

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LA BIODIVERSIDAD Y SUS ALTERACIONES EN COMUNIDADES BENTÓNICAS MARINAS DE LOS PARQUES NACIONALES

XAVIER TURÓN¹, OWEN S. WANGENSTEEN^{1,2}, CREU PALACÍN³, EMMA CEBRIÁN⁴

RESUMEN

El proyecto Metabarpark se propuso tres objetivos: generar un inventario exhaustivo de la biodiversidad presente en las comunidades bentónicas de los dos Parques Nacionales con dominio marino (Archipiélago de Cabrera e Islas Atlánticas de Galicia), analizar el impacto de las algas invasoras sobre esas comunidades y establecer un protocolo para aplicar la técnica del *metabarcoding* a comunidades bentónicas de sustrato duro. Se eligió trabajar con cuatro comunidades representativas en cada Parque, más tres comunidades dominadas por algas invasoras y una comunidad de laguna costera. Los muestreos se realizaron en 2014 y 2015 para analizar cambios temporales, en distintas estaciones (primavera y otoño) para analizar posibles variaciones estacionales y en comunidades invadidas y no invadidas, para analizar la variabilidad debida a los impactos derivados de invasiones biológicas (algas invasoras). Las muestras se separaron en tres fracciones de talla: megabentos (>10 mm), macrobentos (1-10mm) y meiobentos (60µm-1mm). En total se secuenciaron 155 muestras, obteniéndose más de 20 millones de secuencias de cada uno de los genes estudiados: 18S y COI. Se desarrolló un procedimiento bioinformático para procesar las secuencias. En el muestreo de 2014 se detectaron un total de 5.826 MOTUs (Unidad Taxonómica Operativa Molecular, el equivalente genético a la especie) de eucariotas con 18S y 21.452 MOTUs con COI. Los grupos más diversos fueron Metazoa, Archaeplastida y Stramenopiles. Dentro de los Metazoa, Arthropoda, Annelida y Cnidaria fueron los Tipos más diversos. Los resultados mostraron que el procedimiento de separar en fracciones de talla permite capturar la mayor parte de la diversidad de eucariotas presente. Las comunidades están bien diferenciadas entre ellas y también se detectaron diferencias significativas entre años y entre estaciones, al comparar los muestreos de 2014 y 2015. En un estudio específico con el muestreo de 2015, en dos de las tres especies de algas investigadas se encontró un efecto importante de la presencia de algas invasoras en la comunidad subyacente. Las bases de datos generadas deben considerarse como información de base para una monitorización continuada de estas comunidades, que permita detectar cambios (incluso poco aparentes) antes de que los potenciales impactos sean evidentes macroscópicamente.

Palabras clave: Biodiversidad, Bentos, *Metabarcoding*, Monitorización, Especies invasoras.

¹ Centre d'Estudis Avançats de Blanes (CEAB, CSIC), Accés Cala Sant Francesc, 14, 17300 Blanes (Girona). xturon@ceab.csic.es

² Norwegian College of Fishery Science, UiT the Arctic University of Norway, Tromsø, Noruega. owenwangensteen@gmail.com

³ Departament de Biologia Evolutiva, Ecologia y Ciències Ambientals y Institut de Recerca en Biodiversitat (IRBio), Universitat de Barcelona, Avda. Diagonal 643, 08028 Barcelona. cpalacin@ub.edu

⁴ Institut d'Ecologia Aquàtica, Universitat de Girona, Campus Montilivi, Girona. emma.cebrian@udg.edu

GENETIC ASSESSMENT OF BIODIVERSITY AND ITS ALTERATIONS IN MARINE BENTHIC COMMUNITIES OF NATIONAL PARKS

ABSTRACT

The project Metabarpark set out to achieve three objectives: to compile an exhaustive inventory of the biodiversity in benthic communities of the two National Parks with maritime domains (Cabrera Archipelago and Atlantic Islands of Galicia); to analyse the impact of invasive seaweeds in these communities, and to establish a protocol to apply metabarcoding procedures to hard-substrate benthic communities. We chose to work with four representative communities in each Park plus three communities with invasive seaweeds and one from a littoral lagoon. Samplings were performed in 2014 and 2015, to allow analysing temporal trends, in spring and autumn, to analyse seasonal variability, and in invaded and non-invaded assemblages, to deal with the impact derived from bioinvasions (i.e. invasive algae). Samples were size-fractionated in megabenthos (>10 mm), macrobenthos (1-10mm), and meiobenthos (60 µm-1mm). A total of 155 samples were sequenced, obtaining more than 20 million sequences for each of the two genes analysed: 18S and COI. A bioinformatics pipeline was developed for processing these reads. In the 2014 sampling, a total of 5,826 eukaryotic MOTUs (molecular operational taxonomic units, the genetic proxy for species) were detected with 18S, and 21,452 with COI. Metazoa, Archaeplastida, and Stramenopiles were the most diverse groups found. Within Metazoa, Arthropoda, Annelida and Cnidaria were the most MOTU-rich groups. The results showed that our size-fractionation procedure allowed capturing most of the eukaryotic diversity present. The communities were well differentiated among them, and both seasonal and inter-annual differences could be detected when comparing samples from 2014 and 2015. In a specific study in 2015, we found an important effect of the invasive algae (as compared to control samples) on the understory community for two of the three seaweeds analysed. The databases generated should be considered baseline information for a continued monitoring of these communities in order to detect subtle changes before potential impacts become macroscopically apparent.

Keywords: Biodiversity, Benthos, Metabarcoding, Monitoring, Invasive species.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la aplicación de nuevas técnicas genéticas está revolucionando nuestra capacidad de caracterizar e inventariar la biodiversidad presente en las comunidades marinas. Estas técnicas se basan en secuenciar uno o diversos genes en muestras obtenidas del ADN ambiental presente en todas las comunidades. Las secuencias se comparan después con bases de datos genéticas existentes, para traducir la diversidad genética encontrada en biodiversidad de organismos. Todo ello ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas de secuenciación masiva, que permiten secuenciar mezclas heterogéneas de ADN. Este nuevo método para caracterizar y evaluar la biodiversidad se ha denominado *metabarcoding* de comunidades (HAJIBABAEI *et al.*, 2011; TABERLET *et al.*, 2012; BOHMANN *et al.*, 2014, DEINER *et al.*, 2018).

El interés de caracterizar, de forma objetiva y precisa, la biodiversidad de las comunidades marinas, radica en que es el primer paso para cualquier trabajo encaminado a comprender su funcionamiento o a gestionar dichas comunidades (COSTELLO *et al.*, 2010; KNOWLTON & JACKSON 2008). Lamentablemente, un estudio exhaustivo de los ecosistemas marinos es muy difícil usando métodos tradicionales basados en el estudio morfológico, por la gran complejidad de los biomas, con multitud de organismos de pequeño tamaño, por la cada vez más acuciante falta de taxónomos y por la existencia de especies crípticas en muchos grupos (KNOWLTON 1993, MIKKELSEN & CRACRAFT 2001, WHEELER *et al.*, 2004). Por ello, la mayoría de estos estudios se restringen a macro-organismos o a unos pocos grupos, en función de la disponibilidad de taxónomos.

La técnica del *metabarcoding* permite superar en buena parte estos obstáculos y puede considerarse como una aproximación complementaria a la tradicional (CAHILL *et al.*, 2018), que permite en poco tiempo obtener inventarios exhaustivos de biodiversidad, de forma independiente a la capacidad taxonómica disponible, aprovechando bases de datos genéticas en todo el mundo (RATNASINGHAM & HEBERT 2007). Estos inventarios permiten multitud de aplicaciones, desde compa-

raciones ecológicas, monitorización a largo plazo o evaluación de impactos. El *metabarcoding* en medio marino ha sido aplicado hasta ahora con éxito a comunidades de sustratos relativamente homogéneos, como el agua de mar o los sedimentos marinos (p. ej., CHAIN *et al.*, 2015, GUARDIOLA *et al.*, 2016, LEJZEROWICZ *et al.*, 2015). Sin embargo, no se ha aplicado nunca a comunidades naturales de sustrato rocoso, con una gran complejidad estructural y organismos de tallas que difieren en órdenes de magnitud, a excepción de algunas aproximaciones que han usado superficies de asentamiento artificiales (LERAY & KNOWLTON 2015), que no se corresponden con la comunidad natural. Las comunidades de sustrato rocoso a poca profundidad están entre las más impactadas por el hombre, dado su carácter litoral, mientras que son también las más importantes desde el punto de vista de los servicios ecosistémicos y la economía. Por otro lado, se encuentran entre los ecosistemas más diversos de la biosfera (REAKA-KUDLA 1997, AGARDY *et al.*, 2005), por lo que el desarrollo de técnicas estandarizadas para su estudio es de crucial importancia.

En este estudio se ha querido poner a punto un método basado en *metabarcoding* y aplicado a comunidades de eucariotas en sustratos duros litorales. Dicho método se ha probado en comunidades representativas de los dos Parques Nacionales con dominio marino (Islas Atlánticas y Archipiélago de Cabrera). Aplicando la metodología desarrollada, se han compilado bases de datos de biodiversidad, que pueden usarse para su futura monitorización, se han analizado diferencias entre comunidades y en el tiempo, y se ha evaluado el impacto de algas invasoras en la comunidad bentónica subyacente.

MATERIAL Y MÉTODOS

La puesta a punto de un método genético para comunidades litorales de sustrato duro se basa en (1) un tamizado de las muestras para separarlas por clases de talla, (2) el diseño de nuevos cebadores genéticos universales y (3) la puesta a punto de un protocolo bioinformático para el análisis de las secuencias. La metodología detallada puede encontrarse en WANGENSTEEN & TURON (2017).

Muestreo

Los muestreos se llevaron a cabo en septiembre 2014 en ambos Parques y en mayo 2015 en las Islas Cíes y en octubre 2015 en Cabrera. La Tabla 1 muestra las principales características de las comunidades estudiadas. En cada muestreo se tomaron 4 réplicas en las siguientes comunidades: comunidad de *Cystoseira nodicaulis*, comunidad esciáfila con *Saccorhiza polyschides* y comunidad de maërl en las Cíes, y comunidad de algas fotófilas, comunidad de *Lophocladia lallemandii*, comunidad esciáfila con invertebrados y comunidad de fondos detríticos en Cabrera. Además, en 2014 se muestreó la comunidad fotófila de *Cystoseira tamariscifolia* en Cíes y en 2015 se muestrearon las comunidades de *Asparagopsis armata* en Cíes y la comunidad de *Caulerpa cylindracea* en Cabrera.

Las muestras se obtuvieron por raspado total de superficies de 25x25 cm (Fig. 1). En el caso de las comunidades de maërl y detrítico, las muestras se obtuvieron mediante un «corer» de 30 cm de diámetro, muestreando los primeros 5 cm de la comunidad. Todo el material recolectado se guardó en bolsas herméticas bajo el agua.

Procesado de muestras

El procesado inicial se basó en el tamizado de las muestras en tres fracciones de talla: >10 mm (me-

gabentos), de 10 mm a 1mm (macrobenetos), y de 1 mm a 60 µm (meiobenetos). Las tres fracciones de cada muestra se procesaron por separado.

La extracción de ADN se realizó con kits comerciales (MoBio PowerMax). Se amplificaron dos genes: el gen nuclear ribosomal del 18S (aprox. 110 pares de bases de la región v7) y el gen de la Citocromo oxidasa 1 (COI, aprox. 313 pares de bases de la región 5'). Para el primero se usaron los cebadores diseñados en GUARDIOLA *et al.* (2015): «forward» 5'-TTTGTCTGSTTAATTSCG-3', «reverse» 5'-TCACAGACCTGTTATTGC-3. Para el COI se usó un cebador «forward» modificado de LERAY *et al.* (2013) para incrementar su universalidad después de ensayar *in silico* su eficacia (WANGENSTEEN *et al.*, 2018a). Este nuevo cebador se llamó mICOIntF-XT (5'-GGWACWRGWTGRA-CWITITAYCCYCC-3'). El cebador «reverse» fue el jgHCO2198 (GELLER *et al.*, 2013): 5'-TAIACYT-CIGGRTGICCRAARAAYCA-3'.

Se realizaron un total de 4 carreras de secuenciación de alto rendimiento, una para cada gen y para cada muestreo. Se utilizó un secuenciador Illumina Mi-Seq («paired ends» 2*150 pb para el 18S, 2*250 pb para COI). En cada carrera se obtuvieron >12 millones de secuencias, que se analizaron bioinformáticamente. En cada carrera se incluyeron controles negativos y blancos, así como controles de replicabilidad (en una muestra se realizaron tres extracciones

PN	Comunidad	Especie dominante	Profundidad (m)	Coordenadas	Método de muestreo	2014	2015
Cabrera	Algas fotófilas	<i>Lophocladia lallemandii</i>	7-10	39,1250;2,9603	Raspados de 25*25 cm	X	X
Cabrera	Algas fotófilas	<i>Padina pavonica</i>	7-10	39,1250;2,9603	Raspados de 25*25 cm	X	X
Cabrera	Algas esciáfilas	Esonjas e invertebrados	30	39,1250;2,9603	Raspados de 25*25 cm	X	X
Cabrera	Algas esciáfilas	<i>Caulerpa cylindracea</i>	30	39,1250;2,9603	Raspados de 25*25 cm		X
Cabrera	Fondos detríticos	Algas coralináceas	50	39,1249;2,9604	Raspados de 25*25 cm	X	X
Islas Cíes	Algas fotófilas	<i>Cystoseira nodicaulis</i>	3-5	42,2259;-8,8969	Raspados de 25*25 cm	X	X
Islas Cíes	Algas fotófilas	<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	3-5	42,2260;-8,8970	Raspados de 25*25 cm	X	
Islas Cíes	Algas fotófilas	<i>Asparagopsis armata</i>	4-6	42,2146;-8,8973	Raspados de 25*25 cm		X
Islas Cíes	Algas esciáfilas	<i>Saccorhiza polyschides</i>	16	42,1917;-8,8885	Raspados de 25*25 cm	X	X
Islas Cíes	Maërl	Algas coralináceas	20	42,2123;-8,8972	Raspados de 25*25 cm	X	X

Tabla 1. Características de las comunidades y muestras analizadas en el presente trabajo. Se indica los años de muestreo.

Table 1. Characteristics of the communities and samples analyzed in the present study. Sampling years are indicated.

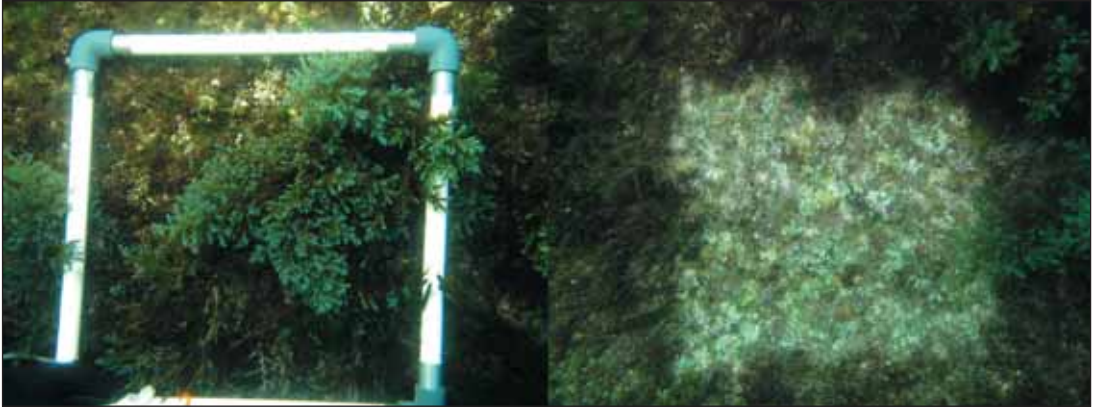


Figura 1. Aspecto de una comunidad fotófila en Islas Cíes antes y después del muestreo.

Figure 1. Aspect of a photophilous community in Cíes Islands before and after sampling.

y para una de esas extracciones se realizaron tres amplificaciones). Se usaron tres réplicas de cada comunidad para estudios genéticos. La cuarta réplica fue preservada en formol, para tener una colección de referencia morfológica.

Protocolo bioinformático

Para el análisis bioinformático se puso a punto un protocolo basado principalmente en el paquete de programas OBITools (BOYER *et al.*, 2016) y otros programas para pasos concretos. También se escribieron rutinas propias en R y Python. Después de eliminar secuencias de baja calidad y ensamblar las dos lecturas de cada una, se realizó un filtro de longitud (75-180 pares de bases para el 18S; 300-320 para el COI). Posteriormente se agruparon las secuencias idénticas, para generar una matriz de secuencias únicas. Se eliminaron las secuencias quiméricas, usando el algoritmo uchime *de novo* implementado en vsearch. Luego se agruparon estas secuencias en MOTUs (Molecular Operational Taxonomic Units). Cada MOTU agrupa las secuencias que son más similares y que se asume que son de la misma especie. La agrupación se realizó por métodos estadísticos bayesianos usando el programa CROP (HAO *et al.*, 2011), con unos parámetros $l=0.3$, $u=0.5$ para 18S (GUARDIOLA *et al.*, 2016) y $l=1.5$, $u=2.5$ para COI. Estos valores se eligieron

para evitar la sobreagrupación de especies diferentes en el mismo MOTU (WANGENSTEEN & TURON 2017).

Posteriormente se realizó una asignación taxonómica de los MOTUs, comparándolos con la información existente en las bases de datos genéticas públicas, usando el programa ecotag de OBITools. Para el 18S, dicha información se obtuvo del GenBank, mientras que para COI se usó GenBank y BOLD (Barcode of Life Datasystems). Con el programa ecoPCR de OBITools se amplificaron *in silico* los genes estudiados y se generó una base de datos de referencia para cada gen. Dichas bases de datos fueron curadas y editadas manualmente. Estas bases de referencia generadas en el proyecto son de acceso abierto y se encuentran disponibles en: (<http://github.com/metabarpark/Reference-databases>).

Los MOTUs se pueden identificar a diferentes niveles taxonómicos, dependiendo de si la especie en cuestión u otras próximas han sido secuenciadas e incluidas en las bases de datos públicas o no. Por ello, algunos MOTUs están identificados a nivel de especie, otros a nivel de Género, Familia, Orden, Clase o Tipo. Las que no se pudieron asignar como mínimo al nivel de Tipo se consideraron no asignadas. El refinamiento final de las tablas de MOTUs incluyó colapsar MOTUs asignados a una misma especie, eliminar MOTUs con menos de 10 lecturas

(si no estaban asignados a Tipo o inferior) o menos de 5 lecturas (si estaban asignados), y corregir según las lecturas de los controles negativos y los posibles errores en la asignación de las secuencias a cada muestra durante la etapa de multiplexado (siguiendo a WANGENSTEEN & TURON 2017). Finalmente, los MOTUs no asignados a eucariotas fueron eliminados.

Análisis estadísticos

Las tablas de MOTUs con el número de secuencias (lecturas) obtenidas de cada uno en cada una de las muestras, y su asignación taxonómica, han sido la base para los estudios de comunidades. Para la mayoría de estos análisis se utilizó el paquete *vegan* de R (OKSANEN *et al.*, 2016). Para comparaciones de riqueza de MOTUs se realizó una rarefacción (función *rarefy*) del número de lecturas a la muestra con menor número (10.000). Igualmente, se construyeron matrices de distancias entre muestras, usando el índice de Bray-Curtis (función *vegdist*) aplicado a la raíz cuarta del número de lecturas de cada MOTU (relativo al total de cada muestra). Dichas matrices de distancia se representaron gráficamente usando un escalado multidimensional no-métrico (nMDS, función *isoMDS*). Las comparaciones entre las diversas comunidades se realizaron con métodos de análisis multivariante, implementados en el programa PERMANOVA (ANDERSON *et al.*, 2008).

RESULTADOS

Patrones de α y β -diversidad

Los resultados de biodiversidad y comparación ecológica se obtuvieron con las muestras de 2014, mientras que las del 2015 se usaron para el estudio de variabilidad temporal y de impactos de algas invasoras.

Con las muestras del 2014 se realizó el *metabarcode* de 80 muestras: 72 muestras (2 parques x 4 comunidades x 3 réplicas x 3 fracciones), 2 blancos, 2 controles negativos y 4 muestras adicionales para el estudio de reproducibilidad. Los controles negativos y los blancos mostraron un número insignificante de secuencias. Después del filtro de calidad, se

retuvieron 8.266.952 secuencias válidas de 18S (media de 105.987 por muestra) y 10.093.453 de COI (media de 134.580 por muestra). Dichas secuencias se agruparon en 5.826 MOTUs de 18S y 21.452 MOTUs de COI. Era de esperar que del fragmento de COI analizado, de mayor longitud y variabilidad que el de 18S, se obtuviera un orden de magnitud más de diversidad que con el 18S. Los controles de replicabilidad técnica (diferentes extracciones de la misma muestra y diferentes amplificaciones del mismo extracto) no mostraron diferencias apreciables. Las tablas de MOTUs, con su asignación taxonómica y los datos de abundancia (número de lecturas) en cada muestra y fracción, se han depositado en la base de datos pública Mendeley: <https://data.mendeley.com/datasets/63r3t67b35/1>.

La Figura 2 muestra el número de MOTUs y de secuencias obtenidas para los principales grupos de Eucariotas con COI (7 en total, dominados por Metazoa, Rhodophyta y Stramenopiles) y para los distintos Tipos de Metazoa (19 en total, siendo Artrópodos, Cnidarios y Anélidos los más diversos). El número de lecturas (Fig. 2) también reflejó la biomasa proporcional de cada grupo. Los resultados relativos de número de MOTUs y de lecturas por grupo fueron similares para los dos genes, aunque el número total de MOTUs fue inferior con 18S.

El método de asignación taxonómica retornó diferentes categorías para cada MOTU, dependiendo de la sensibilidad del marcador y de lo exhaustiva que es la base de datos de referencia correspondiente. El 81.5% de MOTUs de 18S y el 57.6% de MOTUs de COI pudieron ser asignados taxonómicamente a nivel de Tipo o inferior. La Figura 3 muestra la proporción de lecturas que resultaron asignadas a las diferentes categorías taxonómicas con cada marcador. Se aprecia que con COI la asignación fue mucho más precisa, pudiéndose asignar casi el 50% de las lecturas y, por tanto, los MOTUs con mayor biomasa, a nivel de especie. Los MOTUs asignados a la categoría de Tipo o inferior representaron más del 91% de las lecturas con ambos marcadores.

Las tres fracciones de talla que se analizaron presentaron un marcado solapamiento de MOTUs, de forma que el 73,4% de los MOTUS se detectaron en las tres fracciones en el caso del 18S. Dicho porcentaje

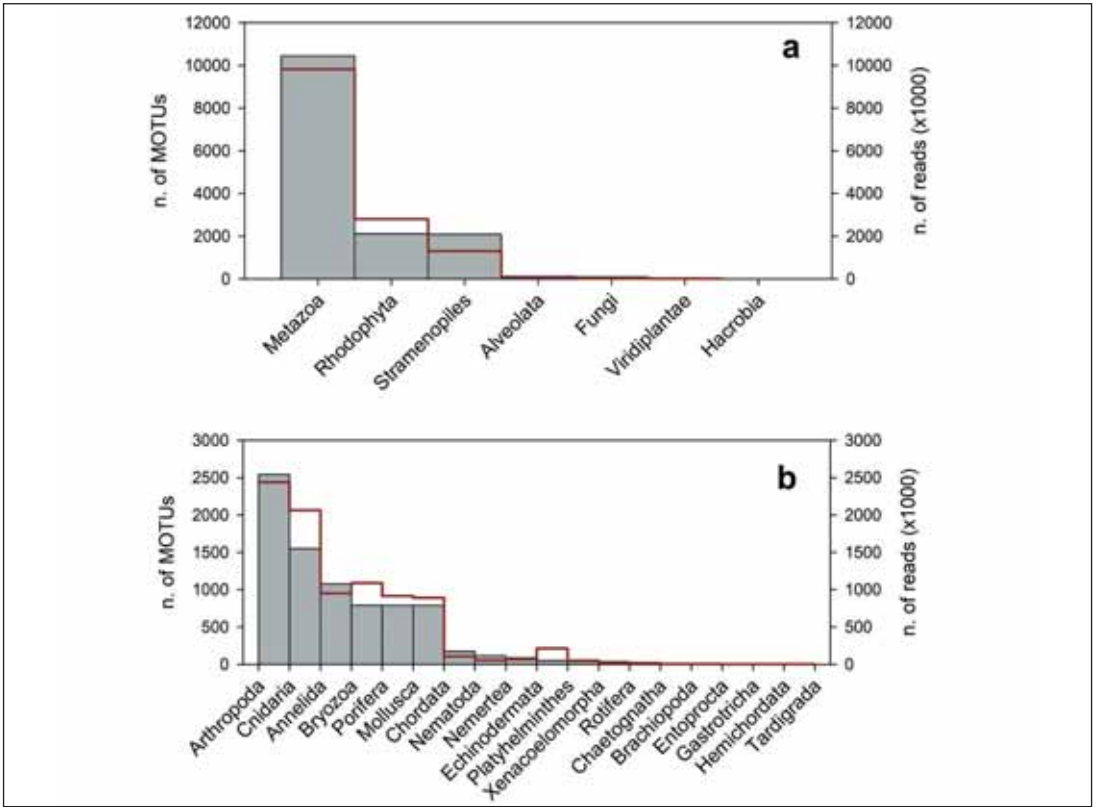


Figura 2. Número total de MOTUs (histogramas) y de lecturas (línea roja) detectados con COI para los principales grupos de eucariotas (a) y, dentro de los metazoos, para los distintos Tipos (b).

Figure 2. Total number of MOTUs (in histograms) and of reads (red line) detected with COI for the main groups of eukaryotes (a) and, within metazoans, for the different Phyla (b).

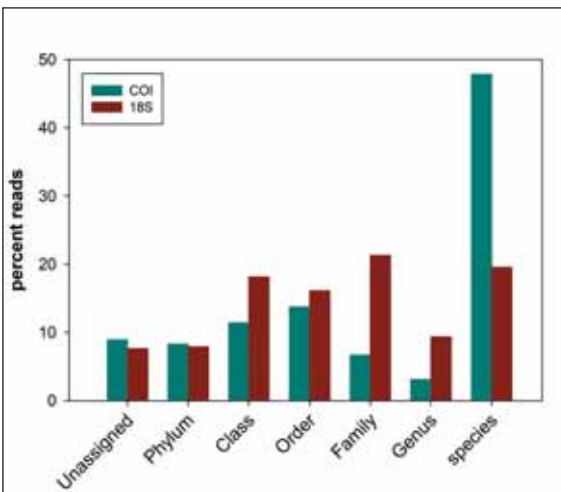


Figura 3. Abundancia (en porcentaje de lecturas) de los MOTUs asignados a las diferentes categorías taxonómicas.

Figure 3. Abundance (in percent read numbers) of MOTUs assigned to the different taxonomic categories.

bajo al 56,4% para el COI. La fracción que presentó más MOTUs exclusivos fue siempre la fracción C (6,1% en 18S y 12,2% en COI). Los valores de diversidad también mostraron una clara tendencia entre fracciones (Fig. 4). La fracción C (meiobentos) fue siempre la más diversa en número de MOTUs (se realizó una rarefacción del número de lecturas a la muestra que tenía menos para que los valores fueran comparables). La fracción B (macrobentos) a su vez fue generalmente más diversa que la fracción A (megabentos). Para ambos marcadores, un análisis

estadístico de Kruskal-Wallis, seguido de un test de Dunn, mostró que en todas las comunidades la fracción C fue significativamente más diversa que las fracciones A y B, que no diferían significativamente. La única excepción fue la comunidad detrítica de Cabrera, que no presentó diferencias significativas entre las tres fracciones para el COI ($p=0.14$).

Las abundancias relativas (en número de lecturas) asignadas a los principales grupos de eucariotas a nivel de Tipo o inferior, por comunidades y fraccio-

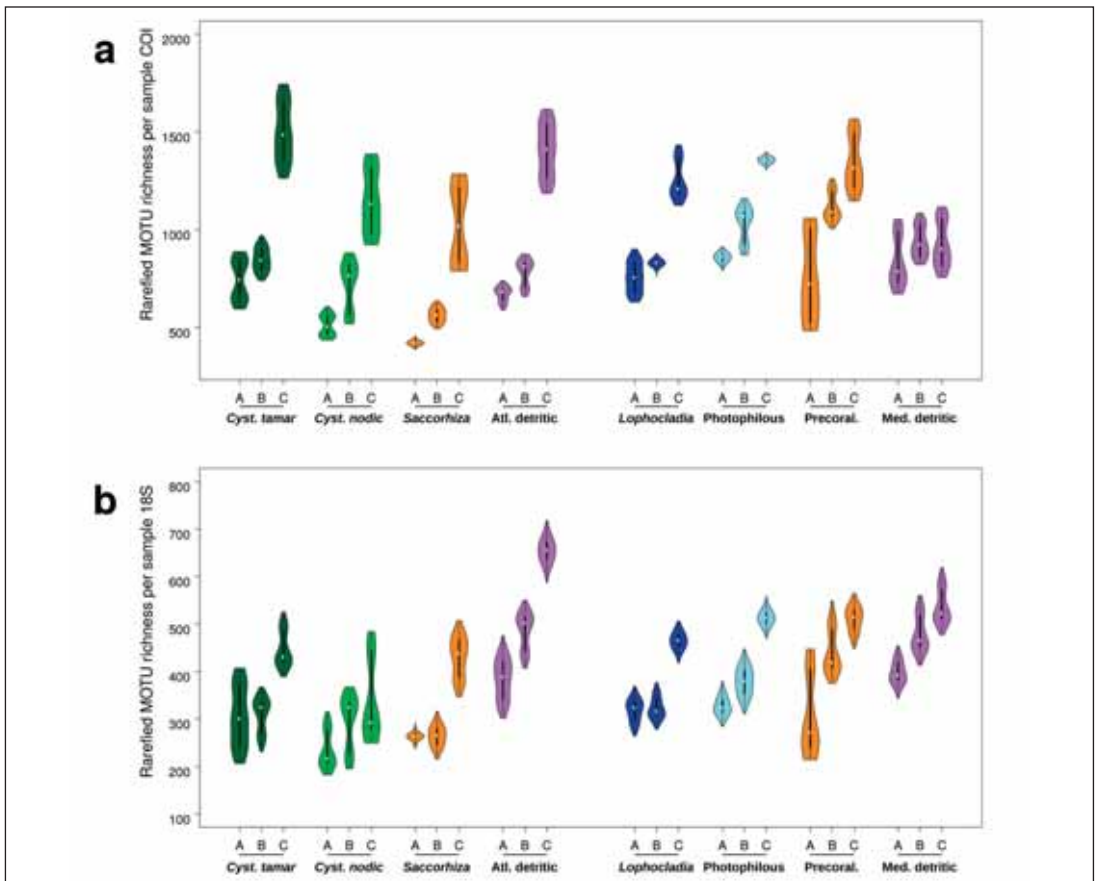


Figura 4. Patrones de α -diversidad. Se representan las tres fracciones de talla (A, B y C) en las ocho comunidades estudiadas. Los resultados se han obtenido después de rarefacción a 10.000 lecturas por muestra con 500 réplicas. (a) resultados para COI, (b) resultados para 18S.

Figure 4. Patterns of α -diversity. Graphs of three different size fractions (A, B and C) in the eight communities studied. Results obtained by rarefaction analysis to 10,000 reads per sample with 500 replicates. (a) MOTU richness obtained with COI; (b) MOTU richness obtained with 18S.

nes, se representan en la Figura 5 para el COI y en la Figura 6 para el 18S. La mayor abundancia de lecturas no asignadas se encontró en la fracción C, particularmente en el caso del COI. Secuencias de pequeños metazoos como anélidos o artrópodos fueron también más abundantes en la fracción más fina, mientras que algas macroscópicas (rodofíceas, feofíceas) tendieron a dominar en las fracciones grandes (A y B). Metazoos coloniales y modulares como esponjas, cnidarios o briozoos estuvieron repartidos más uniformemente entre fracciones. Los dos marcadores mostraron un patrón de abundan-

cias similar, aunque con algunas diferencias, como una mayor abundancia de lecturas de moluscos y esponjas con 18S, y mayor abundancia de artrópodos y rodofíceas con COI.

Un estudio de ordenación espacial realizado con escalado multidimensional no-métrico (MDS, Fig. 7) mostró que, en general, las muestras de las tres fracciones de cada comunidad se agruparon entre sí. Apareció un claro patrón de separación entre comunidades mediterráneas y atlánticas, así como un gradiente en cada una de ellas, desde comunidades

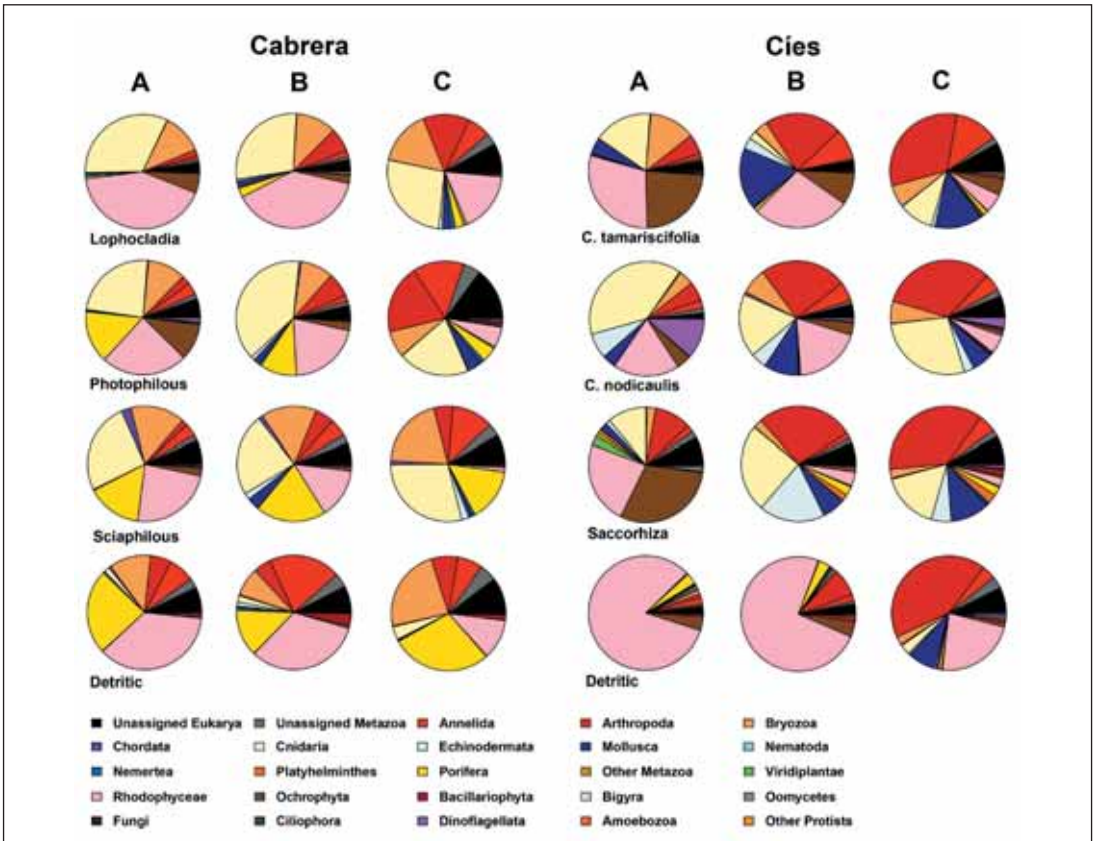


Figura 5. Abundancia (en número de lecturas) de las principales categorías taxonómicas en función de la comunidad y la fracción de talla (A, B y C). Resultados obtenidos con COI en ocho comunidades marinas litorales de Cabrera (izquierda) e Islas Cies (derecha). Las réplicas de cada comunidad y clase de talla se han juntado.

Figure 5. Abundance of metabarcoding reads per community and fraction size (A, B, or C). Results obtained using COI in eight different marine littoral communities from Cabrera (left) and Cies Islands (right). All replicates from the same community and fraction size have been pooled.

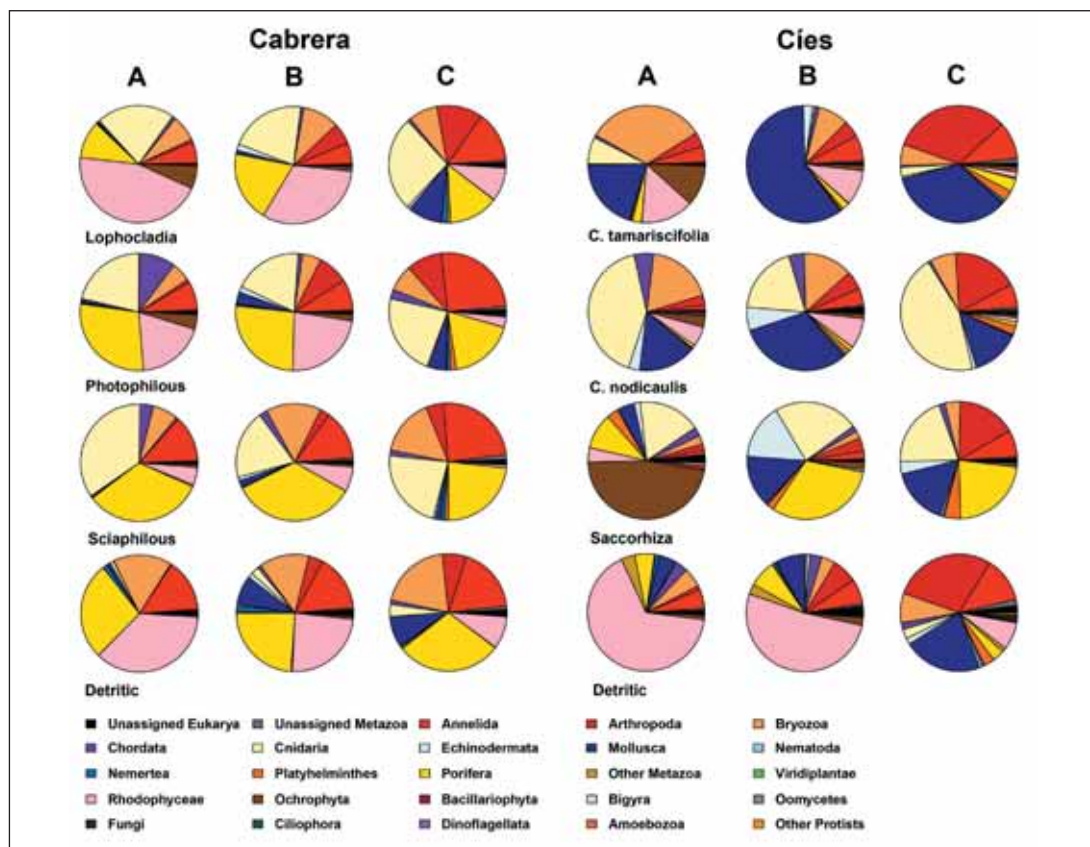


Figura 6. Abundancia (en número de lecturas) de las principales categorías taxonómicas en función de la comunidad y la fracción de talla (A, B y C). Resultados obtenidos con 18S en ocho comunidades marinas litorales de Cabrera (izquierda) e Islas Cíes (derecha). Las réplicas de cada comunidad y clase de talla se han juntado.

Figure 6. Patterns of abundance of metabarcoding reads per community and fraction size (A, B, or C). Results obtained using 18S in eight different marine littoral communities from Cabrera (left) and Cies Islands (right). All replicates from the same community and fraction size have been pooled.

más someras a comunidades más profundas, con menor iluminación. Ambos marcadores mostraron un patrón similar, aunque con COI las comunidades atlánticas aparecieron más próximas entre sí, mientras que con 18S las comunidades fotófilas atlánticas quedaron más separadas de las comunidades esciáfilas (comunidad de *Saccorhiza* y de maërl).

Variación temporal

Las muestras obtenidas en 2015 permitieron establecer comparaciones temporales en la composición

de las comunidades. En el caso de las Islas Cíes, dado que se muestreó en otoño de 2014 y primavera de 2015, se pudieron analizar diferencias ligadas a la estacionalidad, mientras que para Cabrera, muestreada en otoño de 2014 y 2015, las diferencias son atribuibles a cambios interanuales. Las comunidades muestreadas en ambos años se detallan en la Tabla 1. Las secuencias correspondientes se juntaron y reanalizaron con el mismo protocolo bioinformático. La base de datos para el estudio temporal con el gen 18S comprendía 4.077 MOTUs, mientras que con COI se obtuvieron 29.112 MOTUs.

Las representaciones de MDS de las comunidades comparadas fueron muy similares para ambos genes. La Figura 8 muestra los resultados para el 18S. Mediante un análisis PERMANOVA con

9.999 permutaciones, se analizó la diferenciación temporal dentro de cada comunidad. El resultado mostró, para ambos genes, cambios significativos interanuales en Cabrera para las tres comunidades

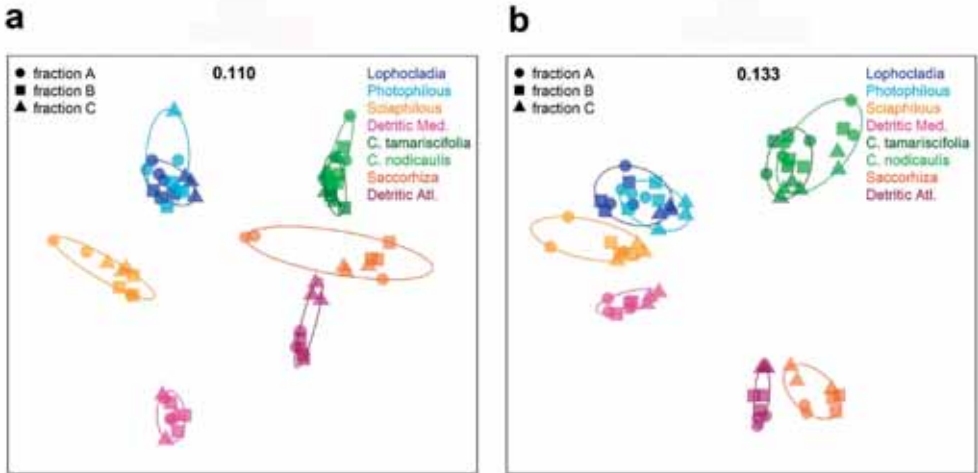


Figura 7. MDS de las comunidades estudiadas usando la distancia de Bray-Curtis. (a) resultados para COI; (b) resultados para 18S. Se indica el valor de estrés de las configuraciones.

Figure 7. MDS of the studied communities based on Bray-Curtis distances. (a) results obtained with COI; (b) results obtained with 18S. The stress of the configurations is indicated.

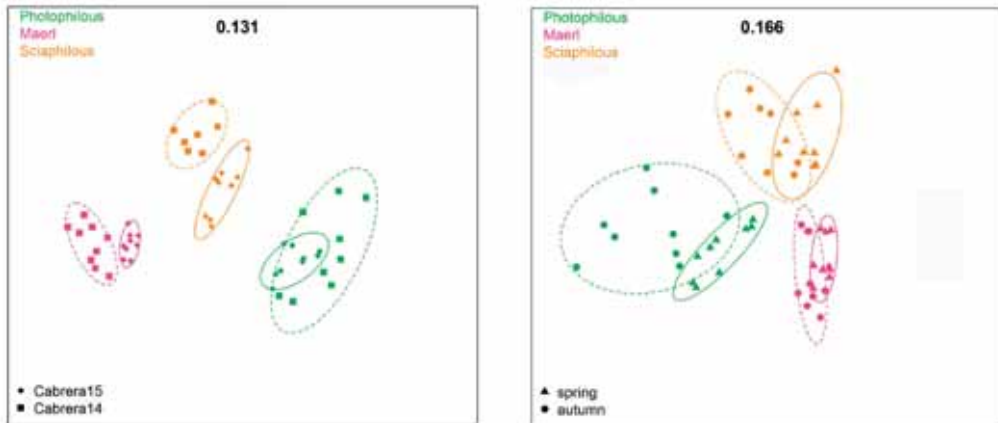


Figura 8. Representación MDS usando la distancia de Bray-Curtis de las comunidades estudiadas en años sucesivos en la misma estación del año (Cabrera, izquierda) y en distintas estaciones (Cies, derecha). Resultados obtenidos del gen 18S. Se indica el valor de estrés de las configuraciones.

Figure 8. MDS graphs (based on Bray-Curtis distances) of the communities sampled in successive years in the same season (Cabrera, left) an in different seasons (Cies Islands, right). Results obtained with 18S. The stress of the configurations is indicated.

(fotófila, esciáfila y detrítico; $p < 0.001$). Igualmente, en las Cíes el factor estacional fue significativo para todas las comunidades estudiadas (fotófila, esciáfila y maërl; $p < 0.001$).

Especies invasoras

El estudio del efecto de las especies invasoras se llevó a cabo con las muestras del 2015, dado que se recogieron de forma específica muestras de las comunidades dominadas por *Caulerpa cylindracea* y *Lophocladia lallemandii* en Cabrera, y por *Asparagopsis armata* en Islas Cíes. Para poder comparar los resultados, se recolectaron también muestras de los mismos puntos y profundidades, pero sin las algas invasoras. Los resultados se muestran en la Figura 9 (ver también WANGENSTEEN *et al.*, 2018b, para más detalles).

En estos análisis se usaron sólo las fracciones finas (macrobentos y meiobentos), ya que la fracción gruesa (> 10 mm, megabentos) estaba dominada por las propias algas invasoras y su inclusión exageraría las diferencias. La pregunta de interés era si la presencia de algas invasoras tenía un efecto detectable en las comunidades de organismos pequeños, que se desarrollan bajo la cobertura algal. Se trata de un aspecto muy raramente considerado, pues los estudios de impacto se suelen hacer a nivel de los organismos más grandes y conspicuos de las comunidades.

Las bases de datos finales para esta parte del estudio comprendieron 2.415 MOTUs para el gen 18S y 21.184 MOTUs para COI. La comunidad de *Caulerpa* resultó ser la más diversa (1.739 y 14.952 MOTUs con 18S y COI, respectivamente), seguida de *Lophocladia* (1.441 y 9.842 MOTUs con 18S y COI, respectivamente) y de *Asparagopsis* (1.190 y 5.382 MOTUs con 18S y COI, respectivamente). La representación espacial mediante MDS mostró cambios en las comunidades en función de la presencia o no de algas invasoras. Los resultados fueron similares para ambos marcadores. En la Figura 10 se muestra la ordenación obtenida con COI. Los análisis estadísticos mostraron un efecto significativo de la presencia de algas invasoras en la comunidad subyacente para *Lophocladia* (análisis PERMANOVA; $p = 0.002$ y $p = 0.005$ para 18S y COI, respectivamen-

te) y para *Asparagopsis* ($p = 0.005$ y $p = 0.008$ para 18S y para COI, respectivamente), mientras que el efecto no fue significativo para *Caulerpa* ($p = 0.174$ y $p = 0.191$ para 18S y para COI, respectivamente). El efecto de la fracción de tamaño considerada (B o C) fue siempre significativo, mientras que la interacción entre fracción y condición (invadido/control) no fue significativa en ningún caso.

El efecto de la presencia de algas invasoras sobre la diversidad dependió también del alga considerada. En general, la diversidad fue mayor en las comunidades invadidas para *Caulerpa* y *Lophocladia* y menor para *Asparagopsis* (Figs. 11-13), aunque el resultado se debe principalmente al efecto de la fracción más diversa (C).

DISCUSIÓN

Se han identificado más de 20.000 (con COI) y más de 5.000 (con 18S) MOTUs de eucariotas en las comunidades seleccionadas. La mayor diversidad se ha encontrado en los Metazoa, seguidos por Archaeplastida y Stramenopiles. Entre los metazoos, los más diversos son artrópodos, anélidos y cnidarios. La técnica de *metabarcoding* no había sido aplicada hasta ahora a comunidades litorales de sustrato duro. El presente proyecto ha demostrado que esta técnica permite una caracterización integral de las comunidades bentónicas, con un nivel de detalle mucho mayor que con métodos tradicionales, y permite analizar más muestras y en mucho menor tiempo. En particular, los componentes más pequeños de la biodiversidad (la fracción menor del macrobentos y el meiobentos), que por motivos logísticos son casi siempre olvidados en los estudios, a pesar de ser la fracción más diversa y la que primero responde a las perturbaciones.

La aplicación de la técnica de *metabarcoding* para caracterizar comunidades litorales marinas se ha visto frenada hasta ahora por la falta de protocolos estandarizados para la obtención y tratamiento de muestras, de cebadores universales para amplificar la gran variedad de grupos presentes en estas comunidades y de un protocolo bioinformático, capaz de analizar los millones de secuencias que se obtienen. Los métodos desarrollados en este trabajo, que in-

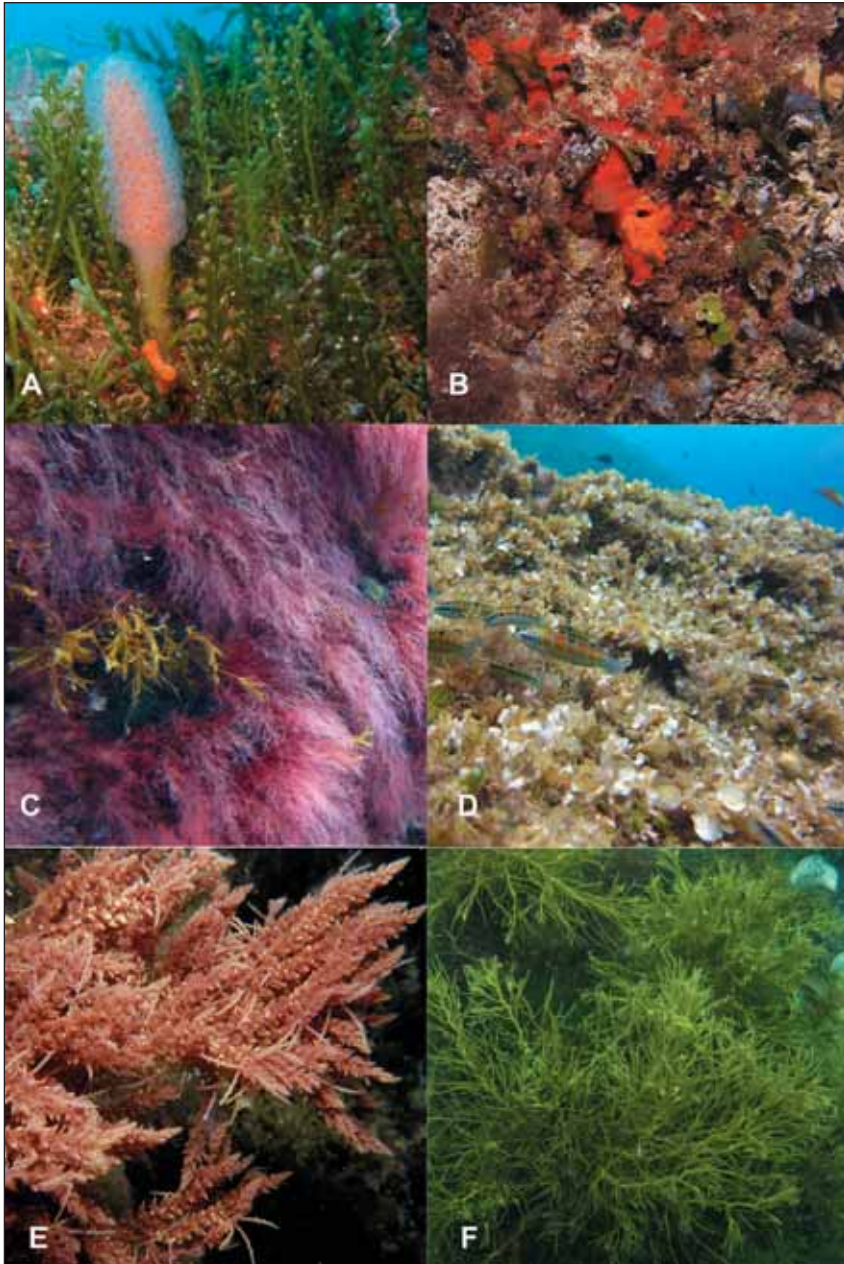


Figura 9. Aspecto de las comunidades dominadas por *Caulerpa cylindracea* (A), *Lophocladia lallemandii* (C) y *Asparagopsis armata* (E), con sus respectivas comunidades control no invadidas (B, D, F). Créditos: foto A, Eneko Aspillaga; fotos C, D, Pol Eneko; fotos B, D, Xavier Turon; foto E, Enrique Ballesteros.

Figure 9. Images of the communities dominated by *Caulerpa cylindracea* (A), *Lophocladia lallemandii* (C) and *Asparagopsis armata* (E), with their respective non-invaded control communities (B, D, F). Credits: photo A, Eneko Aspillaga; photos C, D, Pol Eneko; photos B, D, Xavier Turon; photo E, Enrique Ballesteros.

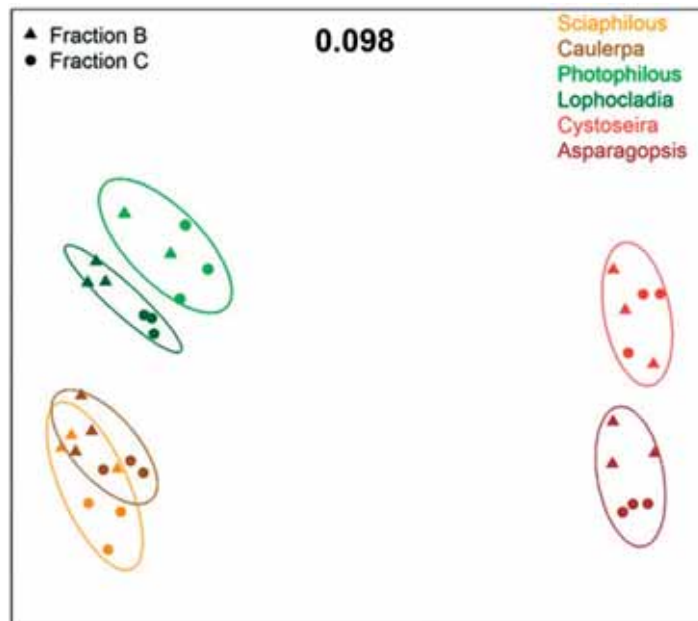


Figura 10. Representación multidimensional (MDS, basado en la distancia de Bray-Curtis) de las muestras pertenecientes a comunidades invadidas y no invadidas. Datos obtenidos con el gen COI. Se indica el valor de estrés de la configuración.

Figure 10. Multidimensional representation (MDS, based on Bray-Curtis distance) of the samples corresponding to invaded and non-invaded communities. Data obtained with COI. The stress of the configuration is indicated.

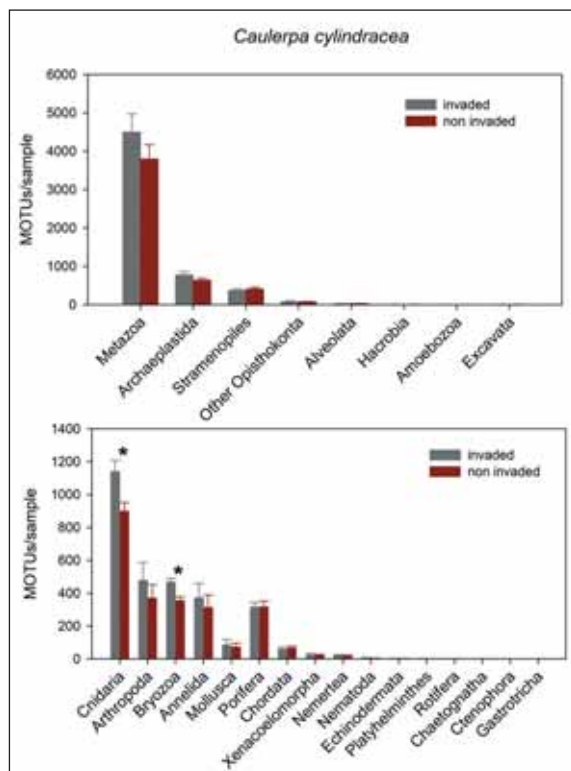


Figura 11. Número de MOTUs por muestra obtenidos con COI de los principales grupos de eucariotas y Tipos de metazoos para la comunidad de *Caulerpa cylindracea*. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las comunidades invadidas y no invadidas (test de la *t*). Las barras de error indican el error estándar.

Figure 11. Number of COI MOTUs per sample of the main Eukarya groups and metazoan Phyla for the *Caulerpa cylindracea* community. Asterisks indicate significant differences between invaded and non-invaded communities (*t*-test). Error bars are standard errors.

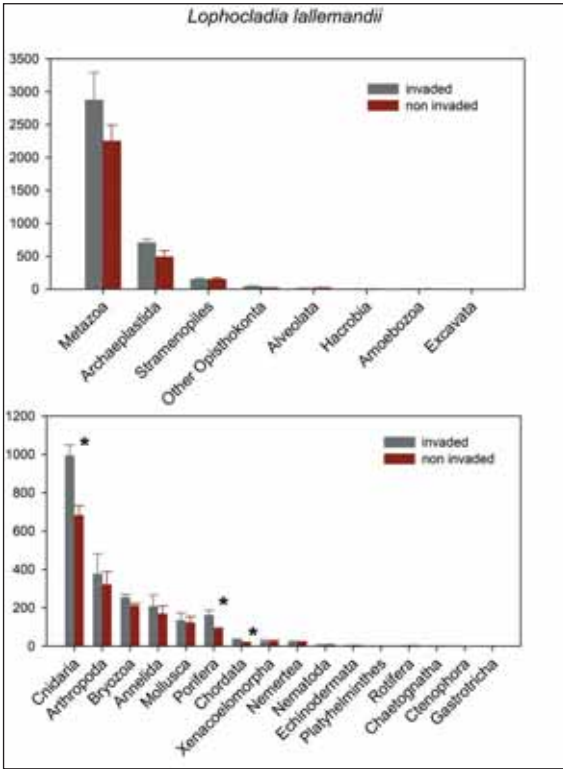


Figure 12. Número de MOTUs por muestra obtenidos con COI de los principales grupos de eucariotas y Tipos de metazoos para la comunidad de *Lophocladia lallemandii*. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las comunidades invadidas y no invadidas (test de la *t*). Las barras de error indican el error estándar.

Figure 12. Number of COI MOTUs per sample of the main Eukarya groups and metazoan Phyla for the *Lophocladia lallemandii* community. Asterisks indicate significant differences between invaded and non-invaded communities (*t*-test). Error bars are standard errors.

cluyen la separación de las muestras en fracciones de talla, cebadores universales mejorados y un protocolo bioinformático, con nuevas bases de referencia para eucariotas, constituyen un paso importante para aplicar las técnicas genéticas a este tipo de comunidades. El método es fiable y repetible: las tres réplicas de cada comunidad tenían composición similar y, al analizar diversas extracciones de la misma muestra o diversas PCR de la misma extracción, los resultados fueron prácticamente idénticos.

El fraccionamiento de las muestras por tamaños es crucial dado que, de otro modo, el elevado contenido en DNA procedente de los organismos de mayor talla impediría la aparición de secuencias de los organismos más pequeños (COWARD *et al.*, 2015, ELBRECHT *et al.*, 2017) o estos aparecerían en tan pequeño número que serían filtrados durante el proceso bioinformático. Por ello, WANGENSTEEN *et al.* (2018a) proponen un filtro de abundancia consis-

tente en eliminar los MOTUs que no alcanzan el 1% de las lecturas en al menos alguna de las muestras. En el presente trabajo no se ha aplicado este filtro, a fin de aprovechar toda la información posible, pero está claro que, de no existir una fracción separada para organismos de pequeña talla (fracción C), no sólo desaparecerían los MOTUs exclusivos de esta fracción (12% para COI), sino que otros muchos MOTUs no pasarían los filtros de abundancia que se suelen aplicar en este tipo de estudios. Hay que tener en cuenta que la fracción C es la más diversa y es particularmente rica en elementos de la meiofauna, que forman una parte muy importante de la biodiversidad, y que pueden detectarse únicamente si la biomasa de los organismos grandes es retenida en otras fracciones de talla.

Aunque ambos genes han producido similar información básica en cuanto a la composición y diferenciación entre comunidades, el COI, dada su

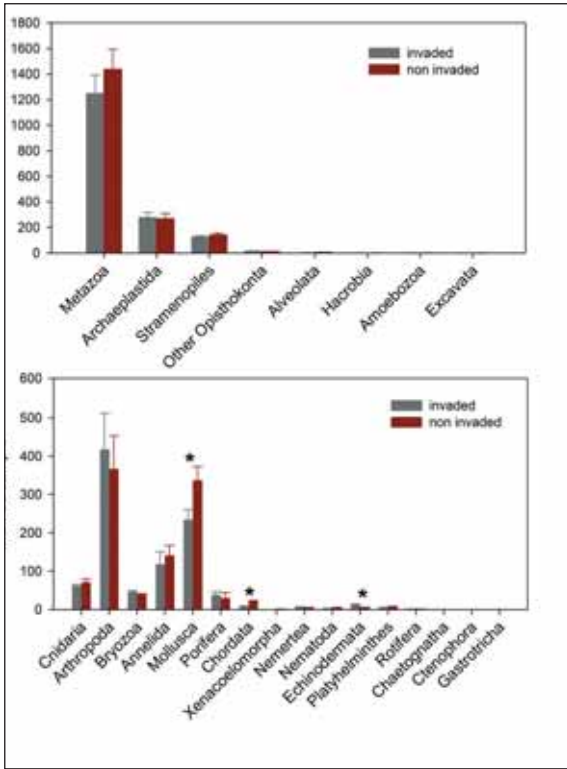


Figura 13. Número de MOTUs por muestra obtenidos con COI de los principales grupos de eucariotas y Tipos de metazoos para la comunidad de *Asparagopsis armata*. Los asteriscos indican diferencias significativas entre las comunidades invadidas y no invadidas (test de la *t*). Las barras de error indican el error estándar.

Figure 13. Number of COI MOTUs per sample of the main Eukarya groups and metazoan Phyla for the *Asparagopsis armata* community. Asterisks indicate significant differences between invaded and non-invaded communities (*t*-test). Error bars are standard errors.

variabilidad, permite una asignación taxonómica mucho más precisa que el 18S. Por contra, y debido a esta diferencia de variabilidad, las secuencias de 18S casi siempre se pueden asignar, al menos a nivel de grandes grupos, mientras que con el COI, cuando no hay secuencias próximas en la base de datos, es imposible realizar una asignación. De hecho, el porcentaje de MOTUs no asignados a Tipo o inferior rango ha sido del 18.5% con 18S y del 42.4% con COI. Aun así, el COI ha detectado unas 4 veces más MOTUs que el 18S y, por otra parte, el COI permite identificaciones fiables a nivel de especie, cosa normalmente imposible con 18S, dado el grado de conservación de sus secuencias (TANG *et al.*, 2012). En particular, a nivel de lecturas, un porcentaje tres veces mayor de la abundancia global ha sido identificado a nivel de especie con COI. Esta resolución a nivel específico es crucial para muchas aplicaciones, como el cálculo de índices ecológicos o la detección de especies invasoras (AYLAGAS *et al.*, 2016, COMTET *et al.*, 2015).

El uso del COI en *metabarcoding* ha sido criticado por la falta de universalidad de los cebadores, que introduce sesgos en los resultados (DEAGLE *et al.*, 2014). Sin embargo, trabajos recientes han contribuido a superar este problema (LERAY *et al.*, 2013, ELBRECHT & LEESE 2017) y el COI está desplazando a los genes ribosomales como marcador para estudios de *metabarcoding* de eucariotas (AYLAGAS *et al.*, 2016, VAMOS *et al.*, 2018). Por otro lado, el COI tiene la ventaja de ser el gen más usado en la identificación genética de especies (*barcoding*), por lo que a nivel internacional se está realizando un esfuerzo continuado, para generar una base de datos completa de COI para metazoos y otros grupos de eucariotas (Barcode of Life Data Systems, RATNASINGHAM & HEBERT 2007).

Las comunidades caracterizadas genéticamente se diferencian claramente entre sí con ambos genes. Con un análisis multivariante se separan en primer

lugar las muestras del Mediterráneo y del Atlántico, y dentro de cada una, las diversas comunidades aparecen bien delimitadas. Por otro lado, se ha puesto de manifiesto una variabilidad temporal significativa, tanto comparando estaciones del año como años sucesivos. El método usado, por tanto, permite una caracterización de la biodiversidad a un nivel muy preciso, adecuado para estudios ecológicos.

Por todo lo anterior, es altamente deseable aplicar este método, para una monitorización continuada en el tiempo, lo que permitirá detectar cualquier cambio que se produzca, incluso antes de que se traduzca en cambios macroscópicos, dado que los organismos de pequeño tamaño son generalmente los primeros en responder a cualquier perturbación. De este modo, la monitorización permitirá detectar con antelación alteraciones de la biodiversidad, permitiendo actuar sobre ellas. Cualquier cambio destacable, en particular la aparición o desaparición de algún MOTU abundante, deberá ser analizado de forma individual, para determinar si se trata de una nueva introducción, de cambios en especies importantes, etc.

Periódicamente deben volver a asignarse taxonómicamente los MOTUs de los estudios realizados, para mejorar la identificación de especies y poder asignar más MOTUs conforme las bases de datos genéticas se vayan mejorando con la inclusión de más organismos. Cada MOTU, aunque no se pueda asignar o no se pueda saber de qué especie se trata, está identificado por su secuencia, por lo que se puede ver en qué muestras se encuentra y con qué abundancia, lo que permite usarlo en comparaciones de estructura de comunidades. Por otro lado, incluso los MOTUs anónimos en el futuro pueden tener una asignación taxonómica precisa, a medida que las bases de datos públicas se vayan completando.

Esta técnica ha puesto de manifiesto que las algas invasoras no sólo afectan el paisaje macroscópico, sino que tienen un efecto sobre las comunidades de organismos de pequeña talla, que forman la mayor parte de la biodiversidad presente. El *metabarcoding* permite, por tanto, un estudio fino de la vulnerabilidad y los impactos sobre las comunidades. Los resultados muestran que la afectación es diferente según la especie invasora considerada y, por ejemplo,

las diferencias encontradas entre las comunidades invadidas por *Caulerpa cylindracea* y las comunidades adyacentes sin el alga no han sido significativas. Por otro lado, la diversidad de algunos grupos aumentó significativamente en las comunidades invadidas por dos de las algas. Es conocido que las especies ingenieras, como son las algas consideradas, pueden incrementar la diversidad, al generar muchos microhábitats que las especies pueden explotar

Como conclusión, en este trabajo se ha puesto a punto y aplicado la metodología para estudiar mediante *metabarcoding* las comunidades de sustrato duro de los Parques Nacionales marítimos. De los dos genes utilizados (el gen ribosomal 18S y el mitocondrial COI), COI permite detectar una variabilidad mucho mayor y una asignación taxonómica más precisa, por lo que se recomienda su uso. Sin embargo, las bases de datos de referencia deben mejorar, para poder asignar una taxonomía a un porcentaje mayor de MOTUs. Los inventarios obtenidos deben considerarse un punto de partida para la monitorización de la biodiversidad y sus cambios en el tiempo. Sería aconsejable repetir los muestreos, usando las mismas técnicas, aproximadamente cada 5 años, de forma que se genere una base de datos de biodiversidad de los Parques Nacionales a largo plazo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la financiación ofrecida para este estudio por el Organismo Autónomo Parques Nacionales (OAPN, proyecto 1036-2013 «Metabarpark»). También se ha recibido financiación parcial por parte del proyecto OAPN 766S/2012 (CorClim) y los proyectos del Plan Nacional CHALLENGEN (CTM2013-48163) ANIMA (CGL2016-76341-R) y PopCOMics (CTM2017-88080). Queremos igualmente agradecer a los equipos directivos y técnicos de los Parques Nacionales de las Islas Atlánticas y del Archipiélago de Cabrera su colaboración y su valiosa ayuda logística. Igualmente agradecemos a Xavier Rojals su ayuda con el clúster de computación del CEAB. Dedicamos este trabajo a Alex Macía, dueño del Club de Buceo Islas Cíes, que nos prestó una gran ayuda logística y que falleció recientemente mientras practicaba su pasión por el submarinismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARDY, T.; ALDER, J.; DAYTON, P. 2005. Coastal systems. En: Reid W, editor. Millennium ecosystem assessment: ecosystems and human well-being. pp. 513-549. Island Press. Washington.
- ANDERSON, M.J.; GORLEY, R.N.; CLARKE, K.R. 2008. PERMANOVA for PRIMER: guide to software and statistical methods. Plymouth, UK.
- AYLAGAS, E.; BORJA, A.; IRIGOIEN, X.; RODRÍGUEZ-EZPELETA, N. 2016. Benchmarking DNA metabarcoding for biodiversity-based monitoring and assessment. *Frontiers in Marine Science* 3: 96.
- BOHMANN, K.; EVANS, A.; GILBERT, M.T.P.; CARVALHO, G.R.; CREER, S.; KNAPP, M.; YU, D.W.; DE BRUYN, M. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology and Evolution* 29:358-367.
- BOYER, F.; MERCIER, C.; BONIN, A.; LE BRAS, Y.; TABERLET, P.; COISSAC, E. 2016. obitools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 16: 176-182.
- CAHILL, A.E.; PEARMAN, J.K.; BORJA, A.; CARUGATI, L.; CARVALHO, S.; DANOVARO, R.; DASHFIELD, S.; DAVID, R.; FÉRAL, J.P.; OLENIN, S.; SIAULYS, A.; SOMERFIELD, P.J.; TRAYANOVA, A.; UYARRA, M.C.; CHENUIL, A. 2018. A comparative analysis of metabarcoding and morphology-based identification of benthic communities across different regional seas. *Ecology and Evolution* 8: 8908-8.920
- CHAIN, F.J.J.; BROWN, E.A.; MACISAAC, H.J.; CRISTESCU, M.E. 2016. Metabarcoding reveals strong spatial structure and temporal turnover of zooplankton communities among marine and freshwater ports. *Diversity and Distributions* 22: 493-504.
- COMTET, T.; SANDIONIGI, A.; VIARD, F.; CASIRAGHI, M. 2015. DNA (meta)barcoding of biological invasions: a powerful tool to elucidate invasion processes and help managing aliens. *Biological Invasions* 17: 905-922.
- COSTELLO, M.J.; COLL, M.; DANOVARO, R.; HALPIN, P.; OJAVEER, H.; MILOSLAVICH, P. 2010. A census of marine biodiversity knowledge, resources, and future challenges. *PLoS One* 5: e12110.
- COWART, D.A.; PINHEIRO, M.; MOUCHEL, O.; MAGUER, M.; GRALL, J.; MINÉ, J.; ARNAUD-HAOND, S. 2015. Metabarcoding is powerful yet still blind: a comparative analysis of morphological and molecular surveys of seagrass communities. *PLoS One* 10: e0117562.
- DEAGLE, B.E.; JARMAN, S.N.; COISSAC, E.; POMPANON, F.; TABERLET, P. 2014. DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biology Letters* 10: 20140562.
- DEINER, K.; BIK, H.M.; MÄCHLER, E.; SEYMOUR, M.; LACOURSIÈRE-ROUSSEL, A.; ALTERMATT, F.; CREER, S.; BISTA, I.; LODGE, D.M.; DE VERE, N.; PFRENDER, M.E.; BERNATCHEZ, L. 2017. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26: 5872-5895.
- ELBRECHT, V.; LEESE, F. 2017. Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. *Frontiers in Environmental Science* 5: 11.
- ELBRECHT, V.; PEINERT, B.; LEESE, F. 2017. Sorting things out-assessing effects of unequal specimen biomass on DNA metabarcoding. *Ecology and Evolution* 7: 6918-6926.
- GELLER, J.; MEYER, C.; PARKER, M.; HAWK, H. 2013. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources* 13: 851-61.
- GUARDIOLA, M.; URIZ, M.J.; TABERLET, P.; COISSAC, E.; WANGENSTEEN O.S.; TURON, X. 2015. Deep-sea, deep-sequencing: Metabarcoding extracellular DNA from sediments of marine canyons. *PLoS One* 10: e0139633.

- GUARDIOLA, M.; WANGENSTEEN, O.S.; TABERLET, P.; COISSAC, E.; URIZ, M.J.; TURON, X. 2016. Spatio-temporal monitoring of deep-sea communities using metabarcoding of sediment DNA and RNA. *PeerJ* 4: e2807.
- HAJIBABAEI, M.; SHOKRALLA, S.; ZHOU, X.; SINGER, G.A.C.; BAIRD, D.J. 2011. Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS One* 6: e17497.
- HAO, X.; JIANG, R.; CHEN, T. 2011. Clustering 16S rRNA for OTU prediction: a method of unsupervised Bayesian clustering. *Bioinformatics* 27: 611-618.
- KNOWLTON, N. 1993. Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 24: 189-216.
- KNOWLTON, N.; JACKSON, J.B.C. 2008. Shifting baselines, local impacts, and global change on coral reefs. *PLoS Biology* 6: e54.
- LEJZEROWICZ, F.; ESLING, P.; PILLET, L.L.; WILDING, T.A.; BLACK, K.D.; PAWLOWSKI, J. 2015. High-throughput sequencing and morphology perform equally well for benthic monitoring of marine ecosystems. *Scientific Reports* 5: 13932.
- LERAY, M.; KNOWLTON, N. 2015. DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 2076-2081.
- LERAY, M.; YANG, J.Y.; MEYER, C.P.; MILLS, S.C.; AGUDELO, N.; RANWEZ, V.; BOEHM, J.T.; MACHIDA, R.J. 2013. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology* 10: 34.
- MIKKELSEN, P.M.; CRACRAFT, J. 2001. Marine biodiversity and the need for systematic inventories. *Bulletin of Marine Science* 69: 525-534.
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F.G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P.R.; O'HARA, R.B.; SIMPSON, G.L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M.H.H.; WAGNER, H. 2016. *vegan: Community Ecology Package*. R package version 2.4-3. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D.N. 2007. *bold: The Barcode of Life Data System* (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes* 7: 355-364.
- REAKA-KUDLA, M.L. 1997. The global biodiversity of coral reefs: a comparison with rain forests. En: Reaka-Kudla ML, Wilson DE, Wilson EO (eds.) *Biodiversity 2: understanding and protecting our biological resources*. pp. 83-108. Joseph Henry Press.
- TABERLET, P.; COISSAC, E.; POMPANON, F.; BROCHMANN, C.; WILLERSLEV, E. 2012. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 21: 2045-50.
- TANG, C.Q.; LEASI, F.; OBERTEGGER, U.; KIENEKE, A.; BARRACLOUGH, T.G.; FONTANETO, D. 2012 The widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity surveys of the meiofauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 16208-16212.
- VAMOS, E.E.; ELBRECHT, V.; LEESE, F. 2018. Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics* 1: e14625.
- WANGENSTEEN, O.S.; TURON, X. 2017. Metabarcoding techniques for assessing biodiversity of marine animal forests. En: Rossi S, Bramanti L, Gori A, Orejas C (eds.) *Marine animal forests. The ecology of benthic biodiversity hotspots*. pp. 445-473. Springer International Publishing, Switzerland.
- WANGENSTEEN, O.S.; PALACIN, C.; GUARDIOLA, M.; TURON, X. 2018. DNA metabarcoding of littoral hard-bottom communities: high diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *Peer J* 6: e4705.

TURÓN, X. Y COLS. «Caracterización genética de la biodiversidad y sus alteraciones en comunidades bentónicas»

WANGENSTEEN, O.S.; CEBRIAN, E.; PALACÍN, C.; TURON, X. 2018. Under the canopy: community-wide effects of invasive algae in Marine Protected Areas revealed by metabarcoding. *Marine Pollution Bulletin* 127:54-66.

WHEELER, Q.D.; RAVEN, P.H.; WILSON, E.O. 2004. Taxonomy: impediment or expedient? *Science* 303: 285.