

**UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORIA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**PATRONES DE DIVERSIDAD GENÉTICA Y DESARROLLO DE
MARCADORES GENÉTICOS PARA LA DETECCIÓN DE ADN AMBIENTAL
DE ESPECIES DE TILAPIA *OREOCHROMIS SP* (PERCIFORMES:
CICHLIDAE) PRESENTES EN SISTEMAS LÉNTICOS EN LA
REPÚBLICA DE PANAMÁ**

**ELABORADO POR:
ANGÉLICA ZULAY ALLARD GUERRA**

**TESIS PRESENTADA COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ORIENTACIÓN EN
BIOLOGÍA MOLECULAR**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2018



Título de la Tesis:

"Patrones de diversidad genética y desarrollo de marcadores genéticos para la detección de ADN ambiental de especies de tilapia *Oreochromis sp* (Perciformes: Cichlidae) presentes en sistemas lénticos en el República de Panamá"

TESIS

Sometida para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas con
Orientación en Biología Molecular

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

APROBADO POR:

Dr. Edgardo E. Díaz Ferguson
Presidente

Dra. Magaly de Chial
Miembro

Dr. Carlos Ramos
Miembro

REFRENDADO POR:

**RÉPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

FECHA:

29/08/18

DEDICATORIA

A mi familia que siempre me ha apoyado y ha confiado en mí, especialmente a mis padres, José y Lisseth que me brindaron una buena educación y me enseñaron a luchar por seguir adelante; a mis hermanos Keyla, Angie, Austin y Odelvis y a mis sobrinas Kaylin y Grashell, para quienes he sido un ejemplo a seguir. Y a Oliver, quien me ha brindado su paciencia y comprensión, y ha sido mi punto de apoyo durante este trayecto.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a mi padre celestial “Dios” por darme la fortaleza para seguir adelante por encima de todos los obstáculos, por darme sabiduría, por protegerme siempre, y por todos los logros que me ha permitido tener.

A La Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación (SENACYT), por la beca otorgada para estudiar la maestría en Ciencias Biológicas con orientación en Biología Molecular.

A la Universidad de Panamá y al Programa de Maestría en Ciencias Biológicas por la formación académica brindada.

A mi asesor de tesis, Dr. Edgardo Díaz-Ferguson por permitirme ser parte de su proyecto de investigación FID-14-205; y quien con sus conocimientos, experiencia, paciencia y motivación ha contribuido en mi formación académica y en la culminación de mi tesis de maestría con éxito.

A mis co-asesores de tesis, el Dr. Carlos Ramos, director del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Panamá, y la Dra. Magaly De Chial, quienes proporcionaron el lugar de trabajo para la realización de esta investigación y brindaron de su tiempo en la revisión y formato de la tesis.

Al personal de la Autoridad de Recursos Acuáticos de Panamá (ARAP), por su colaboración con la logística en el desarrollo de esta investigación, especialmente al

Licenciado Marcos Mendizabal y al Magister Aristides Frías por su apoyo y colaboración en la organización y mantenimiento de los acuarios y manipulación de peces durante los experimentos.

Al Instituto de Investigaciones Científicas y Servicio de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP), por proporcionar parte de sus instalaciones para el desarrollo de la investigación.

A la técnico de laboratorio, la Licenciada Criseida Aguilar por su colaboración en la preparación con parte de los materiales y reactivos para el procesamiento de las muestras.

A la Magister Melida Nuñez, por sus consejos y conocimientos brindados que fueron de gran ayuda en el desarrollo de la tesis.

A mis amigos y compañeros por el apoyo brindado durante este trayecto.

A mi familia por su amor incondicional: a mi mamá, mi papá y a Mártires por sus palabras de aliento y apoyo en todo momento; a mis hermanos por su comprensión y paciencia, y a Oliver, mi compañero de vida quien siempre se preocupó para que yo saliera adelante durante mis estudios.

INDICE GENERAL

HOJA DE APROBACIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
INDICE DE FIGURAS.....	X
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN	3
JUSTIFICACIÓN	7
OBJETIVOS	9
Objetivos generales	9
Objetivos específicos.....	9
HIPÓTESIS.....	10
CAPITULO I	11
REVISIÓN DE LITERATURA	11
1. Antecedentes generales	11
2. Características biológicas de la tilapia	13
2.1 Descripción taxonómica y morfológica de la tilapia del género <i>Oreochromis</i>	14
2.1.1 Reproducción y sexualidad	15
2.1.2 Crecimiento y desarrollo	16

2.1.3 Hábitat	16
2.1.4 Diferencias reproductivas entre los géneros <i>Oreochromis</i> , <i>Tilapia</i> y <i>Sarotherodon</i>	16
2.1.5 Importancia económica	17
3. Caracterización molecular de la tilapia.....	17
3.1 El genoma mitocondrial	19
3.2 Características del gen Citocromo Oxidasa subunidad I (COI)	20
3.3 Organización y composición del genoma mitocondrial de la tilapia del Nilo	23
4. Descripción del ADN ambiental	25
4.1 Factores que afectan la calidad del ADN ambiental.....	27
4.2 Colecta y procesamiento de muestras ambientales	28
4.3 Aplicaciones de ADN ambiental en ecología y conservación.....	29
CAPITULO II	30
METODOLOGIA	30
1. Área de estudio.....	30
2. Colecta de muestras	34
3. Procesamiento de muestras	34
3.1 Extracción, cuantificación y calidad del ADN	35
3.2 Amplificación de ADN.....	35
3.3 Electroforesis en gel de agarosa	36
3.4 Limpieza de los productos de PCR y Secuenciación	37
4. Análisis de resultados.....	37

4.1 Cálculo de la diversidad genética y valores de polimorfismos, diversidad haplotípica y nucleotídica.....	37
4.2 Prueba de neutralidad y distribución mismatch	38
4.3 Flujo genético y conectividad.....	38
4.4 Dendrograma Neighbor-Joining.....	39
4.5 Detección de ADN ambiental en muestras de agua	39
4.5.1 Logística para la instalación de los acuarios	39
4.5.2 Ensayos controlados en acuarios para la obtención de las muestras de ADN ambiental	40
4.5.4 Extracción de ADN ambiental	43
4.5.5 Cuantificación del ADN.....	43
4.5.6 Diseño de primers y sonda para PCR en tiempo real	44
4.5.7 Detección de ADN ambiental por PCR en tiempo real.....	44
4.5.8 Análisis estadísticos	46
CAPITULO III.....	47
RESULTADOS.....	47
1. Caracterización molecular.....	47
2. Estimación de diversidad genética en poblaciones de <i>Oreochromis niloticus</i>	48
2.1 Pruebas de neutralidad y distribución mismatch	49
2.2 Flujo genético y conectividad.....	50
2.3 Dendrograma Neighbor-Joining (NJ).....	51
3. Detección de ADN ambiental	53
3.1 Límite mínimo de detección de ADN ambiental mediante PCR en tiempo real.....	53

3.2 Especificidad de la sonda y los cebadores especie-específicos.....	55
3.3 Prueba de detección en muestras de ADN ambiental de ensayos controlados mediante PCR en tiempo real.....	56
CAPITULO IV.....	62
DISCUSIÓN	62
1. Caracterización molecular de las especies de <i>Oreochromis spp.</i>	62
2. Diversidad genética de <i>Oreochromis niloticus</i>	63
3. Detección de ADN ambiental mediante PCR en tiempo real	70
CONCLUSIONES	77
RECOMENDACIONES.....	79
GLOSARIO	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

INDICE DE FIGURAS

Fig 1. Mapa que muestra la ubicación del área de estudio	30
Fig 2. Lago Gatún	31
Fig 3. Lago Alajuela	32
Fig 4. Individuo de <i>O. niloticus</i> proporcionado de la estación de ARAP en Divisa.	41
Fig 5. Introducción de los individuos de tilapias a los acuarios	42
Fig 6. Diferentes densidades de peces en los acuarios.....	42
Fig 7. Filtración de las muestras de agua.....	43
Fig 8. Extracción de ADN ambiental.....	44
Fig 9. Distribución de diferencias pareadas (Mismatch) con secuencias de Citocromo oxidasa I para <i>O. niloticus</i>	50
Fig 10. Dendrograma Neighbor-joining.....	52
Fig 11. Gráfica del ciclo umbral (CT) vs la cantidad de ADN para la obtención de la curva estándar	53
Fig 12. Gráfica de la curva de amplificación de muestras de ADN ambiental a diferentes concentraciones	55
Fig 13. Ciclo umbral de detección (CT) en función del tiempo (días) para cada una de las densidades de peces.	58

Fig 14. Gráfico de medianas de los ciclos amplificados (CT) para cada una de las densidades (D1=1pez, D2=3 peces, D3=6 peces) obtenido mediante la prueba Kruskal-Wallis (se tomaron en consideración todos los datos).	61
Fig 15. Gráfico de medianas de los ciclos amplificados (CT) para cada una de las densidades (D1=1pez, D2=3 peces, D3=6 peces) obtenido mediante la prueba Kruskal-Wallis (se eliminó un dato CT (35.2) de la densidad 3)	61

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del género tilapia.....	14
Tabla 2. Coordenadas geográficas de los sitios de muestreo de los lagos Gatún y Alajuela	34
Tabla 3. Lista de especies identificadas y referenciadas con las secuencias depositadas en GenBank mediante el programa BLAST'n.....	48
Tabla 4. Niveles de diversidad genética calculados para la poblaciones de <i>O. niloticus</i> .	49
Tabla 5. Prueba de neutralidad (D de Tajima y Fs de Fu)	49
Tabla 6. Diferenciación genética entre las poblaciones de <i>O. niloticus</i> (Bayano y Gatún).	50
Tabla 7. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA).....	51
Tabla 8 Concentraciones de ADN ambiental medidas con el espectrofotómetro nanodrop.	54
Tabla 9. Promedio calculado de los ciclos de amplificación para las réplicas de las distintas densidades por día.....	56
Tabla 10. Prueba de presencia/ausencia de ADN ambiental mediante PCR en tiempo real.....	59
Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis para medianas iguales	60
Tabla 12. Prueba pareada de Mann-Whitney.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

COI: Citocromo Oxidasa I

eDNA: ADN ambiental

F_{ST}: Índice de fijación de Wright

G_{ST}: Índice de fijación de Nei

H_d: Diversidad haplotípica

H_e: Heterocigosidad esperada

H_T: Número total de haplotipos

N_c: Tamaño de censo poblacional

N_e: Número efectivo poblacional

N_m: Número de migrantes por generación

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

Π: Diversidad nucleotídica

RESUMEN

Las tilapias son peces tropicales originarios de África consideradas altamente invasoras, debido a su capacidad para adaptarse rápidamente a diversos ecosistemas acuáticos tanto de agua dulce como salobre y con un amplio rango de tolerancia a temperaturas. La introducción de tilapias del género *Oreochromis* en sistemas lénticos de Panamá y en otros países de América Latina ha sido una práctica frecuente y se remonta a varias décadas. Además, es un problema que actualmente ocurre a nivel mundial, llevando a la pérdida de la biodiversidad en ecosistemas acuáticos. En esta investigación se utilizó una nueva técnica molecular para la detección de especies invasoras sin necesidad de captura. La detección se realizó mediante la amplificación de fragmentos de ADN mitocondrial especie-específicos a partir de ADN ambiental. Se determinó la diversidad genética de dos poblaciones de *Oreochromis niloticus* mediante la amplificación del gen Citocromo Oxidasa I. Los resultados mostraron una baja diversidad genética ($\pi=0.00010$, $Hd=0.059$), indicando que probablemente las poblaciones pasaron por un efecto fundador y un cuello de botella. Se obtuvieron además valores bajos de diferenciación genética ($F_{st}=0.07$), lo cual sugiere que podría tratarse de una sola población. A partir de las secuencias de ADN obtenidas de esta especie, se diseñó una sonda interna (TaqMan) y dos cebadores especie-específicos para la detección de ADN ambiental mediante PCR en tiempo real. Se logró la detección del ADN ambiental de muestras obtenidas mediante ensayos controlados a diferentes densidades (1, 3 y 6 individuos/tanque), cuya detección mínima para esta especie fue de 0.0025 ng/ μ L de ADN. Tal como se esperaba, a mayor densidad la detección se realizó en menos ciclos de amplificación. Además, se realizó una prueba de persistencia, la cual indicó que el ADN ambiental puede ser detectado hasta siete días después que los individuos fueron extraídos de los acuarios. Se demostró que el uso de la técnica de ADN ambiental para la detección de *O. niloticus* es eficaz y sensible. Por lo tanto, se considera este estudio como piloto para la detección temprana y monitoreo de especies invasoras presentes en sistemas lénticos de la República de Panamá.

Palabras clave: Diversidad genética, Citocromo Oxidasa I, *Oreochromis niloticus*, ADN ambiental, PCR en tiempo real, sonda de detección.

ABSTRACT

Tilapia are tropical fish native to Africa considered highly invasive, due to their ability to adapt quickly to various aquatic ecosystems, both fresh and brackish water and with a wide range of tolerance to temperatures. The introduction of tilapias of the genus *Oreochromis* in lentic systems of Panama and other countries of Latin America has been a frequent practice and has been going on for several decades. In addition, it is a problem that currently occurs worldwide, leading to the loss of biodiversity in aquatic ecosystems. In this research, a new molecular technique was used for the detection of invasive species without the need for their capture. Detection was performed by amplifying specific-mitochondrial DNA fragments from environmental DNA. The genetic diversity of two populations of *Oreochromis niloticus* was determined by the amplification of the Cytochrome Oxidase I gene. The results showed a low genetic diversity ($\pi=0.00010$, $Hd=0.059$), suggesting that probably tilapia populations went through a founder effect and a neck of bottle. In addition, low values of genetic differentiation were obtained ($Fst=0.07$), which suggests that it could be a single population. From the DNA sequences obtained from this species, an internal probe (TaqMan) and two species-specific primers were designed for the detection of environmental DNA by means of real-time PCR. Detection of environmental DNA was obtained from samples obtained through controlled trials at different densities (1, 3 and 6 individuals/tank), showing a detection threshold for this species of 0.0025 ng/ μ L of DNA. As expected, at higher density detection was performed in fewer amplification cycles. In addition, a persistence test was conducted, which indicated that the environmental DNA can be detected up to seven days after the individuals were extracted from the aquariums. It was demonstrated that the use of the environmental DNA technique for the detection of *O. niloticus* is effective and sensitive. Therefore, this study is considered as a pilot for the early detection and monitoring of invasive species present in the lentic systems of the Republic of Panama.

Keywords: Genetic diversity, Cytochrome Oxidase I, *Oreochromis niloticus*, environmental DNA, real-time PCR, detection probe.

INTRODUCCIÓN

La introducción de especies acuáticas invasoras es un problema que actualmente se presenta de forma constante en todo el mundo, debido al incremento en conectividad causado por la globalización de la acuicultura y la pesca deportiva (Rixon *et al.*, 2005; Caraballo 2009). Las especies acuáticas no nativas o invasoras representan una amenaza para las especies nativas, ya que por un lado compiten por los recursos del ecosistema con especies nativas en su mismo nivel trófico y por otro lado pueden ser depredadores y alterar la cadena alimentaria. El proceso de invasión consiste en tres etapas: introducción, expansión y colonización (Williamson 2006). En esta última etapa las consecuencias de la introducción de especies invasoras se incrementan, ya que estas logran adaptarse exitosamente, lo cual puede llevar a la desaparición de las especies nativas y por consiguiente, a una disminución de la diversidad y alteración de la estructura de la comunidad (Welcomme 1986; Howard 2004; Caraballo 2009).

Las tilapias son peces tropicales nativos de África pertenecientes a la familia cichlidae que se agrupan en tres géneros: *Oreochromis sp*, *Tilapia sp* y *Saroterodon sp* (Trewavas 1983). Existe una gran diversidad de estos organismos, tanto en hábitats de agua dulce como salobre. Son especies con un amplio rango de tolerancia a la temperatura y la salinidad, lo que garantiza su elevada supervivencia y capacidad adaptativa (FishBase 2007). Las tilapias son consideradas altamente exitosas en los ambientes que colonizan, y

afectan una amplia variedad de ecosistemas, especialmente los que se encuentran en los trópicos. La introducción de estas especies en ambientes acuáticos causa problemas ambientales (Figueredo & Gianne 2005), debido a su ritmo de reproducción acelerado que compite con especies nativas y puede conducir a la pérdida de la biodiversidad, contribuir a la erosión genética, susceptibilidad a enfermedades y pérdida de la capacidad adaptativa (Ameen 1999).

No obstante, el cultivo de tilapias de forma controlada en sistemas artificiales representa un aporte económico y una fuente de proteínas importante a la sociedad. En este sentido, las tilapias son una de las especies más importantes en acuicultura ocupando el segundo lugar como especie cultivada a nivel mundial después de la carpa común. Casi la mitad de la cosecha de tilapia en el mundo es producida por China, por lo general en forma de pescado entero congelado (FAO 2006; FAO 2007). La introducción de diferentes especies de tilapias en Panamá dio inicio en los años cuarenta con el objetivo de implementar la acuicultura y generar fuentes de proteínas alternas en comunidades rurales. Una de las primeras especies introducidas fue la tilapia Java (*Oreochromis mossambicus*), pero debido a su lento crecimiento fue reemplazada por la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) en el año 1976, la cual actualmente constituye la especie principal del programa de piscicultura y la más común en el país (FAO 2017).

Actualmente en Panamá, la tilapia es considerada una especie de importancia comercial por ser un recurso de consumo para la población y de subsistencia para pescadores artesanales e industriales. En el año 2017, se produjeron en Bayano 387 ton/año de tilapias, de las cuales se exportó el 10% (J. Abadía, comunicación personal, 5 de junio, 2018). Por lo tanto, es de gran importancia conocer la diversidad genética de la tilapia, ya

que de esta manera se comprenderá si las poblaciones de *Oreochromis sp* podrían presentar efectos de cuello de botella, deterioro genético y una posible endogamia (Pullin & Capili 1988; Eknath *et al.*, 1993).

La evaluación de la distribución de especies es un punto crítico para el manejo ecológico y la biología de la conservación, ya que requiere de la detección de poblaciones que en ciertas ocasiones pueden presentar bajas densidades y cuya detección se basa en conteo y visualización de estas (Rees *et al.*, 2014). En especies invasoras, localizar las áreas de posible expansión y futura colonización es esencial para su control, vigilancia y erradicación (Díaz-Ferguson & Moyer 2014). Hace poco tiempo se generó interés por la detección de fragmentos de ADN del medio ambiente de distintas especies para permitir el monitoreo de especies acuáticas en distintos ambientes debido a que este método posee mayor sensibilidad que los métodos tradicionales (Rees *et al.*, 2014).

La implementación de ADN ambiental (eDNA) en la detección de especies raras o invasoras, es una técnica relativamente nueva con la que se determina la presencia de una especie sin necesidad de capturarla o realizar observación directa de la misma (*Ficetola et al.*, 2008; Jerde *et al.*, 2011; Thomsen *et al.*, 2012). Esta técnica consiste en la detección a través de marcadores moleculares “especie específicos” de fragmentos de ADN (menores a 350pb) de genes mitocondriales que son liberados al medio por un organismo (Jerde *et al.*, 2011; Mahon *et al.*, 2013).

La detección de especies acuáticas invasoras mediante la técnica de ADN ambiental permite conocer en dónde se encuentran específicamente establecidas las poblaciones de tilapia. Esto permite adoptar una nueva herramienta para establecer medidas de acción y

manejo, evitar la expansión de dichas especies en el ecosistema y así realizar esfuerzos de control y erradicación de manera exitosa (Darling & Mahon 2011).

Otra de las ventajas del uso del ADN ambiental es la detección de especies no nativas en diferentes periodos: 1) al inicio de la invasión cuando las especies invasoras son raras, 2) después de la invasión cuando las especies nativas son raras, y 3) después del control de manejo cuando las acciones son destinadas a la erradicación de la especie invasora. En conclusión, el monitoreo mediante ADN en los diferentes periodos de invasión es mucho más eficiente en relación a los métodos convencionales, ya que el esfuerzo por la detección de especies invasoras es mucho mayor con el uso de los métodos convencionales (Jerde *et al.*, 2011; Wilcox *et al.*, 2013).

JUSTIFICACIÓN

En el año 2006 se realizó el primer estudio genético en tilapias en el lago Bayano, en donde se calcularon los niveles de diversidad genética mediante marcadores de ADN mitocondriales y nucleares (Díaz-Ferguson *et al.*, EN PRENSA). Por lo tanto, es importante realizar estudios genéticos que permitan una mejor comprensión sobre los hábitos reproductivos y la diversidad genética de la tilapia en estos ecosistemas y así poder inferir el impacto que éstas tienen sobre las especies nativas. Sin embargo, esta especie es muy importante en la acuicultura y ayuda a satisfacer las necesidades de consumo de la población generando ganancias económicas, pero es necesario resaltar que la biodiversidad ictiológica debe reconocerse como base para la producción sustentable (Ogutu-Ohwayo & Balirawa 2006).

De esta manera se podrá crear un plan de manejo en el que se pueda controlar la invasión de esta especie en los sistemas de agua dulce de Panamá, sin afectar su importancia económica en sistemas acuáticos en donde ya existen poblaciones establecidas. Es debido a ello que se puntualiza la necesidad de crear un plan de manejo basado en estudios genéticos que permitan realizar comparaciones de diversidad y diferenciación genética entre las poblaciones de *Oreochromis* presentes en distintos sistemas de agua dulce (Díaz-Ferguson *et al.*, EN PRENSA). En Panamá son escasos los

estudios de caracterización molecular de poblaciones de cíclidos y en particular de poblaciones de tilapia.

El desarrollo de la técnica de ADN ambiental mediante el diseño de una sonda especie-específico permite la detección del trayecto o cobertura de la tilapia (*O. niloticus*) como especie invasora en sistemas de agua dulce de la República de Panamá. A la vez se puede detectar la presencia de estas especies en bajas densidades permitiendo tener un estimado de la cantidad de especies que se están estableciendo en sistemas de agua dulce. Esto permite evitar su expansión y crear medidas de erradicación a tiempo para que estas no lleguen a colonizar zonas que son importantes para el desarrollo de otras especies acuáticas nativas y de esta manera disminuir los impactos negativos de las invasiones (Darling & Mahon 2011).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar los niveles de diversidad genética de poblaciones del género *Oreochromis* en Panamá y desarrollar marcadores especie específicos para la detección de ADN ambiental de especies de tilapia del género *Oreochromis* en diferentes sistemas lénticos del país. Este estudio es pionero en la zona tropical de Panamá y presenta información única y pionera sobre la caracterización genética de tilapias del género *Oreochromis* en Panamá y Centro América. En adición, su posible detección a través de técnicas moleculares constituye la primera detección de ADN ambiental en sistemas tropicales y facilitará la detección temprana para así tener un mayor control sobre su expansión sin la necesidad de observar o capturar los especímenes.

OBJETIVOS

Objetivos generales

1. Caracterizar molecularmente las poblaciones de *Oreochromis niloticus* en la República de Panamá y determinar los niveles de diversidad genética en dos cuerpos de agua.
2. Diseñar marcadores de ADN ambiental que permitan detectar la presencia de material genético de *Oreochromis sp* en muestras de agua.

Objetivos específicos

1. Estimar el grado de diversidad genética (diversidad haplotípica y nucleotídica) de *Oreochromis sp*.
2. Estimar indirectamente la conectividad existente entre los sitios estudiados mediante valores de FST.
3. Construir un dendrograma basado en frecuencias haplotípicas para predecir las relaciones poblacionales de *Oreochromis sp* en los cuerpos de agua estudiados.
4. Detectar la presencia *in silico* de *Oreochromis sp* a través de muestras de ADN ambiental mediante cebadores específicos.
5. Evaluar el umbral y la especificidad de detección del ADN ambiental en ensayos de densidad contrastante y controlada de individuos de *Oreochromis niloticus*.

HIPÓTESIS

1. La diversidad genética de las poblaciones de *Oreochromis sp* en los lagos Alajuela, Gatún y Bayano están determinadas por el efecto fundador y reducido flujo genético, endogamia e hibridación.

2. El ADN ambiental puede ser efectivo para la detección de la tilapia (*Oreochromis sp*) en ecosistemas tropicales de agua dulce.

CAPITULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Antecedentes generales

La introducción de especies invasoras es considerada como una de las principales causas de la extinción de especies nativas de los sistemas naturales de agua dulce (Canonical *et al.*, 2005). Uno de los desastres más famosos de efectos en la biodiversidad fue el causado por la introducción de peces invasores como la perca del Nilo (*Lates niloticus*) y la tilapia Nilótica (*Oreochromis niloticus*) en el lago más grande de África, el Lago Victoria (Pringle 2005). Muchas especies nativas de este lago han desaparecido o se encuentran en peligro de extinción, debido a que las especies exóticas o invasoras han alterado significativamente el ecosistema original (Agienda *et al.*, 2011). Uno de los ejemplos más notables es la extinción de la tilapia sálgida (*O. esculentus*), la cual fue una de las especies más importantes en la pesca. Esta especie está clasificada dentro de la UICN como especie en peligro crítico, ya que ha disminuido sorprendentemente en toda la región de África (Twongo *et al.*, 2006).

Pese a este desastre, la tilapia es considerada una de las especies más importantes en la acuicultura mundial. Muchas especies de *Oreochromis sp* han sido introducidas en todo el mundo para aumentar el sustento alimenticio (De Silva *et al.*, 2004; Briñez *et al.*, 2011). En América, poblaciones de tilapias cultivadas también se encuentran establecidas en

muchos países (Grammer *et al.*, 2012). Estudios mencionan que la tilapia se encuentra distribuida desde Norteamérica hasta Suramérica. Por ejemplo hay una amplia distribución de tilapias en los lagos de Brasil; lo que ha llevado al desarrollo potencial de la acuicultura en sistemas naturales, pero al mismo tiempo ha destruido hábitats de especies nativas que han sido desplazadas, considerándose a las tilapias como una plaga potencial para ecosistemas naturales de Brasil (Zambrano *et al.*, 2006).

En Panamá el primer registro de introducción de la tilapia fue en el año de 1940, con fines deportivos, siendo *Oreochromis mossambicus* la especie introducida. En 1976 ésta fue reemplazada por *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis urolepis hornorum*, el híbrido de Tilapia roja (*Oreochromis niloticus x Oreochromis mossambicus*), otra línea de *O. mossambicus*, *O. aureus*, un híbrido de *O. niloticus x O. u. hornorum*, una línea de *O. mossambicus* roja, la línea roja de Jamaica (*O. niloticus x O. u. hornorum x O. mossambicus*) y la línea Red Florida. También se introdujo *Coptodon rendalli* (Boulenger 1897) para estudio de control de malezas en los grandes embalses (Morales 1995).

En 1986, dentro del programa de “Producción de alimentos y desarrollo comunitario en comunidades marginales mediante un programa de agro-acuicultura” en Panamá, promovido por el Programa Mundial de Alimentos (PMA) y La Dirección Nacional de Acuicultura, se puso en práctica el sistema anterior a través del cultivo de peces en arrozales, utilizando a la tilapia como especie principal y la carpa como suplemento (Toledo & García 2000). En 1987, se crea la primera finca comercial de peces en la comunidad de Pacora, como consecuencia del proyecto anteriormente descrito, con una superficie de espejo de agua de 4 ha y una producción anual de 1.4 a 1.6 ton/ha (Toledo & García 2000).

Paralelamente se crearon dos asociaciones de productores en las provincias de Chiriquí y Panamá para la producción comercial de la tilapia y otra en la provincia de Coclé para el desarrollo de la piscicultura integrada a la cría de aves. En 1993 existían 1262 acuicultores de subsistencia en comunidades rurales, que representaban el 88.9% de los piscicultores del país. Para el año 2014 existían 6622 pescadores.

2. Características biológicas de la tilapia

Los peces son el grupo más diverso de los vertebrados con aproximadamente 28,000 especies con características morfológicas y adaptaciones biológicas únicas (Eschmeyer *et al.*, 1998). Una de las familias de peces más diversas dentro de las especies de agua dulce son los cíclidos. Con unas 1,300 especies válidas descritas, pero al menos 2,200 conocidas, son la segunda familia más diversa de peces de agua dulce (Turner 2007; Seehausen 2015). La riqueza de especies es geográficamente muy heterogénea: se conocen 450 y 110 especies de Sudamérica y América Central, respectivamente, 32 de Madagascar, tres de la India, cuatro del Levante y una de Irán (Seehausen 2015). Debido a la gran variedad de especies existentes, su importancia económica y fácil adaptación a diversos ambientes acuáticos es posible encontrarlos en todos los continentes.

Las tilapias (*Oreochromis sp*, *Tilapia sp* y *Saroterodon sp*) (Trewavas 1983), pertenecientes a la familia Cichlidae, son peces nativos de ríos y lagos de la parte tropical y subtropical de África y Madagascar (Arredondo-Figueroa & Guzman-Arroyo 1986). Estas han sido introducidas en ecosistemas acuíferos naturales en Centroamérica y Sudamérica (Morales 1991). Son peces de agua dulce de ambientes cálidos que son utilizados para la producción en la acuicultura (D'Amato *et al.*, 2007).

2.1 Descripción taxonómica y morfológica de la tilapia del género *Oreochromis*

De acuerdo a la descripción taxonómica establecida por Berg y modificada por Trewavas (1983), la tilapia se clasifica de la siguiente manera:

Tabla 1. Clasificación del género tilapia

PHYLUM	CHORDATA
SUBPHYLUM	Vertebrata
SUPERCLASE	Gnathostomata
SERIES	Pisces
CLASE	Actinopterygii
ORDEN	Perciformes
SUBORDEN	Percoide
FAMILIA	Cichlidae
GÉNEROS	<i>Tilapia</i> , <i>Oreochromis</i> , <i>Sarotherodon</i>
ESPECIES	<i>rendalii</i> , <i>aureus</i> , <i>niloticus</i> , <i>mossambicus</i> , <i>urolepis</i> <i>hornorum</i>

Nota: Las especies mencionadas en el cuadro fueron introducidas en Panamá en los años setenta (Morales 1995).

En general, las tilapias comparten características de acuerdo a su morfología, reproducción, hábitad y alimentación. De acuerdo a la morfología poseen un cuerpo comprimido y discoidal. La boca es ancha y bordeada por labios gruesos, presentan mandíbulas con dientes cónicos. Para su locomoción poseen aletas pares e impares; las aletas pares están constituidas por las pectorales y las ventrales, mientras que las impares incluyen las dorsales, caudal y anal (Rodríguez & García 2009).

2.1.1 Reproducción y sexualidad

El macho se diferencia de la hembra, porque presenta dos orificios bajo el vientre (ano y orificio urogenital), mientras que la hembra cuenta con tres (ano, poro genital y orificio urinario) (Rodríguez & García 2009). Además una característica importante de las tilapias, es que estas poseen la habilidad de madurar sexualmente a tallas pequeñas, cuando el cuerpo tiene entre 8 y 10 centímetros de largo (Morales 2003).

De acuerdo a su comportamiento reproductivo (apareamiento), este pez (*O. niloticus*) tiene siete etapas de desarrollo embrionario, los cuales se describen a continuación: 1) Después de 3 a 4 días de sembrados, los reproductores se acostumbran a los alrededores. 2) En el fondo del estanque el macho delimita y defiende un territorio, limpiando un área circular de 20 a 30 cm de diámetro y forma su nido. En estanques con fondos blandos el nido es excavado con la boca y tiene una profundidad de 5 a 8 cm. 3) La hembra es atraída hacia el nido en donde es cortejada por el macho. 4) La hembra deposita sus huevos en el nido para que inmediatamente después sean fertilizados por el macho. 5) La hembra recoge a los huevos fertilizados con su boca y se aleja del nido. El macho continúa cuidando el nido y atrayendo otras hembras con que aparearse. Para completarse el cortejo y desove requieren de menos de un día. 6) Antes de la eclosión los huevos son incubados de 3 a 5 días dentro de la boca de la hembra. Las hembras no se alimentan durante los períodos de incubación y cuidado de las larvas. 7) Finalmente, Las larvas jóvenes (con saco vitelino) permanecen con su madre por un periodo adicional de 5 a 7 días, escondiéndose en su boca cuando el peligro acecha (Martínez 2006).

2.1.2 Crecimiento y desarrollo

El crecimiento de la tilapia se divide en cinco fases: huevos, alevín, cría, juvenil y adulto. La talla y peso que estas alcanzan depende de varios factores, tales como alimento, calidad de agua, espacio y cambios ambientales (Morales 2003).

2.1.3 Hábitat

Una de las principales características que poseen estos peces, es que se adaptan a diferentes ecosistemas, tanto de agua dulce (ríos, lagos, lagunas) como salada y soportan un amplio rango de temperaturas (8°C a 30°C) y salinidades (Chervinski 1983). Además tienen en común hábitos alimenticios herbívoros (Rodríguez & García 2009).

2.1.4 Diferencias reproductivas entre los géneros *Oreochromis*, *Tilapia* y *Sarotherodon*

Los géneros de tilapia se distinguen principalmente por los cuidados parentales que estos desarrollan para sus crías (Mjoun & Rosentrater 2010). En el género *Tilapia*, ambos padres (macho y hembra) protegen los huevos, alevines y larvas, por lo tanto este modo de reproducción se denomina biparental (Trewavas 1983). En el género *Oreochromis*, las hembras incuban los huevos fertilizados y los alevines en sus bocas, por lo tanto, se conoce como incubadora bucal materna (Trewavas 1983). Finalmente los cíclidos del género *Sarotherodon* son criadores paternos, maternos o biparentales, es decir que, cualquiera de los progenitores o ambos protegen los huevos, alevines y larvas (Mjoun & Rosentrater 2010).

2.1.5 Importancia económica

Dentro de los tres géneros, *Oreochromis* tiene mayor importancia, debido a la acuicultura y pesca mundial, ocupando el primer lugar la especie *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758) dentro del género antes mencionado (Bostock *et al.*, 2010). Además esta especie está clasificada dentro de las cinco especies más cultivadas a nivel mundial después de la carpa (*Ctenopharyngodon idella*), la carpa plateada (*Hypophthalmichthys molitrix*), carpa común (*Cyprinus carpio*) y un bivalvo japonés (*Ruditapes philippinarum*) (FAO, 2012) y cabe destacar que la producción comercial mundial de esta especie en 2012 fue de 3.197 millones de toneladas con un valor comercial de 5.3 mil millones de dólares (FAO, 2012).

3. Caracterización molecular de la Tilapia

La tilapias presentan características que han recibido gran atención por parte de los biólogos evolutivos, entre estas se puede mencionar su diversa morfología, comportamiento y altas tasas de reproducción y supervivencia (Agostinho *et al.*, 2007). Debido a dichas características, se han realizado diversos estudios genéticos que han mostrado ser eficaces en la identificación de variedades de tilapias, incluso en poblaciones mixtas e híbridos (Wu & Yang 2012), en comparación con los estudios basados en técnicas morfométricas.

Estos estudios genéticos han permitido el uso de diferentes marcadores moleculares que han establecido la caracterización genética de las tilapias. Dentro de estos, se puede mencionar a las aloenzimas (Moralee *et al.*, 2000), RFLPs (Agnése *et al.*, 1997), RAPDs

(Ali *et al.*, 2005), microsatélites (Ndiwa *et al.*, 2014), región control del ADN mitocondrial (Firmat *et al.*, 2013), y el Citocromo Oxidasa I (COI) (Hebert *et al.*, 2003).

Entre los diferentes marcadores antes mencionados, existe un especial interés por los marcadores del ADN mitocondrial, sobre todo el gen Citocromo Oxidasa I (COI), ya que este ha sido utilizado como código de barras y consiste en una sección corta de la secuencia de ADN para la identificación de especies de peces (Hebert *et al.*, 2003). La eficiencia de los códigos de barras de ADN ha sido reportada en la detección y descripción de nuevas especies crípticas (Frézal & Leblois 2008). Esta herramienta de identificación puede dar apoyo para mejorar clasificaciones y examinar críticamente la precisión de rasgos morfológicos comúnmente utilizados en la taxonomía (Robins *et al.*, 2007).

Además, el uso de marcadores moleculares permite determinar los valores de diversidad genética, que no es más que la medida de la variación genética a nivel de genes de una especie o población (Díaz-Ferguson 2012), que desempeñan un papel importante en la supervivencia de especies/poblaciones y su evolución en respuesta a cambios ambientales, ya sea a corto o largo plazo (Dudu *et al.*, 2015).

De esta forma, los indicadores de diversidad genética implicados en el conocimiento de la estructura genética de una población son el cálculo del número de alelos por locus (N_a), la heterocigosidad (H_e) que es la suma de la frecuencia media de individuos heterocigotos por locus entre el número total de loci, la diversidad nucleotídica (π) que consiste en el promedio de diferencias en nucleótidos por sitio entre dos secuencias de ADN y la diversidad haplotípica (H_d) que es la medida de la frecuencia de un determinado haplotipo en la población (Díaz-Ferguson 2012).

La importancia de estudiar la diversidad genética de la tilapia radica en que es una de las mayores fuentes de alimento a nivel mundial que se han obtenido primariamente de poblaciones salvajes (Ryman *et al.*, 1995).

3.1 El genoma mitocondrial

El genoma mitocondrial se localiza en el interior de las mitocondrias. Es un material genético circular cerrado de doble cadena, consta de aproximadamente 16.569 pb, contiene una región codificante con 37 exones los cuales están distribuidos en 22 ARN de transferencia, 13 genes estructurales, que codifican para los complejos enzimáticos del sistema de fosforilación oxidativa y 2 ARN ribosomales, también contiene una región no codificante conocida como región control o asa D, la cual posee aproximadamente 1200 pb, esta región se sitúa entre el gen que codifica para el ARN de transferencia de la prolina y el de la fenilalanina (Pakendorf & Stoneking 2005)

La región control destaca por su elevada tasa de mutación, aproximadamente 10 veces mayor que en las regiones codificantes, esto corresponde a $0.075-0.167 \times 10^{-6}$ sustituciones/sitio/año, y por su elevada variabilidad intrapoblacional (Pakendorf & Stoneking 2005). Esta variabilidad se centraliza en tres regiones o segmentos hipervariables: HVS-I que ocupa la posición 16.024-16.365, HVS-II se encuentra en la posición 73-340 y la HVS-III en la posición 73-340. Además de las características antes mencionadas, el ADNmt posee otras propiedades como poliplasmia, herencia materna y elevada tasa de mutación que lo hacen especialmente útil en la reconstrucción del pasado reciente de las poblaciones humanas (Pakendorf & Stoneking 2005).

La poliplasmia hace referencia al elevado número de copias de ADNmt que existe en cada mitocondria y, por ende en la célula. Una mitocondria puede tener aproximadamente entre 1.000 y 10.000 copias de ADNmt, estas múltiples copias no necesariamente son todas idénticas. La existencia de diferentes tipos de ADNmt en un individuo se conoce como heteroplasmia; se estima que en las poblaciones existe aproximadamente un 14% de heteroplasmia. No obstante, la homogeneidad del ADNmt en los individuos indica que ocurrió un severo cuello de botella durante las primeras etapas de la oogénesis lo que redujo el número de mitocondrias (Pakendorf & Stoneking 2005).

El ADNmt carece de recombinación ya que se transmite de forma no mendeliana por línea materna. Esto se debe a que las mitocondrias espermáticas son marcadas por ubiquitinación y selectivamente destruidas en el oocito (Shitara *et al.*, 1998; Pakendorf & Stoneking 2005). Este modo de herencia uniparental permite a los investigadores trazar la relación entre los linajes a través del tiempo, destacando la ancestría materna de una población, sin confundirse con los efectos de la recombinación del ADN nuclear en la herencia biparental. (Pakendorf & Stoneking 2005).

3.2 Características del gen Citocromo Oxidasa subunidad I (COI)

Dentro del genoma mitocondrial se encuentra el gen que codifica para la proteína Citocromo Oxidasa subunidad I (COI), cuyo fragmento es de 650 pb; que es un complejo que se encarga del transporte de electrones (Lunt *et al.*, 1996). Las características que han convertido al gen COI como uno de los mejores marcadores moleculares es su tamaño y estructura, los cuales se han conservado en la mayoría de organismos que se han estudiado (Saraste 1990); la longitud del gen, la cual es mayor dentro de las tres subunidades del

citocromo oxidasa, permite amplificar y secuenciar muchos más caracteres o nucleótidos; la presencia de extremos altamente conservados que permite el uso de cebadores universales para generar comparaciones y conclusiones robustas en diferentes tipos de análisis (Folmer *et al.*, 1994) y una tasa de mutación más rápida en comparación con otros genes mitocondriales, la cual permite el análisis de polimorfismos nucleótidos dentro de una misma especie a diferencia del gen ND4 (se usa en el análisis de diferencias nucleotídicas a nivel de género o familia) (Freeland 2005).

El gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) ha sido utilizado de forma fiable como código de barras para animales, ya que posee la habilidad de mostrar en sus secuencias la identificación de especies y la determinación del lugar de procedencia de estas (Hebert *et al.*, 2003). Este gen ha sido utilizado en la estimación de la estructura y diferenciación genética de muchas especies (De Barro *et al.*, 2011), por lo que se ha convertido en una valiosa herramienta molecular. Además, ofrece más del 97% de especificidad a nivel de especies en peces, entre otras especies (Ward *et al.*, 2005) y su uso ha sido considerado muy prometedor a nivel de especies, ya que se basa en la diferencia de sus secuencias (Hebert *et al.*, 2003); debido a la alta variación interespecífica, baja variación intraespecífica y la universalidad de los cebadores para grandes grupos taxonómicos (Folmer *et al.*, 1994).

Es por esto que se han realizado diversos estudios con código de barras en grupos de peces, lo que ha demostrado ser una técnica de ADN altamente eficiente y confiable (Ward *et al.*, 2005; Keskin *et al.*, 2013; Loh *et al.*, 2014), cuya utilización ha tenido diversas aplicaciones como el manejo, evaluación y conservación en el área de la pesca (Loh *et al.*,

2014; Shen *et al.*, 2016), así como la identificación de especies invasoras (Keskin *et al.*, 2013).

Existen otros genes mitocondriales tales como el Citocromo b que también ha sido utilizado en la identificación de especies, la región control o d-loop y el NDH 1-4 que han sido ampliamente utilizados en estudios poblacionales y fileogeográficos por su alto nivel de variabilidad en invertebrados marinos y peces (Díaz-Ferguson 2012). Además, se han realizado estudios genéticos con el gen de la región de control para determinar la diversidad genética y conectividad del manatí antillano (*Trichechus manatus manatus*) en Panamá (Díaz-Ferguson *et al.*, 2017). Estudios realizados en peces del género *Bagarius*, perteneciente a la familia Sisoridae, han demostrado que tanto el gen COI como el Cyt b son marcadores efectivos en la estimación de la variación genética, encontrándose un total de 14 haplotipos en las poblaciones de *Bagarius*; mostrando así una alta variación entre poblaciones con el gen Cyt b y una alta variación dentro de las poblaciones con el gen COI (Nagarajan 2015).

Un estudio en el que se utilizó la región control y el gen COI del ADN mitocondrial, se realizó con el objetivo de identificar especies de tilapias de poblaciones de cultivo y de poblaciones salvajes, cuyos resultados mostraron que la región control tenía mayor diversidad de nucleótidos que COI, indicando así que la región control también se puede utilizar en la identificación de especies de tilapias (Wu & Yang 2012). Sin embargo, el gen COI es mayormente utilizado en el método de código de barras de ADN, ya que es un método estándar en el que se secuencian rutinariamente loci estándar y es altamente confiable en una amplia gama de taxones, debido a sus características de universalidad y alto poder discriminatorio (Comtet *et al.*, 2015).

3.3 Organización y composición del genoma mitocondrial de la tilapia del Nilo

La especie *O. niloticus* es una de las más importantes, ya que es ampliamente cultivada a nivel mundial; además se ha introducido en más de 100 países en el mundo y en países asiáticos representaba el 80% de producción en 2004 (Romana-Eguia, 2004). Como uno de los peces de mayor importancia comercial y evolutiva, ha sido un modelo ampliamente estudiado en la identificación de poblaciones genéticas y su relación filogenética (Rican *et al.*, 2008). El genoma mitocondrial completo de especies como *O. mossambicus* y *Oreochromis sp* ha sido secuenciado (Mabunchi *et al.*, 2007). Sin embargo, el genoma mitocondrial completo de *O. niloticus* era desconocido.

Según He *et al.*, (2011), el genoma mitocondrial completo de *O. niloticus* se determinó utilizando métodos moleculares tales como aislamiento de ADN a partir de tejidos de aletas utilizando el protocolo de fenol cloroformo, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación. Los resultados obtenidos mostraron que el tamaño del genoma completo es de 16.625 pb, un total de trece genes codifican para proteínas (Cytb, ATP6, ATP8, COI-III, ND1-6, ND4L), con una longitud total de 11.473 pb, el cual representa el 69.01% de todo el genoma; 22 genes de ARN de transferencia y dos genes de ARN ribosomal (12S con un tamaño de 943 pb y 16S con 1.696 pb). La composición global del genoma consiste en 28.10% de adenina, 30,30% de citosina, 15,40% de guanina, 26.20% de timina y la región control no codificante o región D-loop presentó una longitud de 927 pb.

3.4 La hibridación natural de las especies del género *Oreochromis* con otros cíclidos y sus posibles efectos para las especies nativas

La influencia de actividades humanas sobre ecosistemas naturales, ha permitido importantes cambios a nivel genético sobre poblaciones de peces en cuanto a su distribución natural (Crispo *et al.*, 2011). De esta forma se ha dado la introducción de especies exóticas de forma intencional o no intencional, llevando a cabo la hibridación con especies nativas (Firmat *et al.*, 2013). Las introducciones intencionales de especies exóticas son llevadas a cabo debido a un aumento en la producción pesquera y las no intencionales son aquellas donde no hay intervención humana, lo que permite a la especie exótica que se mueva fuera de su rango geográfico (Canonical *et al.*, 2005).

Según Rognon & Guyomard (2003), las especies de peces son las que mayormente sufren hibridación, más que cualquier otro taxón animal; ya que las condiciones en las que estos se desarrollan permiten de una manera más sencilla los cruces entre especies o entre poblaciones de una misma especie; es decir, hibridación interespecífica. Por lo que se ha informado que las especies de tilapia tienen una alta tendencia a la hibridación debido a su radiación evolutiva reciente causada por especiación incompleta (D'Amato *et al.*, 2007).

Es importante mencionar que con el aumento de la acuicultura, se propicia el escape de alevines de tilapias desde los estanques a los ecosistemas acuáticos naturales, permitiendo interacciones con especies nativas y una posible hibridación, poniendo en peligro la integridad genética de las especies nativas. Estudios realizados en el lago Victoria, determinaron que la introducción de *O. niloticus* en la década de 1960 dio lugar a una competencia interespecífica con especies autóctonas de *Oreochromis* lo que aumentó la hibridación (Kudhongania & Chitamwebwa, 1995). Esto dio como resultado, la

extinción de las tilapias del lago Victoria, *Oreochromis variabilis* y *Oreochromis esculentus* (Mwanja *et al.*, 2010).

4. Descripción del ADN ambiental

EL ADN ambiental se describe como la tecnología que permite la detección de cantidades trazas de ADN a partir de componentes no vivos del ecosistema como por ejemplo: agua, sedimentos, suelo y aire (Díaz-Ferguson *et al.*, 2014; Díaz-Ferguson & Moyer 2014). El uso de ADN ambiental para la detección y monitoreo de diferentes especies se está convirtiendo en una técnica común, debido al elevado número de estudios realizados a partir de esta (Taberlet 2012).

Los organismos liberan pequeñas cantidades de ADN en su hábitat (por ejemplo, heces, tejido o células epiteliales de la piel, o presentes en secreciones como moco, saliva y gametos), que permiten el fácil y rápido muestreo del lugar donde se encuentra el organismo sin la necesidad de su captura física o confirmación visual (Bronnenhuber & Wilson 2013).

En este sentido el ADN ambiental se ha considerado como un método de detección emergente que permite monitorear o confirmar los cambios en la distribución de especies acuáticas, aún cuando el animal se encuentra en bajas densidades (Hernández *et al.*, 2006). La determinación de la presencia de ADN a través del medio ambiente se da sobre la base de la colecta, extracción y amplificación de este (Jerde *et al.*, 2011).

Varios estudios realizados recientemente han demostrado que la detección del ADN ambiental es más sensible que los métodos tradicionales de muestreo como la electropesca, ya que se puede determinar la distribución de varias especies de peces en ecosistemas de

agua dulce y marinos con un menor esfuerzo de muestreo (Jerde *et al.*, 2011; Thomsem *et al.*, 2012); sobre todo especies raras o crípticas, o aquellas que se encuentran en bajas densidades. Por ejemplo estados iniciales de invasión en especies invasoras o exóticas (Mahon *et al.*, 2013).

Recientemente, Valentini *et al.*, (2016) propusieron el método de metabarcoding de ADN ambiental para peces y anfibios, validados *in-silico* (diseño de primers grupo-específicos donde se utilizó el programa ECOPRIMERS), *in-vitro* (la evaluación de la universalidad de los marcadores diseñados para los grupos taxonómicos estudiados, fue mediante la amplificación de las especies objetivo que se encuentran en la base de datos de con los primers utilizados) e *in-situ* (la evaluación de la eficiencia y la fiabilidad del metabarcoding de ADN ambiental fue mediante la realización de un estudio comparativo en 62 sitios correspondientes a una amplia gama de ecosistemas acuáticos) en donde determinaron que este tipo de análisis era más efectivo para la evaluación de la riqueza de especies, es decir, que se puede evaluar toda la biodiversidad de una muestra de un cuerpo de agua en términos de presencia/ausencia de especies, lo que sugiere que se requieren mejoras en el desarrollo de este método para cálculos de estimación de biomasa de la población en estudio (Takahara *et al.*, 2012).

Así mismo, Civade *et al.*, (2016) señalan que la utilización del método de metabarcoding de ADN ambiental para evaluar la biodiversidad de peces a gran escala, ha demostrado ser eficiente para caracterizar la organización de las comunidades de peces a lo largo de un gradiente longitudinal en sistemas lénticos y lóticos. Estudios recientes sobre el método de metabarcoding de ADN ambiental en ambientes tropicales demostraron que es un método eficiente en el análisis de especies de anuros en corrientes tropicales y que a

pesar del tipo de ambiente que presenta diferencias con respecto a ambientes templados, no fue necesario hacer modificaciones importantes en los protocolos de laboratorio (Lopes *et al.*, 2017).

4.1 Factores que afectan la calidad del ADN ambiental

Es importante mencionar que existen procesos que afectan la detección de ADN ambiental, tales como la producción, el transporte y la degradación. Estos se deben tomar en consideración a la hora de realizar un estudio en el que se utilice la detección de ADN ambiental. Por ejemplo, la tasa de producción del ADN ambiental puede verse afectada por el tamaño, salud, sexo y densidad de los organismos (Thomsen *et al.*, 2012b).

El proceso de transporte del ADN ambiental a través de sistemas lénticos o lóticos, tiene gran influencia, ya que la difusión del ADN se puede ver limitada en sistemas lénticos (Takahara *et al.*, 2012), lo que indica que la extensión del muestreo espacial tal vez sea importante para altas tasas de detección; y en los sistemas lóticos las tasas de detección de ADN pueden ser altas (Pilliod *et al.*, 2013), pero el muestreo espacial suele ser desconocido. Estas características deben considerarse al momento de realizar el diseño de muestreo de manera tal que sea apropiado al tipo de ecosistema en estudio.

Por otro lado, la degradación de ADN ambiental es otro reto a considerar, ya que se debe estimar el tiempo que este ADN permanece en el ambiente antes de degradarse. Turner *et al.*, (2015) mencionan que las moléculas de ADN son adsorbidas por los sedimentos, lo que implica que estas persisten mucho más tiempo en sistemas de agua dulce, esto se puede explicar por el asentamiento de partículas y/o la degradación retardada de los sedimentos. Esto sugiere que el ADN podría volver a suspenderse hasta después de

seis meses, dando resultados falsos positivos sobre la presencia de las especies en estudio. Para esto, Turner *et al.*, (2015) sugieren evitar los sedimentos cuando se realizan colectas de agua para análisis de ADN ambiental.

Otro aspecto a mencionar sobre la degradación de ADN ambiental es la fuerte influencia que los rayos ultravioletas, temperatura y pH ejercen sobre la velocidad de degradación de dicho ADN. Strickler *et al.*, (2015) determinaron que tomando en consideración los parámetros antes mencionados, el ADN ambiental tuvo mayor duración en condiciones alcalinas, oscuras y más frías. Por tanto, nuestros resultados son los pioneros en detección de ADN ambiental en los trópicos.

4.2 Colecta y procesamiento de muestras ambientales

Actualmente, existen distintas formas de colecta de muestras de ADN ambiental, tales como precipitación de pequeños (Ficetola *et al.*, 2008) y grandes (Goldberg *et al.*, 2011) volúmenes de muestras ambientales. Aunque, según Diener *et al.*, (2015) la filtración proporciona la ventaja de colecta de ADN a partir de grandes volúmenes de agua, ya que se puede perder ADN disuelto, lo que podría permitir un aumento en la probabilidad de la detección de este.

Además, es importante mencionar que existen otras formas de extracción del ADN ambiental, tales como, extracción por cloroformo (Renshaw *et al.*, 2014) y utilizando el kit de extracción “DNeasy Blood & Tissue de Qiagen” (Diener *et al.*, 2015). Estos métodos desarrollados a través de diferentes estudios permiten realizar una comparación de cuál de ellos tendría mejores resultados de detección de ADN ambiental.

4.3 Aplicaciones de ADN ambiental en ecología y conservación

Díaz-Ferguson & Moyer (2014) mencionan que la implementación de ADN ambiental tiene diversas aplicaciones en la ecología y conservación, tales como ADN forense de vida silvestre el cual permite detectar el comercio ilegal de especies en peligro de extinción así como la introducción de especies exóticas; detección de poblaciones de baja densidad (por ejemplo, taxones amenazados); detección de especies invasoras para determinar la presencia del organismo de interés y de esta manera controlar su dispersión. Asimismo, el ADN ambiental permite conocer la biodiversidad y estructura de la comunidad en un determinado ecosistema.

CAPITULO II

METODOLOGIA

1. Área de estudio

Para el estudio y comparación de la diversidad genética de *O. niloticus* se tomaron muestras biológicas y parámetros ambientales en diferentes sitios. El área de estudio correspondió a los siguientes sitios de muestreo: lago Gatún, lago Alajuela, lago Bayano y el lago Barrigón en la hidroeléctrica ESTI ubicada en la provincia de Chiriquí (Fig. 1). En el lago Gatún los puntos de muestreo fueron Caña La Uyama, Ciricito y Cuipo. En el lago Alajuela los puntos de muestreo fueron Punta Mala, La Bajura, Isla Verde y Caimitillo. Además, se tomaron las coordenadas geográficas de los sitios de muestreo de los Lagos Gatún y Alajuela, los cuales se muestran en la tabla 2.



Fig 1. Mapa que muestra la ubicación del área de estudio

1.1 Características de los sitios

Gatún: El lago Gatún se creó represando el río Chagres entre los años 1910 y 1914 (Fig. 2). Su principal uso fue tránsito de los barcos que se dirigen al Canal de Panamá y en un menor grado la obtención de agua potable y energía hidroeléctrica. El embalse de Gatún ocupa una superficie de 420 km² (Maturell, 1984). Es importante mencionar que una de las primeras introducciones de peces exóticos al lago Gatún fue la especie *Cichla ocellaris* en el año de 1967 (Maturell 1984), luego se dio la introducción de la carpa herbívora para controlar la maleza acuática y finalmente se dio la introducción accidental de la tilapia *Sarotherodon niloticus* (Maturell, 1984).



Fig 2. Lago Gatún

Alajuela: El Lago Alajuela se creó represando el río Chagres en una sección aguas arriba de lo que actualmente es el Lago Gatún y se terminó de llenar en el año de 1935 (Fig. 3) . El principal objetivo de su construcción fue el de asegurar una reserva de agua para prevenir una disminución del nivel en el Lago Gatún, además de este lago se extrae una importante cantidad de agua potable destinada a la ciudad de Panamá. La superficie que

ocupa el Lago Alajuela es de aproximadamente 50 km² (Maturelll, 1984). Las especies introducidas al embalse fueron *Oreochromis niloticus* (tilapia), *Cichla ocellaris* (sargento) y *Colossoma macropomum* (colosoma), todas de interés comercial, al igual que el caracol *Pomacea zeteki* (Climapesca 2017).



Fig 3. Lago Alajuela

Bayano: El Lago Bayano se creó represando el río del mismo nombre ubicado en la Provincia de Panamá. Su principal uso y el objetivo para el cual se creó es la generación hidráulica de energía eléctrica. El embalse tiene una superficie de aproximadamente 350 km², se terminó en el año de 1976 (Maturelll, 1984). Según Castillo (2013) la introducción de tilapias se dio accidentalmente al escaparse de los estanques de cultivo y/o crías, y en la actualidad la pesca de tilapias en el lago Bayano es el sustento de más de 500 mil familias (La Prensa, 2017).

Barrigón: El lago Barrigón fue construido en el cauce de la quebrada Barrigón para la generación de electricidad como parte de la central hidroeléctrica ESTÍ en la provincia de Chiriquí (ETESA 2009). La central hidroeléctrica ESTÍ está situada al occidente de la

República de Panamá, 30 kilómetros al noroeste de la ciudad de David, en el Distrito de Gualaca, provincia de Chiriquí y a unos 400 kilómetros al oeste de la Ciudad de Panamá. La planta de Estí tiene dos unidades con una capacidad total instalada de 120 MW y un promedio de capacidad firme de 111.5 MW. Esta planta hidroeléctrica utiliza las aguas turbinadas o descargas de la hidroeléctrica Fortuna con la adición de las aguas fluyentes desviadas de los Ríos Caldera, Chiriquí y quebrada Barrigón (ETESA, 2009).

Según datos de Climapesca (2017), no hay actividad de pesca o proyectos de acuicultura en el embalse. Además, aguas abajo de este se encuentra el canal Casablanca del Ministerio de Desarrollo Agropecuario que surte de agua cruda a la Estación Experimental Dulceacuícola de Gualaca. Esta estación se dedica a la producción de alevines e investigación de peces, tales como *Oreochromis niloticus* (tilapia), *Cyprinus carpio*, (carpa común), *Parachromis managuensis* (guapote tigre) y *Colossoma macropomum* (colosoma).

No se ha determinado que especies se encuentran presentes en el embalse después de su inundación. Se listan las especies que fueron observadas en la quebrada Barrigón antes de la construcción y que probablemente se encuentran en el reservorio. Las especies de peces consideradas son *Brachyrhaphis roseni* (parivivo), *Astyanax aeneus* (sardina), *Cyphocharax magdalenae* (sardina maná), *Hoplias malabaricus* (pejeperro), *Astatheros altifrons* (choveca), *Roeboides bouchellei* (sardina espavé) y *Compsura gorgonae* (sabalillo) (Climapesca 2017).

Tabla 2. Coordenadas geográficas de los sitios de muestreo de los lagos Gatún y Alajuela

Lago	Sitio	Coordenada	Coordenada
Gatún	Ciricito	Norte	Este
	Punto 1	0600928	997562
	Punto 2	0600925	997560
Alajuela	Punto 3	0600989	997452
	Punta Mala (área de la bajura)	0655277	1019760
	Isla Verde	0655069	1021837
	Caimitillo	0655157	1018992
	Punta Mala	065504	1019641

2. Colecta de muestras

Los peces fueron capturados con la colaboración del personal de la Autoridad de los Recursos Acuáticos de Panamá (ARAP) y los pescadores artesanales, a través de diferentes métodos de pesca como red agallera, arpón y cuerda y anzuelo. Además, los peces capturados fueron medidos con un ictiómetro y pesados en la balanza marca OHAUS, de los cuales se obtuvo un registro de talla y peso. Se obtuvo muestras de tejido y de aleta del género *Oreochromis* y el periodo de colecta osciló entre enero y abril de 2016.

3. Procesamiento de muestras

Se consideró para este estudio un total de 69 muestras pertenecientes al género *Oreochromis*, de las cuales 58 muestras fueron procesadas para obtención de secuencias. Para cada individuo muestreado se tomaron 25 mg de aleta anal y de tejido muscular, los

cuales fueron conservados en tubos eppendorff de 2 ml con alcohol absoluto al 95%. Los tubos se rotularon de acuerdo al número de espécimen y al sitio de muestreo, hasta el momento de su procesamiento.

3.1 Extracción, cuantificación y calidad del ADN

El ADN genómico total fue aislado de un pequeño fragmento de músculo conservado en alcohol de cada espécimen, mediante el uso del kit comercial para extracción de ADN de sangre y tejido animal DNeasy® Blood and Tissue (QIAGEN) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Luego de la extracción, el ADN fue almacenado en tubos Eppendorf de 1.5 ml a 4°C, debidamente identificado. La cuantificación y calidad del ADN fue determinada mediante el uso del espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific), en el Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP).

3.2 Amplificación de ADN

Un fragmento de aproximadamente 650 pb en la región 5' del gen citocromo oxidasa subunidad 1 (CO1) del ADN mitocondrial, fue amplificado mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) usando un par de cebadores FishF2 (Forward) y FishR1 (Reverse) diseñados por Ward *et al.*, (2005) con la siguiente secuencia:

Forward primer FishF2 5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3'

Reverse primer FishR1 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'

Cada reacción de PCR consistió en los siguientes reactivos: 12.5 μL de Taq PCR Máster Mix Kit (QIAGEN), 1 μL de Forward primer FisF2 (10 μM), 1 μL de Reverse primer FishR1 (10 μM), 9.5 μL de agua libre de DNAsas y RNAsas (MP) y 1 μL de ADN. La PCR se realizó en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: la desnaturalización inicial se llevó a cabo durante 1 minuto a 95°C, seguido por 5 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 50°C por 40 s y extensión a 72°C por 1 minuto. Luego de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación a 55°C por 40 s y extensión a 72°C por un minuto. La amplificación fue finalizada por un paso de extensión de 72°C por 5 minutos, en la que el producto de PCR se mantuvo a una temperatura de 4°C hasta el momento de su visualización en gel (Díaz-Ferguson *et al.*, 2014).

3.3 Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa grado analítico (Promega) teñida con Gel Red™ Dropper Bottle (Orelup SSP®), con el fin de verificar la presencia del ADN amplificado. Las muestras de ADN fueron cargadas en un gel de agarosa preparado al 1% preparada con un buffer TBE 1X, junto con un marcador de peso molecular Gelpilot de 100 pares de bases (QIAGEN, Inc, Valencia, CA) el cual indicó el tamaño de los fragmentos amplificados. La electroforesis en gel se realizó a 80 V durante 40 minutos. Finalmente, los productos de PCR fueron visualizados bajo luz UV y se fotografió para su posterior documentación.

3.4 Limpieza de los productos de PCR y Secuenciación

Los productos de PCR fueron purificados con el kit de purificación QIAquick Purification Kit (QIAGEN, Inc, Valencia, CA) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (USB Corporation). Finalmente, la secuenciación por el método de Sanger fue realizada en la compañía de secuenciación Macrogen (USA), en la que se utilizó el kit comercial Big[®] Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Los parámetros utilizados fueron los siguientes: 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos y 60°C por 4 minutos.

4. Análisis de resultados

La visualización de los cromatogramas se realizó mediante el uso del programa Sequencing analysis v5.2 (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas se exportaron en archivo de texto y se guardaron en archivos Fasta. Además, fueron cortadas en los extremos y editadas con el software MEGA v 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Finalmente, para su identificación, fueron comparadas con las secuencias depositadas en Genbank mediante el programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997), donde se verificó su porcentaje de similitud y cobertura de las secuencias.

4.1 Cálculo de la diversidad genética y valores de polimorfismos, diversidad haplotípica y nucleotídica

La diversidad haplotípica (H_d) y nucleotídica, (π) que consisten en la medida de la frecuencia de un determinado haplotipo en la población y en el promedio de diferencias en nucleótidos por sitio entre dos secuencias de ADN, respectivamente y el número de sitios

polimórficos (S) fue calculado usando DNAsp v 5.0 (Librado & Rozas 2009). Asimismo se determinó el número total de haplotipos (H).

4.2 Prueba de neutralidad y distribución mismatch

El test de neutralidad D de Tajima (Tajima 1989) y F_s de Fu (Fu & Li 1993) miden el efecto que tienen los cambios demográficos de las poblaciones sobre las secuencias de ADN. Estas pruebas evalúan si esas regiones se encuentran en equilibrio mutación-deriva; sin embargo, existen factores demográficos que pueden afectar las variaciones, dentro de las que se pueden mencionar las explosiones y reducciones poblacionales, las cuales son detectadas por estos test; es así como son utilizados para realizar los análisis de demografía molecular (Tajima 1996).

Los valores de la D de Tajima y la F_s de Fu fueron calculados con el software DNAsp v 5.0 (Librado & Rozas 2009). Además, se realizó la distribución de frecuencias de diferencias nucleotídicas entre los haplotipos, comúnmente conocida como distribución mismatch con el software DNAsp v 5.0 (Librado & Rozas 2009) para determinar si las poblaciones de *O. niloticus* han experimentado o no una expansión demográfica (Rogers & Harpending, 1992).

4.3 Flujo genético y conectividad

La diferenciación de poblaciones entre sitios fue examinada usando valores F_{ST} y se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) mediante el software Arlequin v 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005), para definir grupos de poblaciones de tilapias que son geográficamente homogéneas y que pueden estar máximamente diferenciadas.

4.4 Dendrograma Neighbor-Joining

Se realizó un dendrograma NJ mediante el programa MEGA v 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) para determinar las relaciones filogenéticas entre las distintas especies del género *Oreochromis*.

4.5 Detección de ADN ambiental en muestras de agua

4.5.1 Logística para la instalación de los acuarios

Para el montaje de los acuarios se requirieron los siguientes materiales: 12 acuarios, 12 tapas, 12 aireadores, 12 mangueras, 12 filtros y 20 botellas colectoras de agua. Las tapas utilizadas fueron de gypsum y se cortaron a una medida de 16 pulgadas de ancho por 48 pulgadas de largo.

Los acuarios fueron previamente lavados con desinfectante VIRKO. Luego se procedió con la instalación de los aireadores, mangueras y filtros, y el llenado de los acuarios con aproximadamente 270 litros de agua por cada acuario y se procedió a colocar las tapas de gypsum sobre cada uno. Estos fueron etiquetados por densidad (D1= 1 pez, D2= 3 peces, D3= 6 peces) y tratamiento (A= superficie, B= medio, C= fondo). Para determinar si el agua contenía clorox, se realizó la prueba de clorox con Orthotolidina 0.1%, la cual dio positivo. Por lo tanto, el agua contenida en cada acuario fue tratada con 60 mL de tiosulfato de sodio antes de la introducción de los peces (Díaz-Ferguson *et al.*, 2014).

4.5.2 Ensayos controlados en acuarios para la obtención de las muestras de ADN ambiental

Los ensayos fueron realizados durante 10 días y consistieron en cuatro tratamientos (0, 1, 3 y 6 individuos/tanque) con tres repeticiones por tratamiento. Los individuos utilizados para los ensayos provinieron de la Estación de ARAP en Divisa. Un total de 48 individuos juveniles de *Oreochromis niloticus* con un peso promedio de 156.48 gramos y un tamaño promedio de 20.9 cm fueron utilizados en el experimento (Fig. 4). Estos individuos se mantuvieron en una tina de cemento y se dejaron de alimentar tres días antes de ser introducidos en los acuarios (Fig. 5).

Una vez que los acuarios estaban completamente instalados, se procedió a la introducción de los individuos en cada acuario a las 3 pm (hora inicial que fue utilizada como referencia de 24 horas de experimento). El muestreo de cada acuario fue realizado con botellas de plástico de 1 litro debidamente autoclavadas en los días 1, 5 y 8 del experimento y a la misma hora que se realizó la introducción de los individuos, colectando un total de 48 muestras. Las muestras de agua fueron tomadas de la superficie, del medio y del fondo de cada acuario y fueron etiquetadas debidamente de acuerdo a la densidad y el tratamiento (Fig. 6) (Díaz-Ferguson *et al.*, 2014).

Prueba de persistencia: El último día de la colecta de muestras de agua (día 8) se extrajeron los individuos de los acuarios y el agua se dejó en los acuarios durante 5 días. Se realizó la última colecta de muestras de agua (persistencia) con el objetivo de determinar si había presencia de ADN días después de terminado el experimento (Díaz-Ferguson *et al.*, 2014).



Fig 4. Individuo de *O. niloticus* proporcionado de la estación de ARAP en divisa.

Cada muestra de agua recolectada se trató con 1 ml de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 33 ml de etanol no desnaturalizado al 95% para la conservación del ADN ambiental. Todas las muestras se almacenaron a 4°C hasta que se realizó la filtración de las muestras de agua y la extracción de ADN ambiental.

Parámetros fisicoquímicos: se tomaron parámetros fisicoquímicos al azar durante los días del experimento tales como: ph, oxígeno disuelto, temperatura y salinidad.

4.5.3 Filtración de las muestras de agua

Utilizando una bomba de vacío y un erlenmeyer kitasato, se filtró cada muestra de agua de 1 L a través de un filtro estéril de nitrato de celulosa (0,45 μm) (Pall Corporation) (Fig. 7). Después de la filtración, el ADN retenido en el filtro fue extraído usando el protocolo del kit de aislamiento de ADN PowerWater (MO BIO Laboratories, Inc., Carlsbad, CA) (Fig. 8). Finalmente, el ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro

NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA). Para rendimientos de ADN inferiores a 15 ng/uL y lecturas de densidad óptica (260/280) inferiores a 1.5.



Fig 5. Introducción de los individuos de tilapias a los acuarios. A. Pileta donde se encontraban. B. Captura de los individuos. C. Traslado hacia las piletas. D. Tilapias introducidas en los acuarios.

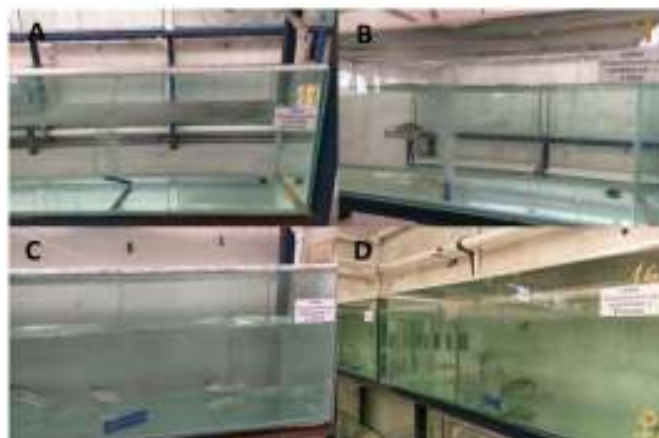


Fig 6. Diferentes densidades de peces en los acuarios. A. Control negativo. B. Densidad 1=1pez. C. Densidad 2=3 peces. D. Densidad 3=6 peces.

4.5.4 Extracción de ADN ambiental

La extracción de ADN ambiental se realizó con el kit de aislamiento de muestras ADN ambiental PowerWater® de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial (MOBIO Laboratories, inc.). Inicialmente, los filtros se insertaron en tubos con perlas PowerWater® de 5 mL y se agregó un buffer de lisis, el cual permitió liberar el ADN atrapado en el filtro mediante el uso del vortex. Después se procedió con la eliminación de proteínas e inhibidores de las muestras de ADN mediante el uso de las soluciones indicadas. Finalmente, el ADN se lavó y eluyó utilizando una columna con filtro, cuya cantidad final fue de 50 μ L de ADN ambiental.

4.5.5 Cuantificación del ADN

La cuantificación y calidad del ADN fue determinada mediante el uso del espectrofotómetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific), en el Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP).

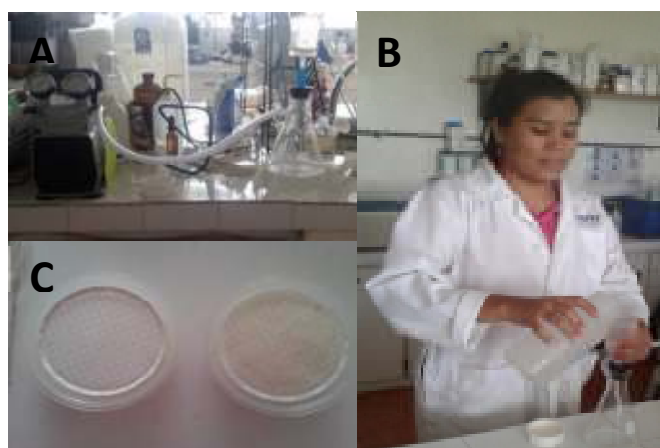


Fig 7. Filtración de las muestras de agua. A. Sistema de filtrado. B. Proceso de filtración de las muestras de agua. C. Filtros antes y después de la filtración (izq: antes de la filtración; der: después de la filtración)

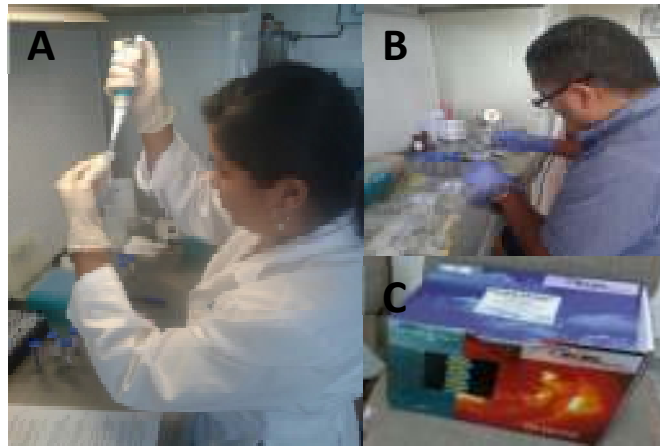


Fig 8. Extracción de ADN ambiental. A y B. Proceso de extracción de ADN ambiental. C. Kit de extracción de ADN ambiental PowerWater® (MOBIO laboratorios, inc).

4.5.6 Diseño de primers y sonda para PCR en tiempo real

Una sonda interna y dos cebadores especie-específicos fueron diseñados a partir de la alineación de las secuencias COI para *O. niloticus* mediante el uso del software en línea Genscript (<http://www.genscript.com>), los cuales fueron corroborados con el programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Inc). Las secuencias de la sonda interna y los cebadores especie-específicos se muestran a continuación:

Sonda Taqman TAMRA: 5'-FAM- CTATCCCTACCCGTTCTTGCCGC- 3'-TAMRA

Cebador Forward: 5'- CCCCTATTTGTATGGTCCGTTTC -3'

Cebador Reverse: 5' - TGTGAGAAGTATTGTGATGCCG-3'

4.5.7 Detección de ADN ambiental por PCR en tiempo real

Se realizó un análisis de una curva standard mediante PCR en tiempo real para determinar la cantidad mínima de ADN detectado, el cual determina la cantidad de ciclos

minimos requeridos para la amplificación del ADN objetivo (en este caso, muestras de ADN ambiental de *O. niloticus*) en cantidad umbral. Para esto, se realizaron cinco diluciones seriales 2/20 a una muestra de ADN puro de la especie objetivo escogida al azar, cuya concentración inicial fue de 20 ng/μL y la concentración final de 0.000125 ng/μL (se realizaron tres replicas por cada valor de dilución). Esta prueba se realizó con el objetivo de probar si la sonda y los cebadores eran sensitivos y viables para la amplificación in vitro de las muestras objetivo.

Luego, en una placa de qPCR se realizaron 48 reacciones de muestras de ADN ambiental obtenidas mediante ensayos controlados, muestras diluidas para la obtención de la curva estándar y negativos (todas con réplicas incluidas). Inicialmente se realizaron tres pruebas variando la concentración de los reactivos utilizados para seleccionar aquellas con resultados más óptimos.

El volumen de reacción final consistió en 20 μL que incluían los siguientes reactivos: 10 μL de TaqMan® Universal Master mix II (Applied Biosystems, Inc.), 0.01 μL de sonda (10 μM), 0.5 μL de cebador Forward (10 μM), 0.5 μL de cebador Reverse (10 μM) y 7.98 μL de agua. Las muestras de ADN ambiental fueron amplificadas bajo las siguientes condiciones: 50 °C por 2 minutos, desnaturalización inicial de 95 °C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos y 60 °C por un minuto (Díaz-Ferguson *et al.*, 2014). Los ensayos para la detección de ADN ambiental fueron realizados mediante la técnica TaqMan (Applied Biosystems, Inc.) con el equipo de PCR en tiempo real *7500 Real Time PCR Systems* (Applied Biosystems, Inc.) en las instalaciones de INDICASAT-AIP.

4.5.8 Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados mediante el software 7500 del *7500 Real Time PCR Systems*, el cual generó la curva estándar, el diagrama de amplificación, el ciclo umbral, el número de ciclos de amplificación por cada muestra y un reporte final del experimento. En adición, se realizó una gráfica de barras de error con el software IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM SPSS, Inc) para comparar el número de ciclos amplificados en función de los días para todos los tratamientos (densidades).

Para determinar diferencias significativas entre los ciclos amplificados y las densidades se realizó una prueba estadística de análisis de la varianza (ANOVA) con el programa Past versión 3.0 (Hammer *et al.*, 2001), pero los datos no cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianza. Por lo tanto, se utilizó una prueba no paramétrica Kruskal-Wallis y como prueba posterior se utilizó una prueba de comparaciones múltiples de Mann-Whitney.

Con los programas estadísticos antes mencionados se realizaron dos pruebas, ya que los datos de los distintos tratamientos (Densidad 1=8 datos, Densidad 2=8 datos, Densidad 3=9 datos) no eran homogéneos (para este tipo de pruebas estadísticas se recomienda usar datos homogéneos). Primero se realizó la prueba estadística eliminando un dato de la densidad 3 (35.3 CT) y luego se realizó otra prueba con todos los datos.

Los resultados para determinar si existe o no diferencias significativas fueron analizados con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha=0.05$). Por consiguiente, si el valor de $p \leq \alpha$: las diferencias entre algunas de las medianas son estadísticamente significativas y si el valor $p > \alpha$: las diferencias entre las medianas no son estadísticamente significativas.

CAPITULO III

RESULTADOS

1. Caracterización molecular

La región mitocondrial Citocromo Oxidasa I fue amplificada satisfactoriamente mediante PCR. A partir de los amplicones se obtuvo un total de 58 secuencias que fueron analizadas y comparadas con las secuencias de referencia depositadas en GenBank. Se identificaron molecularmente un total de cuatro especies, incluido un híbrido en los sitios estudiados: Gatún (S=1), Bayano (muestras colectadas en 2006) (S=3), Alajuela (S=3) y Barrigón (S=1). Las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), y generaron valores de similitud entre 99-100%, un valor de $e=0.00$ con relación a las secuencias de referencia para las especies mencionadas, depositadas en GenBank. Además, la cobertura de los alineamientos con las secuencias de referencia fue de 100%.

Las especies identificadas dentro del género *Oreochromis spp* fueron las siguientes: *Oreochromis niloticus*, *Oreochromis mossambicus*, *Oreochromis urolepis h*, *Oreochromis aureus* y el híbrido entre *Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*. Los lagos Bayano (S=3) y Alajuela (S=3) mostraron una mayor cantidad de especies con respecto a los lagos Gatún (S=1) y Barrigón (S=1) (Tabla 3).

Tabla 3. Lista de especies identificadas y referenciadas con las secuencias depositadas en GenBank mediante el programa BLAST'n

Localidad	Especie	Individuo/Especie
Lago Gatún	<i>O. niloticus</i>	23
Lago Bayano	<i>O. niloticus</i>	11
	<i>O. mossambicus</i>	3
	<i>O. urolepis h</i>	1
Lago Alajuela	<i>O. niloticus</i>	1
	<i>O. mossambicus</i>	3
	<i>O. niloticus</i> x <i>O. aureus</i>	1
Lago Barrigón	<i>O. aureus</i>	15
Total		58

2. Estimación de Diversidad Genética en poblaciones de *Oreochromis niloticus*

El análisis de las secuencias de la región Citocromo Oxidasa I de las poblaciones de *O. niloticus* de los 34 individuos muestreados en los lagos Gatún y Bayano generó dos haplotipos. El haplotipo 1 se presentó en 33 de los 34 individuos mientras que el haplotipo 2 solo se presentó en un individuo del lago Bayano.

Los valores de diversidad haplotípica (H_d) y nucleotídica (π) obtenidos para la población de *O. niloticus* del lago Gatún fueron ambos de 0. Mientras que los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica para la población del lago Bayano fueron de 0.1818 y 0.0003 respectivamente, con un sitio polimórfico ($S=1$) (tabla 4). El valor de diversidad haplotípica total (ambas poblaciones) fue de ($H_d=0.059$) y el de diversidad nucleotídica total fue de ($\pi=0.00010$).

Tabla 4. Niveles de diversidad genética calculados para la poblaciones de *O. niloticus*.

Localidad	n	H	H1	H2	(π)	(Hd)	(S)
Lago Gatún	23	1	23		0	0	0
Lago Bayano	11	2	10	1	0.0003	0.1818	1
Total	34	2	33	1	0.00010	0.059	1

n=número de muestras, H=número de haplotipos, (π)=diversidad nucleotídica, (Hd)=diversidad haplotípica, (S)=sitios polimórficos, H1=Haplotipo 1, H2=Haplotipo 2.

2.1 Pruebas de neutralidad y distribución mismatch (diferencias pareadas)

Las pruebas D de Tajima y Fs de Fu para las poblaciones estudiadas mostraron que los valores obtenidos no son significativos ($D = -1.1378$ y $P > 0.10$; $F_s = -1.1315$ y $P > 0.10$). Una D de Tajima negativa significa un exceso de polimorfismos de baja frecuencia en relación con las expectativas. Una Fs de Fu negativa es evidencia de un exceso de alelos, como se esperaría de una expansión poblacional reciente o de autostop genético (Tabla 5) (Tajima 1989; Fu & Li 1993). Mediante la prueba de distribución de diferencias pareadas (mismatch) se puede observar que ocurrió un reciente cuello de botella (Fig. 9).

Tabla 5. Prueba de neutralidad (D de Tajima y Fs de Fu)

Localidad	Tajima's D	P	Fs Fu's	P
Gatun y Bayano	-1.1378	P>0.10	-1.1315	P>0.10

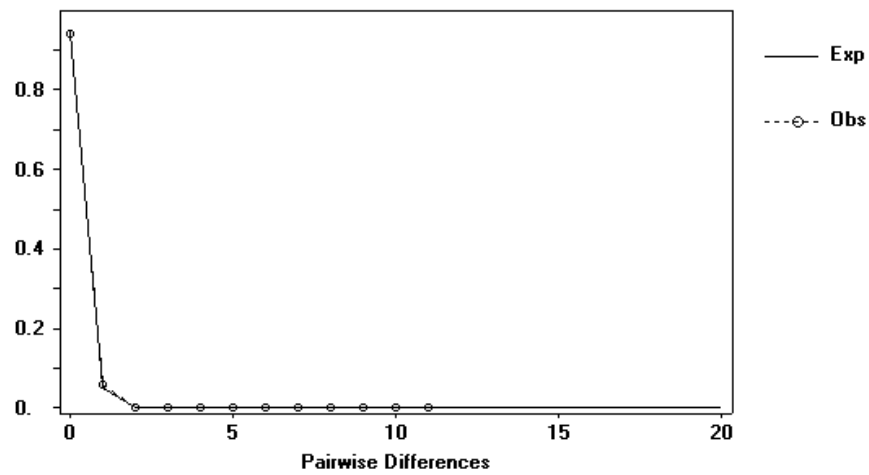


Fig 9. Distribución de diferencias pareadas (Mismatch) con secuencias de Citocromo oxidasa I para *O. niloticus*

2.2 Flujo genético y conectividad

Los valores de diferenciación genética entre poblaciones muestran que existe una baja diferenciación genética entre las poblaciones del lago Gatún y el lago Bayano ($F_{st}=0.07$) (Tabla 6). Los valores calculados para el AMOVA mostraron que existe un 92.74% de variación dentro de las poblaciones y un 7.26% entre las poblaciones estudiadas (Tabla 7).

Tabla 6. Diferenciación genética entre las poblaciones de *O. niloticus* (Bayano y Gatún).

	Población 1	Población 2
Población 1	0.00000	
Población 2	0.07258	0.00000

Tabla 7. Análisis Molecular de Varianza (AMOVA)

Fuente de variación	d.f	Suma de cuadrados	Componentes de Varianza	Índice de fijación FST	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	1	0.061	0.00222 Va		7.26
Dentro de poblaciones	32	0.909	0.02841 Vb		92.74
Total	33	0.971	0.03063	0.07258	

2.3 Dendrograma Neighbor-Joining (NJ)

La historia evolutiva de *Oreochromis ssp* fue inferida utilizando el método Neighbor-Joining con 1000 réplicas y la distancia evolutiva fue calculada utilizando el método de Kimura 2-parámetros. El programa utilizado para obtener el dendrograma NJ fue el programa Mega 6. El dendrograma NJ, basado en el agrupamiento de las diferentes especies de *Oreochromis ssp.*, de cuatro localidades (Gatún, Bayano, Alajuela, Barrigón) muestra una separación entre los individuos de las especies *O. niloticus*, *O. aureus* y *O. mossambicus* y el grupo externo utilizado fueron los individuos de la especie *Coptodon rendalli* (Fig. 10). Además, se utilizaron secuencias de referencias del GenBank para compararlas con las secuencias obtenidas.

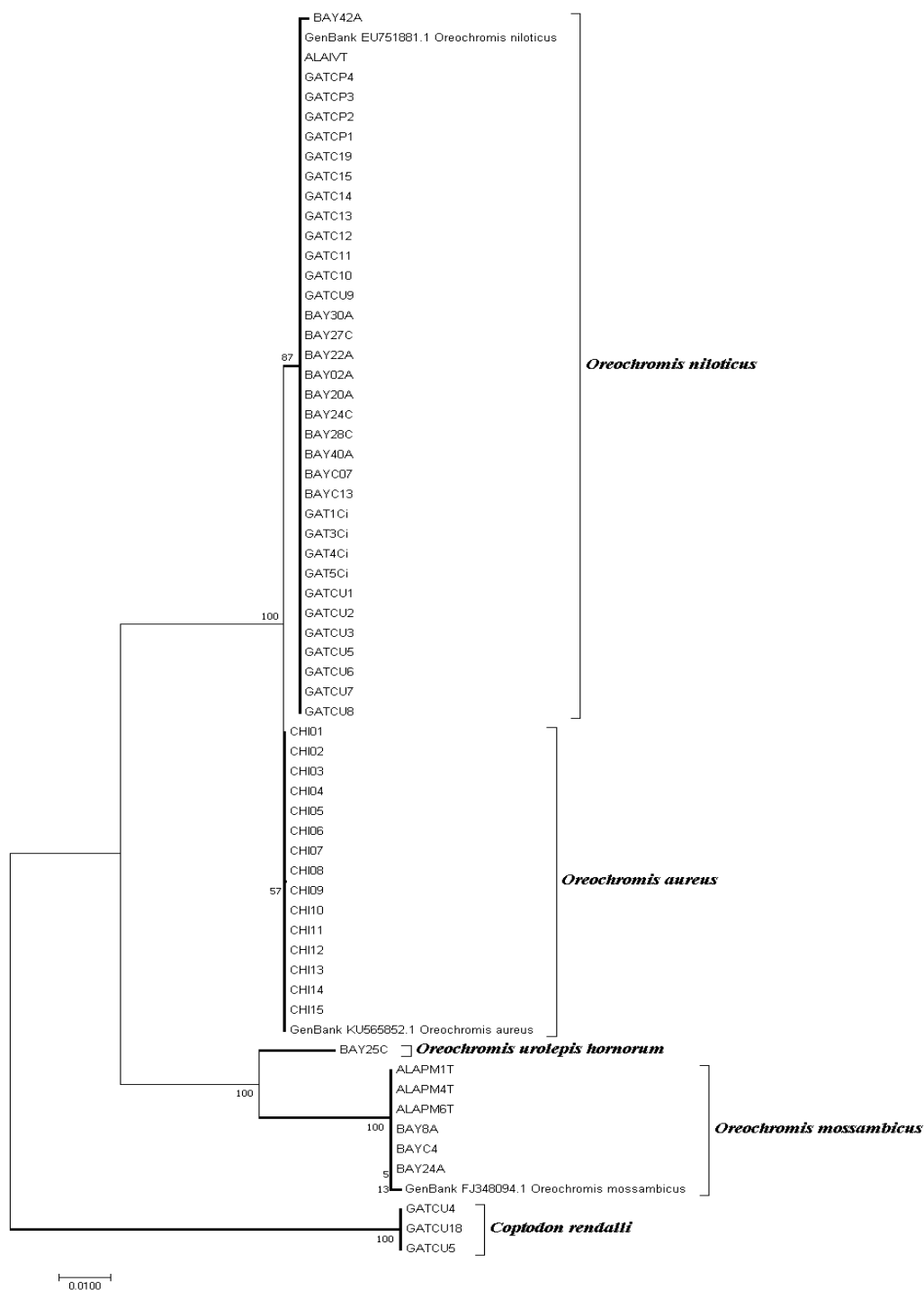


Fig 10. Dendrograma Neighbor-joining. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Kimura 2-parámetros (Kimura 1980) y se utilizaron secuencias de referencias del GenBank. El análisis evolutivo se realizó en Mega 6.

3. Detección de ADN ambiental

Las concentraciones de ADN ambiental, medidas con el espectrofotómetro nanodrop presentaron un rango de concentración total de ADN entre -1.5 y 192.1 ng/ μ L (Tabla 8). Estos resultados indican que las muestras de ADN ambiental tienen concentraciones suficientes de ADN para que pudieran ser detectadas mediante PCR en tiempo real. Las muestras con las concentraciones de ADN con valores negativos son los controles negativos de los ensayos controlados.

3.1 Límite mínimo de detección de ADN ambiental mediante PCR en tiempo real

La curva estándar obtenida mediante diluciones seriadas 2/20 (a partir de 20 μ L) de una muestra de ADN de tejido de la especie objetivo mostró que la concentración mínima de detección fue de 0.0025 μ L con 30 ciclos de amplificación y una correlación entre los ciclos de amplificación y la cantidad de ADN detectada de $R^2= 0.795$ (Fig. 11).

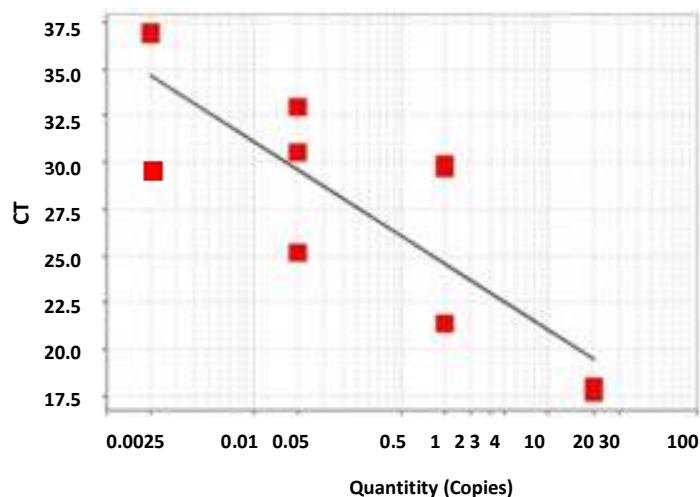


Fig 11. Gráfica del ciclo umbral (CT) vs la cantidad de ADN para la obtención de la curva estándar.

Tabla 8. Concentraciones de ADN ambiental medidas con el espectrofotómetro nanodrop.

Tratamiento	Día 1	[ADN] ng/ μ L	Densidad Óptica	Día 4	[ADN] ng/ μ L	Densidad Óptica	Día 7	[ADN] ng/ μ L	Densidad Óptica	Persistencia	[ADN] ng/ μ L	Densidad Óptica
I (0 peces)	D1A	10.0	1.71	D2A	7.1	2.68	D3A	(-)1.5	1.6	PA (-)	11.7	2.29
	(-)			(-)			(-)					
	D1B	11.9	1.93	D2B	9.5	1.89	D3B	7.0	1.93	PB (-)	-36.2	0.44
	(-)			(-)			(-)					
II (1 pez)	D1C	-44.4	0.52	D2C	-42.5	0.50	D3C	7.4	2.04	PC (-)	-45.6	0.53
	(-)			(-)			(-)					
	D1D1	22.1	1.95	D2D1	14.6	1.68	D3D1	24.2	1.96	PD1A	86.7	1.65
	A			A			A					
III (3 peces)	D1D1	13.4	2.06	D2D1	22.1	2	D3D1	24.1	1.95	PD1B	13.4	1.86
	B			B			B					
	D1D1	17.9	1.91	D2D1	5.4	2.29	D3D1	40.6	1.86	PD1C	19.6	1.92
IV (6 peces)	C			C			C					
	D1D2	52.6	1.93	D2D2	6.6	2.11	D3D2	35.2	1.47	PD2A	46.2	1.88
	A			A			A					
	D1D2	74.6	1.94	D2D2	10.2	1.91	D3D2	6.7	2.1	PD2B	46.6	1.89
III (3 peces)	B			B			B					
	D1D2	45	1.94	D2D2	90.2	1.94	D3D2	75.3	1.93	PD2C	49.5	1.91
	C			C			C					
IV (6 peces)	D1D3	71.3	1.91	D2D3	62.1	2.03	D3D3	50.3	1.89	PD3A	54.7	1.89
	A			A			A					
	D1D3	59.8	1.9	D2D3	192.1	1.94	D3D3	132.5	1.92	PD3B	61.5	1.89
	B			B			B					
IV (6 peces)	D1D3	45.6	1.94	D2D3	107.1	2.62	D3D3	58.3	1.89	PD3C	67.4	1.84
	C			C			C					

3.2 Especificidad de la sonda y los cebadores especie-específicos

Los ensayos de amplificación por PCR en tiempo real permitieron corroborar que la sonda (marcada en su extremo 5' con un colorante fluorescente FAM y en su extremo 3' con un inhibidor TAMRA) está bien diseñada y que es específica para la detección de ADN ambiental de *O. niloticus*, ya que esta no amplificó los controles negativos y si con muestras experimentales. Es decir, que las muestras de ADN ambiental de tilapia amplificaron y sobrepasaron el umbral de detección, el cual se encuentra dentro del rango esperado (CT=0.0159) (Fig. 12).

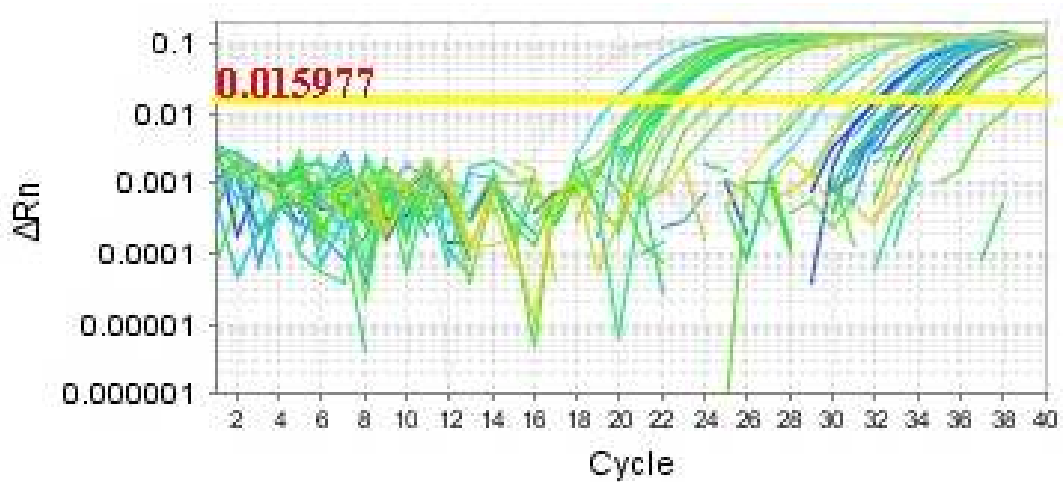


Fig 12. Gráfica que representa la curva de amplificación de las muestras de ADN ambiental a diferentes concentraciones. La gráfica también muestra el ciclo umbral (0.015977) y el delta Rn (magnitud de la señal generada por el conjunto dado de condiciones de PCR) vs el número de ciclos requeridos para la amplificación de las muestras objetivo.

3.3 Prueba de detección en muestras de ADN ambiental obtenidas de ensayos controlados mediante PCR en tiempo real

Las muestras de ADN ambiental de *O. niloticus* amplificaron efectivamente a diferentes ciclos de amplificación. Se realizó un promedio de los ciclos de amplificación para las réplicas de cada densidad por día. Se observó que las densidades dos (3 peces) y tres (6 peces) de los días 1, 4 y 7 respectivamente, requirieron ciclos de amplificación entre 21.00 y 22.81. Mientras que las muestras de las densidades uno (1 pez) y tres (seis peces) presentaron ciclos de amplificación de 24.45 del día 7 y 26.01 del día 1. Los ciclos de amplificación de las densidades uno del día 1, uno y dos del día 4 y dos del día 7 estuvieron entre 27.57 y 30.32 ciclos. Las muestras de persistencia mostraron ciclos de amplificación entre 32.09 y 33.73 cuando dejaron de amplificar (Tabla 9).

Tabla 9. Promedio calculado de los ciclos de amplificación para las réplicas de las distintas densidades por día.

Tratamiento	Día	CT
Densidad 1	1	27.73
Densidad 2	1	22.09
Densidad 3	1	26.01
Densidad 1	4	30.32
Densidad 2	4	27.71
Densidad 3	4	22.81
Densidad 1	7	24.45
Densidad 2	7	27.51
Densidad 3	7	21.00
P Densidad 1	13	33.04
P Densidad 2	13	33.73
P Densidad 3	13	32.99

Además, se realizó una gráfica de barras de error que representa el ciclo umbral en función del tiempo en días para cada una de las densidades (1, 2, 3 y persistencia) de peces de la especie *O. niloticus* (Fig. 13). Se puede observar las densidades que presentan mayores concentraciones de ADN, las cuales corresponden a las densidades 2 (3 pez) del día uno y 3 (6 peces) de los días cuatro y siete, ya que los valores de CT son inversamente proporcionales a la cantidad de ADN objetivo en la muestra (es decir, cuanto menor es el valor de CT, mayor es la cantidad de ADN).

En la tabla 10 se puede observar que todas las muestras de las distintas densidades presentaron ciclos de amplificación hasta un promedio de 30.32, en los que se puede determinar que si hay presencia de ADN, realizando un cálculo aproximado de la concentración de ADN con la curva estándar en función a los ciclos de amplificación de cada muestra estándar (Fig. 11). Es decir, que es probable que la cantidad de ADN ambiental detectada en las muestras a una amplificación de 30.32 ciclos es 0.05 ng/ μ L. Además, las muestras de la prueba de persistencia presentaron hasta 33.73 ciclos de amplificación en los que la cantidad probable de ADN puede ser de 0.0025 ng/ μ L.

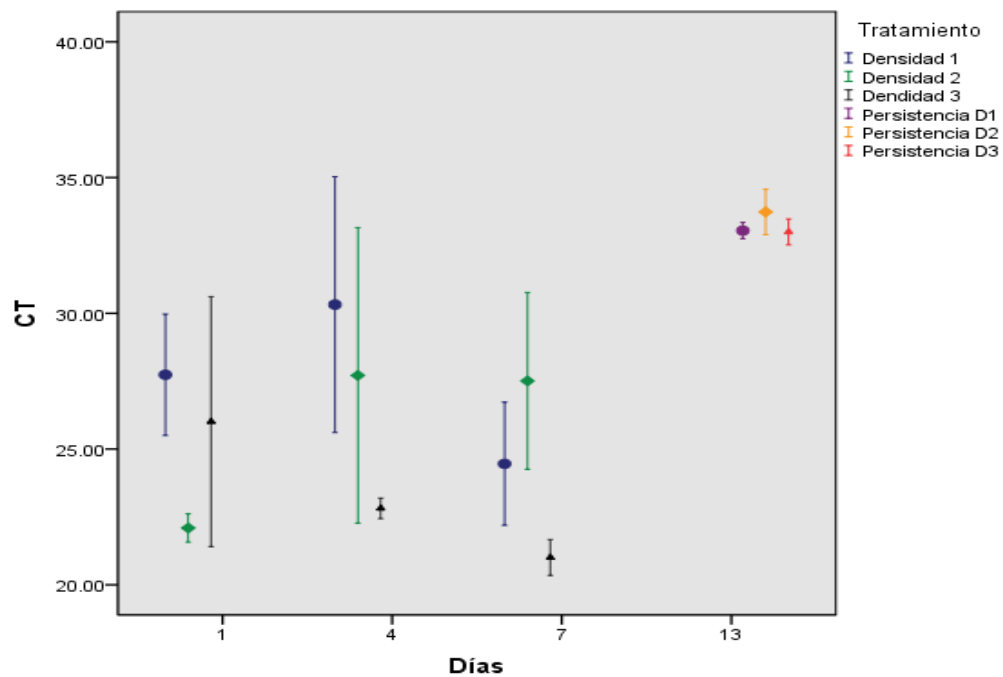


Fig 13. Ciclo umbral de detección (CT) en función del tiempo (días) para cada una de las densidades de peces. Los círculos morados representan la densidad 1 (1pez), los diamantes verdes representan la densidad 2 (3 peces) y los triángulos negros representan la densidad 3 (6 peces). También se añadieron las muestras de persistencia que corresponden a los colores morado, amarillo y rojo. Las barras representan el error típico de la media.

3.4 Análisis estadístico con la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis

Los resultados obtenidos mediante pruebas estadísticas Kruskal-Wallis para determinar si existe o no diferencias significativas entre los ciclos amplificados y las densidades (considerando todos los datos de los ciclos de amplificación), indicaron que las diferencias entre las medianas no son estadísticamente significativas ($p=0.1492$) (Tabla 11). Sin embargo, descriptivamente se observa una tendencia de que existe diferencias significativas entre los CT y las densidades (Fig. 14).

Tabla 10. Prueba de presencia/ausencia de ADN ambiental mediante PCR en tiempo real

Tratamiento	Día 1	CT	Prueba P/A	Día 4	CT	Prueba P/A	Día 7	CT	Prueba P/A	Persistencia	CT	Prueba P/A
I (0 peces)	D1A	35.48	-	D2A	Indet.	-	D3A	Indet.	-	PA (-)	33.55	-
	(-)			(-)			(-)					
	D1B	Indet.	-	D2B	Indet.	-	D3B	36.22	-	PB (-)	32.98	-
	(-)			(-)			(-)					
	D1C	35.84	-	D2C	38.57	-	D3C	36.05	-	PC (-)	34.42	-
	(-)			(-)			(-)					
II (1 pez)	D1D1	31.06	+	D2D1	Indet.	-	D3D1	21.95	+	PD1A	33.36	+
	A			A			A					
	D1D1	23.49	+	D2D1	25.61	+	D3D1	22.43	+	PD1B	33.33	+
	B			B			B					
	D1D1	28.66	+	D2D1	35.03	-	D3D1	28.99	+	PD1C	32.45	+
	C			C			C					
III (3 peces)	D1D2	23.12	+	D2D2	33.16	+	D3D2	29.88	+	PD2A	32.17	+
	A			A			A					
	D1D2	21.73	+	D2D2	Indet.	-	D3D2	31.58	+	PD2B	35.03	-
	B			B			B					
	D1D2	21.43	+	D2D2	22.27	+	D3D2	21.07	+	PD2C	34.00	+
	C			C			C					
IV (6 peces)	D1D3	21.93	+	D2D3	23.57	+	D3D3	19.80	+	PD3A	32.05	+
	A			A			A					
	D1D3	20.90	+	D2D3	22.51	+	D3D3	22.07	+	PD3B	33.36	+
	B			B			B					
	D1D3	35.20	+	D2D3	22.37	+	D3D3	21.15	+	PD3C	33.58	+
	C			C			C					

Nota: Los negativos no amplificaron o presentaron curvas de amplificación irregulares en ciclos superiores a los 35 CT, lo que indica ausencia de detección en muestras donde no hay ADN de tilapia e indican la especificidad de la sonda diseñada

Tabla 11. Prueba de Kruskal-Wallis para medianas iguales

	H (<i>chi</i>²)	p
Prueba realizada con todos los datos de los CT	3.804	0.1492
Prueba realizada sin un dato de los CT (35.2)	6.335	0.04211

Igualmente, se realizó la prueba Kruskal-Wallis eliminando un dato de CT (35.2) correspondiente a la densidad tres. De este modo, se observó que las diferencias entre las medianas son estadísticamente significativas ($p=0.04211$) (Tabla 11). Estos resultados fueron apoyados con una prueba pareada de Mann Whitney, en donde se determinó que la densidad tres fue significativamente menor en comparación con las densidades uno y dos (Tabla 12). Además, esto es corroborado con lo observado en la figura 15.

Tabla 12. Prueba pareada de Mann-Whitney

	Densidad 1	Densidad 2	Densidad 3
Densidad 1		1	0.03025
Densidad 2	1		0.6814
Densidad 3	0.03025	0.6814	

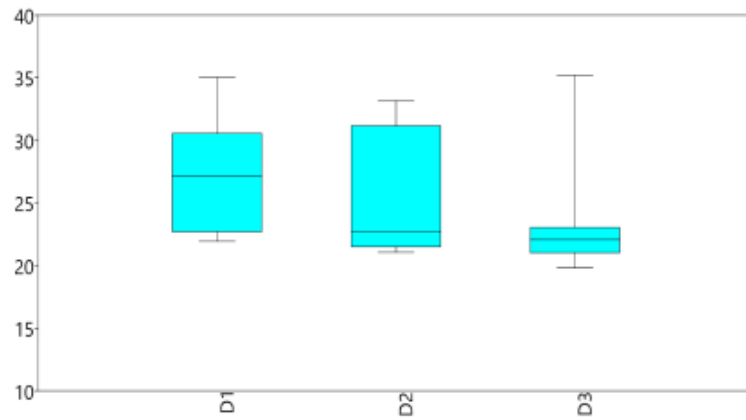


Fig 14. Gráfico de medianas de los ciclos amplificados (CT) para cada una de las densidades (D1=1pez, D2=3 peces, D3=6 peces) obtenido mediante la prueba Kruskal-Wallis (se tomaron en consideración todos los datos).

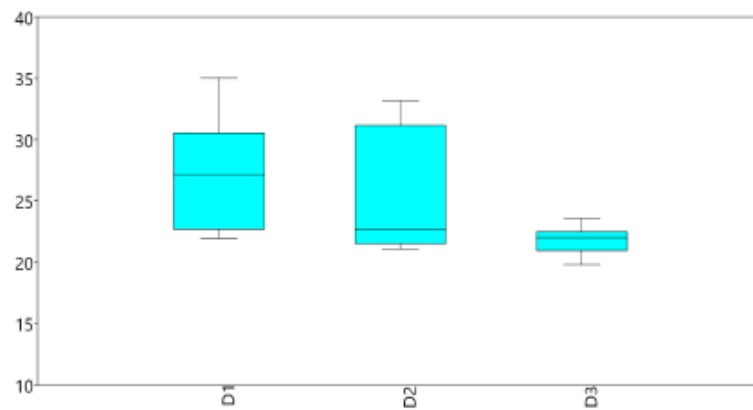


Fig 15. Gráfico de medianas de los ciclos amplificados (CT) para cada una de las densidades (D1=1pez, D2=3 peces, D3=6 peces) obtenido mediante la prueba Kruskal-Wallis (se eliminó un dato CT (35.2) de la densidad 3)

CAPITULO IV

DISCUSIÓN

1. Caracterización molecular de las especies de *Oreochromis spp.*

La caracterización genética de los individuos colectados fue realizada mediante la metodología del código de barras del ADN, que consistió en la secuenciación de la región del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I de aproximadamente 650 pares de bases. Se analizaron un total de 58 secuencias, cuyas especies identificadas y comparadas con las secuencias de referencia de la base de datos GenBank fueron *O. niloticus*, *O. mossambicus*, *O. aureus*, *O. urolepis hornorun* y el híbrido de *O. niloticus* y *O. aureus*.

Es importante mencionar que este ha sido el primer estudio en cuanto a la identificación molecular de las tilapias presentes en los lagos estudiados en Panamá y sus resultados son consistentes con los estudios taxonómicos realizados por Morales 1995, mostrando así que la técnica de código de barras de ADN en la identificación de especies es efectiva (Hebert *et al.*, 2003).

Según Panprommin *et al.*, (2018), las especies de la familia Cichlidae presentan características similares, por lo que es muy difícil identificarlas. Debido a que existen más de 1000 especies de cíclidos en los trópicos, su identificación es un gran desafío taxonómico, por lo que es de gran ayuda la utilización de herramientas moleculares (Berra 2001). Un estudio en el que se realizó la identificación de especies de los géneros

Oreochromis sp y *Coptodon sp*, mediante tres técnicas moleculares (código de barras, enzimas de restricción y análisis de fusión de alta resolución) determinó que la identificación de estas especies por el código de barras es necesaria, ya que la secuenciación directa de nucleótidos del gen COI fue el método más exacto (Panprommin *et al.*, 2018).

Diversos estudios para la identificación molecular de especies de peces han sido realizados mediante la técnica de código de barras del ADN, los cuales corroboran la eficacia de este método. Por ejemplo, Ordoñez *et al.*, (2017) sugieren que este método no solo se puede usar en la identificación molecular de especies, sino también para la detección de los stocks de peces del género *Oreochromis sp* que se utilizan para la acuicultura contribuyendo así a futuros programas de mejoramiento genético.

2. Diversidad genética de *Oreochromis niloticus*

La tilapia nilótica (*O. niloticus*) es una especie invasora originaria de ecosistemas de agua dulce del continente africano. Después de las introducciones realizadas en sistemas acuáticos de Panamá, es de gran interés comprender la diversidad genética de estas especies, ya que son de gran importancia para el futuro desarrollo de la acuicultura, conservación de especies nativas y en peligro de extinción, y para hacer inferencias biogeográficas (Hassanien & Gilbey 2005). Sin embargo, poco se sabe sobre la diversidad genética de poblaciones de *O. niloticus* en sistemas acuáticos de agua dulce (Agnese *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos de diversidad genética con el marcador mitocondrial Citocromo Oxidasa I mostraron que las poblaciones estudiadas de *O. niloticus* presentaron bajos niveles de diversidad haplotípica ($H_d=0.059$) y nucleotídica ($\pi=0.00010$). Por lo tanto, es probable que esto se deba a eventos de selección ocurridos luego de su introducción, como por ejemplo efectos fundadores y cuellos de botella poblacionales ocurridos en las primeras etapas de la introducción (Vidal *et al.*, 2010). Keskin *et al.*, (2013) presentaron resultados similares de baja diversidad genética con la especie invasora *Gambusia holbrooki*, probablemente fue debido a efectos de cuello de botella que sufrió la población recientemente.

Según Wu & Yang (2012), en la identificación de especies de *Oreochromis spp* en captura y en el ambiente se determinó que posiblemente la baja diversidad genética se deba a la endogamia y al número limitado de poblaciones fundadoras. Además, Wu & Yang 2012 mencionaron que el cuello botella se da comúnmente en la acuicultura debido a la falta de registros genealógicos. Otro estudio realizado por Agienda *et al.*, (2011) en poblaciones de *O. niloticus* con marcadores microsatélites, mostró que existía una baja diversidad genética, probablemente debido a cuellos de botella o tamaños efectivos más pequeños (Nei *et al.*, 1975).

Estudios similares de diversidad genética realizados en el 2006 en el lago Bayano, donde se utilizaron marcadores moleculares de ADN mitocondrial (PCR-RFLP) y nuclear (microsatélites), mostraron que las poblaciones de *O. niloticus* presentaron una diversidad genética moderada para ambos marcadores de ADN (Díaz-Ferguson *et al.*, EN PRENSA). Los resultados obtenidos con el marcador de ADN mitocondrial PCR-RFLP mostraron que

posiblemente debido a la sobrepesca exista una baja diversidad genética, por lo que se sugirió establecer planes de manejo y conservación (Diaz-Ferguson *et al.*, EN PRENSA).

Hausen *et al.*, (2002), determinaron mediante marcadores microsatélites que la sobrepesca afecta la diversidad genética de peces como el pargo, reduciendo el tamaño efectivo de la población (N_e), que resulta en la pérdida de la variabilidad genética, llevando a una menor adaptabilidad, persistencia de la población y productividad.

Prueba de neutralidad y distribución mismatch

Los valores de baja diversidad genética obtenidos en este estudio son consistentes con los análisis del test de neutralidad, cuyos resultados sugieren un posible cuello de botella en las poblaciones de *O. niloticus*. Los resultados obtenidos mediante éste test indicaron valores negativos y no significativos para la D de Tajima ($D=-1.1378$) y la F_s de Fu ($F_s=-1.315$), los cuales plantean que la población se encuentra en equilibrio neutral y demográfico. Además, existe evidencia de selección de barrido que consiste en el rápido aumento en la frecuencia por selección natural de un alelo inicialmente raro que también corrige (o casi corrige) los alelos en loci estrechamente vinculados, por lo que reduce la variación genética en una región de un cromosoma (Allendorf & Luikart 2007).

Para corroborar esto, se realizó un análisis de distribución mismatch que mostró que posiblemente debido a que hubo acontecimientos históricos diferentes, se cree que ocurrió un proceso de disminución del tamaño poblacional (aparente cuello de botella). Por lo tanto, los eventos de colonización están dados por cuellos de botella debido al pequeño tamaño de las poblaciones y a la vez estos cuellos de botella fortalecen la deriva genética que conduce a la pérdida de la diversidad genética de las especies posiblemente

magnificada por el efecto fundador característico de poblaciones de invasores (Agnese *et al.*, 1997).

A pesar que las poblaciones de *O. niloticus* estudiadas presentaron una baja diversidad genética, posiblemente causada por un efecto fundador y cuellos de botella históricos; mantienen un alto éxito de invasión y colonización. Esto puede explicarse por la paradoja genética que es un dilema en las invasiones biológicas y nos lleva a la pregunta ¿Cómo las poblaciones fundadoras superan la baja diversidad genética y potencial evolutivo bajo esperado, típicamente asociado con el riesgo de extinción para establecerse fuera de su rango nativo? (Roman & Darling 2007).

Una de las explicaciones del éxito de invasión de *O. niloticus* puede deberse a las características biológicas y fisiológicas que presenta, tales como su amplia tolerancia ambiental, alta tasa de reproducción, rápido crecimiento de la población y facilidad de cultivo. Se caracterizan por el desove múltiple y el cuidado parental, y su alto nivel de competencia con otras especies (Agostinho *et al.*, 2007). También es probable que a lo largo de la historia de esta invasión se hayan dado múltiples introducciones que no han sido documentadas.

Por otro lado, Allendorf & Lundquist (2003) argumentan que algunas especies pueden ser intrínsecamente mejores competidores porque evolucionaron de una manera más competitiva en el ambiente. También explican que la ausencia de enemigos proporciona para las especies invasoras más recursos disponibles para el crecimiento y la reproducción y por lo tanto les permite competir con las especies nativas.

Conectividad y flujo genético

El coeficiente de diferenciación genética ($F_{st}=0.07$) mostró que existe flujo genético entre las poblaciones de *O. niloticus* de los lagos Gatún y Bayano, ya que existe una baja diferenciación genética entre las dos poblaciones. Los resultados son consistentes con el análisis de varianza molecular, cuyo resultado mostró que las diferencias se dieron dentro de las poblaciones (92.74%) y no entre las poblaciones del Lago Gatún y el Lago Bayano (7.26%), esto sugiere que se trata de una sola población.

A pesar del aislamiento que estas poblaciones presentan, es probable que los individuos fundadores de esta población provengan de una misma línea o ancestro común. Debido al tiempo de las introducciones realizadas en ambos lagos, los datos obtenidos sugieren que la primera introducción de *O. niloticus* fue en el lago Gatún en los años 70 y después en el lago Bayano en los años 90 (Morales 1995). Por lo tanto, esto indica que no existe evidencia de recientes introducciones.

Estos resultados son consistentes con estudios realizados por Swain *et al.*, 2014 que mencionan que la baja diferenciación genética observada entre las poblaciones ribereñas peninsulares de *Labeo fimbriatus* puede deberse al conjunto de genes compartidos a nivel ancestral o al flujo de genes entre las poblaciones a través de eventos naturales o intervención antropológica. Sin embargo, Ward *et al.*, (1994) mencionaron que los peces de agua dulce tienden a exhibir niveles más altos de diferenciación genética y subdivisión entre las poblaciones que las que habitan en ambientes marinos o estuarinos.

Por ejemplo, estudios realizados por Angienda *et al.*, 2011 con poblaciones de las especies *O. esculentus* y *O. niloticus* mediante marcadores de ADN mitocondrial (región control) y nuclear (microsatélites), mostraron que existía una alta diferenciación genética

para las poblaciones de las especies antes mencionadas (Valores FST para el ADN mitocondrial entre las poblaciones de las especies estudiadas fue de 0.177 a 0.287; Valores FST para microsatélites fue de 0.02 a 0.069 para *O. niloticus* y 0.057 para *O. esculentus*), probablemente por el aislamiento geográfico de los sistemas de agua dulce estudiados y por las distintas propiedades ecofisiológicas que estos presentan.

Relaciones filogenéticas de las poblaciones de *Oreochromis* sp estudiadas

En este estudio, el árbol filogenético construido a partir de las secuencias obtenidas y las secuencias de referencia de Genbank, mostraron la separación de estas en tres grupos. Las poblaciones de *O. niloticus* de los lagos Gatún y Bayano formaron el primer grupo, la población de *O. aureus* del lago Barrigón formó el segundo grupo y las poblaciones de *O. mossambicus* de los lagos Alajucla y Bayano formaron el tercer grupo; indicando que son especies genéticamente diferentes.

Según Nagl *et al.*, (2001), la divergencia entre los tres grupos de *O. niloticus*, *O. aureus* y *O. mossambicus* es suficiente para distinguir a cada grupo como una especie separada en base a su linaje mitocondrial. Se utilizó como grupo externo a la especie *Coptodon rendalli* anteriormente incluida en el género *Tilapia* (Dunz & Schliewen 2013; Nelson *et al.*, 2016). El género *Coptodon* fue separado del género *Tilapia* por Dunz & Schliewen (2013) basado en morfología, etología y datos moleculares.

En el árbol se puede observar que las especies *O. niloticus* y *O. aureus* se encuentran más cercanas entre sí, es decir que presentan similitudes genéticas. Rashed *et al.*, (2011) realizaron la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre cuatro especies de tilapias (*O. aureus*, *O. niloticus*, *S. galilaeus* y *T. zillii*) mediante RAPD y sus resultados

fueron consistentes con estos datos, ya que *O. niloticus* y *O. aureus* presentan altos valores de similitud genética.

Rognon & Guyomard (2003) mencionan que las relaciones filogenéticas entre *O. niloticus* y *O. aureus* puede deberse a una introgresión que se refiere al intercambio de alelos a través de la hibridación y retrocruzamiento entre taxones distintos (Anderson 1949) incluidas especies (Larson *et al.*, 2014) y subespecies (Sullivan *et al.*, 2014) que puede conducir a la incongruencia entre genealogías de genes y producir alelos estrechamente relacionados entre los distintos taxones. Aunque esta introgresión podría ser antigua y su ocurrencia o persistencia en los últimos años es consistente con la falta de diferenciación entre las secuencias mitocondriales entre estas especies (Rognon & Guyomard 2003).

Además, posiblemente la hibridación del individuo encontrado en el lago Alajuela (*O. niloticus* x *O. aureus*), puede deberse a que estas especies antes de ser separadas compartían haplotipos en común. Según Agnése (1997), hay dos hipótesis que sugieren que haya hibridación entre estas dos especies. En primer lugar, este haplotipo puede ser un haplotipo ancestral que existía antes que las dos especies se separaran. En segundo lugar, el ADN mitocondrial de una especie podría haber sido establecido en el ADN del otro. En adición, la hibridación entre estas dos especies podría deberse a la combinación de características intrínsecas tales como la fertilización y la especificidad gamética (Campton 1987).

Por otro lado, de acuerdo a las comparaciones de las secuencias obtenidas con las secuencias de referencia provenientes de Genbank, se muestra que la especie *O. niloticus* comparte haplotipos con individuos identificados mediante COI en México (Valdez-Moreno *et al.*, 2009). Otro estudio indica que la tilapia del Nilo originaria de África fue

introducida del sureste de los Estados Unidos a lo largo de tierras bajas costeras de México y Centroamérica (Zambrano 2006).

La especie *O. aureus* comparte haplotipos con los individuos de la especies identificada en Filipinas (Ordoñez *et al.*, 2017). Y la especie *O. mossambicus* comparten haplotipos con los de Israel (Shirak *et al.*, 2009), cuya introducción fue en Estados Unidos gracias al negocio de los acuarios y al comercio acuícola, y fue lanzada accidental o intencionalmente a las vías fluviales de Texas, Florida y Alabama (Whiteside 1975, Lee *et al.*, 1980). Es importante mencionar que en Panamá no se tienen registros de las líneas genéticas de estas especies que actualmente se encuentran presentes en los lagos estudiados.

3. Detección de ADN ambiental mediante PCR en tiempo real

El conocimiento de la distribución de especies es importante para el manejo ecológico y la biología de la conservación, y se requiere en muchos casos de la detección de poblaciones que se encuentran en bajas densidades (Rees *et al.*, 2014). Actualmente, se ha desarrollado la técnica de detección del ADN ambiental que consiste en la detección de fragmentos cortos de diferentes especies. Esta técnica permite el monitoreo de especies como las invasoras acuáticas debido a que tiene la ventaja de una mayor sensibilidad y bajos costos con respecto a los métodos tradicionales (Rees *et al.*, 2014).

En este estudio se desarrolló una sonda interna y cebadores especie-específicos, los cuales fueron probados para la detección de ADN ambiental de la especie invasora *O. niloticus* (muestras obtenidas de ensayos controlados), mediante la técnica de PCR en tiempo real. Como estudio pionero, el fin de la realización de esta técnica es proporcionar

una herramienta eficaz y de bajo costo para el monitoreo constante de especies invasoras presentes en los lagos de la República de Panamá para desarrollar futuros planes de manejo.

Límite mínimo de detección de ADN ambiental

Los resultados obtenidos mediante la técnica de PCR en tiempo real mostraron que el límite mínimo de detección de ADN para las muestras amplificadas fue de 0.0025 ng/μL. Díaz-Ferguson *et al.*, (2014) establecieron que el límite mínimo de detección de ADN fue de 0.0002 ng/μL para la especie *Hemichromis letourneuxi*. Los resultados obtenidos a partir de ensayos controlados determinaron la sensibilidad y precisión de la PCR en tiempo real como método de detección de ADN ambiental (Díaz-Ferguson *et al.*, 2014).

Otros estudios realizados determinaron la detección de ADN ambiental a concentraciones tan bajas de 0.5 copias/μL de las especies *Salvelinus fontinalis* (trucha) y *S. confluentus* (trucha) (Wilcox *et al.*, 2013), en donde confirmaron que la PCR en tiempo real es más sensible que la PCR tradicional. Xia *et al.*, (2018) mencionan que el límite mínimo de detección de ADN de la especie invasora *Limnoperna fortunei* (bivalvo) varió ampliamente con rangos de 4×10^{-2} a 4×10^{-6} ng del ADN genómico total.

Especificidad de la sonda y los cebadores especie-específicos

Se determinó que hubo especificidad de la sonda y los cebadores diseñados para la detección de la especie *O. niloticus*, ya que todas las muestras de ADN ambiental obtenidas mediante ensayos controlados amplificaron eficazmente, es decir sus amplificación estuvieron por encima del ciclo umbral (0.00159). Mientras que los negativos o muestras sin ADN de tilapia no amplificaron.

Según Xia *et al.*, (2018) la capacidad de un par de cebadores para detectar especies en muestras ambientales fue influenciado por su límite de detección, esto indica que los cebadores pueden ser muy sensibles para fines de detección. Amberg *et al.*, (2015) mencionan que los métodos de PCR cuantitativa basada en sondas (qPCR) se han utilizado para la detección de una sola especie debido a una mejor sensibilidad, especificidad y capacidad para cuantificar el ADN ambiental en la muestra.

Prueba de detección en muestras de ADN ambiental de ensayos controlados mediante PCR en tiempo real

Las detección de las muestras de ADN ambiental de *O. niloticus* obtenidas a partir de ensayos controlados en acuarios fue eficiente, ya que todas estas muestras divididas en distintas densidades (1, 2 y 3) amplificaron eficazmente. Se observó que las muestras de la densidad 2 (3 peces) del día uno y la densidad 3 (6 peces) de los día cuatro y siete requirieron menores ciclos de amplificación (21.00 y 22.81), lo que indica que presentan mayores cantidades de ADN. Según Wilcox *et al.*, (2013) los valores más bajos de CT son inversamente proporcionales a la cantidad de ADN ambiental en una muestra particular.

Mediante una prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis, tomando en consideración todos los valores CT, se determinó que no existen diferencias significativas en las medianas de los CT en función de las densidades ($p=0.14$) (Tabla 11). Aunque se puede observar descriptivamente una tendencia de que las muestras son significativamente diferentes (Fig 14). Probablemente los resultados obtenidos muestran ser no significativos, ya que un valor CT de la densidad tres del día uno (35.2), fue relativamente alto en comparación con los demás valores CT de dicha densidad.

Posiblemente este valor se deba a que en el momento de los muestreos de los ensayos controlados, los animales se encontraban en condiciones de estrés, liberando mayor cantidad de excretas. Por lo tanto, se decidió eliminar este dato y realizar la prueba nuevamente, en donde los resultados sí mostraron diferencias significativas tanto estadísticamente ($p=0.04$) (Tabla 11) como descriptivamente (Fig 15).

Es por esta razón que se determinó que existen diferencias significativas entre las medianas de las muestras, siendo la densidad 3 significativamente menor que las otras densidades en función de los CT ($p=0.03$) (Tabla 11). Estos resultados pueden ser corroborados descriptivamente donde se observa claramente que los CT de la densidad 3 son significativos (Fig. 15) y son consistentes con los resultados obtenidos por Díaz-Ferguson *et al.*, (2014) que mostraron una relación negativa y significativa entre los CT y las densidades.

Es decir, que probablemente los ciclos amplificados de la densidad 3 garantizarán la detección de ADN ambiental en ecosistemas de aguas de manera más confiable y efectiva que los CT de las otras densidades, ya que a CT más bajos la concentración de ADN es más alta (Wilcox *et al.*, 2013). Además, la densidad de individuos de la especie objetivo también influye en la dinámica de la detección del ADN en muestras de agua (Dejean *et al.*, 2011).

Estos resultados demuestran que las sondas y cebadores especie-específicos diseñadas son eficientes para la detección de ADN ambiental en los ecosistemas naturales incluso a bajas densidades. Díaz-Ferguson *et al.*, (2014) obtuvieron resultados similares, en los cuales las densidades de tres y seis peces presentaron ciclos de amplificación de 26.29 y 24.33 respectivamente *Hemichromis letourneuxi*. En este sentido la detección de

tilapia del Nilo en bajas concentraciones garantizaría la detección temprana. Según Vander Zanden *et al.*, (2010) la detección temprana de ADN ambiental facilita el control y erradicación de especies invasoras de forma más efectiva.

Las concentraciones aproximadas de ADN ambiental de las distintas muestras fueron calculadas en base a los ciclos de amplificación en función de la cantidad de ADN de la curva estándar. Según Wilcox *et al.*, (2013) un valor de CT se puede usar para medir la cantidad relativa de la muestra de ADN ambiental objetivo en la reacción de qPCR. De esta forma, el rango de concentración de ADN para las muestras amplificadas podría encontrarse entre 1 ng/ μ L a 0.0025 ng/ μ L. Es, decir que todas las muestras (excepto los controles negativos) fueron positivas para la prueba de presencia/ausencia, ya que sus ciclos de amplificación estuvieron entre 21 y 30.32 los cuales se consideran ciclos de amplificación deseables para la detección de ADN ambiental (Tabla 10).

En las muestras obtenidas para la prueba de persistencia, los ciclos de amplificación estuvieron entre 32.99 y 33.73. Es probable que estas muestras contengan una cantidad mínima de ADN ambiental, lo que podría indicar que aún después de varios días se puede detectar ADN a partir de ADN degradado. Ardura *et al.*, (2015) mencionan que esto es muy importante en la detección de especies, porque los fragmentos cortos de ADN pueden persistir en el ambiente durante un tiempo relativamente largo. Por ejemplo, fragmentos de ADN de aproximadamente 400 pb persisten hasta una semana a 18°C en ecosistemas acuáticos naturales (Matsui *et al.*, 2001).

En la prueba de persistencia, las muestras de ADN ambiental colectadas siete días después de la extracción de los individuos de *O. niloticus*, se determinó que el tiempo aproximado de detección para el ADN ambiental de esta especie fue de siete días. Por lo

tanto, es probable que el ADN se haya degradado con el tiempo debido a altas temperaturas (29°C). Las características ambientales abióticas influyen en la degradación del ADN ambiental a través de una variedad de mecanismos. Por ejemplo, temperaturas más altas aumentan directamente la degradación del ADN por desnaturalización de las moléculas del ADN (Fu *et al.*, 2012).

Mediante un estudio de persistencia con la especie *Lithobates catesbeianus* (rana toro), se determinó que la temperatura tuvo en efecto mayor sobre la degradación del ADN en comparación con los demás parámetros analizados (rayos UV y pH). El estudio consistió en tres tratamientos a distintas temperaturas (5°C, 25°C y 35°C) por un tiempo de 58 días. La concentración del ADN ambiental fue similar al inicio del experimento para todas las temperaturas. Pero luego de diez días se empezó a degradar el ADN a temperaturas de 25°C y 35°C, aunque el ADN permaneció detectable por los 58 días en algunos tratamientos (Strickler *et al.*, 2015).

Por lo tanto, esto indica que a bajas temperaturas el crecimiento microbiano fue menor, lo que podría haber retardado el proceso de degradación del ADN ambiental. Estos resultados proporcionan clara evidencia que las bajas temperaturas alargan la persistencia del ADN ambiental en agua dulce y que la temperatura está influenciada por la radiación UV y el pH (Strickler *et al.*, 2015).

Otro estudio realizado con salamandras en diferentes condiciones de temperaturas y luz (exposición al sol, exposición a la sombra y refrigeración), mostró que después de tres días se detectó la degradación del ADN ambiental para las muestras expuestas al sol, para las muestras sombreadas después de 11 días y para las muestras refrigeradas después de 18 días (Pilliod *et al.*, 2014). Mediante estos estudios se ha considerado que los factores

ambientales como temperatura, pH, conductividad y la composición de la comunidad microbiana pueden influir en la degradación del ADN ambiental (Barnes *et al.*, 2014).

Este estudio puede contribuir al desarrollo de programas de monitoreo de poblaciones de especies invasoras y de esta forma determinar su distribución, ya que puede ser desarrollado en otros sistemas lenticos y loticos de la República de Panamá. Por lo tanto, al ser el primer estudio realizado con esta técnica (qPCR), funcionará como estudio piloto para la detección de ADN ambiental de otras especies invasoras.

CONCLUSIONES

Diversidad genética de *O. niloticus*

Se identificaron molecularmente mediante COI las especies de *O. niloticus*, *O. aureus*, *O. mossambicus*, *O. urolepis h* y *Coptodon rendalli* en los diferentes sitios muestreados, por lo tanto el gen COI es efectivo en la identificación de especies de peces.

La población de *O. niloticus* estudiada en los lagos Gatún y Bayano, presentó una baja diversidad haplotípica y nucleotídica. La prueba de neutralidad indicó que es probable que la población de *O. niloticus* se encuentra en equilibrio neutral y demográfico e indica que es probable que pasaron por un cuello de botella y un efecto fundador.

Las poblaciones de *O. niloticus* presentaron una muy baja diferenciación genética, es decir que la especie no presenta una estructura poblacional y el análisis de AMOVA indicó que el porcentaje de variación se dio dentro de las poblaciones y no entre poblaciones, por lo que se puede tratar de una sola población.

El dendrograma NJ separó claramente las especies del género *Oreochromis* usando como referencia las secuencias depositadas en GenBank y como grupo externo a la especie *Coptodon rendalli*. Las especies *O. niloticus* y *O. aureus* probablemente pasaron por una introgresión de *O. aureus* a *O. niloticus* en la antigüedad.

Detección de ADN ambiental de *O. niloticus*

La sonda y los cebadores especies-específicos fueron efectivos, ya que las muestras de ADN ambiental amplificaron eficazmente y el límite mínimo de detección fue de 0.0025 ng/ μ L. Además, se determinó que las densidades 2 (3 peces) del día uno y 3 (6 peces) de los días cuatro y siete presentaron amplificaciones entre 21 y 22. 81 ciclos. Para la prueba de presencia ausencia todas las muestras fueron positivas (excepto los negativos). Incluso, las muestras de ADN ambiental del día uno amplificó eficientemente, lo que indica que la sonda detecta específicamente el ADN de la especie objetivo aun en bajas densidades.

Las muestras para la prueba de persistencia también amplificaron de forma positiva, aunque a ciclos entre 32.99 y 33.73, indicativo de que las concentraciones de ADN ambiental pueden ser muy bajas debido al tiempo transcurrido en que el agua quedó expuesto a temperatura ambiente después de terminado el experimento.

En conclusión, la detección de ADN ambiental mediante sondas TaqMan para la especie invasora *O. niloticus* es muy sensible y efectiva, por lo que este estudio se puede considerar como estudio piloto para la detección temprana de especies invasoras y funciona como una herramienta útil para el monitoreo de estas especies, contribuyendo así al desarrollo de planes de manejo que ayuden en la gestión del control de invasiones biológicas, no solo de la especie *O. niloticus*, sino de otras especies invasoras presentes en la República de Panamá, permitiendo medidas de respuesta más rápida y eficiente.

RECOMENDACIONES

Para el análisis de diversidad genética se recomienda aumentar el número de sitios de muestreo para determinar la presencia de *Oreochromis sp* y el número de individuos muestreados (de ser posible) considerando un análisis previo de número de individuos (censo). También se recomienda utilizar marcadores nucleares con mayor variabilidad como SNPs y microsatélites para evaluar el tamaño efectivo de poblaciones de *O. niloticus*. Se recomienda realizar análisis desde el punto de vista de genética cuantitativa para evaluar la heredabilidad de los caracteres comercialmente deseable en las tilapias y realizar estudios genéticos para conocer la existencia de endogamia en las poblaciones de tilapias.

Para pruebas de detección de ADN ambiental se recomienda realizar más pruebas de qPCR hasta lograr optimizar la técnica TaqMan completamente y también realizar pruebas a la sonda TaqMan y a los cebadores especie-específicos con especies hermanas de *O. niloticus* para evitar falsos positivos. Se recomienda realizar detecciones por qPCR en los ecosistemas acuáticos para determinar la distribución y la abundancia de la especie *O. niloticus* en distintos sistemas lenticos de la República de Panamá. Y realizar cálculos exactos de las concentraciones de ADN de esta especie con las muestras ambientales obtenidas por ensayos controlados y las muestras ambientales de los ecosistemas acuáticos de Panamá.

GLOSARIO

ADN (ácido desoxirribonucleico): Largo polímero lineal, compuesto de cuatro tipos de nucleótidos de desoxirribosa, que es el portador de la información genética. En su estado nativo, el ADN es una doble hélice de dos hebras antiparalelas mantenidas juntas mediante enlaces de hidrógeno entre bases de purina y pirimidina complementarias.

ADN ambiental: Tecnología que permite la detección de cantidades trazas de ADN a partir de muestras de agua. Tiene aplicaciones en ecología, genética de la conservación, monitoreo y salud ecosistémica.

ADN genómico: Todas las secuencias de ADN que componen el genoma de una célula o de un organismo.

Alelo: Una de dos o más formas alternativas de un gen. Las células diploides contienen dos alelos de cada gen, localizados en el sitio correspondiente (locus) sobre cromosomas homólogos.

Biología molecular: Rama de la biología que tiene como objetivo el estudio de los procesos que se desarrollan en los seres vivos desde un punto de vista molecular.

Cebador (primer): Secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'-hidroxilo libre que forma pares de bases con una hebra molde complementaria y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

Código de barras: Secuencia corta de ADN que puede ser utilizada para identificar inequívocamente una especie e incluso separar a esta entre congéneres y taxas los cuales están cercanamente relacionados.

Conectividad genética: Intercambio de genes entre poblaciones. Los principales agentes de la conectividad son la migración y la dispersión larval.

Cuello de botella: Un caso especial de fuerte deriva genética en el que una población experimenta una pérdida de variación genética pasando temporalmente por una marcada reducción en el tamaño efectivo de la población. En demografía, una reducción transitoria severa en el tamaño de la población.

Diversidad genética: Medida de la variación genética (a nivel de genes) de una especie o población.

Diversidad haplotípica: Medida de la frecuencia de un determinado haplotipo en la población.

Diversidad nucleotídica: Medida de polimorfismo de una secuencia de ADN. Consiste en el promedio de diferencias en nucleótidos por sitio entre dos secuencias de ADN.

Efecto fundador: Una pérdida de variación genética en una población que fue establecida por un pequeño número de individuos que solo transportan una fracción de la diversidad genética original de una población más grande. Un caso especial de deriva genética.

Endogamia: Es la producción de descendencia mediante el apareamiento o crianza de individuos u organismos que están estrechamente relacionados genéticamente

Especie exótica: Es una especie no nativa del lugar o del área en que se la considera introducida, y ha sido accidental o deliberadamente transportados a una nueva ubicación por las actividades humanas.

Especie invasora: Animales, plantas u otros organismos que se desarrollan fuera de su área de distribución natural, en hábitats que no le son propios o con una abundancia inusual, produciendo alteraciones en la riqueza y diversidad de los ecosistemas.

Estructura genética: Cantidad y distribución de la variación genética presente en la misma. El conjunto de genes de una población recibe el nombre de pool génico. La estructura genética de una población se expresa en términos de frecuencias de esos alelos (frecuencias génicas) y, consecuentemente, genotípicas. La variabilidad está determinada por el número y la frecuencia de los distintos alelos del conjunto de genes de una población.

Gen: Es una unidad de información en un locus de ácido desoxirribonucleico (ADN) que codifica un producto funcional, o Ácido ribonucleico (ARN) o proteínas y es la unidad de herencia molecular.

Genoma: Toda la información genética transportada por una célula o un organismo.

Genotipo: Constitución genética completa de una célula individual u organismo, en la que generalmente se destacan alelos particulares en uno o más locus específicos.

Haplotipo: arreglo único de nucleótidos de una secuencia de ADN que identifica a un individuo.

Hibridación: Proceso de transferencia de genes entre especies distintas pero genéticamente compatibles.

Introgresión: La incorporación de genes de una población a otra a través de la hibridación que da como resultado una descendencia fértil que hibrida aún más y retrocruce a poblaciones parentales.

PCR (reacción en cadena de la polimerasa): Técnica para amplificar un segmento específico de ADN en una mezcla compleja mediante múltiples ciclos de síntesis de ADN

a partir de oligonucleótidos cebadores cortos, seguidos por un breve tratamiento con calor para separar las hebras complementarias.

Polimorfismo: hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen. Es decir, un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población.

Sonda de ADN: Molécula o secuencia utilizada para identificar inequívocamente un gen, su copia o la proteína que este codifica.

Fuente: (Díaz-Ferguson 2012; Lodish *et al.*, 2013, Allendorf & Luikart 2007).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abumourad, I. M. K. (2011). Cytochrome C Oxidase Sub-unit 1 (COX1) Gene in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Its Cloning and Characterization. International Journal of Genetic Engineering 1 (1):1-5.

Angienda, P. O., Lee, H. J., Elmer, K. R., Abila, R., Waindi, E. N., & Meyer, A. (2011). Genetic structure and gene flow in an endangered native tilapia fish (*Oreochromis esculentus*) compared to invasive Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in Yala swamp, East Africa. Conservation genetics, 12(1), 243-255.

Agostinho, A. A., Gomes, L. C., & Pelicice, F. M. (2007). Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil.

Agnèse, J. F., Adépo-Gourène, B., Abban, E. K., & Fermon, Y. (1997). Genetic differentiation among natural populations of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). Heredity, 79(1), 88.

Allendorf, F. W., & Lundquist, L. L. (2003). Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species. Conservation Biology, 17(1), 24-30.

Allendorf F.W, Leary R.F, Hitt N.P, Knudsen K.L & Lundquist L.L, *et al.* (2004). Intercrosses and the US Endangered Species Act: Should hybridized populations be included as westslope cutthroat trout? Conserv Biol, 18,1203–1213.

Allendorf, F. W., & Luikart, G. (2007). Conservation and the genetics of populations. John Wiley & Sons.

Ali, B. A. Huang, T. Qin, D. and Wang, X. (2005). A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. Reviews in Fish Biology and Fisheries 14:443-453.

Altschul S. T., Madden A., Schaffer J., Zhang Z., Zhang W. & Miller D. Lipman. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:389-402.

Amberg, J.J., McCalla, S.G., Monroe, E., Lance, R., Baerwaldt, K. & Gaikowski, M.P. (2015) Improving efficiency and reliability of environmental DNA analysis for silver carp. *Journal of Great Lakes Research*, 41, 367–373

Ameen, M. (1999). Development of guiding principles for the prevention of impacts of alien species. In a consultative workshop in advance of the 4th meeting of SBSTTA to the CBD, organized by IUCN Bangladesh at Dhaka on May 25, 1999. Vol. 25.

Anderson E, (1949). Introgressive Hybridization. London: Chapman & Hall. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 95e102.

Anderson E, Hubricht L. (1938). Hybridization in *Tradescantia*. III. The evidence for introgressive hybridization. *Am J Bot* 25:396–402.

Ardura, A., Zaiko, A., Martinez, J. L., Samulioviene, A., Semenova, A., & Garcia-Vazquez, E. (2015). eDNA and specific primers for early detection of invasive species—a case study on the bivalve *Rangia cuneata*, currently spreading in Europe. *Marine Environmental Research*, 112, 48-55.

Arredondo F., J.L. & M. Guzmán-Arroyo. 1986. Actual situación taxonómica de las especies de la Tribu Tilapiini (Pisces: Cichlidae) introducidas en México. *Anales del Instituto de Biología, Serie Zoología, Universidad Nacional Autónoma de México* 56(2): 555-572.

Attayde J.L., Okun N., Brasil J., Menezes R. & Mesquita P. (2007). Da introdução da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, sobre a estrutura trófica dos ecossistemas aquáticos do Bioma Caatinga. *Oecol. Bras.*, 11(3), 450-461.

Ayres RM, Pettigrove VJ, Hoffmann AA. (2010). Low diversity and high levels of population genetic structuring in introduced eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) in the greater Melbourne area, Australia. *Biol Invasions* 12: 3727–3744.

Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental science & technology*, 48(3), 1819-1827.

Beja-Pereira A., Oliveira R., Schwartz M.K. & Luikart G. (2009). Advancing ecological understanding through technological transformation in noninvasive genetics. *Mol Ecol Res* 9, 1279–1301.

Berra TM. (2001). *Freshwater fish distribution*. New York, NY: Academic Press.

Boulenger, G. A. (1897). 4. An Account of the Freshwater Fishes collected in Celebes by Drs. P. & F. Sarasin. In *Proceedings of the Zoological Society of London* (Vol. 65, No. 2, pp. 426-429). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

Bostock, J. McAndrew, B. Richards, R. Jauncey, K. Telfer, T. Lorenzen, K. Little, D. Ross, L. Handisyde, N. Gatward, I. and corner, R. (2010). Aquaculture: Global status and trends. *Philosophical transactions of the Royal Society B* 365:2897-2912.

Brinez, B., Caraballo, X., Salazar, M. (2011). Genetic diversity of six populations of red hybrid tilapia, using microsatellites genetic markers. *Rev. Mvz. Cordoba* 16, 2491e2498.

Bronnenhuber J.E & Wilson C.C. (2013). Combining species-specific COI primers with environmental DNA analysis for targeted detection of rare freshwater species. *Conserv Genet Resour* 5: 971–975.

Campton D. E. (1987). Natural hybridization and introgression in fishes: methods of detection and genetic interpretation. In: *Population Genetics and Fishery Management* (eds Ryman N, Utter FM), pp. 161–192, University of Washington Press, Seattle and London.

Canonical, G. C. Arthington, A. McCrary J. K. and Thieme, M. L. (2005). The effects of Introduced tilapias on native biodiversity. *Aquatic Conservation: Marine and freshwater Ecosystems* 15:463-483.

Caraballo, P. (2009). Efecto de la tilapia *Oreochromis niloticus* sobre la producción pesquera del embalse el Guájaro Atlántico–Colombia. *Rev. MVZ Córdoba*, 14(3), 1796-1802.

Chervinski. (1983). Aquaculture development in Venezuela. Pag: 209-212. In: *Proceedings, First South American Aquaculture Congress*. Recife, Brazil.

Civade R, Dejean T, Valentini A, Roset N, Raymond J-C, Bonin A, *et al.* (2016) Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. *PLoS ONE* 11(6): e0157366. doi:10.1371/journal.pone.0157366.

Climapesca. 2017. Disponible en <http://climapesca.org/2017/05/10/embalse-barrigon/>. Consultado el 20 de abril de 2018.

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(3), 905-922.

Crispo, E. Moore, J-S. Lee-Yaw, J. A. Gray, S. M. and Haller, B. C. (2011). Broken barriers: Human-induced changes in gene flow and introgression in animals: An examination of the ways in which humans increase genetic exchange among populations and species and the consequences for biodiversity. *Bioessays* 33: 508-518.

D'Amato, M.E., M.M. Esterhuyse, B.C.W. van der Waal, D. Brink & F.A.M. Volckaert. 2007. Hybridization and phylogeography of the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* in southern Africa evidenced by mitochondrial and microsatellite DNA genotyping. *Conservation Genetic* 8: 475-488.

Darling J. A, Mahon A. R. (2011). From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environ Res.* 111: 978–988.

Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E. & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biol. Conserv.* 183, 53–63.

De Barro P.J, Liu S.S, Boykin L.M, Dinsdale AB (2011) *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annu Rev Entomol* 56: 1–19.

De Silva, S.S., Subasinghe, R.P., Bartley, D.M., Lowther, A. (2004). Tilapias as alien aquatics in Asia and the Pacific: a review. In: *FAO Fisheries Technical Paper*, No. 453. FAO, Rome.

Dias, J.B. 2006. Impactos Socio-Economicos e Ambientais da Introducao da Tilapia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em Acudes Publicos do Semi-Arido Nordeste, Brasil. MSc Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Norte (PRODEMA-UFRN), Rio Grande do Norte, Brazil.

Díaz-Ferguson, E. E. & Moyer, G. R. (2014). History, applications, methodological issues and perspectives for the use environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *International Journal of Tropical Biology and Conservation*, 62(4), 1273-1284.

Díaz-Ferguson, E., Herod, J., Galvez, J., & Moyer, G. (2014). Development of molecular markers for eDNA detection of the invasive African jewelfish (*Hemichromis letourneuxi*): a new tool for monitoring aquatic invasive species in National Wildlife Refuges. *Management of Biological Invasions*, 5(2), 121-131.

Díaz-Ferguson, E., Hunter, M., & Guzmán, H. M. (2017). Genetic composition and connectivity of the Antillean manatee (*Trichechus manatus manatus*) in Panama. *Aquatic Mammals*, 43(4), 378.

Díaz-Ferguson. (2012). *Introducción a la Ecología Molecular Marina. Aplicaciones y Perspectivas*. Panamá: Universal Books.

Díaz-Ferguson, E., Jordan, O., Gonzalez, M., Quesada, M. & Sanjur, O. EN PRENSA. Genetic characterization of introduced populations of the Nile Tilapia

(Cichlidae: *Oreochromis nilotica*) in the Bayano Lake, Panama: Implications for management and conservation.

Dudu, A., Georgescu, S. E., & Costache, M. (2015). Evaluation of Genetic Diversity in Fish Using Molecular Markers.

Dunz AR, Schliewen UK. 2013. Molecular phylogeny and revised classification of the haplotilapiine cichlid fishes formerly referred to as "Tilapia". Mol Phylogenet Evol. 68:64–80.

Eknath, A. E., Tayamen, M. M., Palada-de Vera, M. S., Danting, J. C., Reyes, R. A., Dionisio, E. E., & Pullin, R. S. 1993. Genetic improvement of farmed tilapias: the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. Aquaculture, 111(1), 171-188.

Eschmeyer, W.N., Ferraris, C.J., Hoang, D. & Long, D.J. (1998). Species of fishes. California Academy of Sciences, Catalog of Fishes. San Francisco, Part I. 25-1820.

ETESA. 2009. Disponible en <http://www.etsa.com.pa/estudios.php?act=mapa>. Consultado el 18 de abril de 2018.

Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular ecology resources, 10(3), 564-567.

Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary bioinformatics, 1, 117693430500100003.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2007). Fisheries and Aquaculture Department. Species Fact Sheets *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758).

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2006). Cultured Aquatic Species Information Programme - *Oreochromis niloticus*. Text by Rakocy, J. E. In FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome.

FAO. (2017). Visión general del sector acuícola nacional: Panamá. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/publications/es>. Consultado el 11 de marzo de 2017.

Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791.

Ficetola G.F, Miaud C, Pompanon F, Taberlet T. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. Biol Lett, 4, 423–425.

Figueredo C.C. & Giani A. (2005). Ecological interactions between Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) and the phytoplanktonic community of the Furnas Reservoir (Brazil). *Freshwater Biology*, 50, 1391-1403.

Firmat, C. Alibert, P. losseau, M. Baroiller, J-F. and Schliewen, U. K. (2013). Successive Invasion- Mediated Interspecific Hybridizations and Population Structure in the Endangered Cichlid *Oreochromis mossambicus*. *Pols One*, 8 (5): e63880.

FishBase (2007). Common names of *Oreochromis niloticus niloticus* Nile tilapia.

Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO). (2012). *FAO yearbook: Fishery and Aquaculture Statistics*. Rome. <http://www.fao.org/fishery/publication/year-books/en>.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.

Fu, X. H., Wang, L., Le, Y. Q., & Hu, J. J. (2012). Persistence and renaturation efficiency of thermally treated waste recombinant DNA in defined aquatic microcosms. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(13), 1975-1983.

Fu, Y.X., Li, W.H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133:693-709.

Freeland, J.R. (2005). *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Frézal, L., & Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 727-736

Goldberg, C. S., Strickler, K. M., & Pilliod, D. S. (2015). Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 183, 1-3.

Goldberg, C.S., Pilliod, D.S., Arkle, R.S. & Waits, L.P. (2011). Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PLoS One* 6, e22746.

Grammer, G.L., Slack, W.T., Peterson, M.S., Dugo, M.A. (2012). Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) establishment in temperate Mississippi, USA: multi-year survival confirmed by otolith ages. *Aquat. Invasions* 7, 367e376.

Gurgel, J.J.S. and Fernando, C.H. (1994) Fisheries in semiarid northeast Brazil with special reference to the role of tilapias. *Internationale Revue der gesamten Hydro-biologie*, 79, 77–94.

Hall T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98

Hammer, Ø. Harper, D.A.T., and P. D. Ryan. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica* 4(1): 9pp

Härer, A., Torres-Dowdall, J., & Meyer, A. (2017). The imperiled fish fauna in the Nicaragua Canal zone. *Conservation Biology*, 31(1), 86-95.

Hassanien, H. A. and Gilbey, J. (2005). Genetic diversity and differentiation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquaculture research* 36:1450-1457.

Hauser, L., Adcock, G. J., Smith, P. J., Ramírez, J. H. B., & Carvalho, G. R. (2002). Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(18), 11742-11747.

He, A., Luo, Y., Yang, H., Liu, L., Li, S., & Wang, C. (2011). Complete mitochondrial DNA sequences of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Blue tilapia (*Oreochromis aureus*): Genome characterization and phylogeny applications. *Molecular biology reports*, 38(3), 2015-2021.

Hebert, P. D N. Ratnasingham, S. and deWaard, J. R. (2003). *Barcoding animal Life: cytochrome c Oxidase 1 subunit 1 divergences among closely related species*, Ontario, Canada. The Royal Society biology letters.

Hernandez, P.A., Graham, C.H., Master, L.L. & Albert, D.L. (2006). The effect of simple size and species characteristics on performance of different species distribution modeling methods. *Ecography* 29, 773–785.

Howard G. (2004). *Invasive Species in Water-Dependent Ecosystems*. WorldFish Center, 22-26.

IBM Corp. Released (2010). *IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0*. Armonk, NY: IBM Corp.

Jerde C.L, Mahon A.R, Chadderton W.L & Lodge D.M. (2011). “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Cons Lett*, 4, 150– 157.

Keskin, E., Ağdamar, S., & Tarkan, A. S. (2013). DNA barcoding common non-native freshwater fish species in Turkey: Low genetic diversity but high population structuring. *Mitochondrial DNA*, 24(3), 276-287.

Kimura M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.

Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.

Kudhongonia, A. W. and Chitamwebwa, D. B. R. (1995). Impact of environmental change, species introductions and environmental interactions on the fish stocks of Lake Victoria. In Pitcher, T. J. And Hart, P. B. J. (Eds). *The impact of species changes in African Lakes*. Great Britain. Chapman and hall.

Larson, E. L., Andrés, J. A., Bogdanowicz, S. M., & Harrison, R. G. (2013). Differential introgression in a mosaic hybrid zone reveals candidate barrier genes. *Evolution*, 67(12), 3653-3661.

Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.

Linnæus, C. (1758). *Systema naturae*, vol. 1. *Systema naturae*, Vol. 1.

Lee D.S., Gilbert C.R., Hocutt C.H., Jenkins R.E., McAllister D.E., and J.R. Stauffer, Jr. (1980). *Atlas of North American Freshwater Fishes*. North Carolina State Museum of Natural History, Raleigh, NC. 854 p.

Loh, W. K. W., P. Bond, K. J. Ashton, D. T. Roberts, and I. R. Tibbetts. (2014). DNA barcoding of freshwater fishes and the development of a quantitative qPCR assay for the species-specific detection and quantification of fish larvae from plankton samples. *J. Fish Biol.* 85:307–328.

Lopes, C. M., Sasso, T., Valentini, A., Dejean, T., Martins, M., Zamudio, K. R., & Haddad, C. F. (2017). eDNA metabarcoding: a promising method for anuran surveys in highly diverse tropical forests. *Molecular Ecology Resources*.

Lunt, D. H., Zhang, D. X., Szymura, J. M., & Hewlitt, O. M. (1996). The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect molecular biology*, 5(3), 153-165.

Mabuchi K., Miya M., Azuma Y. & Nishida M. (2007). Independent evolution of the specialized pharyngeal jaw apparatus in cichlid and labrid fishes. *BMC Evol Biol* 7:10.

Mahon, A. R., Jerde, C. L., Galaska, M., Bergner, J. L., Chadderton, W. L., Lodge, D. M. & Nico, L. G. (2013). Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. *PLoS one*, 8(3), e58316.

Martínez, M. A. S. (2006). Manejo del cultivo de tilapia. Nicaragua, BIDEAUSAID, p15.

Matsui, M., Honjo, M., Kawabata, Z. (2001). Estimation of the fate of dissolved DNA in thermally stratified lake water from the stability of exogenous plasmid DNA.

Maturell, J. C. (1984). Recopilación sobre las características generales y potencial pesquero de los embalses Gatún, Alajuela y Bayano en la República de Panamá. Dirección Nacional de Acuicultura, Ministerio de Desarrollo Agropecuario, Panamá. 8p.

Menescal, R.A. (2002). Efeitos da introducao da tilapia doNilo, *Oreochromis niloticus*, (Linnaeus, 1758) sobre o desembarque pesqueiro no acude Marechal Dutra, Acari, RN. MSc Dissertation, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Brazil, 50 pp.

Moralee, R. P. Van der Bank F. H. Van da Waal B. C. W. (2000). Biochemical genetic markers between between the endemic *Oreochromis mossambicus* and alien species (pisces: Cichlidae). Water SA 26:2c.

Morales, D.A. (1991). La tilapia en México. A.G.T. México. 190p.

Morales, R. (1995). Situación del cultivo de la tilapia en Panamá. Memorias del I Simposium Centroamericano sobre cultivo de tilapia. Ed. PRADEPESCA, INCOPEPESCA, ACUACORPORACION y Universidad Nacional Heredia Costa Rica: 1 - 9.

Morales, D.A. (2003). Biología, Cultivo y Comercialización de tilapia. Ed. AGT Editor México. Primera edición. Pp 201.

Mjoun, K. and Rosentrater, M. (2010). TILAPIA: Profile and Economic Importance. South Dakota: South Dakota Cooperative Extension Service.

Mwanja, W. Kaufman, L. and Fuerst, P. A. (2010). Comparison of the genetic and ecological diversity of the native to the introduced tilapiines (Pisces, Cichlidae) and their population structures in the Lake Victoria region, East Africa. Aquatic Ecosystem Health and Management 13, 4: 442-450.

Nagarajan, M., Raja, M., & Vikram, P. (2016). Genetic characterization of Bagarius species using cytochrome c oxidase I and cytochrome b genes. Mitochondrial DNA Part A, 27(5), 3781-3783.

Nagl, S., Tichy, H., Mayer, W. E., Samonte, I. E., McAndrew, B. J., & Klein, J. (2001). Classification and phylogenetic relationships of African tilapiine fishes inferred from mitochondrial DNA sequences. Molecular phylogenetics and evolution, 20(3), 361-374.

Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3321–3323

Nelson JS, Grande TC, Wilson MVH. (2016). *Fishes of the world*. 5th ed. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons Inc.

Ogutu-Ohwayo R. & Balirwa J.S. 2006. Management challenges of the freshwater fisheries of Africa. *Lakes, Reservoir Research, and Management*, 11, 1-12.

Okun, N., Brasil, J., Attayde, J.L. and Costa, I.A.S. 2008. Omnivory does not prevent trophic cascades in pelagic food webs. *Freshwater Biology* 53, 129–138.

Ordoñez, J. F. F., Ventolero, M. F. H., & Santos, M. D. (2017). Maternal mismatches in farmed tilapia strains (*Oreochromis spp.*) in the Philippines as revealed by mitochondrial COI gene. *Mitochondrial DNA Part A*, 28(4), 526-535.

Pakendorf, B., & Stoneking, M. (2005). Mitochondrial DNA and human evolution. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 6, 165-183.

Panprommin, D., Soontornpravit, K., & Pangeson, T. (2018). Comparison of three molecular methods for species identification of the family Cichlidae in Kwan Phayao, Thailand. *Mitochondrial DNA Part A*, 1-7.

Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2014). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14 (1), 109-116.

Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S. & Waits, L.P. (2013). Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Can. J. Fisheries Aquat. Sci.* 70, 1123–1130.

Pullin, R.S.V. & Capili, J.B. (1988). Genetic improvement of tilapias: problems and prospects. In: R.S.V. Pullin, T. Bhukaswan, K. Tonguthai and J.L. Maclean (Editors), *The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture*, ICLARM Conference Proceedings 15, Department of Fisheries, Bangkok, Thailand, and International Center for Living Aquatic Resources Management, Philippines, pp. 259-266.

Pringle, R. M. (2005). The origins of the Nile perch in Lake Victoria. *AIBS Bulletin*, 55(9), 780-787.

Rashed, M. A., Saad, Y. M., Atta, A. H., & Ahmed, N. E. (2011). Reconstruction of phylogenetic relations among Four Tilapia species. *World Applied Science Journal* (14), 3, 456-462.

Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R., & 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.

Renshaw, M.A., Olds, B.P., Jerde, C.L., McVeigh, M.M. & Lodge, D.M. (2014). The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Mol. Ecol. Res.*

Rican O., Zardoya R. & Doadrio I. (2008). Phylogenetic relationships of Middle American cichlids (Cichlidae, Heroini) based on combined evidence from nuclear genes, mtDNA, and morphology. *Mol Phylogenet Evol* 49:941–957.

Rixon Corrine A.M, Duggan I.C, Bergeron Nathalie M.N, Ricciardi A & Macisaac Hugh J. (2005). Invasion risks posed by the aquarium trade and live fish markets on the Laurentian Great Lakes. *Biodivers Conserv*, 14, 1365-138.

Robins, J.H., Hingston, M., Matisoo-Smith, E. and Ross, H.A. (2007). Identifying *Rattus* species using mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes*. 7, 717–729.

Rodríguez, G.H & García U.G. 2009. Producción de tilapia en invierno en el norte de Sinaloa. *Fundación Produce Sinaloa*. P 9-10.

Rognon, X., & Guyomard, R. (2003). Large extent of mitochondrial DNA transfer from *Oreochromis aureus* to *O. niloticus* in West Africa. *Molecular Ecology*, 12(2), 435-445.

Roman, J., and J. A. Darling. (2007). Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 22:454–464.

Romana-Eguia M.R.R., Ikeda M., Basiao Z.U. & Taniguchi N. (2004). Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture* 236:131–150.

Ryman, N. Uter F & Laikre L. (1995). Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 5: 417-446.

Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Saraste, M., 1990. Structural features of cytochrome oxidase. *Quart. Rev. Biophys.* 23, 331–366.

Sax D.F, Stachowicz J.J, Brown J.H, Bruno J.F & Dawson M.N, *et al.*, (2007). Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends Ecol Evol*, 22, 465–471.

Seehausen, O. (2015), Process and pattern in cichlid radiations – inferences for understanding unusually high rates of evolutionary diversification. *New Phytol*, 207: 304–312.

Shen, Y., J. Kang, W. Chen, and S. He. (2016). DNA barcoding for the identification of common economic aquatic products in Central China and its application for the supervision of the market trade. *Food Control* 61:79–91.

Shirak, A., Cohen-Zinder, M., Barroso, R. M., Seroussi, E., Ron, M., & Hulata, G. (2009). DNA barcoding of Israeli indigenous and introduced cichlids.

Soule ME, Wilcox BA. (1980). *Conservation Biology. An Evolutionary–Ecological Perspective*. Massachusetts, USA: Sinauer Associates.

Strickler, K.M., Fremier, A.K. & Goldberg, C.S. (2015). Quantifying the effects of UV, temperature, and pH on degradation rates of eDNA in aquatic microcosms. *Biol. Conserv.* 183, 85–92.

Sullivan J, Demboski JR, Bell KC, Hird S, Sarver B *et al.* (2014). Divergence with gene flow within the recent chipmunk radiation (*Tamias*). *Heredity* 113:185–194.

Swain, S. K., Bej, D., Das, S. P., Sahoo, L., Jayasankar, P., Das, P. C., & Das, P. (2016). Genetic variation in *Labeo fimbriatus* (Cypriniformes: Cyprinidae) populations as revealed by partial cytochrome b sequences of mitochondrial DNA. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(3), 1986-1990.

Taberlet P. (2012). Environmental DNA. *Mol Ecol* 21: 1789–1793.

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.

Tajima, F. (1996). The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics*, 143(3), 1457-1465.

Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H. & Kawabata, Z. I. (2012). Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One* 7, e35868

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A. & Kumar S. (2013). MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Thomsen P. F, Kielgast J, Iversen L. L, Moller P. R & Rasmussen M., *et al.* (2012). Detection of diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7: e41732.

Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L. & Willerslev, E. (2012b). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21, 2565–2573.

Toledo, P. S. J., & García, C. M. C. (2000). Nutrición y alimentación de tilapia cultivada en América Latina y el Caribe. *Actas del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, La Paz, BCS, 15-18.

Turner, C.R., Uy, K.L., Everhart, R.C. (2015). Fish environmental DNA is more concentrated in sediments than in surface water. *Biol. Conserv.* 183, 93–102.

Turner, G. F. (2007). Adaptive radiation of cichlid fish. *Current Biology*, 17(19), R827-R831.

Trewavas, E. (1983). Tilapiine fishes of the Genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. British Museum (Natural History), London.

Twongo T. K, Bayona J. D. R, Hanssens M. (2006) *Oreochromis esculentus*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.2. www.iucnredlist.org. Accessed 15 Aug 2010

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.

Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF, *et al.* Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol.* 2016

Vander Zanden, M. J., Hansen, G. J., Higgins, S. N., & Kornis, M. S. (2010). A pound of prevention, plus a pound of cure: early detection and eradication of invasive species in the Laurentian Great Lakes. *Journal of Great Lakes Research*, 36(1), 199-205.

Vidal O, Garcia-Berthou E, Tedesco PA, Garcia-Marin J. (2010). Origin and genetic diversity of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) introduced to Europe. *Biol Invasions* 12:841–851.

Vitule, J. R. S., Freire, C. A., & Simberloff, D. (2009). Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad. *Fish and Fisheries*, 10 (1), 98-108.

Ward RD, Woodwark M, Skibinski DOF. (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *J Fish Biol* 44:213–32.

Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.

Welcomme R.L. 1986. International measures for the control of introductions of aquatic organisms. *FAO Fish Circ*, 11(2), 4-9.

Whiteside B.G. (1975). Additional distribution notes on the Mozambique tilapia in Texas. *Texas Journal of Science* 26:620.

Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Jane, S. F., Lowe, W. H., Whiteley, A. R., & Schwartz, M. K. (2013). Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PloS one*, 8(3), e59520.

Wu, L. and Yang, Y. (2012). Identifications of Captive and wild tilapia species existing in hawaii by mitochondrial DNA Control region Sequence. *PLOS ONE* 7 (12):51731.

Xia, Z., Zhan, A., Gao, Y., Zhang, L., Haffner, G. D., & MacIsaac, H. J. (2018). Early detection of a highly invasive bivalve based on environmental DNA (eDNA). *Biological Invasions*, 20(2), 437-447.

Zambrano L, Martinez-Meyer E, Menezes N, Peterson AT (2006). Invasive potential of common carp (*Cyprinus carpio*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in American freshwater systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 63: 1903-1910.