

Licenciatura en Ciencias Biológicas

Opción Biotecnología

Detección de larvas de *Limnoperna fortunei*
(Dunker, 1857) mediante ADN ambiental

Estudiante:

Leandro Fabián Capurro Leites

Tutor: Dr. QF. Claudio Martínez-Debat

Co-tutor: Dr. Ernesto Brugnoli

Tribunal

Dr. Edgardo Díaz-Ferguson

Dra. Mariana Cosse

Dr. QF. Claudio Martínez-Debat



1.- Índice

2.- Agradecimientos	5
3.- Resumen	6
4.- Abreviaturas utilizadas	7
5.- Introducción	8
5.1 Ecología molecular	8
5.1.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	8
5.1.2. Código de barras de la vida (<i>Barcoding</i>): identificación de organismos por un fragmento del gen mitocondrial codificante para la Citocromo Oxidasa I	9
5.1.3. ADN ambiental (ADNa)	9
5.2.0 Especies exóticas e invasoras (EEI)	10
5.3.0 El modelo de estudio de una especie invasora: mejillón dorado (<i>Limnoperna fortunei</i>)	11
5.3.1 Características generales	11
Propagación histórica de <i>Limnoperna fortunei</i>	12
Ciclo de vida	13
5.3.2 Impactos del mejillón dorado	15
Modificación de los ecosistemas y las comunidades acuáticas	15
Daños en estructuras humanas	17
5.3.3. Aspectos moleculares de la invasión	18
5.3.4. Métodos de detección	19
Tradicionales	19
Moleculares	19
5.4 Futuras invasiones	22
6. Hipótesis	23
7. Predicciones:	23
8. Objetivos	23
9. Material y Métodos	25
9.1 Preselección de organismos utilizados en estudios de especificidad de la metodología	25
9.1.1 Colecta y procesamiento de muestras	25
9.2.0 Preselección de los cebadores	28
9.3 Procesamiento de las muestras para análisis moleculares	29
9.3.1 Extracción de ADN, protocolos para tejidos, larvas y plancton.	29
9.3.2 Electroforesis de ADN genómico	30
9.4 PCR en tiempo final	31
4.1 Determinación de la temperatura de óptima de la reacción:	31
9.4.2 Resolución de los fragmentos de PCR mediante electroforesis en gel de poliacrilamida	31
9.4.3 Especificidad de la PCR en tiempo final	32
9.4.4 Sensibilidad de la PCR en tiempo final	32
9.4.5 Muestras ambientales	32
9.4.6 Test de inhibición	33

9.4.8	Segunda tratamiento con Cloroformo-alcohol isoamílico y Precipitación con Etanol	33
9.4.9	Comparativa en agarosa	34
9.5.0	Secuenciación de la banda de interés	34
9.5.1	Purificación de productos de PCR	34
9.5.2	Envío de muestra adicional para ser purificada y secuenciada	34
9.5.3	Análisis de las secuencias obtenidas	34
9.6.0	Modelaje de un método estandarizado para la detección de larvas de <i>L. fortunei</i>	35
9.6.1	Poder teórico de resolución de la técnica	35
9.6.2	Teorema de Bayes	36
9.6.3	Modelo Binomial y Binomial Negativo	37
10.	Resultados	38
	Inferencias Filogenéticas	38
	Extracciones de ADN:	38
	Preselección de cebadores	40
	Temperatura óptima de los cebadores y primeros ensayos de especificidad	42
a)	Cebadores XiaE	42
b)	Cebadores Limf	44
	Test de especificidad	45
	Test de sensibilidad en ADN genómico	45
	Test de sensibilidad en número de larvas	45
	Muestras ambientales	46
	Gel de agarosa 2X	48
	Secuencia de interés	48
	Modelos estadísticos	51
	Valor predictivo positivo	51
	Valor predictivo negativo:	51
	Modelo binomial de réplicas	52
11.	Discusión	54
	Filogenias	54
	Cantidad y calidad de ADN en las muestras	55
	Determinación de cebadores	56
	Revelado de los geles	57
	Sensibilidad	58
	Especificidad	60
	Muestras ambientales	60
	Purificación de amplicones	62
	Secuencias de ADN obtenidas	63
	Modelos estadísticos	64

12. Conclusiones	66
13. Perspectivas	67
14. Publicaciones realizadas:	69
15. Bibliografía	72
Anexo 1, Tablas	81
Anexo 2, Voucher de los organismos utilizados	83
Anexo 3, Figuras	86
Anexo 4, Material suplementario	88
1.1 Fundamentos teóricos del Teorema de Bayes	90
1.2 Modelo Binomial de réplicas	91
1.3 Modelo binomial negativo de réplicas	91
Anexo 6, comandos de R	92
1.0 Teorema de Bayes	92
1.1 Valor predictivo positivo	92
1.2 Valor predictivo negativo	93
2.0 Modelo Binomial de réplicas	94
2.1 Obtener 2 positivos en un máximo de 3 intentos según el poder de resolución de la técnica	94
2.2 Obtener 2 negativos en un máximo de 3 intentos si existe ADN de <i>L. fortunei</i> según el poder teórico de resolución de la técnica	94
Anexo 4, Soluciones y Buffer utilizados	88
1.0 Buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) 50X, 1L (Fierro, 2014)	88
2.0 Buffer de carga 6X (Fierro, 2014)	88
3.0 Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 5x, 1 L (Fierro, 2014)	88
4.0 Acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida 30,08X-1L (Fierro, 2014):	88
5.0 Acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida 12X, 1L (Fierro, 2014)	88
6.0 Poliacrilamida 12X	88
7.0 Revelado con Tinción de Plata (Sanguinetti et al., 1994)	89

2.- Agradecimientos

Agradezco enormemente a Clau y Come por el apoyo y la confianza que depositaron en mí durante todo este ciclo, por comenzar conmigo esta rama nueva de investigación y acompañarme en otros proyectos a lo largo de estos años.

A Edgardo y Mariana que aportó en la mejora de mi tesina con sus comentarios de la misma.

Al régimen DT y al proyecto CSIC-UTE-PVUSP "*Limnoperna fortunei* (mejillón dorado) en las presas y embalses del Río Negro, grado de invasión y aplicación de métodos de control mecánico" por el apoyo económico.

A todos mis amigos y compañeros de campo y laboratorio que estuvieron ahí para ayudarme: Jenny, Daniel, Vale, Cora, Mariana, Cecilia, Pablo y en general a toda la gente del Piso 3 y 10.

A los compas del piso 9 por el apoyo en todo momento, Manu, Ivana, Hernan, Juli, Sol, Tato y Rafa.

A la gente del Piso 5 y en especial a Yanina por dejarme usar su termociclador de gradiente e instruirme en el mismo

Finalmente a toda mi familia y amigos (Helen, Mage, Fabián, Romel, Kiba, Karen, Luismii) que he hecho a lo largo de todo este periodo que me han acompañado desde el primer día y cuya amistad es la verdadera recompensa de todo este ciclo.

3.- Resumen

El ADN_a corresponde al ADN que se encuentra en muestras ambientales como el suelo o el agua. Puede hallarse suelto, dentro de células o tejidos o como organismos unicelulares o animales de pequeño tamaño. El ADN extraído puede analizarse mediante técnicas moleculares como la PCR. Una de las aplicaciones del estudio del ADN_a es la detección de especies exóticas invasoras. Estas últimas pueden perjudicar los ecosistemas como también a las estructuras y actividades humanas. El objeto de estudio del presente trabajo es el mejillón dorado (*Limnoperma fortunei*, Mytilidae) una especie endémica del sudeste Asiático. A diferencia de otros bivalvos dulceacuícolas, esta especie es epifaunal, lo que le ha permitido colonizar nichos que anteriormente no habían sido explotados en las zonas invadidas (ej. América del Sur). Esta especie presenta un crecimiento poblacional exponencial, invadiendo al menos 6 cuencas hidrográficas independientes en Sudamérica. Su capacidad invasiva se debe a su ciclo de vida, que posee estadios larvales planctónicos y una fase adulta bentónica. En la cuenca del Plata el mejillón dorado está asociado a cambios en las comunidades planctónicas y bentónicas, en las características físico-químicas de la columna de agua, además de ocasionar daños en estructuras humanas (represas hidroeléctricas, unidades de riego o industrias). Actualmente los métodos de detección implementados se basan en la visualización de la especie en el sitio de interés. El objetivo del estudio fue estandarizar una técnica que permita detectar el ADN_a de *L. fortunei* en muestras de agua. Se colectaron ejemplares de *L. fortunei* y complementariamente se colectaron muestras de agua en una central hidroeléctrica invadida, además de sitios en donde la especie no debería estar presente por las condiciones ambientales. A estas muestras se les separaron los sólidos en suspensión y se les realizó extracciones de ADN. Se seleccionó, de antecedentes bibliográficos, un par de cebadores diseñados para detectar ADN_a de *L. fortunei*, en base a su especificidad. Se determinó su sensibilidad como 60 pg de ADN genómico y el equivalente a media larva veliger. Se detectó a la especie en los sitios en donde ya estaba registrada, incluso en muestras donde los métodos tradicionales no lograron detectarla. Se secuenció y confirmó que la secuencia amplificada corresponde a *L. fortunei*. Se realizaron modelos estadísticos para determinar la certeza los resultados, en base a un poder de resolución teórico de la técnica. Se concluye que el método desarrollado podría ser más sensible que los métodos tradicionales debido a que detectó a la especie en muestras que no poseían larvas pero que pertenecen a un sitio donde la especie se encuentra establecida. Adicionalmente, no se detectó en sitios en donde no había registró o que no sobreviviría. Estos resultados refuerzan la especificidad de los mismos en relación a las especies nativas.

4.- Abreviaturas utilizadas

- %GC: Porcentaje de Citosina-Guanina.
- A260/280: Relación del Coeficiente de Absorbancia a 260 nm y 280 nm.
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- ADNa: ADN ambiental.
- ARN: Ácido RiboNucleico
- BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.
- BSA: *Bovine Serum Albumin* (Suero de Albúmina Bovina)
- C-, C+: Control Negativo y Control Positivo.
- C-Al: Cloroformo- Alcohol isoamílico
- CH: Central Hidroeléctrica
- COI: Citocromo Oxidasa I.
- dNTP: Desoxirribonucleótidos Trifosfato.
- EEI: Especies Exóticas Invasoras.
- MA: Millones de años.
- MPM: Marcador de Peso Molecular.
- NCBI: *National Center for Biotechnology Information*
- pb: Pares de bases
- PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción de la Cadena de la Polimerasa).
- qPCR: *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (Reacción de la Cadena de la Polimerasa cuantitativa)
- TAE: Tris-Acetato-EDTA.
- TBE: Tris-Borato-EDTA.
- Tm: Temperatura de *melting* (disociación)
- UV: Ultra violeta.

5.- Introducción

5.1 Ecología molecular

La ecología molecular se define como la aplicación de herramientas de la biología molecular para resolver problemas de ecología (Eguiarte & Souza, 2007). Esta rama de la ecología trata, por ejemplo, de abordar problemáticas como la identificación específica de especie; aspectos genéticos y bioquímicos de la adaptación; estudios poblacionales, flujo génico, selección o deriva. A nivel comunitario permite determinar la diversidad de organismos en el ambiente utilizando técnicas de ADN ambiental mediante las técnicas de *metagenómica* y *metabarcoding* (Eguiarte & Souza, 2007; Johnson *et al.*, 2009). A continuación, se definen y describen diferentes técnicas moleculares utilizadas por en la ecología molecular.

5.1.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción de la Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés, permite obtener millones de copias de moléculas de ADN a partir de una sola. Se basa en los mecanismos de replicación celular, en donde utilizando la ADN polimerasa (enzima encargada de sintetizar las cadenas de ADN en la célula) se logran hacer las copias de un segmento de ADN que se encuentra entre dos cebadores (fragmentos de ADN sintético que se unen específicamente a la cadena de ADN molde, que poseen un extremo 3' libre desde donde comienza la polimerización). *In vitro*, se utiliza una ADN polimerasa termoestable, y a los fragmentos de ADN obtenidos en la PCR se los suele llamar amplicones (Saik *et al.*, 1988; Díaz *et al.*, 2014).

La PCR, en su versión original de tiempo final, cuenta generalmente con tres etapas: desnaturalización, hibridación y elongación, que se repiten entre 30 y 40 ciclos. La primera etapa (desnaturalización) consiste en aumentar la temperatura de la solución a 90-95°C con el objetivo de separar las hebras de ADN para facilitar la hibridación de los cebadores. Durante la hibridación la temperatura desciende para permitir la unión de los cebadores a la cadena molde, esta temperatura depende la de temperatura de disociación (T_m) de los mismos. Finalmente en la elongación, la polimerasa se une a la hebra molde y comienza a sintetizar el nuevo fragmento desde el extremo 3' OH del cebador. La temperatura a la que sucede esto depende de las características de la polimerasa utilizada, típicamente entre 60 y 72°C (Díaz *et al.*, 2014). La visualización del producto de la PCR puede variar dependiendo del tipo de PCR que se utilice, en tiempo final los amplicones se visualizan en geles de agarosa o poliacrilamida (Fierro, 2014).

5.1.2. Código de barras de la vida (*Barcoding*): identificación de organismos por un fragmento del gen mitocondrial codificante para la Citocromo Oxidasa I

El código de barras de la vida se define como un fragmento del gen codificante para la enzima citocromo oxidasa I (COI) de al menos 500 pb que permite la identificación especie específica principalmente de algunos animales (Hebert *et al.*, 2003a; Krishnamurthy & Francis, 2012).

Propuesto originariamente por Hebert *et al.* (2003b) para lepidópteros; posteriormente Hebert *et al.* (2016) concluyeron que los códigos de barras permiten diferenciar el 95% de las especies conocidas, con excepción de poríferos y cnidarios bentónicos.

La determinación de especies exóticas invasoras (EEI) es una de las utilidades del código de barras debido a la alta especificidad de la técnica. Armstrong & Ball (2005) pudieron dilucidar la identidad del 93% de las especies de lepidópteros y moscas de la fruta con importancia agrícola. Briski *et al.* (2011) comparó los métodos morfológicos y los moleculares de determinación de especies a partir de huevos de resistencia en muestras de zooplancton de aguas de lastre, en dicho artículo se concluyó que los métodos clásicos lograron identificar 10 especies de 5106 huevos extraídos, mientras que los métodos moleculares determinaron 19 especies a partir de 289 huevos.

En Uruguay, Failla *et al.* (2017) determinaron la presencia de *Craspedacusta sowerbii*, una medusa dulceacuícola invasora, mediante análisis morfológicos y un segmento del gen que codifica el ARN ribosomal 16S, el cual es considerado un gen incluso más confiable que el COI, especialmente para algunos invertebrados como los Cnidarios (Bucklin *et al.*, 2016). Jorge *et al.* (2019) determinó y corroboró mediante código de barras la identidad de oligoquetos nativos y exóticos en nuestro territorio.

5.1.3. ADN ambiental (ADNa)

El ADNa es el ADN que puede hallarse en una matriz no viva en el ambiente como es el suelo, las heces, el agua o el aire y que puede ser estudiado a través de métodos moleculares. En una muestra de agua pueden provenir de gametos, formas inmaduras o ADNs residuales de células u organelos en suspensión, restos de tejidos, cabellos o heces (Darling & Mahon, 2011; Díaz-Ferguson *et al.*, 2014; Díaz-Ferguson & Moyer, 2014; Johnson *et al.*, 2009; Nathan *et al.*, 2014; Pie *et al.*, 2006, Taberlet *et al.*, 2018). En un principio fue utilizada para el monitoreo de bacterias en sedimentos marinos y el estudio de la comunidad de bacterias del fitoplancton, con el objetivo de detectar floraciones algales (Ogram *et al.*, 1987; Díaz-Ferguson & Moyer, 2014). El ADNa puede dividirse en 2 categorías, el ADNa particulado (ADNa-P) que refiere al ADN que se encuentra en formas o unido a matrices mayores a 0,2 μm y el disuelto (ADNa-D)

que implica el hallado en fracciones de menor tamaño (Díaz-Ferguson & Molles, 2014).

Una de las utilidades de esta herramienta es la detección temprana de especies invasoras, debido a que las herramientas moleculares poseen mayor especificidad, sensibilidad, rapidez y menor costo que los métodos tradicionales que consisten en observar a los organismos en el ambiente invadido (Nathan *et al.*, 2014; Tréguier *et al.*, 2014). El estudio del ADNa para detectar especies invasoras es reciente, su primer uso fue para detectar a la rana toto (*Lithobates catesbeianus*) en sistemas lóticos de Francia (Ficetola *et al.*, 2008), otro ejemplo se presenta en Díaz-Ferguson *et al.* (2014) desarrollaron un método de ADNa para detectar al “pez joya” (*Hemichromis letourneuxi*) en el refugio nacional de vida silvestre Loxahatchee (Florida, EE.UU). En el mencionado trabajo, se logró detectar a la especie extrayendo 1 L de agua. Recientemente Orive *et al.* (2020) proponen metodologías de ADNa, basados en diferentes variedades de PCR, para determinar la presencia del ARN del Coronavirus SARS-CoV-2 en colectores de saneamiento, para detectar y prevenir posibles focos de infección.

5.2.0 Especies exóticas e invasoras (EEI)

Las especies exóticas son organismos que tanto en cautiverio o en libertad se encuentran fuera de su rango natural de dispersión históricamente conocido y que presentan la capacidad de sobrevivir y reproducirse en el lugar (UICN, 2000). Las especies exóticas invasoras son especies que se propagan en ambientes naturales y artificiales, siendo una grave amenaza de los ecosistemas y la biodiversidad, siendo consideradas la segunda causa de pérdida de diversidad a nivel mundial (UICN, 2000). Modifican los ecosistemas, generando perjuicios en los recursos y servicios que proveen, adicionalmente dañan estructuras artificiales generando pérdidas económicas de miles o millones de dólares (Pimentel *et al.*, 1999). Finalmente, muchas especies son vectores de patógenos que ponen en peligro la salud humana y animal (ej. *Aedes aegypti*).

Estudios señalan que Estados Unidos sufrió una pérdida de 97 mil millones de dólares en 85 años por daños causados por 79 EEI (Pimentel *et al.*, 1999).

En Uruguay se identificaron 351 especies exóticas (2009), siendo 72 de ellas consideradas con comportamiento poblacional invasor (Masciadri *et al.*, 2010, Brugnoli *et al.*, 2009). En 2014 el Comité Nacional de EEI acordó definir como especies exóticas invasoras a 42 especies (Aber *et al.*, 2014). Aunque no todas ellas han mostrado aún un comportamiento invasor dentro del país, esto podría deberse a falta de estudios y a que diversas EEI pueden pasar inadvertidas durante años hasta que

repentinamente aumentan su tamaño poblacional, mostrando el daño que pueden generar al ecosistema y directa o indirectamente al ser humano (Simberloff, 2005). Una de las EEI acuáticas que actualmente causa graves problemas a nivel de estructuras humanas y modificaciones ecosistémicas en Uruguay y la región de la cuenca del Plata es el mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*) (Ferrer & Pereira, 2019), objeto de este estudio.

5.3.0 El modelo de estudio de una especie invasora: mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*)

5.3.1 Características generales

El mejillón dorado (Figura 1A) es un molusco bivalvo dulceacuícola de la familia Mytilidae, originario de los ríos del Sur de Asia es el único miembro de agua dulce de esta familia en América del Sur (Ferrer & Pereira, 2019). Los ejemplares maduros presentan un rango de tamaño de 20 a 45 mm aunque se han reportado ejemplares de hasta 60 mm en Corea (Iwasaki & Uryu, 1998; Ricciardi, 1998). Sus valvas están altamente adaptadas a sujetarse a sustratos duros, pues la superficie ventral plana permite una mayor área para su adhesión a través de los filamentos del biso. A diferencia de otros moluscos dulceacuícolas, estos organismos son epifaunales, por ende habitan sobre el sustrato. Estos sustratos pueden ser inorgánicos de origen antrópico (metal, plástico), de origen natural (rocas) como también orgánicos de origen natural como troncos, plantas, caparazones de caracol o de otros bivalvos (Darrigran & Damboreanea, 2006a; Ferrer & Pereira, 2019; Brugnoli *et al.*, 2020). Su modo de vida epifaunal hace que este organismo tenga un nicho que no ha sido ocupado en agua dulce en los ríos de la cuenca del Plata, por ende carece de competidores por el espacio en nuestra región (Pastorino *et al.*, 1993), siendo su único competido *Mytella charruana* en ambientes con salinidades entre 2 y 3 (Scarabino & Verde, 1994; Calanzans *et al.*, 2017). Los adultos presentan comportamiento gregario, con agrupaciones de 80.000 a 150.000 ind.m⁻² (Darrigran & Ezcurra de Drago, 2000).

Boltovskoy & Cataldo (1999) e Iwasaki & Uryu (1998) destacan la temperatura del agua como la variable ambiental más importantes que limita su viabilidad, siendo que ésta marca el desarrollo gonadal como la liberación de gametos. Las larvas de *L. fortunei* (Figura 1B) forman parte del zooplancton junto a microcrustáceos (copépodos y cladóceros), y rotíferos (Brugnoli *et al.*, 2011, 2018), cuya interacción con las larvas de *L. fortunei* aún no se ha determinado. Los asentamientos larvales se generan mayormente en lugares oscuros como el hipolimnion, en grietas o las superficies

cubiertas de los objetos (Ricciardi, 1998; Brugnoli *et al.*, 2011; Iwasaki, 2015) y posteriormente desarrollan sus etapas de vida juvenil y adulto bajo forma de organismos epifaunales bisados descritos previamente.

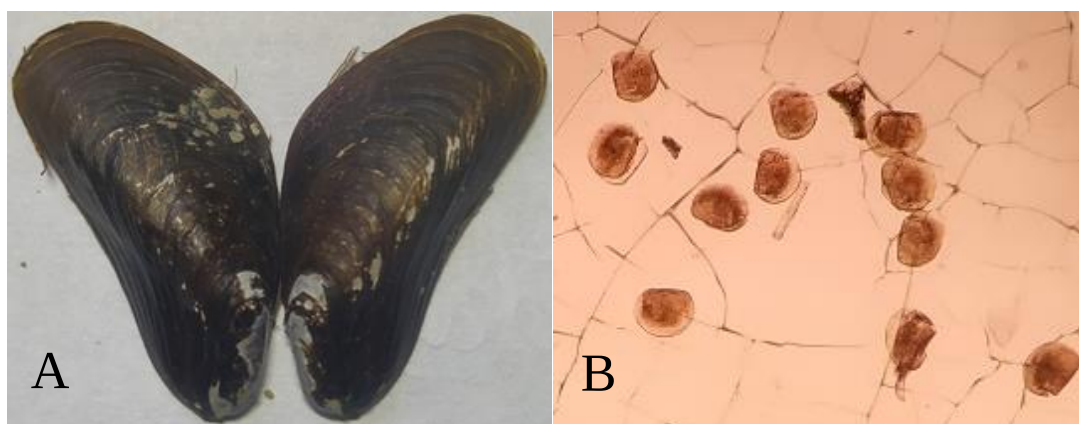


Figura 1. A- Anatomía externa de las valvas de *L. fortunei*. B- Larvas de *L. fortunei* (tamaño entre 100 y 150 μm). Imágenes pertenecientes al autor.

Propagación histórica de *Limnoperna fortunei*

Originario del sudeste asiático, éste organismo comenzó su propagación en la década del sesenta a los suministros de agua potable de Hong Kong a través de larvas captadas del Río Pearl (Boltovskoy, 2015a). En 1990 se detectaron por primera vez en Japón (Iwasaki & Uryu, 1998), pudiendo ingresar por las aguas de lastre de barcos tanto de China como de Corea; algunos autores sugieren que pudieron haberse dado por individuos transportados accidentalmente junto a bivalvos destinados a la acuicultura (Ricciardi, 1998; Ghabooli *et al.*, 2013).

El primer registro de *L. fortunei* en la cuenca del Plata fue en 1991 en la playa Bagliardi, Argentina (Pastorino *et al.*, 1993), se propone que la introducción sucedió por la descarga de aguas de lastre de barcos provenientes de Asia (Boltovskoy *et al.*, 2006). El primer registro en Uruguay corresponde a la zona media e interna del Río de la Plata en 1994 (Scarabino & Verde, 1994). En el Río de la Plata el último registró en la zona Este corresponde a la zona de Punta Espinillo, Montevideo (Brugnoli *et al.*, 2005). El primer registro para el Río Negro fue en 1999 en el embalse de Palmar encontrándose organismos adultos en los sistemas de refrigeración de la central hidrológica (CH) Constitución. En 2002 se registró la especie en las instalaciones de la CH Baygorria y en 2004 se constató la prevalencia de las larvas en el embalse de dicha CH. Finalmente entre el 2007-2008 se registra para el embalse Gabriel Terra y San Gregorio del Polanco, invadiendo de esa forma los 3 embalses del Río Negro (Brugnoli *et al.*, 2005; Brugnoli *et al.*, 2011).

En la región la especie ha invadido cinco países (Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay) (Figura 2) y al menos seis grandes cuencas hidrográficas: del Plata, los

Patos-Merín, Mar Chiquita, Guaíba, Tramandaí y San Francisco (Brasil) (Boltovskoy, 2015a; Barbosa *et al.*, 2016). Se considera que el Río Uruguay se encuentra invadido en su totalidad por este organismo, mientras que las tasas de expansión en el Río Paraná-Paraguay son del orden de 250 km año⁻¹ (Boltovskoy, 2015a; Darrigran & Damborenea, 2006b). Se especula que el gran avance de este molusco está mediado por las aguas de lastre que utilizan los barcos de carga en los sistemas de ríos de la cuenca del Plata, como también de adultos incrustados en sus cascos. La dispersión en ríos poco transitados se estima que es a través de embarcaciones de pescadores artesanales o turísticas (Boltovskoy *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2015).



Figura 2. Distribución actual de *Limnoperna fortunei* en Sudamérica. Extraído y modificado de Oliveira *et al.* (2015). La estrella marca un registro posterior de la especie en la cuenca del Río São Francisco (Barbosa *et al.*, 2016).

Ciclo de vida

Limnoperna fortunei es una especie gonocórica, donde las hembras reproductivas poseen el manto color marrón y los machos lo poseen blanco (Iwasaki & Uryu, 1998; Ricciardi, 1998; Callil *et al.*, 2012), con escasos registros de hermafroditismo en América del Sur (De Draco *et al.*, 2006). Ecológicamente se caracteriza como un estratega *r*, que son organismos que producen millones de gametos por periodo reproductivo, que se desarrollan como larvas planctónicas sin cuidado parental y que luego se convertirán en adultos de hábitos bentónicos (Damborenea & Penchaszadeh, 2006). La fecundación es externa y el desarrollo larvario dura entre 11-20 días según la temperatura del agua (Cataldo, 2015a). El desarrollo gonadal está regulado por la temperatura del medio y el tamaño del individuo (Boltovskoy & Cataldo, 1999). En

primavera el desarrollo gonadal sucede a los 5 mm de largo mientras que en otoño sucede a los 9 mm (De Draco *et al.*, 2006). Según Iwasaki & Uryu (1998) el desarrollo gonadal se genera cuando la temperatura del agua supera los 21°C aunque la liberación de gametas sucede a temperaturas mayores de 16-17°C (Boltovskoy & Cataldo, 1999; Iwasaki & Uryu, 1998). Boltovskoy & Cataldo (1999) concluyen que *L. fortunei* se reproduce durante 9 meses seguidos, desde agosto hasta abril, en el río Las Palmas (Argentina). Estudios realizados en el Uruguay (Río Negro) demuestran que la presencia de larvas es continua exceptuando en invierno (Brugnoli *et al.*, 2011; Fabián *et al.*, 2021) mientras que en la zona del alto Paraná (Ernandes-Silva *et al.*, 2017) se han reportado larvas durante todo el año.

La metamorfosis larval se caracteriza por poseer dos estadios, el primero en el que no posee valva, que inicia en el óvulo fecundado hasta el estado “pre-veliger” en el cual aún no se han desarrollado las valvas por completo; siendo estos organismos de 80-115 µm de largo, aproximadamente. Los siguientes estadios son los “valvados” (Figura 3) que comienzan con la larva veliger tipo D, seguida por la pre-umbonada (~110-180 µm). De esta última se desarrolla la larva umbonada, en la cual se distingue el umbón (180-230 µm). El pie se comienza a observar en el estadio Pediveliger (230 – 600 µm). El último estadio es el de plantígrada (600 - 1.000 µm), la cual se caracteriza por poseer como único medio de locomoción el pie (De Draco *et al.*, 2006; Cataldo, 2015a). Las mayores abundancias larvales ocurren en los meses de verano, con máximos históricos de hasta 80.000 ind.m⁻³ en Japón. En Sudamérica se han registrado máximos de 35.000 ind.m⁻³ en sistemas abiertos aunque normalmente no superan los 7.000 ind.m⁻³. Dentro de un sistema de refrigeración se han hallado densidades de aproximadamente 260.000 ind.m⁻³ siendo este el registro mayor para densidades larvales (Darrigran & Mansur, 2006; Nakano *et al.*, 2010; Boltovskoy *et al.*, 2015a). En las CH del Río Negro, recientes estudios mostraron densidades larvales que oscilaron entre 0 y 11.603 ind.m⁻³ con mínimos en inviernos y máximos a finales de la primavera y verano (Fabián *et al.*, 2021).

Cuando las larvas alcanzan un tamaño de 300 µm desarrollan las glándulas del biso lo que les permitiría adherirse a diferentes sustratos duros (Mansur *et al.*, 2012). Una vez fijadas, comienzan su fase bentónica, en la cual pueden crecer hasta 3 mm en un mes y alcanzar los 20 mm al año (Brugnoli *et al.*, 2011). Las fases adultas (bentónicas) presentan comportamiento gregario, con agrupaciones de 80.000 a 150.000 ind.m⁻² (Brugnoli *et al.*, 2011). En la región Neotropical se registró una esperanza de vida de entre 2 a 3,5 años, aunque en Corea hay registros de organismos de hasta 5 años (Iwasaki & Uryu, 1998).

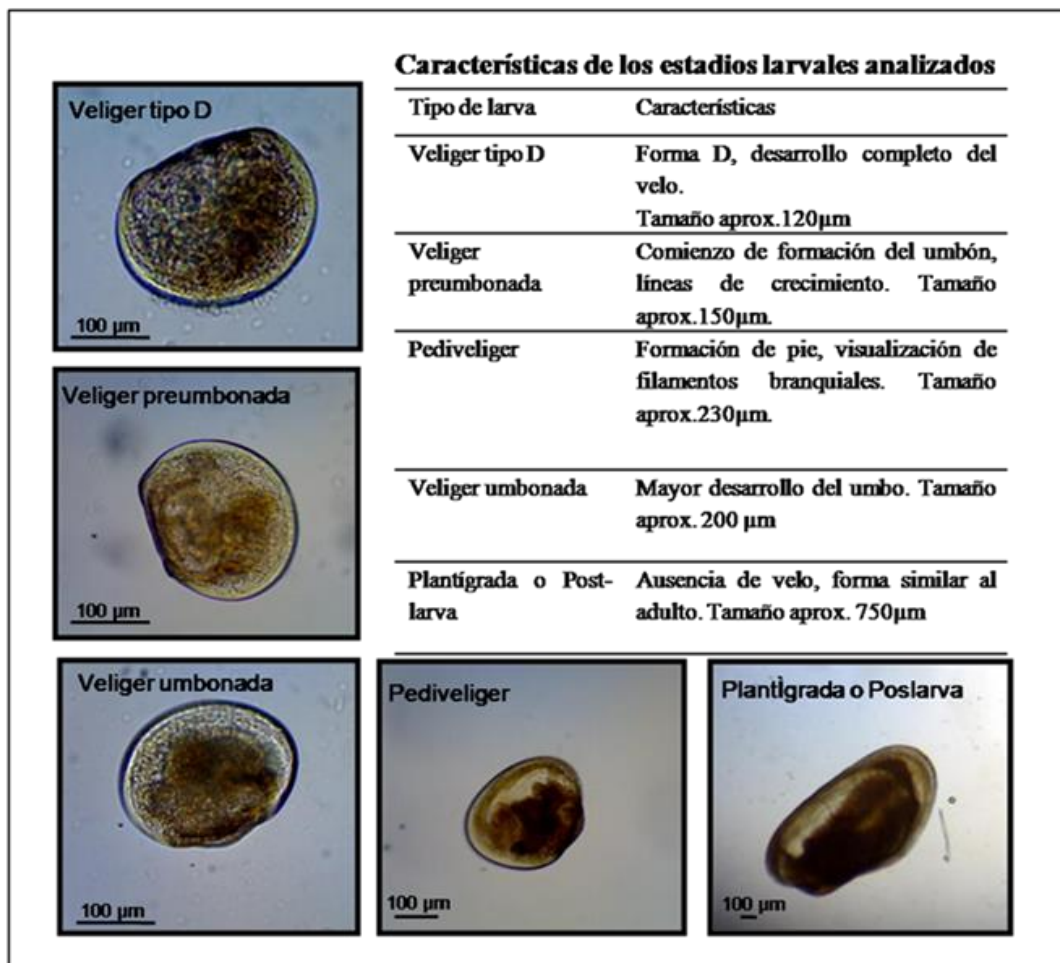


Figura 3. Características de los estadios larvales analizados (Modificado de Fabián et al., 2021).

5.3.2 Impactos del mejillón dorado

Limnoperna fortunei ha mostrado tener un patrón de comportamiento similar a otras especies invasoras con respecto a su capacidad de modificar el ambiente, desplazar y poner en riesgo de extinción a especies autóctonas, pérdida de servicios ecosistémicos, modificación de las cadenas tróficas, además de afectar actividades humanas generando pérdidas económicas (Darrigran & Damborenea, 2006b). A continuación se detallarán algunas problemáticas que produce esta especie:

Modificación de los ecosistemas y las comunidades acuáticas

Por sus altas densidades y tasas de filtración, *L. fortunei* tiende a aumentar la transparencia de los ambientes y reducen las abundancias del plancton de menor tamaño (<1mm), promoviendo a los crustáceos de mayor tamaño (copépodos y grandes cladóceros) como también algas de mayor tamaño o coloniales. Al reducir la turbidez aumenta la temperatura modificando el régimen térmico, lo cual se ha

asociado a cambios de las comunidades por alteraciones metabólicas, del crecimiento y al aumento de las tasas de enfermedad y muerte (Pusey & Arthington, 2003; Hester & Doyle, 2011; Boltovskoy, 2015b). La presencia de *L. fortunei* ha mostrado, en ensayos *in vitro* e *in vivo*, reducir las formas de carbono, fósforo y nitrógeno particuladas, aumentando las concentraciones de nitratos, fosfatos y formas tóxicas del nitrógeno como el amonio (Cataldo *et al.*, 2012; Boltovskoy & Correa, 2015). Se observa el desplazamiento de materia orgánica de la columna de agua al sedimento, generando anoxia en los estratos inferiores causando la liberación de fósforo, metales y formas reducidas del nitrógeno y el azufre (Kalff, 2002; Cataldo *et al.*, 2012; Boltovskoy & Correa, 2015).

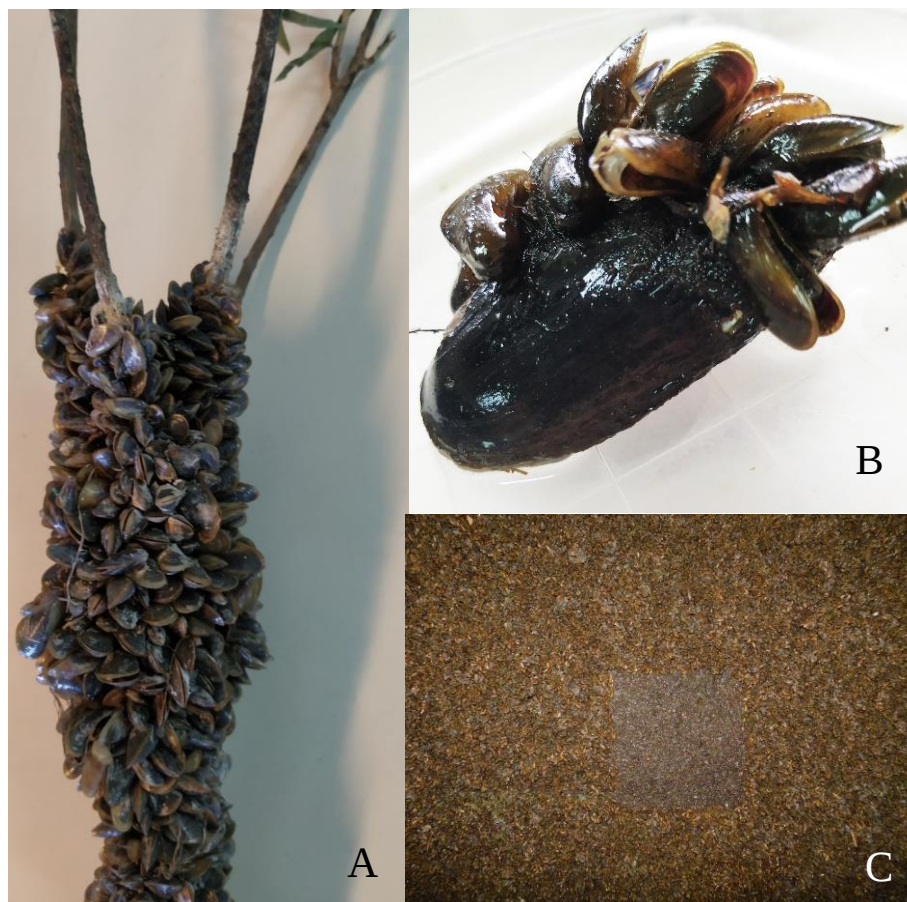


Figura 4. A-Rama cubierta de mejillones obtenida de San Gregorio de Polanco (Río Negro). B- *Biofouling* sobre *Diplodon* sp. C- Pared interna de una turbina de la central Baygorria cubierta de mejillón dorado, con excepción de un cuadrado central. Imágenes A y B pertenecientes al autor, imagen C al Dr. Brugnoli

Otro efecto es la formación de lechos de mejillones que modifican la comunidad de invertebrados bentónicos, promoviendo la aparición de organismos detritívoros pero reduciendo a los filtradores como otros bivalvos nativos. En estos lechos se ha constatado el aumento de la riqueza y biomasa de invertebrados, sin embargo se ha

observado la disminución de la diversidad de especies en los sistemas por la homogeneización de los ambientes (Sylvester & Sardiña, 2015). Complementariamente Silva *et al.*, (2020) hallaron en estudios en el Río Uruguay (Uruguay) que los lechos de mejillones reducían la abundancia de grupos como gasterópodos y dípteros y densidad total de macroinvertebrados nativos.

Adicionalmente, afecta la malacofauna y macrófitas sumergidas mediante el *biofouling*, en donde organismos adultos de *L. fortunei* se instalan sobre otras especies lo que genera problema de movilidad, aumento de la competencia o reducción de la superficie de absorción de nutrientes (Figura 4A y B) (Rojas-Molina & Williner, 2013; Sylvester & Sardiña, 2015).

Los efectos sobre la ictiofauna son variados según el estado del desarrollo, tipo de alimentación y nivel trófico de las diferentes especies que habitan en la región. Se ha observado que en la cuenca del Plata 18 de las 25 especies de alevines estudiados consumían habitualmente larvas de *L. fortunei* modificando las comunidades debido a los efectos que puede tener una nueva fuente de alimento para el ictioplancton (Paolucci & Thuesen, 2015). Muchas especies de peces al llegar a la adultez incluyen dentro de sus dietas a *L. fortunei*. Esto se observa en algunas especies omnívoras y sedimentívoras que han modificado sus hábitos alimenticios en donde *L. fortunei* ha alcanzado a representar el 100% del contenido estomacal. Esto podría influir en las cadenas tróficas, ciclo de nutrientes e incluso promover la persistencia de especies que pueden alimentarse del mejillón, aumentando la dominancia y reduciendo la diversidad (Cataldo, 2015b; Gonzales-Bergonzoni *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020).

Promueve la proliferación de cianobacterias

Por otro lado, el aumento de la temperatura del agua, el aumento de nutrientes, la alta depredación al plancton, especialmente aquellos de pequeño tamaño, promueve la aparición de cianobacterias coloniales, muchas de estas tóxicas (Boltovskoy *et al.*, 2015b; Silva & Giani, 2018). Se ha observado que *L. fortunei* promueve la aparición de cianobacterias del género *Microcystis* las cuales pueden liberar toxinas que generan daños hepáticos, neuronales e incluso la muerte (Carmichael *et al.*, 2001; Butler *et al.*, 2009; Ferrão-Filho & Suzuki, 2011; Cataldo *et al.*, 2012, Vidal *et al.*, 2017).

Daños en estructuras humanas

La principal problemática que este organismo genera en los sistemas gestionados por el ser humano es el *macrofouling*. Se define al *macrofouling* como el proceso de asentamiento y colonización de organismos de más de 50 µm sobre un sustrato artificial). Este proceso genera la obstrucción de tuberías de conducción, sensores e

instalaciones hidráulicas, entre otras, generando costos de mantenimiento en las empresas afectadas (Boltovskoy *et al.*, 2006; Brugnoli *et al.*, 2012). En la figura 4C se observa el efecto del *macrofouling* dentro de una cámara espiral de la CH Baygorria. En la cuenca del Plata el *macrofouling* es de extrema preocupación por la gran dependencia a los servicios ecosistémicos relacionados con los recursos hídricos de agua dulce que ofrece la mencionada cuenca. Esto se ve incrementado especialmente en la producción de energía hidroeléctrica debido al elevado número de CH dispuestas en los diferentes ríos de la cuenca del Plata; por ejemplo Paraguay produce el 100% de su energía a través de fuentes hidroeléctricas; 76% de la energía hidroeléctrica de Brasil es producida en esta cuenca, mientras que Argentina, Bolivia y Uruguay producen entre el 40 y el 60% de su energía de esta manera. Otras industrias que han sido afectadas por este organismo son centrales nucleares, plantas de energía termal, piscicultura, plantas de procesamiento de alimento e industria forestal (Oliveira *et al.*, 2015).

Los costos causados por *L. fortunei* al estado Uruguayo son desconocidos, sin embargo al estar afectados todos los sistemas de producción hidroeléctrica del país, especulamos que los montos causado por detener las turbinas, limpiarlas, instalar los repuestos, entre otros, implicarían sumas de miles de dólares anuales sólo a nivel de producción hidroeléctrica y sin tomar en cuenta las pérdidas en otras industrias y de servicios ecosistémicos (Brugnoli & Clemente, 2002; Brugnoli *et al.*, 2006, 2012).

5.3.3. Aspectos moleculares de la invasión

La gran capacidad invasiva de *L. fortunei* se encuentra escrito en su ADN. Estudios del transcriptoma de esta especie han mostrado una gran diversidad de proteínas dentro de familias génicas asociadas a respuestas de estrés (Uliano-Silva *et al.*, 2014; Uliano-Silva *et al.*, 2016). Algunas familias génicas son las chaperonas moleculares HSP70, proteínas que ayudan al correcto plegamiento de otras proteínas. Otra familia génica son las citocromos p450, los cuales son unos de los responsables de transformar sustancias hidrófobas en compuestos más fáciles de ser eliminados. Estas proteínas se han asociado a respuestas de estrés como desecación, contaminación con metales y la capacidad de procesar sustancias químicas como productos *antifouling* (Uliano-Silva *et al.*, 2014; Uliano-Silva *et al.*, 2016). Igualmente se ha observado la presencia proteínas tipo Toll, sugiriendo la presencia de un precursor del sistema inmune adaptativo, lo cual le ayudaría a soportar distintos tipos de infecciones, permitiéndoles sobrevivir en ambientes con alta contaminación biológica (Uliano-Silva *et al.*, 2014; Uliano-Silva *et al.*, 2016).

Paolucci *et al.* (2014) concluyen que *L. fortunei* posee una alta diversidad fenotípica que está asociada a respuestas de estrés como altas concentraciones de sólidos en suspensión, depredación, competencia por el sustrato, entre otros. Esto le permite una mayor adaptabilidad a las condiciones ambientales adversas.

5.3.4. Métodos de detección

Debido a la problemática que genera esta especie en los ecosistemas y sistemas antrópicos de agua dulce, el monitoreo de las larvas presentes en el zooplancton con potencial adherente es una estrategia de alerta temprana. La misma permitiría realizar medidas rápidas y de bajo costo y de mitigación que podrían eventualmente evitar que se establezca la especie en nuevas regiones (Brugnoli *et al.*, 2011, 2012; Ernandes-Silva *et al.*, 2017).

Los métodos para la detección de larvas en sistemas acuáticos se dividen en:

Tradicionales

Las larvas de *L. fortunei* se pueden coleccionar mediante muestreos de la comunidad zooplanctónica en ambientes acuáticos, utilizando redes de plancton (75 µm de malla) o filtrando volúmenes conocidos de agua a través de tamices con 100 µm o menos de malla. Posteriormente se determinan sus abundancias mediante conteos utilizando microscopio óptico. Las abundancias se expresan en individuos por litro de agua filtrada (dos Santos *et al.*, 2012).

Moleculares

El uso de métodos moleculares para la detección temprana de organismos invasores acuáticos es reciente (Darling & Mahon, 2011; Nathan *et al.*, 2014; Tréguier *et al.*, 2014). Los métodos para detectar a *L. fortunei* se han desarrollado en Brasil, China y Japón aunque aún no se han implementado en Uruguay (Pie *et al.*, 2006, 2017; Endo *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2018).

Pie *et al.* (2006) desarrollaron un método por el cual se podían detectar larvas de *L. fortunei* en agua mediante la amplificación por PCR en tiempo final y visualización de un fragmento del gen codificante para la COI mediante cebadores especie específicos. Este método demostró ser altamente eficaz y veloz en comparación a los métodos tradicionales. Boerger *et al.* (2007) demostró poder detectar de 1 a 5 larvas en 2000 m³ de agua filtrada. Finalmente, Endo *et al.* (2009) implementó una metodología de *Quantitative* – PCR (PCR cuantitativa en tiempo real, qPCR) para detectar y cuantificar

la cantidad de larvas presentes en el agua, logrando obtener resultados positivos con alta especificidad.

Recientemente se han desarrollado técnicas de ADN, las cuales pudieron detectar a la especie con muestras que varían de 100 a 250 mL de agua (Pie *et al.*, 2017; Xia *et al.*, 2018). Estos métodos resultan ser más sensibles y veloces. Tienen la capacidad de procesar muestras de agua hasta 7 veces más rápido que con los métodos tradicionales y obteniendo resultados positivos, en cuanto a la presencia / ausencia de larvas, en muestras donde, con los métodos tradicionales, no habían sido detectadas (Boerger *et al.*, 2007).

A pesar de los beneficios que presentan las técnicas moleculares frente a las tradicionales para el monitoreo de la especie (Tabla 1), las técnicas moleculares aún no han sido aplicadas de forma estándar en la región. Esto último constituye un reto importante para su validación y protocolización en tareas de detección de EEI acuáticas para zonas recientemente invadidas.

Tabla 1. Técnicas tradicionales vs moleculares para el monitoreo de especies.

	Tradicionales	Moleculares	Cita
Tiempo invertido	Pueden llevar mucho tiempo (horas a semanas) dependiendo de las densidades y modo de vida del organismo.	Existen métodos estandarizados y rápidos de procesamiento en campo (ej.3 muestras en 45 minutos). Se pueden procesar masivamente varias muestras en paralelo.	Díaz-Ferguson & Moyer 2014; Nathan <i>et al.</i> , 2014; Davy <i>et al.</i> , 2015; Thomas <i>et al.</i> , 2020; Ravindran, 2019
Costo	Pueden ser muy costosos según el tiempo invertido y los recursos humanos para obtener u observar al organismo.	Los kits y reactivos pueden ser una inversión costosa en un principio, aunque a nivel de muestra individual los precios son menores. Igualmente depende del número de muestras a procesar y la complejidad de la muestra.	Deagle <i>et al.</i> , 2003; Díaz-Ferguson & Moyer, 2014; Nathan <i>et al.</i> , 2014; Davy <i>et al.</i> , 2015
Daños al ambiente	Los métodos pueden ser destructivos para el medio ambiente e implican la captura y sacrificio del organismo de interés y otros no blancos.	No implica el sacrificio del organismo o interacción con el mismo. El obtener el material no es necesariamente dañino para el ambiente.	Díaz-Ferguson & Moyer 2014; Deagle <i>et al.</i> , 2003; Nathan <i>et al.</i> , 2014; Davy <i>et al.</i> , 2015; Ravindran, 2019
Nivel de capacitación	Algunos organismos en estadios larvales pueden ser difíciles de identificar, adicionalmente existen organismos cuya taxonomía es compleja y requiera procesamiento (cortes histológicos, disecciones) que requiere mayor capacitación.	Se utilizan técnicas moleculares de rutina (PCR, qPCR) que cualquier persona con capacitación en biología molecular puede realizar. La extracción y purificación del ADN pueden presentar cierta complejidad, aunque existen <i>kits</i> comerciales que reducen este problema.	Deagle <i>et al.</i> , 2003; Briski <i>et al.</i> , 2011; Davy <i>et al.</i> , 2015
Fiabilidad del resultado	Se observa al organismo en un sitio específico. La fidelidad del resultado se basa en las competencias taxonómicas del grupo de investigación.	El ADN puede encontrarse dentro del sustrato durante meses o años en climas fríos. El ADN puede ser desplazado en matrices fluidas (agua y aire), lo que genera que la geo localización no sea precisa. Adicionalmente el ADN puede ser desplazado por fuera del rango de supervivencia de la especie (aguas abajo de un río a zonas estuarinas) generando una falsa percepción de la distribución. La correcta identificación se basa en poseer buenas bases de datos completas y robustas.	Deagle <i>et al.</i> , 2003; Briski <i>et al.</i> , 2011; Díaz-Ferguson & Moyer 2014; Davy <i>et al.</i> , 2015; Thomas <i>et al.</i> , 2020
Volúmenes de muestra	En muestra de agua puede requerir varios litros dependiendo del estado de invasión y las densidades larvales.	Los métodos más sensibles pueden requerir de 200 mL a pocos litros.	Díaz-Ferguson <i>et al.</i> , 2014b; Pie <i>et al.</i> , 2017; Xia <i>et al.</i> , 2018; Fabián <i>et al.</i> , 2021

Especificidad	Estadios inmaduros de especies cercanas filogenéticamente pueden ser confundidos por personal inexperto o no pueden ser diferenciados.	Los métodos correctamente estandarizados y validados deberían reconocer exclusivamente a la especie de interés.	Deagle <i>et al.</i> , 2003; Briski <i>et al.</i> , 2011
---------------	--	---	--

5.4 Futuras invasiones

Limnoperna fortunei es catalogada como una especie resistente a diferentes tipos de estresores ambientales, como la anoxia y la contaminación, sumado a su capacidad de producir grandes cantidades de gametos y la falta de otros organismos epifaunales en muchas regiones del mundo, convirtiéndola en una especie invasora exitosa (Boltovskoy, 2015b; Ghabooli *et al.*, 2013. Paolucci *et al.*, 2014). Estas características le permitirían invadir un importante número de ambientes acuáticos de la región tropical y neotropical, poniendo en riesgo regiones de gran diversidad como son Centro-América y el Caribe, Madagascar, Nueva Zelanda, el Sudeste-Asiático, el Amazonas y bosques tropicales del centro de África (Boltovskoy, 2015a; Myers *et al.*, 2000). La Figura A3.1 muestra la distribución actual (A) y potencial (B) de la especie de acuerdo con Boltovskoy (2015b).

El uso de métodos veloces, específicos y sensibles para la detección de la especie en los sistemas invadidos es una de las medidas de prevención más importantes para detener el avance de *L. fortunei* y otras EEI (Darling & Mahon, 2011; Díaz-Ferguson & Hunter, 2019). Los métodos moleculares son una alternativa que ha mostrado buenos resultados, por ejemplo Deagle *et al.* (2003) desarrolló un método, en Australia, para detectar larvas de *Asterias amurensis* en muestras de plancton de agua de lastre, para distinguirlas de otras larvas de estrellas de mar. La sensibilidad obtenida fue tan alta que pudo obtener resultados positivos con una larva en 200 mg de plancton. Es así que estos métodos que permiten la detección temprana en muestras de agua de EEI acuáticas deberían continuar su desarrollo a nivel mundial para prevenir los impactos negativos que generan las EEI a nivel mundial.

En el presente trabajo se implementaron técnicas de ecología molecular basadas en la detección del ADN de *L. fortunei* en muestras en sistemas acuáticos invadidos y sistemas no invadidos. Se presenta como posible alternativa para detectar larvas de la especie presente en los sistemas de refrigeración de centrales hidroeléctricas de los embalses del Río Negro.

6.-Hipótesis

En sitios donde está presente *Limnoperna fortunei* es posible detectar su ADN mediante el estudio del ADN ambiental.

7.-Predicciones:

- Predicción 1: Se detectará ADN de *L. fortunei* mediante técnicas de ADNa en muestras de sistemas invadidos por la especie.
- Predicción 2: Los cebadores obtenidos de antecedentes bibliográficos podrán ser utilizados en metodologías de ADN ambiental en Uruguay, basadas en PCR en tiempo final.
- Predicción 3: El método molecular será altamente sensible, pudiendo detectar un nivel bajo de número de larvas (menor a 1 organismo), siendo más sensible que el método tradicional.
- Predicción 4: El procesamiento de muestras complejas (ej. plancton) presentará dificultades procedimentales como la presencia de inhibidores de la PCR.

8.-Objetivos

General:

- Estandarizar una técnica de ecología molecular (ADN ambiental) adaptada para la detección de ADN de *L. fortunei* (mejillón dorado) en sistemas acuáticos de Uruguay mediante PCR en tiempo final.

Específicos:

- Desarrollar, poner a punto y protocolizar una técnica para la detección de ADN de *L. fortunei* en sistemas acuáticos de Uruguay.
- Seleccionar el mejor juego de cebadores para detectar ADN de *L. fortunei* en base a antecedentes bibliográficos.
- Determinar la especificidad de la técnica.
- Estudiar la sensibilidad del método para detectar ADN de *L. fortunei*, proveniente de muestras de diferentes matrices.
- Evaluar la presencia/ausencia de ADN de *L. fortunei* en muestras acuáticas provenientes de ambientes con diferentes probabilidad de poseer ADN de esta especie, mediante PCR en tiempo final revelado en geles de poliacrilamida y agarosa.

- Comparar los resultados obtenidos por métodos tradicionales y moleculares en los sitios de estudio.
- Establecer la confiabilidad de los resultados obtenidos por PCR en tiempo final mediante el ajuste de un modelo binomial y basado en el teorema de Bayes.

9.-Material y Métodos

9.1 Preselección de organismos utilizados en estudios de especificidad de la metodología

Para determinar la presencia de reacciones cruzadas (reacción positiva a una especie no blanco) se estudió las relaciones filogenéticas de la especie con otros bivalvos autóctonos (agua dulce y marinos) de la de la cuenca del Plata (Darrigran & Damborenea, 2006a; Scarabino & Mansur, 2007), nos basamos en el supuesto que los cebadores hibridan en regiones no conservadas dentro de la clase, por consiguiente si no existe reacción cruzada en especies cercanas suponemos que no debería haberlo en especies más lejanas filogenéticamente (Karim, 2019). Para *L. fortunei* se consideraron algunos de los haplotipos presentes en la región de acuerdo con Ghabooli *et al.* (2013). Se realizó un árbol filogenético basado en máxima verosimilitud en el programa *RAxML* v 8.2.10 (Stamatakis, 2014) de acuerdo con el protocolo de Liu *et al.* (2018).

Se utilizaron secuencias *Barcoding* de un grupo representativo de bivalvos que habitan nuestro territorio. Las secuencias fueron alineadas mediante el algoritmo *ClustalW* (Thompson *et al.*, 2003) y recortadas en un fragmento de 496 pb en el programa Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016). Se utilizó a *Laevipilina hialina* (McLean, 1979) como grupo externo por ser un molusco de la Clase Monoplacophora lejanamente emparentado con los moluscos bivalvos.

La visualización del árbol filogenético se realizó en el programa Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016). Las secuencias utilizadas y los códigos de *GeneBank* se presentan en la Tabla A1.1 (Anexo 1), el comando del árbol filogenético fue: “-T 3 -f a -x 616 -p 909 -N 1000 -m GTRGAMMA”.

9.1.1 Colecta y procesamiento de muestras

Durante 2018 y 2019 en diferentes sistemas acuáticos invadidos de Uruguay (Figura 5A) se colectaron muestras de *L. fortunei* como controles positivos. Complementariamente en sistemas acuáticos (agua dulce y marina) (Figura 5B) se colectaron especies autóctonas de invertebrados y moluscos acuáticos y otro bivalvo invasor (*Corbicula fluminea*) para determinar la especificidad de los cebadores. Los *vouchers* fotográficos se muestran en el Anexo 2, con la excepción de *D. magna* y *L. fortunei* que debido a que el procesamiento de las muestras destruyó el *voucher*.

En la tabla A1.2 (Anexo 1) se detallan las especies colectadas, métodos y sitio de muestreo. Los ejemplares adultos de los diferentes bivalvos se colectaron

manualmente y se fijaron inmediatamente en alcohol etílico 95%, luego de que sus valvas fueron cortadas para facilitar el ingreso del alcohol al interior del organismo.

En el marco del proyecto CSIC-UTE-PVUSP "*Limnoperna fortunei* (mejillón dorado) en las presas y embalses del Río Negro, grado de invasión y aplicación de métodos de control mecánico" (responsable Dr. Ernesto Brugnoli), se colectaron 100 L de agua del sistema de refrigeración de la CH Constitución (Embalse Palmar) en los meses de octubre, diciembre y agosto de 2018 y enero de 2019.

Las muestras se filtraron en una malla de 100 μm , se fijaron en alcohol etílico 95% y se conservaron refrigeradas (4°C) a oscuras.

Complementariamente, se colectaron muestras en sistemas acuáticos con condiciones ambientales donde podría sobrevivir la especie pero que aún no ha sido reportado (ej. Laguna del Medio, Río Santa Lucía), así como en sitios con condiciones limitantes para la supervivencia de la especie (ej. Océano Atlántico). En los diferentes sitios de colecta (Tabla A1.2, Anexo 1), se realizaron 2 arrastres de 5 metros con una red de plancton de 60 μm de malla y 30 cm de diámetro, las muestras fueron tamizadas con una malla de 100 μm , fijadas en alcohol etílico 95% y preservadas a -22°C hasta su procesamiento.

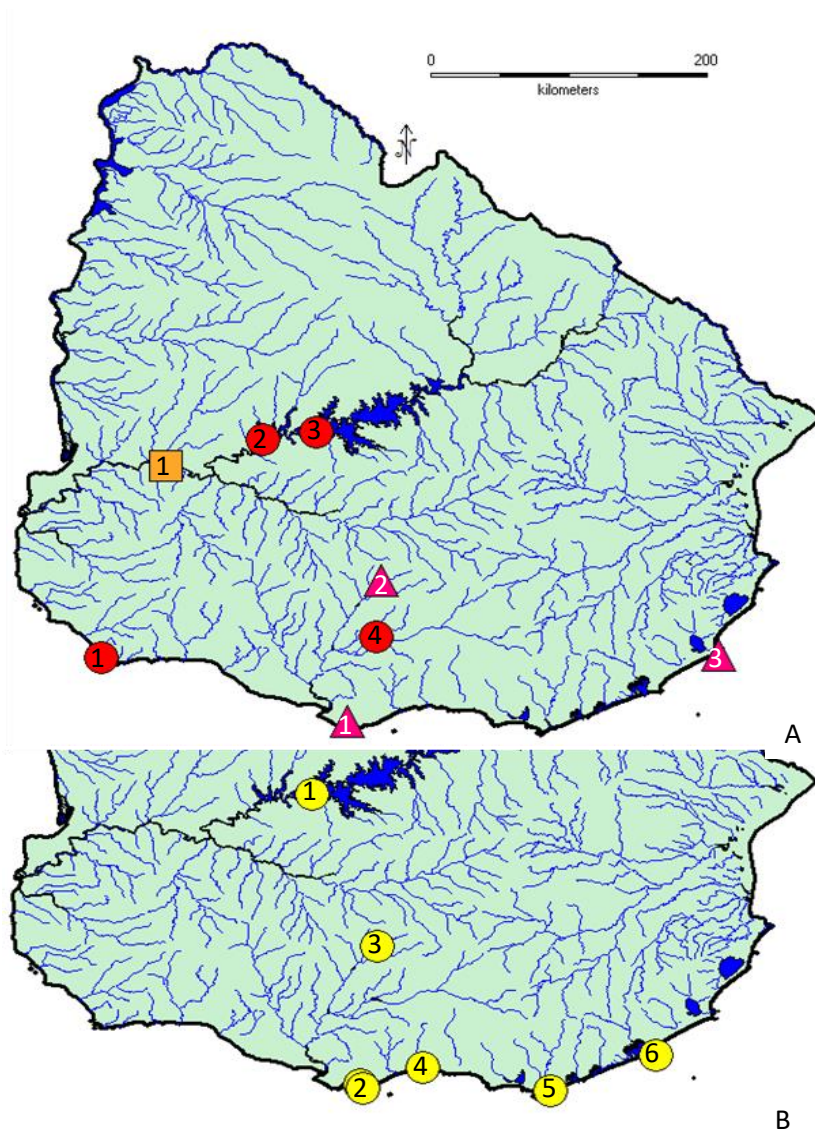


Figura 5. A: Mapa del Uruguay mostrando los sitios de colecta de organismos utilizados en el presente estudio, el rectángulo Naranja representa la Central Hidroeléctrica Constitución. Los Círculos Rojos indican los lugares de donde se colectaron ejemplares adultos de *L. fortunei* 1- Colonia del Sacramento, Río de la Plata (Ejemplar *L. fortunei* 3), 2- Cabecera del Embalse Baygorria, Río Negro (*L. fortunei* 2), 3- Areneras del Hum, Río Negro (*L. fortunei* 1), 4- Embalse Canelón Chico, Arroyo Canelón chico (*L. fortunei* 4). Los rectángulos Rosados son los sitios de colecta de plancton. 1- Bahía de Montevideo, Río de la Plata 2: Laguna del Medio, Río Santa Lucía 3: Cabo Polonio, Océano Atlántico. B: Mapa con los sitios de colecta de organismos utilizados para determinar especificidad: 1: *Corbicula fluminea*, 2: *Daphnia magna* y *Pomacea canaliculata* / *Brachidontes darwinianus* y *Mytella Charruana*, 3: *Diplodon* sp., 4: *Erodona Mactroides*, 5: *Mytilus edulis*, 6: *B. rodriguezii*.

La sensibilidad de la técnica se evaluó en número de larvas de *L. fortunei* (sección 4.4). Para ello se aislaron manualmente, mediante absorción en microscopio óptico, 35 y 10 larvas (largo estimado de 100-150 μm) que fueron depositadas en tubos *eppendorf* con agua calidad *MiliQ* y congeladas a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento,

considerando triplicado para ambas tomas de larvas. Las larvas obtenidas corresponden al sistema de refrigeración de la CH Constitución durante octubre 2018.

9.2.0 Preselección de los cebadores

Varios autores han diseñado cebadores específicos para COI de *L. fortunei* que pueden ser utilizados en muestras ambientales (Endo *et al.*, 2009; Pie *et al.*, 2006; Pie *et al.*, 2017, Xia *et al.*, 2018). Los mencionados cebadores fueron alineados y comparados con las secuencias de ADN del gen COI de los géneros de bivalvos registrados para la región (Darrigran & Damborenea, 2006; Scarabino & Mansur, 2007) mediante el algoritmo *ClustalW* (Thompson *et al.*, 2003) incluido en el paquete del software *MEGA 7* (Kumar *et al.*, 2016). Además se compararon con los 11 haplotipos del mejillón dorado registrados para América del Sur (Ghabooli *et al.*, 2013). Se preseleccionaron los cebadores de Endo *et al.* (2009) “Limf” y el par E de Xia *et al.* (2018) llamados “XiaE”, debido a que han demostrado ser altamente sensibles, específicos y presentan un amplicón de pequeño tamaño (138 y 127 pb respectivamente), lo cual los convierte en buenos candidatos para ADN ambiental. El la reacción de PCR utilizando el par de cebadores XiaE mostró tener alta sensibilidad en gel de agarosa 2X (4×10^{-3} ng de ADN) (Xia *et al.*, 2018). La secuencia y características de los cebadores se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Secuencia y características de los cebadores utilizados. La ubicación de los cebadores en el gen se hizo en base a la secuencia disponible en la base de datos GenBank, código DQ264395.1

Nombre	Secuencia	Gen	Longitud (pb)	Tm (°C)	Ubicación del cebador en el gen	Cita
Limf-D	5' -TCTCTTCATTTAGCTGGTGCGTC-3'	COI	23	57,1	358	Endo <i>et al.</i> , 2009
Limf-R	5' -CAAAACAGATGTAAGTCAAGAGAC-3'	COI	25	62,2	471	Endo <i>et al.</i> , 2009
XiaE-D	5' -TAGAACCCAGCAGTTGACAT-3'	COI	21	61,3	327	Xia <i>et al.</i> , 2018
XiaE-R	5' -ACGCTCACCACGCATTTC-3'	COI	18	60,5	436	Xia <i>et al.</i> , 2018

Se realizaron análisis con el algoritmo *BLAST*, en la base de datos *GenBank* (NCBI), en donde se contrastaron contra todas las secuencias de *GenBank* (exceptuando *L. fortunei*), y análisis de *BLAST* específicos utilizando exclusivamente las especies de bivalvos dulceacuícolas y estuarinas de la región. Finalmente se utilizó la herramienta bioinformática específica online *Primer-BLAST* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), con la que se compararon los

cebadores contra todas las secuencias presentes en el *GenBank*, así como contra los géneros de bivalvos que podrían generar reacción cruzada.

Para optimizar el análisis, mediante el programa online *OligoAnalyzer* (Owczarzy *et al.*, 2008), se determinaron las propiedades físico-químicas de los cebadores como el %CG (porcentaje de Citosinas y Guaninas), la T_m (temperatura a la que la mitad de los cebadores se separan de la hebra complementaria). Se analizó además la temperatura de desnaturalización de horquillas que es la temperatura a la (que se separan las estructuras internas que genera un cebador consigo mismo) así como la energía libre de Gibbs (ΔG) de los posibles homodímeros (indicador de qué tan favorable energéticamente es que un cebador se aparee consigo mismo) y finalmente el ΔG para heterodímeros (qué tan favorable es que se apareen ambos cebadores entre sí).

9.3 Procesamiento de las muestras para análisis moleculares

9.3.1 Extracción de ADN, protocolos para tejidos, larvas y plancton.

Se obtuvo ADN de una sección del pie de *P. canaliculata*, *C. fluminea*, *Diplodon sp.* y *E. mactroides*; para los mejillones como poseen un pie muy pequeño se tomaron muestras de pie, sifones, branquias y manto. Se utilizaron 15 organismos de *Daphnia magna* que fueron lisados completamente debido a que al ser ejemplares criados en laboratorio no existiría posibilidad de que estuvieran contaminados con ADN de *L. fortunei*.

Las muestras se procesaron según riesgo de contaminación, que definimos como la probabilidad estimada *a priori* de que la muestra genere un positivo (falso o verdadero) y que si contamina otra muestra genere un falso positivo, por ejemplo que se contamine el ADN de *D. magna* con *L. fortunei*:

1º: muestras que representaban poco riesgo de generar contaminación (ej. controles negativos que no fueran Mytilidae)

2º muestras pertenecientes a la familia Mytilidae (todas las especies de mejillones colectados excepto *L. fortunei*)

3º muestras de plancton que por su ubicación geográfica no puedan tener o no se sospechara que tuvieran ADN de *L. fortunei*

4º muestras de adultos de *L. fortunei* y muestras con registro de larvas confirmadas.

Todas las muestras y alícuotas de ADN que no fueron utilizadas durante la presente tesina fueron conservadas entre -20 y -80°C en el Laboratorio de Trazabilidad Molecular, Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, UdelaR.

Las extracciones de ADN se realizaron con el *kit* comercial *Gene JET Genomic DNA Purification Kit* (ThermoFisher) de acuerdo con el protocolo provisto por el fabricante con algunas modificaciones. La lisis de tejidos de los organismos obtenidos se realizó por 24 horas en lugar de lo recomendado (de 1 a 3 horas) para lograr la mayor digestión posible de los mismos. A algunos productos de lisis (Tabla A1.2, Anexo 1) se les agregó 300-350 µL de cloroformo-álcohol isoamílico (C-AI) en proporción 24:1, para retirar la mayor cantidad de polisacáridos, restos proteicos y otras sustancias que pueden interferir con la extracción de ADN y posterior PCR, según lo sugerido por el protocolo del *kit* *E.Z.N.A.® Mollusc DNA Kit* (Omega, BioTek), el cual es específico para moluscos. Finalmente los volúmenes de elución se redujeron a 100 µl, eluyendo con 50 + 50 µl o 70 + 30 µl de buffer de elución.

La concentración de ADN genómico se determinó mediante espectrofotometría UV *Nanodrop* (Matlock, 2015). La calidad de la extracción se determinó como la relación de la medida de absorbancia a 260 y 280 nm ($A_{260/280}$), considerándose como buena calidad valores mayores a 1,5 (Díaz-Ferguson *et al.*, 2014b, Velázquez *et al.*, 2014).

Los tubos conteniendo larvas aisladas fueron centrifugados 10 minutos a 14.000 g, según el protocolo obtenido en Frischer *et al.* (2002), con el objetivo de concentrarlas. En ese tubo se siguió el protocolo para tejidos (ver 3.1.2).

Las muestras de plancton fueron filtradas en filtros de fibra de vidrio calidad MGF (0,7 µm de malla). Para eliminar cualquier resto orgánico o de ADN, los filtros de fibra de vidrio fueron previamente tratados a 500 °C por 20 minutos y los equipos de filtración se lavaron entre cada procedimientos con ácido clorhídrico al 10% durante 10 minutos y luego lavados con abundante agua Mili Ro para eliminar cualquier contaminación por ADN.

Las muestras filtradas se colocaron inmediatamente en el *buffer* de digestión comercial del *kit* mencionado en la sección 3.1.2. y congeladas hasta su procesamiento. El tratamiento realizado fue igual que a las muestras de tejidos. Sin embargo en muestras con mucha cantidad de plancton (Ver Figura A3.1 en Anexo 3), las mismas se pasaron dos veces por C-AI para eliminar posibles compuestos inhibidores, que interfieran con la extracción o la PCR.

9.3.2 Electroforesis de ADN genómico

Se realizó un ensayo de electroforesis en gel de agarosa 1% para determinar la integridad del ADN extraído tanto de organismos como de una muestra compleja. La

tinción del ADN se realizó mediante el reactivo *GoodviewTM* (SBS, Genetech), agregando 10 µL del mismo cada 100 mL de agarosa. Se utilizó *Buffer TAE 1X* (Fierro, 2014, Anexo 4 tanto para el gel como la corrida electroforética).

Los ADN seleccionados para analizar en gel de agarosa provinieron de siete extracciones: *L. fortunei* (4 individuos), *C. fluminea*, *P. canaliculata aff.* y plancton de la Bahía de Montevideo. El marcador de peso molecular fue *HiperladderTM II* (Meridian Bioscience®). Se cargó en cada pocillo del gel aproximadamente 1 µg de ADN genómico y 220 ng de ADN de muestra compleja debido al bajo rendimiento de la extracción de ADN de la muestra y el volumen máximo a cargar del pocillo. En los carriles 3 y 4 se cargó ADN que durante su extracción tuvo un tratamiento con C-AI, (el ADN cargado en los demás carriles no recibió este tratamiento).

9.4 PCR en tiempo final

9.4.1 Determinación de la temperatura de óptima de la reacción:

En termociclador de gradiente en tiempo final (*Corbett Research PCR Thermal Cycler*), se realizaron PCRs con ADNs moldes de *L. fortunei* y *Mytilus platensis*, pertenecientes a la misma familia. Posteriormente se probaron los mismos cebadores en el mismo gradiente en ADN con la almeja asiática (*C. fluminea*), otro bivalvo exótico invasor presente en la cuenca del Plata (Brugnoli *et al.*, 2012).

Las condiciones de la PCR fueron iguales a las sugeridas por Xia *et al.* (2018) con volumen de reacción de 25 µL, 1X de *buffer* de PCR, 0,05 mM de cada dNTP, 2,0 mM de Mg²⁺ y 1 unidad de Taq polimerasa (*HybriPolTM DNA Polymerase*; BioLine); con la excepción de la concentración de cebadores que se redujo a 0,2 mM. Se agregaron aproximadamente 50 ng de ADN genómico. El programa de ciclado fue de 4 minutos a 95°C, 30 ciclos con una fase de desnaturalización a 95°C por 30 segundos. La fase de hibridación se realizó en un gradiente de temperaturas entre 55 y 68°C para los cebadores de Xia *et al.* (2018) y entre 60 y 68°C para los de Endo *et al.* (2009) durante 35 s. La elongación se realizó a 72°C por 30 s y una extensión final a 72°C por 7 minutos.

9.4.2 Resolución de los fragmentos de PCR mediante electroforesis en gel de poliacrilamida

Se corrieron 4 µL de producto de PCR y 1 µL de buffer de carga (Anexo 4) en un gel de poliacrilamida 12% (Anexo 4) y revelados por tinción de plata (Sanguinetti *et al.*, 1994, Anexo 4). Se utilizó como marcador de peso molecular el *HyperladderTM V* (Meridian Bioscience®), se corrió en Buffer TBE 1X (Fierro, 2014). Los geles fueron fotografiados y editados en el programa *Adobe Photoshop Cs6*.

9.4.3 Especificidad de la PCR en tiempo final

Se determinó la especificidad de la reacción, a la temperatura de hibridación óptima previamente determinada en 4.1, en muestras de tejidos de organismos adultos de *L. fortunei*, bivalvos autóctonos (Sección 1.1) y muestras de plancton. Los resultados de estas PCRs se resolvieron en geles de poliacrilamida 12% revelado por tinción de plata (Sanguinetti *et al.*, 1994). Las condiciones de la PCR fueron las mismas que para la PCR de gradiente en tiempo final pero agregando en promedio 50 ng de ADN.

9.4.4 Sensibilidad de la PCR en tiempo final

Se determinó el límite inferior de detección de la reacción, esto sería la concentración mínima de ADN que genera una reacción positiva (una banda a la altura esperada en referencia al marcador de peso molecular utilizado y el control positivo). Esto se realizó diluyendo serialmente ADN de organismos adultos (*L. fortunei* 1) y testeando mediante PCR en tiempo final.

Se determinó como valor límite inferior de detección aquella concentración que genere 50% de las reacciones positivas (Xia *et al.*, 2018). Se partió de una muestra de 60 ng.µl⁻¹, diluyendo en un orden de magnitud el ADN hasta 6 pg.µl⁻¹. El experimento se hizo por triplicado. Las características de las PCRs en tiempo final fueron iguales que las descritas en la sección 4.1.

Se realizó el mismo ensayo con larvas de *L. fortunei*, en donde se testearon 35, 10 y 1 organismo, considerando una réplica experimental para cada réplica biológica. Posteriormente se realizaron 3 réplicas biológicas con 3 réplicas experimentales para 1 larva y ½ larva como también 2 réplicas experimentales para las 3 réplicas biológicas de ¼, 1/10 y 1/100 larvas.

Los resultados se visualizaron en geles de poliacrilamida 12%, utilizando 5µl de producto de PCR y 1 µl de *Buffer* de carga. Se utilizó el marcador de peso *Hyperladder*[™] V (Meridian Bioscience®).

9.4.5 Muestras ambientales

Se realizó una primera PCR con ADN extraído de 4 muestras del sistema de refrigeración de la CH Constitución pertenecientes al 20/8/2018 (0 Larva), 20/12/2018 (4340 Larvas de todos los estadios), 3/1/2019 (33.000 Larvas de todos los estadios) y 18/1/2019 (2900 Larvas de todos los estadios). La cuantificación de larvas fue determinada previamente en microscopio óptico en cámaras de conteo de zooplancton de 2 mL (Fabián *et al.*, 2021). Complementariamente se utilizaron muestras de plancton obtenidas en la Bahía de Montevideo, Río de la Plata (2 réplicas), Laguna del

Medio (Río Santa Lucía, Florida) y Cabo Polonio (Rocha, Océano Atlántico) (Figura 5 A).

Se agregó como molde 2 μL de eluido de ADN. A partir de este punto se utilizó la dilución de 60 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de ADN total obtenida del organismo *L. fortunei* 1 como control positivo (sección 3.1).

9.4.6 Test de inhibición

Para determinar si existía inhibición de la PCR se realizó una prueba de inhibición, la cual consiste en realizar en un mismo tubo dos reacciones de PCR diferentes. Se utilizó un gen de maíz como segunda secuencia, utilizando los cebadores específicos de maíz hmgA que delimitan un amplicón de 79 pb (Carvajal *et al.*, 2017). Las características de la PCR de maíz fueron las mismas que la PCR de *L. fortunei* solo que la concentración de cebadores fue el doble para maíz y se agregó 5 μL de eluido de ADN de maíz. El ciclado fue de 4 minutos a 95°C, 30 ciclos con una fase de desnaturalización a 95°C por 30 segundos. La fase de hibridación se realizó a 60°C durante 35 s y la elongación se realizó a 72°C por 30 s y una extensión final de 72° por 7 minutos. Se utilizaron las muestras de plancton de la CH Constitución únicamente.

9.4.7 Prueba con Suero de Albúmina Bovina (BSA)

Se realizó un ensayo de PCR con 5 μL de eluido de ADN con dos tratamientos, uno con el agregado de BSA a concentración final 0,7 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ y otro sin BSA para determinar si el agregado de BSA generaba una mejor visualización de las bandas, suponiendo que existe inhibición de la PCR (Kreader, 1996; Boeger *et al.*, 2007). Además, se realizó otro ensayo con 3 μL de eluido y concentración final de BSA de 0,4 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Se utilizaron las muestras de plancton de la CH Constitución únicamente para testear la metodología. Finalmente se aplicó el proceso a las otras muestras utilizadas en la sección 4.5.

9.4.8 Segunda tratamiento con Cloroformo-alcohol isoamílico y Precipitación con Etanol

A aquellas muestras que evidenciaran interferencia aún con BSA se les practicó una extracción con C-AI24:1 procesando 30 μL de eluido en 35 μL de C-AI siguiendo la recomendación del *kit* comercial *E.Z.N.A.® Mollusc DNA Kit*. Adicionalment e se practicó una precipitación con etanol utilizando 35 μL de eluido (Green & Sambrook, 2016). Se realizó una PCR con lo obtenido utilizando 3 μL de producto y 0,4 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ concentración final de BSA.

9.4.9 Comparativa en agarosa

Debido a la utilización en trabajos previos de geles de agarosa 2X para determinar los productos de la PCR (Endo *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2018), se analizaron mediante esta técnica algunas muestras en las que se observaron bandas en el gel de poliacrilamida (tanto del segmento deseado, como bandas inespecíficas o reacciones cruzadas). Se cargaron 16 µL de producto de PCR de las reacciones *C. fluminea* 64° Xia E, *M. platensis* 64° XiaE, *L. fortunei* 3 64° XiaE, *L. fortunei* 1 64° XiaE, *L. fortunei* 1 60° Limf y *L. fortunei* 1 68° Limf. Se cargaron 4 µL de *Hyperladder*[™] V (Meridian Bioscience®) y se utilizó 1 µL de *buffer* de carga (fórmula en Anexo 4) y la tinción fue *Goodview*[™] (SBS, Genetech), agregando 10 µL de tinción cada 100 ml de agarosa.

9.5.0 Secuenciación de la banda de interés

9.5.1 Purificación de productos de PCR

Se seleccionaron 2 Controles positivos, de la sección 4.4 y de la sección 4.6 tomándose el producto al que no se le aplicó BSA. Ambos controles se unificaron y purificaron con el Kit comercial *GeneJet PCR Purification Kit* (ThermoScientific) y se utilizó el protocolo para fragmentos cortos. La elución se realizó con 2 lavados con 12,5 µL de *Buffer* de elución. Se midió en *Nanodrop* la concentración de ADN y pureza de la muestra. El resultado se corrió en un gel de poliacrilamida 12% y revelado con tinción de plata. Se enviaron a la empresa *Macrogen* (*Gasán-dong, World Meridian I*) en donde se secuenció con el cebador *directo* y *reverso*.

9.5.2 Envío de muestra adicional para ser purificada y secuenciada

Se envió el Control positivo de las PCR de “Prueba BSA 0,4 µg.µl⁻¹” (sección 4.7.) para que sea purificado y secuenciado por la empresa *Macrogen* (*Gasán-dong, World Meridian I*) por ambos cebadores y se compararon los resultados obtenidos por ambas metodologías. Se utilizó este control debido a que se agregó como molde 90 ng de ADN genómico en vez de 60 ng como en reacciones anteriores. Se determinó concentración y pureza al igual que en el ítem 5.1. Adicionalmente se determinó la concentración y pureza del control positivo de una PCR realizada en la sección 4.4, en la que se agregó 60 ng de ADN genómico en modo comparativo.

9.5.3 Análisis de las secuencias obtenidas

A cada secuencia de ADN se le realizó un análisis mediante el algoritmo *BLAST* en la base de datos *GenBank* del NCBI. Se analizó por inspección visual la calidad de cada

secuencia obtenida. Mediante el programa *Chromas 2.6.6* (Gorgani-Firouzjaee *et al.*, 2019). Manualmente se obtuvo una secuencia consenso, el análisis consistió en remover nucleótidos de baja calidad de los extremos 5' y 3' de la secuencia, en donde existían dudas de su identidad en el cromatograma.

En el programa *Mega 7* se compararon las 4 secuencias recibidas con algunas secuencias *barcoding* de *L. fortunei*; se alinearon mediante el algoritmo *Clustal W* y se buscaron las secuencias de los cebadores utilizados, tomándose estos puntos como los límites de la secuencia de interés. Debido a que las 4 secuencias pertenecen al mismo organismo, se obtuvo una secuencia consenso representante de ese organismo, que fue ingresada a la base de datos *GenBank*.

La secuencia consenso fue comparada con los haplotipos registrados por Ghabooli *et al.* (2013). Adicionalmente se realizó un análisis de *BLAST*.

Los parámetros estadísticos resultantes del *BLAST* a interpretar son *Query Cover* que es el porcentaje de la secuencia que se alinea con la secuencia de referencia, el *E-value* que es la probabilidad de que la alineación se hubiese dado por el azar y el % de identidad que es un indicador de qué tan similares son las secuencias alineadas (Madden, 2013).

9.6.0 Modelaje de un método estandarizado para la detección de larvas de *L. fortunei*

Determinar el número adecuado de réplicas de PCRs a realizar de una extracción de ADN es determinante para la estandarización de un método diagnóstico. Este proceso es largo y complejo y exceden los alcances de una tesina de grado, sin embargo se analizará teóricamente su aplicabilidad. Los modelos se realizaron en el *Software* estadístico *R Studio* y los gráficos se realizaron con el paquete "*ggplot2*" (Chang, 2013). Los aspectos teóricos del teorema utilizados se detallan en el Anexo 5. Los comandos utilizados se encuentran en el Anexo 6.

9.6.1 Poder teórico de resolución de la técnica

Definimos el poder de resolución de la técnica como la probabilidad que una reacción sea positiva siendo que existe ADN de la especie de interés. Este límite es importante de estudiar, especialmente en los límites inferiores de detección de la PCR, que serían los casos con poca cantidad de ADN (por ejemplo solo una larva). Esta concentración condiciona el número de réplicas a realizarse para cada extracción para tener certeza de que no se esté reportando un falso negativo o positivo.

La metodología seguida consistió en realizar al menos 100 réplicas de PCR de una muestra de plancton sin ADN de *L. fortunei* (ej. plancton de Cabo Polonio) a la que se le agregaría una larva de *L. fortunei* (Deagle *et al.*, 2003; Xia *et al.*, 2018). De esta manera se obtiene un *pool* de resultados positivos y negativos, siendo el poder de resolución mostrado en la ecuación (1.) En este modelaje no se considera la variación que pueda existir entre diferentes extracciones.

$$1 \text{ Poder de resolución} = \frac{\text{Número de resultados positivos}}{\text{Total de PCRs realizadas}}$$

Una vez obtenido el poder de resolución se puede modelar la probabilidad de obtener un verdadero positivo y un falso negativo. Se determinó la confianza del resultado obtenido (probabilidad que un positivo sea un verdadero positivo y un negativo un verdadero negativo) mediante el Teorema de Bayes (Newman, 2013). Mediante simulaciones basadas en modelos frecuentistas, utilizando la ley de distribución binomial y binomial negativa (Rius & Barón, 2005) se determina la probabilidad de obtener los resultados positivos necesarios.

9.6.2 Teorema de Bayes

El Teorema de Bayes es un teorema probabilístico para determinar probabilidades condicionadas. El teorema es cuestionado por la aplicación de la subjetividad, que se expresa como una probabilidad *a priori* determinada por el usuario. A pesar de ello, el teorema es ampliamente utilizado en diagnóstico, en donde la probabilidad *a priori* utilizada es la tasa de incidencia del fenómeno a estudiar, en el caso de una enfermedad, por ejemplo, es la tasa de incidencia de la población de análisis (Fernández, 2009; Donis, 2012; Newman, 2013). Como esta técnica es un test diagnóstico se puede aplicar este teorema con los mismos principios que en un ensayo epidemiológico para determinar si el ADN de *L. fortunei* se encuentra en un sistema acuático.

La utilidad de este método es que permite concatenar resultados, eso significa que una vez obtenido un resultado (sea positivo o negativo) eso genera una probabilidad *a posteriori* de que haya o no ADN y esa probabilidad *a posteriori* del primer ensayo se convierte en la probabilidad *a priori* del siguiente, permitiendo calcular los VPP y VPN de la segunda PCR en base a los resultados de la primera PCR. Este proceso se puede repetir hasta conseguir el suficiente nivel de confianza en los resultados (Newman, 2013). En nuestro modelaje se tomará como $P(\text{ADN}+) = 50\%$ (probabilidad *a priori* de que exista ADN de *L. fortunei* en el ambiente) debido a que si vamos a diagnosticar

una muestra no sabemos *a priori* si existe o no la especie (independientemente del nivel de sospecha), por ende es un valor razonable en un modelo de estas características. Los VPP y VPN obtenidos del primer ensayo se utilizarán como las probabilidades *a priori* para determinar los VPP y VPN del siguiente ensayo.

9.6.3 Modelo Binomial y Binomial Negativo

Se modelará la probabilidad de obtener 2 resultados positivos de una misma muestra, que es el criterio que tomaremos para determinar que existe ADN de *L. fortunei* en la extracción, con un máximo de 3 intentos. Complementariamente, se determinará la probabilidad de obtener 2 falsos negativos y 2 falsos positivos en una muestra que tiene ADN de *L. fortunei*.

Debido a que no se poseen los datos del poder de resolución (p) se tomará un intervalo entre 70-95% con saltos cada 1 o 5%. La probabilidad de obtener un falso positivo son bajas si se realizan los controles internos adecuados como son los controles negativos y que no exista reacción cruzada. Sin embargo el error humano aún existe y tomamos ese error entre un 0,5-2% (Ficetola *et al.*, 2016). Para esto se supone que cada tubo de PCR es aislado y que el error en uno no afecta a los otros dos.

10.-Resultados

Inferencias Filogenéticas

Dentro de la familia Mytilidae se observan dos *clusters*, uno formado por *L. fortunei* y otro formado por restantes Mytilidae de agua salada o salobre (Figura 6). En otra rama se observa que la sub-clase Heterodonta está más emparentados con la sub-clase Paleoheterodonta que con Pteriomorphia. El *cluster* a nivel de familias y subclases tuvo un alto porcentaje de apoyo por el *bootstrap* (>50%), sin embargo no hubo buena resolución en determinar la relación filogenética entre las sub-clases (<50%). No hubo buena resolución entre los haplotipos de *L. fortunei*.

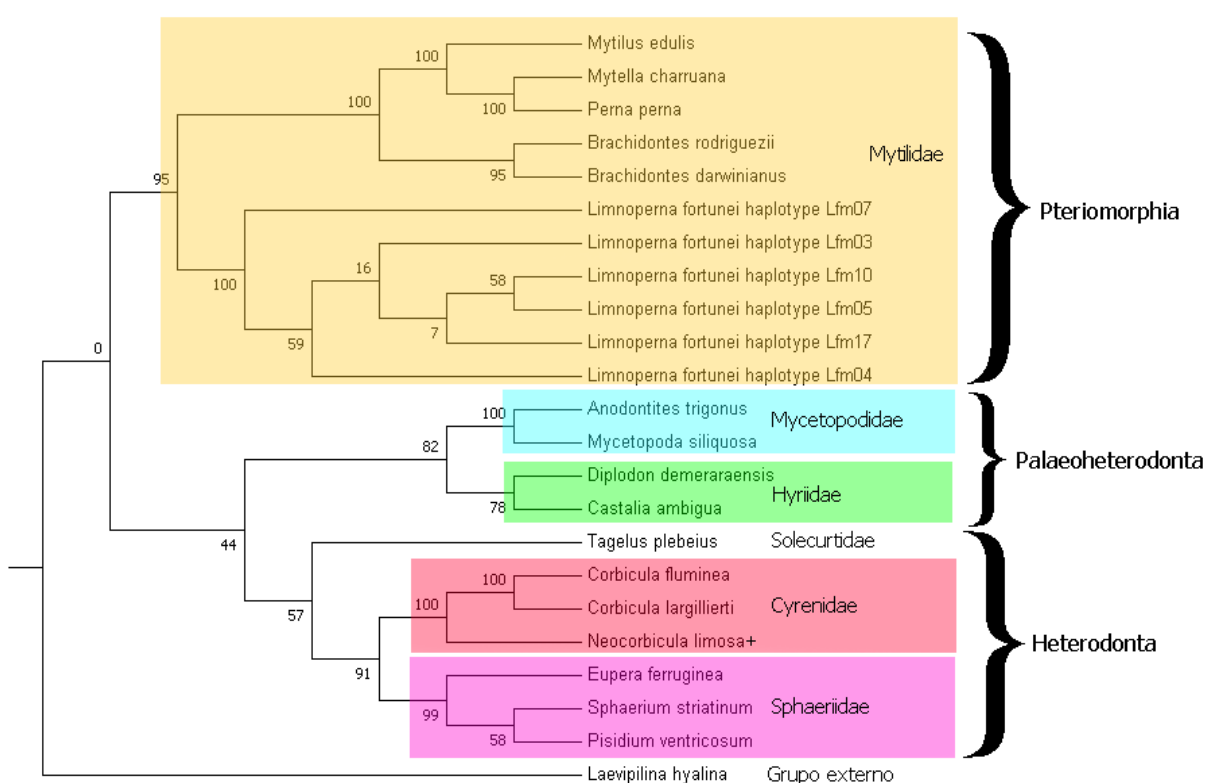


Figura 6. Árbol filogenético basado en máxima verosimilitud entre los distintos bivalvos considerados (Tabla A1.1, Anexo 1). Los colores indican la ordenación por familias y las llaves por sub-clases. +*Neocorbicula limosa* ahora se llama *Cyanocyclas limosa*, se mantuvo el nombre original debido a que es el nombre de referencia en *GenBank*.

Extracciones de ADN:

La concentración de ADN extraído varió entre un mínimo de 4 ng.μL⁻¹ en *Brachidontes darwinianus* y un máximo 726 ng.μL⁻¹ en *Pomacea canaliculata*. La calidad de los mismos fue mayor a 1,5 con excepción de *C. fluminea*, *E. mactroides* y *Diplodon sp.*, representando el 77% de las extracciones realizadas (Tabla 3).

Las muestras de ambientales (plancton) tuvieron concentraciones entre 3 y 23 ng.μL⁻¹, se obtuvieron calidades superiores a 1,5 excepto en las muestras de CH Constitución

3/1, 20/8 y 20/12 (Tabla 3). Se determinaron las concentraciones de ADN de las extracciones de larvas aisladas obteniéndose en promedio $1,4 \text{ ng.}\mu\text{L}^{-1}$ de ADN para 35 larvas y de 0.33 para 10 larvas.

Tabla 3. Concentración de ADN y pureza del mismo ($A_{260/280}$) para cada muestra analizada.

Taxon	Concentración de ADN (ng/ul)	A260/280
<i>Daphnia magna</i>	139	1,7
<i>Pomacea canaliculata, aff</i>	726	2,1
<i>Diplodon sp.</i>	60	1,25
<i>Erodona mactroides</i>	150	1,13
<i>Corbicula fluminea</i>	215	1,4
<i>Brachidontes rodriguezii</i>	122	1,5
<i>Brachidontes darwinianus</i>	4	1,87
<i>Mytilus platensis</i>	48,5	1,87
<i>Mytella charruana</i>	44	1,74
<i>Limnoperna fortunei</i> 1	180	1,95
<i>Limnoperna fortunei</i> 2	252	1,97
<i>Limnoperna fortunei</i> 3	137	1,6
<i>Limnoperna fortunei</i> 4	137	1,6
Plancton Laguna Chica	11	1,6
Plancton Montevideo 1	12	1,6
Plancton Montevideo 2	23	1,6
Plancton Cabo Polonio	7,4	1,5
Constitución 3/1	5,2	1,39
Constitución 18/1	8,1	1,53
Constitución 20/8	3	1
Constitución 20/12	10	1,15

En la figura 7 se presenta el gel de agarosa 2X en donde se corrieron los ADNs genómicos. En la misma se observa la ausencia de señal en los carriles 1, 2 y 5; en los carriles 6 y 7 se observan sombras tenues, mientras que los carriles 3 y 4 se observan corridas con degradación parcial.

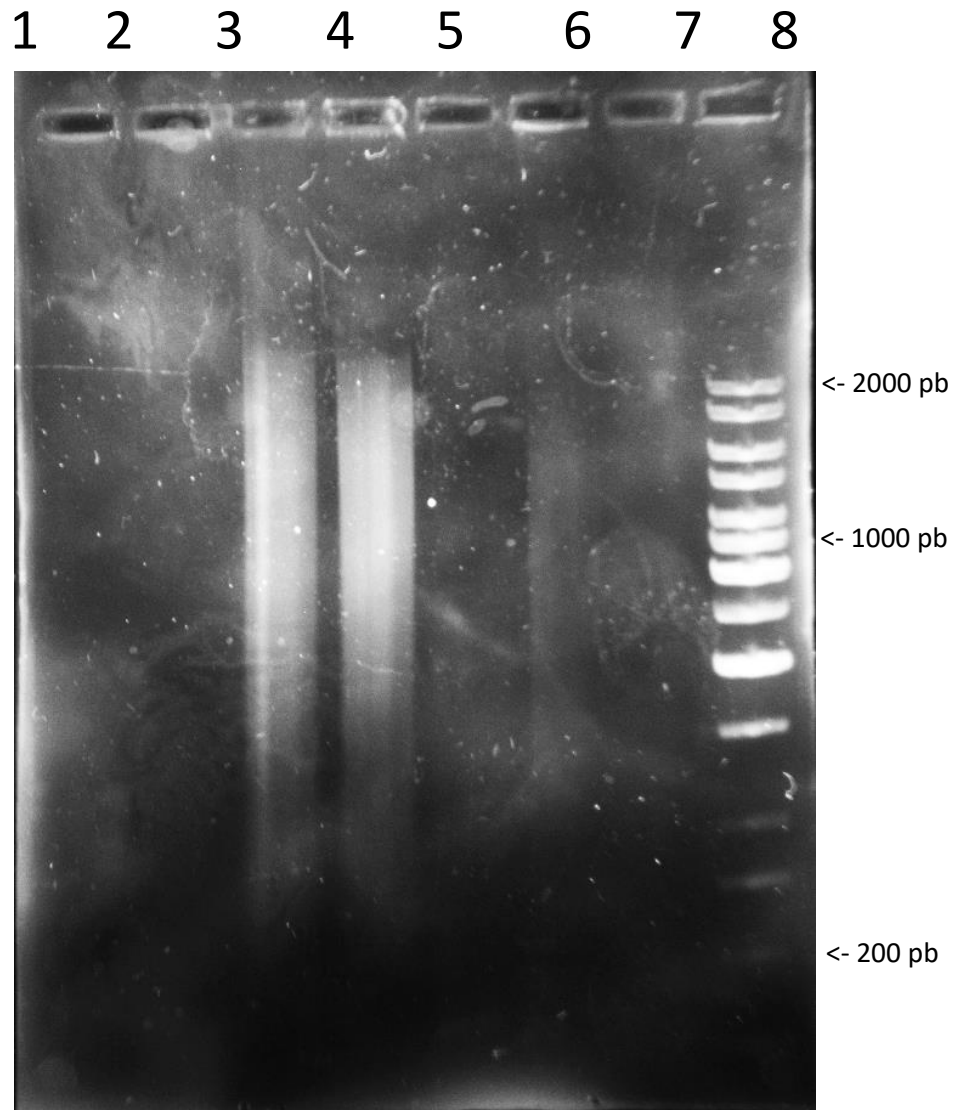


Figura 7. Gel de agarosa 1x con la extracción de ADN genómico. 1: *L. fortunei* 4, 2: *L. fortunei* 4, 3: *L. fortunei* 1, 4: *L. fortunei* 2, 5: *C. fluminea* 6: Plancton de Montevideo 2, 7: *Pomacea canaliculata*, 8: MPM (Marcador de Peso Molecular, algunos tamaños de banda se indican con flechas).

Preselección de cebadores

Los análisis de *BLAST* contra todas las secuencias de *GenBank* de XiaE no tuvieron similitud con ninguna especie asociada al medio acuático. Uno de los cebadores Limf mostró similitud (%) con un oligoqueto dulceacuícola, sin embargo el otro no tuvo similitud con otros organismos de ese ambiente. Los *BLAST* específicos no mostraron gran similitud (%) entre los cebadores y las secuencias existentes de los bivalvos regionales. Los *BLAST* analizados por *Primer-BLAST* no dieron ningún resultado positivo, a excepción de *L. fortunei*, para ningún par de cebadores.

A nivel de similitud con los haplotipos de *L. fortunei*, se observa que ambos cebadores de Limf hibridarían exactamente con todos los haplotipos. Por otra parte, el cebador directo de XiaE difiere en una base en la región 3' en los haplotipos 2 y 10 (Figura 8).



Species/Abbrev	Group Name	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
1. <i>L. fortunei</i> _Lfm01		A	G	A	A	C	C	C	C	A	G	C	A	G	T	T	G	A	C	A	T
2. <i>L. fortunei</i> _Lfm02		A	G	A	A	C	C	C	C	A	G	C	A	G	T	T	G	A	T	A	T
3. <i>L. fortunei</i> _Lfm03		A	G	A	A	C	C	C	C	A	G	C	A	G	T	T	G	A	C	A	T
4. <i>L. fortunei</i> _Lfm04		A	G	A	A	C	C	C	C	A	G	C	A	G	T	T	G	A	C	A	T
5. <i>L. fortunei</i> _Lfm05		A	G	A	A	C	C	C	C	A	G	C	A	G	T	T	G	A	C	A	T
6. <i>L. fortunei</i> _Lfm06		A	G	A	A	C	C	C	C	A	G	C	A	G	T	T	G	A	C	A	T
7. <i>L. fortunei</i> _Lfm07		A	G	A	A	C	C	C	C	A	G	C	A	G	T	T	G	A	C	A	T
8. <i>L. fortunei</i> _Lfm10		A	G	A	A	C	C	C	C	A	G	C	A	G	T	T	G	A	T	A	T
9. <i>L. fortunei</i> _Lfm13		A	G	A	A	C	C	C	C	A	G	C	A	G	T	T	G	A	C	A	T
10. <i>L. fortunei</i> _Lfm16		A	G	A	A	C	C	C	C	A	G	C	A	G	T	T	G	A	C	A	T
11. <i>L. fortunei</i> _Lfm17		A	G	A	A	C	C	C	C	A	G	C	A	G	T	T	G	A	C	A	T

Figura 8. Haplotipos de *L. fortunei* hallados en Sud-América (Ghabooli *et al.*, 2013) contrastado, en el software Mega 7, con el cebador directo de XiaE. Se marca con una flecha la fila en donde se encuentran la mutación que genera la diferencia entre la secuencia y el cebador (cambio de una Citosina por una Timina). En amarillo las secuencias que presentan 100% de identidad con el cebador.

El %GC de los cebadores varió entre 40 y 55,6% y las T_m entre 57 y 61,3 °C. Las temperaturas de desnaturalización de las horquillas fueron entre 28 y 35 °C. Los ΔG de formación de homo y heterodímeros varió entre -8.29 y -0.96 kcal.mol⁻¹. Los resultados obtenidos de los análisis bioinformáticos para cada cebador se expresan en la tabla 4.

Tabla 4. Características físico-químicas de los cebadores a testear. %GC: Porcentaje de Guanina-Citosina del cebador; T_m : temperatura de *melting* de los cebadores; T_m de horquillas: temperatura de *melting* de las horquillas que forman los cebadores; ΔG de homodímeros: Energía libre de Gibbs que poseen los cebadores al unirse a sí mismos; ΔG de heterodímeros: Energía libre de Gibbs que poseen los cebadores al unirse entre sí.

Cebador	%GC	T_m (°C)	T_m de horquillas (°C)	ΔG de homodímeros (Kcal/mol)	ΔG de heterodímeros (Kcal/mol)
<i>Limf-D</i>	47,8	57,1	35	Entre -6,35 y -1,6	Entre -8,29 y -1,34
<i>Limf-R</i>	40	62,2	Entre 31 y 42	Entre -7,05 y -0,96	Entre -8,29 y -1,34
<i>XiaE-R</i>	47,6	61,3	Entre 28 y 32	Entre -3,29 y -0,96	Entre -4,74 y -1,34
<i>XiaE-D</i>	55,6	60,5	Entre 28 y 33	Entre -3,61 y -1,47	Entre -4,74 y -1,34

Temperatura óptima de los cebadores y primeros ensayos de especificidad

a) Cebadores XiaE

La primera PCR se realizó con concentración de cebadores iguales a 0,4 mM, según Xia *et al.*, (2018) y en un gradiente de temperaturas de 55; 57,5; 60 °C. Los ADNs a evaluar fueron obtenidos a partir de *L. fortunei* 1 y 2 (Tabla A1.1, Anexo 1). La figura 9 muestra los resultados obtenidos, en donde se observan varias bandas inespecíficas tanto en la especie blanco como en la no blanco (*M. platensis*). Se observa que está presente en las muestras de *L. fortunei* y muy ligeramente en las muestras de *M. platensis*. En el C- se observa media banda producto del movimiento de producto de PCR del carril 5 al 4.

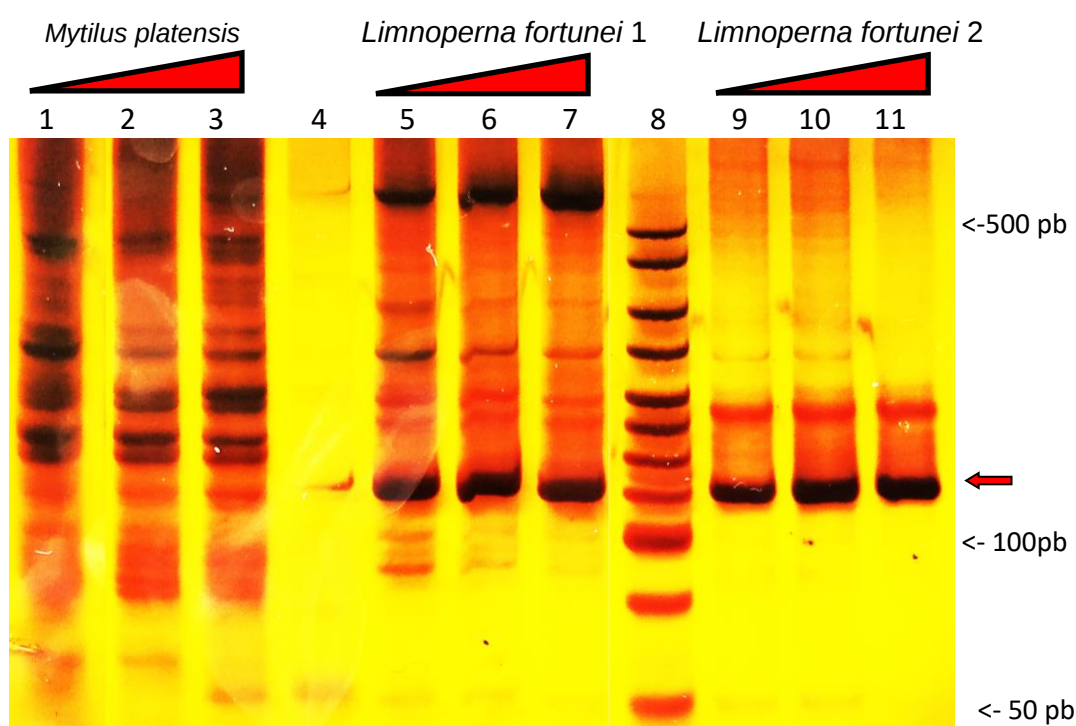


Figura 9. PCR en gradiente XiaE: 1: *M. platensis* 55°, 2: *M. platensis* 57°, 3: *M. platensis* 60°, 4: C-, 5: *L. fortunei* 1 55°, 6: *L. fortunei* 1 57°, 7: *L. fortunei* 1 60°, 8: MPM (Algunos tamaños de banda se indican con flechas), 9: *L. fortunei* 2 55°, 10: *L. fortunei* 2 57°, 11: *L. fortunei* 2 60°. La flecha roja indica la banda de interés.

Posteriormente se incrementó la temperatura y se redujo la concentración de cebadores a 0,2 mM.

En la figura 10 se observan los resultados de la segunda PCR, realizada a 60, 62 y 64 °C. Se observa que la mayoría de las bandas han desaparecido, sin embargo *M. platensis* aún amplifica y en la especie de estudio se observa una banda extra de mayor tamaño a la de interés.

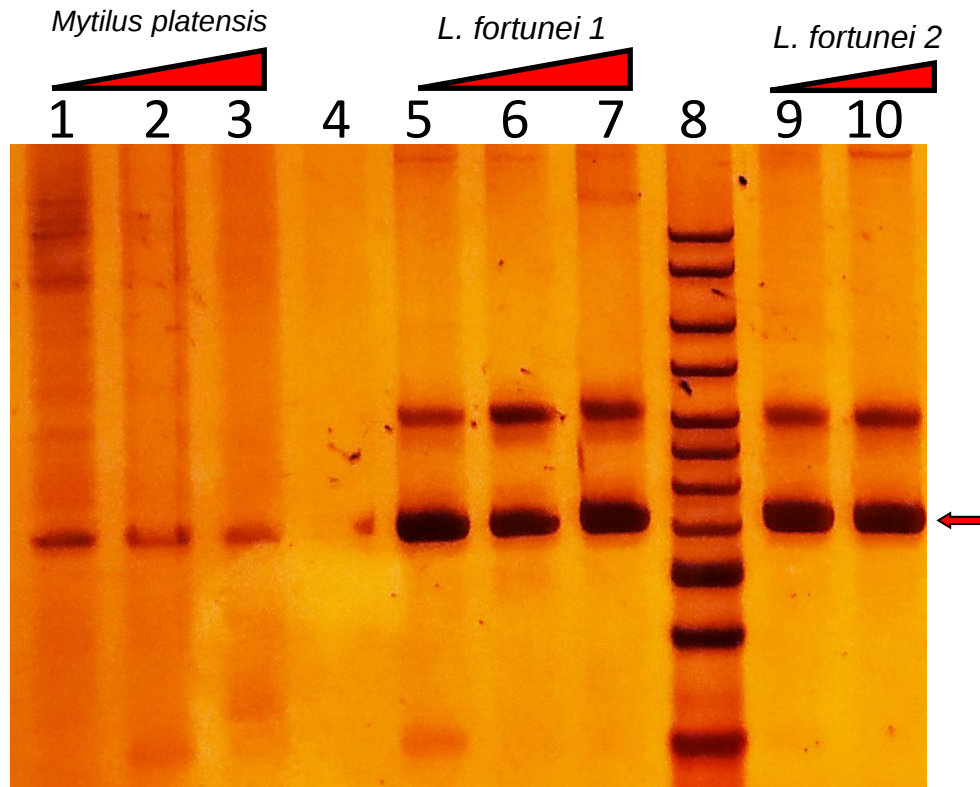


Figura 10. PCR en gradiente XiaE. 1: *M. platensis* 60°C, 2: *M. platensis* 62°C, 3: *M. platensis* 64°C, 4: C-, 5: *L. fortunei* 1 60°C, 6: *L. fortunei* 1 62°C, 7: *L. fortunei* 1 64°C, 8: MPM, 9: *L. fortunei* 2 60°C, 10: *L. fortunei* 2 64°C. La flecha indica el tamaño de banda esperado.

Se realizó el siguiente gradiente de 64-68 °C, manteniendo las características de la PCR. Se optó por sustituir el organismo de la cabecera de Baygorria (*L. fortunei* 2) por un ejemplar hembra de la ciudad de Colonia (*L. fortunei* 3, Tabla A1.1, Anexo 1). Adicionalmente, se agregó a *C. fluminea* al ensayo debido a que es una especie muy común en agua dulce de Uruguay y que obtuvo un resultado negativo a reacción cruzada en el artículo original (Xia *et al.*, 2018).

En el gel (Figura 11) se observa la presencia de dos bandas, una con mayor intensidad y menor tamaño, que se considera la específica, en *L. fortunei* como la presencia de positivos tanto en *C. fluminea* como en *M. platensis* en las diferentes temperaturas ensayadas.

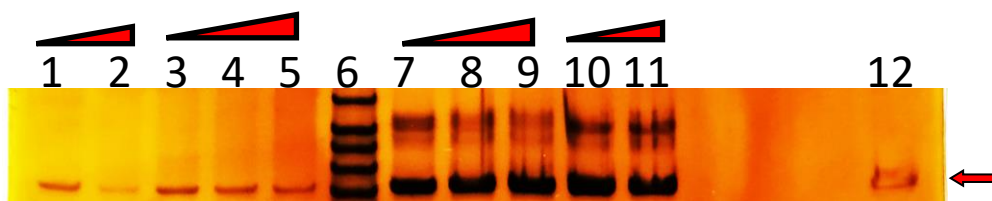


Figura 11. Gel de poliacrilamida de PCR en gradiente con los cebadores XiaE. 1: *C. fluminea* 64°, 2: *C. fluminea* 68°, 3: *M. platensis* 64°, 4: *M. platensis* 66°, 5: *M. platensis* 68°, 6: MPM, 7: *L. fortunei* 3 64°, 8: *L. fortunei* 3 66°, 9: *L. fortunei* 3 68°, 10: *L. fortunei* 1 64°, 11: *L. fortunei* 1 68°, 12: C-. Flecha indica el tamaño de banda esperado.

b) Cebadores Limf

Se realizó la PCR en gradiente partiendo de 60 °C, temperatura de hibridación del artículo original (Endo *et al.*, 2009), aumentando a 62 y 64 °C (Figura 12). No se observan bandas en *C. fluminea* ni en *M. platensis* a la altura de interés (138pb).

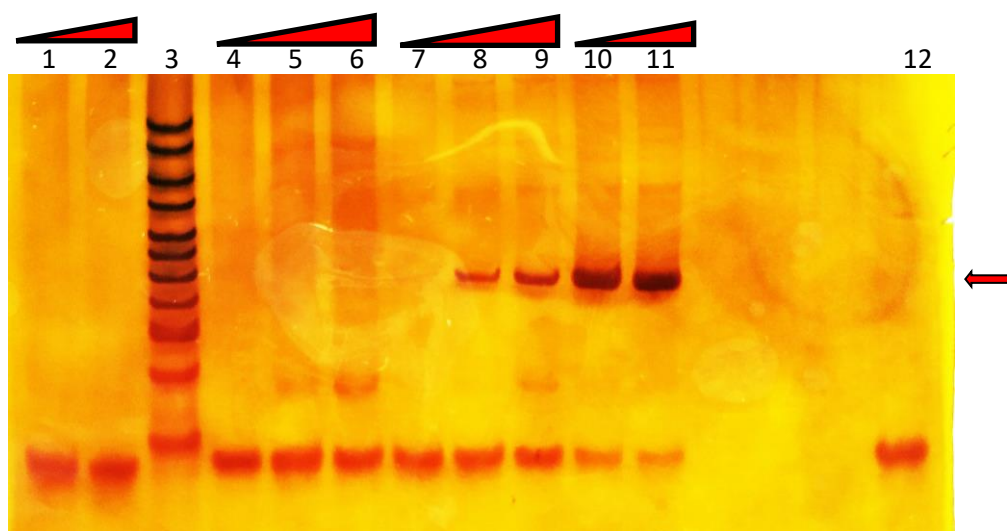


Figura 12. PCR en gradiente con los cebadores Limf. 1: *C. fluminea* 60°, 2: *C. fluminea* 64°, 3: MPM, 4: *M. edulys* 60°, 5: *M. edulys* 62°, 6: *M. edulys* 64°, 7: *L. fortunei* 3 60°, 8: *L. fortunei* 3 62°, 9: *L. fortunei* 3 64°, 10: *L. fortunei* 1 60°, 11: *L. fortunei* 1 64°, 12: C-. Flecha indica el tamaño de banda esperado.

Se procedió a hacer una PCR de gradiente de 60 a 68 °C con aumentos de 2 °C únicamente con ADN de *L. fortunei* 1 para determinar la temperatura óptima de trabajo (Figura 13). En todos los carriles se observa una banda del tamaño esperado pero también dos bandas de mayor tamaño que aumentan su intensidad a medida que aumenta la temperatura, al igual que algunas otras bandas tenues. Por lo anterior se tomó como temperatura de trabajo = 60 °C.

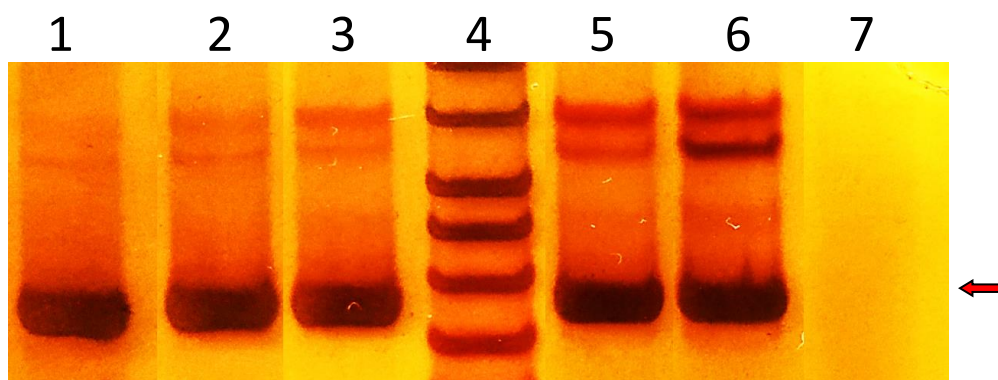


Figura 13. Gel de poliacrilamida de PCR en gradiente, cebadores *Limf*. 1: 60°C; 2: 62°C; 3: 64°C; 4: MPM; 5: 66°C; 6: 68°C; 7: C-. La flecha indica la banda de interés.

Test de especificidad

La figura 14 muestra el test de especificidad en donde no se observan bandas del tamaño del amplicón de interés en los organismos no blancos.



Figura 14. Gel de poliacrilamida de test de especificidad. 1: *D. magna*, 2: *P. canaliculata*, 3: *E. mactroides*, 4: *Diplodon* sp., 5: *B. rodriguezii*, 6: *B. darwinianus*, 7: *M. charruana*, 8: MPM, 9: *L. fortunei* 2, 10: *L. fortunei* 4, 11: *L. fortunei* 3, 12: *L. fortunei* 1, 13: C-.

Test de sensibilidad en ADN genómico

En la figura 15 se observa una banda hasta el tercer carril del gradiente decreciente de concentración, lo que equivale a 6×10^{-2} ng de ADN genómico agregado. Se toma 60 pg (1 ng = 1000 pg) de ADN genómico como el límite mínimo de detección de la técnica.

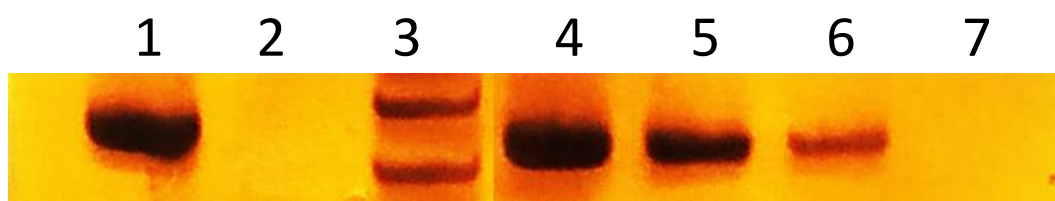


Figura 15. Gel de poliacrilamida de test de sensibilidad. 1: C+ (60 ng ADN), 2: C-, 3: MPM, 4: 6 ng, 5: 0,6 ng, 6: 60 pg, 7: 6 pg.

Test de sensibilidad en número de larvas

Se observaron reacciones positivas tanto para 35, 10, 1 y 1/2 larva de *L. fortunei*. Sin embargo, no se observa reacción positiva para 1/4, 1/10 y 1/100 de larva. La figura 16 muestra las bandas obtenidas de las reacciones, hechas en 3 geles de poliacrilamida.

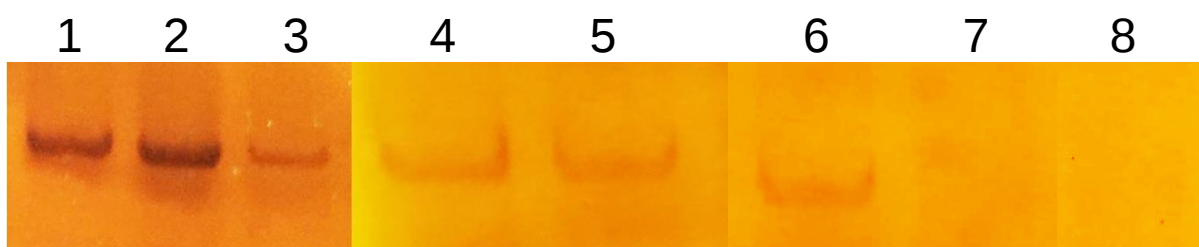


Figura 16. Gel de poliacrilamida de sensibilidad en número de larvas. 1: 35 larvas; 2: 10 Larvas; 3: 1 Larva; 4: 1 Larva; 5: $\frac{1}{2}$ Larva, 6: $\frac{1}{2}$ Larva, 7: $\frac{1}{10}$ de Larva, 8: $\frac{1}{4}$ de Larva de *L. fortunei*.

Muestras ambientales

En la Figura 17 se visualizan resultados positivos en las muestras con 33.000 larvas de *L. fortunei* correspondiente a la muestra de Constitución 3/1 y en una réplica de la Bahía de Montevideo. En la muestra correspondiente a Constitución 20/8 se observa una banda tenue que no se puede visualizar en la Figura 17.



Figura 17. ADN ambiental. 1: C-, 2: C+, 3: MPM, 4: Constitución 3/1, 5: Constitución 18/1, 6: Constitución: 20/12, 7: Constitución 20/8, 8: Bahía de Montevideo 1, 9: Bahía de Montevideo 2, 10: Cabo Polonio, 11: Laguna del Medio.

El test de inhibición no obtuvo resultados concluyentes (Figura A3.3, Anexo 3) debido a problemas en la amplificación del gen de maíz (control positivo de inhibición), el cual no amplificó correctamente en los controles positivos. Sin embargo parecería que existe amplificación de ambos genes en Constitución 3/1 y Constitución 18/1. No se observa reacción para Constitución 20/12.

En el experimento que se agregó 5 μ L de ADN molde se observa sólo la banda perteneciente al 20/8. En esa fecha no se constataron larvas en los conteos al microscopio correspondiente a meses con bajas temperaturas del agua ($<18^{\circ}\text{C}$) (Fabián *et al.*, 2021). En las muestras con BSA se observa que la banda del 3/1 y del 20/8 pero más tenues (Figura 18).



Figura 18. Gel comparativo de muestras ambientales con y sin BSA a concentración final $0,7 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ y $5 \mu\text{L}$ de eluido de ADN genómico. 1: C-, 2: C+, 3: 3/1, 4: 18/1, 5: 20/12, 6: 20/8, 7: MPM, 8: C+ BSA, 9: 3/1 BSA, 10: 18/1 BSA, 11: 20/12 BSA, 12: 20/8 BSA, 13: C- BSA.

En el experimento con $3 \mu\text{L}$ de ADN y $0,4 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de BSA (Figura 19) se observa que todos los carriles poseen reacción positiva con excepción de la muestra tomada en Constitución el 20/12. En el control sin BSA se observa una banda gruesa en Constitución 3/1 y una tenue en 20/8



Figura 19. Gel comparativo de muestras ambientales con y sin BSA a concentración final $0,4 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ y $3 \mu\text{L}$ de eluido de ADN genómico. 1: C-, 2: C+, 3: Constitución 3/1, 4: Constitución 18/1, 5: Constitución 20/12, 6: Constitución 20/8, 7: MPM, 8: C- BSA, 9: C+ BSA, 10: 3/1 BSA, 11: 18/1 BSA, 12: 20/12 BSA, 13: 20/8 BSA.

La alícuota de la muestra correspondiente a Constitución 20/12 que se procesó con C-AI presentó un fuerte olor a cloroformo y con coloración blancuzca, siendo que la PCR dio negativa (gel no mostrado).

La PCR ambiental con BSA a concentración $0,4 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ resultó negativa para todos los sitios testeados, incluyendo la muestra a la que se le realizó la precipitación con etanol (Figura 20). El valor de concentración de ADN de dicha muestra arrojado por el equipo fue de $0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

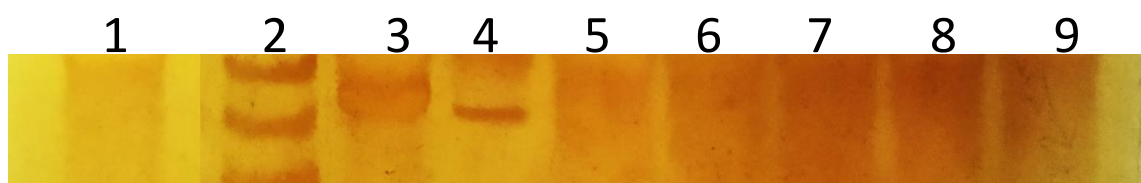


Figura 20. ADN ambiental con BSA a concentración final $0,4 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. 1: C-, 2: MPM, 3 y 4: C+, 5: Constitución 20/12 precipitado, 6: Bahía de Montevideo 1, 7: Bahía de Montevideo 2, 8: Plancton de la Laguna del Medio, 9: Plancton de Cabo Polonio.

Gel de agarosa 2X

No se observa reacción cruzada en *C. fluminea* y *M. platensis* en los productos de PCR de los cebadores XiaE. No se observa la segunda banda en los productos de los cebadores XiaE. Los productos de los cebadores *Limf* muestran una única banda, desapareciendo las otras pequeñas bandas asociadas a cebadores (Figura 21).

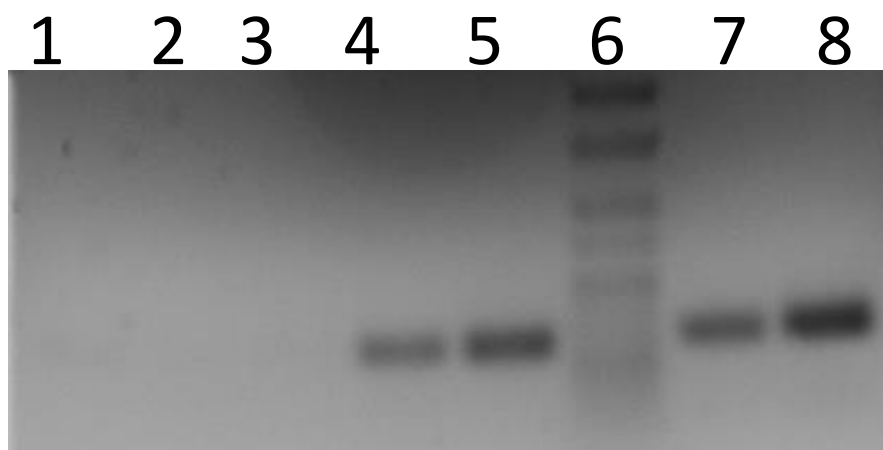


Figura 21. Gel comparativo en agarosa 2x. 1: C- (PCR gradiente 3, XiaE), 2: *C. fluminea* 64°XiaE, 3: *M. platensis* 64°XiaE, 4: *L. fortunei* 3 64°XiaE, 5: *L. fortunei* 1 64°XiaE, 6: MPM, 7: *L. fortunei* 1 60° *Limf*, 8: *L. fortunei* 1 68° *Limf*.

Secuencia de interés

La concentración y pureza de los productos enviados a secuenciar se muestran en la tabla 5. Se observa que las purezas de los tres productos son buenas (aproximadamente 1,8) pero que entre la muestra purificada y los productos de PCR puros, existe un orden de magnitud de diferencia entre las concentraciones medidas.

Tabla 5. Concentración y pureza de las muestras que fueron enviadas a secuenciar (Purificada y Control positivo (C+) con 90 µg) y una muestra de uso comparativo (C+ con 60 µg).

	Muestra purificada	C+ con 60 µg	C+ con 90 µg
Concentración de ADN ng.µL ⁻¹	30	250	180
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	1,8	1,84	1,84

Se observó que en la muestra purificada existen menos bandas inespecíficas (Figura 22) que en ambos productos de PCR sin purificar, sin embargo aún se ve una pequeña sombra bajo la banda de interés.

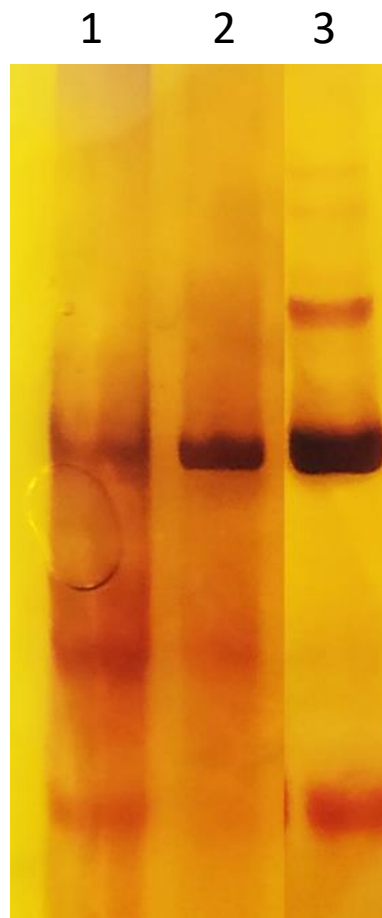


Figura 22. Corridas de los productos pre-seleccionados para la secuenciación. 1: C+ que se agregó 60 μ g de ADN genómico sin purificar, 2: C+ purificado con un kit comercial. 3: C+ que se agregó 90 μ g de ADN genómico sin purificar.

Las secuencias obtenidas tuvieron diferencias entre la muestra purificada y la que se enviaron a purificar. La secuencia recibida de la muestra que fue enviada purificada tuvo una longitud de 111 pb con el cebador directo y 108 pb con el reverso. Las secuencias que fueron enviadas a ser purificadas y secuenciadas rindieron amplicones de 515 pb con el cebador Limf-directo y 394 con el Limf-reverso. Todas las secuencias fueron clasificadas, luego del análisis de *BLAST*, como *L. fortunei*, sin embargo se observa que las muestras que fueron enviadas sin purificar tuvieron contaminación con otras secuencias (que en el cromatograma aparecen como picos bajos e irregulares) que según el algoritmo *BLAST* correspondería a ADN humano para el cebador directo y no dio coincidencia con el cebador reverso.

Ninguna de las cuatro secuencias consenso concordó completamente en longitud con el amplicón de interés, teniéndose longitudes máximas de 90 nucleótidos luego del procesamiento manual. Las cuatro secuencias corresponderían a *L. fortunei* con diferentes niveles de homología, siendo la secuencia secuenciada con el cebador directo de la muestra que fue enviada purificada la que mostró mejores valores en los indicadores analizados (Tabla 6).

Según se pudo contrastar el mejillón utilizado pertenecería a los haplotipos *Lfm3*, *Lfm4*, *Lfm7*, *Lfm12*, *Lfm13*, *Lfm15* o *Lfm17*, según los presentes en *GenBank* (no se hallaron los haplotipos *Lfm22*, *Lfm23* y *Lfm34*) (Ghabooli *et al.*, 2013), al igual que los haplotipos *K07* y *K13* reportados por Nakato *et al.* (2014) para Japón.

Tabla 6- Primer resultado del análisis *BLAST* de las secuencias obtenidas en base al E-value. Purificado: Secuencia del producto de PCR purificado en laboratorio, no purificado: secuencia del producto enviado a ser purificado. Consenso: secuencia más probable del organismo que fue enviado a secuenciar.

	Tamaño de la secuencia (pb)	QueryCover (%)	E-value	% identidad
Directo purificado	90	100	8×10^{-38}	100
Reverso purificado	88	98	6×10^{-34}	98,85
Directo no purificado	94	96	2×10^{-38}	100
Reverso no purificado	87	98	6×10^{-35}	98,85
Secuencia consenso	138	100	3×10^{-64}	100

La secuencia consenso se muestra a continuación, los sitios de unión de los cebadores se marcan en negrita:

5' –**TCTCTTCATTTAGCTGGTGCGTC**GTCAATTGGCGGTTTCGTTAAATTATATTACTAG
TATAAAAAATATACCTGTTAAAGAAATGCGTGGTGAGCGTTTAATATTGTTTGTGTGGT
CTC**TTGCAGTTACATCTGTTTTG**–3'

Modelos estadísticos

Valor predictivo positivo

Las simulaciones mostraron que un resultado positivo tiene una probabilidad de ser un verdadero positivo entre el 98,6 - 99% de las veces bajo las condiciones pre-establecidas (Figura 23). A su vez el segundo resultado positivo consecutivo tiene una probabilidad entre 99,98-99,99% de ser un “verdadero positivo”.

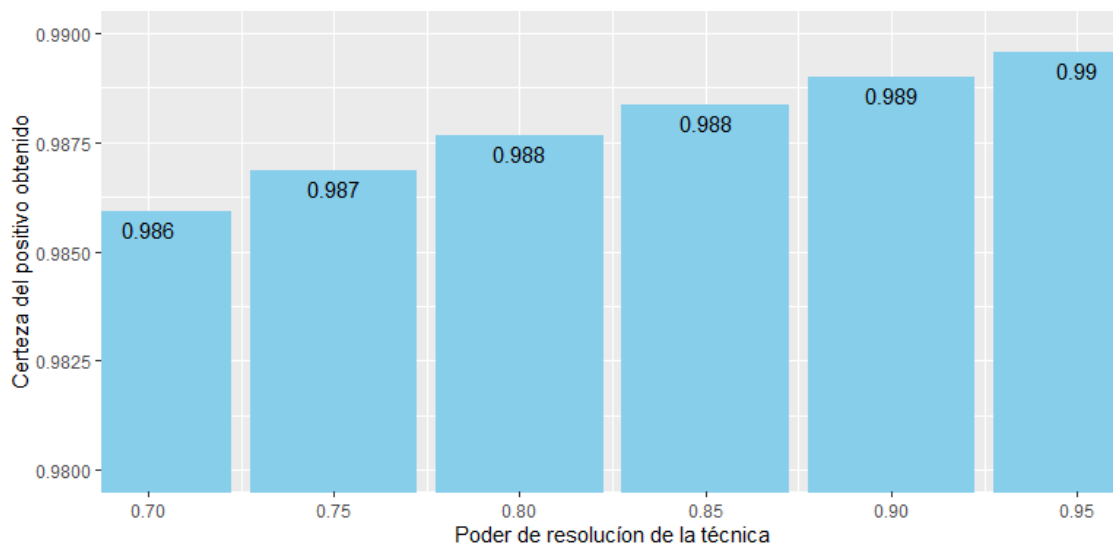


Figura 23: Certeza del primer positivo obtenido según el poder teórico de resolución de la técnica, según el teorema de Bayes.

Valor predictivo negativo:

Según el poder de resolución de la técnica, un negativo tiene entre 77-95% de probabilidad de ser un verdadero negativo, bajo los supuestos preestablecidos (Figura 24). Si se obtienen un segundo negativo las probabilidades aumentan a 91,7 a 98,5% y finalmente si se obtiene un tercer negativo se aumentan a 97,3 a 99,5%.

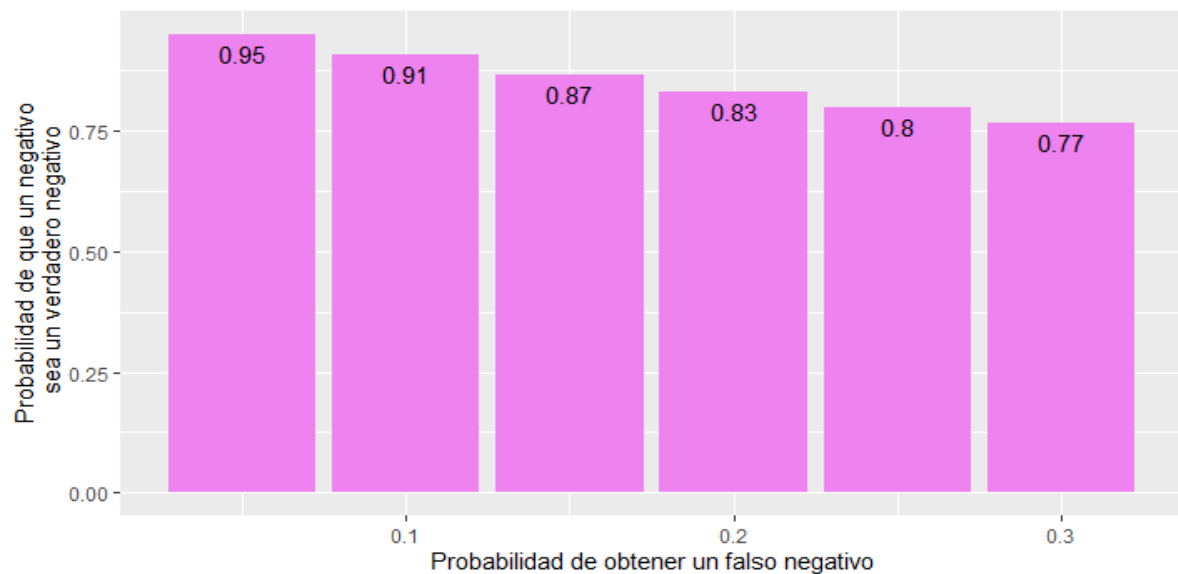


Figura 24. Probabilidad de que un negativo sea un verdadero negativo, según el poder teórico de resolución de la técnica al obtenerse 1 negativo.

Modelo binomial de réplicas

Ambos modelos binomiales (binomial y binomial negativo) presentaron resultados iguales. La probabilidad de obtener al menos 2 positivos verdaderos en un máximo de 3 réplicas, varió entre 78-99% para el intervalo observado. Los resultados de la simulación se observan en la figura 22. Si se utilizaran 4 réplicas, en el valor inferior (resultante del 70% de poder de resolución) la probabilidad de obtener 2 positivos verdaderos correspondería a 92%, y si se consideraran 5 réplicas: 97% (Figura 25).

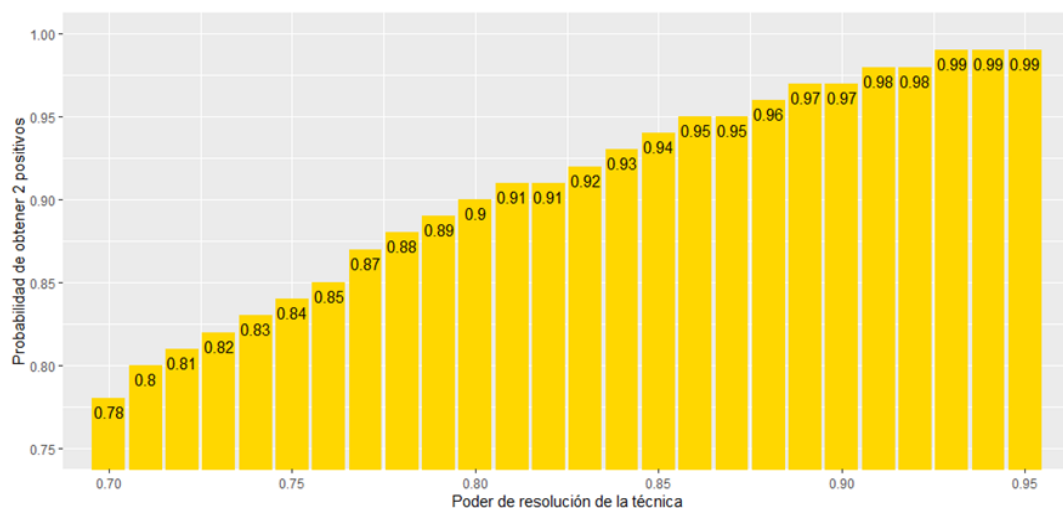


Figura 25. Probabilidad de obtener 2 positivos en un máximo de 3 réplicas según el poder teórico de resolución de la técnica si existiera ADN de *L. fortunei* según un modelo binomial negativo.

Contrariamente la probabilidad de obtener 2 falsos positivos en un máximo de 3 réplicas varía entre $7,5 \times 10^{-3}$ - 0,1% (Figura 26).

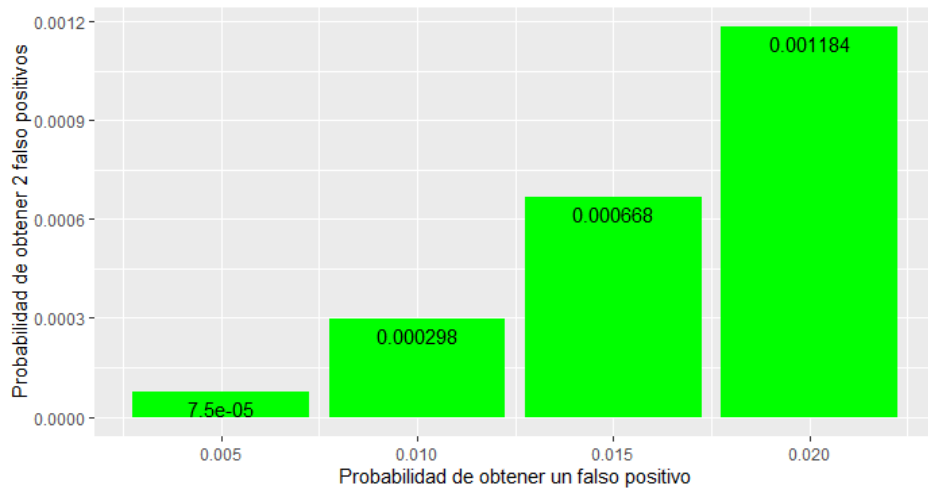


Figura 26. Probabilidad de obtener 2 falsos positivos según un modelo binomial negativo.

La probabilidad de obtener al menos 2 falsos negativos en 3 réplicas varía entre 1-22% según el poder de resolución (Figura 27), para obtener al menos 3 de 4 falsos negativos: 5×10^{-3} -8% y de obtener al menos 4 de 5 es de 3×10^{-3} a 3%.

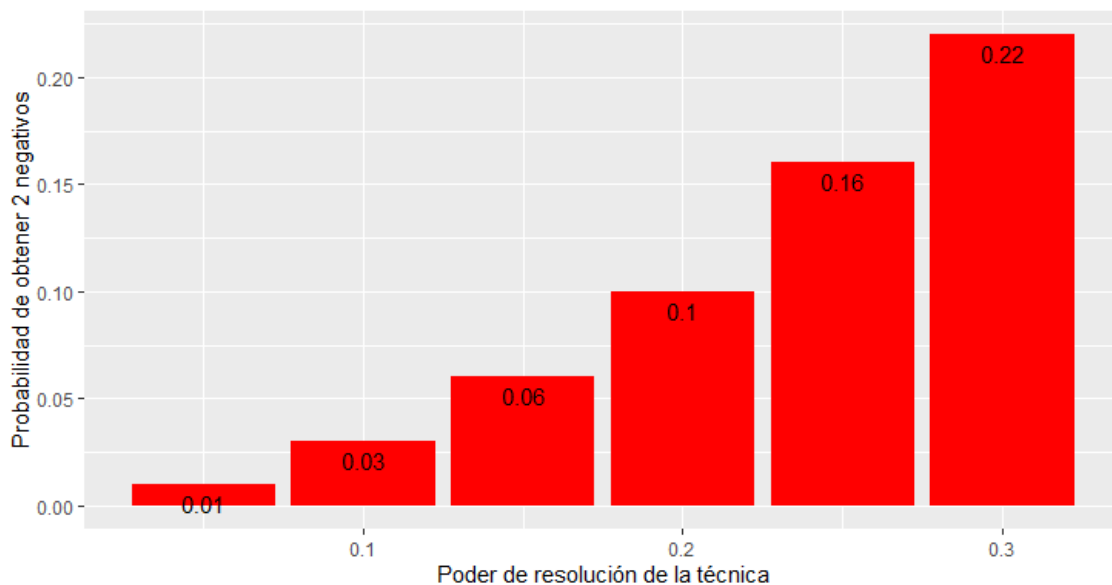


Figura 27. Probabilidad de obtener 2 falsos negativos según el poder teórico de resolución de la técnica, según un modelo binomial negativo.

11.-Discusión

Filogenias

A pesar de los resultados obtenidos, estos análisis son primarios debido a que no fue un objetivo del presente trabajo determinar la filogenia de bivalvos, complementariamente el gen utilizado no tiene porqué representar la historia evolutiva de los organismos utilizados. El objetivo con este análisis fue determinar, según el gen codificante para la COI, cuál especie sería la más propensa a generar una reacción cruzada, interfiriendo con los objetivos planteados de la presente tesina. Mediante el árbol filogenético realizado (Figura 6) se observa que todos los mejillones analizados son igualmente capaces de generar reacción cruzada debido a que poseerían un mismo ancestro común.

Limnoperna fortunei y *M. charruana* son clasificados como pertenecientes a la misma sub-familia Arcuatulinae (Carter *et al.*, 2011). Los resultados del presente trabajo no respaldan esta clasificación, siendo que *M. charruana* es más cercano a *P. perna* con un apoyo del *bootstrap* del 100%. Vallejo *et al.* (2017) registra a *Mytella* dentro del clado de los *Perna*. Esto significa que a pesar de sus similitudes morfológicas (obs. personal) se separaron tempranamente en la historia evolutiva de los Mytilidos. Este análisis filogenético no utilizó metodologías que representen la escala del reloj molecular del gen. Igualmente, estudios del reloj molecular del genoma mitocondrial de los Mytilidos indica que el clado que contiene a *Perna*, *Brachidontes* y *Mytilus* se separó del clado que posee a *L. fortunei* hace aproximadamente 400 millones; incluso se clasifica a *L. fortunei* dentro de la sub-familia Limnoperinae no Arcuatulinae y lo emparenta con el género *Lithophaga* (Lee *et al.*, 2019).

Los análisis de Liu *et al.* (2018) y Lee *et al.* (2019) afirman que *Mytilus* posee un ancestro común más cercano con *Perna* que con *Brachidontes*, lo que es consistente con los resultados encontrados en el presente trabajo. Adicionalmente, análisis de 2 genes mitocondriales y 3 nucleares de los Mytilidae (Liu *et al.*, 2018), indicaron que los géneros *Perna* y *Brachidontes* presentaron un último ancestro común entre 200 y 300 millones de años y aunque este autor no incluye a *L. fortunei* en la filogenia, *Lithophaga* se habría separado de los otros Mytilidae utilizados en el análisis hace unos 349±80 millones de años (MA), reafirmando los resultados obtenidos en el análisis posterior. Lee *et al.* (2019) han generado mucha evidencia que indicaría que *L. fortunei* y *M. charruana* no pertenecen a la misma sub-familia y que se separaron tempranamente en la historia evolutiva de la familia Mytilidae (400 MA aproximadamente), lo que reduciría *a priori* las probabilidades de que los cebadores utilizados en el presente trabajo, se unieran a estas especies (Karim, 2019). El incluir a

L. fortunei y *M. charruana* en un mismo clado puede deberse a que los Mytilidos poseen alta convergencia evolutiva, es por ello que Audino *et al.* (2020) señalan que, según los marcadores moleculares utilizados, la mayoría de las sub-familias de mytilidos analizadas son polifiléticas, incluida Arcuatulinae.

Se observa que el marcador es útil para distinguir entre familias e inclusive dentro de las subclases, sin embargo por las tasas evolutivas no sería un buen marcador para determinar relaciones filogenéticas entre órdenes, siendo que para filogenias más complejas se utiliza más de un marcador molecular (Giribet & Wheeler, 2002; Liu *et al.*, 2018). Para estudiar relaciones entre haplotipos el método de máxima parsimonia es de mayor utilidad (Ghabooli *et al.*, 2013; Paolucci *et al.*, 2014) por ello es que los *bootstrap* entre los haplotipos de *L. fortunei* fueron bajos.

De los organismos utilizados, únicamente *M. charruana* y *B. darwinianus* comparten hábitat con *L. fortunei* en zonas estuarinas del Río de la Plata y bajo Río Uruguay (Brugnoli *et al.*, 2005, Scarabino *et al.*, 2006), causando que una reacción cruzada puede impedir su utilización en estos sistemas acuáticos. Los sistemas estuarinos son de interés debido a que el ingreso de *L. fortunei* fue debido a las aguas de lastre de embarcaciones intercontinentales en la zona del estuario del Río de la Plata, por ende los estuarios son los sitios donde se pueden generar los controles adecuados para prevenir el ingreso de la especie (Boltovskoy, 2015a).

Cantidad y calidad de ADN en las muestras

El 77% de las extracciones de tejidos presentaron buena calidad, lo que reflejaría una baja cantidad de proteínas presentes (Del Valle, 2002; Velázquez *et al.*, 2014). Una alta cantidad de proteínas podría afectar negativamente al ADN por la presencia de nucleasas que no fueron inhibidas mediante la lisis de tejidos. Otra problemática es que el equipo utilizado para cuantificar el ADN en el presente trabajo, no brinda el cociente A_{260}/A_{230} que podrías indicar la presencia de carbohidratos y sustancias fenólicas que podrían inhibir la PCR.

En caso de las larvas aisladas se utilizó la concentración para determinar si la cantidad de ADN de las diferentes extracciones era comparable. Sin embargo las concentraciones y los valores de absorbancia deben ser consideradas con cautela debido a que están por debajo de los límites mínimos del equipo ($4 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) (Matlock, 2015).

La cantidad de ADN obtenido de cada organismo fue variado, sin embargo correspondieron a cantidades suficientes para realizar la PCR correctamente (Velázquez *et al.*, 2014). El uso de C-AI ha demostrado tener el potencial de optimizar la extracción y pureza del ADN en el presente estudio. Las muestras que fueron

tratadas con C-AI presentaron mayor concentración de ADN (visto en el gel de agarosa 2X, Figura 21). Esto posiblemente estuvo relacionado con que el C-AI ayuda a eliminar impurezas que afectan al filtro del *kit* de extracción de ADN (Harper *et al.*, 2019). En el gel en los carriles que se agregó 1 ng de ADN genómico y que no fue observado el ADN luego de la corrida, podría deberse a que el ADN presenta una importante degradación o que existen sustancias que puedan estar dando sobreestimación de la concentración de ADN (Del Valle, 2002).

Determinación de cebadores

Los análisis de las características físico-químicos de los cebadores utilizados muestran que el largo, la T_m y el %GC de todos los cebadores están dentro de los rangos óptimos en base a los criterios de Buck *et al.* (1999). La T_m de las horquillas es menor a las temperaturas de la PCR, por lo que no es de esperar que estas generen problemas en la reacción. La formación de homo y heterodímeros puede ser el mayor problema encontrado para ambos cebadores. Se recomienda que los cebadores no posean $\Delta G > -2$ en homodímeros y $\Delta G > -6$ de heterodímeros (<https://www.sigmaaldrich.com/>), en este sentido se observa que los cebadores de XiaE serían mejores aunque los ΔG máximos para homodímeros serían altos, no así para heterodímeros. Los altos ΔG de homo y heterodímeros podría explicar la presencia de bandas inespecíficas, debido a que en condiciones de almacenamiento (en heladera a 4°C temperatura promedio) se pueden formar dímeros o incluso estructuras más complejas de los cebadores. Cuando se realizó la purificación de la banda para ser enviada a secuenciar, se observó que muchos de esas bandas inespecíficas desaparecen o se vuelven extremadamente tenues, por ende apoyaría la hipótesis que son formaciones de cebadores.

A pesar de lo anterior, se determinó que el par de cebadores LimF fue el más apropiado para cumplir nuestros objetivos, debido a su alta sensibilidad y especificidad. Con los mencionados cebadores se obtuvo una alta sensibilidad correspondientes a media larva y 60 pg ADN genómico. Los cebadores proporcionados por Xia *et al.* (2018) no mostraron tener la especificidad presentados en dicho trabajo. Esto en parte podría deberse a que los métodos basados en tinciones fluorescentes (ej. *Goodview*) no son tan sensibles como la tinción de plata por ende no se visualizan las reacciones cruzadas (Fierro, 2014). Esto se demostró en los geles de agarosa 2X realizados en donde no se visualizan bandas que en los geles de poliacrilamida sí (Figura 21). El nivel de resolución de la agarosa, tanto en los tamaños de fragmentos, como en la cantidad de ADN, al ser menor que la acrilamida, puede generar bandas que contengan diferentes fragmentos de similar tamaño.

Debido a que siguiendo el protocolo de Xia *et al.* (2018) se observó una gran cantidad de bandas inespecíficas, las cuales pudieron haberse solapado en gel de agarosa, sobrestimando el poder de resolución (Fierro, 2014). A pesar de que esto podría ser benéfico en un principio, no sabemos si esta señal podría llegar a ser un falso positivo en alguna otra situación.

Adicionalmente los cebadores de XiaE mostraron la aparición de bandas secundarias que en otras metodologías podrían llegar a generar interferencia; por ejemplo la qPCR es mucho más sensible que la PCR en tiempo final y por ende las amplificaciones inespecíficas pueden causar serios problemas en la determinación confiable y precisa de la presencia de la especie en un sitio determinado si se utiliza su variante con tinciones intercalantes (ej. Syber Green).

Revelado de los geles

La tinción de plata mostró ser un método más sensible que las tinciones utilizadas en el revelado de geles de agarosa (ej. *Goodview*); adicionalmente la metodología es más segura para el usuario debido a la baja toxicidad de los reactivos utilizados en el revelado, esto se debe a que no son intercalantes de ADN y no son cancerígenos (Sanguinetti *et al.*, 1994; Fierro, 2014).

La acrilamida es un neurotóxico en estado líquido, aunque polimerizada es completamente inofensiva, hasta el punto de usarse para el tratamiento de aguas, estabilizante del suelo y cirugías estéticas de implantes subdérmicos, haciendo que su manipulación una vez polimerizada sea segura para el usuario (Green & Stott, 2001; Molin-Ruiz & Requena, 2012; Chinea *et al.*, 2017). Otro problema es el manejo de los *buffers* que estuvieron en contacto con el gel, a diferencia de los geles de agarosa en donde los *buffer* de corrida pueden quedar impregnados con sustancias intercalantes del ADN, en los geles de poliacrilamida el riesgo es menor debido a que se trabaja con el gel polimerizado totalmente. Finalmente, el revelado de plata es directo, sin necesidad de comprar un equipo de revelado ultravioleta, el cual no solo es costoso, sino que además emite a longitudes de onda que pueden ser perjudiciales para la salud del usuario.

El alto poder de resolución de la poliacrilamida permite determinar correctamente la banda deseada, los geles de agarosa al poseer menor resolución (Fierro, 2014), por ende bandas de tamaños similares se ven como una sola lo que genera dificultad para su correcta identificación y que pueda modificar la percepción de la técnica.

Otra ventaja del gel de poliacrilamida es que necesita menor volumen de producto de PCR para observar una banda, en la comparativa realizada se agregó 4 veces más

producto de PCR y se obtuvo menor resolución. El mayor inconveniente de lo anterior es que dificulta o imposibilita la repetición del experimento si este no salió correctamente; por ejemplo en un producto de PCR de 25 μ L se pueden correr entre 5 y 6 geles de poliacrilamida dependiendo del volumen cargado, sin embargo sólo se puede realizar 1 gel de agarosa en las condiciones que usamos previamente. Por lo anterior, si hay alguna falla en la realización del gel de poliacrilamida se puede volver a realizar, sin embargo si el de agarosa no resulta hay que repetir la PCR.

El proceso de hacer el gel y correrlo es mucho más rápido que en los geles de agarosa, siendo que en un gel de agarosa puede tardar más de una hora en solidificar, si se hace a temperatura ambiente, y las corridas pueden ser de varias horas según el nivel de resolución necesario. A su vez el gel de poliacrilamida demora entre 10 y 15 min en solidificar y la corrida entre 40 y 60 min en nuestro caso de estudio. Sin embargo el revelado de la agarosa es inmediato, debido a que consiste en colocarlo en una lámpara UV, mientras que el poliacrilamida puede demorar hasta 40 min cuando se trabaja con PCRs con poco ADN (ej. muestras con media larva).

Las desventajas del gel de poliacrilamida es la necesidad de tener un buen control y generar una buena corrida del marcador de peso molecular, esto se debe a que debido a su alta sensibilidad y alto poder de resolución puede mostrar productos inespecíficos que se forman en menor proporción u homo y heterodímeros de cebadores, y formas más complejas de los mismos, que pueden ser confundidos con bandas. Este problema se vuelve especialmente preocupante cuando existe poca cantidad de ADN y se tiene que hacer un revelado largo.

Sensibilidad

La sensibilidad del par de cebadores LimF demostró ser adecuada. El método podría ser utilizado en sitios con densidades larvales bajas, al ser capaz de detectar al menos 1 larva. Esto es una característica esencial para las técnicas de diagnóstico, debido a que a mayor volumen filtrado, mayor es la cantidad de impurezas y contaminantes que podrían ser co-purificados y potencialmente inhibir la PCR. El C-AI y BSA han demostrado tener el potencial de reducir esas inhibiciones. Las PCRs de las muestras ambientales resultaron positivas con este tratamiento tuvieron bandas de mayor intensidad (Figuras 18-19), lo que se interpreta que aunque se observe un resultado positivo puede haber inhibición parcial de la PCR. Estos puntos deben ser estudiados más profundamente en futuros análisis pues pueden ser extremadamente perjudiciales para técnicas como la *qPCR*.

La muestra con mayor concentración de materia orgánica (CH Constitución 3/1, Figura A2.1) (Fabián *et al.*, 2021), no mostró gran nivel de inhibición, producto de los dos

pasos por C-AI, dando a entender que un solo tratamiento no es suficiente para extraer todos los inhibidores.

La sensibilidad, medida como la cantidad mínima en masa de ADN genómico capaz de ser detectada en nuestras condiciones de trabajo, demostró ser superior que lo publicado por Endo *et al.*, (2009). En dicho estudio y mediante PCR en tiempo real, se alcanzó hasta 250 pg de ADN genómico. En el presente estudio correspondió a 60 pg de ADN. El número de larvas capaz de detectar no es comparable entre estudios, debido a que en el estudio original se tomaron larvas de 100 a 420 μm de largo, mientras que en el presente estudio se trabajó con la fracción de 100 a 150 μm debido a que son los tamaños larvales más pequeños y abundantes (Fabián *et al.*, 2021). Por ende es más probable que se encuentran con mayor frecuencia en la comunidad planctónica y los más difíciles de detectarse por poseer menor cantidad de ADN.

La utilización del estándar “media larva” no es un parámetro biológico real, sino que hemos determinado que la técnica es suficientemente sensible para detectar cantidades de ADNa menores al contenido de ADN de una larva. Esto implica que la técnica se podría utilizar en invierno, cuando no se reportan larvas en sistemas invadidos del Río Negro (Brugnoli *et al.*, 2011, 2020; Fabián *et al.*, 2021), y que potencialmente puedan existir verdaderos positivos. Esto es una ventaja para los muestreos pues ya se ha observado que las muestras de invierno poseen menor cantidad de inhibidores, basándonos en que cuando se agregó más ADN (3 y 5 μL) se observó amplificación mientras que en los muestreo “no invernales” se reduce el producto de PCR al aumentar la cantidad de ADN, (Figura 18-19).

En la PCR de gradiente con los cebadores Limf se observó que al aumentar la temperatura hibridación aumentó el tamaño de dos bandas de menor intensidad. Esto se podría deber a que uno de los cebadores se adhiere inespecíficamente a otro punto en el genoma mitocondrial del organismo, provocando bandas de mayor tamaño. El aumento de la intensidad de banda con el aumento de temperatura podría implicar que esa secuencia se encuentra involucrada en una región que posee alguna estructura secundaria (Taanman, 1999) que impida el acceso del cebador a bajas temperatura. La secuenciación no aportó suficiente evidencia para determinar si uno de los cebadores se estaba uniendo inespecíficamente en otro punto del genoma, probablemente porque si es una unión débil la concentración de la banda inespecífica sería tan baja que el método de secuenciación no sería capaz de secuenciarlo con suficiente resolución.

Especificidad

La especificidad de los cebadores *Limf* mostraron ser consistentes con lo planteado en el artículo original (Endo *et al.*, 2009; Endo & Nogata, 2012), no así los cebadores XiaE (Xia *et al.*, 2018). Los últimos mostraron una reacción cruzada en otras especies en las que fueron probados durante las PCRs realizadas en este estudio. La razón podría ser la menor sensibilidad de la agarosa en comparativa a la poliacrilamida como fue discutido anteriormente (Fierro, 2014).

El no detectar reacción cruzada de otros Mytilidos permite suponer que el método puede ser usado en agua salobre como son los estuarios debido a que por las relaciones filogenéticas otras especies no testeadas no deberían generar una reacción cruzada (Karim, 2019). Esto permitiría generar un monitoreo de zonas no invadidas pero altamente vulnerables al ingreso de especies invasoras acuáticas promoviendo la generación de respuestas de control y erradicación tempranas.

No se obtuvo producto de PCR a partir de ADN de *M. charruana*, una especie que en otros sitios es considerada invasora (Vallejo *et al.*, 2017), es por ello, que este método sería útil para distinguir estas dos especies que morfológicamente pueden ser difíciles de distinguir y que las han llevado a ser clasificadas como de la misma sub-familia (Carter *et al.*, 2011, Audino *et al.*, 2020). Otra utilidad es distinguirlas en zonas en donde ambas especies teóricamente pueden cohabitar (ej. Río de la Plata), para determinar si existió un desplazamiento de alguna de las especies. Sin perjuicio de lo anterior, si este método pudiera detectar bivalvos no nativos, aparte de *L. fortunei*, sería una ventaja técnica ya que podría permitir la detección temprana de otras EEI en el país. Un ejemplo, podría ser *Modiolus carvalhoi* Klappenbach, 1966 (no se analizó en este estudio), un mejillón marino que según la filogenia de Lee *et al.* (2019) sería el mejillón más emparentado filogenéticamente con *L. fortunei* que podemos distinguir para la región, aunque se habrían separado hace 280 ± 56 MA. Esta especie es registrada para la región de La Paloma y Cerro Verde (Scarabino *et al.*, 2006) y es considerada una especie exótica para el país (Campos & Calvo, 2006).

La especificidad de este trabajo puede complementarse mediante el estudio de especies en los sitios de interés, probando la reacción en bivalvos u otros organismos para determinar reacción cruzada. Adicionalmente, los resultados positivos pueden mandarse a secuenciar para confirmar la presencia de la especie.

Muestras ambientales

La utilización solamente del plancton mayor a 100 μ m es polémica debido a la pérdida del ADN-D y gran parte del ADN-P. Sin embargo, esto también permite eliminar la mayoría de los sólidos disueltos, sustancias húmicas y materia orgánica particulada

que puede inhibir la PCR. Ardura *et al.* (2015) exitosamente pudo detectar, en muestras de plancton filtradas con malla de entre 70-100 μm , a la especie invasora *Rangia cuneata* en el Mar Báltico. Las muestras ambientales demostraron poseer una gran complejidad, especialmente aquellas colectadas durante el verano, cuando existe una elevada abundancia de organismos planctónicos. Para obtener la fase sólida del plancton (organismos y materia orgánica particulada) se realizó el procedimiento descrito por Fischer *et al.* (2002), pero a pesar de su utilidad en el artículo original, debido a la cantidad de material orgánico de las muestras, el *pelet* no fue compacto y se desprendía de las paredes. Esta dificultad puede deberse a la cantidad de material obtenido durante el presente trabajo. Las muestras de Fischer *et al.* (2002) fueron obtenidas del Lago George (New York), el cual es clasificado como oligotrófico (és), los cuales poseen menor cantidad de plancton y por lo tanto los *pelets* son de menor volumen. El embalse Palmar (donde se encuentra la CH Constitución) presenta un estado clasificado como eutrófico (según la concentración de Nitrógeno total y Clorofila a) de acuerdo con Chalar *et al.*, 2015, con mayores abundancias de organismos planctónicos.

La otra dificultad fue la inhibición de la PCR las muestras ambientales poseen gran cantidad de sólidos disueltos, compuestos provenientes de la descomposición de materia vegetal como ácidos húmicos y fúlvicos, capaces de inhibir la PCR (Kreader, 1996; Boeger *et al.*, 2007, Harper *et al.*, 2019). Para solucionar este problema se realizó el paso de C-AI dos veces, extrayéndose mayor cantidad de inhibidores. Aplicando esta metodología se obtuvieron resultados positivos debido a que en la primera PCR ambiental se observa la presencia de una banda en la muestra que recibió ese tratamiento por duplicado y que poseía mayor volumen de sólidos en suspensión (CH Constitución 3/1) (Fabián *et al.*, 2021). En la siguiente PCR, al al pasar de 2 μL a 5 μL de ADN, no se observa una banda por lo que se supone que hubo inhibición (más volumen, mayor concentración de inhibidores). Adicionalmente en el tratamiento con BSA se vuelve a visualizar la banda, lo que respalda la presencia de inhibidores debido a que la BSA ha demostrado reducir el efecto de la inhibición de la PCR en muestras de agua (Kreader, 1996; Boeger *et al.*, 2007, Harper *et al.*, 2019). Las otras dos muestras se visualizaron como muestras que contienen inhibidores, correspondiendo al carril vacío con alguna sombra en la parte superior, sin embargo debido a que la imagen está editada esto no se observa en la misma (Taberlet *et al.*, 2018).

Un problema que genera la BSA es que la tinción con plata también revela las proteínas presentes en la muestra, generando que a altas concentraciones se produzca interferencia visual en el resultado. Finalmente, una concentración final de

0,4 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ resultó adecuada para el procedimiento, siendo para Kreader (1996) la concentración óptima de este reactivo. A pesar de lo anterior, se observó una muestra con signos de inhibición (Figura 19), por lo que se aplicaron 2 métodos diferentes para eliminar los inhibidores: C-AI y precipitación de ADN con etanol. El tratamiento con C-AI no fue exitoso, debido a que con poco volumen, se arrastraron residuos de los solventes orgánicos, evidenciándose por el olor residual en la muestra obtenida. Este paso se debería practicar con volúmenes mayores o en la fase previa a introducir el lisado en la columna de purificación en caso de utilizar *Kits* comerciales, momento en el cual ha demostrado ser útil en varias etapas posteriores de la técnica como se ha analizado previamente.

La precipitación con etanol no fue exitosa (Figura 19), la poca concentración de ADN previo al procesamiento y el bajo volumen utilizado para la precipitación generaron que la concentración final de ADN no haya podido ser cuantificada por el Nanodrop. Aunque la concentración de ADN inicial haya sido baja, en las PCRs que utilizaron 1 y $\frac{1}{2}$ larva se obtuvieron resultados positivos, por lo que *a priori* bajas concentraciones de ADN no serían un inconveniente para la técnica, más aún si los inhibidores fueron eliminados previamente.

El protocolo utilizado de purificación mediante precipitación con alcohol etílico (Green & Sambrook, 2016) presenta variantes para muestras con poca cantidad de ADN, sin embargo se optó por el método estándar que se utiliza regularmente en el laboratorio LaTraMA (Facultad de Ciencias, UdelaR) debido a que prolongar los tiempos de incubación en hielo y centrifugación podría generar la co-precipitación de los inhibidores de la PCR.

El utilizar un tamiz de 100 μm para tamizar las muestras de colectadas con la red de 60 μm de malla no implica una pérdida de material, debido a que las larvas de *L. fortunei* poseen en sus primeros estadios aproximadamente 100 μm de largo, por ende son retenidas en su mayoría en el tamiz (Cataldo, 2015a).

Purificación de amplicones

Se observan diferencias entre 1: la banda purificada, 2: la que se agregó 60 μg de ADN genómico y 3: la que se agregó 90 μg (Figura 22). Las diferencias en el espesor y opacidad de la banda (que son comparables porque se agregó el mismo volumen de producto de PCR y fueron corridos en el mismo gel) se deben a la concentración final del amplicón, debido a las diferencias en la concentración final de ADN genómico de cada experimento. Las bandas inespecíficas se deben a dímeros o estructuras más complejas de los cebadores que no fueron consumidos por la reacción de PCR. El *Kit* comercial utilizado está diseñado para eliminar los cebadores y dejar ADN doble

cadena (Zilinskiene, 2015). Si se comparan las tres bandas, se observa que las bandas inespecíficas superiores no son observadas, mientras que las inferiores sí. Los bajos ΔG de los homo y heterodímeros podrían hacer que una vez terminada la PCR, con el descenso de la temperatura, los cebadores generen estructuras formadas por millones de copias de cebadores unidos parcialmente, especialmente cuando los tubos son almacenados por varios días luego de la PCR. Las estructuras de gran tamaño podrían ser disgregadas y eliminadas fácilmente por el *kit*. Sin embargo, las formaciones más pequeñas (ej. verdaderos dímeros) podrían comportarse como una ADN doble cadena por lo que al *kit* le sería más difícil de eliminar.

Se observa que la banda superior en el control positivo que se agregó 90 μg es muy similar en tamaño a la observada en los ensayos para determinar la temperatura óptima de la PCR, lo que genera mayores sospechas de que se trata de amplificaciones inespecífica que al aumentar la concentración de ADN puede aumentar su amplificación, adicionalmente la sensibilidad del gel de poliacrilamida permite visualizar inclusive trazas de ADN (Fierro, 2014).

El nivel de pureza del ADN es consistente con lo esperado, debido a que en una PCR lo que domina son ácidos nucleicos con poco aporte de proteínas (cf. polimerasa). La concentración de ADN también es consistente con lo esperado. La banda purificada posee menos ADN que las que no fueron procesadas debido a que los oligonucleótidos y los dNTPs poseen mayor absorbancia a 260 nm que una hebra de mayor longitud por ser ADNs de simple hebra (Del Valle, 2002). Esto genera sobrestimación de la concentración de ADN, en este caso de más de un orden de magnitud. El control que se le agregó más ADN posee menos concentración, debido a que hubo mayor síntesis de los amplicones de interés, dejando menor cantidad de cebadores y dNTPs libres.

A partir de estos resultados se puede suponer que sería necesario reducir la concentración de cebadores en exceso, esta estrategia puede ser útil si suponemos que existe gran cantidad de ADN, por ejemplo si se quisiera hacer un *minibarcoding* de organismos adultos (Díaz-Ferguson & Molles, 2014; Bagley *et al.*, 2019). Sin embargo, si se considera una baja concentración de ADN, como en una muestra ambiental, es necesario mayor concentración de dichos reactivos.

Secuencias de ADN obtenidas

El cebador directo mostró ser el más útil a la hora de obtener una secuencia, debido que presentó mejores indicadores de calidad de secuencia en ambos casos. Se obtuvieron *E-values* de 3 y 4 órdenes de magnitud menos que el reverso, además de poseer 100% de identidad con la especie. El cebador reverso presentó varios

inconvenientes, tales como cromatogramas de mala calidad que tuvieron que ser analizados más detalladamente, con *E-values* bajos pero superiores a los del cebador directo y presentaron un porcentaje de identidad menor. En esta situación parece poco relevante estas diferencias, sin embargo si el objetivo es un genotipado parcial, estas pequeñas diferencias pueden dificultar la correcta genotipificación de los individuos.

A pesar de lo anterior, contar con ambas secuencias resultó útil debido a que ninguno de los cebadores logró secuenciar el amplicón completo. En la presente situación, al ser de pequeño tamaño, puede generar problemas en identificar correctamente a la especie blanco. La secuenciación *a posteriori* de bandas puede ser una herramienta útil para determinar la identidad de los resultados obtenidos, sin embargo es importante destacar que en muestras ambientales pueden existir varios haplotipos en un producto por ende la secuenciación puede resultar de mala calidad. Es de hacer notar que este juego de cebadores no fue testeado contra todas las especies de bivalvos a nivel bioinformático, debido a que existen muchas especies que poseían su secuencia registrada en el momento de realizar este estudio.

Se logró generar un genotipado parcial del individuo *L. fortunei* 1, esto se debe a que los haplotipos se basan en fragmentos de mayor tamaño que el enviado a secuenciar. Se restringió a un máximo de 7 posibles haplotipos registrados por Ghabooli *et al.* (2013) para la especie a nivel global. El haplotipo más probable que presentó la zona de estudio corresponde a *Lfm3* debido a que es el único haplotipo registrado en Sudamérica y Japón presentando un 100% de identidad con el fragmento obtenido en el presente estudio.

Modelos estadísticos

La certeza de los positivos encontrada de acuerdo con los modelos estadísticos realizados fue alta, en parte porque se estima que los índices de falsos positivos son bajos. El mayor inconveniente sería detectar falsos negativos causados por la falta de ADN o la inhibición de la PCR. Ambos inconvenientes son puntos a mejorar en futuros análisis, implementando *kits* de purificación o metodologías tales como precipitación por etanol u otras (Díaz-Ferguson *et al.*, 2014), para obtener ADNs de buena calidad. La importancia de esto es poder obtener un alto poder de resolución y adicionalmente se puede utilizar las muestras para aplicar técnicas más sensibles a la contaminación, como la PCR en tiempo real y la secuenciación masiva.

Ambos modelos binomiales presentaron el mismo resultado, lo que implica que *a priori* es indiferente cual utilizar, aunque a nivel técnico ambos modelos son diferentes. Un modelo Binomial se aplicaría en el caso de tener pocas muestras y poseer un alto

poder de resolución (tener que hacer pocas réplicas). Esto se debe a que es sencillo realizar varias réplicas en paralelo.

Un modelo Binomial Negativo se asemejaría a una situación en donde se poseen muchas muestras y bajo poder de resolución (hay que realizar muchas réplicas). En esta situación, el tiempo y dinero invertidos en realizar varias réplicas en paralelo sería demasiado alto. Ejemplificando, se parte de que existe un 97% de probabilidad de obtener 2 positivos en 5 réplicas, entonces se procesarían como máximo 10 muestras debido a las capacidades de la cuba. Si se corrieran dos réplicas por muestra, se analizarían un máximo de 27 muestras por ensayo. Si se obtienen 2 resultados positivos, ya tendríamos un resultado positivo, por ende no sería necesario realizar las otras 3 PCRs y posteriores corridas, permitiendo reducir los tiempos y optimizar los costos.

La aplicación del Teorema de Bayes es polémica, debido a la aplicación de una probabilidad *a priori*, lo que muchos autores lo interpretan como el agregado de subjetividad al análisis (Fernández, 2009). En el presente caso de estudio, la probabilidad *a priori* se relaciona con la probabilidad de presencia o ausencia de la especie en un determinado sitio. Actualmente existen modelos matemáticos que permiten determinar la probabilidad de que *L. fortunei* pueda habitar una determinada área (Campos *et al.*, 2014).

Estos modelos pueden adaptarse a escala nacional y determinar cuál es la probabilidad que *L. fortunei* invada un curso de agua y utilizar esa probabilidad *a priori* en nuestro modelo para determinar la certeza de nuestros resultados y modelar adecuadamente el experimento, debido a que en zonas con poca probabilidad de que exista *L. fortunei* serían necesarias más réplicas para confirmar la presencia de la especie y en zonas con alta probabilidad de que exista la especie se necesitaran mayor número de negativos para garantizar la no invasión. Adicionalmente, estos modelos permiten determinar que cursos de agua son más vulnerables a la invasión del mejillón y de esta manera comenzar con planes de monitoreo en los mismos. Con esa probabilidad *a priori* se puede determinar de manera más precisa la robustez de los resultados obtenidos e incluso detectar complicaciones como son la contaminación de las muestras o que haya ADN cuando el organismo no se encuentra presente (ej. en zonas estuarinas).

12.-Conclusiones

- Se logró poner a punto un método molecular para detectar ADN de *L. fortunei* en muestras de agua de sistemas invadidos. El método mostró ser más sensible que los métodos tradicionales utilizados para la detección de especies invasoras acuáticas.
- La utilización de geles de poliacrilamida mostró una serie de ventajas sobre los geles de agarosa debido a su mayor sensibilidad, poder de resolución, repetibilidad y tiempo de procesamiento.
 - Los modelos estadísticos apoyan el supuesto de que obtener 2 positivos es suficiente evidencia para afirmar que *L. fortunei* se encuentra en el ambiente. Establecer el número de réplicas a implementar, para obtener dos positivos, es un objetivo de futuras investigaciones.
- Se recomienda el siguiente protocolo de ADN para la detección de ADN de *L. fortunei* en muestras de plancton:
 - 1- Filtrar a través de tamiz de entre 50 y 100 µm de malla, entre 10 y 100 L de agua del sistema invadido. El concentrado puede guardarse y procesarse posteriormente **2A** o al poco tiempo de procesarse la muestra **2B**:
 - 2- **A.** El concentrado de zooplancton se preserva en alcohol 95-100% a -22°C hasta su procesamiento. En laboratorio se filtra en un filtro de calidad CFG. Lava el filtro con agua *MiliQ* para eliminar el exceso de alcohol y almacenarlo en buffer de digestión a -22 °C.
B. Filtrar la muestra fresca en filtros de igual calidad y guardar la muestra en *buffer* de digestión a -22 °C.
 - 3- Realizar la digestión del filtro con proteasas durante toda la noche (*overnight*), a la temperatura asignada por el proveedor de la proteasa.
 - 4- Agregar a la digestión 350 µL de Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, homogeneizar la muestra y centrifugar por 2 minutos a máxima velocidad (>13.000g).
 - 5- Retirar la fase acuosa evitando tomar de la interfaz polar-apolar. Repetir el paso 4.
 - 6- Procesar el sobrenadante según el protocolo del *Kit* comercial a utilizar o protocolo de extracción de ADN que se considere más adecuado. Se

recomiendan varias eluciones, a alta temperatura, de bajo volumen para obtener ADN concentrado ($\leq 100 \mu\text{L}$).

- 7- Realizar la PCR en tiempo final con las siguientes características: 25 μL de volumen final, 1X de *buffer* de PCR, 0,2 mM de cada cebador, 0,05 mM de cada dNTP, 2,0 mM de Mg^{2+} , 0,4 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de BSA, 1 unidad de Taq polimerasa y 3 μL de eluido de ADN. El programa de ciclado es de 4 minutos a 95°C, 30 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 60°C durante 35 s y elongación a 72°C por 30 s. Se sugiere una extensión final a 72°C por 7 minutos. Sin embargo se recomienda verificar las características de la polimerasa a implementar y regular las condiciones de la PCR en base a esta.
 - 8- Cargar 5 μL de producto de PCR con 1 μL de buffer de carga en un gel de poliacrilamida 12X. Correr a potencia 100-110 mV por un lapso no menor a 40 m, ni mayor a 80 m.
 - 9- Revelar el gel mediante tinción de Plata.
- Futuras investigaciones deberían enfocarse en la obtención de ADN de mejor calidad de muestras de plancton. Harper *et al.* (2019) recomienda la utilización de *Kits* comerciales para la purificación de ADN, adicionalmente se puede consultar a colegas que trabajen con ADNa cuáles son los protocolos utilizados para purificar el ADN de muestras ambientales sin correr el riesgo de co-precipitar los contaminantes.

13.-Perspectivas

El presente estudio muestra que el ADNa puede ser una herramienta eficiente para detectar EEI acuáticas. Se espera utilizar el ADNa para el monitoreo de EEI y generar protocolos que permitan su detección en estadios tempranos del proceso de invasión, lo que posibilitaría una mejor estrategia de control y erradicación de las mismas. Algunos sitios de interés son los estuarios, las aguas de lastre de los barcos e inclusive muestras de agua de alrededor de dichos barcos, debido a que organismos incrustantes pueden viajar alrededor de los mismos y colonizar tanto por desprendimiento como por desove en los muelles. En los cursos de agua dulce consideramos necesario la implementación de planes de monitoreo de *L. fortunei* en sitios en donde aún no ha sido detectada. Este estudio tendría como objetivo actualizar el mapa de distribución y generar planes para evitar nuevas invasiones,

previniendo los daños a los servicios ecosistémicos y a las infraestructuras humanas que ocasiona la especie.

Complementariamente, se identifica la necesidad de generar redes de monitoreo, especialmente con actores locales que sean capacitados para reconocer tanto a *L. fortunei* como a otras EEI que amenazan no sólo a los sistemas acuáticos sino los ecosistemas enteros del país, lo que fortalecería las redes de monitoreo ya existentes.

Futuras investigaciones deberían enfocarse en utilizar el total de ADN en la fase acuosa y no solo del plancton. Actualmente, existen nuevas tecnologías con mayor sensibilidad, velocidad de trabajo y menores costos como son la qPCR y la PCR digital (ddPCR). Este último método ha demostrado ser más sensible, económico y robusto a las inhibiciones que los anteriores (Nathan *et al.*, 2014; Harper *et al.*, 2019). Deben enfocarse además en cuál es el método de colecta más eficiente a la hora de detectar la especie, buscando un compromiso entre el aumento de la cantidad ADN ambiental recuperado en contraste con el aumento de la concentración de inhibidores.

El *metabarcoding* ambiental es una metodología de metagenómica directa que puede detectar cientos de especies en un solo ensayo, lo que permitiría un monitoreo más extenso de las EEI en los sistemas acuáticos como también de las especies raras o en peligro de extinción (Darling & Blum, 2007; Harper *et al.*, 2019). Presenta la ventaja de no necesitar de la manipulación del ADN de la especie de interés si existen secuencias *barcoding* confiables en las bases de datos (ej. *GenBank*, *IBOLD*), reduciendo las posibilidades de obtener falsos positivos debido a contaminación. Adicionalmente, se generan bases de datos en donde futuras investigaciones pueden buscar otros organismos, produciendo un registro histórico de las comunidades de un sitio determinado.

Finalmente se considera que el estudio del ADN ambiental y su utilidad para detectar especies exóticas invasoras y autóctonas es un campo con mucho potencial a ser explotado y que contribuirá al conocimiento de la fauna y flora que habitan nuestro país.

14.-Publicaciones realizadas:

Los resultados de presente tesina de grado se han presentado en un evento nacional, uno internacional y será publicado en un capítulo de un libro. A continuación se presentan los resúmenes de los mismos:

Montevideo Uruguay, 2019: Simposio “Ecología y manejo del molusco invasor *Limnoperna fortunei* (mejillón dorado) en Uruguay”:

ADN ambiental, monitoreo de larvas del mejillón dorado por técnicas moleculares

Debido a las problemáticas causadas por el mejillón dorado se están buscando métodos cada vez más sensibles, específicos y rápidos de detectar a la especie en cuerpos de agua, especialmente en aquellos que fueron recientemente invadidos. Los métodos tradicionales de detección se basan en la observación directa de la especie, sea de estadios adultos (bentónicos) como larvales (planctónicos). Los métodos tradicionales pueden llegar a ser altamente laboriosos, costosos, peligrosos y destructivos para el ambiente, por ello se buscan alternativas que permitan reducir estos inconvenientes, por ejemplo el estudio del ADN ambiental (eADN), el cual se basa en la extracción del ADN que se encuentre en alguna matriz del ambiente (ej. agua, suelo, heces o aire). Con el objetivo de generar un método basado en eADN para detectar larvas de *Limnoperna fortunei* en muestras de agua, se determinó la especificidad de amplificación por PCR (se contrastó con ADN de especies planctónicas y organismos del mismo Phylum, Familia y Sub-familia) y sensibilidad (concentración de ADN genómico o ADN expresado en nº larvas) a partir de los cebadores diseñados por Endo *et al.* 2010. Los productos de PCR se analizaron en geles de poliacrilamida 12% tratados con tinción de plata. Se observaron: una alta especificidad (siendo que los cebadores solo amplificaban la especie de interés), una alta sensibilidad para ADN genómico (entre 0,06 y 0,006 ng de ADN) y para cantidad de larvas (visualización de 0,5 larvas). Finalmente se probó la técnica en muestras ambientales con cantidad conocida de larvas y controles en donde *L. fortunei* no había sido registrado o no podría existir por las condiciones ambientales (salinidad).

1° Encuentro Virtual De Jóvenes Investigadores, 2020:

Detección de larvas de *Limnoperna fortunei* (mejillón dorado) mediante ADN ambiental

El ADN ambiental (ADNa) es el estudio del ADN que puede hallarse en una matriz no viva en el ambiente como el suelo, heces, agua o aire. El ADNa se puede encontrar en forma de ADN suelto, dentro de células o tejidos presentes en la matriz; como organismos unicelulares o incluso animales de pequeño tamaño como es la meiofauna en los sedimentos o el plancton en la columna de agua. El ADNa utiliza técnicas como la PCR con el objetivo de identificar especies cuyo ADN se encuentre dentro de la matriz ambiental analizada. Una de las aplicaciones del ADNa es la detección de especies exóticas invasoras (EEI). Las EEI son la segunda causa de pérdida de biodiversidad a nivel mundial, modificando los ecosistemas y causando perjuicios a los servicios y recursos que brinda los mismos, como a las estructuras y actividades humanas. El objeto de estudio fue *Limnoperna fortunei* (mejillón dorado), especie endémica del sudeste Asiático. La misma ingresó a Sudamérica a través de aguas de lastre de buques cargueros que arribaron al Río de la Plata en la década de 1990 y actualmente se encuentra ampliamente distribuido por los sistemas hídricos de la cuenca del Plata. Presenta estadios larvales planctónicos y fase adulta bentónica que se adhiere a superficies duras, característica que le ha permitido colonizar nichos que anteriormente no habían sido explotados en América del Sur. En la cuenca del Plata el mejillón dorado está asociado a cambios en las comunidades planctónicas y bentónicas, en las características físico-químicas de la columna de agua, además de ocasionar daños en estructuras humanas. Algunos ejemplos son las represas hidroeléctricas, unidades de riego o industrias. Actualmente los métodos de monitoreo implementados son los tradicionales, mediante la visualización de la especie en el sitio de interés o la identificación de larvas en muestras de agua mediante métodos ópticos. El objetivo del trabajo de finalización de grado fue desarrollar y poner a punto una técnica basada en ADNa que permita detectar larvas de *L. fortunei* en muestras de agua. Se seleccionaron cebadores a partir de la bibliografía consultada y mediante PCR en tiempo final se determinó su especificidad en especies que se hallan en el territorio y su sensibilidad como la mínima cantidad de ADN genómico de adultos y número de larvas capaz de ser detectada. Se analizaron muestras ambientales de zonas invadidas, en las que no hay registro de la especie y zonas estuarinas y zonas marinas como controles negativos. Fue posible detectar al mejillón dorado en los sitios en donde presentaba registro, incluso en muestras donde los métodos tradicionales no lograron detectarlo (ej. durante el invierno). No se detectó en zonas en donde no

estaba registrado, como tampoco en zonas estuarinas y marinas. El método desarrollado parece ser más sensible que los métodos tradicionales, debido a que detectó a la especie en muestras que no poseían larvas pero que pertenecen a sitios donde la especie se encuentra establecida.

Portada del capítulo del libro, Ed: Brazeiro A, Bresciano D, Brugnoli E & Iturburu M, 2021: Especies exóticas invasoras de Uruguay: distribución, impactos socioambientales y estrategias de gestión.

CAPÍTULO 8

***Limnoperna fortunei* (mejillón dorado): características bióticas, distribución, impactos y manejo poblacional en Uruguay.**

Ernesto Brugnoli¹, Jennifer Pereira¹, Carolina Ferrer¹, Ivana Silva^{2, a}, **Leandro Capurro³**, Ana Laura Machado¹, Juan María Clemente³, Lucía Boccardi⁴, Soledad Marroni³, Daniel Fabián¹, Fabiana Rey⁴, María Jesús Dabiez³, Iván González-Bergonzoni⁶, Daniel Naya², Alejandro D'Anatro², Franco Teixeira de Mello³, Claudio Martínez⁷, Guillermo Goyenola³, Carlos Iglesias³ & Pablo Muniz¹

1. Oceanografía y Ecología Marina, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Iguá 4225, Montevideo, Uruguay. ebo@fcien.edu.uy
2. Departamento de Ecología y Evolución, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Iguá 4225.
3. Departamento de Ecología y Gestión Ambiental, Centro Universitario de la Región Este, Universidad de la República. Tacuarembó s/n esq. Bvar. Artigas, Maldonado, Uruguay.
4. Latitud - Fundación LATU, Avda Italia 6201, Montevideo, Uruguay.
5. LATU, Avda Italia 6201, Montevideo, Uruguay.
6. Departamento del Agua, CENUR Litoral Norte, Ruta 3 Km 363, EEMAC, Paysandú, Uruguay.
7. Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias. Núcleo Interdisciplinario Colectivo TÁ, El. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

15.-Bibliografía

Aber, A., Ferrari, G., Porcile, J. F., Rodríguez, E. & Zerbino, S. Identificación de prioridades para la gestión nacional de las especies exóticas invasoras. (UNESCO, 2012).

Ardura, A. *et al.* eDNA and specific primers for early detection of invasive species - A case study on the bivalve *Rangia cuneata*, currently spreading in Europe. *Mar. Environ. Res.* 112, 48–55 (2015).

Armstrong, K. F. & Ball, S. L. DNA barcodes for biosecurity: Invasive species identification DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Trans. R. Soc.* 360, 1813–1823 (2015).

Audino, J. A., Serb, J. M. & Marian, J. E. A. R. Phylogeny and anatomy of marine mussels (Bivalvia: Mytilidae) reveal convergent evolution of siphon traits. *Zool. J. Linn. Soc.* 190, 592–612 (2020).

Bagley, J. C., de Aquino, P. D. P. U., Breitman, M. F., Langeani, F. & Colli, G. R. DNA barcode and minibarcode identification of freshwater fishes from Cerrado headwater streams in Central Brazil. *J. Fish Biol.* 95, 1046–1060 (2019).

Barbosa, N. P. U. *et al.* *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae): first record in the São Francisco River basin, Brazil. *Check List* 12, (2016).

Boeger, W. A. *et al.* Testing a molecular protocol to monitor the presence of golden mussel larvae (*Limnoperna fortunei*) in plankton samples. *J. Plankton Res.* 29, 1015–1019 (2007).

Boltovskoy, D. & Cataldo, D. H. Population dynamics of *Limnoperna fortunei*, an invasive fouling mollusc, in the lower Parana River (Argentina). *Biofouling* 14, 255–263 (1999).

Boltovskoy, D. & Correa, N. Ecosystem impacts of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei* (golden mussel) in South America. *Hydrobiologia* 746, 81–95 (2015).

Boltovskoy, D. Distribution and Colonization of *Limnoperna fortunei*: Special Traits of an Odd Mussel. In *Limnoperna fortunei*: The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel (eds. Boltovskoy D.) 301-3012 (Springer, 2015a).

Boltovskoy, D. Ecology and Environmental Impact of *Limnoperna fortunei*: Introduction. In *Limnoperna fortunei*: The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel (eds. Boltovskoy D.) 147-152 (Springer, 2015b).

Boltovskoy, D., Correa, N., Cataldo, D. & Sylvester, F. Dispersion and ecological impact of the invasive freshwater bivalve *Limnoperna fortunei* in the Río de la Plata watershed and beyond. *Biol. Invasions* 8, 947–963 (2006).

Boltovskoy, D., Correa, N., Sylvester, F. & Cataldo, D. Nutrient Recycling, Phytoplankton Grazing, and Associated Impacts of *Limnoperna fortunei*. In *Limnoperna fortunei*: The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel (eds. Boltovskoy D.) 153-176 (Springer, 2015a).

Boltovskoy, D., *et al.* Reproductive Output and Seasonality of *Limnoperna fortunei*. In *Limnoperna fortunei*: The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel (eds. Boltovskoy D.) 77-104 (Springer, 2015b).

Briski, E., Cristescu, M. E., Bailey, S. A. & Macisaac, H. J. Use of DNA barcoding to detect invertebrate invasive species from diapausing eggs. *Biol. Invasions* 13, 1325–1340 (2011).

Brugnoli, E. & Clemente, J. Los moluscos exóticos en la Cuenca del Plata: SU POTENCIAL IMPACTO AMBIENTAL Y ECONÓMICO. *Ambios Cult. Ambient.* 8, 27–31 (2002).

Brugnoli, E., Clemente, J., Boccardi, L., Borthagaray, A. & Scarabino, F. Golden mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) distribution in the main hydrographical basins of Uruguay: update and predictions. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* vol. 77 235–244 (2005).

Brugnoli, E., Dabiezies, M. J., Clement, J. M. & Muniz, P. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) en el sistema de embalses del Río Negro, Uruguay. *Oecologia Aust.* 15, 576–592 (2011).

Brugnoli, E., *et al.* Especies acuáticas exóticas en Uruguay: situación, problemática y manejo. In: BASES para la CONSERVACIÓN y el MANEJO de la COSTA URUGUAYA (eds. Manafra, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F. & Conde, D.) 351-362 (Vida Silvestre Uruguay, 2006).

Brugnoli, E., Fabián, D., Ferrer, C., Pereira, J. & Muniz, P. *Limnoperna fortunei* (mejillón dorado) en las presas y embalses del Río Negro, grado de invasión y aplicación de métodos de control mecánico. (Informe técnico, 2018).

Brugnoli, E., Masciadri, S. & Muniz, P. Base de datos de especies exóticas e invasoras en Uruguay, un instrumento para la gestión ambiental y costera. (InBUy, 2009).

Brugnoli, E., Pereira, J., Castro, M., Capurro, L. & Muniz, P. *Limnoperna fortunei* (mejillón dorado) en las presas y embalses del Río Negro, grado de invasión y aplicación de métodos de control mecánico. (Informe técnico, 2020).

Brugnoli, E., Russo, R., Mandiá, M. & Muniz, P. Estudios para la mitigación del macrofouling ocasionado por especies invasoras acuáticas en áreas industriales y de servicio en Uruguay. in Identificación de prioridades para la gestión nacional de las especies exóticas invasoras (eds. Aber, A., Ferrari, G., Porcile, J. F., Rodríguez, E. & Zerbino, S. 64–83 (UNESCO, 2012).

Buck, G. A. *et al.* Design strategies and performance of custom DNA sequencing primers. *Biotechniques* 27, 528–536 (1999).

Bucklin, A., Lindeque, P. K., Rodriguez-Ezpeleta, N., Albaina, A. & Lehtiniemi, M. Metabarcoding of marine zooplankton: Prospects, progress and pitfalls. *J. Plankton Res.* 38, 393–400 (2016).

Butler, N., Carlisle, J. C., Linville, R. & Washburn, B. Micorcystins: A Brief Overview of their Toxicity and Effects, with Special Reference to fish, Wildlife and Livestock. Integrated Branch, Assessment Environmental, California Agency, Protection (2009).

Callil, C. T., Gomes, A. L. & Soares, A.C. A gametogênese em *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857). in Moluscos Límnicos Invasores no Brasil: Biologia, Prevenção, Controle (eds. Mansur *et al.*) 111-118 (Redes Editora, Porto Alegre, 2012).

Campos, J. & Calvo, A. Moluscos introducidos en Uruguay. *Comun. la Soc. Malacológica del Uruguay* 9, 75–78 (2006).

Campos, M. de C. S. *et al.* Modelling of the potential distribution of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) on a global scale. *Aquat. Invasions* 9, 253–265 (2014).

- Carmichael, W. W. *et al.* Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ. Health Perspect.* 109, 663–668 (2001).
- Carter, J. G. *et al.* A synoptical classification of the Bivalvia (Mollusca). *Paleontol. Contrib.* 4, 1–47 (2011).
- Carvajal, P. *et al.* Detección molecular de secuencias de adn transgénico en alimentos de consumo humano y animal en Costa Rica. *Agron. Costarric.* 41, 53–68 (2017).
- Cataldo, D. H. Larval Development of *Limnoperna fortunei*. In *Limnoperna fortunei: The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel* (eds. Boltovskoy D.) 43-54 (Springer, 2015a).
- Cataldo, D. H. Trophic Relationships of *Limnoperna fortunei* with Adult Fishes. In *Limnoperna fortunei: The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel* (eds. Boltovskoy D.) 231-248(Springer, 2015b).
- Cataldo, D., O'Farrell, I., Paolucci, E., Sylvester, F. & Boltovskoy, D. Impact of the invasive golden mussel (*Limnoperna fortunei*) on phytoplankton and nutrient cycling. *Aquat. Invasions* 7, 91–100 (2012).
- Chalar, G., Fabian, D., González-Piana, M. & Piccardo, A. Estado y evolución de la calidad de agua de los tres embalses del Río Negro. Convenio UTE- Facultad de Ciencias (UdelaR) (2015).
- Chang, W. R. Graphics Cookbook. O'Reilly Media, Inc. (O'Reilly Media, Inc., 2013). doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- Chinea, C. & Abreu, F. Estudio de la inversión de fase en emulsiones de agua en crudo utilizando polímeros y copolímeros de acrilamida como agentes de inversión. *Rev. Latinoam. Met. y Mater.* 7, 34–37 (2017).
- Damborenea, C. & Penchaszadeh, P. E. Biología Reproductiva de *Limnoperna fortunei*. In *Bio-invasion del mejillon dorado en el continente americano* (eds. Darrigran, G. & Damborenea, C.) 69-82 (Universidad Nacional de La Plata, 2006).
- Darling, J. A. & Blum, M. J. DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biol. Invasions* 9, 751–765 (2007).
- Darling, J. A. & Mahon, A. R. From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environ. Res.* 111, 978–988 (2011).
- Darrigran, G. & Ezcurra-De Drago, I. Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in South America. *The Nautilus* 114, 69-73 (2000).
- Darrigran, G. & Damborenea, C. Bio-invasión. In *Bio-invasion del mejillon dorado en el continente americano* (eds. Darrigran, G. & Damborenea, C.) 15-42 (Universidad Nacional de La Plata, 2006b).
- Darrigran, G. & Damborenea, C. Características de la especie. In *Bio-invasion del mejillon dorado en el continente americano* (eds. Darrigran, G. & Damborenea, C.) 53-68 (Universidad Nacional de La Plata, 2006a).
- Darrigran, G. & Mansur, M.C. Distribución, abundancia y Dispersión. In *Bio-invasion del mejillon dorado en el continente americano* (eds. Darrigran, G. & Damborenea, C.) 93-110 (Universidad Nacional de La Plata, 2006).
- Davy, C. M., Kidd, A. G. & Wilson, C. C. Development and Validation of Environmental DNA (eDNA) Markers for Detection of Freshwater Turtles. *PLoS One* 10, 1–13 (2015).

- De Draco, I., Montalto, L. & Oliveros, O. B. Desarrollo y Ecología larval de *Limnoperna fortunei*. In Bio-invasion del mejillon dorado en el continente americano (eds. Darrigran, G. & Damborenea, C.) 83-92 (Universidad Nacional de La Plata, 2006).
- Deagle, B. E. , Bax, N., Hewitt, C. L. & Patil, J. G. Development and evaluation of a PCR-based test for detection of *Asterias* (Echinodermata: Asteroidea) larvae in Australian plankton samples from ballast water. *Mar. Freshw. Res.* 54, 709–719 (2003).
- Del Valle, C. Comparación De Tres Métodos De Extracción De ADN De Restos Óseos. Informe de Práctica de Especialidad, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. (2002).
- Díaz, A. S., Rentería, L. F., Cortez, J. A. & Palacios, E. S. PCR : reacción en cadena. In Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos (eds. Romero, A., Días, A., Aguilar, B. & Munive, M.) 53–74 (Semarnat, INECC, UAM-I, 2014).
- Díaz-Ferguson, E. E. & Hunter, M. E. Life history, genetics, range expansion and new frontiers of the lionfish (*Pterois volitans*, Perciformes: Pteroidae) in Latin America. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 31, 1–8 (2019).
- Díaz-Ferguson, E. E. & Moyer, G. R. History, applications, methodological issues and perspectives for the use of environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Rev. Biol. Trop.* 62, 1273–1284 (2014).
- Díaz-Ferguson, E., Herod, J., Galvez, J. & Moyer, G. Development of molecular markers for eDNA detection of the invasive African jewelfish (*Hemichromis letourneuxi*): a new tool for monitoring aquatic invasive species in National Wildlife Refuges. *Manag. Biol. Invasions* 5, 121–131 (2014).
- Donis, J. Evaluación de la validez y confiabilidad de una prueba diagnóstica. *Av. en Biomed.* 1, 73–81 (2012).
- Dos Santos, C. P., Nehrke, M. V., Mansur, M. C. & Gazulha, V. Como monitorar bivalves invasores no plâncton? Método da microscopia óptica. In *Moluscos Límnicos Invasores no Brasil: Biologia, Prevenção, Controle* (eds. Mansur *et al.*) 139-142 (Redes Editora, Porto Alegre, 2012).
- Eguiarte, L. E. & Souza, V. Introducción a la Ecología Molecular. In *Ecología Molecular* (eds. Eguiarte, L. E., Souza, V. & Aguirre, X.) 1–7 (Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, 2007).
- Endo, N. & Nogata, Y. Método de detecção e quantificação de larvas do mexilhão-dourado *Limnoperna fortunei*, usando PCR quantitativo em tempo real. In *Moluscos Límnicos Invasores no Brasil: Biologia, Prevenção, Controle* (eds. Mansur *et al.*) 149-153 (Redes Editora, Porto Alegre, 2012).
- Endo, N., Sato, K. & Nogata, Y. Molecular based method for the detection and quantification of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* using real-time PCR. *Plankt. Benthos Res.* 4, 125–128 (2009).
- Ernandes-Silva, J., Pinha, G. D. & Mormul, R. P. Environmental variables driving the larval distribution of *Limnoperna fortunei* in the upper Paraná River floodplain, Brazil. *Acta Limnol. Bras.* 29, (2017).
- Fabián, D. Variación anual de larvas del mejillón dorado (*Limnoperna fortunei*) en sistemas de refrigeración de Centrales Hidroeléctricas en embalses del Río Negro, Uruguay. INNOTECH. (En prensa, 2021)

- Failla, M. G., Alanis, W. S. S. & Martinez, C. First record of *Craspedacusta sowerbii* Lankester, 1880 (Hydrozoa, Limnomedusae) in a natural freshwater lagoon of Uruguay, with notes on polyp stage in captivity. *Brazilian J. Biol.* 77, 665–672 (2017).
- Fernández, R. El teorema de Bayes y su utilización en la interpretación de las pruebas diagnósticas en el laboratorio clínico. *Rev. Cuba. Investig. Biomed.* 28, 158–165 (2009).
- Ferrão-Filho, A. D. S. & Kozlowsky-Suzuki, B. Cyanotoxins: Bioaccumulation and effects on aquatic animals. *Mar. Drugs* 9, 2729–2772 (2011).
- Ferrer, C. & Pereira, J. Ficha zoológica: *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) Bivalvia, Mytiloidea, Mytilidae. *Not. la SZU* 46, 27–29 (2019).
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F. & Taberlet, P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4, 423–425 (2008).
- Ficetola, G. F., Taberlet, P. & Coissac, E. How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Mol. Ecol. Resour.* 16, 604–607 (2016).
- Fierro, F. Electroforesis de ADN. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (eds. Romero, A., Días, A., Aguilar, B. & Munive, M.) 27–52 (Semarnat, INECC, UAM-I, 2014).
- Frischer, M. E. *et al.* Specific amplification of the 18S rRNA gene as a method to detect zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) larvae in plankton samples. *Hydrobiologia* 487, 33–44 (2002).
- Ghabooli, S. *et al.* Genetic Diversity in Introduced Golden Mussel Populations Corresponds to Vector Activity. *PLoS One* 8, (2013).
- Giribet, G. & Wheeler, W. On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebr. Biol.* 121, 271–324 (2002).
- González-Bergonzoni, I. *et al.* Evaluating the role of predatory fish controlling the invasion of the Asian golden mussel *Limnoperna fortunei* in a subtropical river. *J. Appl. Ecol.* 57, 717–728 (2020).
- Gorgani-Firouzjaee, T., Kalantrai, N., Ghaffari, S., Alipour, J. & Siadati, S. Genotype characterization of livestock and human cystic echinococcosis in Mazandaran province, Iran. *J. Helminthol.* 93, 255–259 (2019).
- Green, M. R. & Sambrook, J. Precipitation of DNA with Ethanol. In *The Molecular Cloning collection* (eds. Green, M. R. & Sambrook, J.) 1116–1121 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2016). doi:10.1101/pdb.prot093377.
- Green, V. S. & Stott, D. E. Polyacrylamide: A Review of the Use, Effectiveness, and Cost of a Soil Erosion Control Amendment. in *Sustaining the Global Farms* (eds. Stott, D. E., Mohtar, R. H. & Steinhardt, G. C.) 384–389 (USDA-ARS National Soil Erosion Research Laboratory, 2001).
- Harper, L. R. *et al.* Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiol.* 826, 25–41 (2019).
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & DeWaard, J. R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc.* 270, 313–321 (2003b).
- Hebert, P. D. N., Hollingsworth, P. M. & Hajibabaei, M. From writing to reading the encyclopedia of life. *Philosophical Trans. R. Soc.* 371, (2016).

- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S. & DeWaard, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc.* 270, 96–99 (2003a).
- Hester, E. T. & Doyle, M. W. Human impacts to river temperature and their effects on biological processes: A quantitative synthesis. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 47, 571–587 (2011).
- Iwasaki, K. & Uryu, Y. Life Cycle of a Freshwater Mytilid Mussel, *Limnoperna fortunei*, in Uji River, Kyoto. *Venus* 57, 105–113 (1997).
- Iwasaki, K. Behavior and Taxis of Young and Adult *Limnoperna fortunei*. In *Limnoperna fortunei: The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel* (eds. Boltovskoy D.) 249-260 (Springer, 2015).
- Johnson, J. B., Peat, S. M. & Adams, B. J. Where's the ecology in molecular ecology? *Oikos* 118, 1601–1609 (2009).
- Jorge, G., Lagerlöf, J., Martínez Debat, C. & Pérez Carlos, A. Identification of Earthworm Species in Uruguay Based on Morphological and Molecular Methods. *Agrociencia Uruguay* 23, 1–10 (2019).
- Kalff J. *Limnology: Inland water ecology*. (Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA. 2002)
- Kreader, C. A. Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1102–1106 (1996).
- Krishnamurthy, P. & Francis, R. A. A critical review on the utility of DNA barcoding in biodiversity conservation. *Biodiversity and Conservation* vol. 21 1901–1919 (2012).
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874 (2016).
- Lee, Y. *et al.* A mitochondrial genome phylogeny of Mytilidae (Bivalvia: Mytilida). *Mol. Phylogenet. Evol.* 139, (2019).
- Liu, J. & Zhang, H. DNA barcoding for species identification in deep-sea clams (Mollusca: Bivalvia: Vesicomyidae). *Mitochondrial DNA Part A DNA Mapping, Seq. Anal.* 29, 1165–1173 (2018).
- Madden, T. The BLAST Sequence Analysis Tool. In *The NCBI Handbook* 1–15 (The National Library of Medicine, 2013).
- Mansur M. C. *et al.* Morfologia e ciclo larval comparados de bivalves límnicos invasores e nativos. In *Moluscos Límnicos Invasores no Brasil: Biologia, Prevenção, Controle* (eds. Mansur *et al.*) 95-110 (Redes Editora, Porto Alegre, 2012).
- Masciadri, S., Brugnoli, E. & Muniz, P. InBUy database of invasive and alien species (IAS) in uruguay: A useful tool to confront this threat to biodiversity. *Biota Neotrop.* 10, 205–213 (2010).
- Matlock, B. Assessment of Nucleic Acid Purity. Technical Note vol. 52646 (215AD).
- Molina-Ruiz, A. M. & Requena, L. Implantes cosméticos en dermatología: Características y efectos adversos. *Medicina Cutanea Ibero-Latino-Americana* vol. 40 131–146 (2012).
- Myers, N., Mittermeier, R., Mittermeier, C., da Fonseca, G. & Kent, J. Conservation: Biodiversity as a bonus prize. *Nature* 408, 895 (2000).

- Nakano, D., Kobayashi, T. & Sakaguchi, I. Differences in larval dynamics of golden mussel *Limnoperna fortunei* between dam reservoirs with and without an aeration system. *Landsc. Ecol. Eng.* 6, 53–60 (2010).
- Nathan, L. M., Simmons, M., Wegleitner, B. J., Jerde, C. L. & Mahon, A. R. Quantifying environmental DNA signals for aquatic invasive species across multiple detection platforms. *Environ. Sci. Technol.* 48, 12800–12806 (2014).
- Newman, M. C. *Quantitative Ecotoxicology*. (Taylor & Francis Group, 2013).
- Ogram, A., Sayler, G. S. & Barkay, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* 7, 57–66 (1987).
- Olivera, M. D. *et al.* Colonization and Spread of *Limnoperna fortunei* in South America. In: *Limnoperna fortunei: The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel* (eds. Boltovskoy D.) 333–356 (Springer, 2015).
- Orive, G., Lertxundi, U. & Barcelo, D. Early SARS-CoV-2 outbreak detection by sewage-based epidemiology. *Sci. Total Environ.* 732, (2020).
- Owczarzy, R. *et al.* IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. *Nucleic Acids Res.* 36, 163–169 (2008).
- Paolucci E. M. & Thuesen E. V. Trophic Relationships of *Limnoperna fortunei* with Larval Fishes. In *Limnoperna fortunei: The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel* (eds. Boltovskoy D.) 211–230 (Springer, 2015).
- Paolucci, E. M. *et al.* Morphological and genetic variability in an alien invasive mussel across an environmental gradient in South America. *Limnol. Oceanogr.* 59, 400–412 (2014).
- Pastorino, G., Darrigran, G., Martín, S. M. & Lunaschi, L. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), otro bivalvo invasor en el Rio de La Plata. *Neotrópica* 39, 101–102 (1993).
- Pie, M. R. *et al.* Development of a real-time PCR assay for the detection of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*, Mytilidae) in environmental samples. *An. Acad. Bras. Cienc.* 89, 1041–1045 (2017).
- Pie, M. R., Boeger, W. A., Patella, L. & Falleiros, R. M. A fast and accurate molecular method for the detection of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Mytilidae) in plankton samples. *J. Molluscan Stud.* 72, 218–219 (2006).
- Pimentel, D., Lach, L., Zuniga, R. & Morrison, D. Environmental and Economic Costs of Nonindigenous Species in the United States. *Bioscience* 50, 53–65 (2000).
- Pusey, B. J. & Arthington, A. H. Importance of the riparian zone to the conservation and management of freshwater fish: a review. *Mar. Freshw. Res.* 1–16 (2003) doi:10.1071/MF02041.
- Ravindran, S. Turning discarded DNA into ecology gold. *Nature* 570, 543–545 (2019).
- Ricciardi, A. Global range expansion of the Asian mussel *Limnoperna fortunei* (Mytilidae): Another fouling threat to freshwater systems. *Biofouling* 13, 97–106 (1998).
- Rius, F. & Barón, F. *BIOESTADÍSTICA*. (Ediciones Paraninfo, S.A, 2005).
- Rojas Molina, F. & Williner, V. First record of the non-indigenous mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia, Mytilidae) as an epibiont of the crab *Trichodactylus borellianus* (Decapoda, Trichodactylidae). *Crustaceana* 86, 682–692 (2014).

Saik, R. K. *et al.* Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. 239, 487–491 (1987).

Scarabino, F. & Mansur, M. C. Lista sistemática de los bivalvia dulciacuícolas vivientes de Uruguay. *Comun. la Soc. Malacológica del Uruguay* 9, 89–99 (2007).

Scarabino, F. & Verde, M. *Limnoperna fortunei* (DUNKER, 1857) EN DEL RIO DE LA COSTA URUGUAYA LA PLATA (BIVALVIA; MYTILIDA). *Comun. la Soc. Malacológica del Uruguay* 7, 374–375 (1994)

Scarabino, F. *et al.* Bivalvos marinos y estuarinos de la costa uruguaya: faunística, distribución, taxonomía y conservación. In: BASES para la CONSERVACIÓN y el MANEJO de la COSTA URUGUAYA (eds. Manafra, R., Rodríguez-Gallego, L., Scarabino, F. & Conde, D.) 143-156 (Vida Silvestre Uruguay, 2006).

Silva, F. A. e. & Giani, A. Population dynamic of bloom-forming *Microcystis aeruginosa* in the presence of the invasive bivalve *Limnoperna fortunei*. *Harmful Algae* 73, 148–156 (2018).

Silva, I. *et al.* Fish vs. Aliens: predatory fish regulate populations of *Limnoperna fortunei* mitigating impacts on native macroinvertebrate communities. *Hydrobiologia* (2020) doi:10.1007/s10750-020-04421-9.

Simberloff, D. Non-native species DO threaten the natural environment! *J. Agric. Environ. Ethics* 18, 595–607 (2005).

Stamatakis, A. RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–1313 (2014).

Sylvester, F. & Sardiña, P. Relationships of *Limnoperna fortunei* with Benthic Animals. In *Limnoperna fortunei: The Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel* (eds. Boltovskoy D.) 191-210 (Springer, 2015).

Taberlet, P., *et al.* *Environmental DNA for biodiversity and monitoring*. (Oxford University Press, 2018)

Thomas, A. C. *et al.* A system for rapid eDNA detection of aquatic invasive species. *Environ. DNA* 2, 261–270 (2020).

Thompson, J., Gibson, T. & Higgins, D. G. Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX. *Curr. Protoc. Bioinforma.* 1–22 (2003).

Tréguier, A. *et al.* Environmental DNA surveillance for invertebrate species: Advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *J. Appl. Ecol.* 51, 871–879 (2014).

UICN. Guidelines for the Prevention of Biodiversity Loss Caused by Alien Invasive Species. International Union for the Conservation of Nature, Gland, Switzerland (2000).

Uliano-Silva, M. *et al.* Gene discovery through transcriptome sequencing for the invasive mussel *Limnoperna fortunei*. *PLoS One* 9, (2014).

Uliano-Silva, M. *et al.* The complete mitochondrial genome of the golden mussel *Limnoperna fortunei* and comparative mitogenomics of Mytilidae. *Gene* 577, 202–208 (2016).

Vallejo, B. *et al.* First record of the charru Mussel *Mytella charruana* d'orbigny, 1846 (Bivalvia: Mytilidae) from manila bay, luzon, philippines. *BioInvasions Rec.* 6, 49–55 (2017).

Velázquez, L.P, Martínez, M. & Romero, A. Extracción y Purificación de ADN. In Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos (eds. Romero, A., Días, A., Aguilar, B. & Munive, M.) 1-26 (Semarnat, INECC, UAM-I, 2014).

Vidal, F. *et al.* Recreational exposure during algal bloom in carrasco beach, Uruguay: A liver failure case report. *Toxins (Basel)*. 9, 1–12 (2017).

Xia, Z. *et al.* Early detection of a highly invasive bivalve based on environmental DNA (eDNA). *Biol. Invasions* 20, 437–447 (2018).

Zilinskiene, J. GeneJET PCR Purification Kit. Thermo Scientific GeneJET 1–7 (2015).

Anexo 1, Tablas

Tabla A1.1: Taxa utilizadas para el árbol filogenético y su referencia a las secuencias *barcoding* en *GenBank*. **Neocorbicula limosa* actualmente se llama *Cyanocyclus limosa*.

Taxa	Código <i>GenBank</i>
<i>Anodontites trigonus</i>	AF231738.1
<i>Brachidontes darwinianus</i>	KC844407.1
<i>Brachidontes rodriguezii</i>	KY454052.1
<i>Castalia ambigua</i>	JN243889.1
<i>Corbicula fluminea</i>	KX231272.1
<i>Corbiculalargillerti</i>	KC211250.1
<i>Neocorbicula limosa</i> *	AF196277.1
<i>Diplodon demeraraensis</i>	KP184898.1
<i>Eupera ferruginea</i>	KF483420.1
<i>Laevipilina hyalina</i>	FJ445781.1
<i>Limnoperla fortunei</i> haplotype Lfm03	HQ843796.1
<i>Limnoperla fortunei</i> haplotype Lfm04	HQ843797.1
<i>Limnoperla fortunei</i> haplotype Lfm05	HQ843798.1
<i>Limnoperla fortunei</i> haplotype Lfm07	HQ843800.1
<i>Limnoperla fortunei</i> haplotype Lfm10	HQ843802.1
<i>Limnoperla fortunei</i> haplotype Lfm17	HQ843809.1
<i>Mycetopoda siliquosa</i>	JN243887.1
<i>Mytella charruana</i>	KP013804.1
<i>Mytilus edulis</i>	HM180704.1
<i>Perna perna</i>	HG005374.1
<i>Pisidium ventricosum</i>	MG421643.1
<i>Sphaerium striatinum</i>	AF120667.1
<i>Tagelus plebeius</i>	KF245613.1

Tabla A1.2. Sitios, métodos de recolección y metodología aplicada de las diferentes muestras biológicas utilizadas. -: No se trató con Cloroformo-Alcohol isoamílico, +: De trató con Cloroformo-Alcohol isoamílico, ++: Se trató con Cloroformo-Alcohol isoamílico dos veces.

Taxon	Lugar de recolección	Método de recolección	Tratamiento con C-AI
<i>Daphnia magna</i>	Facultad de Ciencias, Montevideo Uruguay	Manual, calderín 500 μm de malla	-
<i>Pomacea canaliculata</i> , aff	Facultad de Ciencias, Montevideo Uruguay	Manual	-
<i>Diplodon</i> sp.	Laguna del Medio, Florida	Draga de fondo	-
<i>Corbicula fluminea</i>	Areneras del Río Negro, Paso de los Toros	Manual	-
<i>Erodona mactroides</i>	Desembocadura del Arroyo Solís	Manual	-
<i>Brachidontes rodriguezii</i>	La Paloma, Rocha, Océano Atlántico	Manual	+
<i>Brachidontes darwinianus</i>	Playa Malvin, Montevideo, Río de la Plata	Manual	+
<i>Mytilus platensis</i>	Barra del Arroyo Maldonado	Manual	+
<i>Mytella charruana</i>	Playa Malvin, Montevideo, Río de la Plata	Manual	+
<i>Limnoperna fortunei</i> 1	Río Negro, Arenara del Hum	Manual	-
<i>Limnoperna fortunei</i> 2	Río Negro, cabecera del embalse Baygorria	Manual	+
<i>Limnoperna fortunei</i> 3	Ciudad de Colonia del Sacramento, Río de la Plata	Manual	+
<i>Limnoperna fortunei</i> 4	Parte baja de embalse Canelón Grande, Río Santa Lucía	Manual	-
Plancton Laguna Chica	Laguna del Medio, Florida	Red de Plancton, 60 μm de malla	-
Plancton Montevideo 1	Bahía de Montevideo, Río de la Plata	Red de Plancton, 60 μm de malla	-
Plancton Montevideo 2	Bahía de Montevideo, Río de la Plata	Red de Plancton, 60 μm de malla	-
Plancton Cabo Polonia	Cabo Polonio, Rocha, Océano Atlántico	Red de Plancton, 60 μm de malla	+
Constitución 3/1	Sistema de refrigeración Central hidroeléctrica Constitución, Río Negro	Tamiz 100 μm de malla	++
Constitución 18/1	Sistema de refrigeración Central Hidroeléctrica Constitución, Río Negro	Tamiz 100 μm de malla	+
Constitución 20/8	Sistema de refrigeración Central Hidroeléctrica Constitución, Río Negro	Tamiz 100 μm de malla	+
Constitución 20/12	Sistema de refrigeración Central Hidroeléctrica Constitución, Río Negro	Tamiz 100 μm de malla	+

Anexo 2, Voucher de los organismos utilizados



Figura A2.1: Especie: *Pomacea canaliculata* aff. Lugar de colección: Estanque de Facultad de Ciencias (UdelaR), Montevideo, Uruguay, 2018. Colector: Leandro Capurro.



Figura A2.3: Especie: *Diplodon* sp. Lugar de colección: Laguna del Medio-Cuenca del Santa Lucía, Florida, Uruguay, 1/12/2018. Colector: Leandro Capurro/ Dr. Ernesto Brugnoli.

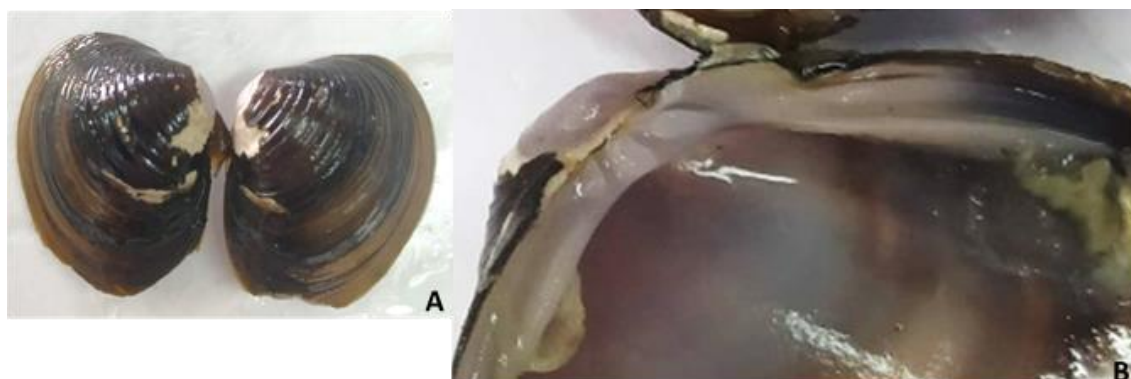


Figura A2.4: Especie: *Corbicula fluminea*. Lugar de colección: Areneras del Hum-Río Negro, Tacuarembó, Uruguay, 8/3/ 2019. Colector: Leandro Capurro. **A.** Vista externa de las valvas. **B.** detalles de la charnala.



Figura A2.5: Especie: *Corbicula fluminea*. Lugar de colección: Areneras del Hum-Río Negro, Tacuarembó, Uruguay, 8/3/ 2019. Colector: Leandro Capurro.



Figura A2.6: Especie: *Brachidontes rodriguezii*. Lugar de colección: Playa Los Botes-Océano Atlántico, Rocha, Uruguay, 26/10/2018. Colector: Leandro Capurro.



Figura A2.7: Especie: *Brachidontes darwinianus*. Lugar de colección: Playa Malvin-Río de la Plata, Montevideo, Uruguay. Colector: Leandro Capurro.



Figura A2.8: Especie: *Mytilus platensis*. Lugar de colección: Desembocadura del Arroyo Maldonado-Océano Atlántico, Rocha, Uruguay, 17/4/2019. Colector: Leandro Capurro.



Figura A2.9: Especie: *Mytella charruana*. Lugar de colección: Playa Malvin-Río de la Plata, Montevideo, Uruguay. Colector: Leandro Capurro.

Anexo 3, Figuras

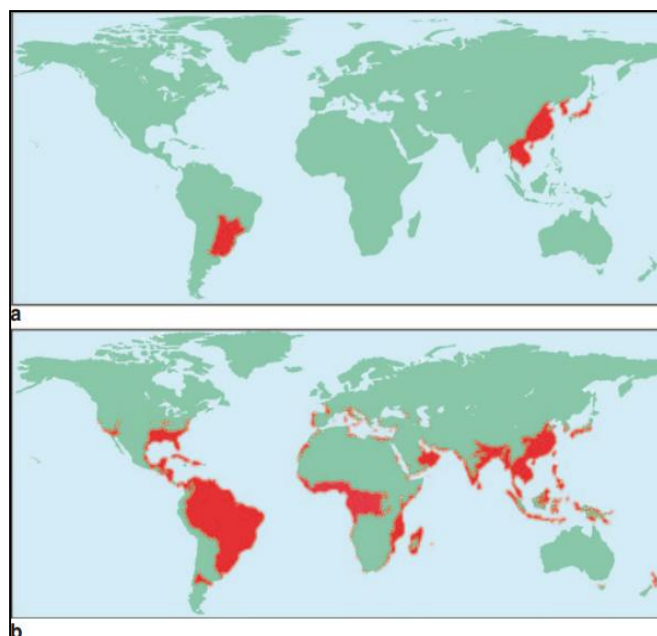


Figura A3.1. A: Distribución actual de *Limnoperla fortunei*. B. Distribución potencial de *L. fortunei*. Extraído de Boltovskoy, (2015)

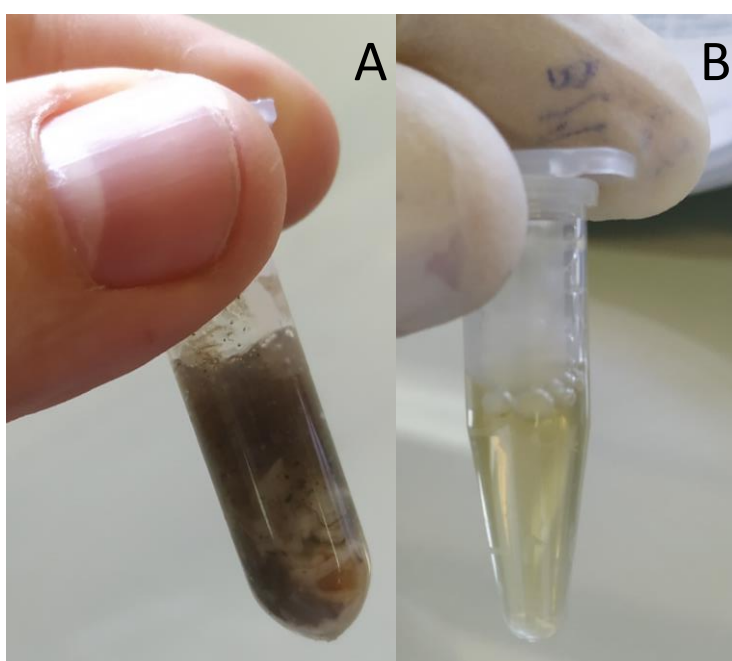


Figura A3.2: A- Filtro con muestra de plancton en *buffer* de lisis antes de la digestión enzimática. B- Sobrenadante obtenido luego extraer el sobrenadante de la muestra con cloroformo-alcohol isoamílico.

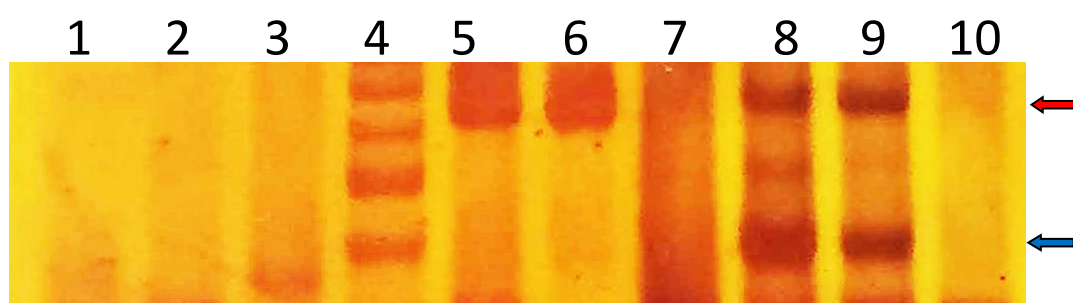


Figura A3.3: Prueba de inhibición de la PCR: 1: C- de *L. fortunei* y maíz, 2: C- *L. fortunei*, 3: C- maíz, 4: MPM, 5: C+: *L. fortunei* y maíz, 6: C+: *L. fortunei*, 7: C+ maíz, 8: Palmar 3/1, 9: Palmar 18/1, 10 Palmar 20/12. La flecha azul es la banda correspondiente a maíz y la roja a *L. fortunei*.

Anexo 4, Soluciones y Buffer utilizados

1.0 Buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) 50X, 1L (Fierro, 2014)

- Tris base, 242 g
- Ácido acético 0,5 M: 57.1 ml;
- EDTA pH 8, 100 ml.
- Enrasar a 1 litro con agua calidad MiliRo.

2.0 Buffer de carga 6X (Fierro, 2014)

- 0.25% azul de bromofenol
- 0.25% xileno cianol;
- 30% glicerol, en agua calidad MiliRo.

3.0 Buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 5x, 1 L (Fierro, 2014)

- Tris base, 54 g.
- Ácido bórico, 27.5 g; 0.5 M
- EDTA pH 8, 20 ml.
- Enrasar a 1 litro con agua calidad MiliRo.

4.0 Acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida 30,08X-1L (Fierro, 2014):

- Acrilamida 486,7 g.
- Bis-acrilamida 13,3g.
- Enrasar a 1 litro con agua calidad MiliRo.

5.0 Acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida 12X, 1L (Fierro, 2014)

- 400 mL de Acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida (29:1) 30X.
- 400 mL de con agua calidad MiliRo.
- 200 mL de TBE 5X.

6.0 Poliacrilamida 12X

- 10 mL de Acrilamida/N,N'-metilenbisacrilamida 12X
- 8 µL de TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina)
- 80 µL de Persulfato de amonio 10X (APS). [Catalizador, se recomienda agregar al final]

7.0 Revelado con Tinción de Plata (Sanguinetti et al., 1994)

5 minutos en **solución fijadora**:

- 20 mL Etanol 95%.
- 1 mL de Ácido Acético.
- 200 mL de agua calidad *MiliRo*.

8 minutos en **solución deplata**:

- 0,45 g de Nitrato de Plata.
- 200 mL de agua calidad *MiliRo*.

2 lavados con agua calidad *MiliRo*.

5 minutos (o hasta que se considere necesario) en **solución reveladora**:

- 6 g de Hidróxido de Sodio.
- 200 mL de agua calidad *MiliRo*.
- 0,66 mL de Formaldehido 37% [Agregar a lo último].

Terminado el revelado se deja en fijador hasta que se detiene la reacción.

Anexo 5, Material suplementario

1.1 Fundamentos teóricos del Teorema de Bayes

El Teorema de Bayes expresa que sean un conjunto de sucesos o hipótesis excluyentes $\{H1, H2, H3... H_i\}$, cuya probabilidad acumulada sea 1 y ninguno sea 0. Sea D la evidencia que brindan los datos, se expresa en la ecuación 1 la probabilidad de que tu hipótesis H_i sea verdadera según tus datos D :

$$P(H_i|D) = \frac{P(H_i)P(D|H_i)}{P(D)} \quad \text{Ecuación 1. Modificada de Newman (2013)}$$

Donde $P(H_i|D)$ es la probabilidad que mi hipótesis i sea verdadera según los datos obtenidos, $P(H_i)$ es que mi hipótesis i sea verdadera previa a los datos, $P(D|H_i)$ es la probabilidad *a priori* de obtener los resultados observados siendo H_i verdadera y finalmente $P(D)$ es la probabilidad de obtener los datos observados.

Los posibles resultados de los experimentos se expresan en la tabla 1.

Tabla 1: Relación entre la presencia de ADN de la especie de interés y los resultados de la PCR. ADN -: Muestras sin ADN de *L. fortunei*; ADN+: muestras con ADN de *L. fortunei*; R-/R+: PCR con resultado negativo/positivo; V-/V+: Verdadero negativo/positivo; F-/F+: Falso negativo/positivo.

	ADN -	ADN +
R -	V -	F-
R +	F+	V+

La **Prevalencia** sería $P(ADN+)$, los falsos positivos serían el cociente $F+/ADN-$ que serían el estimativo de la probabilidad condicional $P(R+|ADN-)$, a su vez los falsos negativos son el cociente $F-/ADN+$ que serían el estimativo de $P(R-|ADN+)$. Adicionalmente se determinan los verdaderos positivos (que se denominan **Sensibilidad**) que representa $P(R+|ADN+)$ y los verdaderos negativos que es la **Especificidad** $P(R-|ADN-)$.

En el presente trabajo se modelará con este teorema la probabilidad de que un positivo sea un verdadero positivo o **Valor Predictivo Positivo (VPP)** que sería $P(ADN+|R+)$ y un negativo sea un verdadero negativo o **Valor Predictivo Negativo (VPN)** que sería $P(ADN-|R-)$, según el poder de resolución de la técnica (ver en sección 6.1). Las ecuaciones del VPP y VPN utilizadas en este estudio se expresan en las ecuaciones 2 y 3:

$$VPP = \frac{P(R+/ADN+) \times P(ADN+)}{P(R+/ADN+) \times P(ADN+) + P(R+|ADN-) \times P(ADN-)} \text{ Ecuación 2}$$

$$VPN = \frac{P(R-/ADN-) \times P(ADN-)}{P(R-/ADN-) \times P(ADN-) + P(R-|ADN+) \times P(ADN+)} \text{ Ecuación 3}$$

1.2 Modelo Binomial de réplicas

En una sucesión de ensayos de Bernoulli (eventos en donde solo puede haber dos resultados: éxito o fracaso) la probabilidad de obtener k éxitos de n experimentos con una probabilidad de éxito p y una probabilidad de fracaso q . Su ley de probabilidad se muestra en la ecuación (4):

$$f(k) = P[X = k] = \binom{n}{k} p^k q^{n-k} \quad 4 \text{ Modificado de Rius \& Barón (2005)}$$

1.3 Modelo binomial negativo de réplicas

En una sucesión de ensayos de Bernoulli, se dice que un experimento aleatorio se rige por la Ley de distribución Binomial Negativa cuando se obtienen k números de “fracasos” hasta obtener r “éxitos” con una probabilidad p de obtener un éxito y una probabilidad q de obtener un fracaso (Rius & Barón, 2005). Su ley de probabilidad se muestra en la ecuación (5):

$$f(k) = P[X = k] = \binom{k+r-1}{k} p^r q^k \quad 5. \text{ Modificado de Rius \& Barón (2005)}$$

Las simulaciones serán las mismas que en el modelo anterior, donde se tomará r como 2 y k como 0 o 1.

Anexo 6, comandos de R

1.0 Teorema de Bayes

1.1 Valor predictivo positivo

```
#A probabilidad que exista L. fortunei en un ambiente
#B que el ensayo genere un resultado positivo
#AB que exista L. fortunei en un ambiente si obtuvo un ensayo positivo
#BA que el test resulte positivo si hay ADN de L. fortunei

#PRIMER RESULTADO POSITIVO

G= seq(from = 0.7, to= 0.95, by=0.05) #Secuencia de números de 0.7 a
0.95 en intervalos de 0.05 que representa el intervalo de poderes de
resolución teórico de la técnica.

M <- 0.5*0.01 #Probabilidad de obtener un falso positivo.

R <- c() #Creo vector vacío

for (i in G) { #Para cada valor en g
  BA <- i
  B <- BA*A + M
  AB <- (BA*A)/B
  R <- c(R, AB)
}

R #Probabilidades de obtener un resultado positivo si existe ADN de L.
fortunei según G.

prob <- data.frame(G,R)#genera un Data Frame con el poder de
resolución de la técnica y las probabilidades obtenidas.

J <- round(R, digits=3)#Redondea los valores de R a 3 dígitos.

ggplot(prob, aes(x=G, y= R)) + #genera el gráfico
  geom_bar(stat="identity", fill = "skyblue")+ #Define como
gráfico de barras
  coord_cartesian(xlim = c(0.70, 0.95), ylim = c(0.98, 0.99))+
#Define los márgenes
  geom_text(aes(label=J), vjust=1.5, colour="black") + #inserta
el texto en la gráfica-
  xlab("Poder de resolución de la técnica") + #Leyenda del eje X
  ylab("Certeza del positivo obtenido") #Leyenda del eje y

#SEGUNDO RESULTADO POSITIVO

L <- c()
R2 <- c()

for (i in g) {
for (j in R) #Se usa los valores de R como el A
BA <- i
  A <- j
  B <- BA*A + 0.01*(1-j)
  AB <- (BA*A)/B
  R2 <- c(R2, AB)
}
```

```

prob2 <- data.frame(g,R2)

N <- round(R2, digits=3)

ggplot(prob2, aes(g,R2)) +
  geom_bar(stat="identity", fill = "pink")+
  coord_cartesian(xlim = c(0.70, 0.95), ylim = c(0.999, 1))+
  geom_text(aes(label=N), vjust=1.5, colour="black") +
xlab("Poder de resolución de la técnica") +
  ylab("Certeza del positivo obtenido")

```

La aplicación de subsecuentes test sigue la misma metodología.

1.2 Valor predictivo negativo

```

#BA probabilidad que el test de obtener un falso negativo
#B probabilidad que de negativo, sea verdadero o falso.
#L probabilidad de obtener un falso negativo.

S<- 0.99*0.5 #probabilidad de obtener un verdadero negativo.
H <- 0.5 #probabilidad que no haya L. fortunei en el ambiente

D= seq(from = 0.05, to= 0.3, by=0.05)

L <- c() #creo vector L.

for (i in D) {
  BA <- i
  B <- S + BA*H
AB <- S/B
  L <- c(L, AB)
}

prob3 <- data.frame(D,L)

M <- round(L, digits=2)

ggplot(prob3, aes(D,L)) +
  geom_bar(stat="identity", fill = "VIOLET") +
  geom_text(aes(label=M), vjust=1.5, colour="black") +
xlab("Probabilidad de obtener un falso negativo") +
  ylab("Probabilidad de que un negativo\n sea un verdadero
negativo")

#SEGUNDO NEGATIVO

L2 <- c()

for (i in D) {
  for (j in L)
    BA <- i
    B <- j + BA*(1-j)
    AB <- j/B
  L2 <- c(L2, AB)
}

prob4 <- data.frame(D, L2)

X <- round(L2, digits = 2)

```

```
ggplot(prob4, aes(D,L2)) +
  geom_bar(stat="identity", fill = "ORANGE")+
  geom_text(aes(label=X), vjust=1.5, colour="black") +
xlab("Probabilidad de obtener un falso negativo") +
  ylab("Probabilidad de que un negativo sea un verdadero
negativo \n si ya se obtuvo un negativo")
```

La aplicación de subsecuentes test sigue la misma metodología.

2.0 Modelo Binomial de réplicas

A continuación se describen los modelos binomiales negativos a modo de ejemplo, la diferencia con el modelo binomial es que la función es:

```
sum(dbinom(x=n1:nk, size=k, prob=i))
```

En donde x es el número de aciertos que serían entre n_1 y n_k , $size$ es el número de intentos totales y $prob$ es la probabilidad de que ese evento suceda.

2.1 Obtener 2 positivos en un máximo de 3 intentos según el poder de resolución de la técnica

$G = \text{seq}(\text{from} = 0.05, \text{to} = 0.30, \text{by} = 0.05)$ Secuencia de números de 0.05 a 0.30 en intervalos de 0.05 que representa el intervalo de poderes de resolución teórico de la técnica.

```
b <- c()
for (i in G) {
  a <- sum(dnbinom(x=0:1, size=2, prob=i))#prob. de obtener 2
éxitos en un máximo de 3 intentos.
b <- c(b,a)
}
```

```
n= round(b, digits=2)
```

```
prob <- data.frame(G,n)
```

```
ggplot(prob, aes(G,n)) +
geom_bar(stat="identity", fill = "red") +
xlab("Poder de resolución de la técnica") +
  ylab("Probabilidad de obtener 2 negativos") +
geom_text(aes(label=n), vjust=1.5, colour="black")
```

El número de “éxitos” o resultados positivos obtenidos se define en $size$ y el número de fracasos se define en x .

2.2 Obtener 2 negativos en un máximo de 3 intentos si existe ADN de *L. fortunei* según el poder teórico de resolución de la técnica

$f = \text{seq}(\text{from} = 0.005, \text{to} = 0.02, \text{by} = 0.005)$ Poder teórico de resolución de la técnica.

```
m <- c()
for (i in f) {
  a <- sum(dnbinom(x=0:1, size=2, prob=i))
m <- c(m,a)
}
```

```
m= round(m, digits=6)

probpos <- data.frame(f,m)

ggplot(probpos, aes(f,m)) +
  geom_bar(stat="identity", fill = "green") +
  xlab("Probabilidad de obtener un falso positivo") +
  ylab("Probabilidad de obtener 2 falso positivos") +
  geom_text(aes(label=m), vjust=1.5, colour="black")
```