

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an



Proyecto No. 00089333: "Aumentar las Capacidades Nacionales para el Manejo de las Especies Exóticas Invasoras (EEI) a través de la Implementación de la Estrategia Nacional de EEI"

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Actividades de muestreo para la obtención de línea base y ADN medioambiental



Fotografía: Chanchah Veracruz, Manuel Elías-Gutiérrez/ECOSUR, 2019

EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR, UNIDAD CHETUMAL

Octubre/2019

"Las opiniones, análisis y recomendaciones de política incluidas en este informe no reflejan necesariamente el punto de vista del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo, como tampoco de su junta ejecutiva ni de sus estados miembros."



Al servicio
de las personas
y las naciones

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Título: *Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an*

Objetivo: *Elaborar la línea base de la biodiversidad algunos en los sistemas dulceacuícolas de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an que servirá de sustento en la elaboración de un protocolo de detección temprana de especies exóticas con herramientas moleculares.*

Autor(es): *Martha Valdez-Moreno y Manuel Elías Gutiérrez*

Modo de citar: PNUD México (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo). 2019. Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an. Proyecto 00089333 "Aumentar las capacidades de México para manejar especies exóticas invasoras a través de la implementación de la Estrategia Nacional de Especies Invasoras". Valdez-Moreno, M. & M., Elías Gutiérrez. El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Chetumal, Quintana Roo, México. 65 pp.

Área objeto del informe: Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Fecha de inicio: 1/Julio/2019

Fecha de terminación: 25/Octubre/2019

Vínculo con la Estrategia Nacional sobre Especies Invasoras: El proyecto se vincula con el Objetivo Estratégico 1: "Prevenir, detectar y reducir el riesgo de introducción, establecimiento y dispersión de especies invasoras"; Metas: 1.2, "Información científica y técnica, relevante, oportuna y accesible, que genere capacidades en diversos sectores para atender las prioridades relacionadas con las especies invasoras. 1.4 "Mecanismos y protocolos estandarizados de prevención en operación, para reducir el riesgo de introducción, establecimiento y dispersión de especies invasoras. El resultado será el proponer un sistema de biomonitorio de especies exóticas y nativas utilizando en el ADN medioambiental basado en la elaboración de la línea base de zooplancton de los sitios estudiados. Una vez completa la línea base, también se podrá utilizar la metagenómica para monitorear el zooplancton. 1.5 "Sistemas coordinados para la detección, manejo de riesgo y alerta temprana de ingreso y dispersión de especies invasoras".

Resumen: En atención a la preservación de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an, una de las Áreas Naturales Protegidas más extensa y con mayor diversidad específica y ecosistémica en México, es urgente generar información que permita la detección rápida de las especies exóticas invasoras dentro del ecosistema. Por lo tanto, se inició la primera línea base del zooplancton de 13 sistemas dulceacuícolas dentro de la Reserva usando métodos moleculares, no invasivos al medio, que permitieron la detección de 80 Unidades Taxonómicas Operativas (OTU's, por sus siglas en inglés), confirmando la presencia del copépodo exótico *Mesocyclops thermocyclopoides*, originario del sureste asiático, en el Cenote Pucté Cafetal 1. Además, se encontraron dos géneros posiblemente exóticos, estos son: el quironímido *Kiefferelus*, ampliamente distribuido en el viejo continente, con un solo registro previo en el continente americano, en Brasil, y *Cyclops*, un género holártico. No se encontró ninguna especie exótica entre el registro de los peces. Se reafirmó la efectividad del método de biomonitorio con el uso de la metagenómica, pues permitió la detección de 25 especies de peces, adicionalmente tres taxones de aves (*Aramides cajaneus*, *Megaceryle torquata* y *Meleagris gallopavo*), cinco de mamíferos (*Artibeus lituratus*, *Lampronnycteris brachyotis*, *Lonchorhina aurita*, *Oryzomys couesi* y *Pteronotus parnellii*) y dos de reptiles (*Kinosternon acutum* y *Trachemys* sp.). Asimismo, detectamos dos complejos de especies "jóvenes" en los peces (el *Bramocharax-Astyanax* y el *Cyprinodon beltrani-simus*), éstos tienen una evolución reciente por lo que presentan baja resolución para el gen COI (empleado en este proyecto), pero ambos con distribución en la península de Yucatán. Debido a que los datos obtenidos a partir de métodos moleculares comprueban una eficacia del 99% en la identificación precisa de OTU's, concluimos que los métodos de recolecta y análisis molecular pueden servir como una herramienta viable para la conservación atinada de la Reserva. Por lo que proponemos continuar con la creación de la línea base de zooplancton acuático, pues, aunque este primer resultado inició la construcción de una lista integral de especies presentes en 13 sistemas acuáticos estudiados, es necesario ampliar el estudio contemplando diferentes épocas del año e incrementando el número de microambientes de cada sistema (incluyendo vegetación sumergida, región limnética, sistema radicular de mangle y los estromatolitos).

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
2	OBJETIVO	6
	2.1 Objetivo general.....	6
	2.2 Objetivos específicos	6
3	METODOLOGÍA.....	7
	3.1 Trabajo de campo	7
	3.1.1 Área de estudio.....	7
	3.1.2 Preparativos salida al campo	9
	3.1.3 Descripción de los sitios de recolección de muestras.....	11
	Laguna Muyil.....	11
	Laguna Chunyaxché	14
	Laguna Km 48.....	15
	Cenote del Padre.....	17
	Cenote Tres Reyes 1.....	18
	Cenote tres Reyes 2	20
	Cenote Santa Teresa	21
	Minicenote	23
	Cenote Síijil Noh Ha	24
	Cenote Chanchah Veracruz.....	26
	Cenote el Toro	27
	Cenote Pucté Cafetal 1.....	29
	Cenote Pucté 2.....	30
	3.1.4 Obtención de muestras para el ADN medioambiental y filtrado de muestras en el campo	32
	3.1.5 Obtención de muestras para la elaboración de línea base de zooplancton y búsqueda de especies exóticas	36
	3.2 Trabajo de Laboratorio	36
	3.2.1 Extracción de ADN a partir de muestras de agua, Centre for Biodiversity Genomics en la Universidad de Guelph, Canadá.....	36
	3.2.2 Elaboración de la línea base de zooplancton y búsqueda de especies exóticas, Laboratorio de Código de Barras de la Vida en ECOSUR, Chetumal.....	38
4	RESULTADOS y DISCUSIÓN	41
	4.1 ADN medioambiental.....	41
	4.2 Línea base de zooplancton	44
	4.2.1 Larvas de peces	50
5	CONCLUSIONES.....	54
6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sitios donde se realizaron los muestreos.....	7
Tabla 2. Resumen de los resultados de identificación. Los géneros (complejos de especies) con baja resolución interespecífica están marcados con * Fuente: Elaboración propia, ECOSUR, 2019).....	43
Tabla 3. Lista de taxones y su presencia en los 13 sistemas estudiados (Fuente: Elaboración propia, ECOSUR, 2019).	47
Tabla 4. Lista de especies encontradas en cada método de muestreo, trampa de luz y ADN medioambiental (Fuente: Elaboración propia, ECOSUR, 2019).	50
Tabla 5. Ubicación de las especies encontradas por sitio de muestreo. *larvas de peces colectadas con la trampa de luz, + especies registradas con ADN medioambiental (eDNA)	51

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Figura 1. Mapa con los Sitios de muestreo de zooplancton, larvas de peces y eDNA en el Complejo de Sian Ka'an (Fuente: Elaboración propia, ECOSUR, 2019).	8
Figura 2. Laguna La Sabana (Fotografía: Manuel Elías Gutiérrez/ECOSUR, 2019).	9
Figura 3. Visita al comisariado de Chankah Veracruz.....	10
Figura 4. Preparación del material para el filtrado de muestras para ADN medioambiental	10
Figura 5. Vista aérea del sitio de muestreo Laguna Muyil 1.....	11
Figura 6. Laguna Muyil 1, <i>Thorichthys meeki</i> o cíclido boca de fuego en la zona de muestreo.....	12
Figura 7. Laguna Muyil 1, lugar donde se colocó la trampa de luz junto a pastos acuáticos	12
Figura 8. Laguna Muyil, recolección de agua para análisis de ADN medioambiental.....	13
Figura 11. Laguna Muyil 1, toma de muestra de agua para ADN medioambiental.....	13
Figura 9. Laguna Chunyaxche 1, colocación de la trampa cerca del manglar.....	14
Figura 10. Laguna Chunyaxché 2, lugar donde se colocó la trampa de Luz entre el manglar.	15
Figura 12. Laguna Km 48, vista general de las condiciones de la laguna. Gran abundancia de pastos y nenúfares. Fondo lodoso-fangoso.	15
Figura 13. Laguna Km 48, vista aérea del sistema.....	16
Figura 14. Laguna Km 48, toma de muestra de agua para ADN medioambiental.....	16
Figura 15. Cenote del Padre, vista aérea	17
Figura 16. Cenote del Padre, <i>Thorichthys meeki</i> o cíclido boca de fuego.....	17
Figura 17. Cenote del Padre, trampa de luz colocada en la noche	18

Figura 18. Cenote Tres Reyes 1, vista general de las condiciones del lugar, gran abundancia de pastos (<i>Carex</i> sp.), cortadera (<i>Cladium jamaicense</i>) y nenúfares (<i>Nymphaea alba</i>). Fondo lodoso-fangoso, agua clara.	18
Figura 19. Cenote Tres Reyes 1, vista aérea.....	19
Figura 20. Cenote Tres Reyes 1, imagen de la muestra de zooplancton.....	19
Figura 21. Cenote Tres Reyes 2, vista general del sitio de muestreo. Cenote tipo vaso con orillas rocosas, presencia de mucha hojarasca y árboles.	20
Figura 22. Cenote Tres Reyes 2, colocación de la trampa de Luz.....	20
Figura 23. Cenote Tres Reyes 2, imagen de la muestra de zooplancton.....	21
Figura 24. Cenote Santa Teresa, vista general del sitio de muestreo. Cenote pequeño con orillas rocosas, presencia de hojarasca y árboles.....	21
Figura 25. Cenote Santa Teresa, colocación de la trampa de Luz.....	22
Figura 26. Cenote Santa Teresa, imagen que muestra el proceso de obtención y fijación de la muestra de zooplancton.	22
Figura 27. Minicenote, vista general del sitio de muestreo. Cenote pequeño con orillas rodeado de cortadera (<i>Cladium jamaicense</i>) y árboles y troncos tirados.....	23
Figura 28. Minicenote, colocación de la trampa de Luz.....	23
Figura 29. Minicenote, toma de muestra de agua para ADN medioambiental.	24
Figura 30. Cenote Síijil Noh Há, vista general del sitio de muestreo. Este cenote se encuentra embebido en la laguna, profundo de aguas claras con poca materia en suspensión. Las orillas rodeados con poca vegetación, lodoso.	24
Figura 31. Cenote Síijil Noh Há, toma de muestra de agua para ADN medioambiental.....	25
Figura 32. Cenote Síijil Noh Há, vista aérea.	25
Figura 33. Cenote Chanchah Veracruz. Vista general del sitio de muestreo. Cenote de aguas claras rodeado de cortadera (<i>Cladium jamaicense</i>).....	26
Figura 34. Cenote Chanchah Veracruz, colocación de la trampa de Luz.	26
Figura 35. Cenote Chanchah Veracruz, toma de muestra de agua para ADN medioambiental.....	27
Figura 36. Cenote El Toro, vista general del sitio de muestreo. Cenote de aguas claras ligeramente verdosa.....	27
Figura 37. Cenote El Toro, colocación de la trampa de Luz.	28
Figura 38. Cenote El Toro, toma de muestra de agua para ADN medioambiental.	28
Figura 39. Cenote Pucté Cafetal 1, vista general del sitio de muestreo. Cenote de aguas claras ligeramente verdosa	29
Figura 40. Cenote Pucté Cafetal 1, obtención de muestras de trampas de luz y agua para ADN medioambiental.	29
Figura 41. Cenote Pucté Cafetal 1, condiciones del terreno para llegar al cenote, ocasionadas por un incendio previo.	30
Figura 42. Cenote Pucté 2, vista general del sitio de muestreo.	30
Figura 43. Cenote Pucté 2, colocación de la trampa de luz.	31
Figura 44. Cenote Pucté 2, toma de muestra para metagenómica.	31
Figura 45. Limpieza del material para evitar contaminación de la muestra	32
Figura 46. Equipo para la filtración de muestras de ADN medioambiental (bombas de vacío, frascos kitasato con los filtros para el agua)	33

Figura 47. Procesando muestras.....	33
Figura 48. Detalle del material para filtrado (bombas de vacío, frasco kitasato con el filtro para el agua).....	34
Figura 49. Vista del filtro con la muestra	34
Figura 50. Colocación del filtro dentro de un tubo falcón para poder ser transportados ...	35
Figura 51. Envío de muestras de ADN medioambiental.....	35
Figura 52. Trampas de luz utilizadas en el muestreo	36
Figura 53. Página del proyecto en BOLD donde está incluida toda la información referente a los especímenes generada en este proyecto (actualización del 5/noviembre/2019).	44
Figura 54. Reproducción de la figura 9 de Elías-Gutiérrez et al. (2018). a) Corresponde a la acumulación de especies en Bacalar después de 16 eventos de muestreo con diferentes métodos; b) Corresponde a la acumulación de especies en un lago templado (Eel Lake, Canadá).....	53

1 INTRODUCCIÓN

Las Áreas Naturales Protegidas de Quintana Roo enfrentan, desde el punto de vista biológico, dos problemas muy importantes: la pérdida de biodiversidad y las invasiones biológicas (Santander-Mosalvo *et al.*, 2018).

La biodiversidad es tan importante que se le considera como el capital natural de la nación. Actualmente se encuentra amenazada por varios factores (pérdida de hábitat, contaminación, cambio climático, especies exóticas etc.) que se han incrementado en los últimos años (CONABIO, 2008).

En este contexto, es una prioridad para México el reconocimiento de la biodiversidad acuática, donde ocupa un lugar privilegiado a nivel mundial (Montes-Ortiz & Elías-Gutiérrez, 2018). En el caso de los organismos dulceacuícolas existen todavía enormes vacíos de información incluyendo el estado de Quintana Roo, donde en sus áreas protegidas como la reserva de Sian Ka'an, hay zonas que nunca han sido exploradas.

En el caso de las comunidades acuáticas epicontinentales, dos de los grupos más importantes son el necton, representado por los peces (y algunos otros vertebrados) y el zooplancton, representado por todos aquellos organismos que viven a la deriva en lagos, lagunas o estanques, cuyos movimientos natatorios se dan principalmente en sentido vertical en la columna de agua (Margalef, 1983).

En el caso del zooplancton, México es uno de los países con mayor riqueza de especies endémicas en este grupo (Ciros-Pérez & Elías-Gutiérrez, 1997; Elías-Gutiérrez & Suárez-Morales, 1999; Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008b; Elías-Gutiérrez & Valdez-Moreno, 2008; Quiroz-Vázquez & Elías-Gutiérrez, 2009), algunas de ellas micro-endémicas (Elías-Gutiérrez & Suárez-Morales, 1999; Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Mercado-Salas *et al.*, 2018), donde en el sureste, en particular la península de Yucatán, se han descrito numerosas especies de cladóceros, copépodos y ostrácodos con una distribución aparentemente limitada (Fiers, 1995; Fiers *et al.*, 1996; Reid & Suárez-Morales, 1999; Elías-Gutiérrez & Suárez-Morales, 1999; Suárez-Morales & Elías-Gutiérrez, 2000; Cohuo-Durán *et al.*, 2013; Yoo *et al.*, 2017), y más recientemente un copépodo calanoideo, posiblemente exclusivo de Sian Ka'an (Mercado-Salas *et al.*, 2018).

En cuanto a las invasiones biológicas es mundialmente reconocido que son un grave problema con un gran impacto ambiental (Mendoza-Alfaro & Koleff-Osorio, 2014). Su efecto pueden ser desde la degradación ambiental, pérdida de biodiversidad, contaminación genética, contribución al aumento de desastres naturales, enfermedad y muerte de los organismos nativos (Contreras-Balderas *et al.*, 2008; Ibáñez *et al.*, 2011; Mendoza-Alfaro & Koleff-Osorio, 2014) e incluso pérdidas económicas que van desde el desempleo, la pérdida de productividad, daños en la infraestructura, hasta problemas sanitarios severos, por lo que se vuelven una amenaza directa para la calidad de vida del ser humano (Aguirre-Muñoz & Mendoza-Alfaro, 2009). La biodiversidad tropical ha sido

considerada muy vulnerable a las especies invasoras, en particular los organismos de agua dulce, que pueden incluso extinguirse debido a la actividad de éstas (Clavero & García-Berthou, 2005), como ya ocurrió en la laguna de Chichancanab, en el municipio de José María Morelos, donde al menos una especie endémica de ciprinodóntido posiblemente ya se encuentra extinta debido a la presencia de *Oreochromis* spp. y *Astyanax aeneus* (Strecker, 2006).

Cabe señalar que, aunque pueden existir translocaciones de especies nativas dentro de México, solo se considerarán para los fines de este trabajo como exóticas aquellas cuyo origen sea otro continente o bien de diferentes partes del continente americano (principalmente Sudamérica). En el caso de especies invasoras, es cuando, siendo exótica o traslocada, el aumento de su población supone un problema ambiental, pues pone en peligro al resto de especies presentes en una zona determinada.

En nuestro país, no sólo se han detectado especies de peces exóticos o invasores, también existen registros de invasores dentro de los tres grupos principales del zooplancton (rotíferos, cladóceros y copépodos); en el caso de los rotíferos, por ejemplo, se encontraron *Notholca* cf. *liepetterseni* (especie europea) y *Lecane yatseni* (especie asiática) en Veracruz (Nandini *et al.*, 2017). En Isla Mujeres, Quintana Roo se registró el rotífero *Brachionus almenara* de Europa (García-Morales & Elías-Gutiérrez, 2013). En Sinaloa se detectó un copépodo calanoideo (Suárez-Morales & Arroyo-Bustos, 2012). En Chiapas y la península de Yucatán, se han detectado al menos cuatro especies exóticas de copépodos ciclopoideos (Gutiérrez-Aguirre & Suárez-Morales, 2002; Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2003; Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008a; Suárez-Morales *et al.*, 2011a; Suárez-Morales *et al.*, 2011b; Montoliu-Elena *et al.*, 2015) y un cladóceros (Montoliu-Elena *et al.*, 2019).

Es importante señalar que las especies invasoras de zooplancton se cuentan entre las más agresivas y de rápida dispersión en el mundo, por ejemplo, la pulga de agua *Daphnia lumholtzi*, un cladóceros de origen africano se expandió por todo el este de Estados Unidos en 10 años (Dzialowski *et al.*, 2000; Sousa *et al.*, 2017). Su introducción inicial se dio por huevos de resistencia (efipios) que se encontraban en el intestino de una perca africana en 1990 (Frisch *et al.*, 2013). Esta especie ya se detectó en el norte de México (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008a; Silva-Briano *et al.*, 2010) y recientemente poblaciones de estos organismos de origen norteamericano ya se encontraron en Brasil y Argentina (Simoes *et al.*, 2009; Kotov & Taylor, 2014), por lo que hay altas probabilidades de que ya se encuentre en el sur de México. Esta especie afecta al zooplancton nativo, cambiando su composición y afecta a los peces en sus etapas tempranas, pues no la pueden ingerir (Kolar & Wahl, 1998; Johnson & Havel, 2001; Engel *et al.*, 2014). Este cladóceros tiene un enorme potencial de invadir áreas del neotrópico donde todavía no ha colonizado (Sousa *et al.*, 2017). En particular el modelo de Sousa *et al.* (2017) ubica la región de la Reserva de Biosfera de Sian Ka'an como de alta idoneidad en su potencial de ser invadido debido a sus características ambientales (ver Fig. 2 de su artículo).

A pesar de estos ejemplos, se puede considerar que en nuestro país se han detectado pocas especies exóticas de invertebrados acuáticos, debido principalmente al impedimento taxonómico (Balian *et al.*, 2008) y en ocasiones por los métodos de muestreo que no han sido los adecuados.

Por otro lado, no se puede conservar esta riqueza biológica de un lugar, cuyo valor todavía es desconocido, si no se establece primero la identidad taxonómica de los organismos y así poder elaborar una línea base (inventario faunístico).

En la búsqueda de nuevas metodologías que ayuden a acelerar la solución de estos problemas, se ha utilizado metodologías de biología molecular, como la que propuso Paul Hebert (2003), el uso de un fragmento de gen mitocondrial citocromo oxidasa I (COI) como un marcador universal para la identificación de las especies, denominado códigos de barras (Hebert *et al.*, 2003). Así se inició un megaproyecto internacional para documentar la diversidad biológica de nuestro planeta empleando este gen: el Código de Barras de la Vida Internacional o IBOL, por siglas en inglés (www.ibol.org), utilizando plataformas informáticas (BOLD systems). Desde entonces se ha venido documentando la biodiversidad de México (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008a; Prado *et al.*, 2011; García-Morales & Elías-Gutiérrez, 2013) y se han descrito numerosas especies de invertebrados y peces (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008b; Montiel-Martínez *et al.*, 2008; Victor, 2012; Mercado-Salas *et al.*, 2018).

Esta metodología ha demostrado tener una eficiencia de más del 90% para la determinación de las especies (Ivanova *et al.*, 2009). Con esta técnica se han identificado adultos, larvas y huevos de especies de peces marinas mexicanas y su potencial en el manejo de pesquerías (Valdez-Moreno *et al.*, 2010). Se detectaron por primera vez áreas de desove en el Caribe Mexicano de especies de importancia económica y ecológica como por ejemplo el boquinete (*Lachnolaimus maximus*), el pez espada (*Xiphias gladius*) y el marlín blanco (*Kajikia albida*) (Leyva-Cruz *et al.*, 2016). Además, se publicó el primer trabajo para la identificación de la icitiofauna dulceacuícola de México y Guatemala (Valdez-Moreno *et al.*, 2009).

También se ha podido establecer líneas base de códigos de barras de varios lugares y así poder compararlos. Cabe destacar que el Cenote Azul y Bacalar, pese a su cercanía, solo comparten 15% de las especies (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2018; Montes-Ortiz & Elías-Gutiérrez, 2018). Estos mecanismos se perfilan como un excelente instrumento de conservación (Liu *et al.*, 2015) que permitirá reconocer cualquier alteración, como la presencia de especies exóticas desde vertebrados (como los peces) hasta invertebrados, el fenómeno del cambio climático global (Makino *et al.*, 2017), o los cambios de uso del suelo con el consecuente incremento en el uso de fertilizantes cuyos lixiviados tienen una alta probabilidad de llegar a los cuerpos de agua afectando a la composición faunística (Krishnamurthy & Francis, 2012). Así mismo, se concretaron nuevas metodologías para el desarrollo de líneas base de los sistemas acuáticos epicontinentales de la península de Yucatán (Elías-Gutiérrez *et al.*,

2018), con la finalidad de proveer una plataforma para su conservación y detección de especies exóticas.

Los autores de este estudio fueron los primeros en aplicar métodos de secuenciación tradicional para detectar especies exóticas de zooplancton en la península de Yucatán (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008a; Montoliu-Elena *et al.*, 2015; Montoliu-Elena *et al.*, 2019). Por ejemplo, cerca de Chetumal, recientemente registraron a *Moina macrocopa*, un cladócero europeo sumamente invasivo (Montoliu-Elena *et al.*, 2019), que previamente sólo se había registrado en Sudamérica (Elías-Gutiérrez & Zamuriano-Claros, 1994; Paggi, 1997; Rietzler *et al.*, 2014) También participaron activamente en el seguimiento de la invasión del pez diablo en el sur de la península de Yucatán (Martín, 2016).

Por otra parte, el ADN ambiental (eDNA, por sus siglas en inglés) es una técnica que ha ganado popularidad para el monitoreo biológico, especialmente en la detección de especies invasoras y estudios de referencia de comunidades de animales y plantas. Se define como aquel ADN que puede ser extraído de muestras ambientales como agua, sedimentos o hielo, sin la presencia directa de los organismos (Rees *et al.*, 2014), y forma parte de un conjunto de técnicas conocidas como metagenómica que utilizan las plataformas de secuenciación de 2a y 3a generación.

El ADN medioambiental se deriva de células vertidas en el medio ambiente como moco, orina, heces, saliva o gametos de los organismos en cuestión. Más de 120 artículos han considerado el eDNA, incluido un número especial sobre el tema (Thomsen & Willerslev, 2015). La rápida adopción de bio-evaluaciones basadas en el eADN refleja dos factores: mejor acceso a las secuencias de referencia (Goldberg *et al.*, 2016) necesarias para vincular las lecturas cortas de eADN a sus especies de origen, y la disponibilidad de secuenciadores de alto rendimiento que pueden generar grandes volúmenes de datos a un costo moderadamente accesible.

Los programas de biomonitoreo convencionales requieren un esfuerzo extenso con muestreo repetido en el tiempo y espacio (Baird & Hajibabaei, 2012). Debido a que estos métodos utilizan redes y electropesca, son invasivos y pueden dañar los hábitats (King & Crook, 2002; Collins *et al.*, 2013). Además, rara vez revelan todas las especies en un entorno, y cada espécimen que se recolecta debe identificarse a una especie, lo que requiere acceso a expertos taxonómicos (Gomes *et al.*, 2015). Dadas estas limitaciones, los métodos basados en eDNA son un enfoque atractivo para la cuantificación de la biodiversidad requerida para la conservación y el manejo (Valdez-Moreno *et al.*, 2019).

La mayoría de los estudios de eDNA anteriores se han centrado en la detección de especies invasoras de peces o especies acuáticas raras / en peligro de extinción (Dougherty *et al.*, 2016; Robson *et al.*, 2016; Almeida *et al.*, 2017; Farley *et al.*, 2017), aunque también se han utilizado para examinar la abundancia y biomasa de las especies de peces (Doi *et al.*, 2017; Stewart, 2019). Los primeros resultados revelaron complejidades en la adquisición e interpretación de datos que han provocado estudios para mejorar el muestreo y la

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

extracción de ADN, al tiempo que minimizan los sesgos metodológicos (Deiner *et al.*, 2015; McKee *et al.*, 2015).

En el caso de México, el grupo de trabajo de ECOSUR fue el primero en aplicar el análisis del ADN ambiental en un sistema tropical oligotrófico y con un enfoque diferente: en vez de tratar de detectar una sola especie problema, se realizó un análisis integral de la comunidad de peces (Valdez-Moreno *et al.*, 2019).

La Reserva de la Biosfera Sian Ka'an (RB Sian Ka'an), es una de las Áreas Naturales Protegidas con mayor diversidad específica y ecosistémica en México; es así que en 1987 fue declarada Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO (UNESCO, ND) y en el 2003 obtuvo la declaratoria de Sitio Ramsar.

Actualmente, se cuenta con una lista de especies exóticas invasoras y nativas con comportamiento invasor en el Complejo Sian Ka'an; en la porción de aguas epicontinentales se tiene registro, sin mencionar la localidad específica donde fueron recolectadas, de dos especies de copépodos exóticos dulceacuícolas, cuyo origen es asiático: *Mesocyclops aspericornis* y *M. thermocyclopoides* (Schüttler & Karez, 2008); así como del pez exótico invasor *Pterygoplichthys dorsalis* (coloquialmente llamado pez diablo) en la parte alta del Río Hondo -esta especie tiene la posibilidad de expandirse a otros sistemas de agua dulce- y la presencia de cultivos de tilapia (*Oreochromis mossambicus* y *O. niloticus*) cercanos al área protegida, lo que las convierte en especies exóticas con distribución potencial. Por su parte, en el ecosistema marino se tiene registro del pez león (*Pterois volitans*), especie que actualmente se encuentra distribuida desde Rhode Island, Estados Unidos hasta Venezuela, con potencial de llegar hasta Brasil (USGS, 2019).

Ante dicha problemática, es urgente realizar estudios para establecer las líneas base del zooplancton de agua dulce, para así para favorecer la detección temprana de especies exóticas en los sistemas del Complejo y establecer estrategias para su combate y/o manejo, así como acciones de restauración de la biodiversidad nativa.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo general

Desarrollar la línea base para el biomonitoreo no invasivo de ecosistemas acuáticos, basados en el gen COI y el eDNA en trece sistemas acuáticos dulceacuícolas de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an a fin de determinar la presencia de especies exóticas invasoras (EEI).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de especies exóticas invasoras en 13 cuerpos de agua dulceacuícolas dentro de la RB Sian Ka'an, aplicando las técnicas de detección de EEI basadas en muestras medioambientales de ADN (eDNA).
- Generar la línea base (inventario) del zooplancton mediante la secuenciación el gen COI) en los sitios de muestreo, identificando a las especies exóticas invasoras.
- Recolectar información para la futura elaboración de un sistema de detección temprana de EEI acuáticas en la Reserva Sian Ka'an, lo que permitirá establecer una respuesta temprana que evite su establecimiento (DTRR).

3 METODOLOGÍA

3.1 Trabajo de campo

3.1.1 Área de estudio

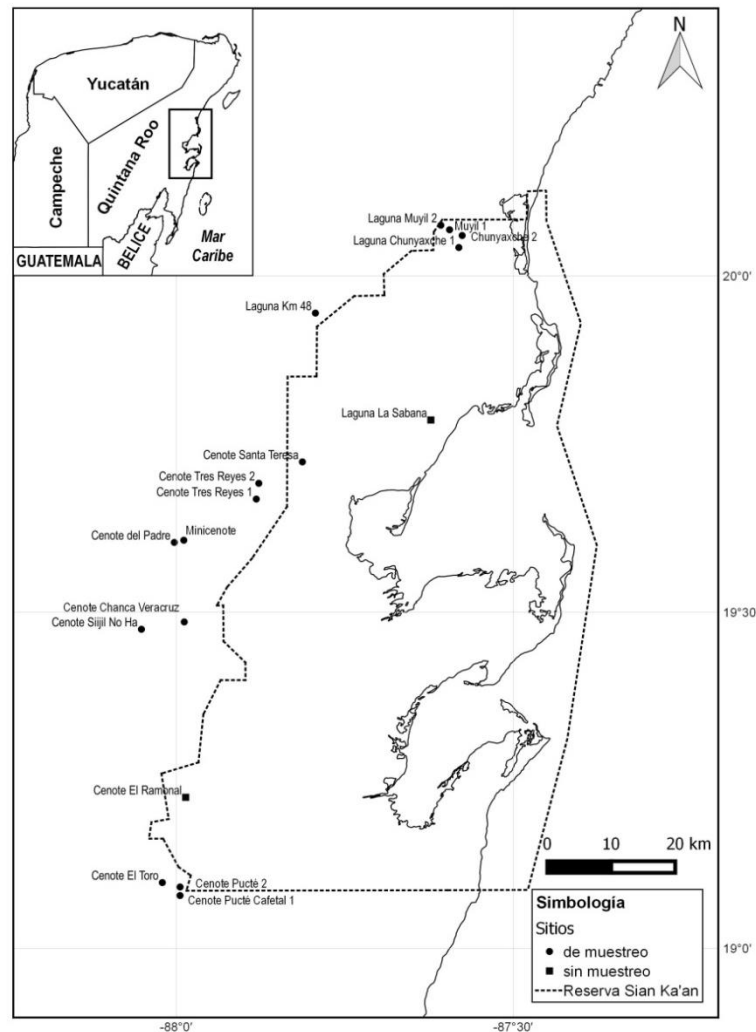
Se realizó una salida al campo del 21 al 26 de agosto del presente año para la obtención de muestras para la metagenómica y la elaboración de las líneas base.

En total se visitaron 13 sitios: Laguna Muyil, Laguna Chunyaxché, Laguna km 48, Cenote Santa Teresa, Cenote Tres Reyes 1, Cenote Tres Reyes 2, Minicenote, Cenote del Padre, Cenote Chanchah Veracruz, Cenote Síijil Noh Ha, Cenote El Toro, Cenote Pucté Cafetal 1 y Cenote Pucté 2 (Tabla 1 y Figura 1).

Tabla 1. Sitios donde se realizaron los muestreos

Nombre	Coordenadas		Zona	Municipio
	Latitud	Longitud		
Laguna Muyil 1	20.068611°	-87.594444°	Amortiguamiento	Felipe Carrillo Puerto
Laguna Muyil 2	20.075281°	-87.607322°		
Chunyaxché 1	20.042197°	-87.580711°	Amortiguamiento	Felipe Carrillo Puerto
Chunyaxché 2	20.060058°	-87.575747°		
Laguna km 48	19.943061°	-87.793825°	Zona de influencia fuera del ANP	Felipe Carrillo Puerto
Cenote del Padre	19.603764°	-88.002775°	Zona de influencia fuera del ANP	Felipe Carrillo Puerto
Cenote Tres Reyes 1	19.668225°	-87.881167°	Zona de influencia fuera del ANP	Felipe Carrillo Puerto
Cenote Tres Reyes 2	19.691622°	-87.877447°	Zona de influencia fuera del ANP	Felipe Carrillo Puerto
Cenote Santa Teresa	19.723988°	-87.813010°	Amortiguamiento	Felipe Carrillo Puerto
Minicenote	19.607006°	-87.988681°	Zona de influencia fuera del ANP	Felipe Carrillo Puerto
Cenote Síijil Noh Há	19.474628°	-88.051583°	Zona de influencia	Felipe Carrillo Puerto
Cenote Chanchah Veracruz	19.485536°	-87.987992°	Zona de influencia	Felipe Carrillo Puerto
Cenote El Toro	19.098056°	-88.020556°	Zona de influencia fuera del ANP	Bacalar
Cenote Pucté Cafetal 1	19.078789°	-87.994269°	Área de protección de Flora y Fauna Uaymil	Bacalar
Cenote Pucté 2	19.091497°	-87.994208°	Zona de influencia fuera del ANP	Bacalar

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an



* Sistema de referencia de coordenadas: EPSG:4326, WGS84, Sistema de coordenadas geográficas/

Figura 1. Mapa con los Sitios de muestreo de zooplancton, larvas de peces y eDNA en el Complejo de Sian Ka'an

(Fuente: Elaboración propia, ECOSUR, 2019).

Es importante mencionar que a lo largo del proyecto se debió realizar un cambio en los sitios de muestreo. En el caso de La Sabana, cuando se visitó el lugar, estaba seca y solo había un charco inaccesible rodeado de lodo, tal como muestra la siguiente imagen, por lo que no se pudo realizar el muestreo y fue sustituido por el Minicenote.



Figura 2. Laguna La Sabana
Fotografía: Manuel Elías Gutiérrez/ECOSUR, 2019.

El cenote El Ramonal, en comunicación personal con el Director de la Reserva de Sian Ka'an, Biól. Omar Ortiz Hernández, no fue muestreado debido a su cercanía al área de incendios todavía activos en aquel momento; así, se decidió sustituirlo por el cenote El Toro, localizado cerca de la zona y en el que no se presentaba peligro de fuego. Todo esto se habló previamente con el director de la reserva.

Los cenotes El Toro, Pucté Cafetal 1 y Pucté 2, fueron los sistemas de más difícil acceso por lo que se utilizaron motocicletas para acceder a ellos y se pernoctó en los sitios de recolección con el fin de obtener las muestras de zooplancton durante la noche, por la mañana se tomaron las muestras de agua para metagenómica.

Cada sitio se visitó en una sola ocasión. Excepto El Muyil y Laguna Chuyaxché que tienen dos estaciones de muestreo por sistema. Esto se decidió en el momento debido a que son dos sistemas grandes con diferentes ambientes y se trató de abarcar lo más posible.

3.1.2 Preparativos salida al campo

Previamente a la salida a cada sitio de muestreo, se visitó a cada uno de los comisariados ejidales responsables de cada sistema visitado para informales de las actividades que se iban a realizar durante el muestreo.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an



Figura 3. Visita al comisariado de Chankah Veracruz
Fotografía: José Ángel Cuhuo Colli/ECOSUR, 2019.

Posteriormente se preparó todo el material, el equipo necesario y el área donde se trabajarían las muestras para el ADN medioambiental, así como todos los preparativos para acampar los días siguientes.



Figura 4. Preparación del material para el filtrado de muestras para ADN medioambiental
Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.

3.1.3 Descripción de los sitios de recolección de muestras

A continuación, se describen cada uno de los sitios de recolección de muestras, fotografías y coordenadas geográficas. El orden que se siguió para presentarlos está en función de su localización en el mapa, de norte a sur (Figura 1).

Laguna Muyil

Fecha de Colecta: 24/08/2019

Se recolectó en dos puntos:

Laguna Muyil 1.- Zona de bajo a la salida del canal que comunica con la laguna de Chunyaxché

Coordenadas geográficas: 20°04'07"" N, 87°35'40" W

Laguna Muyil 2.- Cerca del muelle de la estación del guardaparque

Coordenadas geográficas: 20°04'31.01" N, 87°36'26.36" W



Figura 5. Vista aérea del sitio de muestreo Laguna Muyil 1
Fotografía: Manuel Elías Gutiérrez/ECOSUR, 2019.



Figura 6. Laguna Muyil 1, *Thorichthys meeki* o cíclido boca de fuego en la zona de muestreo
Fotografía: Adrián Uh Navarrete/ECOSUR, 2019.



Figura 7. Laguna Muyil 1, lugar donde se colocó la trampa de luz junto a pastos acuáticos
Fotografía: Adrián Uh Navarrete/ECOSUR, 2019.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an



Figura 8. Laguna Muyil, recolección de agua para análisis de ADN medioambiental
Fotografía: Sergio Chay Kumul/ECOSUR, 2019.



Figura 9. Laguna Muyil 1, toma de muestra de agua para ADN medioambiental
Fotografía: Sergio Chay Kumul/ECOSUR, 2019.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Laguna Chunyaxché

Fecha de Colecta: 24/08/2019

Se recolectó en dos puntos:

Laguna Chunyaxché 1.- Al fondo de la laguna, en zona de arenal antes de la vegetación.

Coordenadas geográficas: 20°02'31.91" N, 87°34'50.56" W

Laguna Chunyaxché 2.- Litoral con manglar, se colocó la trampa entre el manglar.

Coordenadas geográficas: 20°03'36.21" N, 87°34'32.69" W



Figura 10. Laguna Chunyaxche 1, colocación de la trampa cerca del manglar
Fotografía: Sergio Chay Kumul/ECOSUR, 2019.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an



Figura 11. Laguna Chunyaxché 2, lugar donde se colocó la trampa de Luz entre el manglar.
Fotografía: Adrián Uh Navarrete/ECOSUR, 2019.

Laguna Km 48

Fecha de Colecta: 24/08/2019

Se recolectó en un solo punto

Coordenadas geográficas: 19°56'35.02"N, 87°47'37.77"W



Figura 12. Laguna Km 48, vista general de las condiciones de la laguna. Gran abundancia de pastos y nenúfares. Fondo lodoso-fangoso.
Fotografía: Sergio Chay Kumul/ECOSUR, 2019.



Figura 13. Laguna Km 48, vista aérea del sistema
Fotografía: Manuel Elías Gutiérrez/ECOSUR, 2019.



Figura 14. Laguna Km 48, toma de muestra de agua para ADN medioambiental
Fotografía: Sergio Chay Kumul/ECOSUR, 2019.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Cenote del Padre

Fecha de Colecta: 22/08/2019

Se recolectó en un solo punto

Fecha de Colecta: 25/08/2019 muestra de ADN medioambiental

Coordenadas geográficas: 19°36'13.55"N, 88° 0'9.99"W



Figura 15. Cenote del Padre, vista aérea
Fotografía: Manuel Elías Gutiérrez/ECOSUR, 2019.



Figura 16. Cenote del Padre, *Thorichthys meeki* o cíclido boca de fuego
Fotografía: Manuel Elías Gutiérrez/ECOSUR, 2019.



Figura 17. Cenote del Padre, trampa de luz colocada en la noche
Fotografía: Manuel Elías Gutiérrez/ECOSUR, 2019.

Cenote Tres Reyes 1

Fecha de Colecta: 24/08/2019

Se recolectó en un solo punto

Coordenadas Geográficas: 19°40'5.61"N, 87°52'52.20"W



Figura 18. Cenote Tres Reyes 1, vista general de las condiciones del lugar, gran abundancia de pastos (*Carex* sp.), cortadera (*Cladium jamaicense*) y nenúfares (*Nymphaea alba*). Fondo lodoso-fangoso, agua clara.

Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.



Figura 19. Cenote Tres Reyes 1, vista aérea
Fotografía: Manuel Elías Gutiérrez/ECOSUR, 2019.



Figura 20. Cenote Tres Reyes 1, imagen de la muestra de zooplancton
Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Cenote tres Reyes 2

Fecha de Colecta: 24/08/2019

Coordenadas Geográficas: 19°41'29.84"N 87°52'38.81"W



Figura 21. Cenote Tres Reyes 2, vista general del sitio de muestreo. Cenote tipo vaso con orillas rocosas, presencia de mucha hojarasca y árboles.
Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.



Figura 22. Cenote Tres Reyes 2, colocación de la trampa de Luz.
Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.



Figura 23. Cenote Tres Reyes 2, imagen de la muestra de zooplancton.
Fotografía: Adrián Uh Navarrete/ECOSUR, 2019.

Cenote Santa Teresa

Fecha de Colecta: 24/08/2019

Se recolectó en un solo punto

Coordenadas de la recolecta: 19°43'24.61" N, 87°48'45.91" W



Figura 24. Cenote Santa Teresa, vista general del sitio de muestreo. Cenote pequeño con orillas rocosas, presencia de hojarasca y árboles.
Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.



Figura 25. Cenote Santa Teresa, colocación de la trampa de Luz.
Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.



Figura 26. Cenote Santa Teresa, imagen que muestra el proceso de obtención y fijación de la muestra de zooplancton.
Fotografía: José Ángel Cuhuo Colli/ECOSUR, 2019.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Minicenote

Fecha de Colecta: 24/08/2019

Se recolectó en un solo punto

Coordenadas geográficas: 19°36'25.22" N, 87°59'19.25"W



Figura 27. Minicenote, vista general del sitio de muestreo. Cenote pequeño con orillas rodeado de cortadera (*Cladium jamaicense*) y árboles y troncos tirados.
Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.

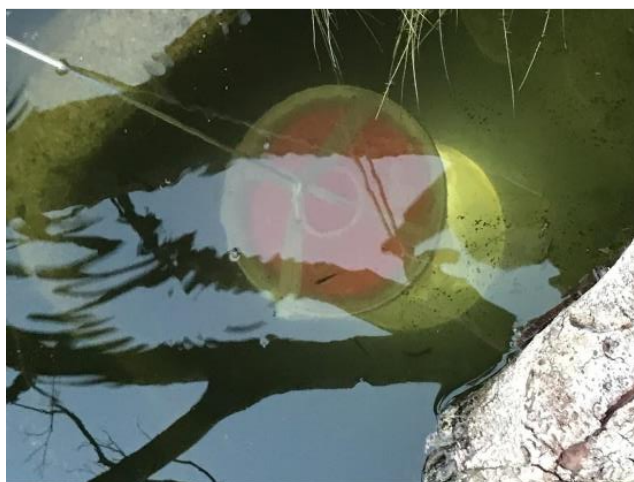


Figura 28. Minicenote, colocación de la trampa de Luz.
Fotografía: Sergio Chay Kumul/ECOSUR, 2019.



Figura 29. Minicenote, toma de muestra de agua para ADN medioambiental.
Fotografía: Sergio Chay Kumul/ECOSUR, 2019.

Cenote Síijil Noh Ha

Fecha de Colecta: 22/08/2019

Se recolectó en un solo punto

Coordenadas de la recolecta: 19°28'28.66" N, 88°03'05.70" W



Figura 30. Cenote Síijil Noh Há, vista general del sitio de muestreo. Este cenote se encuentra embebido en la laguna, profundo de aguas claras con poca materia en suspensión. Las orillas rodeadas con poca vegetación, lodoso.

Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.



Figura 31. Cenote Síijil Noh Há, toma de muestra de agua para ADN medioambiental
Fotografía: Erika Alarcón Chavira/ECOSUR, 2019.



Figura 32. Cenote Síijil Noh Há, vista aérea.
Fotografía: Manuel Elías Gutiérrez/ECOSUR, 2019, agosto 2019.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Cenote Chancah Veracruz

Fecha de Colecta: 22/08/2019

Coordenadas de la recolecta: 19°29' 7.93" N, 87°59' 16.77"W



Figura 33. Cenote Chancah Veracruz. Vista general del sitio de muestreo. Cenote de aguas claras rodeado de cortadera (*Cladium jamaicense*).

Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.



Figura 34. Cenote Chancah Veracruz, colocación de la trampa de Luz.

Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an



Figura 35. Cenote Chancah Veracruz, toma de muestra de agua para ADN medioambiental.
Fotografía: Erika Alarcón Chavira/CONANP, 2019.

Cenote el Toro

Fecha de Colecta: 25/08/2019

Se recolectó en un solo punto.

Coordenadas geográficas: 19°05'53" N, 88°01'14" W



Figura 36. Cenote El Toro, vista general del sitio de muestreo. Cenote de aguas claras ligeramente verdosa

Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.



Figura 37. Cenote El Toro, colocación de la trampa de Luz.
Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.



Figura 38. Cenote El Toro, toma de muestra de agua para ADN medioambiental.
Fotografía: Erika Alarcón Chavira/CONANP, 2019.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Cenote Pucté Cafetal 1

Fecha de Colecta: 25/08/2019

Se recolectó en un solo punto

Coordenadas geográficas: 19°04'43.64 N, 87°59'39.37"W



Figura 39. Cenote Pucté Cafetal 1, vista general del sitio de muestreo. Cenote de aguas claras ligeramente verdosa
Fotografía: Iván Canul Palma/ECOSUR, 2019.



Figura 40. Cenote Pucté Cafetal 1, obtención de muestras de trampas de luz y agua para ADN medioambiental.
Fotografía: Iván Canul Palma/ECOSUR, 2019.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an



Figura 41. Cenote Pucté Cafetal 1, condiciones del terreno para llegar al cenote, ocasionadas por un incendio previo.

Fotografía: Iván Canul Palma/ECOSUR, 2019.

Cenote Pucté 2

Fecha de Colecta: 25/08/2019

Se recolectó en un solo punto

Coordenadas Geográficas: 19°05'29.39" N, 87°59'39.15" W.



Figura 42. Cenote Pucté 2, vista general del sitio de muestreo.

Fotografía: José Ángel Cohuo Colli/ECOSUR, 2019.



Figura 43. Cenote Pucté 2, colocación de la trampa de luz.
Fotografía: José Ángel Cohuo Colli/ECOSUR, 2019.



Figura 44. Cenote Pucté 2, toma de muestra para metagenómica.
Autor: José Angel Cohuo Colli/ECOSUR, 2019.

3.1.4 Obtención de muestras para el ADN medioambiental y filtrado de muestras en el campo

En cada sitio, se tomó una muestra de 1 L de agua cerca de la región litoral y se colocó en una botella de CIVEQ® esterilizada; las botellas y el equipo de muestreo se manejaron con guantes para minimizar la contaminación con ADN humano. Todas las muestras se colocaron inmediatamente en hielo y luego se transportaron al laboratorio montado en la casa que se rentó en Carrillo Puerto para el procesamiento de las muestras. Para minimizar la degradación de ADN ambiental, las muestras de agua se filtraron dentro de las primeras 12 horas a partir de su recolección.

Antes de proceder al filtrado de las muestras, todas las superficies y materiales de laboratorio se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 10%, seguido de etanol al 70%; se cambiaron los guantes entre cada muestra. Cada muestra se filtró a través de filtros de 0,22 μm , donde quedó el ADN. Los filtros se almacenaron en tubos falcón, colocados inmediatamente en un congelador a -18°C . Al día siguiente fueron transportados desde el sitio de trabajo hasta en frío desde ciudad de Cancún, para ser trasladados por paquetería a uno de los laboratorios del Centre for Biodiversity Genomics (CBG) en Guelph, Canadá, lugar donde se realizó la extracción de ADN. El proceso entre la filtración y la extracción de ADN fue inferior a 48 horas para evitar su degradación.

En las siguientes fotografías se ejemplifica el trabajo realizado en el laboratorio implementado en Carrillo Puerto.

Las muestras de agua para ADN medioambiental fueron tomadas el mismo día (Fecha de Colecta: 25/08/2019) para que fueran todas procesadas al mismo tiempo, como se muestra en las siguientes fotografías:



Figura 45. Limpieza del material para evitar contaminación de la muestra
Fotografía: Erika Alarcón Chavira/CONANP, 2019.



Figura 46. Equipo para la filtración de muestras de ADN medioambiental (bombas de vacío, frascos kitasato con los filtros para el agua)
Fotografía: Erika Alarcón Chavira/CONANP, 2019.



Figura 47. Procesando muestras
Fotografía: Erika Alarcón Chavira/CONANP, 2019.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Vista del manejo de los filtros después de haber realizado el filtrado.



Figura 48. Detalle del material para filtrado (bombas de vacío, frasco kitasato con el filtro para el agua)

Fotografía: Erika Alarcón Chavira/CONANP, 2019.



Figura 49. Vista del filtro con la muestra
Fotografía: Erika Alarcón Chavira/CONANP, 2019.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an



Figura 50. Colocación del filtro dentro de un tubo falcón para poder ser transportados
Fotografía: Erika Alarcón Chavira/CONANP, 2019.

Finalmente, el lunes 26 de agosto todas las muestras se prepararon para su envío por DHL a Cancún para enviarse al Centre for Biodiversity Genomics en la Universidad de Guelph, Canadá, en donde se realizará el proceso de eDNA.



Figura 51. Envío de muestras de ADN medioambiental
Fotografía: Erika Alarcón Chavira/CONANP, 2019.

3.1.5 Obtención de muestras para la elaboración de línea base de zooplancton y búsqueda de especies exóticas

En cada sitio de recolecta se colocó una trampa de luz de diseño propio (Figura 5), creada para sistemas lénticos tropicales, y cada una se dejó trabajando durante la noche (la instalación fue entre las 19:00 a 20:00 horas y fueron recogidas entre las 6:30 a 7:00 hrs del siguiente día); excepto en el Minicenote, donde se dejaron por solo tres horas, lo cual fue suficiente para que se saturara la red. Inmediatamente después de su recolección, las muestras se lavaron en un tamiz de 50 μm con etanol frío, sin desnaturalizar ($\pm 4^\circ\text{C}$) al 96% para extraer toda el agua, antes de que las muestras se transfieran a un frasco, con una proporción de 1/3 de muestra y 2/3 de etanol sin desnaturalizar. Los frascos de muestra se colocaron en un recipiente con hielo para transferirlos al laboratorio donde fueron almacenados en un congelador a -18°C durante al menos una semana. Después de este período, las muestras se almacenaron a temperatura ambiente y están listas para su revisión.



Figura 52. Trampas de luz utilizadas en el muestreo
Fotografía: Martha Valdez Moreno/ECOSUR, 2019.

3.2 Trabajo de Laboratorio

3.2.1 Extracción de ADN a partir de muestras de agua, Centre for Biodiversity Genomics en la Universidad de Guelph, Canadá.

Antes de la extracción del ADN, todas las superficies de laboratorio y los pipeteadores se esterilizaron con hipoclorito de sodio al 10%, seguido de etanol al 70%. Las pipetas se limpiaron repetidamente con hipoclorito de sodio al 10%, seguido de etanol al 70% durante la extracción y los guantes se cambiaron con frecuencia. Los rotores de centrifugación, los adaptadores y los bastidores de tubos se lavaron con ELIMINase diluido (Decon Labs) (1:10) y se enjuagaron con agua desionizada.

El ADN se extrajo de los filtros de las muestras de agua usando un kit de extracción de ADN PowerWater (MoBio) siguiendo un protocolo de lisis modificado (los tubos se incubaron a 65 °C antes de la etapa de molienda) con modificaciones menores para evitar la contaminación cruzada entre muestras; todos los pasos que requieren 650 µl se redujeron a 625 µl. Las columnas se incubaron a 56 °C durante 15 minutos antes de la elución del ADN en 100 µl de tampón PW6 y se cuantificaron utilizando el kit Qubit 2.0 y el dsDNA de HS.

Amplificación por PCR

Para aumentar la recuperación de especies y superar el posible sesgo de PCR introducido por los cebadores de fusión marcados con los UMI (identificadores moleculares únicos) seguimos un enfoque de PCR de dos pasos con la primera ronda empleando cebadores convencionales, donde el producto de PCR diluido sirvió como plantilla para una segunda ronda de PCR con los cebadores de fusión que contienen adaptadores de secuenciación y las etiquetas con Identificadores Moleculares Únicos (UMI, por sus siglas en inglés).

Se amplificó un segmento de 184-187 pb de la región del código de barras de COI con dos conjuntos de cebadores (AquaF2 / C_FishR1, AquaF3 / C_FishR1), que son efectivos para los vertebrados.

Las reacciones de PCR emplearon la mezcla maestra descrita por Hajibabaei *et al.* (2005) y Platinum Taq. La primera ronda de PCR empleó el siguiente régimen térmico: 94 °C durante 2 min, 40 ciclos de 94 °C durante 40 s, annealing 51 °C para AquaF2 o 50 °C para AquaF3 durante 1 min, y 72 °C por 1 min, con una extensión final a 72 °C durante 5 min.

Después de la primera ronda, los productos de la PCR se diluyeron dos veces con agua de grado molecular y se transfirieron 2 µl a un nuevo tubo para una segunda ronda de la PCR con el objeto de crear bibliotecas de amplicones etiquetadas con identificadores moleculares únicos (UMI) y con cebadores de fusión que contienen Ion Xpress™ Etiquetas MID y los adaptadores de iones. Cada localidad tuvo una etiqueta diferente, que permitió reconocer de donde provenían las secuencias.

El régimen de PCR para la segunda ronda consistió en 94 °C durante 2 min, 20 ciclos de 94 °C durante 40 s, annealing a 51 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min, con una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en un E-Gel96 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Las bibliotecas para AquaF2 / C_FishR1 y AquaF3 / C_FishR1 se purificaron por separado usando perlas magnéticas preparadas y se cuantificaron usando el kit de ADN de Qubit 2.0 y HS, y se normalizaron a 13 pM antes de la secuenciación. Las bibliotecas de amplicones se secuenciaron en un secuenciador S5, utilizando los kits de 400 plantillas y secuenciación siguiendo las instrucciones del fabricante con un chip 530.

Determinación de especies

El procesamiento de las lecturas del secuenciador se realizó con el software Cutadapt (v1.8.1) para recortar secuencias de cebadores; Sickle (v1.33) se usó para el filtrado de tamaño (se retuvieron secuencias de 150-250 pb), mientras que se utilizó Uclust (v1.2.22q) para reconocer las OTU basadas en la identidad > 98% y una profundidad de lectura mínima de 2 umbrales. El algoritmo Local Blast 2.2.29+ se usó para comparar cada OTU con las secuencias de referencia en cinco conjuntos de datos: datos públicos de peces de BOLD filtrados a nivel de identificación de género y especie (130,357 secuencias), y datos públicos de BOLD para Amphibia, Aves, Mammalia y Reptilia representada por los siguientes conjuntos de datos: DS-EBACAMPH (11,018 secuencias), DS-EBACAVES (28,914 secuencias), DS-EBACMAMM (39,890 secuencias), DS-EBACREPT (5,424 secuencias). Los resultados de la salida de Raw Blast se analizaron utilizando un script de Python personalizado OTUBlastParser.py, y se concatenaron utilizando ConcatenatorResults.py (Bessonov, 2018). Los resultados procesados en formato delimitado por tabuladores se importaron a Excel. Se realizó un filtrado por puntaje mínimo de 250, y 97-100% de rango de identidad para identificar a las especies.

Cabe mencionar que el ADN humano fue detectado en las muestras, pero esas secuencias fueron eliminadas del estudio.

3.2.2 Elaboración de la línea base de zooplancton y búsqueda de especies exóticas, Laboratorio de Código de Barras de la Vida en ECOSUR, Chetumal.

Preparación de los especímenes

En el laboratorio, se procedió a la separación de los especímenes de las muestras por morfotipos, utilizando un microscopio estereoscópico u óptico, dependiendo de la talla de los ejemplares y de la dificultad en su categorización. Después cada uno de ellos fue fotografiado. En algunos casos se generarán imágenes apiladas por el eje Z utilizando el software Helicon Focus 6.5.1 (Martínez-Caballero *et al.*, 2017).

Extracción y amplificación de ADN.

El ADN se extrajo utilizando un método estándar de fibra de vidrio (Ivanova *et al.*, 2006). La forma es que se extrajo la muestra de tejido para la extracción del ADN se detalla a continuación: individuos completos, en el caso de taxones pequeños como los rotíferos (<0,3 mm). En el caso de los ácaros del agua, se les extrajo el ADN y posteriormente se recuperaron de los filtros (Porco *et al.*, 2010), conservandolos en etanol al 96% con una gota de glicerol: para los cladóceros, se utilizaron los embriones o la segunda antena. En el caso de los copépodos grandes (mayores a 1.5 mm), se extrajo los músculos dorsales del cefalotórax o los huevos (en el caso de las hembras ovígeras). En otros grupos, como insectos, solo se cortó una fracción de una pata. Finalmente, para las larvas de peces, se

utilizó preferentemente el ojo del lado derecho. Los especímenes que no se perdieron durante la extracción se colocaron nuevamente en etanol y se depositaron en la Colección de Referencia de ictioplancton y zooplancton del ECOSUR, Unidad Chetumal a manera de *vouchers*.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Después de la extracción de ADN, se agregaron 2 µL de cada extracto de ADN a una mezcla de PCR que consiste en 2 µL de agua ultrapura Hyclone (Thermo Fisher scientific), 6.25 µL de D - (+) - trehalosa dihidratada al 10% (Fluka Analytical), 1.25 µL de 10X Platinum Taq buffer (Invitrogen), 0.625 µL de 50 µM MgCl₂ (Invitrogen), 0.0625 µL de 10 µM dNTP (KAPA Biosystems), 0.125 µL de cada cebador 10 µM (cebadores Zplank, ver Prosser *et al.*, 2013 para detalles), y 0.06 µL de PlatinumTaq (Invitrogen). El total de la mezcla, incluyendo el templado de ADN fue de 12.5 µL. Todas las muestras se amplificaron con los cebadores Zplank y/o el cóctel C-Fish (Ivanova *et al.*, 2007; Prosser *et al.*, 2013).

El termociclado permite realizar los ciclos de temperaturas necesarios para producir la amplificación de ADN con el método de Sanger. Las reacciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: aumentar la temperatura a 95° C durante 1 minuto, continuar con 5 ciclos de 94° C durante 40 segundos, bajar la temperatura a 45° C durante 40 segundos, después subir la temperatura a 72° C durante 1 minuto y luego 35 ciclos a 94° C durante 40 minutos, seguidos de 51° C durante 40 segundos, 72° C durante 1 min y una extensión final de 72° C durante 5 minutos.

Los productos de PCR (ADN amplificado) se visualizaron en un gel de agarosa al 2% utilizando un sistema de electroforesis de agarosa de 95 pozos E-Gel (Invitrogen) y se seleccionaron aquellos que muestran un producto de PCR óptimo para la secuenciación.

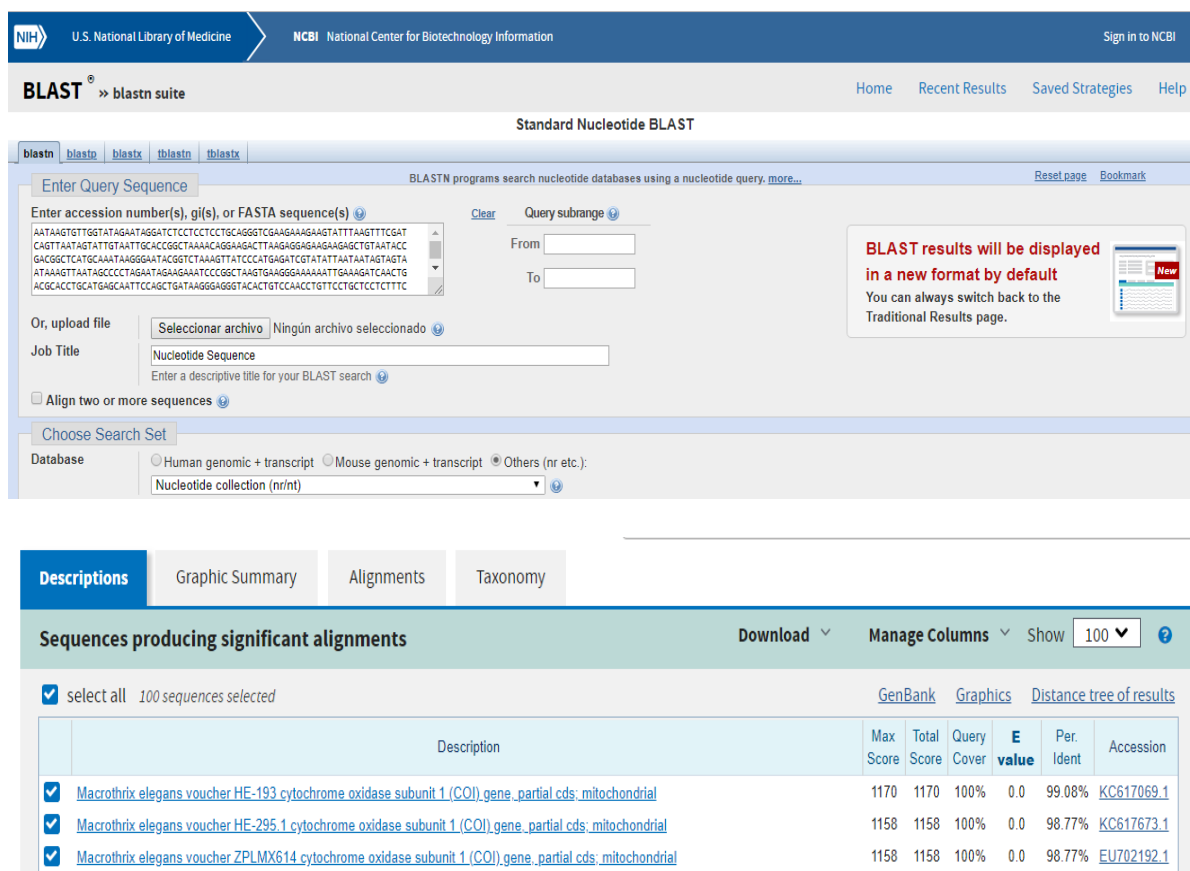
Secuenciación y análisis de datos

Los productos de PCR se secuenciaron utilizando un kit de secuenciación BigDye © Terminator v.3.1 modificado (Hajibabaei *et al.*, 2005) (Applied Biosystems, Inc.). La secuenciación fue bidireccional en un secuenciador automatizado ABI 3730XL, utilizando los cebadores M13F y M13R. Las secuencias se editaron utilizando el programa CodonCode v. 3.0.1 (CodonCode Corporation, Dedham, Massachusetts), se subieron a la base de datos del sistema BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007). Estos datos se harán disponibles a través de un dataset específico dentro del proyecto “Zooplankton from epicontinental water systems associated to Biosphere Reserve Sian Kaan” (SKAAN”) (boldsystems.org). Todos los datos se analizaron con las herramientas en BOLD y todas las secuencias se examinaron para establecer que estén limpias, o sea que no tengan la presencia de codones de parada e indeles, así como una comprobación contra NUMTS (DNA mitocondrial incorporado al núcleo de la célula) (Ratnasingham & Hebert, 2007).

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Identificación de los especímenes

La identificación molecular se realizó mediante la técnica de BLAST en GenBank y sólo se consideró hasta el nivel de especie cuando la divergencia fue de 3% o menos. Para el rango de género se consideró hasta un 10%-12% de divergencia. Finalmente, para taxones superiores ya sea nivel de familia, subfamilia u orden se consideraron valores por arriba del 12%, pero menores del 20%. Cada taxón identificado, independientemente del nivel (especie a orden) se consideró una Unidad Taxonómica Operacional (OTU, por sus siglas en inglés).



The screenshot displays the NCBI BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) interface. The top navigation bar includes the NIH logo and links to the U.S. National Library of Medicine and NCBI. The main header shows "BLAST" and "blastn suite". The search form is titled "Standard Nucleotide BLAST" and includes fields for "Enter Query Sequence", "Job Title", and "Database". The "Database" dropdown is set to "Nucleotide collection (nr/nt)". The search results section, titled "Sequences producing significant alignments", shows three matches from Macrothrix elegans, all with 100% query cover and 98.77% identity.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Macrothrix elegans voucher HE-193 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1170	1170	100%	0.0	99.08%	KC617069.1
Macrothrix elegans voucher HE-295.1 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1158	1158	100%	0.0	98.77%	KC617673.1
Macrothrix elegans voucher ZPLMX614 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial	1158	1158	100%	0.0	98.77%	EU702192.1

Figura 53. Ejemplo de cómo se realizó la identificación molecular de los especímenes secuenciados mediante la técnica de BLAST en GenBank.

Cabe mencionar que la extracción, purificación y amplificación de ADN de las muestras de zooplancton se realizó en el laboratorio de código de barras de la vida en Chetumal y los amplificados se mandaron a secuenciar a Eurofins en Louisville, Kentucky, Estados Unidos.

4 RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.1 ADN medioambiental

En total se recolectaron 14 muestras de agua, una para cada sitio excepto en el Pucté 2 que se recolectaron dos muestras por ser el lugar más inaccesible de la reserva.

El presente estudio eDNA detectó 25 especies de peces, 3 especies de aves, 5 especies de mamíferos y 2 especies de reptiles (Tabla 1). Basado en cálculos estadísticos apropiados de coincidencia BOLD y un grado razonable de certeza científica de la biblioteca de referencia BOLD, la identidad taxonómica de la fuente de ADN detectada en estas muestras se considera prácticamente probada.

Las 25 especies de peces pertenecen a 23 géneros y 10 familias siendo la familia Cichlidae la mejor representada con 10 taxones.

Prácticamente todos los peces que se registraron con ADN medioambiental ya han sido reportados para Quintana Roo y en zonas de Sian Ka'an quedando solo en duda *Rhamdia quelen*, *Thorichthys helleri* y *Lutjanus griseus*.

En el primer caso, su presencia es dudosa, debido a que Silvergrip (1996), sinonimizó varias subespecies de *Rhamdia guatemalensis* y otras especies de este género con *R. quelen* (Quoy y Gaimard). Sin embargo. En un estudio reciente, Hernández *et al.* (2015) consideran que *R. quelen* está restringida a Sudamérica. En Quintana Roo se ha reportado la presencia de *R. guatemalensis* (Schmitter-Soto, J. J., 1996; Miller, 2009; Hernández *et al.*, 2015).

En el caso de *Thorichthys helleri*, en el estudio que realizamos solo fue detectado en el cenote Del Padre y con muy pocas secuencias por lo que su presencia también sería dudosa. Esta especie se ha registrado en Tabasco, Chiapas, Coatzacoalcos, y Palenque hasta Champoton (Schmitter-Soto, J. J., 1996; Miller, 2009).

Para confirmar la identidad taxonómica de estos dos casos es necesario recolectar especímenes adultos y revisarlos morfológicamente, junto con el análisis molecular del ADN. Solo de esta forma se podrá confirmar si se trata de especie exótica o traslocadas o no.

Finalmente, *Lutjanus griseus* solo se encontró en Santa Teresa y probablemente se encuentre en este lugar (Omar Ortiz com. pers.) o bien puede tratarse de una contaminación por efecto humano, ya que se trata de una especie muy consumida, y como ocurrió en el caso del boquinete, documentado por Valdez *et al.* (2019), donde sus restos

podieron haber llegado a este pequeño sistema, localizado dentro de la estación de la reserva.

Caso especial de estudio es *Atherinella* sp., si bien ya sido reportada en laguna Caobas y en Bacalar (Schmitter-Soto, 1996; Valdez Moreno *et al.*, 2019), probablemente pertenezca a *alvarezi* o bien que sea una nueva especie. Confirmar su identidad real requiere un análisis más profundo contemplando la taxonomía integrativa

El Muyil fue el sitio con mayor número de especies detectadas con 12, seguida del Pucté 2 con 10 y el Toro con 7; el resto fluctuó entre 5 y 2 especies.

Es importante mencionar que los números que se presentan en la tabla 1 significan el grado de credibilidad de la presencia de una especie, no expresan si es más abundante o no, simplemente refleja que en el momento de la recolecta de agua, había mayor concentración de ADN de esa especie debido a que estaba cerca o había más residuos de ese organismo o bien, que los primers utilizados tuvieron una mayor afinidad por el ADN de esa especie. En otras palabras, tener mayor número de secuencias significa que hay más certeza de la presencia de la especie y que no se trate de un falso positivo, pero no necesariamente tiene que ver directamente con la abundancia de esa especie.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Tabla 2. Resumen de los resultados de identificación. Los géneros (complejos de especies) con baja resolución interespecífica están marcados con * Fuente: Elaboración propia, ECOSUR, 2019).

Identificación	Chunaxe eDNA1	Muyil eDNA2	Km 48 eDNA3	Santa Teresa eDNA4	Tres Reyes 2 eDNA5	Tres Reyes 1 eDNA6	Minicnote eDNA7	Del Padre eDNA8	El Toro eDNA9	Sijil Noh Ha eDNA10	Pucté 2 eDNA11	Chacah Veracruz	Pucté Cafetal 1 eDNA13	Pucté 2 eDNA14
<i>Aramides cajaneus</i>						13								
<i>Megaceryle torquata</i>												1887		
<i>Meleagris gallopavo</i>				10										
<i>Artibeus lituratus</i>				5										
<i>Lamproncyteris brachyotis</i>				47										
<i>Lonchorhina aurita</i>				95										
<i>Oryzomys couesi</i>										5063				
<i>Pteronotus parnellii</i>														3
<i>Kinosternon acutum</i>				3										
<i>Trachemys</i> sp.					610									
<i>Atherinella</i> sp.											290		77	2460
<i>Belonesox belizanus</i>						287			3					
<i>Bramocharax-Astyanax</i> *	321	2				2		2			3	4678		
<i>Cribroheros robertsoni</i>	23									130			83	
<i>Cryptoheros chetumalensis</i>		2									3033		13265	10939
<i>Cyprinodon beltrani – simus</i> *		969												
<i>Dormitator maculatus</i>		66												
<i>Gambusia sexradiata</i>			4			2840				1563		816		
<i>Gambusia yucatana</i>		2	31		4				9					2
<i>Gerres cinereus</i>	71	381												
<i>Gobiomorus dormitor</i>												9		
<i>Hyphessobrycon compressus</i>													1332	
<i>Jordanella pulchra</i>		411												
<i>Lutjanus griseus</i>				108										
<i>Mayaheros urophthalmus</i>			69	10	16		18		29		1723			16
<i>Ophisternon</i>													233	
<i>Parachromis friedrichsthalii</i>											25			
<i>Petenia splendida</i>							919				3927			
<i>Poecilia mexicana</i>		9	2		4		28		6			528	2	2
<i>Rhamdia quelen</i>	2	8				2	15	4	4			6		156
<i>Rocio octofasciata</i>						42								
<i>Thorichthys helleri</i>								15						
<i>Thorichthys meeki</i>		4							7					
<i>Trichromis salvini</i>	6	26	2	3	39			6	20		2780			23
<i>Vieja melanura</i>		2											2196	4

Aves

Mammalia

Reptilia

Actinopterygii

4.2 Línea base de zooplancton

De los 14 sitios del muestreo con las trampas de luz, se seleccionaron 1,043 especímenes de los cuales 947 fueron artrópodos, 95 cordados y 1 platelminto. Todos los organismos que se introdujeron en las trampas de luz se consideraron como parte del zooplancton, siguiendo la definición de Montes-Ortiz & Elías-Gutiérrez (2018), que se basa en el método en que este grupo estará definido por todos los organismos con capacidad de natación, para el establecimiento de la línea base del Cenote Azul, al sur de Quintana Roo. Todos los datos con los resultados obtenidos, incluyendo localidades, secuencias, cromatogramas y fotografías de los especímenes secuenciados se pueden consultar en la base de datos BOLD (boldsystems.org), en el proyecto “Zooplankton from epicontinental water systems associated to Biosphere Reserve Sian Kaan”, SKAAN (Figura 6). Este proyecto será el inicio de la construcción de la línea base del zooplancton en la reserva.

A continuación, se muestra la página del proyecto, con el resumen de los datos que contiene hasta el momento. Cabe señalar que conforme se avance en el conocimiento de estos organismos y de zonas adyacentes el número de especies cambiará por lo tanto la taxonomía se irá depurando. Es importante señalar que ninguna secuencia tuvo codones de parada, no hay contaminaciones ni registros con problemas.

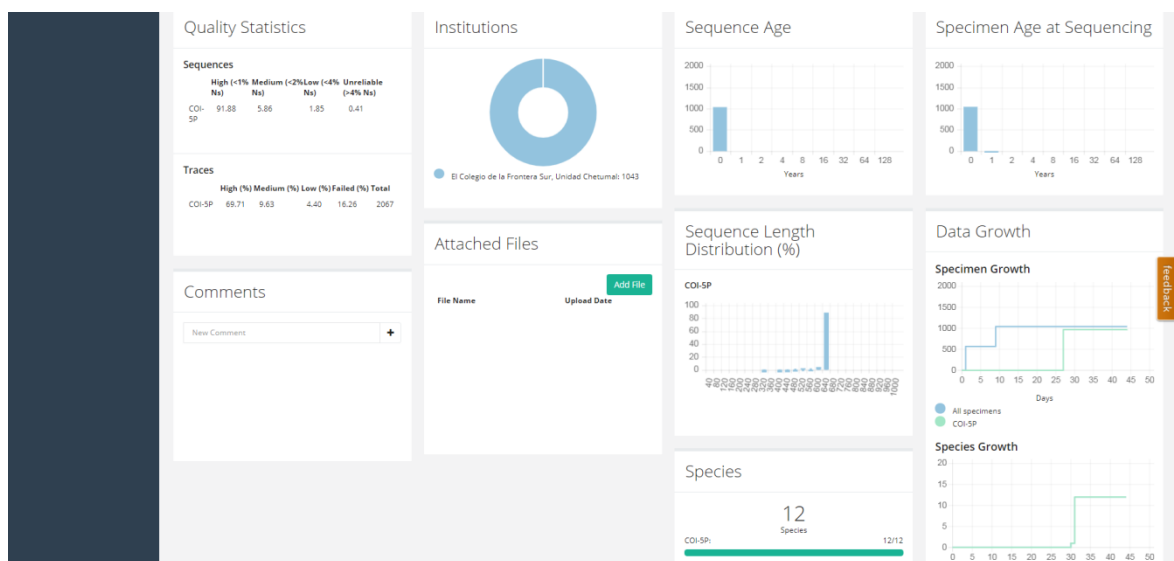


Figura 53. Página del proyecto en BOLD donde está incluida toda la información referente a los especímenes generada en este proyecto (actualización del 5/noviembre/2019).

Del total de organismos secuenciados solo 73 de ellos no obtuvieron secuencia, por lo que la técnica tuvo un 93% de eficacia. Un resultado de este tipo no ha sido logrado en ningún otro laboratorio del mundo utilizando un solo set de cebadores (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2018)

para todos los grupos del zooplancton, desde peces a todos los invertebrados recolectados. Las 970 secuencias positivas tienen una buena calidad, demostrada por los cromatogramas que se subieron al sistema de BOLD.

En total se obtuvieron 80 OTU's diferentes, identificados por medio de las secuencias genéticas y corroboradas parcialmente por la identificación morfológica, debido a que este proceso llevará más tiempo del que fue destinado para realizar el proyecto.

Como se puede apreciar en la tabla 2, se consideraron tres grupos principales de invertebrados: Arachnida, que comprende uno de los grupos más diversos e importantes como indicadores de la calidad del agua y que forman parte del plancton, los ácaros acuáticos; Insecta, que en su mayoría comprende estadíos larvales principalmente de quironómidos, tricópteros y odonatos y Crustacea, que comprende desde organismos holoplanctónicos (son organismos planctónicos durante toda su vida) a meroplanctónicos (en sólo una parte de su ciclo vital son organismos planctónicos), estos últimos representados al igual que en el caso de los insectos por etapas larvales. Además, se consideró un cuarto y último grupo, los cordados, que básicamente fueron larvas de peces (ictioplancton), que fueron atraídos por las trampas de luz.

En lo que se refiere a las especies exóticas se detectaron tres géneros que potencialmente podrían representar introducciones accidentales. La primera fue el género *Cyclops*, que se considera de origen holártico (Dussart & Defaye, 2001) por lo que es posible que haya llegado a la península de Yucatán transportados por las aves migratorias. Los organismos que detectamos en la reserva de Sian Ka'an presentan secuencias muy similares a otros detectados en Canadá, sin embargo, no se ha determinado la especie a la que pertenecen, por lo cual se requiere un examen taxonómico fino para esclarecer su identidad.

El otro género que posiblemente corresponda a una especie exótica es el quironómido *Kiefferulus*, con un único registro previo para el continente americano en Brasil (Floss *et al.*, 2012) y distribuido ampliamente en el viejo continente (Pramual, 2016). Debido a la enorme dificultad que representa este género, es necesario un análisis detallado tanto de las formas adultas como las etapas larvales (Pramual *et al.*, 2016), pues éste sería el segundo registro que se tiene en el continente americano.

La presencia del exótico *Mesocyclops thermocyclopoides*, de origen asiático si fue confirmada en el Cenote Pucté Cafetal 1.

Por otra parte, prácticamente no existen estudios formales de ácaros acuáticos y quironómidos en México a pesar de la enorme importancia que tienen como indicadores de la calidad del agua (Lindegaard, 1995; Goldschmidt, 2016). El primer estudio que exploró la viabilidad para discriminar las especies de ácaros acuáticos por medio del gen COI en México fue publicado recientemente (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2018) y representa el punto de partida para la descripción formal de las especies, posiblemente la mayoría aún

desconocidas para la ciencia. Por esta razón, la mayor parte de los arácnidos no tienen una identificación precisa. El caso de los quironómidos es aún más complejo y tiene el mismo punto de partida que para los ácaros acuáticos. El único antecedente reciente de su estudio es la descripción de seis especies distribuidas en Yucatán y Guatemala (Vinogradova, 2008), dos de ellas de la laguna de Bacalar (*Polypedilum bacalar*, posiblemente endémica y *Polypedilum rissi* distribuida hasta el lago Petén en Guatemala), pero cuya descripción es exclusivamente morfológica.

En el caso de los crustáceos, es donde pudimos identificar el mayor número de especies, debido a que la base de datos se está construyendo desde el año 2008 (Elías-Gutiérrez *et al.*, 2008a). *Mesocyclops pehpeiensis* detectado previamente en Campeche, no se encontró en la reserva (Montoliu & Elías-Gutiérrez *et al.*, 2015). Cabe señalar que *M. pehpeiensis* se ha detectado previamente en México asociado a cultivos de arroz, al igual que en el sur de España, por lo que la reserva de Sian Ka'an no representa un hábitat ideal para esta especie.

Como ya se mencionó, se confirmó la presencia del copépodo exótico *Mesocyclops thermocyclopoides* en el cenote Pucté Cafetal 1. Esta especie cuenta con registros previos en Tabasco y Centroamérica (Honduras y posiblemente Costa Rica) (Gutiérrez-Aguirre *et al.*, 2003). En BOLD existen 14 registros de secuencias de esta especie, 11 de Tabasco (México) y tres de Taiwan (obtenidos de GenBank, (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), lo que permite confirmar plenamente su presencia en esta localidad.

Otra posible especie exótica cuya presencia era posible en la reserva es *Daphnia lumholtzi*, pues se ha adaptado desde la zona templada de Norteamérica hasta Sudamérica, pasando por regiones tropicales (Sousa *et al.*, 2017). No fue detectada durante este trabajo.

El número de OTU's por sistema osciló desde seis en el cenote Santa Teresa hasta 28 en Muyil 1. Esta última estación se localizó en un bajo, cerca de la parte media de la laguna con una gran abundancia de vegetación sumergida, por lo que posiblemente sirvió de refugio para todas las OTU's encontradas. El segundo punto con mayor número de OTU's fue en Chunyaxché 2, donde la trampa fue colocada entre las raíces de manglar. Es importante señalar que la comunicación al Caribe de las lagunas Muyil y Chunyaxché las ha convertido en una zona de refugio de especies de origen marino como son los cangrejos *Minuca*, *Sesarma* y *Uca*, cuyas larvas, principalmente zoea, se encontraron en gran abundancia.

Otro registro interesante, aunque no lo podemos considerar como una especie exótica y si acaso sería traslocada, es el camarón *Palaemon mundusnovus*, cuyo registro previo se encuentra en la Laguna Madre y costas del golfo de México (Jordan *et al.*, 2019). Posiblemente llegó a la laguna del Muyil a través de la conexión que tiene con el mar. El registro de esta especie podríamos considerarlo como una extensión de ámbito geográfico, pero es necesario un análisis más detallado sobre su distribución natural.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

Tabla 3. Lista de taxones y su presencia en los 13 sistemas estudiados (Fuente: Elaboración propia, ECOSUR, 2019).

Identificación molecular hasta el nivel más fino posible	Chunyaxe 1	Chunyaxe 2	Muyil 1	Muyil 2	Km 48	Santa Teresa	Tres Reyes 2	Tres Reyes 1	Miniceno	Del Padre	El Toro	Sijil Noh Ha	Pucté 2	Chacah Veracruz	Pucté Cafetal 1
Arachnida															
<i>Archezogozetes</i> +			X		X										
Arrenuridae +						X						X			
<i>Arrenurus</i> +	X	X	X	X	X					X		X		X	X
<i>Atractides</i> +												X			
Hydrodromidae +			X		X								X		X
<i>Konikea</i> +		X	X												X
Krenowskiidae +				X	X		X								
<i>Limnesia</i> +		X	X												
<i>Lebertia</i> +															X
Mideopsidae +		X	X	X	X					X		X	X		X
Pionidae +			X	X						X				X	X
<i>Piona</i> +		X													
Sarcoptiformes +						X									
Trombidiformes +	X		X		X	X	X	X	X		X		X		X
<i>Unionicola</i> +		X	X								X		X		X
Insecta															
<i>Argia translata</i> +			X												
<i>Ablabesmyia</i> +													X	X	X
Axarus +													X		
Ceratopogonidae +			X												
<i>Chaoborus</i> +											X		X		X
Chironomidae +	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X	X	X		X
Chironominae +	X												X		
<i>Cladopelma</i> +								X							
<i>Cladopelma forcipes</i> +		X	X	X	X					X		X	X		
<i>Coelotanypus</i> +			X												
Corduliidae +												X			
<i>Cryptochironomus</i> +		X	X	X											
<i>Cryptochironomus</i> +	X														

**Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental
en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an**

<i>Kiefferulus</i> +++									X						
<i>Limnesia</i> sp. +										X					
<i>Oxyethira</i> +									X						
<i>Orthotrichia</i> +														X	
<i>Paracladopelma</i> +												X			
<i>Polypedilum</i> +					X				X						
<i>Tanytarsus</i> +			X		X			X	X	X		X	X	X	
Crustacea															
<i>Alona pectinata</i> +											X	X			
<i>Alona</i> sp. +								X		X	X	X			
<i>Alonella</i> cf. <i>excisa</i> +											X				
Aloninae +												X			
<i>Arctodiaptomus</i> cf. <i>dorsalis</i> +					X							X		X	
<i>Arctodiaptomus dorsalis</i> +												X			
<i>Argulus</i> +		X												X	
<i>Ceriodaphnia</i> cf. <i>rigaudi</i> +							X					X		X	
<i>Ceriodaphnia</i> sp. +					X					X					
Chydorinae +							X								
Cyclopoida +			X	X	X	X		X		X	X	X	X	X	X
<i>Cyclops</i> sp.+++								X			X				X
<i>Cypria</i> sp. +										X		X		X	
<i>Darwinula stvensoni</i> +														X	
<i>Ephemeroporus hybridus</i> +										X					
<i>Eubosmina tubicen</i> +									X		X	X		X	X
<i>Eucyclops</i> cf. <i>cuatrociénegas</i> +				X	X			X		X			X		
<i>Eucyclops prionophorus</i> +					X							X			
<i>Eucyclops cuatrociénegas</i> ++		X								X		X		X	X
Isopoda +				X											
<i>Macrocyclus albidus</i> +	X	X	X	X	X		X	X				X	X		
<i>Mastigodiptomus nesus</i> +	X	X	X	X					X	X				X	
<i>Mastigodiptomus siankaanensis</i> +							X								
<i>Mastigodiptomus</i> sp. +															X
<i>Macrothrix elegans</i> +					X		X	X			X	X			X
<i>Macrothrix spinosa</i> +										X					
<i>Mesocyclops</i> sp. +												X			X

**Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental
en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an**

<i>Mesocyclops thermocyclopoides</i> *															X
<i>Minuca</i> +	X	X	X	X							X				
Ostracoda +				X							X	X			X
Podocopida +				X	X			X					X		X
<i>Palaemon mundusnovus</i> ++			X	X											
<i>Sesarma</i> +	X	X	X	X											
<i>Simocephalus</i> +		X			X					X	X				
<i>Thermocyclops inversus</i> +									X	X					
<i>Tropocyclops cf. aztequei</i> +						X	X			X	X		X	X	X
<i>Uca</i> +		X	X	X											X
Chordata															
<i>Astyanax aeneus</i> +											X				
<i>Atherinella</i> sp. +												X	X		X
<i>Cyprinodon artifrons</i> +	X	X	X												
<i>Dormitator maculatus</i> +	X	X	X		X										X
<i>Floridichthys polyommus</i> +	X		X												
<i>Gambusia yucatana</i> +														X	
<i>Jordanella pulchra</i> +	X	X	X												
<i>Mayaheros urophthalmus</i> +			X												
<i>Thorichthys meeki</i> +										X					X
<i>Trichromis salvini</i> +									X						
<i>Vieja melanura</i> +		X	X												
Total de taxones: 80	13	21	28	18	20	6	9	10	10	20	16	25	16	16	26

° Cada renglón corresponde a una unidad taxonómica operativa (OTU, por sus siglas en inglés) definida a través del análisis molecular preliminar mediante la técnica de BLAST en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), pero no corresponde a un nivel específico en el sistema de clasificación de Linneo (puede ser Orden, Familia o Subfamilia), salvo los nombres que están en cursiva, y que corresponden a géneros o especies.
+ Especie Nativa; ++ Especie Nativa trasladada; +++ Posible especie exótica; *Exótico confirmado.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

4.2.1 Larvas de peces

En el caso específico de los peces se procesaron 85 ejemplares. Todos ellos con secuencias de buena calidad y uno que no tuvo secuencia.

En total se identificaron 12 especies que pertenecen a 12 géneros y 6 familias. El ejemplar CH765-A07|Cenote Pucté Cafetal 1 resultó ser una contaminación por lo que no se tomó en cuenta (Tabla 3).

Tabla 4. Lista de especies encontradas en cada método de muestreo, trampa de luz y ADN medioambiental (Fuente: Elaboración propia, ECOSUR, 2019).

		Larvas de Peces recolectadas con trampa de luz	ADN medioambiental (eDNA)
Orden	Familia	Especie	Especie
Atheriniformes			
	Atherinopsidae		
		<i>Atherinella</i> sp.	<i>Atherinella</i> sp.
Characiformes	Characidae		
		<i>Astyanax aeneus</i>	
			<i>Bramocharax-Astyanax</i>
			<i>Hyphessobrycon compressus</i>
Cichliformes	Cichlidae		
		<i>Mayaheros urophthalmus</i>	<i>Mayaheros urophthalmus</i>
		<i>Thorichthys meek</i>	<i>Thorichthys meeki</i>
		<i>Trichromis salvini</i>	<i>Trichromis salvini</i>
		<i>Vieja melanura</i>	<i>Vieja melanura</i>
			<i>Cribroheros robertsoni</i>
			<i>Chrysoheros chetumalensis</i>
			<i>Parachromis friedrichsthalii</i>
			<i>Petenia splendida</i>
			<i>Rocio octofasciata</i>
			<i>Thorichthys helleri</i>
Cyprinodontiformes	Cyprinodontidae		
		<i>Cyprinodon artifrons</i>	<i>Cyprinodon beltrani-simus</i>
		<i>Floridichthys polyommus</i>	
		<i>Jordanella pulchra</i>	<i>Jordanella pulchra</i>
	Poeciliidae		
		<i>Gambusia yucatana</i>	<i>Gambusia yucatana</i>
			<i>Belonexis belizanus</i>
			<i>Gambusia sexradiata</i>
			<i>Poecilia mexicana</i>
Gobiiformes	Eleotridae		

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

		<i>Dormitator maculatus</i>	
		<i>Gobiomorus dormitor</i>	
Siluriformes	Heptapteridae		<i>Rhamdia quelen</i>
Synbranchiformes	Symbranchidae		<i>Ophisternon sp.</i>
Perciformes	Gerreidae		<i>Gerres Cinereus</i>
	Serranidae		<i>Lutjanus griseus</i>

Las especies recolectadas con las trampas de luz, como se mencionó anteriormente, habían sido reportadas en Quintana Roo y en la zona de Sian Ka'an.

En total se registraron 29 con ambos métodos. Analizando las especies por sitio, *Trichromis salvini* fue la especie de mayor distribución ya que se encontró en 10 lugares diferentes, seguida por *Mayaheros urophthalmus*, *Poecilia mexicana* y *Rhamdia quelen* que se encontraron en 8 y *Gambusia yucatana* en 6 de los 14 lugares visitados (Tabla 4).

El Muyil fue el sitio que registró el mayor número de taxones con 15, seguido de Chuyaxché y Pucté Cafetal 1 con 10 (Tabla 4).

Tabla 5. Ubicación de las especies encontradas por sitio de muestreo. *larvas de peces colectadas con la trampa de luz, + especies registradas con ADN medioambiental (eDNA)

Especies	Sitios													
	Chunxaxché	Muyil	Km48	Santa Teresa	Tres Reyes 2	Tres Reyes 1	Mini cenote	Del Padre	El Toro	Síjil Noh Ha	Pucté 2	Chanchah Veracruz	Pucté-Cafetal 1	Pucté 2
<i>Atherinella sp.</i>										*	+		*+	*+
<i>Atherinella alvarezi</i>													*	*
<i>Astyanax aeneus</i>									*					
<i>Bramocharax-Astyanax</i>	+	+				+		+			+	+		
<i>Hyphessobrycon compressus</i>													+	
<i>Mayaheros urophthalmus</i>		*	+	+	+		+		+		+			+
<i>Thorichthys meeki</i>		+						*	+				*	
<i>Trichromis salvini</i>	+	+	+	+	+		*	+	+		+			+
<i>Vieja melanura</i>	*	*+											+	+
<i>Cribroheros robertsoni</i>	+									+			+	
<i>Chryptoheros chetumalensis</i>		+									+		+	+

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

<i>Parachromis friedrichsthalii</i>												+			
<i>Petenia splendida</i>							+					+			
<i>Rocio octofasciata</i>						+									
<i>Thorichthys helleri</i>								+							
<i>Cyprinodon artifrons</i>	*	*													
<i>Cyprinodon beltrani-simus</i>		+													
<i>Floridichthys polyommus</i>	*	*													
<i>Jordanella pulchra</i>	*	*+													
<i>Gambusia yucatana</i>		+	+		+				+			*			+
<i>Gambusia sexradiata</i>			+			+				+		+			
<i>Belonexus belizanus</i>						+			+						
<i>Poecilia mexicana</i>		+	+		+		+		+			+	+	+	
<i>Dormitator maculatus</i>	*	*+	*											*	
<i>Gobiomorus dormitor</i>												+			
<i>Ophisternon sp.</i>													+		
<i>Gerres Cinereus</i>	+	+													
<i>Lutjanus griseus</i>				+											
<i>Rhamdia quelen</i>	+	+				+	+	+	+			+			+
Total	10	15	6	3	4	5	5	5	8	3	7	6	10	9	

Cabe mencionar que los resultados que en este reporte se muestran son preliminares, especialmente los del zooplancton, ya que muchos de los ejemplares necesitan ser revisados con especial cuidado, además de que existe un enorme impedimento taxonómico con algunos grupos, como ya se mencionó. Conforme pase el tiempo la lista que está presente en la base de datos de BOLD (boldsystems.org) se irá modificando y es muy posible que el número de especies aumente conforme se vaya actualizando el algoritmo del Barcode Index Number (Ratnasingham & Hebert, 2013), el cual se encuentra en un proceso continuo de actualización, además de la revisión taxonómica cuidadosa de los especímenes.

Queremos señalar que esta lista de especies corresponde a un solo muestreo y por lo tanto debe considerarse como preliminar. Un ejemplo del esfuerzo necesario para tener una lista más completa como la que se presenta en el estudio realizado por Elías *et al.* (2018) para la laguna de Bacalar, donde la curva de acumulación de la Figura 9 corresponde a 16 eventos de muestreo utilizando diferentes métodos que van desde los arrastres tradicionales de plancton hasta las trampas de luz (ver Figura 2 en este informe). Como se aprecia en las dos curvas del trabajo mencionado, la curva de acumulación de especies presenta una pendiente mucho más elevada en un lago de zona templada. Esto se traduce en la necesidad de un mayor esfuerzo de muestreo para las zonas tropicales, a fin de tener representada de una manera más real la diversidad del zooplancton.

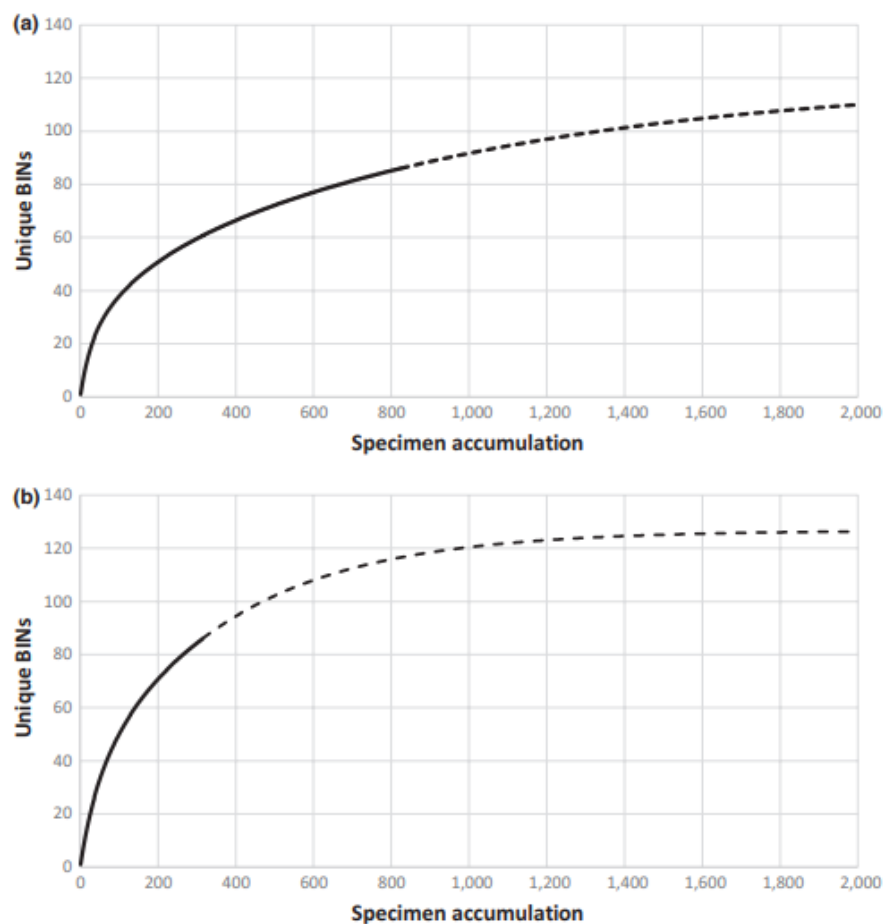


Figura 54. Reproducción de la figura 9 de Elías-Gutiérrez *et al.* (2018). a) Corresponde a la acumulación de especies en Bacalar después de 16 eventos de muestreo con diferentes métodos; b) Corresponde a la acumulación de especies en un lago templado (Eel Lake, Canadá)

5 CONCLUSIONES

Con los análisis de ADN medioambiental se puede tener una idea de los organismos que se encontraban en el momento que fue recolectada el agua. Sin embargo, para tener una idea más clara de la composición íctica de los sistemas, es necesario realizar más muestreos en diferentes sitios de un mismo sistema, así como en diferentes épocas del año (secas, lluvias, nortes).

Al comparar los resultados de los dos métodos utilizados para el estudio de los peces, es claro que ambos detectaron las mismas especies en la mayoría de los casos, sin embargo, hubo algunas que fueron diferentes, pero de ninguna manera fueron registros incongruentes, ya que se trata de taxones previamente registrados en la región, por lo que se puede decir que son métodos complementarios.

Para que todo este sistema funcione es indispensable contar con una LÍNEA BASE de todos los organismos acuáticos de los sistemas de la región, representada por la biblioteca de referencia de código de barras de ADN. En este caso la base de datos BOLD juega un papel crítico.

Es importante señalar, que por primera vez se da una lista de especies zooplanctónicas que habitan en sistemas acuáticos asociados o dentro de la reserva de Sian Ka'an. Esto constituye en un gran avance en el conocimiento de la biodiversidad en esta importante área protegida.

Consideramos fundamental continuar con la elaboración de la línea base de las especies en estos sistemas, utilizando diferentes artes, sobre todo en la Laguna de Chunyaxché y el Muyil, que fueron los sistemas con una mayor diferencia de especies entre las dos zonas de muestreo (Tabla 2).

Finalmente, nos permitimos mencionar que no se puede proteger lo que no se conoce, por lo que consideramos prioritario continuar con el reconocimiento a través del uso de estas metodologías en los sistemas acuáticos de la reserva de la biósfera de Sian Ka'an, pues el plancton es la primera comunidad en reaccionar ante cualquier afectación, desde la entrada de una especie exótica a la contaminación por diversas fuentes.

El biomonitoreo regular a largo plazo ayudará a comprender no solo si hay algún cambio debido a la actividad humana, sino que también ayudará a ver el efecto del cambio climático en las comunidades acuáticas de esta reserva que constituye un patrimonio de la humanidad.

Programa de detección temprana piloto de especies acuáticas invasoras a través de los métodos de código de barras de la vida y análisis de ADN ambiental en la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an

En relación a las especies exóticas, se detectaron tres posibles especies del zooplancton de las cuales es necesario ampliar el conocimiento de dos de ellas (*Kiefferulus* y *Cyclops*) pues no se pudieron reconocer a especie y se confirmó la presencia de *M. thermocyclopoides* en un solo cenote (Pucté Cafetal 1). Con respecto a los peces, de las tres posibles especies exóticas (*Rhamdia quelen*, *Thorichthys helleri* y *Lutjanus griseus*), es necesario realizar muestreos de adultos en los sistemas donde se detectaron para confirmar su identidad taxonómica y obtener secuencias del ADN de los organismos directamente, a fin de compararlas con las bases de datos existentes.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre-Muñoz, A. & Mendoza-Alfaro, R.** 2009. Especies exóticas invasoras Impactos sobre las poblaciones de flora y fauna, los procesos ecológicos y la economía. In: CONABIO. *Capital natural de México*, vol. II. México. 277–318 p.
- Almeida, F. S., Frantine-Silva, W., Lima, C. L., García D. A. Z. & Orsi, M. L.** 2017. DNA barcoding as a useful tool for identifying non-native species of freshwater ichthyoplankton in the neotropics. *Hydrobiologia*. 817(1): 111-119.
- Baird, D. J. & Hajibabaei, M.** 2012. Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology*. 21(8): 2039-2044.
- Balian, E. V., Segers, H., Leveque, C. & Martens, K.** 2008. The freshwater animal diversity assessment: An overview of the results. *Hydrobiologia*. 595: 627-637.
- Bessonov, K.** 2018. OTUExtractorFromBLASToutput. Fecha de Actualización: 22 de junio de 2019.
<https://gitlab.com/biodiversity/OTUExtractorFromBLASToutput>
- BOLD (Barcode of Life Data System).** 2019. Fecha de consulta: 22 de junio de 2019.
<http://www.boldsystems.org>
- Ciros-Pérez, J. & Elías-Gutiérrez, M.** 1997. Spinalona anophtalma n. gen. n. sp. (Anomopoda, Chydoridae) a blind epigean cladoceran from the Neovolcanic Province of Mexico. *Hydrobiologia*. 353: 19-28.
- Clavero, M. & García-Berthou, E.** 2005. Invasive species are a leading cause of animal extinctions. *Trends in Ecology & Evolution*. 20(3): 110-110.
- Cohuo-Durán, S., Elías-Gutiérrez, M. & Karanovic, I.** 2013. On three new species of Cypretta Vávra, 1895 (Crustacea: Ostracoda) from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Zootaxa*. 3636(4): 501-524.
- Collins, R. A., Armstrong, K. F., Holyoake, A. J. & Keeling, S.** 2013. Something in the water: biosecurity monitoring of ornamental fish imports using environmental DNA. *Biological Invasions*. 15(6): 1209-1215.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).** 2008. *Capital Natural de México*, vol I. México. 620 p.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO).** ND. ¿Por qué se pierde la biodiversidad?. Fecha de consulta: 22 de junio de 2019.

- Contreras-Balderas, S., Ruiz-Campos, G., Schmitter-Soto, J. J., Diaz-Pardo, E., Contreras-McBeath, T., Medina-Soto, M. & Lyons, J.** 2008. Freshwater fishes and water status in Mexico: A country-wide appraisal. *Aquatic Ecosystem Health & Management*. 11(3): 246-256.
- Deiner, K., Walser, J. C., Maechler, E. & Altermatt, F.** 2015. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*. 183: 53-63.
- Doi, H., Akamatsu, Y., Watanabe, Y., Goto, M., Inui, R., Katano, I. & Minamoto, T.** 2017. Water sampling for environmental DNA surveys by using an unmanned aerial vehicle. *Limnology and Oceanography-Methods*. 15(11): 939-944.
- Dougherty, M. M., Larson, E. R., Renshaw, M. A., Gantz, C. A., Egan, S. P., Erickson, D. M. & Lodge, D. M.** 2016. Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. *Journal of Applied Ecology*. 53(3): 722-732.
- Dussart, B. H. & Defaye, D.** 2001. *Introduction to the Copepoda* (2 ed.). Leiden: Backhuys Publishers. 344 p. ISBN: 9057820692 9789057820694.
- Dzialowski, A. R., O'Brien, W. J. & Swaffar, S. M.** 2000. Range expansion and potential dispersal mechanisms of the exotic cladoceran *Daphnia lumholtzi*. *Journal of Plankton Research*. 22(12): 2205-2223.
- Elías-Gutiérrez, M., Martínez-Jerónimo, F., Ivanova, N. V. & Valdez-Moreno, M.** 2008a. DNA barcodes for Cladocera and Copepoda from Mexico and Guatemala, highlights and new discoveries. *Zootaxa*. 1849: 1-42.
- Elías-Gutiérrez, M. & Suárez-Morales, E.** 1999. *Alona pectinata* (Crustacea : Anomopoda ; Chydoridae), a new freshwater cladoceran from Southeast Mexico. *Revista de Biología Tropical*. 47: 105-111.
- Elías-Gutiérrez, M., Suárez-Morales, E., Gutiérrez-Aguirre, M., Silva-Briano, M., Granados-Ramírez, J. G. & Garfias-Espejo, T.** 2008b. *Guía ilustrada de los microcrustáceos (Cladocera y Copepoda) de las aguas continentales de México*. México: Universidad Nacional Autónoma de México & Comisión Nacional Para el Uso y Manejo de la Biodiversidad. 322 p. ISBN: 978-970-32-4852-0
- Elías-Gutiérrez, M. & Valdez-Moreno, M.** 2008. A new cryptic species of *Leberis* Smirnov, 1989 (Crustacea, Cladocera, Chydoridae) from the Mexican semi-desert region, highlighted by DNA barcoding. *Hidrobiologica*. 18(1): 63-74.

- Elías-Gutiérrez, M., Valdez-Moreno, M., Topan, J., Young, M. R. & Cohuo-Colli, J. A.** 2018. Improved protocols to accelerate the assembly of DNA barcode reference libraries for freshwater zooplankton. *Ecology and Evolution*. 8(5): 3002-3018.
- Elías-Gutiérrez, M. & Zamuriano-Claros, R.** 1994. Primer registro de *Moina macrocopa* (Daphniiformes:Moinidae) en Bolivia. *Revista de Biología Tropical*. 42(1/2): 385.
- Engel, K., Schreder, T. & Tollrian, R.** 2014. Morphological defences of invasive *Daphnia lumholtzi* protect against vertebrate and invertebrate predators. *Journal of Plankton Research*. 36(4): 1140-1145.
- Farley, N. J., Vasquez, A. A., Kik IV, R., David, S. R., Katailiha, A. S. & Walker, X. N.** 2017. Primer designs for identification and eDNA detection of gars (Lepisosteidae). *Transactions of the American Fisheries Society*. 147(4): 687-695.
- Fiers, F.** 1995. *Halicyclops caneki* n. sp. (Copepoda, Cyclopoida) from Celestun Lagoon (Yucatan, Mexico). *Belgian Journal of Zoology*. 125(2): 301-313.
- Fiers, F., Reid, J. W., Iliffe, T. M. & Suárez-Morales, E.** 1996. New hypogean cyclopoid copepods (Crustacea) from the Yucatán Peninsula, México. *Contributions to Zoology*. 66(2): 65-102.
- Floss, E. C. S., Kotzian, C. B., Spies, M. R. & Secretti, E.** 2012. Diversity of non-biting midge larvae assemblages in the Jacui River basin, Brazil. *Journal of Insect Science*. 12: 1-33.
- Frisch, D., Havel, J. E. & Weider, L. J.** 2013. The invasion history of the exotic freshwater zooplankter *Daphnia lumholtzi* (Cladocera, Crustacea) in North America: a genetic analysis. *Biological Invasions*. 15: 817-828.
- García-Morales, A. & Elías-Gutiérrez, M.** 2013. DNA barcoding of freshwater Rotifera in Mexico: Evidence of cryptic speciation in common rotifers. *Molecular Ecology Resources*. 13(6): 1097-1107.
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A. & Taberlet, P.** 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*. 7(11): 1299-1307.
- Goldschmidt, T.** 2016. Water mites (Acari, Hydrachnidia): powerful but widely neglected bioindicators – a review. *Neotropical Biodiversity*. 2(1): 12-25.

Gomes, L. C., Pessali, T. C., Sales, N. G., Pompeu, P. S. & Carvalho, D. C. 2015. Integrative taxonomy detects cryptic and overlooked fish species in a neotropical river basin. *Genetica*. 143(5): 581-588.

Gutiérrez-Aguirre, M. A. & Suárez-Morales, E. 2002. The afro-asian *Mesocyclops aspericornis* (Copepoda, Cyclopidae) in Mexico: Comments on morphology and distribution. *Crustaceana*. 75(11): 1349-1361.

Gutiérrez-Aguirre, M. A., Reid, J. W. & Suárez-Morales, E. 2003. An Afro-Asian species of *Mesocyclops* (Copepoda : Cyclopoida) in Central America and Mexico. *Journal of Crustacean Biology*. 23(2): 352-363.

Hajibabaei, M., DeWaard, J. R., Ivanova, N. V., Ratnasingham, S., Dooh, R., Kirk, S. L. & Hebert, P. D. N. 2005. Critical factors for assembling a high volume of DNA barcodes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 360: 1959-1967.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & DeWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*. 270(1512): 313-321.

Hernández, C. L., Ortega-Lara A., Sánchez-Garcés G. C. & Alford M. H. 2015. Genetic and Morphometric Evidence for the Recognition of Several Recently Synonymized Species of Trans-Andean Rhamdia (Pisces: Siluriformes: Heptapteridae). *Copeia* 103(3): 563-579.

Ibáñez, A. L., Espinosa-Pérez, H. & García-Calderon, J. L. 2011. Recent data on the distribution of the exotic species used in Mexican freshwater fisheries based on fish stocking. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 82(3): 904-914.

IBOL (International Barcode of Life). 2019. Fecha de consulta: 22 de junio de 2019.
<https://ibol.org>

Ivanova, N. V., Borisenko, A. V. & Hebert, P. D. N. 2009. Express barcodes: racing from specimen to identification. *Molecular Ecology Resources*. 9: 35-41.

Ivanova, N. V., DeWaard, J. R. & Hebert, P. D. N. 2006. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*. 6(4): 998-1002.

Ivanova, N. V., Zemlak, T. S., Hanner, R. H. & Hebert, P. D. N. 2007. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*. 7(4): 544-548.

Johnson, J. L. & Havel, J. E. 2001. Competition between native and exotic *Daphnia*: in situ experiments. *Journal of Plankton Research*. 23(4): 373-387.

- Jordan-Hernandez, M., Rodriguez-Almaraz, G. & Favela-Lara, S.** 2019. Delimitation of sympatric *Palaemon* (Decapoda, Palaemonidae) species of the Laguna Madre, Mexico. *Zoologica Scripta*. 48(5): 667-678.
- King, A. J. & Crook, D. A.** 2002. Evaluation of a sweep net electrofishing method for the collection of small fish and shrimp in lotic freshwater environments. *Hydrobiologia*. 472(1-3): 223-233.
- Kolar, C. S. & Wahl, D. H.** 1998. Daphnid morphology deters fish predators. *Oecologia*. 116(4): 556-564.
- Kotov, A. A. & Taylor, D. J.** 2014. *Daphnia lumholtzi* Sars, 1885 (Cladocera: Daphniidae) invades Argentina. *Journal of Limnology*. 73(2): 167-172.
- Krishnamurthy, P. K. & Francis, R. A.** 2012. A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodiversity and Conservation*. 21(8): 1901-1919.
- Leyva-Cruz, E., Vásquez-Yeomans, L., Carrillo, L. & Valdez-Moreno, M.** 2016. Identifying pelagic fish eggs in the southeast Yucatan Peninsula using DNA barcodes. *Genome*. 59(12): 1117-1129.
- Lindegaard, C.** 1995. Classification of water-bodies and pollution In: P.D. Armitage, L.C. Pinder and P. Cranston (Eds.) *The Chironomidae: The biology and ecology of non-biting midges*. Chapman & Hall, London, UK. 385-404 p.
- Liu, J., Yan, H. F., Newmaster, S. G., Pei, N., Ragupathy, S. & Ge, X. J.** 2015. The use of DNA barcoding as a tool for the conservation biogeography of subtropical forests in China. *Diversity and Distributions*. 21(2): 188-199.
- Makino, W., Maruoka, N., Nakagawa, M. & Takamura, N.** 2017. DNA barcoding of freshwater zooplankton in Lake Kasumigaura, Japan. *Ecological Research*. 32(4): 481-493.
- Margalef, R.** 1983. *Limnología*. Omega, Barcelona. 1010 p. ISBN: 9788428207140
- Martín, C.** 2016. Investigadores van tras la pista del pez diablo en Q. Roo. Fecha de consulta: 22 de julio del 2019.
<https://www.ecosur.mx/investigadores-van-tras-la-pista-del-pezu-diablo-en-q-roo/>
- Martínez-Caballero, A. L., Morales-Gutiérrez, S. & Elías-Gutiérrez, M.** 2017. First record of the genus *Bunops* Birge, 1893 (Cladocera: Macrotrichidae) in the Neotropical highlands of Mexico with a detailed study of morphology and DNA barcodes. *Zootaxa*. 4300(4): 589-600.

- Mendoza-Alfaro, R. & Koleff-Osorio, P.** (eds.). 2014. *Especies acuáticas invasoras en México*. México, DF. Comisión Nacional Para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 540 p. ISBN: 978-607-8328-04-08
- McKee, A. M., Spear, S. F. & Pierson, T. W.** 2015. The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples. *Biological Conservation*. 183: 70-76.
- Mercado-Salas, N. F., Khodami, S., Kihara, T. C., Elías-Gutiérrez, M. & Arbizu, P. M.** 2018. Genetic structure and distributional patterns of the genus *Mastigodiptomus* (Copepoda) in Mexico, with the description of a new species from the Yucatan Peninsula. *Arthropod Systematics & Phylogeny*. 76(3): 487-507.
- Miller, R. R.** 2009. *Peces dulceacuícolas de México*. México, D.F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Sociedad Ictiológica Mexicana A. C., El colegio de la Frontera Sur y Consejo de los Peces del Desierto México-Estados Unidos. 559 p. ISBN: 978-607-7607-20-5
- Montes-Ortiz, L. & Elías-Gutiérrez, M.** 2018. Faunistic survey of the zooplankton community in an oligotrophic sinkhole, Cenote Azul (Quintana Roo, Mexico), using different sampling methods, and documented with DNA barcodes. *Journal of Limnology*. 77(3): 428-440.
- Montiel-Martínez, A., Ciro-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E. & Elías-Gutiérrez, M.** 2008. Morphological, ecological, reproductive and molecular evidence for *Leptodiptomus garciai* (Osorio-Tafall 1942) as a valid endemic species. *Journal of Plankton Research*. 30(10): 1079-1093.
- Montoliu-Elena, L., Elías-Gutiérrez, M. & Silva-Briano, M.** 2019. *Moina macrocopa* (Straus, 1820): a species complex of a common Cladocera, highlighted by morphology and DNA barcodes. *Limnetica*. 38(1): 253-277.
- Montoliu-Elena, L., Miracle, M. R. & Elías-Gutiérrez, M.** 2015. Using DNA barcodes to detect non-indigenous species: the case of the asian copepod *Mesocyclops pehpeiensis* Hu, 1943 (Cyclopidae) in two regions of the world. *Crustaceana*. 88(12-14): 1323-1338.
- Nandini, S., Sarma, S. S. S. & Gulati, R. D.** 2017. A Seasonal Study Reveals the Occurrence of Exotic Rotifers, the River Antigua, Veracruz, Close to the Gulf of Mexico. *River Research and Applications*. 33(6): 970-982.
- UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization).** ND. Oficina de la UNESCO en México: Patrimonio Mundial. Fecha de consulta: 22 de junio de 2019.

Paggi, J. C. 1997. *Moina macrocopa* (Straus, 1820) (Branchiopoda, Anomopoda) in South America: Another case of species introduction? *Crustaceana*. 70(8): 886-893.

Porco, D., Rougerie, R., Deharveng, L. & Hebert, P. D. N. 2010. Coupling non-destructive DNA extraction and voucher retrieval for small soft-bodied Arthropods in a high-throughput context: the example of Collembola. *Molecular Ecology Resources*. 10: 942-945.

Prado, B. R., Pozo, C., Valdez-Moreno, M. & Hebert, P. D. N. 2011. Beyond the Colours: Discovering Hidden Diversity in the Nymphalidae of the Yucatan Peninsula in Mexico through DNA Barcoding. *Plos One*. 6(11): e27776.

Pramual, P., Simwisat, K. & Martin, J. 2016. Identification and reassessment of the specific status of some tropical freshwater midges (Diptera: Chironomidae) using DNA barcode data. *Zootaxa*. 4072(1): 39-60.

Prosser, S., Martínez-Arce, A., & Elías-Gutiérrez, M. 2013. A new set of primers and some methodological improvements for COI amplification in freshwater microcrustaceans. *Molecular Ecology Resources*. 13: 1151-1155.

Quiroz-Vázquez, P. & Elías-Gutiérrez, M. 2009. A New Species of the Freshwater Cladoceran Genus *Scapholeberis* Schoedler, 1858 (Cladocera: Anomopoda) from the Semidesert Northern Mexico, Highlighted by DNA Barcoding. *Zootaxa*. 2236: 50-64.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. 2007. BOLD: The Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org). *Molecular Ecology Notes*. 7(3): 355-364.

Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M. & Gough, K. C. 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*. 51(5): 1450-1459.

Reid, J. W. & Suárez-Morales, E. 1999. A new neotropical species of *Acanthocyclops* (Copepoda: Cyclopoida: Cyclopidae). *Beaufortia*. 49(5): 37-45.

Rietzler, A. C., Maia-Barbosa, P. M., Ribeiro, M. M. & Menendez, R. M. 2014. On the first record of the exotic *Moina macrocopa* (Straus, 1820) in Minas Gerais State, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 74(2): 518-520.

Robson, H. L. A., Noble, T. H., Saunders, R. J., Robson, S. K. A., Burrows, D. W. & Jerry, D. R. 2016. Fine-tuning for the tropics: application of eDNA technology for invasive fish detection in tropical freshwater ecosystems. *Molecular Ecology Resources*. 16(4): 922-932.

- Santander-Monsalvo, J., Espejel, I. & Ortiz-Lozano, L.** 2018. Distribution, uses, and anthropic pressures on reef ecosystems of Mexico. *Ocean & Coastal Management*. 165: 39-51.
- Schüttler, E. & Karez, C. S.** 2008. Especies exóticas invasoras en las Reservas de Biosfera de América Latina y el Caribe. Un informe técnico para fomentar el intercambio de experiencias entre las Reservas de Biosfera y promover el manejo efectivo de las invasiones biológicas. UNESCO, Montevideo. 247 pp.
- Silfvergrip, A. M. C.** 1996. A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae). Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden
- Silva-Briano, M., Arroyo-Bustos, G., Beltrán-Alvarez, R., Adabache-Ortiz, A. & Galvan-De la Rosa, R.** 2010. *Daphnia Ctenodaphnia lumholtzi* G. O. Sars, 1885 (Crustacea: Cladocera); un cladócero exótico en México. *Hidrobiologica*. 20(3): 275-280.
- Simoës, N. R., Robertson, B. A., Lansac-Toha, F. A., Takahashi, E. M., Bonecker, C. C., Velho, L. F. M. & Joko, C. Y.** 2009. Exotic species of zooplankton in the Upper Parana River floodplain, *Daphnia lumholtzi* Sars, 1885 (Crustacea: Branchiopoda). *Brazilian Journal of Biology*. 69(2): 551-558.
- Schmitter-Soto, J. J.,** Catálogo de los peces continentales de quintana roo [Internet]. 1996. <http://www.nativefishlab.net/library/textpdf/20569.pdf>
- Sousa, F. D. R., Palaoro, A. V., Elmoor-Loureiro, L. M. A., & Kotov, A. A.** 2017. Predicting the invasive potential of the cladoceran *Daphnia lumholtzi* Sars, 1885 (Crustacea: Cladocera: Daphniidae) in the Neotropics: are generalists threatened and relicts protected by their life-history traits? *Journal of Limnology*. 76(2): 272-280
- Stewart, K. A.** 2019. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. *Biodiversity and Conservation*. 28(5): 983-1001.
- Strecker, U.** 2006. The impact of invasive fish on an endemic *Cyprinodon* species flock (Teleostei) from Laguna Chichancanab, Yucatan, Mexico. *Ecology of Freshwater Fish*. 15(4): 408-418.
- Suárez-Morales, E. & Arroyo-Bustos, G.** 2012. An intra-continental invasion of the temperate freshwater copepod *Skistodiaptomus pallidus* (Herrick, 1879) (Calanoida, Diaptomidae) in tropical Mexico. *BioInvasions Records*. 1(4): 255-262.

- Suárez-Morales, E. & Elías-Gutiérrez, M.** 2000. Two new *Mastigodiptomus* (Copepoda, Diaptomidae) from Southeastern Mexico with a key for the identification of the known species of the genus. *Journal of Natural History*. 34(5): 693-708.
- Suárez-Morales, E., Gutierrez-Aguirre, M. A. & Mendoza, F.** 2011a. The Afro-Asian cyclopoid *Mesocyclops aspericornis* (Crustacea: Copepoda) in eastern Mexico with comments on the distribution of exotic copepods. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 82(1): 109-115.
- Suárez-Morales, E., Mercado-Salas, N. F. & Morales-Ramírez, A.** 2011b. Morphological variability and distribution of the exotic Asian *Mesocyclops thermocyclopoides* (Copepoda: Cyclopoida) in the Neotropical region. *Zoologia*. 28(5): 673-679.
- Thomsen, P. F. & Willerslev, E.** 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*. 183: 4-18.
- USGS (United States Geological Survey).** 2019. NAS-Nonindigenous Aquatic Species. Fecha de consulta: 01 de agosto de 2019.
<https://nas.er.usgs.gov/queries/SpeciesAnimatedMap.aspx?SpeciesID=963>
- Valdez-Moreno, M., Ivanova, N. V., Elías-Gutiérrez, M., Contreras-Balderas, S. & Hebert, P. D. N.** 2009. Probing diversity in freshwater fishes from Mexico and Guatemala with DNA barcodes. *Journal of Fish Biology*. 74(2): 377-402.
- Valdez-Moreno, M., Ivanova, N. V., Elías-Gutiérrez, M., Pedersen, S. L., Bessonov, K. & Hebert, P. D. N.** 2019. Using eDNA to biomonitor the fish community in a tropical oligotrophic lake. *Plos One*. 14(4): e0215505.
- Valdez-Moreno, M., Vázquez-Yeomans, L., Elías-Gutiérrez, M., Ivanova, N. V. & Hebert, P. D. N.** 2010. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management. *Marine and Freshwater Research*. 61: 665-671.
- Victor, B. C.** 2012. *Hypoplectrus floridae* n. sp. and *Hypoplectrus ecosur* n. sp., two new Barred Hamlets from the Gulf of Mexico (Pisces: Serranidae): more than 3% different in COI mtDNA sequence from the Caribbean *Hypoplectrus* species flock. *Journal of the Ocean Science Foundation*. 5(1): 2-19.
- Vinogradova, E. M.** 2008. Six new species of *Polypedilum* Kieffer, 1912, from the Yucatan peninsula (Insecta, Diptera, Chironomidae). *Spixiana*. 31(2): 277-288.
- Yoo, H., Cohuo, S., Macario-González, L. & Karanovic, I.** 2017. A new freshwater ostracod genus from the northern Neotropical region and its phylogenetic position in the family Cyprididae (Podocopida). *Zoologischer Anzeiger*. 266: 196-215.