



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
AMBIENTALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**“DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL eDNA DE *Poecilia  
reticulata* EN SEDIMENTOS ACUÁTICOS Y AGUAS SUPERFICIALES”**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO/A EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORA:**

**Ana Judith Encarnación Díaz**

**DIRECTORA:**

**ELIZABETH VELARDE, M.Sc.**

**Ibarra - Ecuador**

**2020**

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y  
AMBIENTALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

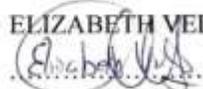
**“DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL eDNA DE *Poecilia  
reticulata* EN SEDIMENTOS ACUÁTICOS Y AGUAS SUPERFICIALES”**

Tesis de Grado revisada por el Comité Asesor, por lo cual autoriza su presentación  
como requisito parcial para obtener el Título de:

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**APROBADA:**

ELIZABETH VELARDE, M.Sc.

.....

**DIRECTORA**

Ing. CARLA SANDOVAL, MSc.

.....

**ASESORA**

Ing. PEDRO BARBA, M.Sc.

.....

**ASESOR**

Ibarra – Ecuador 2020



## UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

### BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

#### AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN

#### A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

#### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO 1		
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b>	1724284698	
<b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b>	Encarnación Díaz Ana Judith	
<b>DIRECCIÓN:</b>	El Olivo	
<b>EMAIL:</b>	ann.encarnacion@hotmail.com	
<b>TELÉFONO FIJO:</b>	-	<b>TELÉFONO MÓVIL:</b> 0980960558
DATOS DE LA OBRA		
<b>TÍTULO:</b>	<b>“DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL eDNA DE <i>Poecilia reticulata</i> EN SEDIMENTOS ACUÁTICOS Y AGUAS SUPERFICIALES”</b>	
<b>AUTORA:</b>	Ana Judith Encarnación Díaz	
<b>FECHA:</b>	Febrero 2019	
<b>PROGRAMA:</b>	PREGRADO	
<b>TÍTULO POR EL QUE OPTA:</b>	Ingeniera en Biotecnología	
<b>DIRECTORA:</b>	Ing. Elizabeth Velarde	

## 2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros; por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 04 días de marzo del 2020

### LA AUTORA:



Ana Judith Encarnación Díaz

C.I. 1724284698

### **CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA**

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por la Srta. Ana Judith Encarnación Díaz, bajo mi supervisión.

Ibarra, a los 04 días de marzo del 2020

A handwritten signature in black ink, enclosed in a hand-drawn oval. The signature appears to be 'Elizabeth Velarde'.

Ing. Elizabeth Velarde MSc  
**DIRECTORA DE TESIS**



UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

**CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE GRADO A  
FAVOR  
DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**

Yo, ANA JUDITH ENCARNACIÓN DÍAZ, con cédula de identidad Nro.172428469-8, manifiesto mi voluntad de ceder a la Universidad Técnica del Norte los derechos patrimoniales consagrados en la Ley de Propiedad Intelectual del Ecuador, artículos 4, 5 y 6, en calidad de autor de la obra o trabajo de grado denominado: "DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL eDNA DE *Poecilia reticulata* EN SEDIMENTOS ACUÁTICOS Y AGUAS SUPERFICIALES", que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología en la Universidad Técnica del Norte, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente. En mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Técnica del Norte.

  
ANA JUDITH ENCARNACIÓN DÍAZ  
C.I. 172428469-8  
**PRESENTACIÓN**

## AGRADECIMIENTO

*A las personas que se convirtieron en mi motivación, admiración y ejemplo de superación, quienes con su apoyo me dieron la fortaleza para culminar la ingeniería.*

*A mis amados padres, María y Dionicio, por su amor, esfuerzo y apoyo incondicional. A mis pequeñas hermanas porque a pesar de las dificultades diarias me recuerdan que rendirse no es una opción. Son mi ejemplo.*

*A las personas que formaron y forman parte de la Carrera de Biotecnología de La Universidad Técnica del Norte, por las enseñanzas impartidas, el apoyo y el cariño brindado. A las personas que son parte del Laboratorio de Investigaciones Ambientales, por la oportunidad de realizar la tesis en sus instalaciones. Al Laboratorio de Biología perteneciente a la Universidad San Francisco de Quito, especialmente a Andrés Caicedo, investigador de la Universidad, quien fue un guía fundamental para culminar la investigación.*

*Al proyecto 'Pilot study on DNA-based biomonitoring in the Amazon River Basin' del programa VLIR-OUS, por la oportunidad de ser partícipe de este gran proyecto.*

*A mis grandes amigos de biotecnología, especialmente a Vanessa F, Evelyn G, Lennin R y Rodrigo Ch por los momentos vividos.*

## **DEDICATORIA**

*A Dios, mi fortaleza.*

*A mi familia, mi bendición.*

*Al gran amor de mi vida, a ti V.L.*

*Anita Encarnacion*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Contenido	Página
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 OBJETIVOS .....	6
1.1.1 Objetivo general.....	6
1.1.2 Objetivo específico.....	6
1.2 HIPÓTESIS .....	6
CAPÍTULO II .....	7
REVISIÓN LITERARIA .....	7
2.1 ESPECIES INVASORAS .....	7
2.1.1 Impactos ecológicos.....	7
2.1.2 <i>Poecilia reticulata</i> .....	8
2.2 ADN AMBIENTAL (EDNA).....	9
2.2.1 Persistencia del eDNA. ....	10
2.2.2 Aplicaciones del eDNA. ....	11
2.2.3 Proceso de estandarización del método eDNA .....	11
CAPÍTULO III.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS .....	18

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO .....	18
3.2 ESTANDARIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL EDNA DE <i>P. RETICULATA</i> EN SEDIMENTOS ACUÁTICOS Y AGUAS SUPERFICIALES .....	19
3.2.1 Colección de muestras .....	20
3.2.2 Método de extracción, cuantificación y análisis de la integridad del ADN.....	21
3.2.3 Elaboración de primers específicos para la especie .....	24
3.2.4 Amplificación del ADN mediante PCR.....	25
3.3 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EDNA MEDIANTE QPCR .....	26
3.3.1 Experimento <i>in vitro</i> .....	27
3.3.2 Estandarización de la PCR en tiempo real .....	29
3.4 EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EDNA .....	32
CAPÍTULO IV .....	34
RESULTADOS.....	34
4.1 EXTRACCIÓN, CANTIDAD, PUREZA E INTEGRIDAD DEL ADN .....	34
4.1.1 Muestras de tejido .....	34
4.1.2 Muestras de agua.....	35
4.1.3 Muestras de sedimento.....	36
4.2 ELABORACIÓN Y VALIDACIÓN IN SILICO DE PRIMERS. ....	37
4.3 AMPLIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE PCR .....	39
4.4 CUANTIFICACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL EDNA MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL .....	41
4.4.1 Estandarización de la técnica PCR en tiempo real.....	43
4.4.2 Construcción de la curva estándar y análisis de las muestras del experimento .	45
4.3 ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DEL EDNA.....	46
CAPÍTULO V .....	48
DISCUSIÓN .....	48
CAPÍTULO VI.....	58

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	58
CONCLUSIONES .....	58
RECOMENDACIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA .....	60
ANEXOS .....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Especie <i>P. reticulata</i> ; macho y hembra.....	8
<b>Figura 2.</b> Proceso de estandarización del eDNA.....	12
<b>Figura 3.</b> Curva de amplificación y curva de fusión .....	15
<b>Figura 4.</b> Construcción de la curva estándar .....	16
<b>Figura 5</b> Mapa de ubicación del área de estudio.....	19
<b>Figura 6.</b> Proceso de extracción de eDNA de muestras de agua.....	21
<b>Figura 7.</b> Proceso de ignición.....	28
<b>Figura 8.</b> Construcción de la Curva estándar .....	31
<b>Figura 9.</b> Gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del ADN de tejido .....	35
<b>Figura 10.</b> Gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del ADN extraído de muestras de agua de 200ml y 150ml.....	36
<b>Figura 11.</b> Gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del ADN extraído de muestras de sedimento mediante el protocolo de MasterPure de epicentro.....	37
<b>Figura 12.</b> Secuencias del análisis BLAST de los primers: forward y reverse .....	38
<b>Figura 13.</b> Amplificación de productos PCR por gradiente de temperatura de hibridación de los primers.....	39
<b>Figura 14.</b> Amplificación de ADN extraído de muestras de agua utilizando la TaqMan Environmental y Green GoTaq.....	40

<b>Figura 15.</b> Amplificación de productos PCR de ADN de <i>P. reticulata</i> extraído de muestras de agua y sedimento.....	40
<b>Figura 16.</b> Curva de amplificación y fusión de la temperatura de hibridación de los primers por gradiente .....	43
<b>Figura 17.</b> Curva de amplificación y curva estándar obtenida según los resultados de las diluciones.....	45
<b>Figura 18.</b> Rangos de significancia estadística de la interacción: medio con tratamiento .....	47
<b>Figura 19.</b> Concentración de eDNA de la interacción: tratamiento y día muestreo. ..	47
<b>Figura 20.</b> Rangos de significancia estadística del día de muestreo .....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Taxonomía de la especie .....	8
<b>Tabla 2</b> Características físico-químicas de los primers .....	24
<b>Tabla 3</b> Reacción maestra .....	25
<b>Tabla 4</b> Reacción maestra .....	26
<b>Tabla 5</b> Densidad de individuos por tratamiento .....	27
<b>Tabla 6</b> Reacción maestra de qPCR .....	30
<b>Tabla 7</b> Reacción maestra de qPCR. Comparación de volúmenes de reacción final.	30
<b>Tabla 8</b> Codificación de las variables independientes .....	32
<b>Tabla 9</b> Concentración y pureza del ADN extraído de muestras tejido .....	34
<b>Tabla 10</b> Concentración y pureza de ADN extraído de agua con volúmenes de 150 y 200ml .....	36
<b>Tabla 11</b> Concentración y pureza del ADN extraído de sedimento comparando tres protocolos de extracción .....	37
<b>Tabla 12</b> Características de primers específicos para <i>P. reticulata</i> .....	38

<b>Tabla 13</b> Concentración y pureza del ADN de agua y sedimento de muestras experimentales.....	42
<b>Tabla 14</b> Valores de amplificación con un volumen final de 25µl y 10 µl en la reacción maestra .....	44
<b>Tabla 15</b> Datos de amplificación del ADN de P.reticulata extraído de muestras de agua y sedimento .....	44
<b>Tabla 16</b> Datos de la amplificación de la curva estándar .....	46

**UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE**  
**FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y**  
**AMBIENTALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL eDNA DE *Poecilia***  
***reticulata* EN SEDIMENTOS ACUÁTICOS Y AGUAS SUPERFICIALES**

Nombre del estudiante: Ana Judith Encarnación Díaz

**RESUMEN**

El análisis del ADN que los organismos liberan al medio ambiente (eDNA) tiene un enorme potencial para detectar especies. Hasta ahora, los estudios sobre el método se han centrado en evaluar el comportamiento del eDNA en ambientes acuáticos, limitando los estudios en sedimentos, por lo tanto, se cree que el análisis del eDNA en sedimento podría ofrecer más información para el monitoreo de estas especies. En este estudio, se evaluó y comparó como la concentración del eDNA cambia con relación al tiempo y la densidad de los individuos en muestras recolectadas tanto de agua como de sedimentos, usando como modelo la especie invasora *Poecilia reticulata*, introducida en el lago Yahuarcocha. Se trabajó con un experimento de laboratorio en condiciones controladas en el cual se varió tres factores: el medio (agua, sedimento), los tratamientos (densidades de peces) y el día de muestro (tiempo). Para conocer el comportamiento de la concentración del eDNA con relación a los tres factores se aplicó la técnica de PCR en tiempo real con primers específicos para la especie y se realizó un análisis ANOVA de medias repetidas para analizar los datos. Los resultados obtenidos demostraron una mayor concentración de eDNA por ml de agua que por gramo de sedimento, además se registró un descenso gradual de la concentración de eDNA en el tiempo, al sexto día en ausencia de los peces se registró una mayor degradación de eDNA en muestras de sedimento, específicamente en el tratamiento con menor número de peces (T3). Asimismo, el comportamiento de la concentración del eDNA se relacionó en función al número de peces presente en los tratamientos, a mayor número de peces mayor concentración eDNA. Los resultados demuestran la efectividad del método del eDNA para detectar especies invasoras a bajas densidades, sin embargo, para robustecer estos resultados es necesario ampliar la información del comportamiento del eDNA en el sedimento. Esto especialmente si se desea utilizar el eDNA como herramienta de alerta temprana, donde las acciones de gestión se implementen según los resultados de dichas pruebas.

**Palabras claves:** especies invasoras, eDNA, PCR cuantitativa (qPCR), *Poecilia reticulata*, agua, sedimento, densidad

## ABSTRACT

The DNA analysis that organisms release to the environment (eDNA) has enormous potential to detect species. Now, the studies about the method evaluate only the behavior of eDNA in aquatic environments. However, the studies in sediment are limited, therefore, the eDNA analysis in sediment could offer more information. In this study, it was evaluated and compared how the concentration of eDNA changes in relation to the time and the density of individuals in a sample collected the water and sediment, using the invasive species *Poecilia reticulata*, introduced in lake Yahuarcocha. It was worked with a laboratory experiment in controlled conditions where it was varied three factors: medium (water, sediment), treatments (fish densities) and day of sampling (time). The behavior of the concentration of eDNA was evaluated through real-time PCR technique and specific primers for the species. The data was analyzed through an ANOVA of repeated measures. The results showed a higher concentration of eDNA per ml of water that per gram of sediment. Also, it was registered a gradual decrease in the concentration of eDNA in the time, on the sixth day in the absence of fish was registered a greater degradation of eDNA in sediment samples, specifically in the treatment with fewer fish (T3). Also, the behavior of the eDNA concentration was related depending on the number of fish present in the treatments, a greater the number of fish, the higher the eDNA concentration. The results demonstrated the affectivity of eDNA method to detect invasive species at low densities however, to strengthen these results, it necessary to expand the information of the behavior of the eDNA in the sediment. This especially, if it wants to use the eDNA how an early warning tool, where the management actions are implemented according to the results..

Keywords: invasive species, eDNA, quantitative PCR (qPCR), *Poecilia reticulata*, water, sediment, species density

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

De acuerdo a lo que indica Jaramillo Hoyos et al. (2005) , la introducción de especies invasoras, la sobreexplotación de recursos biológicos, la contaminación y el cambio climático junto con la transformación y fragmentación de los ecosistemas son actualmente las mayores amenazas que sufre la biodiversidad. Así como indica Jiménez et al. (2010), que la biodiversidad es la variabilidad de seres vivos sobre la tierra y los patrones naturales que los conforman. Debido a que la biodiversidad guarda una relación tan estrecha con las necesidades humanas y la calidad de vida, su conservación es un elemento estratégico para nuestra supervivencia. De tal manera que su conservación conlleva la protección y manejo de muestras de organismos vivos compatibles con la supervivencia, ritmo y evolución de los ecosistemas (Muñoz et al., 1997).

Es por esto que la atención sobre las especies exóticas invasoras se ha incrementado en los últimos 20 años, debido su impacto en la economía, la salud de los ecosistemas y la población humana (INABIO, 2019). Siendo que la introducción de estas especies , se origina principalmente por la necesidad de importar especies para potenciar la producción agropecuaria y acuícola ya que son a menudo una importante fuente de ingresos (Holt & Hoddle, 2001; Mora, 2001). Los efectos de los invasores en el ecosistema varían de indetectables a dramáticos (Simon & Townsend, 2003) . Generalmente, esto depende del tipo de especie, la magnitud de invasión y la vulnerabilidad de los ecosistemas invadidos (Kettunen et al., 2009). Asimismo, del

proceso de invasión biológica, ya que consta de tres fases: Dispersión inicial, establecimiento de poblaciones auto sostenibles y propagación en los ecosistemas (Goldberg et al., 2013).

En los ecosistemas acuáticos continentales (ríos, lagos, lagunas, etc.), las invasiones biológicas son comunes (Crespo, 2015). Existen varios ejemplos catastróficos de cambios en comunidades enteras causados por especies invasoras. Tal es el caso de la introducción de la perca del Nilo (*Lates niloticus*) al lago Victoria, la cual ha causado diversos impactos socioeconómicos y medioambientales, incluyendo la desaparición o casi desaparición de cientos de especies de peces nativos y la consecuente simplificación de la red trófica del lago (Palau, 2006). Otros ejemplos extremos incluyen a los mejillones cebra (*Dreissena polymorpha*) en los ríos y lagos de Norte América y Europa (Rolla et al., 2019), la tilapia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) y la carpa común (*Cyprinus carpio*) que causan también impactos en ecosistemas en México (Medoza & Osorio, 2014).

Actualmente, en el Ecuador se han introducido, de manera voluntaria o involuntariamente, muchas especies que se han convertido en invasoras y amenazan a especies nativas, ecosistemas, cultivos agrícolas y la salud humana (Crespo, 2015). Los cuerpos de agua dulce del país no están libres de especies exóticas, pero en general existen muy pocos datos acerca de su potencial invasor, su distribución o su abundancia. Yahuarcocha, es un lago representativo de la provincia de Imbabura que actualmente enfrenta graves problemas ecológicos (Ortega et al, 2018). Uno de los principales problemas es la presencia y establecimiento de varias especies invasora, entre las que destaca el *Procambarus clarkii*, *Poecilia reticulata* y *Cyprinus carpio* (Riascos et al., 2018).

A pesar de los esfuerzos por erradicarlas, éstas especies introducidas continúan ejerciendo un importante daño ecológico en el lago (Ortega et al, 2018).

Recientemente, el Ministerio del Ambiente presentó un plan de acción para la prevención, manejo y control de especies invasoras en el Ecuador teniendo en cuenta factores ambientales, económicos y sociales, con el cual pretende responder a la problemática, necesidades y realidades identificadas; esto mediante el desarrollo de mecanismos e instrumentos técnicos de gestión y estableciendo mecanismos de financiamiento sostenible para la gestión (MAE, 2019; El Telégrafo, 2019).

Una técnica nueva de muestreo genético no invasivo representa una gran ventaja frente a especies invasoras, la cual, proporciona información sobre su distribución y abundancia; de modo sencillo y a bajo costo (Goldberg et al., 2011). Esta técnica está basada en el análisis del ADN que los organismos liberan al medio ambiente (eDNA) a manera de huella genética (Ficetola et al., 2008). El eDNA se caracteriza por tener una mezcla compleja de ADN nuclear, mitocondrial y de cloroplastos de diferentes organismos, que permite la detección de especies en cualquier etapa de vida y de ambos sexos (Taberlet et al., 2012). La principal ventaja de este método está en que no requiere trabajar directamente con la especie objetivo (Turner et al., 2015a), lo contrario a las técnicas tradicionales, que se basan en observación directa e identificación mediante claves taxonómicas comúnmente utilizadas para identificar estas especies, que a menudo resultan difíciles y costosas (Biomeme, sf).

Este eDNA se puede extraer de muestras ambientales como suelo, agua, heces, sedimento, etc. (Jelger Herder, 2014). Está compuesto por ADN intracelular y ADN extracelular (Thomsen et al., 2012a) que al ser liberado al ambiente éste puede sobrevivir desde horas hasta miles de años dependiendo del entorno ambiental (Thomsen & Willerslev, 2015). Desde sus inicio de la década de 1980, la aplicación de este método se ha ampliado a muchos tipos de animales, incluidos anfibios, peces, moluscos, insectos y crustáceos, en diversos ecosistemas como lagos, ríos y océanos (Doi et al., 2015 ; Díaz Ferguson & Moyer, 2014).

Las investigación se ha centrado no solo en las aplicaciones de eDNA para más especies, sino también en cuestiones fundamentales como la persistencia y dispersión del eDNA en diferentes entornos y sustratos, las probabilidades de detección y la relación entre el eDNA y la densidad de organismo (Jelger Herder, 2014). La persistencia del ADN se puede definir como la continuidad del ADN después de la eliminación de su fuente (Dejean et al., 2011a). Una vez el ADN es liberado al ambiente, puede persistir, absorberse en partículas orgánicas e inorgánicas, degradarse o transformarse (Díaz Ferguson & Moyer, 2014). Varios factores pueden afectar la degradación de este ADN; las nucleasas endógenas, el agua, la radiación UV y la acción de bacterias y hongos que en el medio ambiente contribuyen su desintegración (Dejean et al., 2011a).

En ambientes marinos y de agua dulce, la persistencia de eDNA puede variar considerablemente entre los estudios, desde unas pocas horas (Pilliod et al., 2014 ; Buxton et al., 2017) hasta un mes (Turner et al., 2015b), dependiendo del ambiente estudiado (Buxton et al., 2018a) y el método utilizado para la detección de ADN (Strickler et al., 2015). Sin embargo, cuando se incorpora el eDNA a los sedimentos, la persistencia de eDNA puede ser superior a meses (Turner et al., 2015b) o incluso años (Buxton et al., 2017a). El ADN extracelular puede unirse a partículas y compuesto húmicos puede favorecer a la adsorción de ADN (Dell'Anno & Corinaldesi, 2004). Los ácidos húmicos, es una clase heterogénea de moléculas derivadas de la degradación de varias biomoléculas, son capaces de unir el ADN a través de puentes catiónicos. En consecuencia, el sedimento puede ser una fuente valiosa pero aún no probada de eDNA (Buxton et al., 2018b).

De igual manera, la probabilidad de detección depende de la densidad de la especie y de la relación entre el ADN liberado por el organismo y el ADN degradado por factores ambientales (Buxton et al., 2017a). Varios estudios han demostrado correlaciones positivas entre densidad y la concentración de eDNA en diferentes organismos

acuáticos (Chambert et al., 2018). Por ejemplo, un estudio de la carpa común en una laguna japonesa indicó que la concentración de eDNA se correlaciona con la abundancia de peces (Takahara et al., 2012). Mientras tanto, un estudio en un lago Minnesota de EE. UU, sobre la carpa común encontró resultados similares, con una tasa de detección y una concentración de eDNA que se correlacionan positivamente con la abundancia de peces (Eichmiller et al., 2014), al igual que Pilliod (2013) y Thomsen (2012b) que también han encontrado correlaciones similares con múltiples especies de anfibios.

Por lo anteriormente expuesto, este método, es una herramienta prometedora para la detección temprana de especies invasoras (Goldberg et al., 2013b). Considerando que, la adaptación y expansión de estas especies constituyen una amenaza ecológica y económica para la biodiversidad. Es importante su detección en una etapa inicial para combatir con éxito la propagación de éstas especies, ecológicamente dañinas (Klymus et al., 2015 ; Takahara et al., 2013). Dependiendo de la concentración y la persistencia de eDNA, las muestras de sedimentos podrían ser más útiles que las muestras de agua para monitorear estas especies (Turner et al., 2015b)

Esta investigación pretende determinar y evaluar como la concentración de eDNA de *P. reticulata* cambia con relación al tiempo después de la eliminación de esta especie. Además, como se relaciona la concentración del eDNA con la densidad de individuos en muestras recolectadas tanto de agua como de sedimentos. Datos que se obtendrán aplicando técnicas de qPCR y PCR convencional. El análisis de la concentración entre dos ambientes proporcionará información precisa en cuanto a datos para monitorear especies invasoras en lagos. Además, la información obtenida en la presente investigación podrá contribuir al desarrollo de protocolos fiables y repetibles para muestreo, extracción, purificación y amplificación del eDNA en ambientes acuáticos y sedimentarios. Asimismo, este estudio contribuirá con el cumplimiento de los objetivos

del proyecto ‘Pilot study on DNA-based biomonitoring in the Amazon River Basin’ del programa VLIR-OUS, de la cual forma parte esta investigación.

### **Pregunta directriz**

¿El eDNA es un método capaz de detectar la presencia de *P. reticulata* a baja densidades en agua y sedimento?

## **1.1 Objetivos**

### *1.1.1 Objetivo general*

Determinar la concentración del eDNA de *P. reticulata* en sedimentos acuáticos y aguas superficiales.

### *1.1.2 Objetivo específico*

- Estandarizar el método de extracción y purificación del eDNA de *P. reticulata* en sedimentos acuáticos y aguas superficiales.
- Cuantificar la concentración del eDNA de *P. reticulata* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real.
- Evaluar la relación entre la concentración de eDNA de *P. reticulata*, la densidad de individuos y el tiempo de permanencia del ADN en aguas superficiales y sedimentos acuáticos.

## **1.2 Hipótesis**

La concentración del eDNA de *P. reticulata* permite estimar la densidad poblacional de especies invasoras.

## **CAPÍTULO II**

### **REVISIÓN LITERARIA**

#### **2.1 Especies invasoras**

De acuerdo a la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza una especie invasora es aquella especie que ha sido introducida de forma intencional o accidental en lugares fuera de su hábitat natural, y que tiene la capacidad de establecerse y adaptarse produciendo cambios en la composición, estructura y procesos de los ecosistemas tanto terrestres como acuáticos (Alvarado, 2016). Convirtiéndose en una amenaza para especies endémicas y en peligro de extinción (Simberloff et al., 2013).

##### *2.1.1 Impactos ecológicos.*

Los impactos ecológicos en los ecosistemas varían significativamente dependiendo del tipo de especie, la magnitud de invasión y la vulnerabilidad de los ecosistemas invadidos. Según Simberloff et al., (2013) , los principales impactos además de la pérdida de biodiversidad se encuentra la alteración de las características química del agua, alteración de los procesos biogeoquímicos y alteración de redes tróficas (Mora, 2001).

### 2.1.2 *Poecilia reticulata*

*P. reticulata* es una especie de pez nativo del Caribe y noreste de Sudamérica. Habita en zonas de corriente baja tales como ríos, lagos y charcas. Es conocido comúnmente como guppy, lebistes o pez millón por su alta tasa de reproductividad. Fue descubierto por Wilhelm Peter, 1959, su taxonomía se describe en la Tabla 1.

Tabla 1  
*Taxonomía de la especie*

Reino:	Animalia
Filo:	Chordata
Clase:	Actinopterygii
Orden:	Cyprinodontiformes
Familia:	Poeciliidae
Género:	Poecilia
Especie:	<i>P. reticulata</i> , Peters, 1859

Fuente. Jordan (2008)

Los guppys son peces ovovivíparos, es decir las hembras desarrollan los huevos en su interior hasta que estos están en etapa maduros. Esta especie ovula cada tres días y alumbran aproximadamente cada veintiocho días.



Figura 1. Especie *P. reticulata*; macho y hembra

Su cuerpo suele alcanzar, en promedio, de 3.5 centímetros en etapa adulto (Figura 1), (Lindholm et al., 2005). Su dieta se basa en pequeños insectos, zooplancton, algas, detritos bentónicos, así como también de una amplia gama de huevos de peces nativos de zonas invadidas (Jordan, 2013). Estos son capaces de adaptarse a condiciones de pH 5-9, salinidad de 0-45 ppt y a temperaturas de 24-29°C.

## **2.2 ADN ambiental (eDNA)**

El ADN Ambiental (eDNA, por su nombre en inglés) es el material genético (ADN nuclear o mitocondrial) liberado por organismos al ambiente a través de procesos como el desprendimiento de células, la excreción de moco, la defecación y mudas de piel (Eichmiller et al., 2014). Este ADN se puede extraer de muestras ambientales como suelo, agua, sedimento, entre otras (Herder et al 2014). El eDNA está compuesto por ADN intracelular (contenido en las células vivas) y ADN extracelular o restos celulares procedentes de la lisis celular, excreción o secreción (Herder, 2014; Pilliod, 2013). Combinado con las herramientas genéticas modernas, el eDNA ofrece un medio no invasivo para identificar especies o comunidades asociadas con el entorno del cual se extrae el ADN (Seymour, 2019).

El eDNA se ha utilizado desde mediados de la década de 1980 para la detección de comunidades bacterianas en sedimentos marinos (Ogram et al., 1987). Sin embargo, no fue hasta 2008, cuando investigadores franceses aplicaron por primera vez el método de eDNA para confirmar la presencia de una especie acuática invasora (*Rana catesbiana*) de muestras de agua en un sistema lótico natural (Díaz Ferguson & Moyer, 2014). Desde sus inicios, los esfuerzos de investigaciones han demostrado que muchos factores pueden influir en la cantidad de material genético liberado por los organismos en sus entornos (Barnes & Turner, 2015). Factores bióticos y abióticos como las nucleasas endógenas, la radiación UV, pH, temperatura y la acción de bacterias y hongos contribuyen en la desintegración del eDNA (Dejean et al., 2011a).

De manera general, el comportamiento del eDNA depende de cuatro dominios: origen, estado, transporte y destino (Turner et al., 2015b). El origen de eDNA, describe sus fuentes fisiológicas, comúnmente usadas como heces, orina, gametos, piel entre otras (Turner et al., 2015b). El estado de eDNA, describe sus formas físicas, como las moléculas de ADN unidas a partículas o disueltas libremente (Turner et al., 2014). El transporte de eDNA, se refiere al movimiento después de abandonar el organismo de origen, incluido el asentamiento y el flujo en corrientes (Barnes & Turner, 2016) . Finalmente, el destino de eDNA, describe su transformación de ADN genómico intacto dentro de células vivas en fragmentos de ADN pequeños para su identificación (Barnes et al., 2014).

### *2.2.1 Persistencia del eDNA.*

Se entiende como persistencia del eDNA, la continuación de los fragmentos de ADN en el tiempo, una vez liberado al medio ambiente (Dejean et al., 2011b). Los fragmentos de ADN expuestos al ambiente se degradan rápidamente en fragmentos más cortos, que rara vez supera los 150 pares de base (Deagle et al., 2006). La influencia de factores bióticos y abióticos sobre el eDNA puede provocar su degradación o transformación, asimismo, puede persistir, ser adsorbido en partículas orgánicas e inorgánicas ( Thomsen et al., 2012 , McKelvey et al., 2016, Valentini et al., 2016), SPYGEN, sf).

La persistencia del eDNA en diferentes entornos (marinos, agua dulce o terrestre) y en diferentes sustratos (agua, suelo y sedimentos) puede variar considerablemente (Jelger Herder, 2014). En ambientes marinos y de agua dulce el eDNA puede variar de horas (Pilliod et al., 2014 ; Buxton et al., 2017) hasta meses (Turner et al., 2015b), dependiendo del ambiente estudiado (Buxton et al., 2018a) y el método utilizado para la detección de ADN (Strickler et al., 2015). En sedimentos y suelos terrestres, una

proporción muy baja de ADN puede persistir durante largos periodos, absorbido a partículas orgánicas e inorgánicas que lo protegen de varios agentes de degradación (Jelger Herder, 2014). En ambientes acuáticos, las partículas acuosas que contienen eDNA suelen superar (>1  $\mu\text{m}$ ), su gran tamaño impide que permanezcan suspendidas indefinidamente en la columna de agua, lo que conlleva a su sedimentación (Turner et al., 2015b). El eDNA puede persistir durante días a miles de años, dependiendo de las condiciones iniciales de concentración y degradación (Levy-Booth et al., 2007a).

### *2.2.2 Aplicaciones del eDNA.*

El ADN ambiental (eDNA) es una metodología que muestra una promesa para la detección de especies exóticas invasoras (AIS) en las primeras etapas de la introducción o cuando se encuentran en densidades bajas (Hulme, 2006; Rees et al., 2014), incluso, para el monitoreo de especies raras o en peligro de extinción (Cowart et al., 2018). También, se ha aplicado en estudios de persistencia de eDNA y en estimaciones de la biomasa y distribución de las especies (Rees et al., 2014). De la misma manera, el monitoreo y la conservación de las poblaciones acuáticas (Rees et al., 2014). Asimismo, en los campos de ecología marina y biología de conservación, e incluyen análisis forense de ADN de vida silvestre y patrones históricos de distribución de especies (Díaz-Ferguson & Moyer, 2014).

### *2.2.3 Proceso de estandarización del método eDNA*

El ADN ambiental (eDNA) se utiliza para detectar la biodiversidad mediante la captura, extracción e identificación de ADN derramado al medio ambiente. Sin embargo, los protocolos de captura y extracción de eDNA varían ampliamente entre los estudios. Este uso de diferentes protocolos puede sesgar los resultados de detección y podría obstaculizar significativamente el uso confiable de eDNA para detectar la

biodiversidad (Deiner et al., 2015). En la Figura 2 se presenta de manera resumida las etapas que conlleva la estandarización del eDNA.

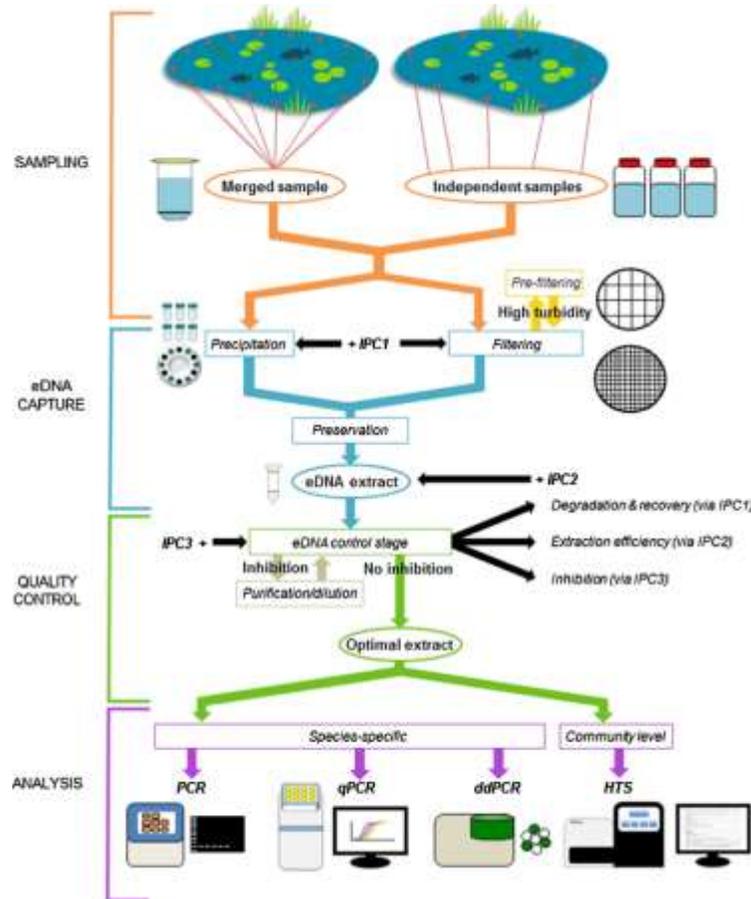


Figura 2. Proceso de estandarización del eDNA

- Colección de la muestra

Los estudios proponen dos enfoques principales de muestreo, ambos basados en la concentración del ADN a partir de diferentes volúmenes de agua (Jelger Herder, 2014).

- Extracción de ADN

Las muestras ambientales son procesadas en el laboratorio, donde se someten a una etapa de extracción de ADN (Champlot et al., 2010). La extracción o el aislamiento del ADN es una técnica para extraer o liberar el ADN de las células. Este ADN sufre procesos de lisis celular, inactivación de nucleasas, precipitación de proteínas, eliminación del ARN y precipitación-purificación del ADN. Se puede utilizar kits comerciales o protocolos caseros (Jelger Herder, 2014).

- Amplificación de DNA.

El ADN extraído puede amplificarse usando cebadores específicos para la especie. Durante la extracción de ADN, el ADN nuclear, mitocondrial y de cloroplasto de varios organismos se co-extraen. El ADN de la especie diana es una pequeña fracción del ADN total extraído (Levy-Booth et al., 2007b). Para analizar este ADN en particular, se pueden utilizar dos tipos de amplificaciones por medio de métodos convencionales de PCR o PCR cuantitativa (qPCR) (Herder et al., 2014).

1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR convencional, es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN a partir de una sola molécula (Serrato et al., 2013). Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN de las células (Tamay de Dios et al., 2013). Un ciclo de la amplificación consta de tres etapas: separación de las hebras de ADN (desnaturalización), unión de los iniciadores a una secuencia complementaria del ADN molde (alineamiento) y la síntesis semiconservativa de una nueva cadena por adición de nucleótidos debido a la acción de la ADN polimerasa (extensión). Cada una de las etapas está determinada por una temperatura (Serrato et al., 2013). Los

elementos importantes en la reacción son el templado o molde, la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótido trifosfatos (dNTPs), el ión magnesio, una solución amortiguadora ( $Mg^{+}$ ) o buffer y  $H_2O$  (Tamay de Dios et al., 2013). Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa (Tamay de Dios et al., 2013).

## 2. Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo real (qPCR)

La PCR en Tiempo Real, también llamada PCR cuantitativa o qPCR, puede proporcionar un método simple y sensible para determinar la cantidad de una secuencia o gen objetivo que está presente en una muestra (Thermofisher, sf), aun teniendo una cantidad muy pequeña de templado, el sistema garantiza una alta sensibilidad, especificidad y eficiencia. Los reactivos de la PCR en tiempo real son los mismos utilizados en la PCR convencional pero la enzima, dNTP's,  $Mg^{+}$ , el buffer y el sistema reportero de fluorescencia para detectar los productos amplificados vienen juntos en una solución conocida como "Master Mix". El reportero de fluorescencia más usado se llama SYBR Green, es una molécula intercalante que tiene afinidad por el ADN de doble cadena y que al ser oxidados generan una señal de fluorescencia. La fluorescencia emitida es capturada en la etapa de excitación de cada ciclo y es proporcional al número de copias de ADN de doble cadena obtenidas en cada ciclo de la qPCR (Tamay de Dios et al., 2013).

El análisis de la reacción es el paso final para determinar la cuantificación genética. Para ello, los termocicladores están provisto con un software que genera gráficas que muestran datos para conocer si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios et al., 2013). Una de estas graficas es la amplificación, que muestra el curso y el progreso de la reacción, y la otra gráfica es la curva de disociación o curva melting, que monitoriza la cinética de la disociación de los fragmentos amplificados (Figura 3). Mediante esta

aplicación se puede determinar la temperatura de fusión ( $T_m$  del inglés melting temperature) de los amplicones para comprobar su especificidad (Costa, 2004)

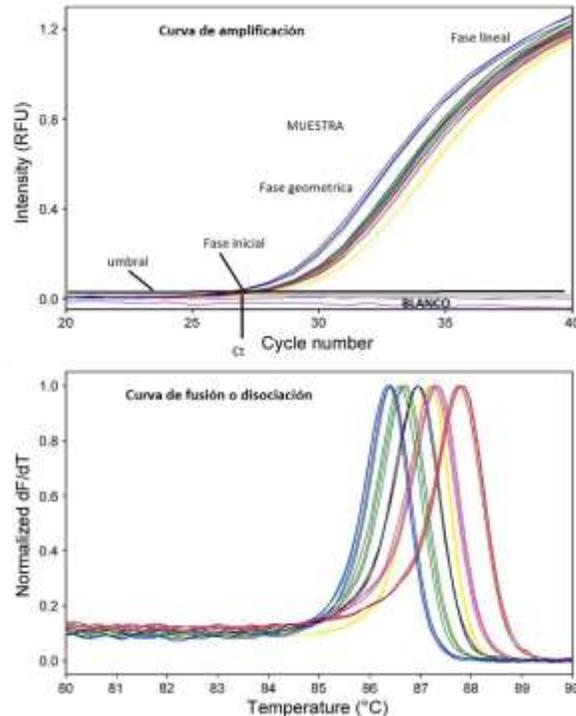


Figura 3. Curva de amplificación y curva de fusión

El análisis de la cuantificación depende de los intereses del investigador a que existe dos tipos: la absoluta y la relativa. La primera generalmente se utiliza para conocer el número exacto de copias amplificadas o la concentración precisa de ácidos nucleicos en una muestra (Tamay de Dios et al., 2013). Se puede cuantificar la concentración de ADN o ARN diana de manera sencilla, añadiendo estándares con concentraciones conocidas y crecientes de ADN diana (curva patrón o estándar) en las amplificaciones (Costa, 2004). El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina punto de corte ( $C_p$ , de crossing point) o ciclo umbral ( $C_t$ , de threshold cycle) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de las muestras estándar y sus  $C_t$  correspondientes se dibuja una curva patrón (curva de calibración) (Costa,

2004); (Figura 4). Esta curva de calibración permite interpolar directamente los valores de Ct de las muestras problema y obtener su concentración. La recta obtenida permite calcular las concentraciones desconocidas de las muestras usando la ecuación y coeficiente de correlación y porcentaje de eficiencia.

**Ecuación 1.** Ecuación de la recta

$$Y = ax + b$$

Dónde:  $y$  es el Ct medido por el termociclador,  $x$  la concentración inicial de ADN de la muestra expresada en log,  $a$  la pendiente y  $b$  el intercepto del eje Y (Pedroarias, sf).

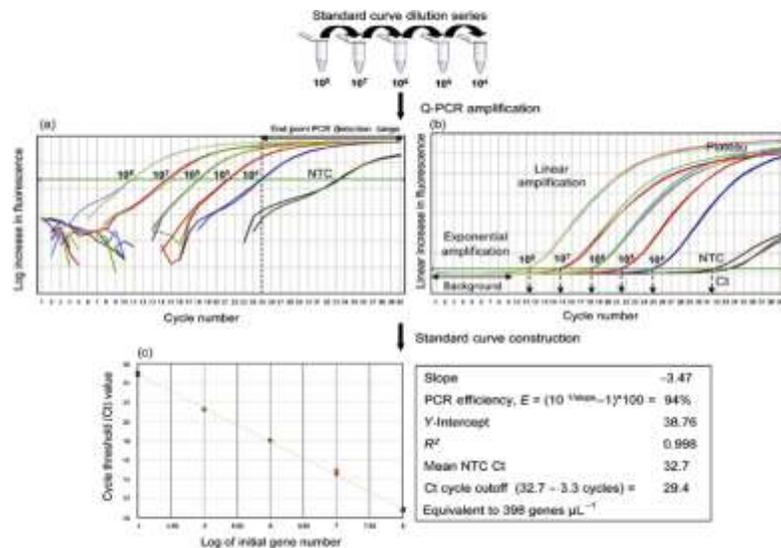


Figura 4. Construcción de la curva estándar

El valor de la pendiente se utiliza para calcular la eficiencia de la amplificación de los primers la cual debe ser superior al 90% para que pueda ser considerada como aceptable en la experimentación. La eficiencia de 100% tiene una pendiente de -3.32 y la de 75% una pendiente de -4, si  $a > -3$  existe contaminación (Aguilar et al., 2014). Según Smith

& Osborn (2009), la eficiencia puede ser calculada directamente por el equipo o se puede calcular mediante la siguiente ecuación:

**Ecuación 2.** Ecuación para calcular el % de la eficiencia

$$\% \text{ Eficiencia} = \left[ \left( 10^{\frac{1}{a}} \right) - 1 \right] * 100$$

El intercepto se utiliza para evaluar la sensibilidad de la reacción, mientras menor sea el valor Ct mayor será la sensibilidad del sistema (Martínez Rodríguez et al., 2009). La recta de calibración para estos valores medios puede definirse gracias a una regresión lineal con un determinado coeficiente de correlación ( $R^2$ ) que, para ser considerado de calidad, debe poseer un valor mínimo de 0.9999 (Flores et al., 2015).

- Diseño y validación de primers específicos.

Los cebadores deben ser diseñados considerando la rápida degradación del ADN, con el fin de mejorar la probabilidad de detección. Los primers utilizados en la PCR son validados *in silico* (análisis bioinformático), *in vitro* (a partir de muestras de tejido) e *in situ* (en los sitios donde la especie es conocida por estar presentes en diferentes densidades de ser posible en mínimo 3 puntos) (Herder, 2014).

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

En esta sección se describe los materiales, métodos y técnicas que se usaron para el cumplimiento de los objetivos planteados en esta investigación.

#### **3.1 Caracterización del área de estudio**

La fase de campo del estudio se realizó mediante la toma de sedimento de la orilla del lago y ejemplares de *Poecilia reticulata* del lago Yahuarcocha, ubicado a 5 km al noreste de la ciudad de Ibarra (X 17824310 E Y 0042128 N), a una altitud de 2200 msnm (Figura 5). La muestra de sedimento fue tomada de la orilla del lago utilizando una pala redonda y un balde industrial de 4 L, su recolección se realizó de un punto al azar del lago porque la *P. reticulata* se encuentra distribuida a lo largo del perímetro del lago Yahuarcocha. Una vez recolectado, el sedimento fue transportado al laboratorio LABINAM para su posterior uso en la parte experimental de la investigación.

Por otra parte, los peces se colectaron con una red cónica para zooplancton de 100  $\mu\text{m}$ , los cuales fueron ubicados en baldes industriales de 4 L previamente llenos con agua del lago, con el fin de evitar el estrés de los individuos. Los peces fueron transportados al laboratorio LABINAM a una pecera de 120 L con dimensiones de largo 64 cm, ancho 32 cm y alto 32 cm. La pecera permaneció con aireación constante por 24 horas con agua del lago, transcurrido este tiempo de aclimatación, el agua del lago fue sustituida

por agua potable (dejada en reposo durante una semana con el fin de evaporar el cloro). Los peces permanecieron en la pecera hasta su utilización en la parte experimental de la investigación.



Figura 5 Mapa de ubicación del área de estudio

La parte experimental de este estudio se llevó a cabo en conjunto, entre el Laboratorio de Investigaciones Ambientales “LABINAM”-Universidad Técnica del Norte y el laboratorio de Biología de la Universidad San Francisco de Quito.

### **3.2 Estandarización de la extracción y purificación del eDNA de *P. reticulata* en sedimentos acuáticos y aguas superficiales**

Para estandarizar la extracción y purificación de eDNA se elaboraron protocolos y metodologías para: colección de muestras, extracción y cuantificación del ADN, diseño de primers, amplificación del ADN mediante PCR y análisis de los resultados. Estos procedimientos fueron aplicados para muestras de tejido de la especie, agua y sedimento.

### *3.2.1 Colección de muestras*

Se colectaron 3 tipos de muestras: muestra de tejido, agua y sedimento. Para la muestra de tejido, se seleccionaron tres individuos de aproximadamente 3 cm de largo. Cada individuo vivo fue introducido en 10 ml de etanol al 75% durante 10 minutos o hasta su muerte. Posteriormente, utilizando bisturí y pinzas estériles se extrajo 0.01 g de tejido de la zona de la cola y la aleta (por su facilidad de toma de muestra y extracción de ADN a comparación de muestras de escama o hígado) (Wasko et al., 2003; Lopera-Barrero et al., 2008) y se los colocó en micro-tubos eppendorf de 1.5 ml.

Las muestras de agua se colectaron de la pecera establecida en el laboratorio. Usando un vaso de precipitación estéril de 500 ml se tomó dos alícuotas de 150 ml de agua; estos volúmenes de agua se vertieron en dos frascos de tapa rosca azul, los cuales previamente fueron esterilizados y rotulados. A continuación, se tomó dos alícuotas de 200 ml de agua siguiendo el procedimiento anterior según lo recomendado en Geerts et al. (2018) y Jeunen et al. (2019).

Las muestras de sedimento fueron tomadas de la pecera establecida en el laboratorio. Se diseñó un dispositivo colector de muestras utilizando como modelo el equipo multisampler (Maser, s.f.), el dispositivo consistía en tubo de vidrio de diámetro 8 mm y, 45 cm de longitud. Este equipo permitió tomar muestras de sedimento sin perturbar la interfase agua-sedimento. Se introdujo el equipo en la pecera, se tomó muestras únicamente de sedimento, y se evitó extraer agua. Se colectaron un total de doce muestras de  $0.390 (\pm 0.1)$  g, las cuales fueron puestas en micro-tubos eppendorf de 2 ml estériles (Turner et al., 2015b).

### 3.2.2 Método de extracción, cuantificación y análisis de la integridad del ADN

Para la extracción de ADN a partir de muestras de tejido se utilizó el protocolo de purificación MasterPure™ de Epicentre® siguiendo instrucciones de fábrica.

Para la extracción de ADN a partir de agua, se utilizó filtros de nitrocelulosa (Porafil), tamaño de poro de 0.47  $\mu\text{m}$  y 47 mm de diámetro utilizando una bomba de vacío. Para maximizar la recuperación de eDNA retenido cada membrana fue cortada en pequeños pedazos, cada una fue colocada en diferentes tubos eppendorf de 1.5 ml debidamente rotulados. Para ello, se usó pinzas y tijeras estériles, (Figura 6). Por cada volumen se incluyó un control negativo de 200 ml de agua ultra pura (Tipo 1) a fin de descartar contaminación en el proceso de extracción de ADN, este control se trató como una muestra como lo recomienda Turner et al., (2015).



Figura 6. Proceso de extracción de eDNA de muestras de agua  
a) Filtración de muestra, b) corte de membrana y c) extracción de ADN

Los tubos con pedazos de membrana se sometieron a un proceso de extracción de ADN utilizando el protocolo de purificación MasterPure™ de Epicentre® siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas adaptaciones en los volúmenes de las soluciones y tiempos según lo recomendado en Geerts et al., (2018). A cada muestra se añadió 1.3  $\mu\text{l}$  de proteinasa K en 400  $\mu\text{l}$  de solución de Tissue and Cell Lysis y se agitó vigorosamente durante 5 minutos. La solución se incubó a temperatura ambiente durante 12 horas.

Transcurrido este tiempo, la solución se incubó a 65°C en baño maría durante 40 minutos agitando vigorosamente cada 10 minutos en vortex. Toda la solución se transfirió a nuevos micro-tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles y se desechó los tubos con los restos de la membrana. Se agregó 1.3 µl de concentración 5 µg/ µl RNAsa, se mezcló vigorosamente y se incubó a 37°C por 30 minutos, después se dejó enfriar durante 15 minutos. Posteriormente, 223µl de la solución de precipitación de proteínas (MPC) se añadió, se agitó vigorosamente durante 10 segundos y a continuación se centrifugó a 4°C a 13000 rpm por 10 minutos. Las proteínas precipitaron formando un sedimento blanco. Con cuidado se retiró el sobrenadante sin perturbar el sedimento blanco, el sobrenadante obtenido se colocó en micro-tubos eppendorf de 1.5ml.

En la fase de precipitación del ADN se añadió 300 µl de isopropanol frío en el sobrenadante y se invirtió el tubo manualmente 40 veces, en este paso el ADN se hizo visible a manera de pellet. Cuidadosamente se descartó el sobrenadante dejando únicamente el pellet. Al pellet se agregó 300 µl de etanol frío al 70% y se centrifugó durante 1 minuto a 13000 rpm, este proceso de lavado se realizó 3 veces para eliminar restos de isopropanol. El etanol al 70% se descartó cuidadosamente y se invirtió los micro-tubos sobre papel secante durante 30 minutos o hasta que el pellet este seco. Finalmente, se re suspendió el ADN en 25 µl de agua estéril libre de nucleasas y se almacenó a -10°C para su cuantificación.

Igualmente, en la extracción de eDNA a partir de muestras de sedimento se utilizó el protocolo MasterPure™ epicentre® modificado. En el protocolo se modificó el volumen de la proteinasa y RNAsa a 3µl según lo recomendado en Coyne et al., (2006); Coyne et al., (2001) y Turner et al., (2015). Se procesaron un total de cuatro muestras de sedimento, además de un control negativo que fue tratado igual que las muestras, en el control negativo se usó 200 µl de agua ultra pura (Tipo 1) sin ADN (Turner et al., 2015).

- Cuantificación y análisis de la integridad del ADN

Una vez extraído el ADN de las muestras de tejido, agua y sedimento se cuantificó el ADN genómico por espectrofotometría, para su posterior uso en la amplificación por PCR. La pureza y concentración del ADN genómico de las muestras de tejido, agua y sedimento se midió utilizando el espectrómetro de microvolumen Colibri UV-VIS MARCA Titertek-Berthold. El equipo posee un software integrado que le permite calcular la concentración en ng/ $\mu$ l y la pureza basándose en la absorbancia  $A$  (o densidad óptica,  $DO$ ) de luz ultravioleta (Somma, sf). En la concentración de ADN toma los valores de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm. Mientras la relación de absorbancia  $A_{260}/A_{280}$  arroja valores de la pureza de las muestras, dado que las proteínas absorben a 280 nm. Las preparaciones puras de ADN deben tener un valor 1,8 a 2. Los valores inferiores a este rango son indicativos de contaminación con proteínas o fenol (Quaquebeke, 2015). Una vez encendido el equipo con 1ul de agua estéril, las mediciones se llevaron a cabo por duplicado, para ello se agregó un 1ul de cada muestra en el equipo y se corrió el programa, cabe destacar que no se realizó diluciones.

La integridad del ADN se visualizó por electroforesis, se corrió el ADN genómico por electroforesis para tener una apreciación cualitativa de la integridad del ADN (Lopera-Barrero et al., 2008b) para ello se preparó geles de agarosa. Se midió 50 ml de buffer TBE 1X (Tris, Borato, EDTA) y se mezcló con 0.75g de agarosa para preparar un gel al 1%. Para la corrida electroforética, se programó la cámara de electroforesis a 100 voltios por 30 minutos. Se realizó una corrida electroforética para cada muestra de tejido, agua y sedimento. Los geles se visualizaron en el transiluminador Safe Imager™ 2.0.

### 3.2.3 Elaboración de primers específicos para la especie

Los primers de *P. reticulata* fueron diseñados en esta investigación a partir del gen citocromo b (cytb) mitocondrial. Para su elaboración, se seleccionó una secuencia en la base de datos GenBank de número de acceso KP699838.1 (GenBank, 2016). Se creó una secuencia consenso inclusiva que incorporó toda la variabilidad dentro de las especies para una especie en una región conocida de ADN. Se escogió ADN mitocondrial porque es más abundante que el ADN nuclear y hay más datos de secuencias disponibles (Pilliod, Goldberg, Laramie, et al., 2013).

La región seleccionada se ingresó en el software Primer3 version 4.0.0, donde se consideró que la longitud del fragmento se encuentre entre 18-25 pb, el porcentaje de GC entre el 45-60% y el tamaño del amplicon no supere los 150 pb ( Jelger Herder, 2014); (Tabla 2).

Tabla 2  
*Características físico-químicas de los primers*

Características	Forward	Reverse
Nombre	PoRet	PoRet
Secuencia	AGGATTATGCCTAGT TGCCC	CTCCATTAGCGTGTATGTTGCG
Longitud (pd)	20	22
Contenido de GC (%)	50	50
Temperatura	54.5	56.2
Peso molecular(g/mol)	6108	6732.4

Fuente: OligoAnalyzer, (2020)

La especificidad de los primers: forward y reverse a nivel de especie se analizó mediante *in silico* utilizando los programas OligoAnalyzer y NCBI BLAST. En estos programas se tomó en cuenta el porcentaje de identidad, E-value, la cobertura de la secuencia diana como principales parámetros para determinar la complementariedad

de las bases nucleotídica entre las secuencias de *P. reticulata* y las secuencias de primers, para asegurarse que no se presente homología con otros géneros o especies.

### 3.2.4 Amplificación del ADN mediante PCR

En la técnica de PCR se estandarizó la temperatura de los primers ( $T_m$ ), tipo de ADN polimerasa y detección de ADN en muestras de agua y sedimento.

Para estandarizar la temperatura de amplificación de los primers, se varió su temperatura de hibridación por gradiente en 63, 64.3, 64.9, 65, 65.5 y 66°C. Se usó el equipo Mastercycler® nexus gradient-Eppendorf, modificado con las condiciones de reacción: 95°C por 2min, 35 ciclos de 95°C por 1min, gradiente por 1min y 72°C por 1.30min, 72°C por 5min. Este proceso se realizó utilizando ADN extraído de muestra de tejido. En la Tabla 3, se detalla los componentes utilizados en la reacción maestra de PCR.

Tabla 3  
*Reacción maestra*

Componentes	Volumen final/ R
Green GoTaq® 5X	5µl
Forward Primer 10µM	0.4µl
Reverse Primer 10µM	0.4µl
ADN 10ng/ul	0.5µl
Agua	3.8µl
Volumen final	10µl

Fuente: Adquirido de la casa comercial Promega

Para la amplificación de ADN de muestras de agua se utilizó dos reacciones maestras, en el cual se varió el tipo de ADN polimerasa. Esto se debió a la alta sensibilidad que posee el eDNA y se consideró que la TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 al ser específica para ADN extraído de muestras ambientales tendría mejores resultados en comparación con Green GoTaq® 5X (ThermoFisher, s. f.); (Tabla 4). Las condiciones

de reacción fueron: 95°C por 2min, 35 ciclos de 95°C por 1min, 66° C por 1min y 72°C por 1.30min, 72°C por 5min. Al finalizar, el resultado de la PCR se amplificó en geles de agarosa y se visualizó con un transiluminador Safe Imager™ 2.0

Tabla 4  
*Reacción maestra*

Componentes	Volumen Final
TaqMan®/Green GoTaq®5X	5µl
Forward Primer 10µM	0.4µl
Reverse Primer 10µM	0.4µl
ADN 10ng/ul	1µl
Agua MilliQ	3.2µl
Volumen Final	10µl

Fuente: Adquirido de la casa comercial promega

Se utilizó las mismas condiciones del equipo y de reacción maestra (Tabla 4) para amplificar ADN de muestras de sedimento, pero, en este caso se utilizó únicamente la TaqMan® Environmental Master Mix 2.0.

### **3.3 Cuantificación de la concentración del eDNA mediante qPCR**

Con el fin de evaluar y comparar como la concentración de eDNA cambia en relación al tiempo y la densidad de los individuos en muestras recolectadas tanto de agua como de sedimentos, en primer lugar, se diseñó un experimento *in vitro* utilizando 9 peceras con dimensiones: ancho 20, largo 40 y alto 30cm. El experimento *in vitro* permaneció a temperatura ambiente y expuesto a luz natural. Las peceras tuvieron agua, sedimento y peces con diferentes densidades (número de individuos). En segundo lugar, una vez armado el experimento, se establecieron días de muestreo, que consistió en tomar muestras tanto de agua como sedimento en determinados días utilizando los protocolos establecidos y descritos en el apartado 3.2.1. En tercer lugar, se extrajo el ADN de estas muestras utilizando los protocolos descritos anteriormente. Y finalmente, se conoció la

concentración del eDNA de la especie *P. reticulata* mediante la cuantificación absoluta de las muestras con la curva estándar en la PCR en tiempo real o qPCR.

### 3.3.1 Experimento *in vitro*

Las peceras fueron lavadas con detergente y abundante agua potable, una vez retirado todo el detergente se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Mientras tanto, se preparó el sedimento, que consistió en agregar 500gr en baldes pequeños autoclavables y fueron autoclavados a presión 1.5 psi por 30 minutos. Se esterilizó 1kg de sedimento por número de pecera. Posteriormente, el sedimento se almacenó en las 9 peceras y se dejó enfriar por 24 horas. A continuación, se agregó 9 litros de agua destilada en cada pecera y se dejó reposar por 24 h.

Transcurrida las 24 horas, se estableció tres tratamientos de densidades de individuos y tres réplicas de cada tratamiento (Tabla 5). Los peces permanecieron en las peceras por 6 días, cumplido este tiempo fueron retirados. El primer día de muestreo inició al sexto día de la introducción de los peces, el siguiente muestreo se hizo al 1 día después de haber retirado los peces y el último muestreo al sexto día. Se tomaron 36 muestras de agua y 36 de sedimento en total, utilizando los protocolos antes descritos.

*Tabla 5*

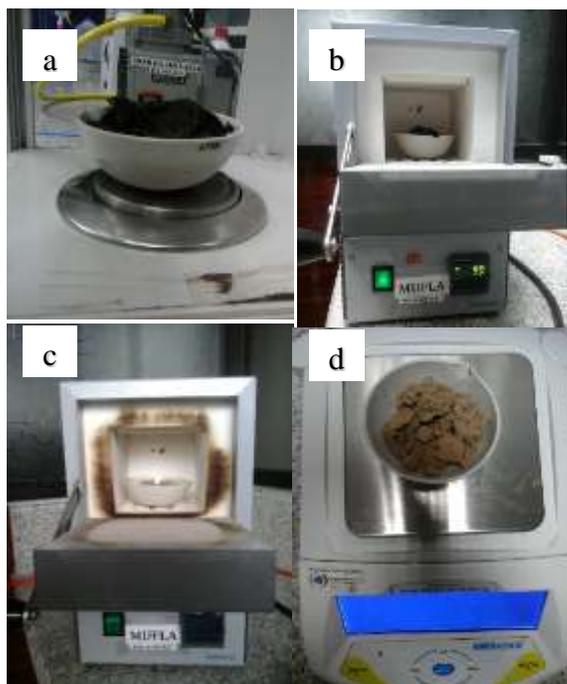
Densidad de individuos por tratamiento

Réplicas	Tratamientos		
	1	2	3
A			
B	30 peces	15 peces	10 peces
C			

a. Materia orgánica del sedimento

Para determinar el % de materia orgánica, el sedimento fue sometido a un proceso de pérdida de peso por ignición (LOI). Se utilizó la metodología descrita por Dean (1974), que se basa en el calentamiento continuo de las muestras a diferentes temperaturas en un horno provocando la pérdida de agua estructural, sales y carbono orgánico.

Se pesó 100g (crisol+ muestra de sedimento), luego se sometió a una temperatura de 110°C, durante aproximadamente 10horas en una mufla-Thermolyne™. Transcurrido el tiempo se retiró y pesó (crisol + muestra de sedimento). La muestra (crisol+ muestra de sedimento) se volvió a someter a una temperatura de 550°C por 6 horas, la materia orgánica experimentó un proceso de combustión provocando la formación de CO<sub>2</sub> y cenizas. Finalmente, se retiró de la mufla, se enfrió y nuevamente se pesó (crisol+ muestra de sedimento), (Figura 7).



*Figura 7.* Proceso de ignición  
a) peso inicial del sedimento, b) muestra a 100°C, c)  
muestra a 500°C, d) peso de cenizas

El % de materia orgánica se calculó mediante la ecuación 3 descrita en el trabajo de Marin & Antonio (2003).

$$\text{Ecuación 3. } LOI_{550} = ((DW_{110} - DW_{550}) / DW_{110}) \times 100$$

Donde:

$DW_{110}$ : representa el peso seco de la muestra antes de la combustión a 110°C.

$DW_{550}$ : representa el peso seco de la muestra después de la combustión a 550°C.

### 3.3.2 Estandarización de la PCR en tiempo real

La PCR en tiempo real o qPCR se implementó para la detección y cuantificación del eDNA de *P. reticulata* de muestras de agua y sedimento. La técnica mediante una curva estándar comparó la concentración desconocida de eDNA de las muestras del experimento y determinó sus valores. En la técnica de qPCR se estandarizó la temperatura de los primers ( $T_m$ ), volumen final de reacción y la curva estándar.

#### a. Temperatura de amplificación de primers

La estandarización de la qPCR se realizó mediante el equipo QuantStudio 3 Real-Time PCR System, Tiene una tecnología Veriflex™ que permite trabajar con tres zonas de temperatura independiente para la optimización de la PCR. Con el fin de determinar la temperatura óptima de amplificación de los primers, se varió por gradiente la temperatura de hibridación 60°C, 63°C y 66°C. En la estandarización se utilizó ADN extraído de muestras de tejido con concentración 10 ng/μl y la reacción maestra descrita en la

Tabla 6. Las condiciones de reacción del sistema fueron: 50°C por 2min, 95°C por 10min y 35 ciclos de: 95°C 15seg y 60°C por 1min. La reacción maestra se preparó en una zona estéril utilizando una cámara de flujo laminar, exceptuando el ADN, éste, se agregó a la reacción maestra fuera de la cámara. Para este procedimiento se usó

microtubos de 0.1 ml (applied biosystems™) diseñados para el equipo QuantStudio 3 Real-Time PCR System.

Tabla 6  
*Reacción maestra de qPCR*

Componentes	Cantidad
SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal	12.5µl
forward primer, 10 µM	0.5 µl
reverse primer, 10 µM	0.5 µl
ROX	0.5 µl
ADN 10ng	11ul
Agua estéril	
Volumen total	25ul

Fuente: Adquirido de la casa comercial ThermoFisher.

b. Volumen final de reacción

Con la finalidad de optimizar reactivos, se preparó dos reacciones maestras con diferentes volúmenes finales: 25µl y 10µl. Se mezcló los componentes de reacción en una zona estéril utilizando una cámara de flujo laminar, partiendo del protocolo general establecido por SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal, (Tabla 7).

Tabla 7  
*Reacción maestra de qPCR. Comparación de volúmenes de reacción final*

Componentes	Cantidad	Cantidad
SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal	12.5µl	5ul
Forward primer, 10 µM	0.5 µl	0.2
reverse primer, 10 µM	0.5 µl	0.2
ROX	0.5 µl	0.2
ADN 10ng	11ul	4.4ul
Agua estéril		
Volumen total	25ul	10ul

Fuente: Adquirido de la casa comercial ThermoFisher

c. Construcción de la curva estándar

Los experimentos de curva estándar determinaron la cantidad absoluta del gen diana en una muestra. Se construyó la curva a partir de diluciones seriadas de una cantidad conocida de ADN. El ADN extraído de muestras de tejido previamente descrito en el apartado 3.2.2. Se seleccionó una muestra y se cuantificó por espectrofotometría, para ello se usó el equipo Epoch 2 Microplate Spectrophotometer – MARCA biotek. Una vez conocida la concentración y calidad, se diluyó el ADN a una concentración de 20ng/μl en volumen de 50 μl., a partir de ésta concentración se desarrolló las siguientes diluciones que tuvieron una relación 1:2. Se generaron seis puntos (20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62μg/μl) con volúmenes finales de 50μl, (Figura 8).Se empleó la reacción maestra descrita en la Tabla 7 con un volumen final 10μl y las condiciones de reacción del sistema: 50°C por 2min, 95°C por 10min y 35 ciclos de: 95°C 15seg y 60°C. Se agregó controles negativos (agua ultra pura, tipo 1).

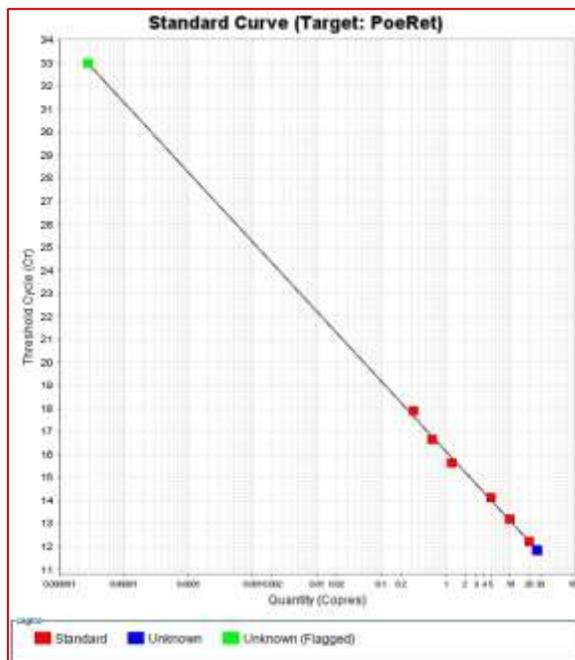


Figura 8 Construcción de la Curva estándar

Una vez estandarizada la curva estándar, se analizaron las 72 muestras (agua y sedimento) del experimento. En cada ensayo se amplificó 24 muestras por duplicado, además se incluyó las diluciones de la curva estándar, un control positivo (ADN de tejido) y un negativo (una muestra sin ADN de la especie), según lo recomendado por Jelger Herder, (2014). Al final del ensayo se generó un documento donde se analizó la curva de amplificación, curva de fusión y las concentraciones de las muestras.

### 3.4 Evaluación de la concentración del eDNA

Una vez obtenido los valores de las concentraciones del eDNA tanto de muestras de agua como sedimento aplicando qPCR, se diseñó un experimento para evaluar la influencia de las variables independientes (densidad de individuos, tipo de muestra ambiental, y tiempo) en la concentración de eDNA. Se evaluaron tres factores en estudio i) tratamiento, ii) día de muestreo y iii) medio. El primer factor en estudio (tratamiento) tuvo 3 niveles (30 peces, 15 peces, 10 peces), el segundo factor (día de muestreo) constó de 3 niveles (6 días con peces, 1 día sin peces, 6 días sin peces) y el tercer factor (medio) de 2 niveles (agua, sedimento), (Tabla 8).

*Tabla 8*  
Codificación de las variables independientes

Variable	Descripción	Código
Tratamiento	30 peces	T1
	15 peces	T2
	10 peces	T3
Día de muestreo	6 días con peces	C1
	1 día sin peces	C2
	6 días sin peces	C3
Medio	Agua	M1
	Sedimento	M2

La variable evaluada fue concentración de eDNA (ng/μl). Esta variable fue evaluada mediante un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas con arreglo factorial ((tratamiento x tipo de muestra ambiental) + día de muestreo). Se consideró realizar cada interacción por triplicado. Los factores que mostraron significancia estadística fueron sometidos a una prueba a posterior de Tukey al 5%.

Considerando que, los datos originales no cumplieron con el supuesto de normalidad ni con el supuesto de homocedasticidad para los diferentes niveles del medio, se transformó la variable dependiente mediante la función  $y = \left( \text{Ln} \left( 1 + \text{concentración del eDNA} \left( \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) * 1000 \right) \right)^{\frac{2}{3}}$ . Adicionalmente, se realizó una prueba de esfericidad de Mauchly para incrementar la robustez del análisis.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

Para llevar a cabo la estandarización del método de extracción y purificación del eDNA en la especie *P. reticulata* en muestras de agua y sedimento, se utilizó protocolos y metodología de colección de la muestra, extracción de ADN, elaboración de primers y técnicas de amplificación (PCR), generando los siguientes resultados:

#### 4.1 Extracción, cantidad, pureza e integridad del ADN

##### 4.1.1 Muestras de tejido

En cuanto al ADN extraído de las muestras de tejido tanto de aleta como de cola de la especie en estudio se encontró que estas presentaron concentraciones de ADN mayores a 200 ng/μl y la pureza de ADN en las seis muestras se encontró dentro del rango de aceptabilidad de 1.8 y 2 (Tabla 9).

Tabla 9  
*Concentración y pureza del ADN extraído de muestras tejido*

Tipo de tejido	Pureza del ADN Relación A260/280	Concentración de ADN (ng/μl)
Aleta1	1.896	302.35
Aleta 2	1.918	299.65
Aleta 3	1.962	303.85
Cola1	1.986	236.70
Cola2	1.975	197.00
Cola3	1.977	190.55

La integridad del ADN genómico basado en el gel de agarosa presentó bandas integras en todas las muestras, sin embargo, se pudo observar un barrido ligero a lo largo del gel como se puede ver en la Figura 9.



Figura 9. Gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del ADN extraído de tejido Ldd, marcador molecular de 1Kb; cola1-3, ADN de tejido de cola; A. dorsal y aleta 1-2 ADN de tejido de la aleta; CN, control negativo; SM, carril sin muestra.

#### 4.1.2 Muestras de agua

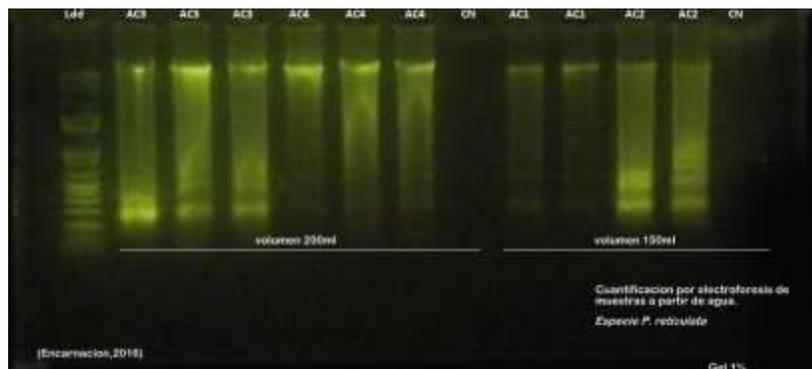
El eDNA extraído de dos volúmenes de agua utilizando el protocolo MasterPure arrojaron concentraciones de aproximadamente 100 ng/μl utilizando el volumen de agua de 200 ml y 90 ng/ul utilizando el volumen de 150 ml. Las muestras de ADN no mostraron contaminación de sales ni residuos proteicos, cumpliendo su índice de pureza los parámetros establecidos de 1.8-2, (Tabla 10). Se eligió en el presente estudio trabajar con el volumen de agua de 200 ml, porque presento mayor concentración de ADN (110.35 ng/μl y 146.15 ng/μl).

Tabla 10

*Concentración y pureza de ADN extraído de agua con volúmenes de 150 y 200ml*

Volumen 150ml	Pureza del ADN Relación A260/280	Concentración de ADN (ng/μl)	Volumen 200ml	Pureza del ADN Relación A260/280	Concentración de ADN (ng/μl)
AC1	1.819	72.1	AC3	1.927	110.35
AC2	1.886	86.3	AC4	1.991	146.15

Por otra parte, la integridad del ADN extraído de muestras de agua de 200 y 150 ml presentó signos de degradación, las bandas revelaron una ligera pérdida de definición y un barrido a lo largo del gel (Figura 10).



*Figura 10.* Gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del ADN extraído de muestras de agua de 200ml y 150ml  
Ldd marcador molecular de 1Kb; AC3-AC4 (ADN extraído de un volumen de 200ml); CN, control negativo; AC1-AC2 (ADN extraído de un volumen de 150ml).

#### 4.1.3 Muestras de sedimento

Las muestras de sedimento tratadas con el protocolo MasterPure epicenter modificado mostraron concentraciones altas de ADN, con promedios aproximados de 350 ng/μl, su índice de pureza presentó datos dentro del rango aceptable de 1.8-2, (Tabla 11).

Tabla 11

Concentración y pureza del ADN *extraído* de sedimento

Muestra	Pureza de ADN Relación A260/280	Concentración de ADN (ng/μl)	Muestra	Pureza de ADN Relación A260/280	Concentración de ADN (ng/μl)
1Z.6	1.78	338.85	3Z.6	1.981	495.12
1Y.6	1.892	209.83	3Y.6	1.872	170.83
1X.6	1.745	344.67	3X.6	1.781	210.23
2Z.6	1.97	625.21	1Z.1s	1.841	141.23
2Y.6	1.956	267.91	1Y.1s	1.952	894.4
2X.6	1.823	219.89	1X.1s	1.993	313.34

En cuanto a la integridad de eDNA de muestras de sedimento utilizando el protocolo MasterPure de epicentre se pudo apreciar en el gel de agarosa una banda única sin signos de degradación, Figura 11.



Figura 11. Gel de agarosa al 1% para visualizar la integridad del ADN extraído de muestras de sedimento mediante el protocolo de MasterPure de epicentro. Ldd, marcador molecular de 1Kb; 1Z.6 – 1X.1s, muestras de sedimento.

#### 4.2 Elaboración y validación *in silico* de primers.

Se elaboró primers específicos para la especie *P. reticulata* de 149 pb a partir del gen citocromo b de ADN mitocondrial, utilizando una secuencia consenso obtenida

posterior a la alineación de secuencias de la especie *P. reticulata* extraídos de la base de datos GenBank. En la Tabla 12 se detalla las características de cada primer.

Tabla 12  
Características de primers específicos para *P. reticulata*

Nombre Primer	Secuencia Primer 5'-3'	Longitud (bp)	Tm(°C)	GC(%)	Tamaño amplicon
PoRet Fwd	AGGATTATGCCTAGTTGCC	20	59.8	50	149
PoRet Rev	CTCCATTAGCGTGTATGTTG	22	60.8	50	

CG

Para garantizar que los primers seleccionados amplifiquen la región genómica de interés, se evaluó la especificidad para la detección y la amplificación del tamaño del amplicon. El análisis *in silico* del par de primers arrojaron un porcentaje de identidad y de cobertura de la secuencia diana del 100%, los primers forward y reverse produjeron un E-value de 0.027 para más de 10 secuencias parciales para la especie *P. reticulata* (Figura 12). El valor *E* describe el número de visitas que uno puede “esperar” ver por casualidad cuando busca en una base de datos de un tamaño particular, cuanto más bajo es el valor *E*, o cuanto más se acerca a cero, más “significativa” es la coincidencia (Hernández & Valdéz, 2018).

Descripción	Match	Porcentaje partido	Porcentaje total	Cobertura de consulta	Valor E	Por línea	Adhesión
<a href="#">Bona de Pocilloa reticulata gen.Poet cytochrome b (cod) sub unidades mitocondrial</a>	44.1	44.1	100%	100%	0.027	100.00%	<a href="#">gi 836556581 KP250413.1</a>
<a href="#">Bona de Pocilloa reticulata 6290 gen.del citocromo b (cod) sub unidades mitocondrial</a>	44.1	44.1	100%	100%	0.027	100.00%	<a href="#">gi 836556441 KP2499336.1</a>
<a href="#">Bona de Pocilloa reticulata 6210 gen.del citocromo b (cod) sub unidades mitocondrial</a>	44.1	44.1	100%	100%	0.027	100.00%	<a href="#">gi 836556439 KP2499337.1</a>
<a href="#">Pocilloa reticulata haplotipo 52 gen.citocromo b sub unidades mitocondrial</a>	44.1	44.1	100%	100%	0.027	100.00%	<a href="#">gi 661788233 KJ415728.1</a>
<a href="#">Pocilloa reticulata haplotipo 51 gen.citocromo b sub unidades mitocondrial</a>	44.1	44.1	100%	100%	0.027	100.00%	<a href="#">gi 661788231 KJ415728.1</a>
<a href="#">Pocilloa reticulata haplotipo 50 gen.citocromo b sub unidades mitocondrial</a>	44.1	44.1	100%	100%	0.027	100.00%	<a href="#">gi 661788229 KJ415727.1</a>
<a href="#">Pocilloa reticulata haplotipo 49 gen.citocromo b sub unidades mitocondrial</a>	44.1	44.1	100%	100%	0.027	100.00%	<a href="#">gi 661788227 KJ415726.1</a>
<a href="#">Pocilloa reticulata haplotipo 48 gen.citocromo b sub unidades mitocondrial</a>	44.1	44.1	100%	100%	0.027	100.00%	<a href="#">gi 661788225 KJ415725.1</a>
<a href="#">Pocilloa reticulata haplotipo 47 gen.citocromo b sub unidades mitocondrial</a>	44.1	44.1	100%	100%	0.027	100.00%	<a href="#">gi 661788223 KJ415724.1</a>
<a href="#">Pocilloa reticulata haplotipo 46 gen.citocromo b sub unidades mitocondrial</a>	44.1	44.1	100%	100%	0.027	100.00%	<a href="#">gi 661788221 KJ415723.1</a>

Figura 12. Secuencias del análisis BLAST de los primers: forward y reverse

### 4.3 Amplificación del ADN mediante PCR

La temperatura de hibridación se seleccionó tomando en cuenta la intensidad de los fragmentos amplificados en el gel, mediante la apreciación cualitativa de las bandas (Marrero-Domínguez et al., 2016). El par de primers amplificaron un fragmento de 149 pb en todas las temperaturas evaluadas (Figura 13). Sin embargo, a una temperatura de 65°C se apreció una banda integra de gran tamaño y con mayor intensidad en comparación a las otras bandas. Esta temperatura de 65°C se evaluó en muestras ambientales donde amplificó bandas inespecíficas en todas las muestras. Sin embargo estas bandas desaparecieron cuando se aplicó una temperatura más alta de 66°C que a pesar de presentar una banda de menor volumen e intensidad comparada con la de 65°C generó una mayor estabilidad de la unión de los primers, amplificando bandas específicas de 149 pb en las muestras ambientales evaluadas (Arana Labrada et al., 2016).

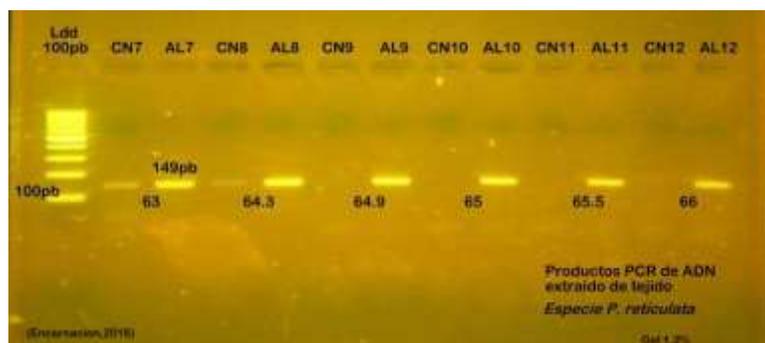


Figura 13. Amplificación de productos PCR por gradiente de temperatura de hibridación de los primers.

Ldd, marcador molecular 100pd; CN7-12, control negativo; AL7-12, muestras de ADN de tejido

Asimismo, utilizando la temperatura de hibridación de los primers a 66°C y la reacción maestra con la TaqMan environmental permitió amplificar un producto PCR de 149 pb de la especie *P. reticulata*, como se indica en la Figura 14. En cambio, las muestras tratadas con la reacción maestra que contenía la GreenGoTaq no amplificaron. Por

tanto, se demostró que la TaqMan ambiental es más sensible para la amplificar el ADN de muestras de agua.

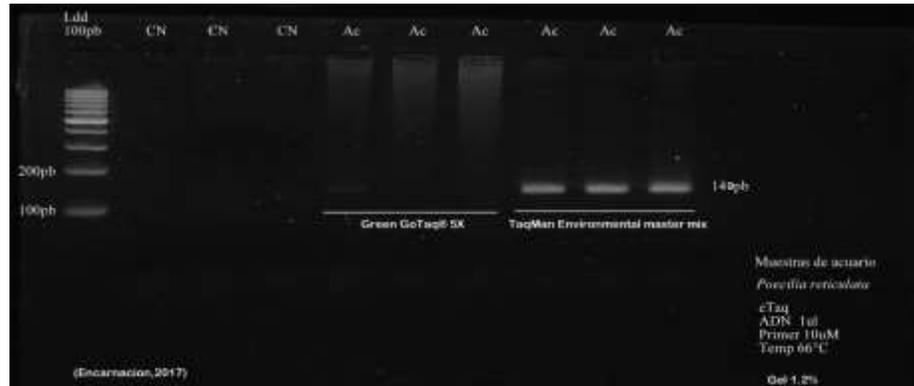


Figura 14. Amplificación de ADN extraído de muestras de agua utilizando la TaqMan Environmental y Green GoTaq. Ldd, marcador molecular 100pd; CN, control negativo; Ac, eDNA extraído de agua.

Con respecto con la amplificación de productos PCR de ADN a partir de muestra de sedimento presentó bandas nítidas de tamaño de 149pb (Figura 15). Estos resultados demostraron que es posible amplificar ADN de *P. reticula* extraído tanto de muestras de agua como de sedimento, es decir la técnica de la PCR permitió detectar la especie en muestras ambientales.

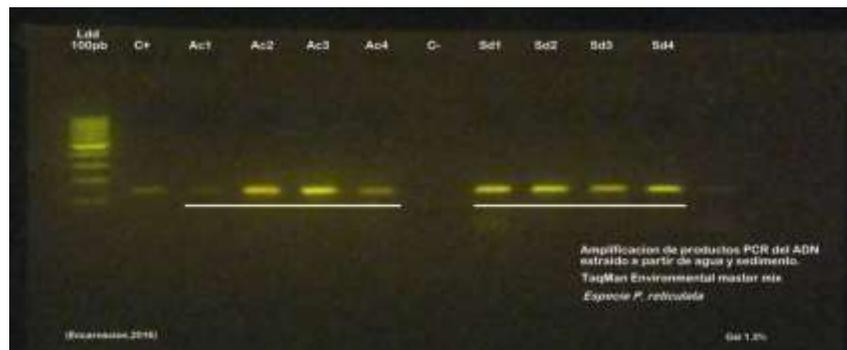


Figura 15. Amplificación de productos PCR de ADN de *P. reticulata* extraído de muestras de agua y sedimento. C+, control positivo (ADN de tejido); Ac1-4, eDNA de agua; Sd, eDNA de sedimento; C-, control negativo.

#### **4.4 Cuantificación de la concentración del eDNA mediante PCR en tiempo real**

Para llevar a cabo la cuantificación se procesó un total de 72 muestras, distribuidas de la siguiente manera: 36 muestras de agua y 36 de sedimento utilizando los protocolos descritos en los apartados “3.2.1” y “3.2.2”. Las concentraciones de ADN genómico extraído de las muestras de agua en su mayoría presentaron valores mayores a 100 ng/ $\mu$ l, en cuanto a las muestras de sedimento presentaron valores mayores a 200 ng/ $\mu$ l.

En cuanto a la pureza de ADN las 36 muestra de agua mostraron un promedio de 1.907, lo cual indica que se encuentra dentro del rango de aceptabilidad (1.8-2) en cambio, las muestras de sedimento arrojaron un promedio de 1.457, valores que se encuentran por debajo de lo estimado para ser considerado un ADN puro, Tabla 13.

Por otra parte, en el análisis de la materia orgánica el sedimento presentó un 34.168% de materia orgánica, 2.8g de arena y 5.4g de piedras.

Tabla 13

*Concentración y pureza del ADN de agua y sedimento de muestras experimentales*

Días de muestreo	Trt	Código	Muestras de agua		Muestras sedimento		
			Pureza A260/280	Concentración del eDNA ng/ul	Pureza A260/280	Concentración del eDNA ng/ul	
6 DIAS CON PECES	T1	1A.6	1.8935	246.9	1.4935	267.9	
		1B.6	1.8785	654.4	1.4405	778.85	
		1C.6	1.966	219.6	1.485	338.85	
	T2	2A.6	1.892	203.3	1.4375	388.45	
		2B.6	1.918	88.9	1.53	110.95	
		2C.6	1.871	139.5	1.501	209.8	
	T3	3A.6	1.8775	45.15	1.471	219.4	
		3B.6	1.962	109.8	1.4595	344.65	
		3C.6	1.993	99.95	1.463	370.95	
	1 DIA SIN PECES	T1	1A.1s	1.88	341.2	1.442	625.2
			1B.1s	1.932	932.6	1.6185	148.9
			1C.1s	1.987	127.2	1.4165	797.95
T2		2A.1s	1.8925	163.9	1.638	158.4	
		2B.1s	1.917	139.85	1.2375	782.3	
		2C.1s	1.898	186.6	1.373	894.5	
T3		3A.1s	1.835	45.5	1.421	870.55	
		3B.1s	2.0285	285.7	1.4315	313.3	
		3C.1s	1.967	233.3	1.343	915.75	
6 DIAS SIN PECES		T1	1A.6s	1.8645	183.05	1.4715	141.2
			1B.6s	1.7895	182.4	1.48	153.2
			1C.6s	1.895	178.4	1.433	284.15
	T2	2A.6s	1.982	101.78	1.434	495.1	
		2B.6s	1.957	89.34	1.438	414.45	
		2C.6s	1.989	54.903	1.4715	304.45	
	T3	3A.6s	1.7755	43.35	1.495	170.8	
		3B.6s	1.8025	85.25	1.4565	263.55	
		3C.6s	1.8545	136.2	1.4595	210.2	

#### 4.4.1 Estandarización de la técnica PCR en tiempo real

La amplificación mediante la variación de la temperatura de los primers por gradiente demostró que los primers trabajan con mayor eficiencia a temperatura de hibridación 60°C en la técnica PCR a tiempo real. La curva de amplificación a 60°C presentó mayor fase logarítmica, ideal para el estudio, (Figura 16).

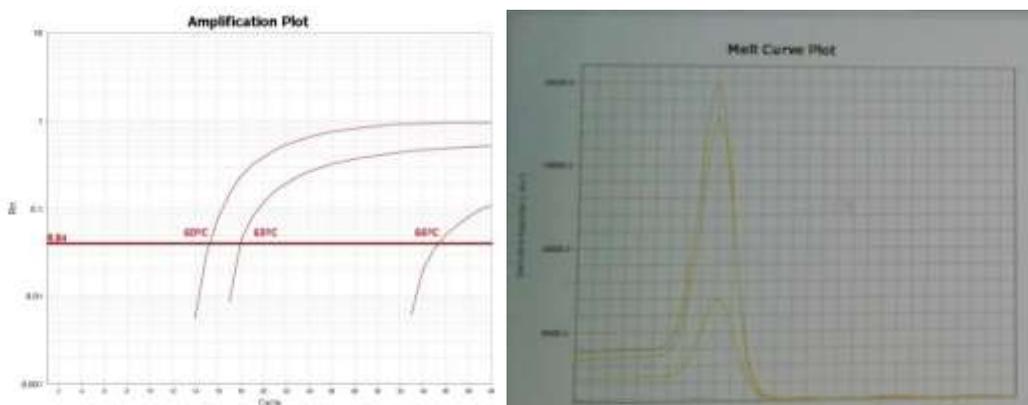


Figura 16. Curva de amplificación y fusión de la temperatura de hibridación de los primers por gradiente

Los valores de Ct variaron considerablemente empleando las tres temperaturas de hibridación como se indica en la Tabla 14.

Tabla 14.

*Valores de los Ct de la estandarización de temperatura de hibridación de los primers por gradiente*

Código	Muestra	Primers	Ct	Tm
A1	Blanco 60°C	Poe_Ret	Indeterminado	66.001
A1	ADN tejido 60°C	Poe_Ret	15.09	74.039
A2	Blanco 63°C	Poe_Ret	Indeterminado	66.001
A2	ADN tejido 63°C	Poe_Ret	18.08	75.098
A3	Blanco 66°C	Poe_Ret	Indeterminado	66.001
A3	ADN tejido 66°C	Poe_Ret	30.390	75.098

Se determinó mediante la aplicación de la PCR en tiempo real que un volumen final de 10  $\mu$ l en la reacción maestra es suficiente para obtener resultados positivos (Tabla 15). Los valores de Ct (ciclo threshold), definido por el punto donde la línea “threshold” corta con las curvas de amplificación, para 25 $\mu$ l y 10 $\mu$ l de reacción fueron 13 ciclos. Las curvas de fusión no mostraron amplificaciones de productos inespecíficos y solo se destaca un producto específico con un Tm a 74.4124°C.

Tabla 15

*Valores de amplificación con un volumen final de 25 $\mu$ l y 10  $\mu$ l en la reacción maestra*

Código	Muestra	Primer		Ct	Tm
A1	Blanco	Poe_Ret	NTC	30.2543	74.5615
A2	Blanco	Poe_Ret	NTC	27.6149	74.4124
A3	A.25 $\mu$ l	Poe_Ret	MUESTRA	13.0459	74.4124
A4	A.25 $\mu$ l	Poe_Ret	MUESTRA	13.8969	74.4124
A5	A2. 10 $\mu$ l	Poe_Ret	MUESTRA	13.6792	74.4124
A6	A2. 10 $\mu$ l	Poe_Ret	MUESTRA	13.91	74.4124

La técnica PCR en tiempo real permitió detectar y amplificar ADN de la especie *P. reticulata* en muestras de agua y sedimento. A pesar de que la relación de pureza  $A_{260}/A_{280}$  para el ADN extraído de muestras de sedimento fue menor a 1.8-2, no fue impedimento para la amplificación de las muestras. La Tabla 16 presenta el número de ciclos (Ct) dada por la curva de amplificación del duplicado de cada muestra.

Tabla 16

*Datos de amplificación del ADN de *P. reticulata* extraído de muestras de agua y sedimento*

Código	Muestra	Primer		Ct	Tm
A1	Blanco	Poe_Ret	NTC	Indeterminado	65.9184
A2	Blanco	Poe_Ret	NTC	Indeterminado	92.6029
A3	1C.6	Poe_Ret	UNKNOWN	12.6102	74.2666
A4	1C.6	Poe_Ret	UNKNOWN	14.5235	74.1176
A5	1Y.6	Poe_Ret	UNKNOWN	32.0075	74.2666
A6	1Y.6	Poe_Ret	UNKNOWN	25.1827	74.4157

Las curvas de fusión (Tm) no muestran amplificaciones de productos inespecíficos y solo se destaca un producto específico a 74 °C. Las muestras de agua fueron representadas con el código 1C.6 y las de sedimento con el 1Y.6.

#### 4.4.2 Construcción de la curva estándar y análisis de las muestras del experimento

En la Figura 17, se presenta gráficamente la curva de aplicación y la curva estándar construida con 6 puntos, partiendo de una concentración de 20 hasta 0.3125 ng/μl. La curva de fusión (recuadro interior) no indica amplificaciones de productos inespecíficos y solo destaca un producto con un Tm a 74.42°C, (Tabla 17). De acuerdo con los valores de la ecuación de recta dados por la curva estándar después de su amplificación, mostró los siguientes datos: pendiente (-3.028), el intercepto (16) y el coeficiente de correlación 0.995. Este último valor demostró el ajuste de la línea de regresión y los puntos de Ct del estándar (dilución).

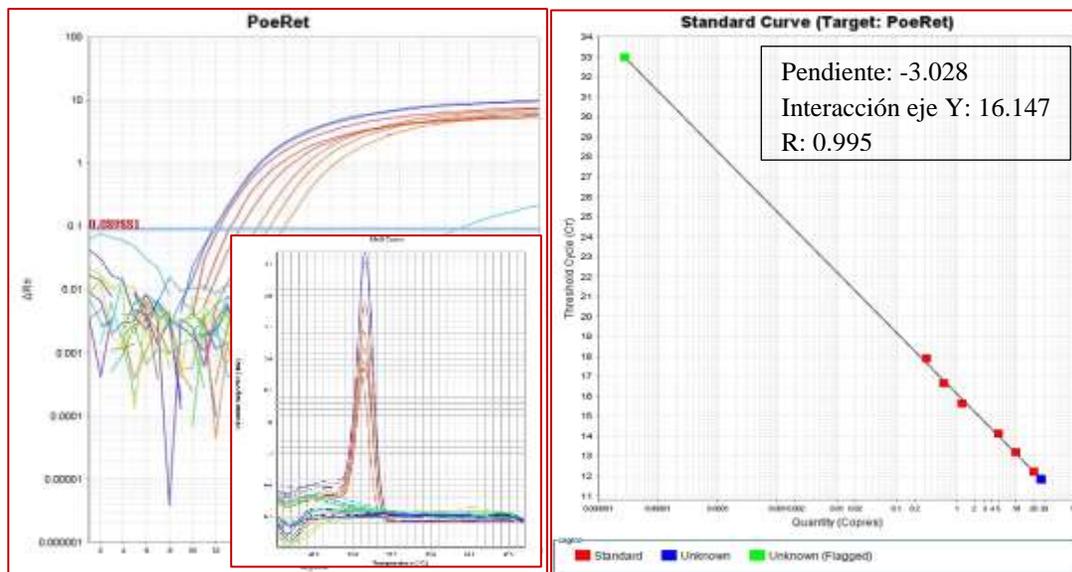


Figura 17. Curva de amplificación y curva estándar obtenida según los resultados de las diluciones

A partir de la estandarización de la curva estándar se analizaron las 72 muestras extraídas del experimento *in vitro*, la extrapolación de las muestras con la curva estándar permitió conocer la concentración del ADN de *P. reticulata* en cada una de las muestras.

Los Ct que se obtuvieron en amplificación de la curva estándar se detallan en la Tabla 17

Tabla 17

*Datos de la amplificación de la curva estándar*

Código	Muestra	Primer	Cantidad ng/ul	Ciclo Ct	Tm °C
A1	Poe_Ret	Standard	20	12.1977	74.4292
A2	Poe_Ret	Standard	10	14.1656	74.4292
A3	Poe_Ret	Standard	5	14.1208	73.8333
A4	Poe_Ret	Standard	2.5	-----	-----
A5	Poe_Ret	Standard	1.25	15.6481	74.2808
A6	Poe_Ret	Standard	0.625	16.6296	74.2802
A7	Poe_Ret	Standard	0.3125	17.8876	74.4292
A8	Blanco	Poe_Ret	Blanco	indeterminado	77.4085
A9	Blanco	Poe_Ret	Blanco	Indeterminado	82.6224
A10	Aleta	Poe_Ret	Muestra	26.5976	11.8319
A11	Aleta	Poe_Ret	Muestra	25.8943	11.8671

### 4.3 Análisis de la concentración del eDNA

Una vez realizado el ANOVA para medidas repetidas se encontró significancia para las interacciones: tratamiento por medio ( $F=21.21$ ;  $gl=2, 30$ ;  $p<0.001$ ) y tratamiento por día de muestreo ( $F= 2.97$ ;  $gl=4,30$ ;  $p=0.030$ ), (Figura 19). Adicionalmente, se determinó significancia para los factores medio ( $F=236.24$ ;  $gl=1,15$ ;  $p<0.001$ ), (Anexo 3) y tratamiento ( $F=42.61$ ;  $gl= 2,30$ ;  $p< 0.001$ ), (Anexo 4).

La prueba de significancia Tukey al 5% detectó cuatro rangos de significancia estadística (Figura 18; Anexo 1 ). El rango mayor fue la interacción entre el tratamiento 1 y el medio 1 con un valor de 0.828 ng/μl; el menor rango fue en la interacción del medio 2 con el tratamiento 3 con un valor de 0.024 ng/μl.

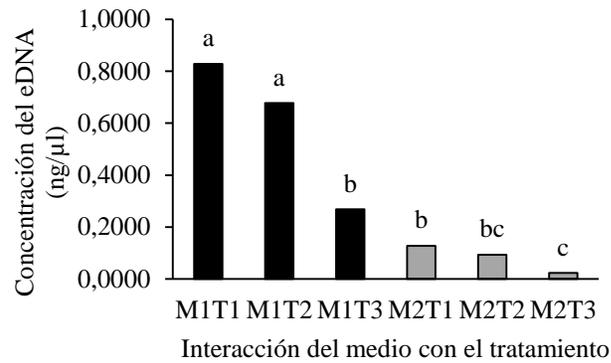


Figura 18. Rangos de significancia estadística de la interacción: medio con tratamiento

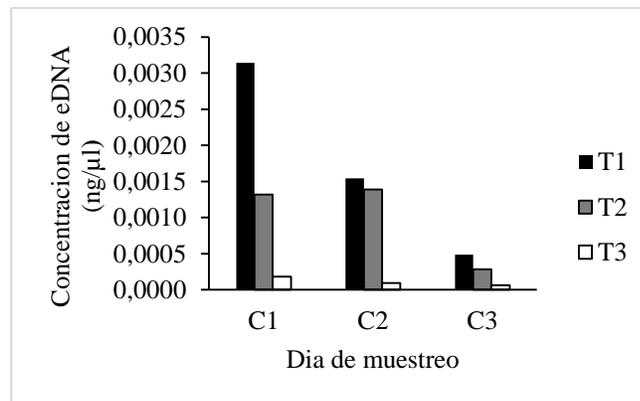


Figura 19. Concentración de eDNA de la interacción: tratamiento y día muestreo.

De igual manera, se encontró dos rangos de significancia estadística para el día de muestreo con valores de 0,4273 y 0,2108 ng/μl (Figura 20; Anexo 2)

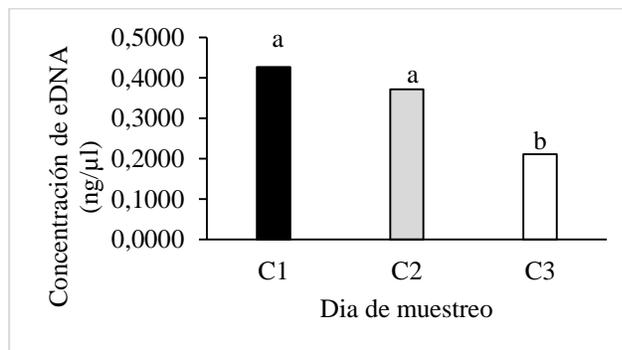


Figura 20. Rangos de significancia estadística del día de muestreo

## **CAPÍTULO V**

### **DISCUSIÓN**

La intervención oportuna en la detección de especies invasoras ya sea a bajas densidades, en una invasión temprana o después de un intento de erradicarlas, es clave para el control exitoso de estas especies (Goldberg et al., 2013, Ficetola et al., 2008). Una alternativa atractiva ante esta situación es el ADN ambiental (eDNA), la captura de este material genético que los organismos liberan al ambiente permite biomonitorizar especies aun cuando estas se encuentran a bajas densidades (Pilliod, Goldberg, Laramie, et al., 2013). La selección de protocolos de colección de muestra y extracción de eDNA son cruciales para la captura de este material genético (Goldberg et al., 2015) ya que el uso de diferentes protocolos puede variar los resultados y su interpretación (Deiner et al. 2015 y Goldberg et al., 2016;).

En la primera etapa de esta investigación se aplicó diferentes protocolos y metodologías para la colectación de muestras, extracción y amplificación del ADN que permitieron estandarizar el método del eDNA para muestras de agua y sedimento, la estandarización de este método siguió una secuencia de pasos sugerido por Jelger Herder (2014) y Pilliod et al., (2013). Varias autores han adaptado esta metodología del eDNA en diferentes medios (agua, sedimento, suelo, etc ) para la detección de especies invasoras, principalmente peces (Wilcox et al., 2013; Collins *et al.*, 2012; Jerde *et al.*, 2011 y Baldigo et al., 2017) y anfibios (Dejean et al., 2012; Rees et al., 2017). Los hallazgos de la adaptación de esta metodología han hecho del método del eDNA una herramienta molecular prometedora en la detección de una única especie o de un ecosistema completo (Lynsey et al., 2018; Lawson Handley, 2015).

En este estudio se adoptó la metodología del eDNA para la detección de la especie *P. reticulata*. La calidad de ADN y los primers específicos de la especie desarrollados en este estudio fueron factores esenciales para su detección por PCR. El ADN extraído tanto de la aleta como de la cola de la especie en estudio *P. reticulata*, presentaron una cantidad alta de ADN y pureza en el rango 1.8-2. La cuantificación del ADN demostró que los dos tipos de tejido ya sea aleta o cola representaron una fuente importante de ADN por su alto contenido y por su facilidad de colecta en comparación con otros tejidos (músculo, sangre) (Wasko et al., 2003).

Estos resultados coinciden con Lopera-Barrero et al., (2008), quien obtuvo cantidades de ADN genómico similares al comparar dos tipos de tejido: larva y aleta, arrojando cantidades altas de ADN tan conveniente como la de otros tejidos (músculo, hígado, sangre). Asimismo, Wasko et al., (2003) en un estudio de muestreo genético no destructivo en peces obtuvo resultados exitosos al extraer cantidades altas de ADN tanto de aleta como de escamas, con una cantidad promedio de 200 ng/μl. Una investigación similar realizada por Nam et al., (2003) utilizando tejido de aleta en un análisis de peces transgénicos, encontró una cantidad alta de ADN y una pureza óptima para amplificaciones por PCR. Por lo tanto, según los resultados obtenidos en esta investigación se cree que por su similitud en la estructura anatómica entre las dos partes del pez no existió diferencias en la cantidad de ADN extraído (Wasko et al., 2003).

La captura del eDNA por filtración fue el único método probado en este estudio, ya que actualmente es el método de captura de ADN más utilizado en investigaciones de eDNA a partir de muestras de agua (Jeunen et al., 2019). Una investigación previa realizada en un ecosistema de agua dulce muestran que la filtración supera en rendimiento de ADN tanto a la centrifugación como la precipitación (Hinlo et al., 2017). Se demostró en este estudio que el volumen de agua filtrada usando el filtro de nitro celulosa de 0.47 μm capturó una mayor cantidad de eDNA usando un volumen de 200ml en comparación al de 150 ml, al igual que Geerts et al., (2018), quien

identificó la especie invasora *Procambarus clarkii* filtrando 200 ml de muestras de campo y de laboratorio .

Estos resultados también se relacionan con el estudio realizado por Turner et al., (2014) donde compara diferentes volúmenes de agua de muestra para la captura óptima del eDNA por filtración, encontrando mayor cantidad de eDNA utilizando un volumen de 250 ml comparado con 150 ml , ya que considera que utilizando volúmenes mayores a 250 ml se puede dar la sobresaturación del filtro. En una investigación similar Jeunen et al.,( 2019) menciona que el volumen de muestra puede exceder el límite de los filtros con poros muy pequeños (0.2  $\mu\text{m}$ ) es por eso que recomienda usar filtros de 1.2  $\mu\text{m}$  y un volumen que no supere los 500 ml. En este estudio no se usó volúmenes superiores a los 200 ml ya que era probable sobresaturar el filtro tomando en cuenta que se usó un tamaño de poro de 0.47  $\mu\text{m}$ .

Por otra parte, en esta investigación se demostró la efectividad del protocolo Masterpure marca epicentre para la extracción de ADN a partir de muestras de tejido, agua y sedimento. La pureza del eDNA se evaluó mediante la relación de absorbancia  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  ( $A_{260}/A_{280}$ ). Se consideró ADN puro cuando la proporción se encontró dentro del rango de 1.8 a 2 (Lopera-Barrero et al., 2008). Una relación  $A_{260}/A_{280}$  inferior a 1.8 sugirió la presencia de proteínas, sales o solventes, mientras que una relación  $A_{260}/A_{280}$  superior a 2.0 indicó la presencia de ARN coextraído (Han et al., 2018). En este estudio se demostró que, la mayoría de las muestras examinadas de tejido y agua presentaron un ADN puro y una cantidad alta de ADN con valores superior a 200 ng/ $\mu\text{l}$ . Pero el ADN extraído de muestras de sedimento arrojó valores inferiores a 1.8 en su pureza, de modo que fue probable la presencia de proteínas, sales o solventes. A pesar de esta probabilidad en el ADN extraído de las muestras de sedimento se logró su amplificación.

Los resultados de esta investigación demostraron la especificidad de los primers para *P. reticulata*. Los primers amplificaron una región específica de 149 pb del gen citocromo b (cyt-b) del ADN mitocondrial de la especie. Tsuji et al.,(2019), según su investigación informa que el ADN mitocondrial (ADNmt) es usado como marcador genético en la mayoría de estudios debido a su alta tasa de mutación, abundantes copias en una célula (Pilliod, Goldberg, Laramie et al., 2013) y mayor cobertura en bases de datos genéticos. Las principales regiones que han sido utilizadas del ADNmt son: citocromo b (Cyt b) (33%), subunidad citocromo c oxidasa 1 (COI) (30%), D-loop (11%), ARN ribosómico 12S (12S) (6%), ARN ribosomal 16S (16S) (6%) e ITS de ADN nuclear (3%) (Tsuji et al.,2019)

Según Goldberg et al., (2016) y Herder et al., (2013) para aumentar la detección o la especificidad, la estandarización de los primers debe realizar en tres etapas: i) *in silico*, ii) *in vitro* y iii) *in situ* . En este estudio, la validación *in silico* de estos primers arrojó una especificidad del 100% para la especie en estudio *P. reticulata*, además de un E-value de 0.027, lo cual significa que estos primers únicamente pueden amplificar el fragmento de ADN de la especie. Asimismo, la prueba *in vitro* amplificó un fragmento de ADN esperado de 149 pb usando PCR, este proceso se desarrolló utilizando ADN derivado de tejido de la especie *P. reticulata* como lo recomienda Goldberg et al., (2016), lo cual demostró empíricamente la especificidad de los primers.

Los resultados de esta investigación se relacionan con el estudio realizado por Ficetola et al., (2008), donde detectó la presencia de una rana (*Rana catesbeiana*) en ambientes controlados por medio del eDNA y cebadores específicos que amplifican secuencias cortas de cyt-b mitocondrial, demostrando de esta manera la capacidad de la región cyt-b en el desarrollo de primers específicos para especies objetivo para muestras ambientales. Mientras que Erickson et al.,(2016) y Minamoto et al.,(2017) obtuvieron resultados positivos en la detección de la especie carpa (*Cyprinus carpio*) por medio del eDNA en ríos y lagos, usando ADN nuclear y la región D-loop como marcadores

genéticos. En otros estudios Goldberg et al., (2011) y Ficetola et al., (2010), demostraron la importancia de la región de ADN en el desarrollo de primers y su respectivo análisis *in silico*, ya que puede influenciar en los resultados.

En este estudio, se desarrolló ensayos específicos para la especie *P. reticulata* usando la PCR convencional y cuantitativa (qPCR). La PCR convencional amplificó un fragmento de 149 pb a partir de muestras de tejido y muestras ambientales, mediante el control de las siguientes condiciones: temperatura de hibridación de los primers, tipo de ADN polimerasa y la reacción maestra. Según Pilliod et al.,( 2013) la técnica de PCR se puede usar para analizar eDNA, pero también puede generar amplificaciones cruzada y proporcionar resultados falsos positivos. Sin embargo, Dejean et al., (2012) y Jerde et al., (2011), utilizaron el ADN ambiental (eDNA) y la PCR para la detección de las especies invasoras, obteniendo resultados positivos para las especies de rana toro americana *catesbeiana* , carpas asiáticas y una salamandra gigante de Idaho (Goldberg et al. , 2011).

En otro estudio Jerde et al., (2011) encontró limitaciones para estimar la abundancia de peces usando el eDNA y la PCR, ya que el resultado positivo únicamente indicó presencia de la especie en estudio, no abundancia. Debido a que desconoce como la abundancia, el tamaño, el comportamiento u otras características individuales o de la población afectan la intensidad de la banda de eDNA amplificado. Según England et al.,(2005), la única información confiable que puede obtenerse de un resultado positivo es que al menos un individuo o muchos están o han estado presentes en el lugar. A pesar que la técnica de PCR presenta ciertas limitaciones (Tsuji et al., 2019), varios autores han optado por usarla para detectar especies acuáticas: Gobio redondo ( *Neogobius melanostomus* ) (Nathan et al., 2014) , Tilapia del Nilo ( *Oreochromis niloticus* ) (Keskin, 2014), Carpa cabezona ( *Hypophthalmichthys nobilis* ) (Mahon et al., 2013)

En cambio, Lawson Handley, (2015) menciona que la qPCR tiene la ventaja de una sensibilidad mucho mayor comparada con la PCR convencional, de modo que se pueden

detectar concentraciones de eDNA muy bajas y, por definición, la capacidad de cuantificar el número de copias de ADN objetivo que están presentes, es decir, la estimación de abundancia relativa. De igual manera Tsuji et al., (2019) considera que la qPCR tienen una alta especificidad, sensibilidad y capacidad de cuantificación. Según Turner et al., (2015) la concentración de eDNA puede estimarse en función al número de réplicas de PCR, o las copias de ADN calculadas en función de una curva estándar obtenida de concentraciones conocidas de ADN de tejido de la especie en estudio, aunque es considerada una técnica costosa (Nathan et al., 2014), debido a sus reactivos, como la sonda TaqMan o SYBR Green. A pesar de ello, la técnica qPCR se ha convertido en el método más utilizado para la detección específicas en el análisis de eDNA en los últimos años (Tsuji et al., 2019).

Por otra parte, en la segunda etapa de esta investigación se elaboró un experimento *in vitro* en el cual se tomó en cuenta tres factores: el medio (agua y sedimento), tratamiento (número de peces o densidad de peces) y tiempo (día de muestreo) con el fin de evaluar el comportamiento de la concentración de eDNA. Conjuntamente, se diseñó ensayos de PCR en tiempo real con primers específicos de la especie, y, se determinó la concentración del eDNA. Los resultados de este estudio demostraron que el eDNA se encuentra más concentrado por ml de agua que por g de sedimento. Asimismo, se encontró un descenso gradual de la concentración a medida que disminuye la densidad o número de peces, es decir, en el T1 que contenían 30 peces se encontró mayor concentración de eDNA comparado con el T3 con 10 peces. Algo similar ocurrió con la concentración en el tiempo, la cantidad de eDNA disminuyó con el pasar de los días en ausencia de los peces, es decir, existe un proceso de degradación, el cual es más notorio cuando han transcurrido seis días de haber eliminado los peces.

En este estudio, en base al análisis de la concentración de eDNA en los dos medios (agua y sedimento) se encontró una mayor concentración en agua que en sedimento, estos resultados obtenidos son contradictorios a los resultados del estudio realizado por

Turner et al., (2015) donde utilizando la carpa asiática de cabeza grande (*Hypophthalmichthys.spp.*) como modelo de estudio, encontró 8-1800 veces más concentrado el eDNA en sedimento que el agua. Turner et al., (2015) explica que esos resultados pueden darse debido a la sedimentación de partículas que contienen eDNA ya que estas partículas al tener un tamaño  $>1\mu\text{m}$  (Maggi, 2013) no pueden permanecer suspendidas en la columna de agua por mucho tiempo por lo tanto, considera que la acumulación neta (es decir, la precipitación menos la degradación y el transporte) del eDNA es más alta en sedimentos ya que la adhesión del eDNA a partículas orgánicas e inorgánicas evita su degradación rápida (Turner et al., 2015b)

Asimismo, Turner et al. (2015) demostró que el ADN extramembranoso (es decir, moléculas de ADN no protegidas por membranas celulares, orgánicas o virales) se encuentra en mayores concentraciones en el sedimento que en la columna de agua (Cinzia Corinaldesi et al., 2005) y que el ADN microbiano de la columna de agua puede acumularse progresivamente en el sedimento (Corinaldesi et al., 2011), por lo tanto, los resultados sugieren que la sedimentación del ADN extramembranoso podría causar que el eDNA de peces se encuentre más concentrado en los sedimentos que el agua (Turner et al., 2015).

En esta investigación, el proceso de recolección de muestras solo se enfocó a la superficie del sedimento, donde se supone se encuentra la acumulación de eDNA más reciente, debido a que el material genético suspendido dentro de la columna de agua, incluidas las células enteras y ADN extracelular precipita progresivamente en él. Pero Buxton et al. (2017), Levy-Booth et al. (2007) en sus estudios encontraron que el ADN no necesariamente se une al sedimento, el ADN que no se adhiere dentro al sedimento se degrada con mayor rapidez que el ADN unido. Por lo tanto, esto podría explicar la razón del porque se encontró una mayor concentración de eDNA en muestras de agua (Buxton et al., 2018).

A demás, Buxton et al., (2018) demostró que la concentración del eDNA en el sedimento depende del tiempo de permanencia de la especie objetivo en el lugar de estudio (debido a la mínima cantidad de eDNA de 0.0001816 ng/  $\mu$ l extraída al sexto día de haber introducido los peces) y del tipo de sedimento. (Buxton et al. 2017, Levy-Booth et al. 2007) en sus estudios demostraron que la estructura del sedimento puede influir en la concentración del eDNA debido a que depende de la capacidad del ADN para incorporarse al sedimento tomando en cuenta el número de sitios de unión y el mecanismo de unión ya que la absorción del ADN a sustancias minerales y húmicas lo protegen de las ADNasas y nucleasas extracelulares.

Por otro parte, en esta investigación se demostró que la concentración de eDNA descendió gradualmente a medida que disminuyó la densidad o número de peces. De manera que la mayor concentración de eDNA de 0.00184 ng/ $\mu$ l, se encontró en el tratamiento uno que contenían 30 peces y la menor concentración de 0.001319 ng/  $\mu$ l, en el tratamiento tres con 10 peces; estos resultados se relacionan con el estudio realizado por Goldberg et al., (2013) donde demostró una relación significativa entre la densidad de individuos y la cantidad de eDNA utilizando el *Potamopyrgus antipodarum* como modelo de estudio, con un promedio de 22ng de ADN por cada 100 caracoles. Además, demostró que utilizando el método del eDNA pudo confirmar la presencia de esta especie a densidades tan bajas como 11 a 144 caracoles/ m<sup>2</sup>. También Takahara et al., (2012) demostró correlación positiva entre la concentración de eDNA y la biomasa de carpa y una correlación entre el número de carpas y biomasa en acuarios.

También se demostró en esta investigación que la concentración de eDNA disminuyó con el pasar de los días después de la eliminación de los peces, este proceso ocurrió en los medios (agua y sedimento). Sin embargo, en el sedimento fue más notorio el proceso de degradación. De igual manera, se demostró el comportamiento de la concentración de eDNA en la interacción tratamiento y día de muestreo, donde se

observó que la concentración de eDNA en el tiempo está en función de la densidad de peces. La concentración de eDNA en el primer día de muestreo en el tratamiento 1 fue de 0.0031ng/  $\mu$ l, y en el tercer día de muestro (en ausencia de los peces) del mismo tratamiento fue de 0.000485ng/  $\mu$ l, pero si se compara estos datos de la concentración del eDNA con el tratamiento 3, primer día de muestro (0.00018417ng/  $\mu$ l) y tercer día de muestreo ( $6 \times 10^{-5}$ ng/ul) se demuestra que la concentración disminuyó. Por lo tanto, la concentración y persistencia del eDNA dependió del número de peces presentes en los tratamientos.

En un estudio Turner et al., (2015), menciona que la degradación está relacionada con la diferencias de concentración porque la degradación del eDNA generalmente sigue un patrón de descomposición exponencial en el que una concentración inicial más alta crea una persistencia más larga. Por otro lado Dejean et al. (2011) en su estudio pudo detectar hasta después de un mes de la eliminación de su fuente, para las especies: esturión siberiano y renacuajos de rana toro es decir que la persistencia del eDNA fue inferior a un mes. De modo similar Goldberg et al.( 2013), menciona que el eDNA del *Potamopyrgus antipodarum* puede permanecer detectable durante 21 a 44 días después de la eliminación.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 6.1 Conclusiones

- Mediante la aplicación del protocolo modificado de MasterPure se logró estandarizar el método de extracción y purificación del eDNA de *P. reticulata* para muestra de tejido, agua y sedimentos, indicando de esta manera su efectividad. Además, se demostró la eficiencia de del par de primers diseñados a partir del gen citocromo b del ADN mitocondrial amplificando únicamente el producto esperado de la especie objetivo *P. reticulata* en muestras de tejido, agua y en sedimento.
- Utilizando la cuantificación absoluta de la técnica qPCR conjuntamente con los primers específico de la especie *P. reticulata* se logró estimar la concentración del eDNA tanto de las muestras de agua como de sedimentos
- Según los resultados obtenidos basados en la evaluación de la concentración de eDNA de *P. reticulata*, con respecto a la densidad de individuos, el tiempo de permanencia del ADN y el medio, se logró demostrar que el eDNA de la especie *P. reticulata* se encuentra más concentrado en el agua. La concentración de eDNA en los tratamientos con mayor número peces fue mayor, es decir que la concentración de eDNA estuvo influenciada por el número de peces. Además, se demostró que el eDNA a partir de muestras de agua fue más

sensible y confiable para la detección de eDNA de la especie después del sexto día de que la especie ya no estuvo presente, sin considerar la densidad de individuos. Asimismo, se demostró que el método del eDNA fue capaz de detectar la presencia de *P. reticulata* en muestras de agua aun cuando la especie se encontraba a bajas densidades (10 peces) sin la necesidad de capturar el individuo.

- También se evidenció que el eDNA sedimentario no es una fuente confiable para monitorear especies transitorias o que han permanecido temporadas cortas en el lugar de estudio ya que presentó una concentración mínima (0.00018167 ng/  $\mu$ l) cuando estos permanecieron únicamente 6 días en el lugar de estudio haciendo casi imperceptible la concentración del eDNA ( $3.3 \times 10^{-6}$  ng/  $\mu$ l) al sexto día después de haber eliminado la especie.
- El desarrollo del método del eDNA en muestras de agua abre la posibilidad de que puede usarse en la detección de especies invasoras en ambientes naturales de una manera rápida y sencilla a diferencia de los métodos tradicionales basados en claves taxonómicas o por conteo directo.
- La concentración de eDNA varió en función al número de individuos tanto en muestras de agua como de sedimento.

## 6.2 Recomendaciones

- Ampliar investigaciones acerca de protocolos de muestreo, extracción de ADN a partir de muestras sedimentarias, que permitan eliminar inhibidores PCR, con la finalidad de robustecer los datos de ausencia y presencia de especies en lagos.
- La aplicación de eDNA a entornos acuáticos sigue siendo una tecnología nueva que requiere perfeccionamiento y desarrollo de métodos. Esta investigación resalta la necesidad de un estudio adicional con respecto al tipo sedimento, estos estudios pueden generar mayor información acerca de la concentración de eDNA en sedimento lo cual permitan afianzar la información obtenida en esta investigación, que permita analizar nuevos enfoques y comprender mejor el proceso de degradación del ADN en este medio. Además de un análisis físico-químico con el fin de conocer las interacciones que tiene el eDNA con los compuestos presentes en los sedimentos.
- Extender la investigación del método de eDNA a pruebas *in situ* (pruebas en campo), considerando que la información obtenida podría proporcionar datos sólidos, comparables y ecológicamente significativos que permitan biomonitorizar no solamente la especie *P. reticulata*, si no también otras especies presentes en el lago Yahuarcocha, con el fin de que se efectúen gestiones pertinentes en su eliminación o conservación de dichas especies.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, P., Eugenia, M., Rocha, M., Pineda, B., & Chanez, M. (2014). *PCR en tiempo real*. ResearchGate.  
[https://www.researchgate.net/publication/259042551\\_PCR\\_en\\_tiempo\\_real](https://www.researchgate.net/publication/259042551_PCR_en_tiempo_real)
- Alvarado, M. L. S. (2016). *Especies exóticas invasoras e instrumentos económicos: Una primera aproximación en México, con base en revisión de literatura*. 227.
- Arana Labrada, F., Pacheco Sánchez, R., Díaz De la Osa, A., Piñol Pérez, B., & Quiñones Pantoja, M. (2016). Desarrollo de un método para el diagnóstico específico del *PepMoV* basado en la RT-PCR. *Revista de Protección Vegetal*, 31(1), 20-28.
- Baldigo, B. P., Sporn, L. A., George, S. D., & Ball, J. A. (2017). Efficacy of Environmental DNA to Detect and Quantify Brook Trout Populations in Headwater Streams of the Adirondack Mountains, New York. *Transactions of the American Fisheries Society*, 146(1), 99-111.  
<https://doi.org/10.1080/00028487.2016.1243578>
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2015). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1-17.  
<https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>
- Barnes, M. A., & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17(1), 1-17.  
<https://doi.org/10.1007/s10592-015-0775-4>

- Biomeme. (sf). A Guide to Environmental DNA (eDNA). *Biomeme*.  
<https://biomeme.com/environmental-dna/>
- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., & Griffiths, R. A. (2017b). Is the detection of aquatic environmental DNA influenced by substrate type? *PLOS ONE*, *12*(8), e0183371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183371>
- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., & Griffiths, R. A. (2018a). Seasonal variation in environmental DNA detection in sediment and water samples. *PLOS ONE*, *13*(1), e0191737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191737>
- Chambert, T., Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Doi, H., & Takahara, T. (2018). An analytical framework for estimating aquatic species density from environmental DNA. *Ecology and Evolution*, *8*(6), 3468-3477. <https://doi.org/10.1002/ece3.3764>
- Champlot, S., Berthelot, C., Pruvost, M., Bennett, E. A., Grange, T., & Geigl, E.-M. (2010). An Efficient Multistrategy DNA Decontamination Procedure of PCR Reagents for Hypersensitive PCR Applications. *PLOS ONE*, *5*(9), e13042. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013042>
- Collins, R. A., Armstrong, K. F., Holyoake, A. J., & Keeling, S. (2012). Something in the water: Biosecurity monitoring of ornamental fish imports using environmental DNA. *Biological Invasions*, *15*(6), 1209-1215. <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0376-9>
- Corinaldesi, C., Barucca, M., Luna, G. M., & Dell'anno, A. (2011). Preservation, origin and genetic imprint of extracellular DNA in permanently anoxic deep-sea

sediments. *Molecular Ecology*, 20(3), 642-654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04958.x>

Corinaldesi, Cinzia, Danovaro, R., & Dell'Anno, A. (2005). Simultaneous Recovery of Extracellular and Intracellular DNA Suitable for Molecular Studies from Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 46-50. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.1.46-50.2005>

Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5), 299-305. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73092-X](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73092-X)

Cowart, D. A., Breedveld, K. G. H., Ellis, M. J., Hull, J. M., & Larson, E. R. (2018). Environmental DNA (eDNA) applications for the conservation of imperiled crayfish (*Decapoda: Astacidea*) through monitoring of invasive species barriers and relocated populations. *Journal of Crustacean Biology*, 38(3), 257-266. <https://doi.org/10.1093/jcbiol/ruy007>

Coyne, K. J., Hare, C. E., Popels, L. C., Hutchins, D. A., & Cary, S. C. (2006). Distribution of *Pfiesteria piscicida* cyst populations in sediments of the Delaware Inland Bays, USA. *Harmful Algae*, 5(4), 363-373. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2005.07.008>

Coyne, K. J., Hutchins, D. A., Hare, C. E., & Cary, S. C. (2001). Assessing temporal and spatial variability in *Pfiesteria piscicida* distributions using molecular probing techniques. *Aquatic Microbial Ecology*, 24(3), 275-285. <https://doi.org/10.3354/ame024275>

- Crespo, V. (2015). Nuestras Ciencia. *Nuestra Ciencia*, 17, 12-16.
- Deagle, B. E., Eveson, J. P., & Jarman, S. N. (2006). Quantification of damage in DNA recovered from highly degraded samples – a case study on DNA in faeces. *Frontiers in Zoology*, 3, 11. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-3-11>
- Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E., & Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 183, 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., & Miaud, C. (2011a). Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLOS ONE*, 6(8), e23398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023398>
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E., & Miaud, C. (2012a). Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: The example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49(4), 953-959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x>
- Dell'Anno, A., & Corinaldesi, C. (2004). Degradation and Turnover of Extracellular DNA in Marine Sediments: Ecological and Methodological Considerations. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), 4384-4386. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.4384-4386.2004>

- 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. *Revista de Biología Tropical*, 62(4), 1273-1284.
- Doi, H., Uchii, K., Takahara, T., Matsushashi, S., Yamanaka, H., & Minamoto, T. (2015). Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys. *PLOS ONE*, 10(3), e0122763. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122763>
- Eichmiller, J. J., Bajer, P. G., & Sorensen, P. W. (2014). The Relationship between the Distribution of Common Carp and Their Environmental DNA in a Small Lake. *PLOS ONE*, 9(11), e112611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112611>
- El Telégrafo. (2019). Ecuador presenta plan en el control de especies exóticas entre 2019 y 2029. *El Telégrafo*. <https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/sociedad/6/ecuador-plan-control-especies-exoticas-2019-2029>
- England, L. S., Pollok, J., Vincent, M., Kreutzweiser, D., Fick, W., Trevors, J. T., & Holmes, S. B. (2005). Persistence of extracellular baculoviral DNA in aquatic microcosms: Extraction, purification, and amplification by the polymerase chain reaction (PCR). *Molecular and Cellular Probes*, 19(2), 75-80. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2004.09.004>
- Erickson, R. A., Rees, C. B., Coulter, A. A., Merkes, C. M., McCalla, S. G., Touzinsky, K. F., Walleser, L., Goforth, R. R., & Amberg, J. J. (2016). Detecting the movement and spawning activity of bigheaded carps with environmental DNA.

*Molecular Ecology Resources*, 16(4), 957-965. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12533>

Ficetola, G. F., Coissac, E., Zundel, S., Riaz, T., Shehzad, W., Bessièrè, J., Taberlet, P., & Pompanon, F. (2010). An *In silico* approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11(1), 434. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-434>

Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008a). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423-425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>

Flores, M., Vasconcellos, A., & Paredes, M. (2015). Análisis de la expresión transcripcional del receptor de estrógeno en ovario de ovejas prepúberes de razas Texel y Criolla Araucana mediante RT-PCR cuantitativo en tiempo real. *Archivos de medicina veterinaria*, 47(2), 155-160. <https://doi.org/10.4067/S0301-732X2015000200005>

Geerts, A. N., Boets, P., Van den Heede, S., Goethals, P., & Van der heyden, C. (2018). A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): A lab and field evaluation. *Ecological Indicators*, 84, 564-572. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.08.068>

Goldberg, C. S., Pilliod, D. S., Arkle, R. S., & Waits, L. P. (2011a). Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using *Rocky Mountain Tailed Frogs* and *Idaho Giant Salamanders*. *PLOS ONE*, 6(7), e22746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022746>

- Goldberg, C. S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., & Waits, L. P. (2013a). Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32(3), 792-801. <https://doi.org/10.1899/13-046.1>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.040>
- Goldberg, C. S., Turner, C. R., Deiner, K., Klymus, K. E., Thomsen, P. F., Murphy, M. A., Spear, S. F., McKee, A., Oyler- McCance, S. J., Cornman, R. S., Laramie, M. B., Mahon, A. R., Lance, R. F., Pilliod, D. S., Strickler, K. M., Waits, L. P., Fremier, A. K., Takahara, T., Herder, J. E., & Taberlet, P. (2016). Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11), 1299-1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>
- Han, Z., Sun, J., Lv, A., Sung, Y., Sun, X., Shi, H., Hu, X., Wang, A., & Xing, K. (2018). A modified method for genomic DNA extraction from the fish intestinal microflora. *AMB Express*, 8. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0578-3>
- Hernández, C., & Valdéz, R. (2018). *Análisis de iniciadores con herramientas bioinformáticas libres en línea*. 22, 5-19.

- Hinlo, R., Gleeson, D., Lintermans, M., & Furlan, E. (2017). Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS ONE*, 12(6).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251>
- Holt, J. S., & Hoddle, M. S. (2001). *The Population Biology of Invasive Species*.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114037>
- Hulme, P. E. (2006). Beyond control: Wider implications for the management of biological invasions. *Journal of Applied Ecology*, 43(5), 835-847.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2006.01227.x>
- INABIO. (2019). *Especies exóticas invasoras controladas* –.  
<http://inabio.biodiversidad.gob.ec/2019/01/30/9-especies-exoticas-invasoras-controladas/>
- Inicio GenBank*. (2016). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- Integrated DNA Technologies. (2020). *Analizador Oligo* [Analyzer]. Integrated DNA Technologies. <https://www.idtdna.com/calc/analyzer>
- Jaramillo Hoyos, C. L., Villa García, C. M., Armenteras Pascual, D., Casas Castañeda, F., Gast Harders, F., Cavelier Franco, I., Bello Silva, J. C., Díaz Merlano, J. M., Fandiño Orozco, M. C., Pardo Fajardo, M. del P., Chaves, M. E., Gaitán Uribe, M. M., Palacios Lozano, M. T., Mendieta Galindo, M., Álvarez Rebolledo, M., Rodríguez Eraso, N., García Galindo, O. L., & Franco Villegas, X. (2005). *Biodiversidad para el desarrollo. El manejo sostenible de ecosistemas como aporte al bienestar humano*.  
<http://repository.humboldt.org.co/handle/20.500.11761/34607>

- Jelger Herder, A. V. (2014). *Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species*.  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4002.1208>
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2011). "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4(2), 150-157.
- Jeunen, G., Knapp, M., Spencer, H. G., Taylor, H. R., Lamare, M. D., Stat, M., Bunce, M., & Gemmell, N. J. (2019). Species-level biodiversity assessment using marine environmental DNA metabarcoding requires protocol optimization and standardization. *Ecology and Evolution*, 9(3), 1323-1335.  
<https://doi.org/10.1002/ece3.4843>
- Jiménez, C., Torres, R., & Corcuera, P. (2010). *Biodiversidad una alérta*.  
[http://www.uam.mx/difusion/casadeltiempo/36\\_iv\\_oct\\_2010/casa\\_del\\_tiempo\\_eIV\\_num36\\_09\\_16.pdf](http://www.uam.mx/difusion/casadeltiempo/36_iv_oct_2010/casa_del_tiempo_eIV_num36_09_16.pdf)
- Jordan, L. (2008, marzo 7). *Poecilia reticulata (guppy)*. CABI.  
<http://www.cabi.org/isc/datasheet/68208#>
- Keskin, E. (2014). Detection of invasive freshwater fish species using environmental DNA survey. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56, 68-74.  
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.05.003>
- Kettunen, M., Genovesi, P., Gollasch, S., Pagad, S., & Starfinger, U. (2009). *Assessment of the impacts of IAS in Europe and the EU*. 131.

- Klymus, K. E., Richter, C. A., Chapman, D. C., & Paukert, C. (2015). Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological Conservation*, *183*, 77-84. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.020>
- L, R., A.n, G., T, O., P, G., J, C.-C., J, C.-C., W, V. B., W, V. B., F.a.m, V., J, B., J, B., K, M., E, V., P, B., P, B., & Christine, V. der heyden. (2018). Monitoreo basado en ADN de los cangrejos de río invasores de América del Norte *Procambarus clarkii* en los lagos andinos (Ecuador) | Información del investigador | J-GLOBAL. *Limnologica*, *70*, 20-25.
- Levy-Booth, D. J., Campbell, R. G., Gulden, R. H., Hart, M. M., Powell, J. R., Klironomos, J. N., Pauls, K. P., Swanton, C. J., Trevors, J. T., & Dunfield, K. E. (2007c). Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, *39*(12), 2977-2991. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.06.020>
- Lindholm, A. K., Breden, F., Alexander, H. J., Chan, W.-K., Thakurta, S. G., & Brooks, R. (2005). Invasion success and genetic diversity of introduced populations of guppies *Poecilia reticulata* in Australia. *Molecular Ecology*, *14*(12), 3671-3682. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02697.x>
- Lopera-Barrero, N. M., Povh, J. A., Ribeiro, R. P., Gomes, P. C., Jacometo, C. B., & Silva Lopes, T. da. (2008a). Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: Extracción modificada con cloruro de

sodio. *Ciencia e investigación agraria*, 35(1), 77-86.

<https://doi.org/10.4067/S0718-16202008000100008>

Lynsey, H., Buxton, A., Rees, H., Bruce, K., Halfmaerten, D., Read, D., Watson, H.,

Sayer, C. D., Jones, E., Priestley, V., & Mäc, E. (2018, noviembre 21).

Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Freshwater Ecology*.

[https://freshwaterecology.wordpress.com/2018/11/21/prospects-and-](https://freshwaterecology.wordpress.com/2018/11/21/prospects-and-challenges-of-environmental-dna-edna-monitoring-in-freshwater-ponds/)

[challenges-of-environmental-dna-edna-monitoring-in-freshwater-ponds/](https://freshwaterecology.wordpress.com/2018/11/21/prospects-and-challenges-of-environmental-dna-edna-monitoring-in-freshwater-ponds/)

MAE. (2019). *Ecuador presenta plan de acción para el control de especies exóticas*

*para los próximos 10 años*. Ministerio del Ambiente.

[http://www.ambiente.gob.ec/ecuador-presenta-plan-de-accion-para-el-control-](http://www.ambiente.gob.ec/ecuador-presenta-plan-de-accion-para-el-control-de-especies-exoticas-para-los-proximos-10-anos/)

[de-especies-exoticas-para-los-proximos-10-anos/](http://www.ambiente.gob.ec/ecuador-presenta-plan-de-accion-para-el-control-de-especies-exoticas-para-los-proximos-10-anos/)

Maggi, F. (2013). The settling velocity of mineral, biomineral, and biological particles

and aggregates in water. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 118(4),

2118-2132. <https://doi.org/10.1002/jgrc.20086>

Mahon, A. R., Jerde, C. L., Galaska, M., Bergner, J. L., Chadderton, W. L., Lodge, D.

M., Hunter, M. E., & Nico, L. G. (2013). Validation of eDNA Surveillance

Sensitivity for Detection of Asian Carps in Controlled and Field Experiments.

*PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058316>

Marrero-Domínguez, K., Ledón-Pérez, T., & Fando-Calzada, R. (2016). Desarrollo de

un ensayo de PCR para detectar los genes codificadores de la toxina del cólera

- (ctxAB) en preparaciones del candidato vacunal vivo atenuado CV638 contra el cólera. *Vaccimonitor*, 25(2), 30-36.
- Martínez Rodríguez, P. A., Muné Jiménez, M., Soto Brito, Y., Ramírez Bartutis, R., Correa Sierra, C., Alfonso Castellanos, M., & Kourí Cardellá, V. (2009). Normalización de un sistema de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación del herpesvirus humano 8. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(2), 0-0.
- Maser. (s. f.). Multisampler. *Maser*. Recuperado 23 de enero de 2020, de <http://maser.com.co/producto/multisampler/>
- McKelvey, K. S., Young, M. K., Knotek, W. L., Carim, K. J., Wilcox, T. M., Padgett-Stewart, T. M., & Schwartz, M. K. (2016). Sampling large geographic areas for rare species using environmental DNA: A study of bull trout *Salvelinus confluentus* occupancy in western Montana. *Journal of Fish Biology*, 88(3), 1215-1222. <https://doi.org/10.1111/jfb.12863>
- Medoza, R., & Osorio, P. (2014). *Especies acuáticas invasoras en México*.
- Minamoto, T., Uchii, K., Takahara, T., Kitayoshi, T., Tsuji, S., Yamanaka, H., & Doi, H. (2017). Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*. *Molecular Ecology Resources*, 17(2), 324-333. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12586>
- Mora, A. (2001). *Política y Estrategía Nacional de Biodiversidad del Ecuador 2001-2010* (1). <https://www.cbd.int/doc/world/ec/ec-nbsap-01-es.pdf>

- Muñoz, M., Núñez, H., & Yáñez, J. (1997). *Libro rojo de los sitios prioritarios para la conservación de la biodiversidad en Chile*. 10.
- Nam, Y. K., Park, J. E., Kim, K. K., & Kim, D. S. (2003). A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fish using a restricted amount of fin tissue. *Transgenic Research*, 12(4), 523-525.  
<https://doi.org/10.1023/a:1024274508052>
- Nathan, L. M., Simmons, M., Wegleitner, B. J., Jerde, C. L., & Mahon, A. R. (2014). Quantifying Environmental DNA Signals for Aquatic Invasive Species Across Multiple Detection Platforms. *Environmental Science & Technology*, 48(21), 12800-12806. <https://doi.org/10.1021/es5034052>
- Ogram, A., Sayler, G. S., & Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7(2), 57-66. [https://doi.org/10.1016/0167-7012\(87\)90025-X](https://doi.org/10.1016/0167-7012(87)90025-X)
- Ortega, S., Velarde, E., Oña, T., & Echeverría, C. (2018). *Naturaleza descubriendo su esencia*. Universidad Técnica del Norte.
- Palau, J. A. i. (2006). Efectos socioeconómicos y medioambientales de la introducción de la perca del Nilo («*Lates niloticus*») en el Lago Victoria. *Ecología política*, 32, 111-114.
- Pedroarias, V. (sf). *Cuantificación mediante la técnica de la PCR en tiempo real*. Instituto de Biotecnología.  
<file:///C:/Users/hp/Desktop/2016%20clase%20qPCR%20Fitopat%20molec-Pedroarias.pdf>

- 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. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *70*(8), 1123-1130. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2013-0047>
- 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. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12159>
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Laramie, M. B., & Waits, L. P. (2013). *Application of environmental DNA for inventory and monitoring of aquatic species* (USGS Numbered Series N.º 2012-3146; Fact Sheet). U.S. Geological Survey. <http://pubs.er.usgs.gov/publication/fs20123146>
- Quaquebeke, J. (2015). *Development of an environmental DNA-based method for biomonitoring the Amazon River Basin and Yahuarcocha Lake (Ecuador) linked to classical physicochemical water analyses*. Ho-Gent.
- Rees, H. C., Baker, C. A., Gardner, D. S., Maddison, B. C., & Gough, K. C. (2017). The detection of great crested newts year round via environmental DNA analysis. *BMC Research Notes*, *10*(1), 327. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2657-y>
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., & Gough, K. C. (2014). REVIEW: 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. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306>

- Rolla, M., Consuegra, S., Hall, D. J., & Leaniz, C. G. de. (2019). Seasonal and spatial variation in growth and abundance of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in a recently invaded lake: Implications for management. *BioRxiv*, 656371. <https://doi.org/10.1101/656371>
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Del Carmen, E. (2013). *PCR: Reacción en cadena de la polimerasa*. ResearchGate. [https://www.researchgate.net/publication/266856169\\_PCR\\_reaccion\\_en\\_cadena\\_de\\_la\\_polimerasa](https://www.researchgate.net/publication/266856169_PCR_reaccion_en_cadena_de_la_polimerasa)
- Seymour, M. (2019). Rapid progression and future of environmental DNA research. *Communications Biology*, 2(1), 80. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0330-9>
- Simberloff, D., Martin, J.-L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D. A., Aronson, J., Courchamp, F., Galil, B., García-Berthou, E., Pascal, M., Pyšek, P., Sousa, R., Tabacchi, E., & Vilà, M. (2013). Impacts of biological invasions: What's what and the way forward. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(1), 58-66. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.013>
- Simon, K. S., & Townsend, C. R. (2003). Impacts of freshwater invaders at different levels of ecological organisation, with emphasis on salmonids and ecosystem consequences. *Freshwater Biology*, 48(6), 982-994. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01069.x>
- Smith, C. J., & Osborn, A. M. (2009). Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 6-20. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x>

- Somma, M. (sf). *Extracción y purificación de ADN*. <https://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/Manual%20ES/Sesion4.pdf>
- SPYGEN. (sf). What is environmental DNA (eDNA). *Spygen*.  
<http://www.spygen.com/technologies/what-is-environmental-dna-edna/>
- Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, *183*, 85-92.  
<https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.038>
- Taberlet, P., Prud'homme, S. M., Campione, E., Roy, J., Miquel, C., Shehzad, W., Gielly, L., Rioux, D., Choler, P., Clément, J.-C., Melodelima, C., Pompanon, F., & Coissac, E. (2012). Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular Ecology*, *21*(8), 1816-1820. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05317.x>
- Takahara, T., Minamoto, T., & Doi, H. (2013). Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds. *PLOS ONE*, *8*(2), e56584.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056584>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). *Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa(PCR) y de la PCR en tiempo real*. *2*(2), 70-78.
- ThermoFisher. (s. f.). *TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0*. ThermoFisher scientific. Recuperado 21 de febrero de 2020, de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4396838#/4396838>

- ThermoFisher. (sf). *Real-Time PCR: Understanding Ct - EC*.  
<https://www.thermoFisher.com/ht/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, P. R., Rasmussen, M., & Willerslev, E. (2012). Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLOS ONE*, 7(8), e41732.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732>
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., Orlando, L., & Willerslev, E. (2012a). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(11), 2565-2573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4-18. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.019>
- Tsuji, S., Takahara, T., Doi, H., Shibata, N., & Yamanaka, H. (2019). The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1(2), 99-108. <https://doi.org/10.1002/edn3.21>
- Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., & Lodge, D. M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial

- eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(7), 676-684.  
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12206>
- Turner, C. R., Uy, K. L., & Everhart, R. C. (2015a). Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation*, 183, 93-102. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.017>
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., ... Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25(4), 929-942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>
- Wasko, A. P., Martins, C., Oliveira, C., & Foresti, F. (2003). Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas*, 138(3), 161-165. <https://doi.org/10.1034/j.1601-5223.2003.01503.x>
- 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059520>

## ANEXOS

Anexo 1 Rangos de significación de Tukey de la interacción: medio con tratamiento

Interacción	Significado	Concentración de eDNA (ng/μl)	Rango
M1T1	Agua * Tratamiento 1	0.828	a
M1T2	Agua * Tratamiento 2	0.678	a
M1T3	Agua * Tratamiento 3	0.268	b
M2T1	Sedimento * Tratamiento 1	0.128	b
M2T2	Sedimento * Tratamiento 2	0.094	bc
M2T3	Sedimento * Tratamiento 3	0.024	c

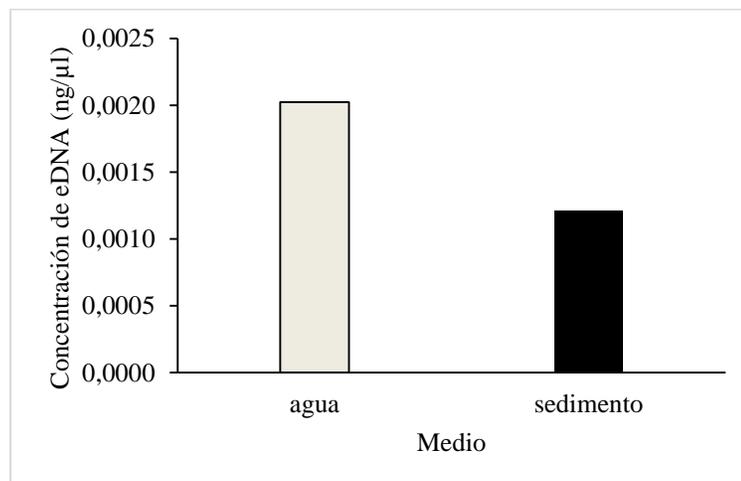
Anexo 2. Rangos de significación de Tukey para día de muestreo

Día de muestreo	Significado	Concentración eDNA (ng/μl)	rango
C1	Sexto día*	0.4273	a
C2	Primer día**	0.3716	a
C3	Sexto día**	0.2108	b

\* Muestreo en presencia de los peces

\*\* Muestreo en ausencia de los peces, después de su eliminación al sexto día

Anexo 3. Promedio de la concentración del eDNA (ng/μl) de agua y sedimento



Anexo 4. Promedio de la concentración de eDNA (ng/μl) por tratamiento

