestras alcanzaron el mínimo del 10° percentil (≈ 40 – 60 ASV con alrededor de 45,000 lecturas) (**Fig. 7 A-D**). No obstante, durante ambas estaciones del año 2023 algunas muestras superaron la media de lecturas de la librería ($\approx 80,000$ lecturas) sin alcanzar una meseta definida, mostrando un incremento lineal continuo que sugiere ausencia de saturación de ASV (**Fig. 7 C-D**). Un número reducido de muestras ($n =$

2 por año) presentó baja acumulación inicial de ASV durante las estaciones lluviosas de ambos años, aunque posteriormente alcanzó la meseta (**Fig. 7 B-D**).

Por otro lado, el Archipiélago de Las Perlas evidenció curvas notablemente más heterogéneas. En su mayoría, con excepciones, llegó al mínimo del 10° percentil. Similar a Coiba, con menos de 30,000, se detectaron aproximadamente 40 ASV por estación por año (**Fig. 7 E-H**). En la estación seca de 2023, la saturación de ASV fue incluso elevada, ya que con menos de 30,000 lecturas se pudieron detectar más de 40 ASV, y algunas muestras continuaron acumulando ASV incluso más allá de las 60,000 lecturas (**Fig. 7F**). La estación seca de 2022 mostró un comportamiento similar, con un alto número de ASV dentro de un rango medio de lecturas (**Fig. 7E**).

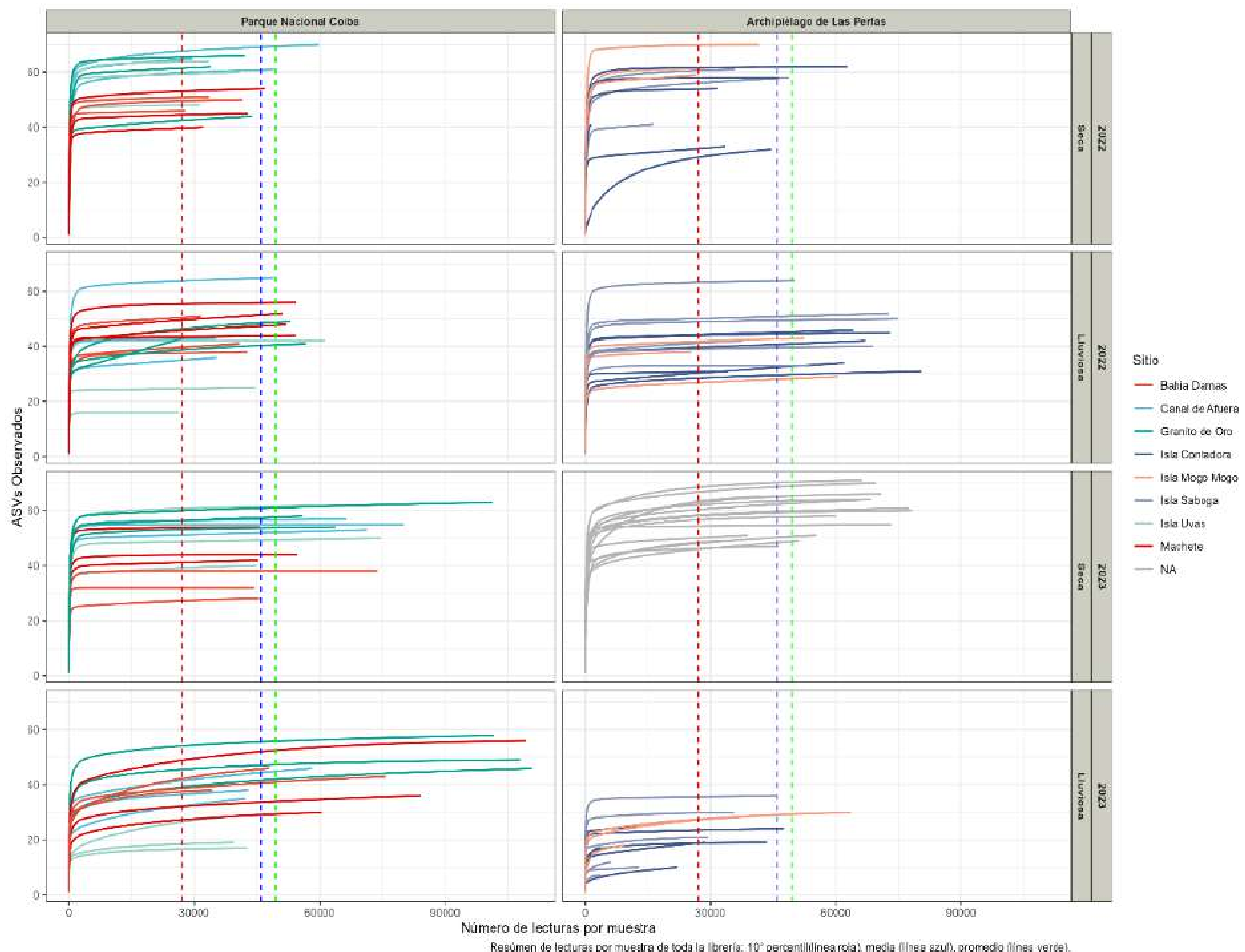


Figura 7. Curvas de rarefacción de ASV por localidad, año y estación.

En contraste, ambas estaciones lluviosas del año 2022 y del año 2023 exhibieron menor diversidad detectable. En particular, durante la estación lluviosa del año 2023, los valores de ASV no superaron 40 ni el número de lecturas promedio de la librería. Además, se identificaron aproximadamente cuatro muestras con bajo número de lecturas que no alcanzaron el plateau esperado (**Fig. 7H**). De forma similar, en la estación seca de 2022 se observaron un par de muestras con comportamiento equivalente, mientras que el resto mostró saturación satisfactoria (**Fig. 7E**).

Pregunta 1: Composición taxonómica de ASV

2. Composición y coherencia de la asignación taxonómica de secuencias de variantes de amplicones

El primer conjunto de datos de secuencias sin contaminantes, muestras de control y su primera asignación taxonómica consistió en 1.676 ASV, de los cuales 378 ASV (22,5%) no obtuvieron asignación taxonómica satisfactoria. Por ejemplo, de estos 378 ASV, el 65.34 % no obtuvieron asignación taxonómica alguna, mientras que el 34.66 % restante fue asignado a taxones no deseados. Entre ellos, hongos de la clase *Pezizomycetes* (género *Morchella*); en la clase *Mammalia* se detectaron murciélagos del género *Myotis*, *Homo sapiens*, delfín moteado *Stenella attenuata*; en muy bajos números de ASV (<10), la clase *Malacostraca*, *Asteroidea*, *Aves*, entre otras.

El conjunto de datos final, constituido por 1,294 ASV asignados al phylum *Chordata*, 1,275 fueron asignados satisfactoriamente a la clase *Actinopteri* (peces óseos) y 19 ASV a la clase *Chondrichthyes* (rayas y tiburones), o sea, de un total de 1676 ASV, el 77.2% logró retención de taxones de interés. El conjunto de datos final de ASV es aquel con la taxones de interés; su asignación taxonómica se comprobó con una segunda asignación taxonómica mediante BLASTn; se curó mediante LCA (*Lowest Common Ancestor*), se revisaron manualmente los taxones y se eliminaron ASV que no lograron ser asignadas al nivel de phylum (n = 4).

El gen 12S ARNr y su amplificación mediante el cebador universal MiFish-U lograron asignar todos los ASV a niveles de phylum y clase. Tomando como referencia 1,294 como el número

total de ASV, la mayoría de estos alcanzó una asignación a nivel de orden (95.2%) y familia (94.1%). Un menor número de ASV pudo ser asignado a nivel de género (73.2%) y especie (27.8%). Por tanto, según el tipo de análisis realizado, se emplearon los niveles taxonómicos de orden o familia.

Por otro lado, se logró detectar un total de 144 géneros distribuidos en 74 familias, que a su vez están contenidas en 38 órdenes. Sin embargo, debido a las limitaciones en la resolución taxonómica, solo el 52.77% (n=76) de estos géneros lograron asignaciones a nivel de especie, logrando detectar un total de 96 especies. De los géneros detectados, 134 géneros representan la clase *Actinopteri* y solo 10 a la clase *Chondrichthyes*.

Entre las familias de peces óseos con mayor número de ASV (entre 60 y 160 ASV) se destacan *Labridae* (Peces Lábridos), *Pomacentridae* (Damiselas), *Muraenidae* (Morenas), *Haemulidae* (Roncadores) y *Serranidae* (Serranos). Se observó un alto número de taxones únicos (un solo ASV) y dobletes (no más de dos ASV). A nivel de familia, se identificaron 18 taxones únicos (*singletones*) por ejemplo las familias: *Albulidae* (Macabies), *Synodontidae* (Peces garrobos), *Dussumieriidae* (Sardinetas). También 7 dobletes (*doubletones*) como las familias *Lobotidae* (Berrugates), *Chanidae* (Sabalote), *Antennariidae* (Peces Ranisapos).

La asignación taxonómica se complementó con un árbol filogenético de máxima verosimilitud (*Maximum Likelihood*) construido a partir de las secuencias del gen 12S, con el objetivo de visualizar que las asignaciones taxonómicas de los ASV fueran coherentes con la filogenia resultante, además de dar un vistazo a la composición de especies detectadas en todos los ASV. Las familias se representaron con un color distintivo en la leyenda, y aquellas con mayor número de ASV fueron etiquetadas directamente en el árbol. Los nodos se encuentran identificados con la asignación taxonómica más alta obtenida para cada ASV (**Figura 8**).

El árbol mostró una topología consistente, con la secuencia del delfín *Stenella attenuata* utilizada como grupo externo (*outgroup*), posicionada de forma distante respecto al conjunto de las secuencias de interés. Se observaron dos clados principales bien definidos: el primero incluye todos los ASV asignados a la clase *Chondrichthyes* (rango ASV1221–ASV199, que agrupa géneros como *Narcine* e *Hypanus*), y el segundo comprende el resto de las secuencias

pertenecientes a la clase *Actinopteri*. En general, las familias se agruparon en clados monofiléticos y bien sustentados, especialmente aquellas con mayor abundancia de ASV, como familias *Labridae* (Peces Lábridos), *Pomacentridae* (Damiselas), *Muraenidae* (Morenas), *Haemulidae* (Roncadores) y *Serranidae* (Serranidos). Con algunas, excepciones, como la familia *Pomacentridae* que se observó una separación de dos clados muy distantes entre los géneros *Azurina* y *Abudefduf*, reflejando una divergencia filogenética dentro del grupo. El árbol también permitió identificar familias con posibles relaciones filogenéticas estrechas a taxones que no pudieron ser identificados, como la familia *Gerreidae*, que se ubicó próxima a varios ASV con asignaciones limitadas hasta nivel de phylum, así como casos aislados, menos frecuencias en las familias *Chaenopsidae* (Trambollines) y *Serranidae*. En conjunto, la topología del árbol refuerza la coherencia de las asignaciones taxonómicas y proporciona una visión integrada de la diversidad filogenética detectada mediante el análisis de ADN ambiental.

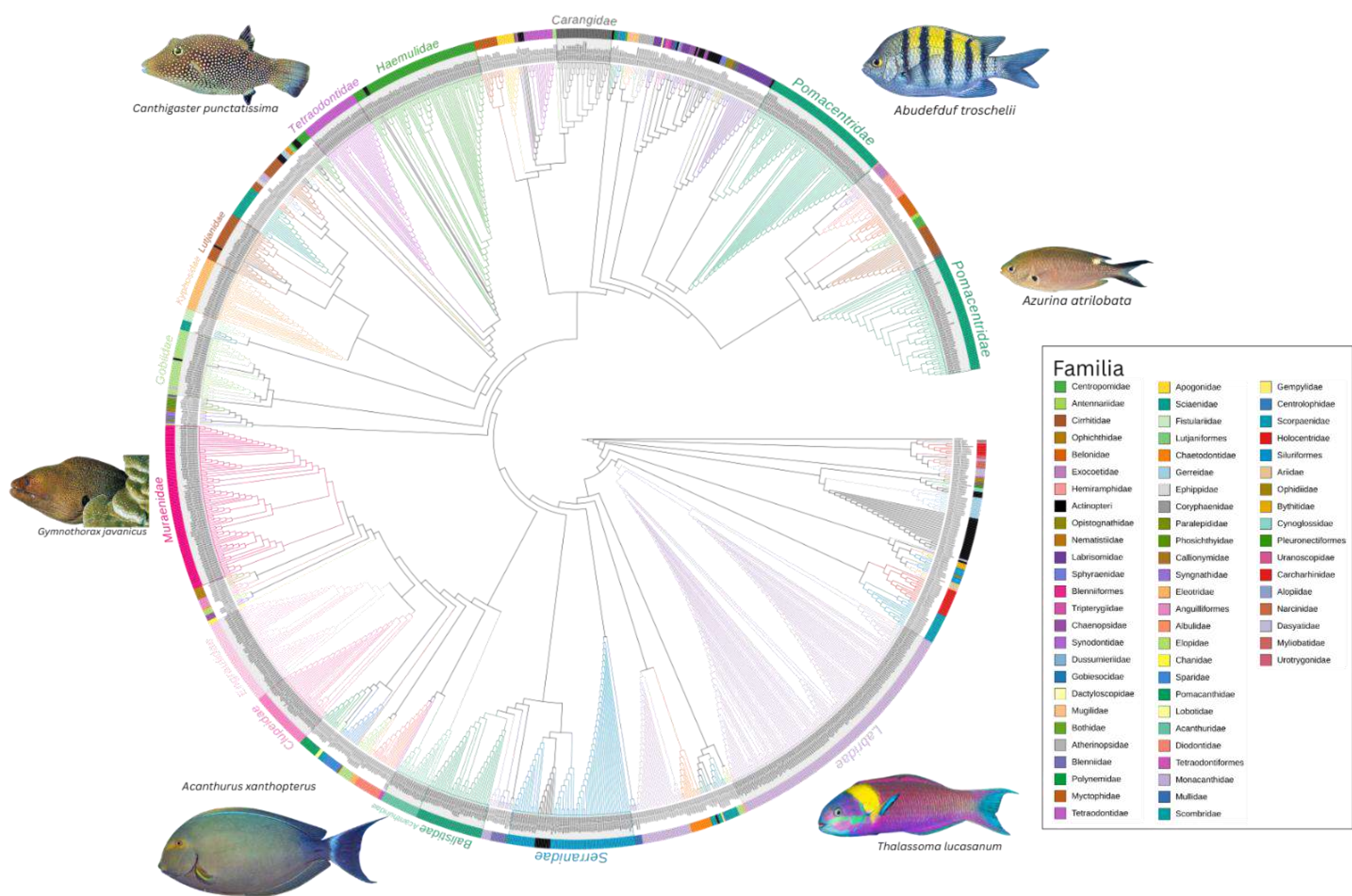


Figura 8. Árbol filogenético de ASV: visualización general de la diversidad genética de ASV detectados a nivel taxonómico de familia mediante árbol filogenético de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood).

Pregunta 2: Variación espaciotemporal de ASV

3. Composición de la abundancia relativa de ASV

El análisis de las comunidades de peces a partir del Metabarcoding del ADN ambiental (eDNA) se basa en la interpretación de las variantes de secuencia de amplicones (ASV). Los recuentos de lecturas generados para cada ASV por muestra no son medidas directas de la abundancia absoluta de organismos individuales, pero sí representan una estimación de la abundancia relativa de las especies presentes (Deagle et al., 2019; Muri et al., 2020).

En cambio, estos datos son intrínsecamente composicionales, lo que significa que los recuentos de lecturas para cada ASV representan una proporción del total de lecturas de secuenciación obtenidas para esa muestra (Gloor et al., 2017). Esta restricción composicional surge porque el número total de lecturas es un artefacto del propio proceso de secuenciación, no un parámetro biológico (Deagle et al., 2019; Gloor et al., 2017). Reconociendo esto, todos los análisis posteriores de la abundancia de ASV se presentan como abundancias relativas (la proporción de un ASV en relación con el total de lecturas en una muestra) para explorar la estructura y la dinámica de la comunidad, principalmente a nivel taxonómico de orden.

El análisis de la abundancia relativa de ASV reveló variaciones en la composición de órdenes de peces detectados, tanto a nivel espacial como temporal. Al comparar ambas localidades de muestreo, los gráficos de barras descriptivos indicaron distintos perfiles de abundancia relativa de ASV a nivel de orden. Considerando el total de lecturas por ASV global, el Parque Nacional Coiba se caracterizó por una abundancia relativa de ASV de algunos taxones dominantes, de mayor a menor porcentaje, órdenes: *Perciformes* (27.09%) , *Labriformes* (19.88%), *Tetraodontiformes* (15.29%), *Lutjaniformes* (9.20%), *Acanthuriformes* (4.47%), y *Blenniiformes* (4.36%) (**Figura 9**). De forma similar, el Archipiélago de Las Perlas posee taxones dominantes similares a Coiba, aunque con algunas diferencias. Los órdenes más dominantes, de mayor a menor porcentaje, fueron *Labriformes* (32.31%), *Perciformes* (17.48%), *Tetraodontiformes* (9.91%) y *Lutjaniformes* (8.27%). Otra diferencia notable fue el gran número de órdenes con bajo porcentaje de abundancia relativa de ASV (aprox. en un rango

de 5% a 25%) presentes en Coiba. En Las Perlas, por el contrario, los pocos taxones dominantes representaron un alto porcentaje del total de órdenes detectados (**Figura 10**).

Los factores temporales de estaciones secas y lluviasas influenciaron la abundancia relativa de ASV. Considerando la abundancia relativa por muestra, en el Parque Nacional Coiba, la abundancia relativa de ASV de sus órdenes más abundantes varió. El orden *Tetraodontiformes* presentó un aumento por muestra del año 2022 al 2023, mientras que los órdenes *Labriformes* y *Blenniiformes* presentaron un efecto inverso. Por otro lado, el orden *Lutjaniforme* se encontró en mayor número de muestras y porcentaje durante la estación seca de ambos años. Adicionalmente, los peces del orden *Myctophiformes* son detectados con mayor frecuencia, aunque con baja abundancia relativa, durante la estación seca que en la lluviosa (**Figura 22**). El resto de los órdenes no presenta un patrón claro asociado a la estación o al año (**Fig. 9**).

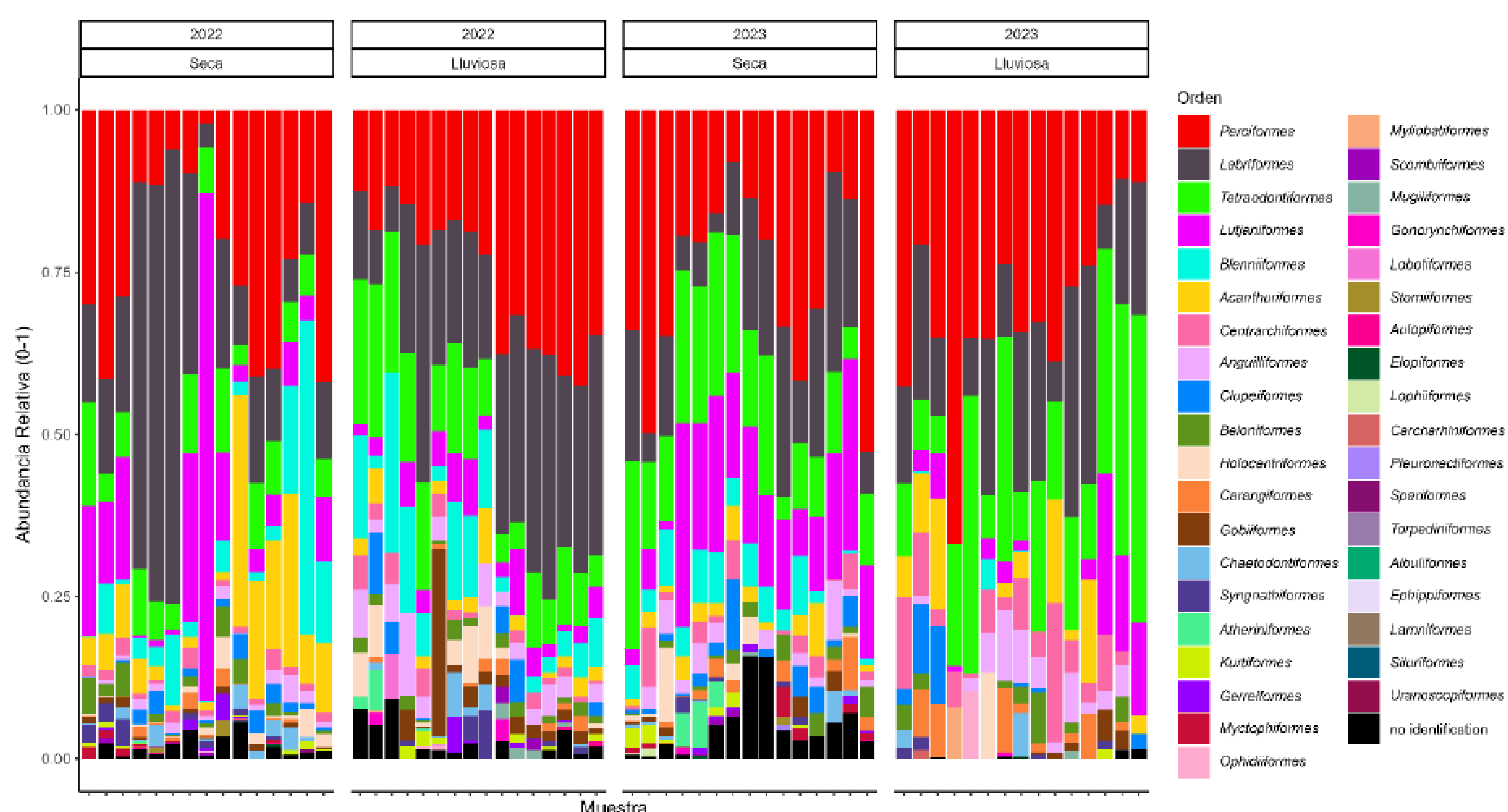


Figura 9. Parque Nacional Coiba. Perfiles de cambios espaciotemporales de composición de la abundancia relativa de ASV asignados a nivel taxonómico de orden de peces de arrecifes coralinos

Por otro lado, en el Archipiélago de Las Perlas, el orden *Perciformes* (uno de sus órdenes con mayor porcentaje de abundancia relativa de ASV por muestra) representó alrededor del 50% en las muestras de 2022, pero disminuyó a casi el 25% en 2023 (Figura 10). El orden *Tetraodontiformes* presentó un efecto opuesto: aumentó su abundancia relativa en el año 2023, en comparación con el 2022, en mayor grado durante la estación lluviosa de 2023. Otros órdenes se observaron en estaciones específicas con alta abundancia relativa, por ejemplo, *Clupeiformes* durante la estación seca de 2022 y la estación lluviosa de 2023; y *Acanthuriformes* durante la estación seca de 2023. En el resto de los órdenes no se observó un patrón notable asociado a la estación, a excepción de algunos órdenes con muy baja abundancia relativa de ASV durante la estación seca de ambos años, como los órdenes *Atheriniformes* y *Ophidiiformes* (**Figura 10**).

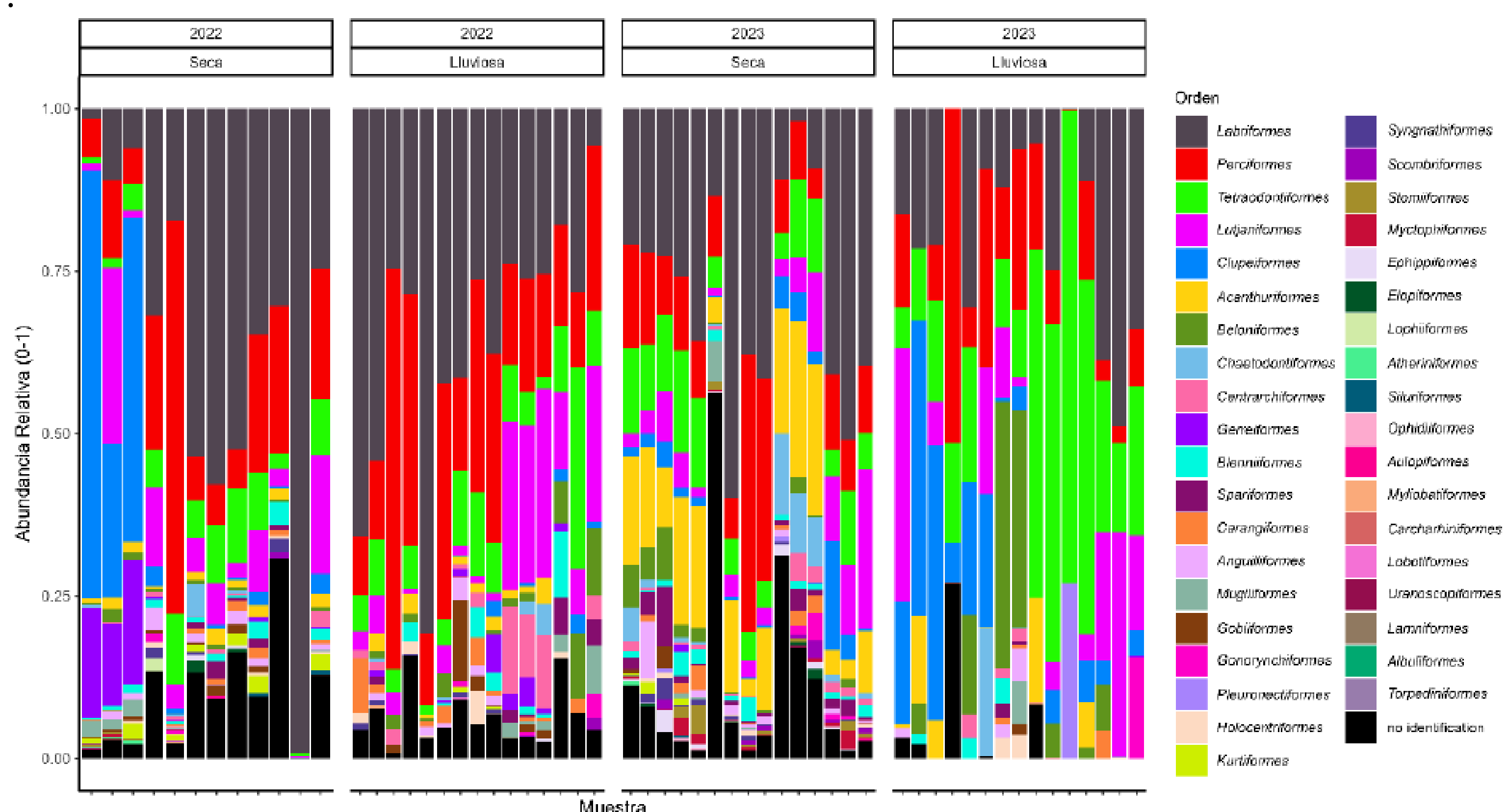


Figura 10. Archipiélago de Las Perlas. Perfiles de cambios espaciotemporales de composición de la abundancia relativa de ASV asignados a nivel taxonómico de orden de peces de arrecifes coralinos.

4.Diversidad Alfa

4.1.2. Distribución de datos y pruebas de supuestos de la riqueza observada de ASV

Para determinar la viabilidad de aplicar una prueba paramétrica de Análisis de Varianza (ANOVA) en las comparaciones de la riqueza observada, se evaluaron los supuestos de normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Prueba de Levene) . En estas pruebas estadísticas, la métrica de decisión es el valor de p , en el que un rango esperado de $p \geq 0.05$ para el cumplimiento de los supuestos (Zar, 2014). En la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, un valor p superior a 0.05 indica que los datos no difieren de una distribución simétrica normal (curva de Gauss), mientras que un valor inferior señala que los datos presentan asimetría (Shapiro & Wilk, 1965). Por su parte, en la prueba de Levene, un valor $p > 0.05$ confirma el supuesto de homocedasticidad, lo que significa que la dispersión de los datos (la varianza) es estadísticamente equivalente entre los distintos grupos evaluados (Levene, 1960).

Se evaluó la normalidad (Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de varianza (Levene) para los recuentos de variantes de secuencia de amplicones (ASV) para cada uno de los cuatro grupos de estudio. Al analizar los recuentos de variantes de secuencias de amplicones (ASV), los resultados de la prueba de Shapiro-Wilk determinaron que los datos de Perlas-2022 (Shapiro $p = 0.096$), Coiba-2022 (Shapiro $p = 0.243$) y Coiba-2023 (Shapiro $p = 0.421$) se ajustaron a una distribución normal. Sin embargo, los perfiles de riqueza del grupo Perlas-2023 obtuvieron un valor inferior al mínimo requerido (Shapiro $p=0.017$). Al no cumplir con este supuesto, se concluyó que los datos de Perlas-2023 presentan una distribución asimétrica. En contraste, respecto a la prueba de Levene, el p valor fue consistentemente superior a 0.05 (**S1- Tabla 4**). Consecuentemente, debido al incumplimiento de la normalidad en el grupo Perlas-2023, la metodología exige descartar el ANOVA y aplicar pruebas no paramétricas, como la prueba de Kruskal-Wallis, para garantizar la robustez de las comparaciones estacionales.

4.2.2. Comparación estadística de la riqueza de ASV

En Coiba-2022, el ANOVA demostró una diferencia significativa entre la estación seca ($M = 55.1$) albergando una media (abreviada M) de ASV superior a la estación lluviosa ($M = 43.1$)

($F(1, 29) = 9.85, p = 0.0039$). Por otro lado, el grupo Coiba-2023 mostró una diferencia significativa en la riqueza de ASV entre la estación seca ($M = 48.7$) y la lluviosa ($M = 39.1$) ($F(1, 28) = 5.34, p = 0.028$) (**Tabla 6**).

En los resultados del ANOVA para Perlas-2022 se observó una diferencia estadísticamente significativa en la riqueza media de ASV entre la estación seca ($M = 52.6$) y la estación lluviosa ($M = 41.3$) ($F(1, 25) = 7.10, p = 0.013$). Por otro lado, Perlas-2023 no cumplió con los supuestos de normalidad de Shapiro-Wilk; se realizó la prueba de Kruskal-Wallis. Esta reveló una diferencia altamente significativa en la riqueza de ASV entre estaciones [$\chi^2(1) = 21.803, p < 0.001$]. Esta diferencia fue impulsada por un número drásticamente mayor de ASV detectados en la estación seca ($M = 58.7$) en comparación con la lluviosa ($M = 20.5$) (**Figura 11****Error! Reference source not found., Tabla 6**).

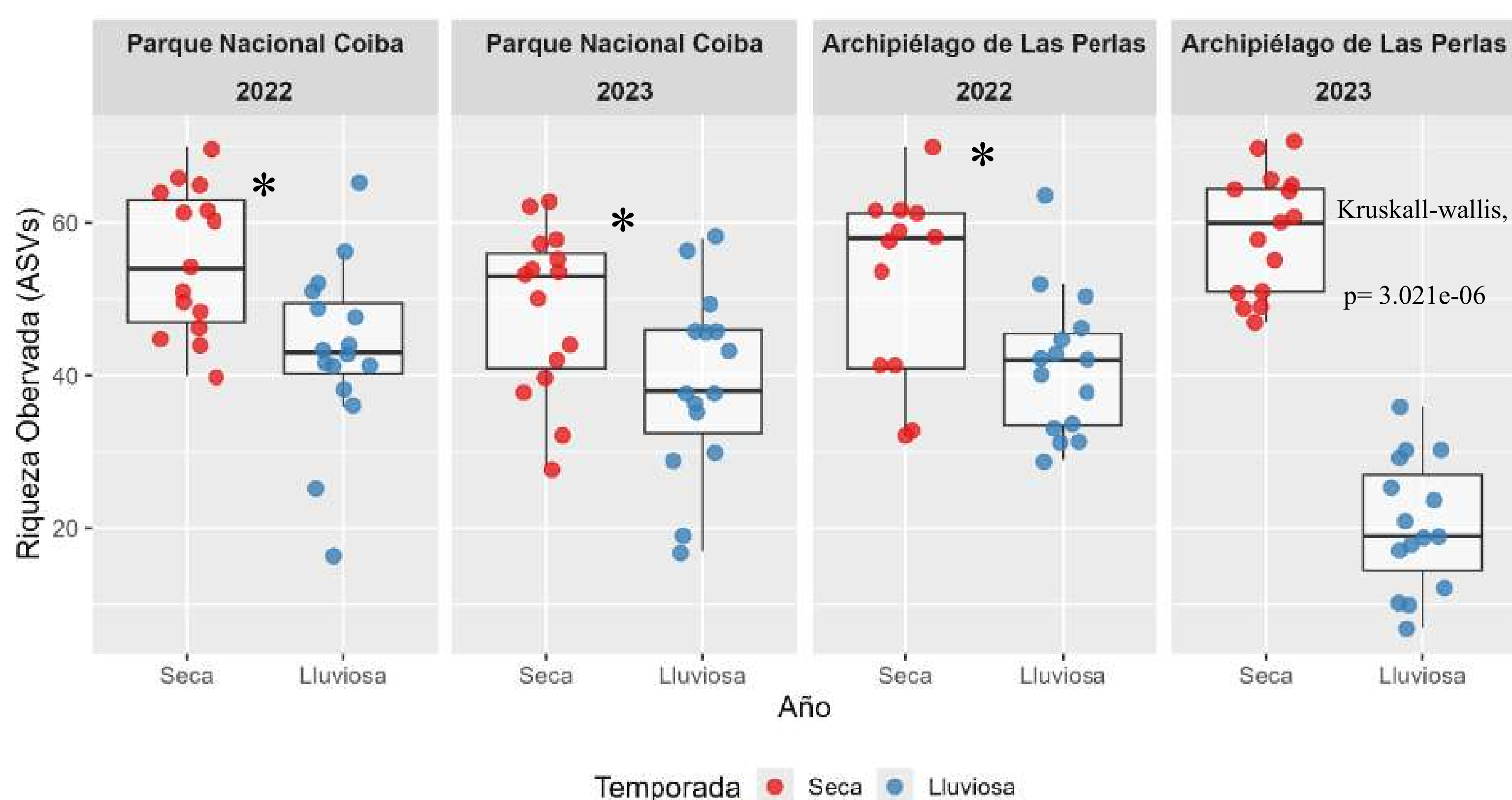


Figura 11. Diversidad alfa: Riqueza observada ($q=0$) de ASV(** : $p < 0.01$).

4.2.3. Estimador de Chao1

De forma complementaria, se calcularon los valores del índice de Chao1. Estos valores se derivaron directamente de los datos crudos de presencia/ausencia (P/A) de ASV, sin estandarización en función de la profundidad de lectura. El índice Chao1 es un estimador no paramétrico del número de especies no observadas en una muestra. Estima la riqueza total de especies basándose en el número de especies que aparecen solo una vez (especies únicas o *singletons*) y dos veces (especies dobles o *doubletons*) en la muestra (Chao, 1984).

Los resultados descriptivos indican una alta variabilidad y una tendencia consistente en los cuatro grupos de estudio: la media estimada de Chao1 fue siempre mayor en la estación "Seca" que en la "Lluviosa" (**Figura 12**). Las estimaciones de riqueza más extremas se observaron en Perlas-2023, que mostró tanto el valor medio más bajo (Lluviosa, $M = 253.8 \pm 186.3$) como el más alto (Seca, $M = 1783.9 \pm 472.7$). Los grupos de 2022 mostraron una tendencia similar, con Perlas-2022 Seca ($M = 1480.8 \pm 627.7$) y Coiba-2022 Seca ($M = 1585.5 \pm 526.8$) presentando valores más altos que sus contrapartes de la estación lluviosa. El grupo Coiba-2023 también siguió este patrón, aunque con una magnitud de diferencia menor (Seca $M = 1262.5$ vs. Lluviosa $M = 849.5$). Estos valores de Chao1 han demostrado depender en gran medida del número de secuencias raras o "singletons".

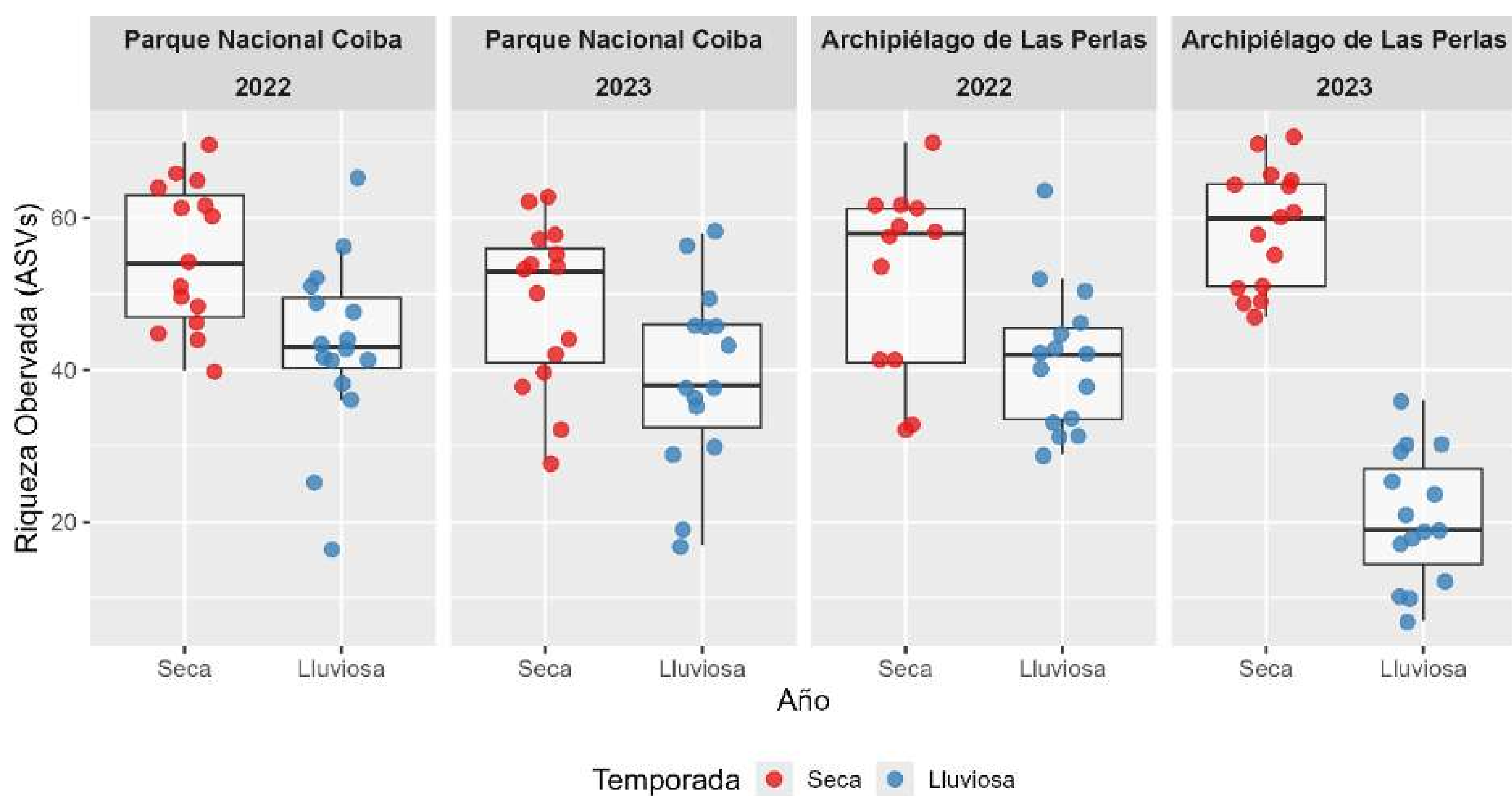


Figura 12. Diversidad alfa. Índice de Chao1 de ASV estandarizado a presencia y ausencia

5. Estructura Comunitaria de Variantes de Secuencia de Amplicón (ASV)

La estructura de la comunidad de peces de arrecifes se evaluó mediante un enfoque multivariado dual a partir de las Variantes de Secuencia de Amplicón (ASV) en que se emplearon dos métodos: (1) la distancia de Bray-Curtis sobre datos de abundancia relativa de ASV transformados por Hellinger (Legendre & Gallagher, 2001) y (2) la distancia de Jaccard sobre datos de composición (presencia/ausencia) de ASV. Utilizando, NMDS con distancias de Bray-Curtis y Jaccard a nivel de localidad y temporal (año-estación) y Bray-Curtis para estructura de ASV a nivel temporal (seca vs lluviosa) de cada localidad.

El Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) es una técnica de ordenación que representa las muestras en un espacio de pocas dimensiones basándose en el rango de sus disimilitudes (Kruskal & Shepard, 1974). El valor de estrés mide qué tan bien la configuración de baja dimensión representa las distancias ecológicas originales. Si su valor está por debajo de 0.2 indican un ajuste bueno o robusto, mientras que valores por debajo de 0.1 se consideran excelentes (Clarke, 1993). Mientras que el PERMANOVA analizó las diferencias en varianzas entre los grupos de datos, expresadas aquí mediante el valor p (significancia estadística de Pseudo-F) y el coeficiente de determinación que indica la variación explicada.

5.1. Estructura Comunitaria Espacial General (Localidad)

Al analizar el factor espacial "Localidad" el Parque Nacional Coiba versus Archipiélago de las Perlas. Se encontraron diferencias estadísticas en los ensamblajes de ASV de peces, utilizados como proxy de la estructura comunitaria. El modelo basado en la abundancia de ASV con matriz de distancia de Bray-Curtis proporcionó una ordenación NMDS fiable (Estrés = 0.142; **Figura 13 A**). Recordando que este valor de estrés por debajo de 0.2 indica que la representación bidimensional captura fielmente las distancias entre las matrices de abundancias de amplicones entre las localidades (Clarke, 1993). La distinción entre los ensamblajes de ASV de las diferentes localidades fue estadísticamente validada por PERMANOVA ($p = 0.001$). El factor "Localidad" fue responsable del 5.8% de la varianza en la abundancia relativa de ASV ($R^2 = 0.058$).

Al cambiar al enfoque composicional de ASV con matriz de distancia de Jaccard, la ordenación NMDS mantuvo una buena representación de la disimilitud (Estrés = 0.166; **Figura 13 B**). Aunque ligeramente superior, este valor de Estrés sigue considerándose un ajuste robusto. La significancia estadística de la separación espacial fue nuevamente confirmada ($p = 0.001$). Sin embargo, la magnitud del efecto para la composición espacial fue marcadamente inferior. El factor "Localidad" explicó solo el 2.9% de la varianza en la presencia/ausencia de ASV ($R^2 = 0.029$).

5.2. Estructura Comunitaria Temporal General (Estación–Año)

La estructura temporal "Estación–Año", los datos agrupados por Estación (Seca/Lluviosa) con respectivo año (2022/2023) Seca-2022, mostraron ensamblajes de ASV de peces con diferencias claras.

El NMDS de abundancia relativa de ASV con distancia de Bray-Curtis mostró un ajuste confiable (Estrés = 0.142; **Figura 13 C**), idéntico al observado en el análisis espacial. La prueba PERMANOVA confirmó una disimilitud significativa ($p = 0.001$). El factor temporal explicó el 5.8% de la varianza ($R^2 = 0.058$), replicando exactamente la magnitud de efecto observada para el factor "Localidad" en esta misma métrica.

El enfoque composicional (distancia de Jaccard) generó una ordenación igualmente robusta (Estrés = 0.165; **Figura 13 D**) y también resultó estadísticamente significativo (PERMANOVA: $p = 0.001$). En este caso, el modelo composicional explicó un porcentaje mayor de la varianza ($R^2 = 0.077$) que el modelo de abundancia de ASV. Esta magnitud de efecto (7.7%) fue la más alta registrada en los análisis a gran escala, superando en 1.9 puntos porcentuales al modelo de abundancia temporal.

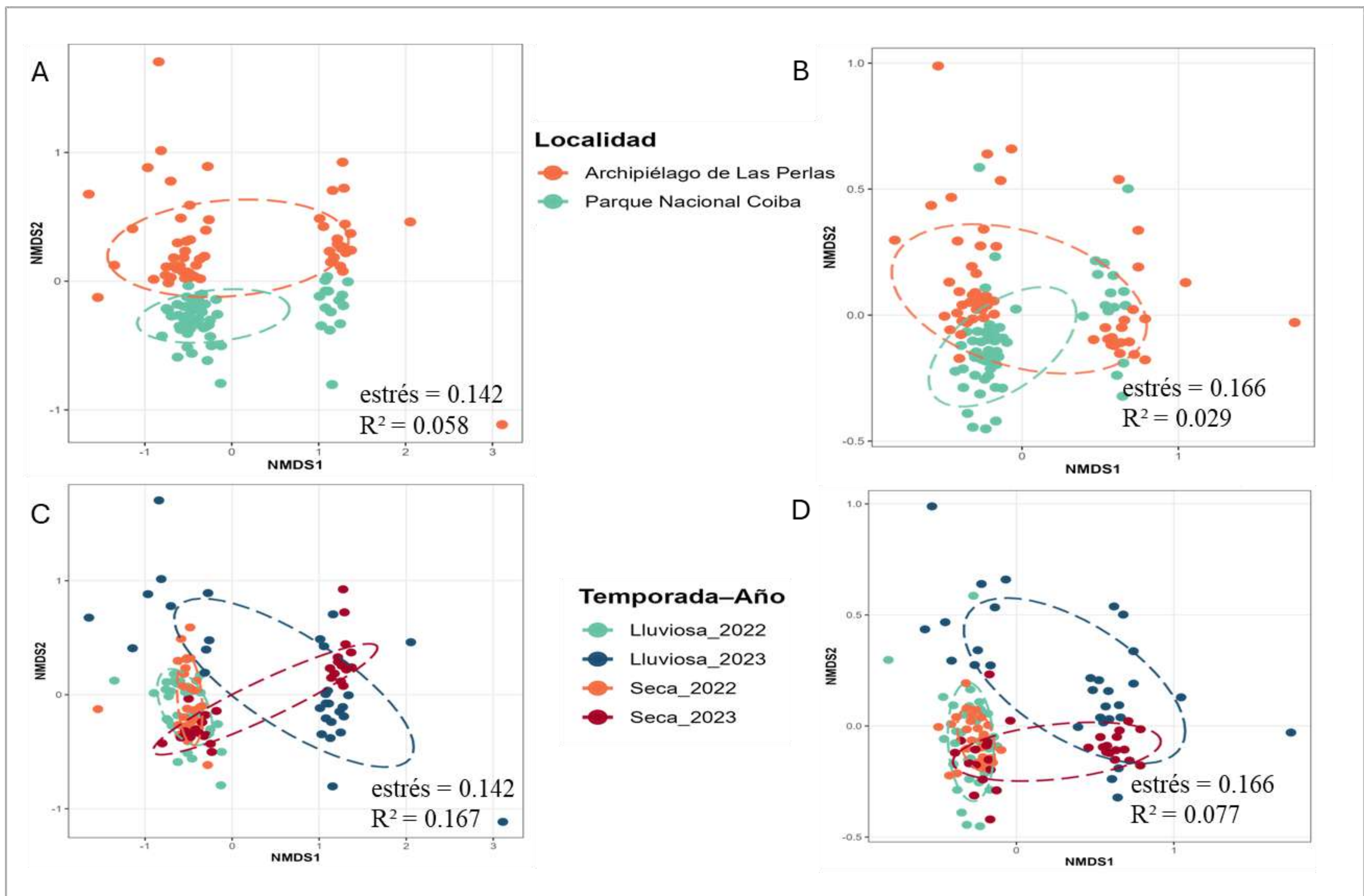


Figura 13. NMDS de la estructura comunitaria general espacial y temporal de variantes de secuencias de amplicones (ASV). **A.** NMDS-Bray-Curtis con datos transformados a Hellinger a nivel de localidad **B.** NMDS-Jaccard con datos de presencia y ausencia a nivel de localidad. **C.** NMDS-Bray-Curtis con datos transformados a Hellinger a nivel de Temporada-Año. **D.** NMDS-Jaccard con datos presencia y ausencia a nivel de Temporada-Año

5.3. Estructura Comunitaria Temporal del Parque Nacional Coiba

P.N. Coiba también presentó una significativa variabilidad estacional interanual en la abundancia de ASV. Durante el 2022 la separación estacional entre seca y lluviosa fue estadísticamente válida (PERMANOVA: $R^2 = 0.081$, $p = 0.001$). Sin embargo, el ajuste de la ordenación NMDS fue solo moderado (Estrés = 0.215; **Figura 14 A**). Este valor, que excede ligeramente el umbral de 0.2, sugiere que la visualización 2D debe interpretarse con cierta cautela. El tamaño del efecto (8.1%) fue el más bajo de los cuatro análisis locales.

En contraste, Coiba 2023 mostró la separación estacional más pronunciada de todo el estudio. La ordenación tuvo un ajuste excelente (Estrés = 0.079, **Figura 14 B**) indicando una

representación visual de muy alta confianza. La prueba PERMANOVA arrojó un valor R^2 excepcionalmente alto ($R^2 = 0.354$, $p = 0.001$). El factor "Estación" explicó el 35.4% de la varianza, una magnitud de efecto más de cuatro veces superior a la observada en Coiba 2022.

5.4. Estructura Comunitaria Temporal del Archipiélago de Las Perlas

El análisis de la abundancia relativa de ASV estandarizadas mediante transformación de Hellinger dentro de Las Perlas (usando la distancia de Bray-Curtis) reveló un patrón estacional (seca vs. lluviosa) estadísticamente significativo en ambos años, aunque con magnitudes de efecto distintas.

La ordenación NMDS de Perlas 2022 mostró un buen ajuste (Estrés = 0.184, **Figura 14 C**). Este valor, cercano al límite de 0.2 pero aún considerado aceptable, representa adecuadamente la separación estacional. El análisis PERMANOVA confirmó esta disimilitud ($R^2 = 0.106$, $p = 0.001$), indicando que el factor "Estación" explicó el 10.6% de la varianza en la abundancia de ASV. Por otro lado, en Las Perlas 2023, la señal estacional fue considerablemente más fuerte. El NMDS presentó un ajuste excelente (Estrés = 0.084, **Figura 14 D**). Este valor, al estar por debajo del umbral de 0.1, indica una alta fidelidad en la representación gráfica de las distancias comunitarias. La PERMANOVA confirmó una separación muy robusta ($R^2 = 0.243$, $p = 0.001$). La magnitud del efecto (24.3%) fue más del doble de la observada en 2022, indicando un cambio estacional mucho más pronunciado en la estructura de abundancia de ASV de este año.

Los resultados de PERMANOVA indican colectivamente que las variaciones estacionales en la abundancia de ASV de peces son una característica recurrente, aunque la magnitud de este cambio varió considerablemente entre sitios y años.

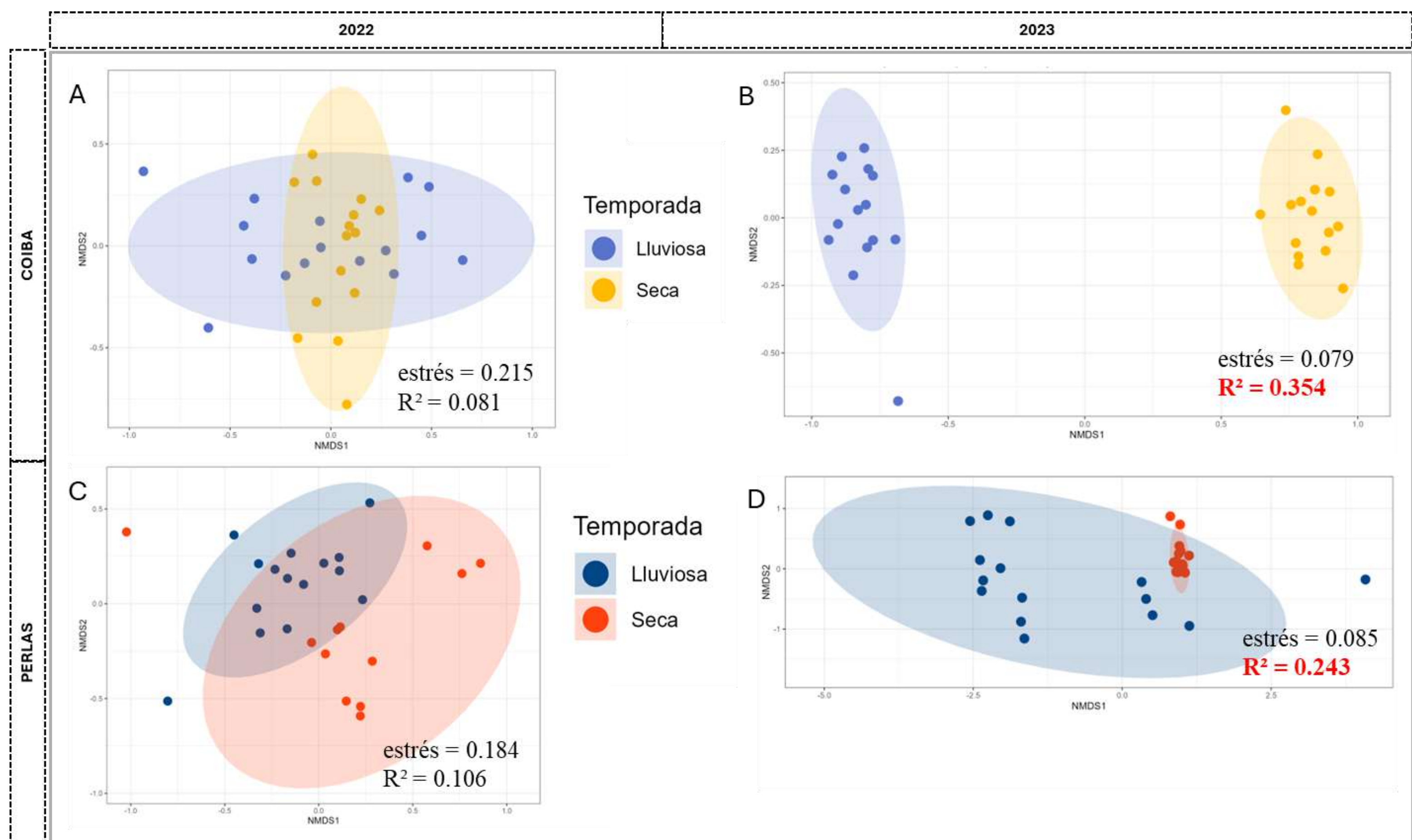


Figura 14. NMDS Bray-Curtis comparando estructura comunitaria de abundancia de ASV entre estación seca y estación lluviosa. **A.** Parque Nacional Coiba - año 2022, **B.** Parque Nacional Coiba - año 2023, **C.** Archipiélago de las Perlas - año 2022, **D.** Archipiélago de las Perlas - año 2023.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

La evaluación de la diversidad biológica marina en sistemas tropicales dinámicos requiere metodologías capaces de capturar las especies presentes, así como los cambios en la diversidad y la composición de las comunidades ante cambios drásticos o recurrentes, a lo largo de períodos extensos de monitoreo y en amplias escalas territoriales del ecosistema.

El estudio presente aplicó Metabarcoding de ADN ambiental del gen mitocondrial 12S rRNA para determinar un perfil molecular de alta resolución de la ictiofauna de los arrecifes de coral del Pacífico Oriental de Panamá. La caracterización de un total de 1,294 Variantes de Secuencias de Amplicones (ASV) nos permitió abordar cuatro objetivos específicos: 1) determinar la asignación taxonómica y filogenética de los clase *Actinopteri* y *Chondrichthyes*, 2) comparar los perfiles de abundancia relativa, 3) comparar la diversidad alfa y 4) evaluar diferencias en la estructura comunitaria de estos ASV en el Parque Nacional Coiba y Zona Especial de Manejo del Archipiélago de Las Perlas durante dos años continuos en la estación seca y la estación lluviosa. Siguiendo, abordaremos (1) la eficacia del marcador y cebador para asignar los taxones de peces, además de la capacidad de la técnica de detectar una composición de peces reportada en la región del POT de Panamá; (2) posibles factores bióticos y abióticos que explican los patrones espaciotemporales de los amplicones de peces detectados mediante Metabarcoding de ADN ambiental, (3) interpretación de la ecología del ADN ambiental, y (4) limitaciones metodológicas e implicaciones finales.

1. Resolución y composición taxonómica de amplicones del gen 12S ARNr

1.1. Eficacia el cebador MiFish-U y marcador 12S ARNr mitocondrial

La amplificación del marcador molecular 12S ARNr mitocondrial mediante el cebador universal mitocondrial MiFish-U demostró la capacidad de retener taxones de peces y asignar la unidad taxonómica con alta resolución. Primero, pudimos retener una librería final con un 88.2% de las

lecturas crudas iniciales luego de los análisis bioinformáticos DADA2 y remoción de controles y secuencias contaminantes (**Figura 5**). Segundo, de un total inicial de 1676 ASV, un 77.2% se logró asignar a las clases de interés Actinopteri y Chondrichthyes (**Figura 8**). Tercero, si bien se obtuvo un alto porcentaje de asignaciones de ASV a nivel de familia (94.1%) y género (73.2%), la asignación a nivel de especie (27.8%) reflejó las limitaciones actuales de las bases de datos de referencia para el Océano Pacífico Oriental (PTO). Por último, la asignación taxonómica de estos ASV a distintas resoluciones permitió detectar un total de 144 géneros distribuidos en 74 familias, que a su vez están contenidas en 38 órdenes de peces óseos y cartilaginosos. Pero solo 76 de estos géneros lograron asignaciones a nivel de especie, un total de 96 especies. A continuación, comparamos nuestra resolución taxonómica con otros estudios de Metabarcoding de ADN ambiental regionales y locales.

En el contexto de estudios de ADN ambiental a nivel regional en el Pacífico Oriental Tropical, nuestros resultados son consistentes con la capacidad de recuperación de clases de vertebrados reportada por He (2023). Quienes también emplearon Metabarcoding de ADN ambiental con cebadores MiFish-U para amplificar el gen 12S rRNA en 22 muestras de la Zona Clarion-Clipperton y retuvieron una proporción de 62.8% de 2,406,141 lecturas crudas mediante el flujo bioinformático de DADA2. Estas lecturas fueron asignadas a 35 órdenes, 64 familias y 87 géneros de las clases *Chondrichthyes* y *Actinopteri* (He et al., 2023). Sin embargo, nuestra resolución taxonómica presenta matices importantes al compararla con estudios sobre peces de arrecifes rocosos en el Golfo de California. Valdivia-Carrillo et al. (2021) analizaron 26 muestras de ADN ambiental amplificando un fragmento del gen 12S con el cebador Teleo (Valentini et al., 2016); con los cuales detectaron 5,429,682 lecturas crudas y retuvieron un 53.4 % de las lecturas mediante análisis bioinformáticos distintos como *Obitools v1.2.11*. Dichas lecturas resultaron en 542 OTUs, se identificaron 119 OTUs únicos de Actinopterygi, pero de estos OTUs solo 64 representaron especies (resolución a nivel de especie del ~11,8% respecto al total de OTUs iniciales, pero 53% al considerar los OTUs asignados a peces), mientras que 57 OTUs quedaron asignados a niveles taxonómicos superiores a familia, abarcando en total 44 géneros, 26 familias y 7 órdenes (Valdivia-Carrillo et al., 2021).

Estudios previos de ADN ambiental en Panamá son escasos y no completamente comparables con el nuestro; por tanto, a nivel geográfico de Panamá, este estudio se posiciona como uno de los primeros en realizar monitoreo de la diversidad y composición de peces de arrecifes de corales en el Pacífico de Panamá mediante ADN ambiental como parte del programa *Rorh Reef Resilience Program* de STRI. Entre aquellos estudios de ADN ambiental en Panamá, se han empleado otros marcadores moleculares del marcador citocromo c oxidasa I (COI) para caracterizar diversidad marina de peces e invertebrados en distintos ecosistemas marinos costeros en Bocas del Toro (Nguyen et al., 2020), mientras que otro estudio complementó Metabarcoding de ADN ambiental con pesca con redes de enmalle para revelar la potencial de invasiones de peces interoceanicos a través del Canal de Panamá (Schreiber et al., 2023). Nguyen et al., (2020) Reportó para el Caribe (134 muestras) que al utilizar cebadores COI generales para metazoos, las lecturas de peces óseos representaron una mediana del 0.07% del total de lecturas por muestra, asignándose el 99.5% a invertebrados y no metazoos. Adicionalmente, la resolución taxonómica de nuestro estudio (27.8% a nivel de especie con 12S) se compara con los resultados en el Canal de Panamá (168 muestras), quienes utilizando el marcador COI detectaron 37 taxones en la sección de agua dulce mediante ADN ambiental, de los cuales 5 (13.5%) permanecieron a nivel de género, y señalaron 17 detecciones marinas adicionales solo a nivel de género debido a la limitación del marcador para diferenciar especies congéneres entre el Pacífico y el Atlántico (Schreiber et al., 2023).

En conjunto, nuestros datos validan la eficacia del Metabarcoding de ADN ambiental con el marcador 12S para detectar peces de las clases *Actinopteri* y *Chondrichthyes* con una alta resolución taxonómica, comparable con estudios similares del POT; sin embargo, resaltamos que las diferencias en retención de lecturas y porcentajes de asignación taxonómica pueden deberse al uso de análisis bioinformáticos distintos para asignar OTUs/ASV e implementación de bases de datos de referencia locales, entre otros. La aplicación de ADN ambiental empleada reflejó también resultados similares a estudios en ecosistemas acuáticos en Panamá, al detectar también especies crípticas; además, los amplicones de 12S por MiFish-U demostraron mayor especificidad para peces en comparación con el uso de los marcadores como COI en otros estudios locales (Nguyen et al., 2020; Schreiber et al., 2023).

1.2. Composición taxonómica de peces recuperada por Metabarcoding de ADN ambiental

En el Pacífico Oriental Tropical (POT), de 111 especies de *Chondrichthyes* y 1,193 especies de *Actinopterygios* de peces conocidas, solo unas 353 de ellas ocurren de forma exclusiva en arrecifes de coral (AC) o rocosos (AR)(Cortés et al., 2017). Dada la escasez y el tamaño reducido de los arrecifes de coral en la región, la mayor parte de esta ictiofauna, 238 especies, se encuentra únicamente en arrecifes rocosos; de las restantes 115 especies ocurren en ambos tipos de arrecife (mixtos), y solo otras pocas (6 especies) están asociadas exclusivamente a los corales (Cortés et al., 2017; Glynn, Manzello, et al., 2017; Robertson & Allen, 2024).

El análisis de eDNA presentado aquí detectó 96 especies mientras que los estudios históricos de censos visuales submarinos (UVC) documentaban típicamente una riqueza que oscilaba entre las 79 especies en el Archipiélago de Las Perlas (Benfield et al., 2008) y las 88 especies en Bahía Honda, Golfo de Chiriquí (Dominici-Arosemena & Wolff, 2006). Cabe destacar que estas especies asignadas representan poco menos del 30% del total de variantes de secuencia de amplicones (ASV). En los estudios de eDNA, un ASV representa una variante específica de secuencia de ADN y se entiende como una unidad taxonómica operativa molecular o MOTU por sus siglas en inglés (Fasolo et al., 2024), no necesariamente como una especie biológica en el sentido morfológico tradicional. Sin embargo, al considerar nuestro número total de géneros (144) o incluso las especies detectadas (96) como unidad de comparación frente a los taxones reportados históricamente para el Pacífico Oriental Tropical (POT) de Panamá, el inventario molecular generado mediante ADN ambiental superó y complementó sustancialmente la riqueza de especies alcanzada por los métodos tradicionales.

En el POT, 38 familias de peces se han reportado según su presencia en "arrecifes de coral y rocosos (ACR, 28 familias) " o "solo arrecifes rocosos (AR, 10 familias)" conforme a la definición de Glynn et al. (2017). De estas familias, 3 de ellas asociadas a AR, no habían sido reportadas para POT de Panamá: *Aplodactylidae*, *Myrocongridae*, *Oplegnathidae* (Robertson & Allen, 2024). De las 74 familias detectadas mediante ADN ambiental, 25 se consideran asociadas a ARC, recuperando el 89% de los taxones reportados. Mientras que 4 familias eran exclusivas de arrecifes rocosos, las 45 familias restantes estaban asociadas a arrecifes de forma

no exclusiva, a fondos marinos fangosos, a pelágicos y a mesopelágicos. Por último, las familias asociadas a AR no detectadas en este estudio fueron 5: *Aulostomidae*, *Carapidae*, *Ostraciidae*, *Priacanthidae* y *Zanclidae*.

Finalmente, al comparar nuestros hallazgos con estudios regionales en el Golfo de California, Validivia-Carrillo (2021) Informó de manera similar que el Metabarcoding de eDNA capturó una mayor diversidad de familias arrecifales, principalmente con un mayor número de OTUs, las familias *Labridae* y *Pomacentridae*, además de taxones pelágicos (p.ej., *Scombridae*) y demersales (aquellos que viven cerca del fondo marino) no observados en los censos visuales. Sin embargo, existe una divergencia notable en cuanto a la diversidad críptica: mientras que en dicho estudio los ensayos de eDNA no lograron detectar familias como *Muraenidae*, *Labrisomidae* y *Chaenopsidae* registrándolas únicamente mediante métodos visuales, nuestro estudio recuperó con éxito estas familias a nivel molecular. Este contraste sugiere diferencias notables en la composición de especies en el contexto de cada estudio o diferencias en los protocolos de muestreo o amplificación que permitieron detectar aquellos linajes bentónicos crípticos que, a menudo, pasan desapercibidos en puntos críticos de biodiversidad marina similares.

2. Efectos de las variaciones espaciotemporales sobre variantes de amplicones

El estudio evaluó las variaciones en la estructura comunitaria de los peces arrecifales mediante el análisis de las variaciones espaciotemporales de los amplicones del gen 12S ARNr en cuatro conjuntos de muestras agrupadas por localidad y año. Grupos (n=30): Coiba-2022, Coiba-2023, Perlas-2022 y Perlas-2023. Evaluamos las diferencias entre estaciones en: 1) cambios en la abundancia relativa de la composición taxonómica de ASV (**Figura 9-Figura 10** , 2) diversidad alfa de ASV (**Figura 11-Figura 12**) y 3) estructura comunitaria de ASV mediante distancias Bray-Curtis y Jaccard (**Figura 13-Figura 14**).

Nuestra hipótesis consideró al Parque Nacional Coiba como una región estable, con poca o ninguna variación temporal tanto en la riqueza observada como en la estructura comunitaria.

Por otro lado, esperábamos que el Archipiélago de las Perlas, debido a la influencia del afloramiento estacional, reportara una riqueza observada de ASV consistentemente menor y una variación considerable tanto en la riqueza como en la estructura comunitaria entre estaciones. Por último, se esperaba que la composición fuese distinta entre localidades y que todos estos patrones fueran constantes en los dos años. Sin embargo, el análisis estadístico de los cuatro grupos reveló patrones que difieren parcialmente de nuestras predicciones. La riqueza observada de ASV mostró diferencias significativas entre estaciones seca y lluviosa en todos los grupos de muestreo, es decir, difiere de nuestra predicción al observarse también en Coiba (Figura 11. Diversidad alfa: riqueza observada ($q=0$) de ASV (** : $p < 0.01$). **Tabla 6**).

2.1. Variación en la estructura comunitaria de ASV entre estación seca y lluviosa.

La evaluación del efecto de la estación seca y la lluviosa sobre la estructura comunitaria de abundancias de ASV por localidad indicó diferencias significativas. Contrario a la hipótesis de estabilidad, Coiba experimentó una reestructuración comunitaria más notable durante el año 2023 ($R^2 = 0.35$), y un efecto significativo aunque mucho menor en el 2022 ($R^2 = 0.081$), incluso un NMDS con estrés ligeramente por encima del umbral de 0.2 (**Figura 14 C-D**). Mientras tanto, en el Archipiélago de Las Perlas se observó el patrón esperado, con diferencias en la estructura respecto a las estaciones seca y lluviosa, pero, similar a Coiba, ese efecto fue más notable en el año 2023 ($R^2 = 0.243$) en comparación con 2022 ($R^2 = 0.10$), con un efecto ligeramente mayor (2%) (**Figura 14 A-B**). De esta forma, estos datos preliminares evidencian que hay factores que influenciaron las estructuras comunitarias locales y la diversidad alfa de amplicones detectados durante la estación seca. Este estudio evaluó las variaciones de los ASV detectados mediante ADN ambiental versus variables categóricas como la localidad y temporales como la estación y el año; por lo tanto, no podemos proponer otros factores físicos como la temperatura o bióticos como el aumento de la producción primaria como la causa de estas observaciones, ni corroboración estadística. Por lo tanto, a continuación discutimos posibles factores que posiblemente explican las variaciones de ADN ambiental de peces detectados, proponemos la evaluación de estos factores o fenómenos a futuro para expandir el análisis de estos resultados preliminares.

La topografía del istmo en gran medida dicta directamente los entornos marinos oceánicos del Pacífico oriental tropical (O'Dea et al., 2012, 2025). Los vientos alisios del norte, durante la estación seca en los meses enero-abril, en el Golfo de Panamá (GOP) impulsan un fuerte afloramiento costero (D'Croz & O'Dea, 2007; Ordóñez-Zúñiga et al., 2021). Este afloramiento implica reducciones rápidas y extremas de la temperatura superficial del mar y aumentos en la abundancia de plancton fotosintético, que luego forma la base de ecosistemas altamente productivos (D'Croz & O'Dea, 2009). El rango fisiológico de tolerancia a la temperatura de los peces puede variar considerablemente entre especies, y algunos permanecen y otros abandonan un área durante los eventos de afloramiento (Anderson, 2017; Peck et al., 2013; Sato et al., 2018). Por ejemplo, se ha observado que varias especies de peces se desplazan hacia aguas más cálidas en zonas costeras durante el afloramiento (Sato et al., 2018). Por tanto, el incremento en riqueza observada o el cambio en la composición de la estructura de ASV podría explicarse por los cambios en la cadena trófica por afloramiento que reorganizan las comunidades de peces al generar densas biomasas de plancton y favorecer a las especies tolerantes a estas condiciones ricas en nutrientes (Angeles-Gonzalez et al., 2024; Eisele et al., 2021; Spring & Williams, 2023).

Nuestros hallazgos en el Archipiélago de Las Perlas coinciden con estudios realizados en otras regiones con afloramiento mediante ADN ambiental. De hecho, un vistazo a los datos preliminares de temperatura, no incluidos en este estudio, muestra una disminución de al menos 10 °C durante la estación seca en Isla Contadora, Archipiélago de las Perlas (**Figura 23 A**). Estudios en el mar Báltico corroboran que bajas temperaturas provocan cambios en la estructura de la comunidad íctica, implicando el predominio de especies marinas específicas (Dabuleviciene et al., 2023). Similarmente, durante el afloramiento de verano en Chile se reportan variaciones en la comunidad de peces en el afloramiento de zonas mesofóticas, aquellas zonas oceánicas en las profundidades poco iluminadas, desde aproximadamente 30-40 m hasta 150 m (Bongaerts, 2022; Saenz-Agudelo et al., 2024). En el Pacífico Norte de Costa Rica, al comparar otros métodos como BRUVS (Baited Remote Underwater Video Station) versus UVC (Underwater Visual Census), también detectaron una mayor diversidad de peces y cambios significativos en su composición asociados al afloramiento y a los hábitats de arrecifes rocosos (Eisele et al., 2021). Otro aspecto para considerar es la posible detección de estadios larvales de

peces en nuestros resultados, por ejemplo, en Isla Gorgona, Colombia, la mayoría de las especies larvarias de peces presentes en el arrecife de coral se correlacionaron directamente con la biomasa del zooplancton durante eventos de afloramiento (Gallego-Zerrato et al., 2025).

En contraste, el Golfo de Chiriquí se caracteriza históricamente por condiciones más cálidas y estables debido al bloqueo orográfico de los vientos alisios (Crawford et al., 2023; Randall et al., 2020). Sin embargo, en el Parque Nacional Coiba se observó un incremento en la diversidad alfa de 10 AVS del gen 12S ARNr durante la estación seca con respecto a la lluviosa en ambos años (**Tabla 6**. Supuestos de normalidad y análisis de ANOVA de riqueza de ASV, así como posibles patrones de detección de los *Lutjaniformes* dominantes durante ambas estaciones secas (**Figura 9**). Respecto a la estructura comunitaria de ASV, las mayores diferencias en la abundancia de ASV se observan en 2023 respecto a 2022, aunque son estadísticamente significativas en ambos años. Proponemos que estos resultados preliminares están asociados a cambios estacionales localizados de parámetros fisicoquímicos, así como a la reproducción estacional de algunas especies de peces que el ADN ambiental puede detectar.

Por ejemplo, entre aquellos factores que proponemos evaluar en futuros estudios, están los cambios en la temperatura superficial (SST) y concentración de clorofila A (Chl-a); esta última se reportaron en mayo 2007 y junio 2008 inusuales altas concentraciones en el Golfo de Chiriquí (Crawford et al., 2023). En el Parque Nacional Coiba se ha reportado cambios en la termoclina que conduce a bolsas efímeras de agua profunda a de bajas temperatura y rica en nutrientes (D’Croz & O’Dea, 2007).

Por último, en los meses de febrero, marzo y abril de 2012 se reportaron por primera vez agregaciones de desove para los pargos seda (*Lutjanus peru*) y pargo de la mancha (*L. guttatus*) en el Parque Nacional Coiba (Ángel et al., 2015). Dichas agregaciones de desove ocurren a profundidades someras (12-16 m). Además, la conducta de *L. peru* involucra agregaciones masivas de 500-600 individuos, menor que la de *L. guttatus*, de 50-100 individuos (Ángel et al., 2015). Estos eventos podrían estar asociados a la detección de un patrón de abundancia relativa de ASV de *Lutjanus* durante la temporada seca de ambos años en el Parque Nacional Coiba (Ángel et al., 2015). Además, el monitoreo entre los años 2020 al 2025 confirmó las

agregaciones de desove durante la estación seca de otras especies como *Lutjanus colorado*, *Lutjanus aratus*, *C. sexfasciatus*, *Cephalopholis colonus* y *Thalassoma lucasanum* (Robles P. et al., 2026). Por consiguiente, estas agregaciones estacionales también pueden influir en la detección de ciertas especies mediante el Metabarcoding de ADN ambiental, no solo de *Lutjanus* sino de otros géneros como *Thalassoma* cuyos ASV detectados fueron abundantes.

2.2. Variación en la estructura de ASV entre año 2022 y 2023

La estructura comunitaria por localidad resultó significativa tanto en la abundancia (Bray-Curtis, $R^2 = 0.058$) como en la composición (presencia/ausencia de ASV, Jaccard, $R^2 = 0.029$) (**Figura 13 A-B**). De forma similar, la estructura comunitaria de ASV por Estación-Año mostró un efecto más fuerte en la composición de ASV (presencia/ausencia, Jaccard, $R^2 = 0.077$) respecto a la estructura comunitaria por abundancia de ASV ($R^2 = 0.058$), lo que sugiere una ligera reestructuración (un efecto 2% mayor) en la composición de especies al comparar la interacción Estación-Año (**Figura 13 C-D**). Además, al evaluar los NMDS con distancias de Jaccard, con datos de presencia y ausencia de ASV, a nivel de localidad (**Figura 13A**) y Estación-Año (**Figura 13C**), se evidencia un agrupamiento de la mayoría de las muestras en dos grupos que no se explican por estación seca o lluviosa, sino quizás por diferencias en el año de muestreo.

Nuestra recolecta de ADN ambiental de la estación lluviosa de 2023, entre los meses de agosto y septiembre, coincidió con anomalías de temperatura reportadas en otras regiones del POT. Por ejemplo, la zona arrecifal de Huatulco del Golfo de Tehuantepec en el Pacífico sur de México reportó temperatura superficial moderada entre febrero y abril de 2023 (0,2–0,48 °C), pero un incremento más drástico a partir de junio de 2023 con temperaturas anormalmente altas (>31 °C) (López-Pérez et al., 2024). Los datos preliminares de temperatura del proyecto de *Rohr Reef Resilience*, de forma general para una estación de cada localidad, muestran temperatura estable en el Archipiélago de las Perlas (Isla Contadora), mientras que en el Parque Nacional Coiba (Islas Uvas) muestran variaciones mensuales, llegando a incrementarse en el mes de junio a 31 °C más constantemente (**Figura 23**). Por lo que sugerimos que la temporada lluviosa de 2023

coincide con la ocurrencia repentina y esporádica de las anómalas condiciones asociadas a la fase cálida conocida como El Niño o El Niño-Oscilación del Sur (ENSO).

Las condiciones de ENSO pudieron influir en la estructura comunitaria de ASV del año 2023, distinta de la de 2022, en la que la abundancia de ASV es distinta entre las estaciones seca y lluviosa de 2023. Esto es también consistente con los cambios en la composición de peces en arrecifes con y sin afloramiento mediante censos visuales reportados en el Golfo de Papagay, Costa Rica, durante El Niño 2023-2024. Lo cual caracterizó la disminución de un grupo funcional de peces que se alimenta de invertebrados; esto se debe a que, a medida que el arrecife sufre blanqueamiento, pierde gradualmente la diversidad de fauna asociada al coral vivo, que sirve como fuente de alimento para otros organismos, incluidos los peces. (Alvarado et al., 2025). Además, el incremento drástico y prolongado de la temperatura superficial del mar durante ENSO tiene consecuencias inmediatas para las comunidades arrecifales, como la reducción a largo plazo de la cobertura coralina, eliminando hábitat esencial para peces arrecifales y retrasando la recuperación (Glynn, Manzello, et al., 2017). En las poblaciones de peces, este estrés altera su fisiología (Alfonso et al., 2021), e impulsa cambios de comportamiento, como el desplazamiento horizontal hacia la franja costera o la migración vertical, ya que las especies buscan hábitats térmicos óptimos bajo la Zona Mínima de Oxígeno (ZMO) (Alfonso et al., 2021).

La reestructuración de la abundancia de amplicones en el 2023, más marcada en Coiba que en Las Perlas, refleja posiblemente la vulnerabilidad diferencial que confieren sus condiciones de afloramiento. Las temperaturas de la superficie del mar en el Pacífico Tropical Oriental han aumentado significativamente en los últimos ~150 años, aunque existe una considerable heterogeneidad espacial en las tasas de cambio (Smale et al., 2019). Esto es crucial porque, a medida que el clima se calienta, se ha reportado que el Golfo de Chiriquí experimenta un aumento de sus máximos térmicos anuales un 25 % más rápido que en el Golfo de Panamá, lo que exacerba la variabilidad interanual (Randall et al., 2020; Rodríguez-Ruano). El Archipiélago de las Perlas (Golfo de Panamá) podría estar siendo protegido de altas temperaturas por una amortiguación térmica debido al fuerte afloramiento estacional que incurre en corrientes de aguas profundas frías, mientras que Coiba (Golfo de Chiriquí) es un sistema de

surgencia débil debido al bloqueo orográfico (D’Croz y O’Dea, 2007). Por ejemplo, posteriormente, en el Niño de 2015-2016 y 2018, se detectó, mediante datos de fotocuadrantes, el blanqueamiento de coral en el Golfo de Chiriquí, pero no en el Golfo de Panamá (Randall et al., 2020).

Consecuentemente, las diferencias estacionales (seca/lluviosa) y anuales (2022/2023) de la estructura comunitaria de ASV del gen 12S detectadas mediante ADN ambiental en el Archipiélago de las Perlas y Parque Nacional Coiba pueden estar asociadas a cambios en el comportamiento de especies de peces, así como a condiciones abióticas que pudieron modificar la actividad biológica de las comunidades de arrecifes e influir en la detectabilidad y la ocupación de las especies recuperadas a partir del ADN ambiental (Barnes et al., 2021; Klymus et al., 2015).

3.Ecología del ADN Ambiental

Las variaciones en diversidad alfa y la estructura comunitaria entre las estaciones de ambas localidad deben contemplar que la interpretación de la diversidad biológica a través del ADN ambiental (eDNA) requiere considerar que la detección de una especie no depende únicamente de su presencia física, sino de una compleja interacción entre la biología y ecología del organismo, la disponibilidad de material genético en la columna de agua (persistencia y transporte) y los sesgos metodológicos inherentes al marcador molecular , cebadores , métodos de colectas y procesamiento de datos (Barnes & Turner, 2016). Aquí discutimos brevemente la posible interpretación, las limitaciones y las fortalezas de los resultados de ADN ambiental desde su concepto teórico.

3.1. Factores bióticos

La detección de ciertas especies en nuestro estudio se puede dar por factores como la biomasa (tamaño), densidad (número de individuos), distribución, reproducción y migración, entre otros (Rourke et al., 2022). Datos experimentales confirman que la tasa de liberación de ADN en peces marinos aumenta significativamente con la biomasa total de peces, lo cual se observó en estudios con especies como el jurel japonés (*Trachurus japonicus*) (Jo et al., 2019). Sin embargo,

la tasa de liberación y la degradación de ADN son específicas del taxón estudiado (Andruszkiewicz Allan et al., 2021; Sassoubre et al., 2016). Por ejemplo, en 4 especies de peces marinos (sardina, caballa, anchoa), utilizando qPCR Taqman, las tasas de desprendimiento de ADN resultaron específicas para cada especie, variando entre 165 y 3368 pg de ADN por hora por gramo de biomasa, a lo que el autor atribuyó a diferencias entre las especies en la producción de escamas y mucosa (Sassoubre et al., 2016).

Los estadios juveniles suelen presentar una tasa de liberación de ADN más alta que la de los adultos, un fenómeno probablemente relacionado con la reducción ontogenética de la actividad metabólica en peces más grandes (Maruyama et al., 2014). Además, la liberación de ADN se correlaciona positivamente con la actividad física o el movimiento, lo que sugiere que especies con mayor actividad en los arrecifes pueden conducir a señales de ADN más altas (Thalinger et al., 2021). También la actividad alimentaria puede elevar las tasas de liberación de ADN hasta diez veces, lo que subraya que las células intestinales y las heces liberadas son fuentes importantes de ADN ambiental (Klymus et al., 2015).

3.2. Factores abióticos y su influencia en la producción y detección de ADN ambiental

La temperatura determina significativamente la persistencia del ADN ambiental (McCartin et al., 2022; Caza-Allard et al., 2022). Primero, al aumentar la temperatura se ha registrado un aumento en la tasa de desprendimiento de ADN debido a una mayor actividad metabólica de los peces (Jo et al., 2019). Sin embargo, se acelera las tasas de degradación del ADN, principalmente debido a una mayor hidrólisis enzimática impulsada por microbios (Barnes et al., 2014; Tsuji et al., 2017). Datos experimentales muestran que el ADN ambiental marino persiste durante más de dos semanas a temperaturas más frías (≤ 10 °C), pero generalmente se degrada en una semana o menos a temperaturas más cálidas (≥ 20 °C) (McCartin et al., 2022). La salinidad suele promover la estabilidad del ADN en comparación con el agua dulce, aunque el pH y la salinidad suelen ejercer una influencia mínima en la descomposición directamente en comparación con la actividad microbiana (Collins et al., 2018; Salter, 2018; Seymour et al., 2018).

En el contexto del afloramiento estacional, esto presenta una paradoja: las aguas ricas en nutrientes son característicamente frías, lo que teóricamente podría suprimir las tasas de

desprendimiento individuales en comparación con las aguas superficiales más cálidas y estratificadas. Por lo que quizás aquellas especies específicas al afloramiento, por su actividad y alimentaria presentan una señal notable en el Archipiélago de Las Perlas (Klymus et al., 2015; Thalinger et al., 2021). De hecho, la proporción y cantidad de publicaciones que se especializan en comprender la ecología del ADN ambiental son bajas (Blackman et al., 2024). Por tanto, consideramos que existen oportunidades para comprender cómo sistemas de afloramientos pueden cambiar la persistencia del ADN ambiental en función de la biología de las especies, al igual que eventos de altas temperaturas extremas como el fenómeno del Niño.

Los factores enunciados anteriormente reflejan la complejidad de detectar una especie en ecosistemas marinos (Sassoubre et al., 2016). Además, quizás uno de los retos actuales en ecología molecular es poder establecer una aproximación completamente fiable de la biomasa de peces mediante las copias de ADN ambiental. Similar a los estudios mencionados anteriormente, la aplicación de técnicas de PCR como ddPCR o qPCR, a diferencia del 2-step PCR de este estudio, cuantifica con mayor precisión la concentración de ADN ambiental en condiciones experimentales, pero obtiene resultados muy variados que dependen también de los taxones dominantes presentes (Skelton et al., 2023) o del tamaño del fragmento amplificado (Jo & Yamanaka, 2022). Por tanto, la reconfiguración de abundancia de ASV observada en el Parque Nacional Coiba y el Archipiélago de las Perlas es un proxy, no estrictamente un incremento real en el número de peces, y por lo general su mejor interpretación, a pesar de esfuerzos anteriores, puede ser presencia/ausencia no cuantitativa (Andruszkiewicz et al., 2017; Klymus et al., 2015). En este sentido, el ADN ambiental captó una aproximación a los cambios en la estructura comunitaria mediante abundancia (Bray-Curtis) de ASV, y de forma general también captó diferencias composicionales (Jaccard) de ASV para localidad y muestras agrupadas por año y estación, y observa cómo unas especies sí están presentes o ausentes en distintas estaciones

4. Limitaciones

En nuestro estudio, además de las limitaciones asociadas a la producción y persistencia del ADN en el medio acuoso marino, hay otras relacionadas a la resolución taxonómica en a nivel de

especie. Principalmente, porque los fragmentos del gen 12S amplificados con el cebador universal MiFish no son lo suficientemente largos para discriminar entre especies evolutivamente cercanas (Yamamoto et al. 2017; Zhang, Zhao, and Yao 2020; Beatty et al. 2023).

Sin embargo, el uso del gen 12S con cebador MiFish-U mostró eficacia para recuperar el mayor número de familias reportadas para esta región del Pacífico Tropical de Panamá, esto debido a su corto fragmento (<200 pb) que permite amplificar ADN de muestras ambientales que a menudo contienen trazas altamente degradado (Bylemans et al., 2018; Freeland, 2017). En especial, la detección de especies raras o asociadas a una estación específica se debe al uso de variantes de secuencias de amplicones en lugar de OTUs. Este último, conlleva varios sesgos desventajosos engañosos, incluido el riesgo de pasar por alto taxones nuevos que aún no están referenciados en las bases de datos (Fasolo et al., 2024).(Callahan et al., 2017a).

Además, también encontramos limitaciones por baja cobertura de varios géneros y asignaciones taxonómicas desactualizadas, como fue el caso del género *Atrilobata*, en lugar de *Azurina*; o la asignación errónea de los peces loros dentro de la familia *Labridae*, en lugar de *Scaridae*. Esto está vinculado en gran medida de la integridad y precisión de las bases de datos de referencia pertinentes (Zhang et al., 2020). De hecho, solo un 25% de las especies de peces marinos y agua dulce registradas en el Pacífico Oriental Tropical han sido secuenciadas para el marcador 12S y cebador MiFish U, según la aplicación a base de datos de GAPeDNA, la cual evalúa y mapea las brechas globales de especies en bases de datos genéticas (Marques et al., 2021). Por tanto, la combinación de bases de referencias de secuencias de acceso libre y bases locales son relevante, al poder incrementar al menos un 12% la asignación a nivel de género y especie y también localizar niveles de divergencia intra e interespecífica de las especies locales (Valdivia-Carrillo et al., 2021). En Panamá, hay recientes esfuerzos para mejorar las bases de referencias de fauna acuática presente principalmente en el Canal de Panamá, incluyendo los marcadores COI, 12S y 16S, incluyendo algunas especies marinas (Saltonstall et al., 2025). Superar esta limitación es imperativo para transitar de inventarios moleculares exploratorios a un biomonitoreo de alta precisión, permitiendo así el desarrollo de políticas de conservación

basadas en datos genómicos escalables, no invasivos y sensibles a los cambios ambientales globales (Miya, 2022; Hassan et al., 2024).

También, la estructura comunitaria de ASV detectada en base a las disimilitudes de Bray-Curtis como la detección de especies raras pueden ser influenciadas diferencias en la profundidad de secuenciación por muestra (Edgar & Flyvbjerg, 2015; Hsieh et al., 2016). Por tanto, se propone explorar a futura estandarización de la data amplicones en base a la profundidad de secuenciación y evaluar su efecto en índices de diversidad como Chao1 y la estructura de abundancias (Chao, 1984; Deng et al., 2024; Hsieh et al., 2016).

CONCLUSIONES

Este estudio presenta una de las primeras aplicaciones del Metabarcoding de ADN ambiental en arrecifes coralinos en el Pacífico Oriental Tropical de Panamá

Entre los hallazgos destacan los siguientes:

- La asignación taxonómica de 1,294 ASV detectados reveló una composición taxonómica de 96 especies distribuidas en 144 géneros, dichos géneros contenidos en 74 familias coherentes y acordes con los taxones reportados anteriormente para la región.
- Los perfiles de abundancia relativa describieron que sí existen cambios en la composición de ASV para cada localidad y estación.
- La diversidad alfa de ASV fue distinta entre estaciones. Siendo mayor durante la estación seca. Cambios oceanográficos como el afloramiento estacional en el Golfo de Panamá pueden estar relacionados a estas observaciones.
- Detectamos cambios en la estructura comunitaria a nivel de ASV en ecosistemas marinos, asociados posiblemente a variaciones físicas drásticas como el afloramiento estacional en el Archipiélago de Las Perlas y a efectos de eventos climáticos globales como El Niño 2023.

La aplicación de esta técnica molecular se valida como una herramienta robusta para el monitoreo de la ictiofauna arrecifal, permitiendo análisis de alta resolución a través de escalas espaciotemporales complejas en Panamá. En un contexto de pérdida de biodiversidad, esta metodología es clave para comprender la resiliencia de las comunidades ante cambios ambientales, aportando información esencial para la conservación de los amenazados ecosistemas de arrecife coralino del Pacífico Oriental de Panamá.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander, M. A., Seo, H., Xie, S. P., & Scott, J. D. (2012). *ENSO's Impact on the Gap Wind Regions of the Eastern Tropical Pacific Ocean*. <https://doi.org/10.1175/JCLI-D-11-00320.1>
- Alfonso, S., Gesto, M., & Sadoul, B. (2021). Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. *Journal of Fish Biology*, 98(6), 1496–1508. <https://doi.org/10.1111/jfb.14599>
- Altermatt, F., Couton, M., Carraro, L., Keck, F., Lawson-Handley, L., Leese, F., Zhang, X., Zhang, Y., & Blackman, R. C. (2025). Utilizing aquatic environmental DNA to address global biodiversity targets. *Nature Reviews Biodiversity*, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s44358-025-00044-x>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alvarado, J. J., Quesada-Perez, F., Solano, M. J., Calvo-Fong, M., & Mena, S. (2025). Impact of the 2023–2024 ENSO Event of the North Pacific Coral Reefs of Costa Rica. *Diversity*, 17(11), 791. <https://doi.org/10.3390/d17110791>
- Amador, J. (1998). A climatic feature of the tropical Americas: The trade wind easterly jet. *Top. Meteor. Oceanogr.*, 5, 91–102.
- Andersen, K., Bird, K. L., Rasmussen, M., Haile, J., Breuning-Madsen, H., Kjær, K. H., Orlando, L., Gilbert, M. T. P., & Willerslev, E. (2012). Meta-barcoding of ‘dirt’ DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology*, 21(8), 1966–1979. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05261.x>
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32–46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>

- Anderson, M. J. (2017). Permutational Multivariate Analysis of Variance (PERMANOVA). En *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (pp. 1–15). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat07841>
- Andruszkiewicz Allan, E., Zhang, W. G., C. Lavery, A., & F. Govindarajan, A. (2021). Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes. *Environmental DNA*, 3(2), 492–514. <https://doi.org/10.1002/edn3.141>
- Andruszkiewicz, E. A., Sassoubre, L. M., & Boehm, A. B. (2017). Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight. *PLOS ONE*, 12(9), e0185043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185043>
- Ángel, J., Vega, A., Mate, J., & Robles, Y. (2015). Primer Reporte de Agregaciones de Desove para los Pargos Seda (*Lutjanus peru*) (Nicholson y Murphy, 1992) y Mancha (*L. guttatus*) (Steindachner, 1869) en el Parque Nacional Coiba, Pacífico de Panamá. *Proceedings of the 68th Gulf and Caribbean Fisheries Institute*, 68, 112–117.
- Bakker, J. D. (2025). *Applied Multivariate Statistics in R*. University of Washington. <https://uw.pressbooks.pub/appliedmultivariatestatistics/>
- Barnes, M. A., Chadderton, W. L., Jerde, C. L., Mahon, A. R., Turner, C. R., & Lodge, D. M. (2021). Environmental conditions influence eDNA particle size distribution in aquatic systems. *Environmental DNA*, 3(3), 643–653. <https://doi.org/10.1002/edn3.160>
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Baselga, A. (2012). The relationship between species replacement, dissimilarity derived from nestedness, and nestedness. *Global Ecology and Biogeography*, 21(12), 1223–1232. <https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2011.00756.x>
- Beentjes, K. K., Speksnijder, A. G. C. L., Schilthuizen, M., Hoogeveen, M., Pastoor, R., & Hoorn, B. B. van der. (2019). Increased performance of DNA Metabarcoding of macroinvertebrates by taxonomic sorting. *PLOS ONE*, 14(12), e0226527. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226527>

- Benfield, S., Baxter, L., Guzman, H. M., & Mair, J. M. (2008). A comparison of coral reef and coral community fish assemblages in Pacific Panama and environmental factors governing their structure. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 88(7), 1331–1341. <https://doi.org/10.1017/S0025315408002002>
- Blackman, R., Couton, M., Keck, F., Kirschner, D., Carraro, L., Cereghetti, E., Perrelet, K., Bossart, R., Brantschen, J., Zhang, Y., & Altermatt, F. (2024). Environmental DNA: The next chapter. *Molecular Ecology*, 33(11), e17355. <https://doi.org/10.1111/mec.17355>
- Boettiger, C., Lang, D. T., & Wainwright, P. C. (2012). rfishbase: Exploring, manipulating and visualizing FishBase data from R. *Journal of Fish Biology*, 81(6), 2030–2039. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03464.x>
- Bongaerts, P. (2022). Mesophotic coral ecosystems. *Current Biology*, 32(8), R345–R346. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.03.036>
- Bray, J. R., & Curtis, J. T. (1957). An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 27(4), 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Brock, T. D. (1987). The study of microorganisms in situ progress and problems. *Fletcher, M., T R G Gray And J G Jones (Ed) Symposium Of The Society For General Microbiology, 41 Ecology Of Microbial Communities; St Andrew*(Ed), Article Ed. <https://eurekamag.com/research/029/426/029426084.php>
- Bunce, M., Szulkin, M., Lerner, H. R. L., Barnes, I., Shapiro, B., Cooper, A., & Holdaway, R. N. (2005). Ancient DNA Provides New Insights into the Evolutionary History of New Zealand's Extinct Giant Eagle. *PLOS Biology*, 3(1), e9. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030009>
- Bylemans, J., Furlan, E. M., Hardy, C. M., McGuffie, P., Lintermans, M., & Gleeson, D. M. (2017). An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: A case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 646–655. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12709>
- Bylemans, J., Gleeson, D. M., Hardy, C. M., & Furlan, E. (2018). Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA Metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish

- biodiversity of the Murray–Darling Basin (Australia). *Ecology and Evolution*, 8(17), 8697–8712. <https://doi.org/10.1002/ece3.4387>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017a). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017b). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), 2639–2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carvalho, C. O., Gromstad, W., Dunthorn, M., Karlsen, H. E., Schrøder-Nielsen, A., Ready, J. S., Haugaasen, T., Sørnes, G., de Boer, H., & Mauvisseau, Q. (2024). Harnessing eDNA Metabarcoding to investigate fish community composition and its seasonal changes in the Oslo fjord. *Scientific Reports*, 14(1), 10154. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60762-8>
- Castrillón-Cifuentes, A. L., Zapata, F. A., & Wild, C. (2023). Physiological responses of Pocillopora corals to upwelling events in the Eastern Tropical Pacific. *Frontiers in Marine Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmars.2023.1212717>
- CBOL Plant Working Group, Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., van der Bank, M., Chase, M. W., Cowan, R. S., Erickson, D. L., Fazekas, A. J., Graham, S. W., James, K. E., Kim, K.-J., Kress, W. J., Schneider, H., van AlphenStahl, J., Barrett, S. C. H., van den Berg, C., ... Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31), 12794–12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- Chac, L. D., & Thinh, B. B. (2023). Species Identification through DNA Barcoding and Its Applications: A Review. *Biology Bulletin*, 50(6), 1143–1156. <https://doi.org/10.1134/S106235902360229X>

- Chao, A. (1984). Nonparametric Estimation of the Number of Classes in a Population. *Scandinavian Journal of Statistics*, 11(4), 265–270. <https://www.jstor.org/stable/4615964>
- Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18(1), 117–143. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x>
- Clusa, L., Ardura, A., Fernández, S., Roca, A. A., & García-Vázquez, E. (2017). An extremely sensitive nested PCR-RFLP mitochondrial marker for detection and identification of salmonids in eDNA from water samples. *PeerJ*, 5, e3045. <https://doi.org/10.7717/peerj.3045>
- Collins, R. A., Wangensteen, O. S., O’Gorman, E. J., Mariani, S., Sims, D. W., & Genner, M. J. (2018). Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*, 1(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0192-6>
- Cortés, J., Enochs, I. C., Sibaja-Cordero, J., Hernández, L., Alvarado, J. J., Breedy, O., Cruz-Barraza, J. A., Esquivel-Garrote, O., Fernández-García, C., Hermosillo, A., Kaiser, K. L., Medina-Rosas, P., Morales-Ramírez, Á., Pacheco, C., Pérez-Matus, A., Reyes-Bonilla, H., Riosmena-Rodríguez, R., Sánchez-Noguera, C., Wieters, E. A., & Zapata, F. A. (2017). Marine Biodiversity of Eastern Tropical Pacific Coral Reefs. En P. W. Glynn, D. P. Manzello, & I. C. Enochs (Eds.), *Coral Reefs of the Eastern Tropical Pacific: Persistence and Loss in a Dynamic Environment* (pp. 203–250). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7499-4_7
- Crawford, G., Mepstead, M., & Díaz-Ferguson, E. (2023). Characterizing oceanographic conditions near Coiba Island and Pacific Panama using 20 years of satellite-based wind stress, SST and chlorophyll-a measurements. *Marine and Fishery Sciences (MAFIS)*, 37(xx). <https://doi.org/10.47193/mafis.37X2024010112>
- Dabuleviciene, T., Jucevicius, D., Zolubas, T., Vaiciute, D., & Nika, N. (2023). The Effect of Short-Term Upwelling Events on Fish Assemblages at the South-Eastern Coast of the Baltic Sea. *Water*, 15(3), 452. <https://doi.org/10.3390/w15030452>

- D’Croz, L., Kwiecinski, B., & Maté, J. L. (2003). *EL AFLORAMIENTO COSTERO Y EL FENÓMENO DE EL NIÑO: IMPLICACIONES SOBRE LOS RECURSOS BIOLÓGICOS DEL PACIFICO DE PANAMÁ*.
- D’Croz, L., & O’Dea, A. (2007). Variability in upwelling along the Pacific shelf of Panama and implications for the distribution of nutrients and chlorophyll. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73(1–2), 325–340. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2007.01.013>
- D’Croz, L., & O’Dea, A. (2009). *Nutrient and chlorophyll dynamics in Pacific Central America (Panama)*. <https://hdl.handle.net/10088/81544>
- Deagle, B. E., Thomas, A. C., McInnes, J. C., Clarke, L. J., Vesterinen, E. J., Clare, E. L., Kartzinel, T. R., & Eveson, J. P. (2019). Counting with DNA in Metabarcoding studies: How should we convert sequence reads to dietary data? *Molecular Ecology*, 28(2), 391–406. <https://doi.org/10.1111/mec.14734>
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., de Vere, N., Pfrender, M. E., & Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA Metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21), 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Deiner, K., Yamanaka, H., & Bernatchez, L. (2021). The future of biodiversity monitoring and conservation utilizing environmental DNA. *Environmental DNA*, 3(1), 3–7. <https://doi.org/10.1002/edn3.178>
- Deng, Y., Umbach, A. K., & Neufeld, J. D. (2024). Nonparametric richness estimators Chao1 and ACE must not be used with amplicon sequence variant data. *The ISME Journal*, 18(1), wræ106. <https://doi.org/10.1093/ismejo/wrae106>
- Djurhuus, A., Closek, C. J., Kelly, R. P., Pitz, K. J., Michisaki, R. P., Starks, H. A., Walz, K. R., Andruszkiewicz, E. A., Olesin, E., Hubbard, K., Montes, E., Otis, D., Muller-Karger, F. E., Chavez, F. P., Boehm, A. B., & Breitbart, M. (2020). Environmental DNA reveals seasonal shifts and potential interactions in a marine community. *Nature Communications*, 11(1), 254. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14105-1>

- Doi, H., Uchii, K., Takahara, T., Matsushashi, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2015). Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys. *PLOS ONE*, *10*(3), e0122763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122763>
- Dominici-Arosemena, A., & Wolff, M. (2006). Reef fish community structure in the Tropical Eastern Pacific (Panamá): Living on a relatively stable rocky reef environment. *Helgoland Marine Research*, *60*(4), Article 4. <https://doi.org/10.1007/s10152-006-0045-4>
- Edgar, R. C., & Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics*, *31*(21), 3476–3482. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv401>
- Eisele, M. H., Madrigal-Mora, S., & Espinoza, M. (2021). Drivers of reef fish assemblages in an upwelling region from the Eastern Tropical Pacific Ocean. *Journal of Fish Biology*, *98*(4), 1074–1090. <https://doi.org/10.1111/jfb.14639>
- Enright, S. R., Meneses-Orellana, R., & Keith, I. (2021). The Eastern Tropical Pacific Marine Corridor (CMAR): The Emergence of a Voluntary Regional Cooperation Mechanism for the Conservation and Sustainable Use of Marine Biodiversity Within a Fragmented Regional Ocean Governance Landscape. *Frontiers in Marine Science*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.674825>
- Epp, L. S., Boessenkool, S., Bellemain, E. P., Haile, J., Esposito, A., Riaz, T., Erséus, C., Gusarov, V. I., Edwards, M. E., Johnsen, A., Stenøien, H. K., Hassel, K., Kauserud, H., Yoccoz, N. G., Bråthen, K. A., Willerslev, E., Taberlet, P., Coissac, E., & Brochmann, C. (2012). New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: Potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology*, *21*(8), 1821–1833. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05537.x>
- Eren, A. M., Morrison, H. G., Lescault, P. J., Reveillaud, J., Vineis, J. H., & Sogin, M. L. (2015). Minimum entropy decomposition: Unsupervised oligotyping for sensitive partitioning

- of high-throughput marker gene sequences. *The ISME Journal*, 9(4), 968–979. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.195>
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8(3), 175–185. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>
- Fasolo, A., Deb, S., Stevanato, P., Concheri, G., & Squartini, A. (2024). ASV vs OTUs clustering: Effects on alpha, beta, and gamma diversities in microbiome Metabarcoding studies. *PLOS ONE*, 19(10), e0309065. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0309065>
- Fiedler, P. C., & Lavín, M. F. (2017). Oceanographic Conditions of the Eastern Tropical Pacific. En P. W. Glynn, D. P. Manzello, & I. C. Enochs (Eds.), *Coral Reefs of the Eastern Tropical Pacific: Persistence and Loss in a Dynamic Environment* (pp. 59–83). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7499-4_3
- Freeland, J. R. (2017). The importance of molecular markers and primer design when characterizing biodiversity from environmental DNA. *Genome*, 60(4), 358–374. <https://doi.org/10.1139/gen-2016-0100>
- Gagic, D., Maclean, P. H., Li, D., Attwood, G. T., & Moon, C. D. (2015). Improving the genetic representation of rare taxa within complex microbial communities using DNA normalization methods. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 464–476. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12321>
- Gallego-Zerrato, J. J., Córdoba-Rojas, D. F., & Giraldo, A. (2025). Fish Larval Assemblage Associated with an Eastern Tropical Pacific Coral Reef: Seasonal and Interannual Variability. *Diversity*, 17(1), 23. <https://doi.org/10.3390/d17010023>
- Gelis, E. R. E., Kamal, M. M., Subhan, B., Bachtar, I., Sani, L. M. I., & Madduppa, H. (2021). Environmental biomonitoring of reef fish community structure with eDNA Metabarcoding in the Coral Triangle. *Environmental Biology of Fishes*, 104(8), 887–903. <https://doi.org/10.1007/s10641-021-01118-3>

- Gloor, G. B., Macklaim, J. M., Pawlowsky-Glahn, V., & Egozcue, J. J. (2017). Microbiome Datasets Are Compositional: And This Is Not Optional. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02224>
- Glynn, P. W., Alvarado, J. J., Banks, S., Cortés, J., Feingold, J. S., Jiménez, C., Maragos, J. E., Martínez, P., Maté, J. L., Moanga, D. A., Navarrete, S., Reyes-Bonilla, H., Riegl, B., Rivera, F., Vargas-Ángel, B., Wieters, E. A., & Zapata, F. A. (2017). Eastern Pacific Coral Reef Provinces, Coral Community Structure and Composition: An Overview. En P. W. Glynn, D. P. Manzello, & I. C. Enochs (Eds.), *Coral Reefs of the Eastern Tropical Pacific: Persistence and Loss in a Dynamic Environment* (pp. 107–176). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7499-4_5
- Glynn, P. W., Manzello, D. P., & Enochs, I. C. (Eds.). (2017). *Coral Reefs of the Eastern Tropical Pacific: Persistence and Loss in a Dynamic Environment* (Vol. 8). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7499-4>
- Gold, Z., Koch, M. Q., Schooler, N. K., Emery, K. A., Dugan, J. E., Miller, R. J., Page, H. M., Schroeder, D. M., Hubbard, D. M., Madden, J. R., Whitaker, S. G., & Barber, P. H. (2023). A comparison of biomonitoring methodologies for surf zone fish communities. *PLOS ONE*, 18(6), e0260903. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260903>
- Gotelli, N. J., & Colwell, R. K. (2001). Quantifying biodiversity: Procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters*, 4(4), 379–391. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00230.x>
- Gries, C., Gilbert, E. E., & Franz, N. M. (2014). Symbiota – A virtual platform for creating voucher-based biodiversity information communities. *Biodiversity Data Journal*, 2, e1114. <https://doi.org/10.3897/BDJ.2.e1114>
- Guzman, H. M., Benfield, S., Breedy, O., & Mair, J. M. (2008). Broadening reef protection across the Marine Conservation Corridor of the Eastern Tropical Pacific: Distribution and diversity of reefs in Las Perlas Archipelago, Panama. *Environmental Conservation*, 35(01). <https://doi.org/10.1017/S0376892908004542>

- Hajibabaei, M., Smith, M. A., Janzen, D. H., Rodriguez, J. J., Whitfield, J. B., & Hebert, P. D. N. (2006). A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes*, 6(4), 959–964. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01470.x>
- He, W., Wang, L., Ou, D., Li, W., Huang, H., Ou, R., Qiu, J., Cai, L., Lin, L., & Zhang, Y. (2023). Fish Diversity Monitoring Using Environmental DNA Techniques in the Clarion–Clipperton Zone of the Pacific Ocean. *Water*, 15(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/w15112123>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hill, M. O. (1973). Diversity and Evenness: A Unifying Notation and Its Consequences. *Ecology*, 54(2), 427–432. <https://doi.org/10.2307/1934352>
- Holman, L. (2021). *Environmental DNA Metabarcoding and the study of marine biodiversity and biological invasions* [Phd, University of Southampton]. <https://eprints.soton.ac.uk/450590/>
- Hsieh, T. C., Ma, K. H., & Chao, A. (2016). iNEXT: An R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution*, 7(12), 1451–1456. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12613>
- Jaccard, P. (1912). The Distribution of the Flora in the Alpine Zone. *New Phytologist*, 11(2), 37–50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1912.tb05611.x>
- Jo, T., & Yamanaka, H. (2022). Fine-tuning the performance of abundance estimation based on environmental DNA (eDNA) focusing on eDNA particle size and marker length. *Ecology and Evolution*, 12(8), e9234. <https://doi.org/10.1002/ece3.9234>
- Kandlikar, G. S., Gold, Z. J., Cowen, M. C., Meyer, R. S., Freise, A. C., Kraft, N. J. B., Moberg-Parker, J., Sprague, J., Kushner, D. J., & Curd, E. E. (2018). ranacapa: An R package and Shiny web app to explore environmental DNA data with exploratory statistics and

- interactive visualizations. *F1000Research*, 7, 1734.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.16680.1>
- Klymus, K. E., Richter, C. A., Chapman, D. C., & Paukert, C. (2015). Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological Conservation*, 183, 77–84.
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.020>
- Kress, W. J., García-Robledo, C., Uriarte, M., & Erickson, D. L. (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 30(1), 25–35.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.008>
- Kruskal, J. B., & Shepard, R. N. (1974). A Nonmetric Variety of Linear Factor Analysis. *Psychometrika*, 39(2), 123–157. <https://doi.org/10.1007/BF02291465>
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). MEGA12: Molecular Evolutionary Genetic Analysis Version 12 for Adaptive and Green Computing. *Molecular Biology and Evolution*, 41(12), msae263.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msae263>
- Legendre, P., & Gallagher, E. D. (2001). Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia*, 129(2), 271–280. <https://doi.org/10.1007/s004420100716>
- Leray, M., Knowlton, N., & Machida, R. J. (2022). MIDORI2: A collection of quality controlled, preformatted, and regularly updated reference databases for taxonomic assignment of eukaryotic mitochondrial sequences. *Environmental DNA*, 4(4), 894–907.
<https://doi.org/10.1002/edn3.303>
- 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 in Zoology*, 10, 34.
<https://doi.org/10.1186/1742-9994-10-34>

- Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: Recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W78–W82. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>
- Levene, H. (1960). *Robust Tests for Equality of Variances*. In I. Olkin, S. G. Ghunye, W. Hoeffding, W. G. Mandow, & H. B. Mann (Eds.). *Contribution to Probability and Statistics*. Stanford University Press.
- López-Pérez, A., Granja-Fernández, R., Ramírez-Chávez, E., Valencia-Méndez, O., Rodríguez-Zaragoza, F. A., González-Mendoza, T., & Martínez-Castro, A. (2024). Widespread Coral Bleaching and Mass Mortality of Reef-Building Corals in Southern Mexican Pacific Reefs Due to 2023 El Niño Warming. *Oceans*, 5(2), 196–209. <https://doi.org/10.3390/oceans5020012>
- Lydolph, M. C., Jacobsen, J., Arctander, P., Gilbert, M. T. P., Gilichinsky, D. A., Hansen, A. J., Willerslev, E., & Lange, L. (2005). Beringian Paleoecology Inferred from Permafrost-Preserved Fungal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(2), 1012–1017. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.1012-1017.2005>
- Marques, V., Milhau, T., Albouy, C., Dejean, T., Manel, S., Mouillot, D., & Juhel, J.-B. (2021). GAPeDNA: Assessing and mapping global species gaps in genetic databases for eDNA Metabarcoding. *Diversity and Distributions*, 27(10), 1880–1892. <https://doi.org/10.1111/ddi.13142>
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), Article 1. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>
- Martin, S. L., Ballance, L. T., & Groves, T. (2016). An Ecosystem Services Perspective for the Oceanic Eastern Tropical Pacific: Commercial Fisheries, Carbon Storage, Recreational Fishing, and Biodiversity. *Frontiers in Marine Science*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00050>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLOS ONE*, 8(4), e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>

- 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. *Royal Society Open Science*, 2(7). <https://doi.org/10.1098/RSOS.150088>
- Morrissey, J. F., & Sumich, J. L. (2012). *Introduction to the biology of marine life* (10th ed). Jones & Bartlett Learning.
- Muri, C. D., Handley, L. L., Bean, C. W., Li, J., Peirson, G., Sellers, G. S., Walsh, K., Watson, H. V., Winfield, I. J., & Hänfling, B. (2020). Read counts from environmental DNA (eDNA) Metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. *Metabarcoding and Metagenomics*, 4, e56959. <https://doi.org/10.3897/mbmg.4.56959>
- Nagarajan, R. P., Bedwell, M., Holmes, A. E., Sanches, T., Acuña, S., Baerwald, M., Barnes, M. A., Blankenship, S., Connon, R. E., Deiner, K., Gille, D., Goldberg, C. S., Hunter, M. E., Jerde, C. L., Luikart, G., Meyer, R. S., Watts, A., & Schreier, A. (2022). Environmental DNA Methods for Ecological Monitoring and Biodiversity Assessment in Estuaries. *Estuaries and Coasts*, 45(7), 2254–2273. <https://doi.org/10.1007/s12237-022-01080-y>
- Naik, T., Sharda, M., & Pandit, A. (2020). *High quality single amplicon sequencing method for illumina platforms using ‘N’ (0-10) spacer primer pool without PhiX spik-in* (p. 2020.06.05.134197). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2020.06.05.134197>
- Nguyen, B. N., Shen, E. W., Seemann, J., Correa, A. M. S., O'Donnell, J. L., Altieri, A. H., Knowlton, N., Crandall, K. A., Egan, S. P., McMillan, W. O., & Leray, M. (2020). Environmental DNA survey captures patterns of fish and invertebrate diversity across a tropical seascape. *Scientific Reports*, 10(1), 6729. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63565-9>
- O'Dea, A., Hoyos, N., Rodríguez, F., Degracia, B., & De Gracia, C. (2012). History of upwelling in the Tropical Eastern Pacific and the paleogeography of the Isthmus of Panama.

- Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 348–349, 59–66.
<https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2012.06.007>
- O’Dea, A., Sellers, A. J., Pérez-Medina, C., Pardo Díaz, J., Guzmán Bloise, A., Pöhlker, C., Chiliński, M. T., Aardema, H. M., Cybulski, J. D., Heins, L., Paton, S. R., Slagter, H. A., Schiebel, R., & Haug, G. H. (2025). Unprecedented suppression of Panama’s Pacific upwelling in 2025. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 122(36), e2512056122. (world). <https://doi.org/10.1073/pnas.2512056122>
- 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)
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R., & Stahl, D. A. (1986). Microbial Ecology and Evolution: A Ribosomal RNA Approach. *Annual Review of Microbiology*, 40(Volume 40,), 337–365. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.40.100186.002005>
- Ordóñez-Zúñiga, S. A., Correa-Ramírez, M., Ricaurte-Villota, C., Bastidas-Salamanca, M., Ordóñez-Zúñiga, S. A., Correa-Ramírez, M., Ricaurte-Villota, C., & Bastidas-Salamanca, M. (2021). The Panama Low-Level Jet: Extension, annual cycle and modes of variation. *Latin american journal of aquatic research*, 49(5), 750–762.
<https://doi.org/10.3856/vol49-issue5-fulltext-2591>
- Pagès, Aboyoun, P., Gentleman, R., & DeRoy, S. (2024). *Biostrings: Efficient manipulation of biological strings* (Versión R package version 2.76.0) [Software].
[doi:10.18129/B9.bioc.Biostrings](https://doi.org/10.18129/B9.bioc.Biostrings)
- Paradis, E., & Schliep, K. (2019). ape 5.0: An environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35(3), 526–528.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633>
- Peck, M. A., Reglero, P., Takahashi, M., & Catalán, I. A. (2013). Life cycle ecophysiology of small pelagic fish and climate-driven changes in populations. *Progress in Oceanography*, 116, 220–245. <https://doi.org/10.1016/j.pocean.2013.05.012>

- Poinar, H. N., Hofreiter, M., Spaulding, W. G., Martin, P. S., Stankiewicz, B. A., Bland, H., Evershed, R. P., Possnert, G., & Pääbo, S. (1998). Molecular Coproscopy: Dung and Diet of the Extinct Ground Sloth *Nothrotheriops shastensis*. *Science*, *281*(5375), 402–406. <https://doi.org/10.1126/science.281.5375.402>
- Posit team. (2025). *RStudio: Integrated Development Environment for R* [Software]. <http://www.posit.co/>
- Poveda, G., Waylen, P. R., & Pulwarty, R. S. (2006). Annual and inter-annual variability of the present climate in northern South America and southern Mesoamerica. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, Late Quaternary climates of tropical America and adjacent seas*, *234*(1), 3–27. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2005.10.031>
- R Core Team. (2024). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [Software]. <https://www.R-project.org/>
- Ragot, R., & Villemur, R. (2022). eDNA profiling of mammals, birds, and fish of surface waters by mitochondrial metagenomics: Application for source tracking of fecal contamination in surface waters. *Environmental Monitoring and Assessment*, *194*(2), 72. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09668-w>
- Randall, C. J., Toth, L. T., Leichter, J. J., Maté, J. L., & Aronson, R. B. (2020). Upwelling buffers climate change impacts on coral reefs of the eastern tropical Pacific. *Ecology*, *101*(2), e02918. <https://doi.org/10.1002/ecy.2918>
- Richardson, K., & Bendtsen, J. (2019). Vertical distribution of phytoplankton and primary production in relation to nutricline depth in the open ocean. *Marine Ecology Progress Series*, *620*, 33–46. <https://doi.org/10.3354/meps12960>
- Ricotta, C., & Podani, J. (2017). On some properties of the Bray-Curtis dissimilarity and their ecological meaning. *Ecological Complexity*, *31*, 201–205. <https://doi.org/10.1016/j.ecocom.2017.07.003>

- Robertson, D. R., & Allen, G. R. (2024). *Shorefishes of the Tropical Eastern Pacific: Online information system*. (Versión 3.0). Smithsonian Tropical Research Institute, Balboa, Panamá. <https://biogeodb.stri.si.edu/sftep/>
- Robles P., Y. A., Vega, Á. J., Montes S., L. A., Sánchez-Carles, E. E., & Lombardo G., R. C. (2026). Fish spawning aggregations in the Gulf of Chiriqui, Panamanian Pacific: Six years of monitoring. *Revista de Biología Tropical*, 74(1), e2026203–e2026203. <https://doi.org/10.15517/0wk2ee74>
- Rourke, M. L., Fowler, A. M., Hughes, J. M., Broadhurst, M. K., DiBattista, J. D., Fielder, S., Wilkes Walburn, J., & Furlan, E. M. (2022). Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 4(1), 9–33. <https://doi.org/10.1002/edn3.185>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Saenz-Agudelo, P., Ramirez, P., Beldade, R., Campoy, A. N., Garmendia, V., Search, F. V., Fernández, M., Wieters, E. A., Navarrete, S. A., Landaeta, M. F., & Pérez-Matus, A. (2024). Environmental DNA reveals temporal variation in mesophotic reefs of the Humboldt upwelling ecosystems of central Chile: Toward a baseline for biodiversity monitoring of unexplored marine habitats. *Ecology and Evolution*, 14(2), e10999. <https://doi.org/10.1002/ece3.10999>
- Sahu, A., Singh, M., Amin, A., Malik, M. M., Qadri, S. N., Abubakr, A., Teja, S. S., Dar, S. A., & Ahmad, I. (2025). A systematic review on environmental DNA (eDNA) Science: An eco-friendly survey method for conservation and restoration of fragile ecosystems. *Ecological Indicators*, 173, 113441. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2025.113441>
- Saltonstall, K., Collin, R., Aguilar, C., Alda, F., Baldrich-Mora, L. M., Bravo, V., Castillo, M. F., Castro, S., De León, L. F., Díaz-Ferguson, E., Garcés, H. A., Gómez, E., González, R. G., González-Torres, M. A., Guzman, H. M., Hiller, A., Ibáñez, R., Jaramillo, C.,

- Kaiser, K. L., ... Castellanos-Galindo, G. (2025). A DNA Barcode Dataset for the Aquatic Fauna of the Panama Canal: Novel Resources for Detecting Faunal Change in the Neotropics. *Data*, 10(7), 108. <https://doi.org/10.3390/data10070108>
- Sassoubre, L. M., Yamahara, K. M., Gardner, L. D., Block, B. A., & Boehm, A. B. (2016). Quantification of Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates for Three Marine Fish. *Environmental Science & Technology*, 50(19), 10456–10464. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b03114>
- Sato, M., Barth, J. A., Benoit-Bird, K. J., Pierce, S. D., Cowles, T. J., Brodeur, R. D., & Peterson, W. T. (2018). Coastal upwelling fronts as a boundary for planktivorous fish distributions. *Marine Ecology Progress Series*, 595, 171–186. <https://doi.org/10.3354/meps12553>
- Schliep, K., Potts, A. J., Morrison, D. A., & Grimm, G. W. (2017). Intertwining phylogenetic trees and networks. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(10), 1212–1220. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12760>
- Schreiber, L., Castellanos-Galindo, G. A., Robertson, D. R., Torchin, M., Chavarria, K., Laakmann, S., & Saltonstall, K. (2023). Environmental DNA (eDNA) reveals potential for interoceanic fish invasions across the Panama Canal. *Ecology and Evolution*, 13(1), e9675. <https://doi.org/10.1002/ece3.9675>
- Sellers, A. J., Leung, B., Altieri, A. H., Glanz, J., Turner, B. L., & Torchin, M. E. (2021). Seasonal upwelling reduces herbivore control of tropical rocky intertidal algal communities. *Ecology*, 102(6), e03335. <https://doi.org/10.1002/ecy.3335>
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika*, 52(3/4), 591–611. <https://doi.org/10.2307/2333709>
- Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N. E., Heger, A., & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: Key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 15(2), 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrg3642>
- Skelton, J., Cauvin, A., & Hunter, M. E. (2023). Environmental DNA Metabarcoding read numbers and their variability predict species abundance, but weakly in non-dominant species. *Environmental DNA*, 5(5), 1092–1104. <https://doi.org/10.1002/edn3.355>

- Smale, D. A., Wernberg, T., Oliver, E. C. J., Thomsen, M., Harvey, B. P., Straub, S. C., Burrows, M. T., Alexander, L. V., Benthuyssen, J. A., Donat, M. G., Feng, M., Hobday, A. J., Holbrook, N. J., Perkins-Kirkpatrick, S. E., Scannell, H. A., Sen Gupta, A., Payne, B. L., & Moore, P. J. (2019). Marine heatwaves threaten global biodiversity and the provision of ecosystem services. *Nature Climate Change*, 9(4), 306–312. <https://doi.org/10.1038/s41558-019-0412-1>
- Smithsonian Institution. (2025). *High Performance Computing Cluster | Research Computing*. <https://doi.org/10.25572/SIHPC>
- Spalding, M. D., Fox, H. E., Allen, G. R., Davidson, N., Ferdaña, Z. A., Finlayson, M., Halpern, B. S., Jorge, M. A., Lombana, A., Lourie, S. A., Martin, K. D., McManus, E., Molnar, J., Recchia, C. A., & Robertson, J. (2007). Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience*, 57(7), 573–583. <https://doi.org/10.1641/B570707>
- Stuhldreier, I., Sánchez-Noguera, C., Roth, F., Jiménez, C., Rixen, T., Cortés, J., & Wild, C. (2015). Dynamics in benthic community composition and influencing factors in an upwelling-exposed coral reef on the Pacific coast of Costa Rica. *PeerJ*, 3, e1434. <https://doi.org/10.7717/peerj.1434>
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8), 1789–1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Thalinger, B., Rieder, A., Teuffenbach, A., Pütz, Y., Schwerte, T., Wanzenböck, J., & Traugott, M. (2021). The Effect of Activity, Energy Use, and Species Identity on Environmental DNA Shedding of Freshwater Fish. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9. <https://doi.org/10.3389/fevo.2021.623718>
- Thomsen, P. F. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4–18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>

- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, P. R., 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>
- Topor, Z. M., Rasher, D. B., Duffy, J. E., & Brandl, S. J. (2019). Marine protected areas enhance coral reef functioning by promoting fish biodiversity. *Conservation Letters*, 12(4), e12638. <https://doi.org/10.1111/conl.12638>
- Toth, L. T., Aronson, R. B., Cheng, H., & Edwards, R. L. (2015). Holocene variability in the intensity of wind-gap upwelling in the tropical eastern Pacific. *Paleoceanography*, 30(8), 1113–1131. <https://doi.org/10.1002/2015PA002794>
- Ul-Hasan, S., Bowers, R. M., Figueroa-Montiel, A., Licea-Navarro, A. F., Beman, J. M., Woyke, T., & Nobile, C. J. (2019). Community ecology across bacteria, archaea and microbial eukaryotes in the sediment and seawater of coastal Puerto Nuevo, Baja California. *PLOS ONE*, 14(2), e0212355. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212355>
- Valdivia-Carrillo, T., Rocha-Olivares, A., Reyes-Bonilla, H., Domínguez-Contreras, J. F., & Munguia-Vega, A. (2021). Integrating eDNA Metabarcoding and simultaneous underwater visual surveys to describe complex fish communities in a marine biodiversity hotspot. *Molecular Ecology Resources*, 21(5), 1558–1574. <https://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., ... Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA Metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929–942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>
- Valiere, N., & Taberlet, P. (2000). Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Molecular Ecology*, 9(12), 2150–2152. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.11142.x>

- Wright, E. S. (2015). DECIPHER: Harnessing local sequence context to improve protein multiple sequence alignment. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 322. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0749-z>
- Wright, E., S. (2016). Using DECIPHER v2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R. *The R Journal*, 8(1), 352. <https://doi.org/10.32614/RJ-2016-025>
- Yates, M. C., Glaser, D. M., Post, J. R., Cristescu, M. E., Fraser, D. J., & Derry, A. M. (2021). The relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature is strengthened by allometric scaling. *Molecular Ecology*, 30(13), 3068–3082. <https://doi.org/10.1111/mec.15543>
- Zainal Abidin, D. H., Mohd. Nor, S. A., Lavoué, S., A. Rahim, M., & Mohammed Akib, N. A. (2022). Assessing a megadiverse but poorly known community of fishes in a tropical mangrove estuary through environmental DNA (eDNA) Metabarcoding. *Scientific Reports*, 12(1), 16346. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19954-3>
- Zamani, N. P., Zuhdi, M. F., & Madduppa, H. (2022). Environmental DNA biomonitoring reveals seasonal patterns in coral reef fish community structure. *Environmental Biology of Fishes*, 105(8), 971–991. <https://doi.org/10.1007/s10641-022-01274-0>
- Zar, J. H. (2014). *Biostatistical Analysis*. Pearson Education Limited.
- Zuur, A. F., Ieno, E. N., & Smith, G. M. (2007). *Analysing Ecological Data*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-45972-1>

S1- ANEXO DE MATERIALES SUPLEMENTARIOS

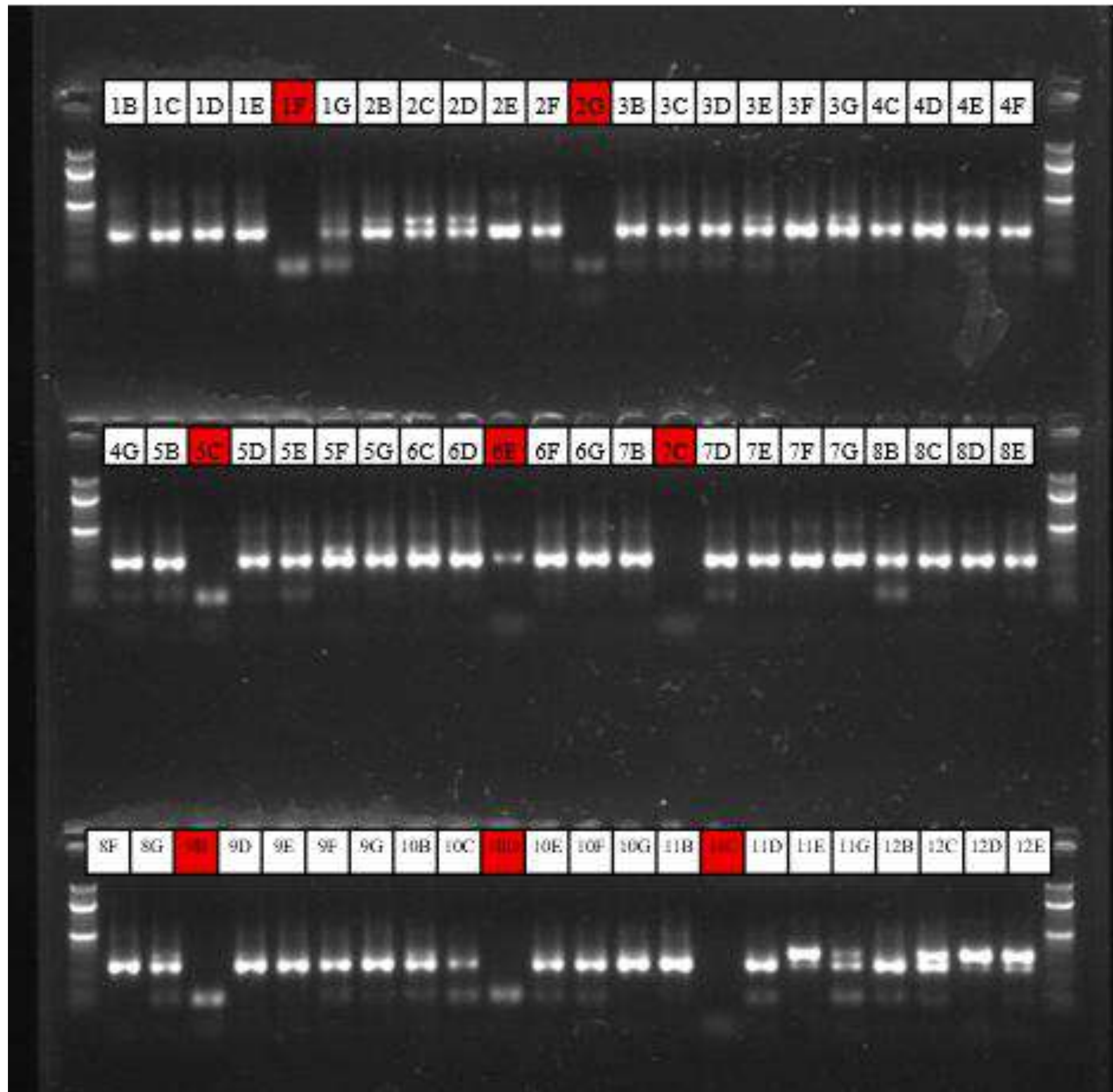


Figura 15. Visualización de gel de agarosa al 2% de la PCR I. Plato 1/2, réplica 2/3 de los amplicones 12S (primer MiFishU_IL). En rojo las muestras de control de extracción.



Figura 16. Visualización en gel de agarosa al 2% de la Index PCR del plato 1.

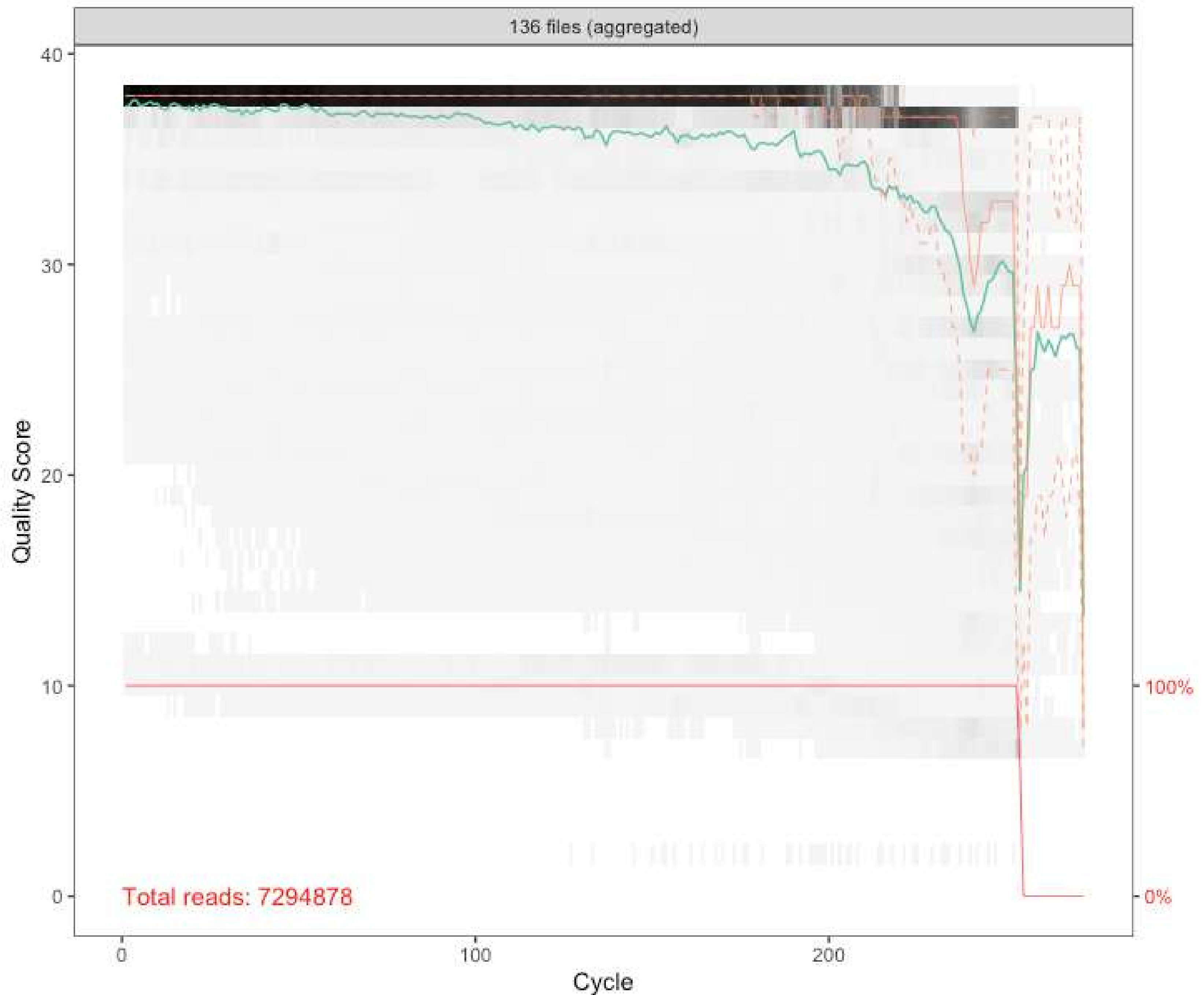


Figura 17. Perfiles de calidad de secuenciación de las secuencias Forward

En escala de grises se muestra un mapa de calor de la frecuencia de cada puntuación de calidad en cada posición base. La puntuación media de calidad en cada posición se muestra con la línea verde, y los cuartiles de la distribución de la puntuación de calidad con las líneas naranjas. La línea roja muestra la proporción escalada de lecturas que se extienden al menos hasta esa posición (esto es más útil para otras tecnologías de secuenciación, ya que las lecturas de Illumina suelen tener todas la misma longitud, de ahí la línea roja plana

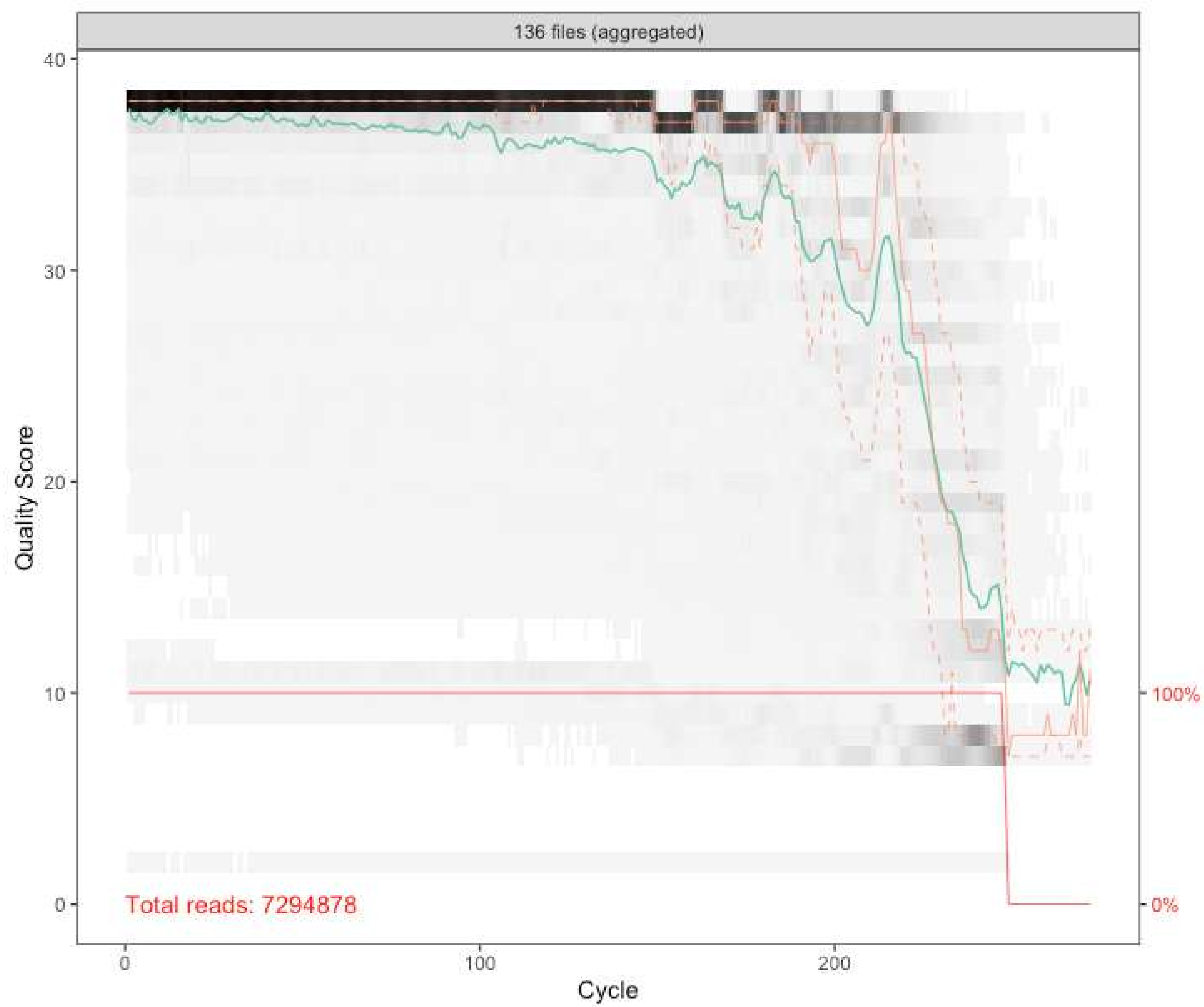


Figura 18. Perfiles de calidad de secuenciación de las secuencias *Reverse*.

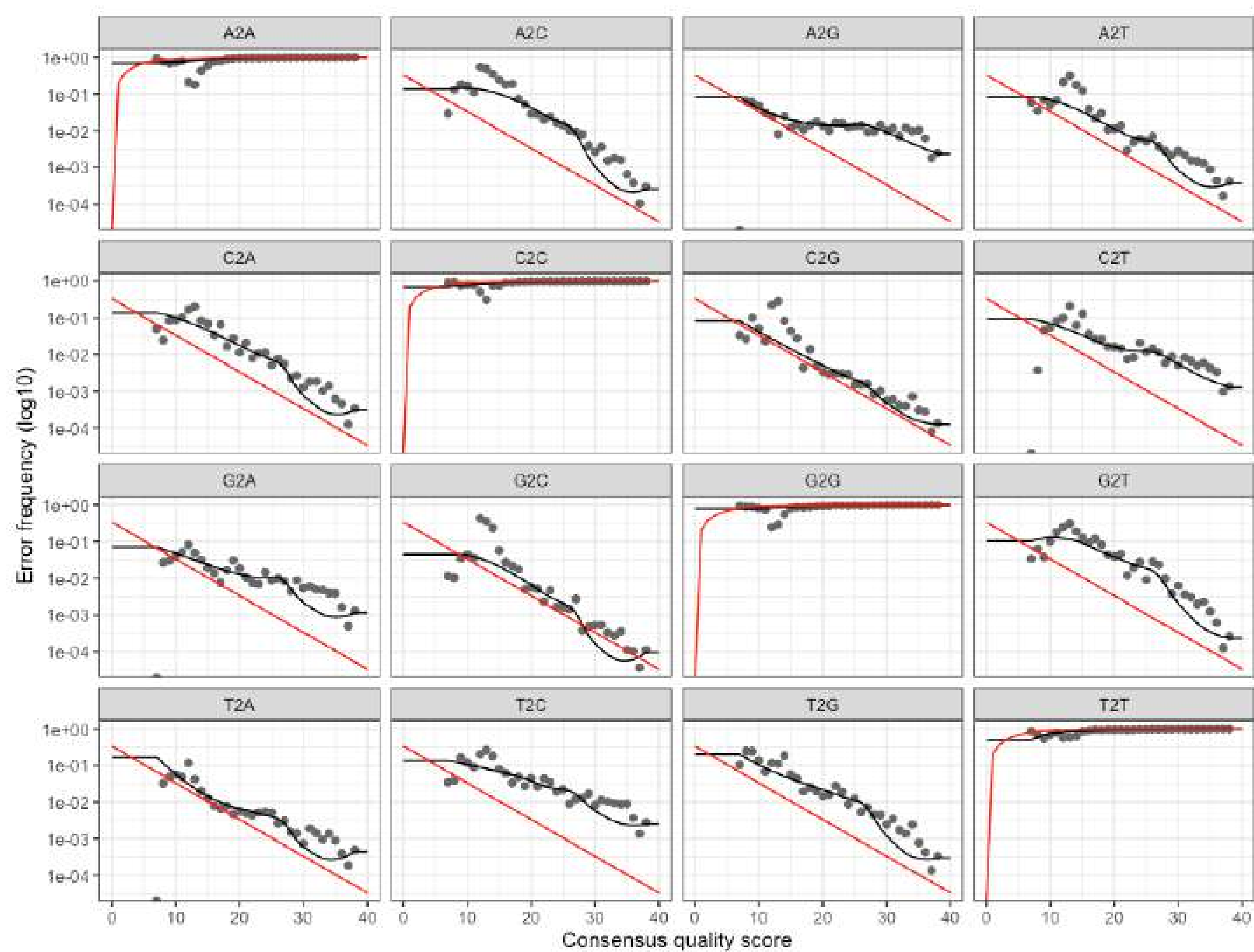


Figura 19. Tasas de errores. Secuencias *Forward*

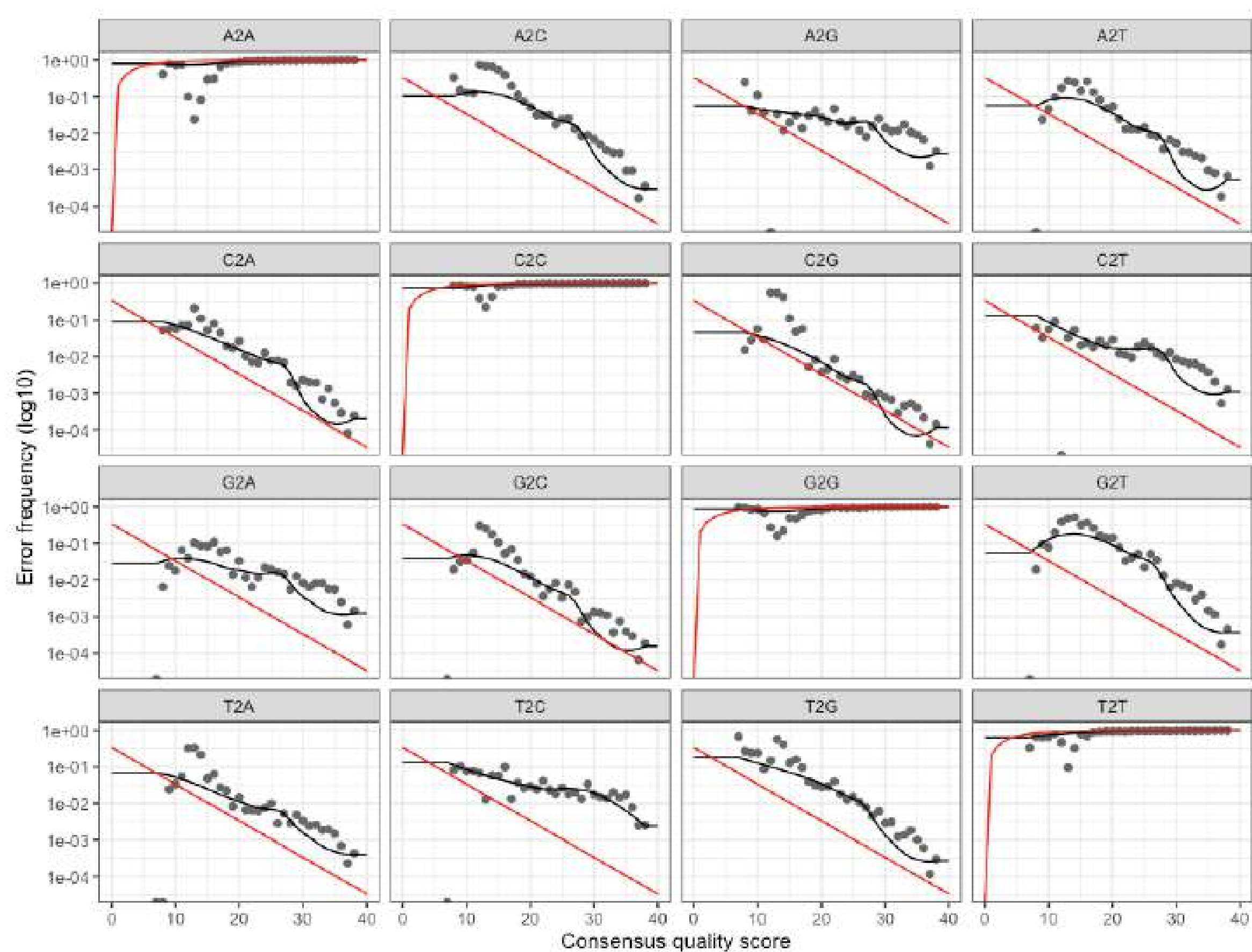


Figura 20. Tasas de errores. Secuencias *Reverse*

Nota: los puntos son las tasas de error observadas para cada puntuación de calidad consensuada. La línea negra muestra las tasas de error estimadas tras la convergencia del algoritmo de aprendizaje automático. La línea roja muestra las tasas de error esperadas según la definición nominal de la puntuación Q. En este caso, las tasas de error estimadas (línea negra) se ajustan bien a las tasas observadas (puntos), y las tasas de error disminuyen con el aumento de la calidad, tal y como se esperaba. Todo parece razonable y procedemos con confianza.(Callahan et al., 2016).

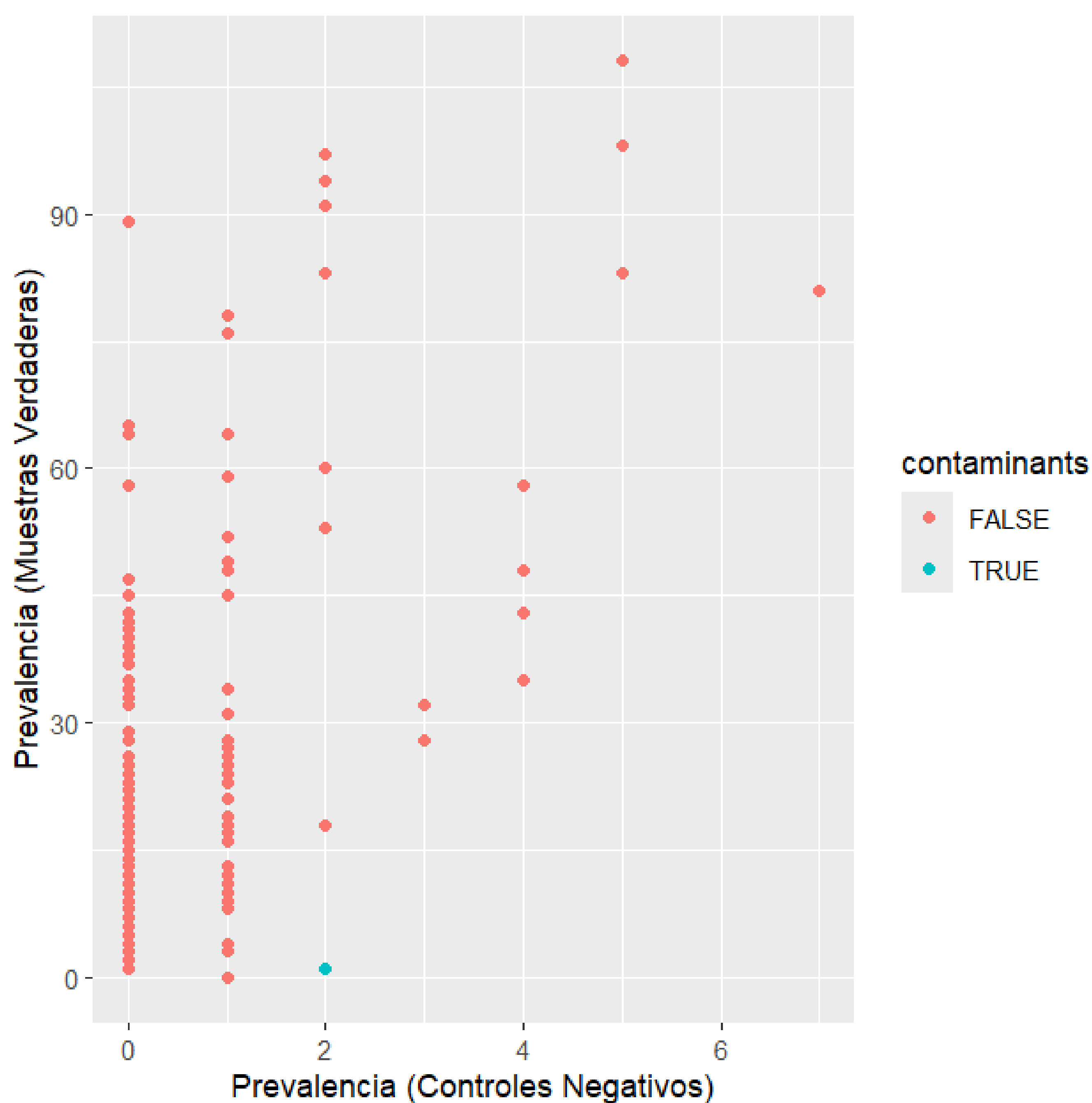


Figura 21. Prevalencia de contaminantes en muestras y controles negativos de PCR y extracción.

Tabla 3. Resumen del cambio de número de lecturas en el flujo bioinformático de DADA2.

Paso	Lecturas de amplicones	Retención de lecturas (%)	Promedio (P)	Media	Desviación Estándar (DE)	P+DE
<i>input</i>	7,294,878		53638.81	52966.5	32289.49	85928.3
<i>filtered</i>	6,758,851	92.65	49697.43	49264.5	30496.93	80194.37
<i>denoised_F</i>	6,738,912	92.38	49550.82	49092.5	30416.14	79966.96
<i>denoised_R</i>	6,742,334	92.43	49575.99	49099	30430.68	80006.67
<i>merged</i>	6,649,910	91.16	48896.4	48482	29951.51	78847.91
<i>nonchim</i>	5,974,280	81.90	43928.53	43874	25968.25	69896.78

Tabla 4. Asignación taxonómica máxima obtenida de las variantes de secuencias de amplicones (ASV) para la clase Chondrichthyes

Género	Familia	Orden	# de ASV
<i>Urobatis</i>	<i>Urotrygonidae</i>	<i>Myliobatiformes</i>	1
<i>Triaenodon</i>	<i>Carcharhinidae</i>	<i>Carcharhiniformes</i>	1
<i>Sphyrna</i>	<i>Carcharhinidae</i>	<i>Carcharhiniformes</i>	1
<i>Rhizoprionodon</i>	<i>Carcharhinidae</i>	<i>Carcharhiniformes</i>	1
<i>Rhinoptera</i>	<i>Myliobatidae</i>	<i>Myliobatiformes</i>	4
<i>Narcine</i>	<i>Narcinidae</i>	<i>Torpediniformes</i>	1
<i>Mobula</i>	<i>Myliobatidae</i>	<i>Myliobatiformes</i>	1
<i>Hypanus</i>	<i>Dasyatidae</i>	<i>Myliobatiformes</i>	3
<i>Carcharhinus</i>	<i>Carcharhinidae</i>	<i>Carcharhiniformes</i>	2
<i>Alopias</i>	<i>Alopiidae</i>	<i>Lamniformes</i>	1
no identificado	<i>Dasyatidae</i>	<i>Myliobatiformes</i>	2
no identificado	<i>Carcharhinidae</i>	<i>Carcharhiniformes</i>	1
Total			19

Tabla 5. Asignación taxonómica máxima obtenida de variantes de secuencias de amplicones (ASV) para la clase Actinopteri.

Género	Familia	Orden	# de ASV
Halichoeres	Labridae	Labriformes	59
Azurina	Pomacentridae	Perciformes	59
Thalassoma	Labridae	Labriformes	55
Haemulon	Haemulidae	Lutjaniformes	52
Abudefduf	Pomacentridae	Perciformes	40
Canthigaster	Chare	Tetraodontiformes	31
Gymnothorax	Muraenidae	Anguilliformes	30
Kyphosus	Kyphosidae	Centrarchiformes	28
Scarus	Labridae	Labriformes	26
Lutjanus	Lutjanidae	Lutjaniformes	26
Stegastes	Pomacentridae	Perciformes	24
Starksia	Labrisomidae	Blenniiformes	19
Cirrhitichthys	Cirrhitidae	Centrarchiformes	16
Uropterygius	Muraenidae	Anguilliformes	15
Opisthonema	Clupeidae	Clupeiformes	15
Diodon	Diodontidae	Tetraodontiformes	15
Cephalopholis	Serranidae	Perciformes	15
Sufflamen	Balistidae	Tetraodontiformes	14
Cynoscion	Sciaenidae	Perciformes	14
Caranx	Carangidae	Carangiformes	13
Arothron	Tetraodontidae	Tetraodontiformes	13
Acanthurus	Acanthuridae	Acanthuriformes	12
Oxyporhamphus	Hemiramphidae	Beloniformes	11
Engraulis	Engraulidae	Clupeiformes	11
Chaetodon	Chaetodontidae	Chaetodontiformes	11

Scorpaenodes	Scorpaenidae	Perciformes	10
Holacanthus	Pomacanthidae	Acanthuriformes	10
Eucinostomus	Gerreidae	Gerreiformes	10
Tylosurus	Belonidae	Beloniformes	9
Prionurus	Acanthuridae	Acanthuriformes	9
Calamus	Sparidae	Spariformes	9
Apogon	Apogonidae	Kurtiformes	9
Ctenogobius	Gobiidae	Gobiiformes	8
Myripristis	Holocentridae	Holocentriiformes	7
Coryphopterus	Gobiidae	Gobiiformes	7
Scuticaria	Muraenidae	Anguilliformes	6
Paraclinus	Labrisomidae	Blenniiformes	6
Mugil	Mugilidae	Mugiliformes	6
Microspathodon	Pomacentridae	Perciformes	6
Fistularia	Fistulariidae	Syngnathiiformes	6
Epinephelus	Serranidae	Perciformes	6
Benthoosema	Myctophidae	Myctophiformes	6
Scorpaena	Scorpaenidae	Perciformes	5
Scomberomorus	Scombridae	Scombriformes	5
Decapterus	Carangidae	Carangiformes	5
Centropomus	Centropomidae	Perciformes	5
Aluterus	Monacanthidae	Tetraodontiformes	5
Pseudobalistes	Balistidae	Tetraodontiformes	4
Malacoctenus	Labrisomidae	Blenniiformes	4
Diplectrum	Serranidae	Perciformes	4
Bodianus	Labridae	Labriformes	4
Anisotremus	Haemulidae	Lutjaniformes	4
Anchoa	Engraulidae	Clupeiformes	4

Acanthemblemaria	Chaenopsidae	Blenniiformes	4
Sphyraena	Sphyraenidae	Carangiformes	3
Seriola	Carangidae	Carangiformes	3
Rypticus	Serranidae	Perciformes	3
Gymnomuraena	Muraenidae	Anguilliformes	3
Gnathanodon	Carangidae	Carangiformes	3
Elops	Elopidae	Elopiformes	3
Elagatis	Carangidae	Carangiformes	3
Echidna	Muraenidae	Anguilliformes	3
Diapterus	Gerreidae	Gerreiformes	3
Coralliozetus	Chaenopsidae	Blenniiformes	3
Syngnathus	Syngnathidae	Syngnathiformes	2
Synchiropus	Callionymidae	Syngnathiformes	2
Symphurus	Cynoglossidae	Pleuronectiformes	2
Sphoeroides	Tetraodontidae	Tetraodontiformes	2
Selar	Carangidae	Carangiformes	2
Scomber	Scombridae	Scombriformes	2
Ptereleotris	Gobiidae	Gobiiformes	2
Platybelone	Belonidae	Beloniformes	2
Plagiotremus	Blenniidae	Blenniiformes	2
Parexocoetus	Exocoetidae	Beloniformes	2
Mulloidichthys	Mullidae	Syngnathiformes	2
Microdesmus	Gobiidae	Gobiiformes	2
Lythrypnus	Gobiidae	Gobiiformes	2
Lobotes	Lobotidae	Lobotiformes	2
Johnrandallia	Chaetodontidae	Chaetodontiformes	2
Hypsoblennius	Blenniidae	Blenniiformes	2
Harengula	Clupeidae	Clupeiformes	2

Euthynnus	Scombridae	Scombriformes	2
Emblemaria	Chaenopsidae	Blenniiformes	2
Chloroscombrus	Carangidae	Carangiformes	2
Chanos	Chanidae	Gonorynchiformes	2
Chaetodipterus	Ephippidae	Ephippiformes	2
Bollmannia	Gobiidae	Gobiiformes	2
Auxis	Scombridae	Scombriformes	2
Xyrichtys	Labridae	Labriformes	1
Triphoturus	Myctophidae	Myctophiformes	1
Trachinotus	Carangidae	Carangiformes	1
Tomicodon	Gobiesocidae	Blenniiformes	1
Thunnus	Scombridae	Scombriformes	1
Synodus	Synodontidae	Aulopiformes	1
Stathmonotus	Labrisomidae	Blenniiformes	1
Selene	Carangidae	Carangiformes	1
Pseudogramma	Serranidae	Perciformes	1
Pomacanthus	Pomacanthidae	Acanthuriformes	1
Polydactylus	Polynemidae	Carangiformes	1
Paralonchurus	Sciaenidae	Perciformes	1
Orthopristis	Haemulidae	Lutjaniformes	1
Opistognathus	Opistognathidae	Perciformes	1
Ophidion	Ophidiidae	Ophidiiformes	1
Ophichthus	Ophichthidae	Anguilliformes	1
Oligoplites	Carangidae	Carangiformes	1
Occidentarius	Ariidae	Siluriformes	1
Novaculichthys	Labridae	Labriformes	1
Nematistius	Nematistiidae	Carangiformes	1
Nealotus	Gempylidae	Scombriformes	1

Mycteroperca	Serranidae	Perciformes	1
Muraena	Muraenidae	Anguilliformes	1
Microgobius	Gobiidae	Gobiiformes	1
Melichthys	Balistidae	Tetraodontiformes	1
Lonchopisthus	Opistognathidae	Perciformes	1
Hippocampus	Syngnathidae	Syngnathiformes	1
Hemanthias	Serranidae	Perciformes	1
Gobiosoma	Gobiidae	Gobiiformes	1
Gobiomorus	Eleotridae	Gobiiformes	1
Gillellus	Dactyloscopidae	Blenniiformes	1
Gerres	Gerreidae	Gerreiformes	1
Euleptorhamphus	Hemiramphidae	Beloniformes	1
Etrumeus	Dussumieriidae	Clupeiformes	1
Entomacrodus	Blenniidae	Blenniiformes	1
Enchelycore	Muraenidae	Anguilliformes	1
Eleotris	Eleotridae	Gobiiformes	1
Diaphus	Myctophidae	Myctophiformes	1
Coryphaena	Coryphaenidae	Carangiformes	1
Brotula	Ophidiidae	Ophidiiformes	1
Bothus	Bothidae	Pleuronectiformes	1
Astroscopus	Uranoscopidae	Uranoscopiformes	1
Ariopsis	Ariidae	Siluriformes	1
Alectis	Carangidae	Carangiformes	1
Albula	Albulidae	Albuliformes	1
Abantennarius	Antennariidae	Lophiiformes	1
no identificado	no identificado	no identificado	62
no identificado	Serranidae	Perciformes	36
no identificado	Engraulidae	Clupeiformes	31

no identificado	Muraenidae	Anguilliformes	27
no identificado	Gobiidae	Gobiiformes	20
no identificado	Labridae	Labriformes	18
no identificado	Balistidae	Tetraodontiformes	17
no identificado	Haemulidae	Lutjaniformes	16
no identificado	Clupeidae	Clupeiformes	14
no identificado	Lutjanidae	Lutjaniformes	13
no identificado	Atherinopsidae	Atheriniformes	8
no identificado	Holocentridae	Holocentriiformes	7
no identificado	Sciaenidae	Perciformes	7
no identificado	Ophichthidae	Anguilliformes	6
no identificado	Blenniidae	Blenniiformes	6
no identificado	no identificado	Anguilliformes	5
no identificado	Exocoetidae	Beloniformes	5
no identificado	Phosichthyidae	Stomiiformes	5
no identificado	Carangidae	Carangiformes	4
no identificado	Myctophidae	Myctophiformes	4
no identificado	Bythitidae	Ophidiiformes	3
no identificado	Pomacentridae	Perciformes	3
no identificado	no identificado	Siluriformes	3
no identificado	Hemiramphidae	Beloniformes	2
no identificado	Tripterygiidae	Blenniiformes	2
no identificado	Eleotridae	Gobiiformes	2
no identificado	no identificado	Lutjaniformes	2
no identificado	Ariidae	Siluriformes	2
no identificado	Mullidae	Syngnathiformes	2
no identificado	no identificado	Tetraodontiformes	2
no identificado	Paralepididae	Aulopiformes	1

no identificado	Belonidae	Beloniiformes	1
no identificado	no identificado	Blenniiformes	1
no identificado	Cirrhitidae	Centrarchiformes	1
no identificado	Antennariidae	Lophiiformes	1
no identificado	Ophidiidae	Ophidiiformes	1
no identificado	Opistognathidae	Perciformes	1
no identificado	no identificado	Pleuronectiformes	1
no identificado	Centrolophidae	Scombriformes	1
no identificado	Tetraodontidae	Tetraodontiformes	1
Total			1275

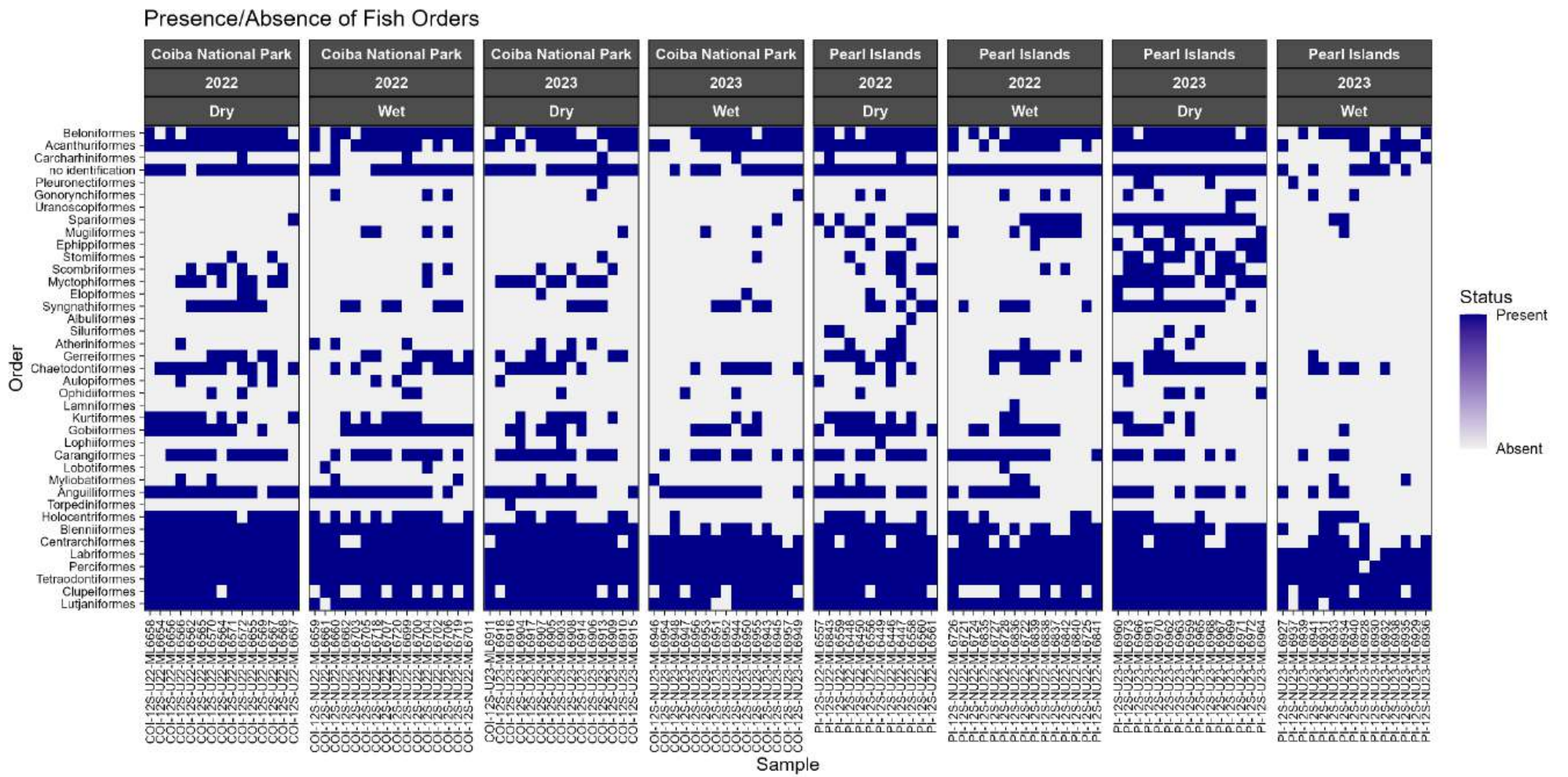


Figura 22. Heatmap de presencia y ausencia de lecturas de ASV a nivel de orden.

Nota: Los ASV están agrupados a nivel taxonómico de orden, para todas las muestras obtenidas de ambas localidades durante ambas estaciones y años (ajustada con distancia de Jaccard para agrupar muestras similares entre sí).

Tabla 6. Supuestos de normalidad y análisis de ANOVA de riqueza de ASV

Normalidad				ANOVA						
Grupo	n	Shapiro_p	Levene_p	F_value	df1	df2	p_value	Promedio Seca	Promedio Lluviosa	p_ajustado
Perlas_2022	27	0.096	0.443	7.097	1	25	0.013	52.583	41.333	0.018
Perlas_2023*	30	0.017	0.969					58.733	20.467	
Coiba_2022	31	0.243	0.869	9.849	1	29	0.004	55.067	43.125	0.008
Coiba_2023	30	0.421	0.786	5.343	1	28	0.028	48.667	39.067	0.028

*La prueba de Kruskal-Wallis para Perlas 2023:
data: richness by Estación
Kruskal-Wallis chi-squared = 21.803, df = 1, p-value = 3.021e-06

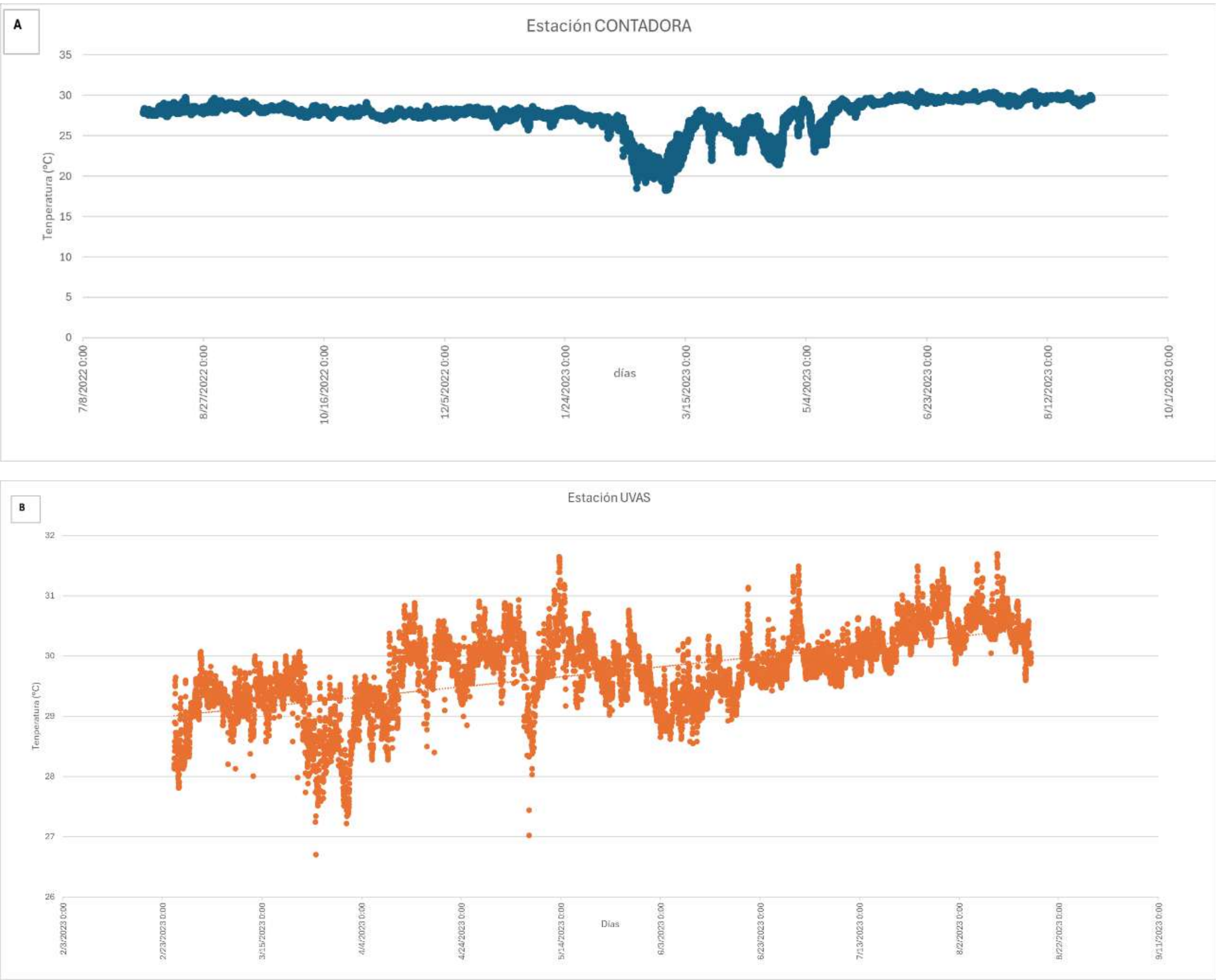


Figura 23. Perfiles generales de temperaturas de la estación de colecta de ADN ambiental 2023.
A. Archipiélago de Las Perlas – Isla Contadora, **B.** Parque Nacional Coiba - Islas Uvas.