

EVALUACIÓN DEL METABARCODING DE ADN AMBIENTAL (eDNA) PARA EL MONITOREO DE LA ICTIOFAUNA EN UN ENCLAVE PROTEGIDO DEL MAR DE ALBORÁN

Francisca Robles¹, Laura Torres^{1,2}, Alfredo Rosales-Ruiz^{1,2}, Héctor J. Pula³, Ánder Congil Ross², Marta Delgado Herrera⁴, Óscar Ocaña², Rafael Navajas-Pérez¹, Roberto de la Herrán¹, Carmelo Ruiz-Rejón¹

Departamento de Genética. Universidad de Granada¹, Fundación Museo del Mar de Ceuta, España ², Aula del Mar de la Universidad de Granada (CEI MAR) ³, Gestión Técnica Medioambiental Sur, Granada.⁴

INTRODUCCIÓN

La biodiversidad de la ictiofauna marina está experimentando un notable declive debido a la creciente presión antropogénica, especialmente por la pesca intensiva. Frente a este escenario, es crucial desarrollar estrategias de conservación respaldadas por métodos de monitoreo eficientes y no invasivos, capaces de identificar la composición específica de las comunidades marinas. En este contexto, el metabarcoding de ADN ambiental (eDNA) se presenta como una herramienta innovadora y prometedora, ya que posibilita la detección de especies marinas a partir del material genético que los propios organismos liberan en el entorno, evitando la captura directa. En el presente estudio, se evalúa la eficacia del metabarcoding de eDNA para caracterizar la diversidad de peces en La Punta de la Mona (Figura 1), un enclave marino protegido y reconocido por su elevada biodiversidad, ubicado en la Costa Tropical de Granada (Mar de Alborán).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado dos métodos de obtención de eDNA: mediante filtración de agua marina y mediante la extracción directa a partir de la esponja *Axinella polypoides*. En ambos casos, se amplificaron cuatro marcadores (tres mitocondriales y uno nuclear) cuyas características se indican en la tabla 1. Los fragmentos amplificados fueron secuenciados mediante la plataforma Illumina y las secuencias obtenidas se filtraron por calidad y fueron clusterizadas y asignadas taxonómicamente utilizando dos bases de datos complementarias: NCBI nucleotide y Mitofish, esta última especializada en ADN mitocondrial de peces (Figura 1).

OBJETIVOS

-Desarrollar y validar un sistema de biomonitorización basado en metabarcoding de ADN ambiental (eDNA) para evaluar la biodiversidad de la ictiofauna en la Punta de la Mona (Mar de Alborán)
-Comparar la eficacia de diferentes marcadores genéticos y tipos de sustrato para identificar los más eficaces en la detección de ictiofauna mediante metabarcoding de eDNA
-Evaluar la capacidad del metabarcoding de eDNA para la identificación de la ictiofauna a diferentes niveles taxonómicos comparando con las secuencias existentes en las bases de datos.
Comparar los resultados obtenidos mediante metabarcoding de eDNA con los registros históricos y actuales de especies de peces del mar de Alborán.



Figura 1. La Punta de la Mona , Almuñecar (Granada)

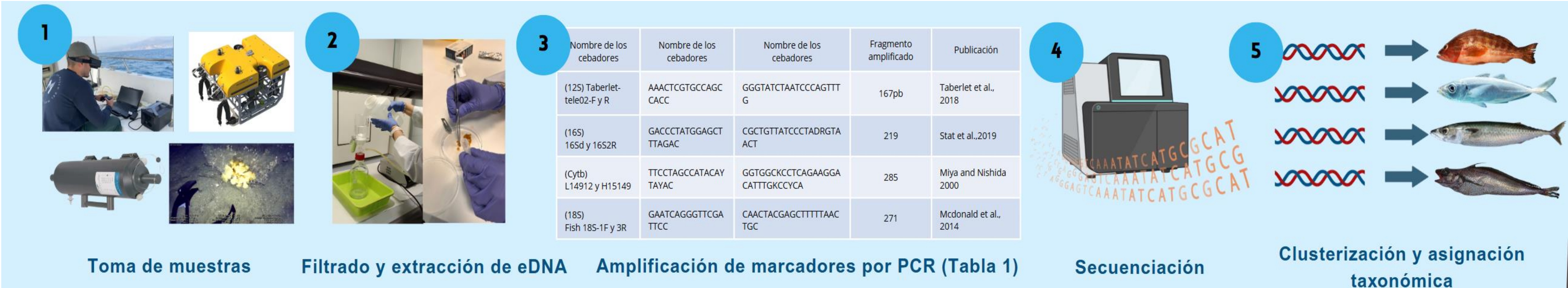


Figura 2. Esquema de los diferentes pasos utilizados en este estudio

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las muestras de agua, ninguno de los clústeres obtenidos pudo asignarse a taxones de peces. La mayoría correspondió a procariotas y a secuencias de humano. Aunque el volumen de agua filtrada (6L) se encuentra dentro del rango recomendado en la bibliografía (Miya et al., 2015), parece que no fue suficiente para recuperar ADN de peces detectable mediante metabarcoding. En contraste, las muestras de la esponja *A. polypoides* permitieron una mayor asignación de clústeres a OTUs. En muchos casos a nivel de especie, especialmente al utilizar la base de datos NCBI nucleotide, que contiene un mayor número de secuencias de los marcadores empleados en este estudio en comparación con Mitofish, a pesar de que esta última está específicamente diseñada para el metabarcoding mitocondrial de peces. Las Figuras 3, 4 y 5 muestran, para cada uno de los marcadores, los taxones a los cuales fueron asignado los diferentes clústeres, indicando el número de secuencias pertenecientes a cada uno. No se obtuvieron resultados positivos para el Cytb, posiblemente por problema de anillamiento de los cebadores.

Figura 1

Esponja 12S

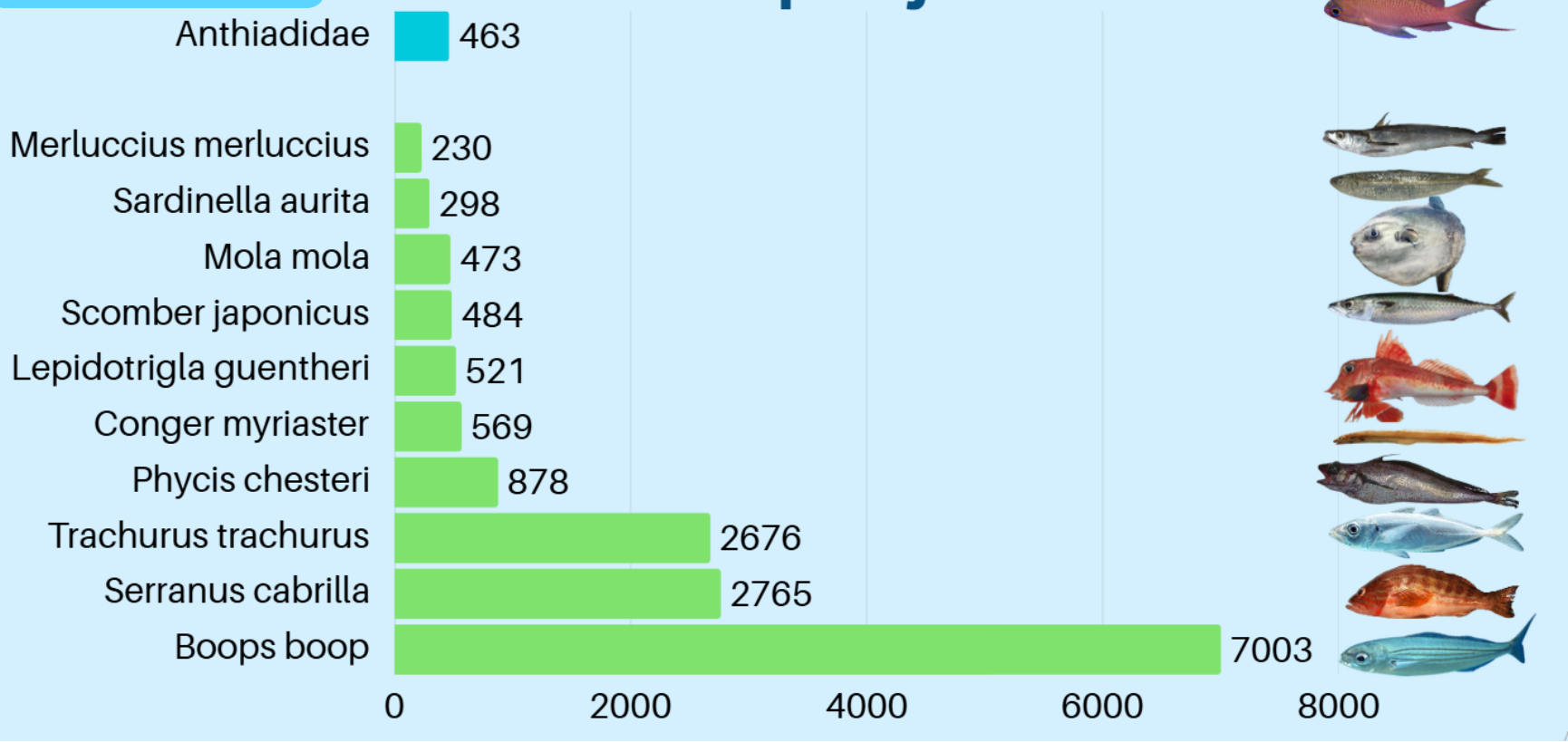


Figura 2

Esponja 16S

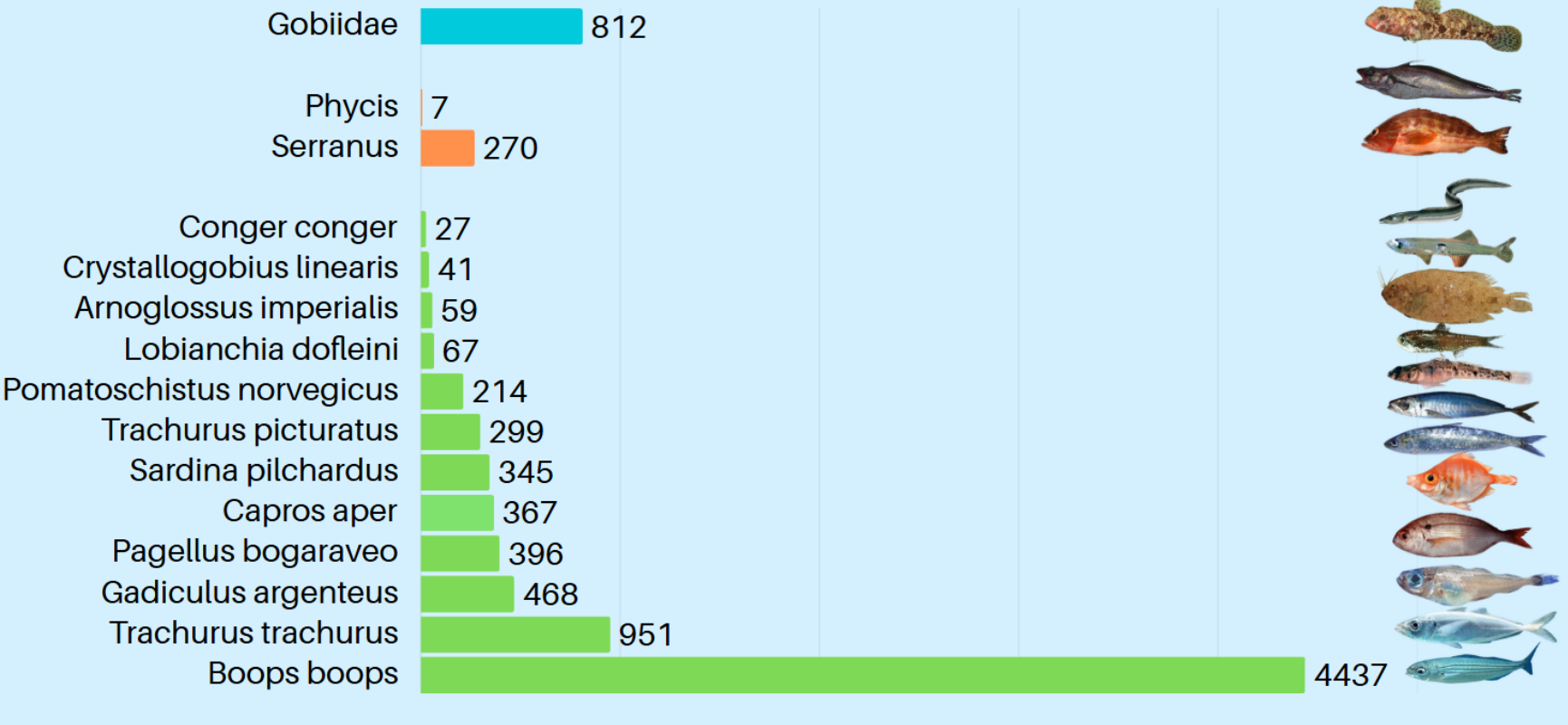
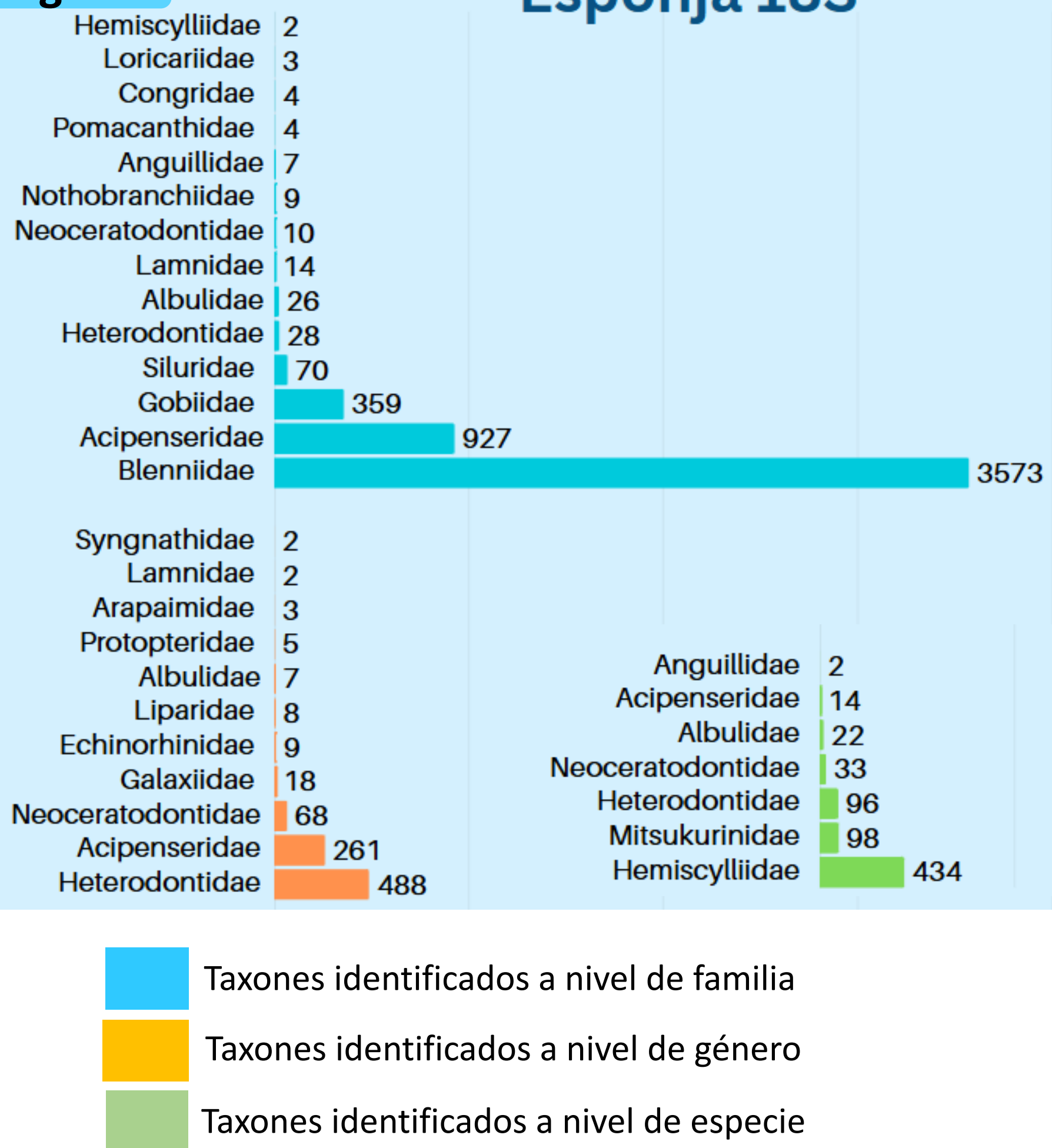


Figura 3

Esponja 18S



■ Taxones identificados a nivel de familia
■ Taxones identificados a nivel de género
■ Taxones identificados a nivel de especie

De las 36 OTUs identificadas a nivel de familia a partir del ADN presente en la esponja, 20 corresponden a especies habituales del Mar de Alborán, documentadas en guías como Litoral de Granada (Litoral de Granada, 2024). Entre las familias más frecuentes destacan Gobiidae, Sparidae y Serranidae. De las 16 familias restantes, varias de ellas como Liparidae, Pomacanthidae y Acipenseridae, son registradas en otras áreas del Mediterráneo (Matallanas, 2000; Salameh et al., 2012; Antognazza et al., 2024), por lo que su detección podría deberse a procesos de dispersión, corrientes marinas o migraciones ocasionales.

El Mar de Alborán, al ser una zona de transición entre el Mediterráneo y el Atlántico, está influenciado por corrientes que pueden transportar ADN de especies atlánticas, lo que también podría explicar la presencia de familias como Acipenseridae, presentes también en el Atlántico (Gessner, J., et al. 2024). Además, la detección de ADN de familias tropicales o de regiones alejadas, como Galaxiidae, podría deberse tanto a errores en la asignación taxonómica (causados por la falta de secuencias de referencia específicas) como al transporte de ADN a larga distancia por las corrientes marinas. Es importante considerar que el eDNA puede persistir en el ambiente y desplazarse grandes distancias, lo que puede contribuir a la detección de familias no residentes en la zona de estudio (Deiner et al., 2016).

CONCLUSIONES

1. La extracción de ADN ambiental a partir de *Axinella polypoides* permitió detectar mayor diversidad de peces que el muestreo de agua, donde el volumen filtrado resultó insuficiente.
2. La base de datos NCBI nucleotide permitió asignar más OTUs a nivel de especie que Mitofish, gracias a su mayor cobertura y actualización de secuencias.
3. Los marcadores mitocondriales 12S y 16S son los más efectivos para identificar especies de peces. Ambos permitieron la identificación de un mayor número de especies con alta resolución, superando al marcador nuclear 18S, que detectó más familias pero con menor precisión a nivel de especie.
4. Se identificaron familias propias del Mar de Alborán y otras de áreas más lejanas, lo que refleja la capacidad del eDNA para captar señales de dispersión y migración, aunque también posibles errores de asignación. Entre las familias más frecuentemente detectadas se encuentran Gobiidae, Sparidae y Serranidae, habituales en el Mar de Alborán.
5. La combinación de varios marcadores y bases de datos es clave para una detección más completa de la ictiofauna y una mayor identificación de la diversidad presente.

Antognazza, C.M.; Ramazzotti, F.; Bruno, A.; Galimberti, A.; Di Francesco, M.; Zaccara, S. A Novel eDNA-Based Approach for the Monitoring and Management of the Endangered Beluga (Huso huso, Linnaeus, 1758) and Adriatic (Acipenser naccarii, Bonaparte, 1836) Sturgeon. *Environments* 2024, 11, 160.

Deiner, K., Fronhofer, E. A., Mächler, E., Walser, J.-C., & Altermatt, F. (2016). Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nature Communications*, 7, 12544.

MacDonald AJ, Young MJ, Lintermans M, Sarre SD (2014). Primers for detection of Macquarie perch from environmental and trace DNA samples. *Conserv Genet Resour*. 6(3):551–3

Matallanas, J. (2000). On Mediterranean and some north-eastern Atlantic Liparidae (Pisces: Scorpaeniformes) with the restoration of Eutelichthys. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 80, 935–939.

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., Minamoto, T., ... 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), 150088.

Miya M., Nishida M. (2000). Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: A tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17: 437-455.

Salameh, P., Sonin, O., Edelist, D. & Golani, D. (2012). The first substantiated record of the yellowbar angelfish, Pomacanthus maculosus (Actinopterygii: Perciformes: Pomacanthidae) in the Mediterranean. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 42(1), 73–74.

Stat, M., John, J., DiBattista, J.D., Newman, S.J., Bunce, M. and Harvey, E.S. (2019). Combined use of eDNA metabarcoding and video surveillance for the assessment of fish biodiversity. *Conservation Biology*, 33: 196-205.

Taberlet, Pierre, and others (2018). *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring* (Oxford, 2018; online edn, Oxford Academic, 22 Mar. Universidad de Granada. (2024, 18 de diciembre). El litoral granadino. <https://litoraldegranada.ugr.es/>

Agradecimientos: Análisis de la diversidad de peces mediante la metodología eDNA en el Mar de Alborán. Proyecto CEI-MAR-2023-(CEI-TR-05). CONVOCATORIA DE AYUDAS A PROYECTOS PARA EL IMPULSO DE LA ECONOMÍA AZUL. TRANSFERENCIA E INNOVACIÓN. PLAN PROPIO CEI-MAR 2023.

El proyecto *CEI_Mar 2* se desarrolla con la colaboración de la Fundación Biodiversidad del Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, a través del programa *Pleamar*, y se cofinancia por la Unión Europea por el FEMPA (Fondo Europeo Marítimo , de Pesca y Acuicultura).