

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ESPECIALIZACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR

DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DEL PEZ
Centropomus armatus (TELEOSTEI: CENTROPOMIDAE)
EN EL PACÍFICO DE PANAMÁ

Por:

OLGA VÁSQUEZ CEDEÑO

Licenciada en Biología

PANAMÁ, REPUBLICA DE PANAMÁ

2018

HOJA DE APROBACIÓN

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
con especialización en Biología Molecular

Presentada por:

OLGA M. VÁSQUEZ CEDEÑO

Licenciada en Biología

Miembros del Jurado:

Dr. Carlos Vergara Chen

Dra. Magaly Sánchez de Chial

Dra. Alana Domingo

Universidad de Panamá

Panamá, República de Panamá

2018

DEDICATORIA

A mis padres y hermana, gracias por todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mi asesor Carlos Vergara por sus enseñanzas, apoyo e inspiración a seguir estudiando más sobre el fascinante mundo de los róbalo.

Este trabajo fue realizado como parte del proyecto de investigación “Identificación de la variación genética adaptativa en poblaciones naturales del róbalo, *Centropomus armatus* (Gill, 1963), financiado por la Secretaria Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (SENACYT).

Agradezco al programa de Maestría en Ciencias Biológicas y SENACYT por la beca otorgada para realizar mis estudios de postgrado.

El trabajo de laboratorio fue completado en los laboratorios de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP) y la Estación de Maricultura de la Autoridad de los Recursos Acuáticos de Panamá (ARAP) en Vacamonte. Se agradece el apoyo logístico por parte de la ARAP para la colecta de muestras en el Golfo de Montijo, especialmente al biólogo Benjamín Sánchez, funcionario de la oficina regional de la ARAP en Veraguas.

Agradezco inmensamente a Katherine Roca, Yesuri Pino y Laura Molina por su apoyo durante la colecta y procesamiento de muestras. Gracias por estar siempre allí dándome palabras de aliento para culminar este trabajo exitosamente. De igual manera, a mis compañeras de maestría Angélica Allard y Osiris Murcia, fue un gusto compartir esta experiencia académica con ustedes.

ÍNDICE GENERAL

HOJA DE APROBACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
A. Biología y ecología de los róbalos (Centropomidae).....	2
B. Descripción de la problemática.....	4
C. Hipótesis de trabajo y objetivos de la investigación.....	6
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
A. Generalidades sobre las mitocondrias.....	9
1. La mitocondria: un organelo celular importante.....	9
2. Organización y características del genoma mitocondrial.....	10
B. Importancia del ADN mitocondrial, especialmente el gen COI, en el estudio de las poblaciones.....	11

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
A. Recolecta de muestras y Extracción de ADN.....	13
B. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Secuenciación.....	15
C. Análisis de datos	17
a) Diversidad genética.....	17
b) Estructura genética.....	18
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....	19
A. Diversidad genética.....	19
B. Estructura genética.....	21
C. Test de neutralidad e historia demográfica.....	24
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....	29
A. Diversidad genética.....	29
B. Estructura genética.....	33
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
A. Conclusiones.....	37
B. Recomendaciones.....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1	Sitios de muestro de <i>C. armatus</i> en el Pacífico de Panamá.
Tabla 2	Índices de diversidad genética de <i>C. armatus</i> basados en las secuencias del marcador del gen mitocondrial COI.
Tabla 3	Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las secuencias de <i>C. armatus</i> , utilizando el marcador mitocondrial COI.
Tabla 4	Índices de fijación (F_{st}) entre poblaciones de <i>C. armatus</i> .
Tabla 5	Test de neutralidad. D de Tajima y estadístico F_S de F_U .

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Imagen ilustrada de la especie *Centropomus armatus*.
- Figura 2 Sitios de muestreo en cinco localidades de la costa del Pacífico de Panamá.
- Figura 3 Fotografía del róbalo *Centropomus armatus*.
- Figura 4 Frecuencias haplotípicas para *Centropomus armatus* utilizando 1 marcador mitocondrial COI, en cinco sitios muestreados.
- Figura 5 Distribución de diferencias por pares de haplotipos para las cinco poblaciones de *C. armatus* estudiadas, obtenidas a partir datos del gen COI.
- Figura 6 Red haplotípica *MNS* que muestra las relaciones genéticas entre los haplotipos reconocidos por el gen mitocondrial COI, para *C. armatus*.

LISTADO DE ABREVIATURAS

COI	Citocromo c oxidasa subunidad I
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	Genoma mitocondrial
ADNn	Genoma nuclear
ARN	Ácido ribonucleico
π	Diversidad nucleotídica
Hd	Diversidad haplotípica
Ns	Número de sitios segregantes (polimórficos)
Nh	Número de haplotipos
Fst	Índice de diferenciación genética
AMOVA	Análisis de varianza molecular

RESUMEN

Centropomus armatus es un pez común en los estuarios del Pacífico de Panamá. Es una especie con amplia distribución en el Pacífico Oriental Tropical y asociada a ecosistemas costeros. Posee una alta tolerancia a cambios en su hábitat como, a la salinidad, temperatura, disponibilidad de alimento; y además tiene un alto potencial pesquero, sin embargo, es poco lo que se conoce respecto a su diversidad y estructura genética poblacional. El presente estudio propuso evaluar la variación y estructura genética a lo largo de la costa del Pacífico panameño a partir del análisis de secuencias nucleotídicas del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) del ADN mitocondrial. Se procesó un conjunto de secuencias de 137 muestras del tejido recolectadas de ejemplares desembarcados en cinco puertos pesqueros. Se detectaron 21 haplotipos en total, siendo el haplotipo 2 (H2) el más abundante y presente en todas las localidades, excepto Rio Hato. La diversidad haplotípica (H_d) y nucleotídica (π) para toda la población fue de 0.6062 y 0.0639, respectivamente. Esta diversidad haplotípica moderada y diversidad nucleotídica alta, pueden ser el resultado de un cuello de botella sobre una población grande y estable, seguido por una rápida expansión demográfica en su reciente historia evolutiva. Los patrones de variación genética con AMOVA no mostraron evidencia de diferenciación genética entre las localidades muestreadas a lo largo de la costa, sin embargo, los valores del F_{st} entre algunas de las localidades muestran que, si existe un alto nivel de diferenciación, pero debe ser explorado utilizando otros marcadores.

ABSTRACT

Centropomus armatus, commonly known as armed snook, is a native fish in estuaries along the pacific coast of Panama. This species is widely distributed throughout the Eastern Pacific from of Mexico to Ecuador, and it is closely associated with inshore coastal ecosystems. It has a high tolerance to changes in their habitat such as salinity, temperature, availability of food. Additionally, the armed snook is an important species for recreational and commercial fisheries, yet little is known about its biology, genetic diversity and population structure. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity and population structure of *C. armatus* based on the analysis of the mitochondrial DNA, specifically a 592 bp fragment of the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene. A total of 137 individuals were sampled from five locations. After sequencing the amplified fragments, these were analyzed, and 21 haplotypes were defined, with haplotype 2 (H2) being the most frequent in the population and was present in all locations, except Rio Hato. The estimated haplotype diversity (H_d) and nucleotide diversity (π) for the entire population was 0.6062 and 0.0639, respectively. This relationship between haplotype, nucleotide diversity and neutrality test revealed that *C. armatus* experienced bottleneck event and a subsequent rapid population expansion, in its recent evolutionary history. The patterns of genetic variation with AMOVA showed no evidence of genetic differentiation between the locations sampled throughout the coast. However, the F_{st} values between some populations show that there is a high level of differentiation, but it must be explored using other markers.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los peces óseos poseen características fisiológicas y morfológicas que les han permitido adaptarse exitosamente a una gran variedad de hábitats, desde aguas marinas profundas a estuarios, ríos, lagos, y aguas subterráneas (Gross, 1987; Ito *et al.*, 2007; Keenleyside, 2012; Soares & Niemiller, 2013). A pesar de ello, la distribución y dispersión de la mayoría de las especies, generalmente se ve restringida por factores ambientales como: salinidad, temperatura, barreras geográficas, disponibilidad de hábitat, actividad antropogénica, entre otros (Moyle & Moyle, 1995; Helfman *et al.*, 2009). Por esta razón, la biodiversidad en peces ha sido ampliamente estudiada por distintas disciplinas de la Biología, incluyendo la Genética. Los avances en las técnicas moleculares han permitido a los investigadores entender y resolver relaciones filogenéticas, patrones poblacionales, biogeográficos y evolutivos; los cuales son de gran importancia para la conservación y aprovechamiento de las especies (Salzburger & Meyer, 2004; Cilleros *et al.*, 2018).

Una población, en el sentido genético, no es sólo un grupo de individuos, sino un grupo reproductivo; es decir, que miembros de una población rara vez migran y se reproducen con miembros de otra población (Helfman *et al.*, 2009).

Por lo tanto, la genética de poblaciones está interesada no sólo en la constitución genética de los individuos, sino también en la transmisión de los genes de una generación a la siguiente. Estos principios, generalmente, son aplicados en el manejo de muchas pesquerías de alto impacto económico, así como en la acuicultura (Pinsky & Palumbi, 2014; Duong, & Scribner, 2018).

Mediante el uso de diversas herramientas moleculares, estadísticas y ecológicas se puede evaluar la diversidad genética y distinguir poblaciones. La caracterización de la diversidad genética y el análisis de las diferencias genéticas entre poblaciones se realizan a partir de secuencias de genes del ADN nuclear y ADN mitocondrial, mediante el uso de marcadores moleculares (Wright & Bentzen, 1995; Li *et al.*, 2015; Gong *et al.*, 2018).

A. Biología y ecología de los róbalos (Centropomidae).

Los róbalos son especies de peces marinos pertenecientes al género *Centropomus*. Este grupo se distribuye en zonas tropicales y subtropicales del continente americano. Anteriormente, se catalogaba a *Centropomus* como el único género dentro de la familia Centropomidae (Nelson, 2006); sin embargo, nuevos estudios filogenéticos sugieren que la familia está compuesta por otros dos géneros (*Psammoperca* y *Lates*), pero estos dos tienen una distribución diferente a *Centropomus* (Li *et al.*, 2011). Existen 12 especies reportadas para el

género *Centropomus*, 6 de ellas se distribuyen en el Atlántico Occidental y 6 en el Pacífico Oriental; y ninguna de las 12 especies se encuentran en los dos océanos. Los reportes de Rivas (1986) indican que estas especies habitan de forma simpátrica y sintópica en sus respectivos océanos. Además, se sugiere que 6 de las 12 especies forman pares transísmicos o especies gemelas (Tringali *et al.*, 1999).

Los róbalo son organismos eurihalinos, estenotérmicos, estuario-dependiente y son capaces de realizar migraciones entre cuerpos de agua dulce y marina según la temporada del año con fines alimenticios y reproductivos (Rivas, 1986; Castro-Aguirre, 1999; Robles & Vega, 2004). Asimismo, su gran capacidad adaptativa les permite colonizar diferentes nichos, como lagunas salobres y dulces, bocas de ríos y zonas marinas poco profundas cercanas a la costa, donde ocurre la reproducción. Los róbalo desovan cerca de los estuarios. Posterior a la eclosión, las larvas son transportadas por las corrientes hacia aguas más someras, donde buscan refugio y protección contra depredadores entre las raíces de mangles y el pasto marino (Gilmore *et al.*, 1983; McMichael *et al.*, 1989).

B. Descripción de la problemática.

Debido a la importancia de los róbalo en el sector pesquero, se han realizado estudios sobre su biología, ecología y genética, especialmente en *Centropomus undecimalis*, cuyo valor comercial es elevado en pesquerías que se realizan en el Golfo de México y sur de los Estados Unidos (Smith, 1997).

El listado de especies amenazadas de la IUCN cataloga a todas las especies de *Centropomus* como no amenazadas. Sin embargo, los róbalo están sometidos a fuertes presiones selectivas, como destrucción de su hábitat, pesquerías poco controladas, contaminación y cambio climático, que podrían estar influyendo de forma negativa sobre sus poblaciones. Bajo este contexto, los marcadores moleculares constituyen una herramienta poderosa para analizar la historia evolutiva de las especies, estructura poblacional y conectividad; a la vez que proveen información importante para el establecimiento de mejores programas de manejo y conservación (Awise, 1998).

Análisis genéticos utilizando marcadores moleculares, alozimas y RFLP del ADN mitocondrial, proveen evidencia de un flujo genético restringido entre poblaciones de *Centropomus undecimalis* de la costa Atlántica de Florida y el Golfo de México (Tringali & Leber, 1999). En un estudio más reciente, utilizando gen 16S del ADN mitocondrial y microsatélites, se encontró que poblaciones de *C. poeyi* y *C. paralellus*, que habitan en la costa de Texas exhiben patrones de

hibridación e introgresión. Además, las poblaciones de *C. undecimalis* presentaron homocigosidad elevada consistente con una alta endogamia (González, 2015).

La Autoridad de Recursos Acuáticos de Panamá (ARAP) ha catalogado a los róbalos como un recurso importante en la pesca artesanal, comercial y deportiva. Sin embargo, no existe un plan de manejo y conservación para estas especies. Los róbalos capturados suelen ser catalogados como un solo grupo y no se toma en consideración el estado de genético de cada una de las especies (ARAP, 2011). Las capturas de estos peces representan cerca del 6% de las especies que llegan al Mercado de Mariscos de la Ciudad de Panamá (Vergara-Chen, 2014). A pesar de no ser un porcentaje alto, cuando se compara con los volúmenes de captura de corvinas y pargos, Vega (2004) indica que *Centropomus armatus* es una de las especies más capturadas en estuarios y desembocaduras de ríos en el Golfo de Montijo, por lo que el estado actual de las poblaciones de *C. armatus* en el Pacífico de Panamá es desconocido. Debido al alto volumen de captura de esta especie en algunos mercados y puertos del país, se decidió tomar a la especie *C. armatus* como nuestro objeto de estudio (Fig. 1).

Este estudio proporcionará información importante y novedosa sobre la diversidad genética y estructura poblacional del pez *C. armatus* en el Pacífico de Panamá, permitiendo definir la estructura poblacional de esta especie de

importancia ecológica o comercial, información útil para la conservación y manejo de sus pesquerías.

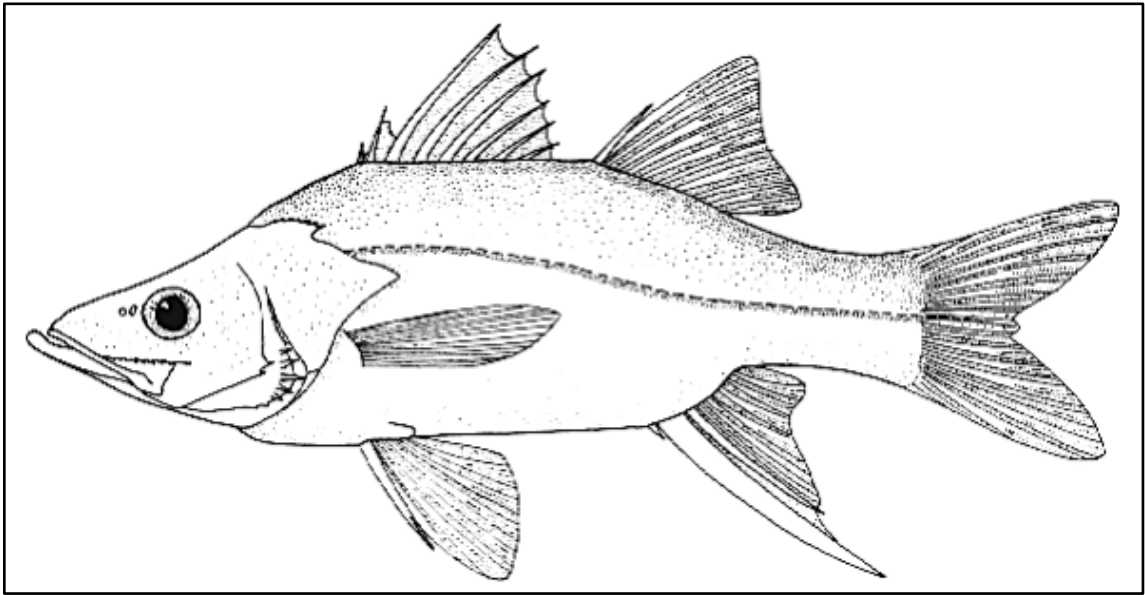


Fig. 1. Imagen ilustrativa de la especie *Centropomus armatus*. Tomada de la Guía FAO para identificación de especies para fines de pesca Bussing (1995).

C. Hipótesis de trabajo y objetivos de la investigación.

Para este trabajo se planteó la hipótesis de que las poblaciones de *Centropomus armatus* poseen una diversidad genética elevada, debido a la gran capacidad adaptativa de los róbalo a las fluctuaciones ambientales constantes que ocurren en los ecosistemas estuarinos del Pacífico de Panamá. Al mismo tiempo, la influencia que tienen las corrientes marinas y la discontinuidad de hábitat sobre

el flujo génico en las poblaciones naturales, se espera encontrar que existe una estructura poblacional a pequeña escala definida en las localidades naturales de *C. armatus* muestreadas.

Para probar estas hipótesis, el objetivo principal de este trabajo fue inferir la diversidad y estructura genética de las poblaciones mediante el análisis de secuencias de un fragmento del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) del ADN mitocondrial, a partir de los cálculos de diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica, polimorfismo, divergencia en las secuencias de ADN entre haplotipos, divergencia de las secuencias de ADN entre individuos y análisis de neutralidad.

CAPÍTULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En la actualidad, es común la utilización de técnicas moleculares en estudios poblacionales y filogenéticos. Sin embargo, el desarrollo de estas nuevas metodologías no hubiera sido posible sin el descubrimiento de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) por Mullis *et al.* (1987), esta técnica permite a los investigadores realizar miles de copias a partir de una pequeña muestra de ADN. La PCR revolucionó la investigación científica en el campo de la genética humana, pero es un procedimiento que puede ser aplicado en todos los organismos vivientes. Tal fue su éxito, que logro impulsar el desarrollo de nuevas disciplinas como la ecología molecular marina (Burton, 1996).

La técnica de PCR en conjunto con el desarrollo de marcadores moleculares (proteínas, ADN nuclear y ADN mitocondrial) han sido utilizados para resolver preguntas relacionadas con la evolución de las especies, distribución y diversidad genética de las poblaciones, identificación molecular de especies crípticas, resolver incertidumbres taxonómicas, que no pueden ser dilucidadas meramente por la información morfológica (Valentini *et al.*, 2009; Avise, 2012; Angeletti *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017).

En las últimas décadas, los avances en la biología molecular (e.g. desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación) han impulsado la evolución de nuevos marcadores moleculares, los cuales prometen ser menos costosos y producir una extensa biblioteca de información genética, incluyendo regiones altamente polimórficas del genoma nuclear (Schulman, 2007). No obstante, estos datos pueden ser confusos al momento de hacer comparaciones de genes nucleares los cuales presentan muchas mutaciones, una herencia biparental, eventos de recombinación productos de los genomas parentales que causan cambios generacionales. Existen otros organelos que contienen información nucleotídica: las mitocondrias, presentes en todas las células eucarióticas, conteniendo su propio genoma: el ADN mitocondrial (Schlötterer, 2004).

A. Generalidades sobre las mitocondrias

1. La mitocondria: un organelo celular importante

La importancia de las mitocondrias reside principalmente en la función que realizan para la célula. Se les suele llamar central energética, en virtud de las actividades que realizan en la producción de ATP. El número de mitocondrias presentes en una célula eucariota puede variar de unos pocos cientos a miles, dependiendo de la actividad fisiológica que realice la célula en cuestión. Así tenemos que, las células que utilizan

grandes cantidades de ATP tendrán un mayor número de mitocondrias (e.g. células musculares, hepatocitos, etc.).

Las mitocondrias están limitadas por dos membranas, una externa lisa y una interna con pliegues complejos (crestas) en los que se llevan a cabo las reacciones químicas de la respiración celular aeróbica. Las mitocondrias tienen la capacidad de autorreplicarse dependiendo de la cantidad de energía que la célula demande. (Tortora & Derrickson, 2008).

2. Organización y características del genoma mitocondrial

Cada mitocondria tiene múltiples copias idénticas de una molécula circular de ADN de doble cadena. En humanos, se ha reportado que la cadena de ADNmt tiene aproximadamente 16.5 kb y el genoma está conformado por 37 genes (Taanman, 1999).

A diferencia del ADN nuclear, en el genoma mitocondrial los genes se encuentran uno a continuación del otro, por lo que casi no hay intrones ni regiones no codificantes. Casi todos los genes mitocondriales son codificantes, excepto por la región control, lugar donde se origina la replicación.

El ADNmt codifica para 13 polipéptidos, 22 ARN de transferencia (ARNt) y 2 ARN ribosomales (ARNr). De acuerdo con la organización genética del ADNmt, los genes codificantes de ARNt se localizan entre los genes del ARNr y los genes codificantes de proteínas, dicha distribución juega un papel fundamental en el procesamiento del ARN (Taanman, 1999).

B. Importancia del ADN mitocondrial en el estudio de las poblaciones.

El análisis del ADNmt ha sido una herramienta esencial en el entendimiento de la evolución de las especies. Esto debido a características como, su alto número de copias, facilidad para obtener el ADN genómico, recombinación limitada, altos niveles de sustitución y su herencia materna (Brown *et al.*, 1979; Giles *et al.*, 1980; Ingman *et al.*, 2000).

Innumerables estudios filogenéticos se han realizado mediante la secuenciación del ADNmt. Para muchas especies (incluyendo peces óseos) ha sido posible secuenciar el genoma mitocondrial completo, lo que ha permitido a los científicos estudiar los procesos evolutivos por los cuales pasaron dichas poblaciones en el pasado, así como posibles procesos de especiación reciente e identificación de nuevas especies (Miya & Nishida, 1999; Yamanoue *et al.*, 2006; Prosdocimi *et al.*, 2011; Iwasaki *et al.*, 2013;

Adrian-Kalchhauser *et al.*, 2017). Adicionalmente, la secuenciación del genoma mitocondrial completo ha podido estudiar la eficacia de distintos marcadores mitocondriales, para dilucidar interrogantes relacionadas con el estudio poblacional (Billington & Hebert, 1991; Prodocimo *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2012; Zheng & Yang, 2018).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

A. Recolecta de muestras y Extracción de ADN

Las recolectas del róbalo *Centropomus armatus* se realizaron en cinco localidades del Pacífico de Panamá: (a) Golfo de Chiriquí: Puerto Armuelles (AC), Puerto Pedregal (PC) y Veraguas (VC); (b) Golfo de Panamá: Río Hato (RC), Puerto de Coquira (CC) (Fig. 2). Estos sitios fueron escogidos con el objetivo de obtener muestras representativas a lo largo de la costa y analizar la variabilidad genética a pequeña escala. En la tabla 1, se muestran los sitios de colecta y número de muestras obtenidas en cada localidad.

Tabla 1. Sitios de muestro de *C. armatus* en el Pacífico de Panamá.

Localidad	Coordenadas	Tamaño de muestra
Puerto Armuelles	8°15'49.57" N 82°51'13.25" W	21
Puerto Pedregal	8°18'33.71" N 82°26'42.92" W	34
Veraguas	7°55'35.50" N 81°03'15.82" W	48
Río Hato	8°22'20.61" N 80°05'11.96" W	21
Puerto de Coquira	9°00'24.43" N 79°06'08.51" W	45

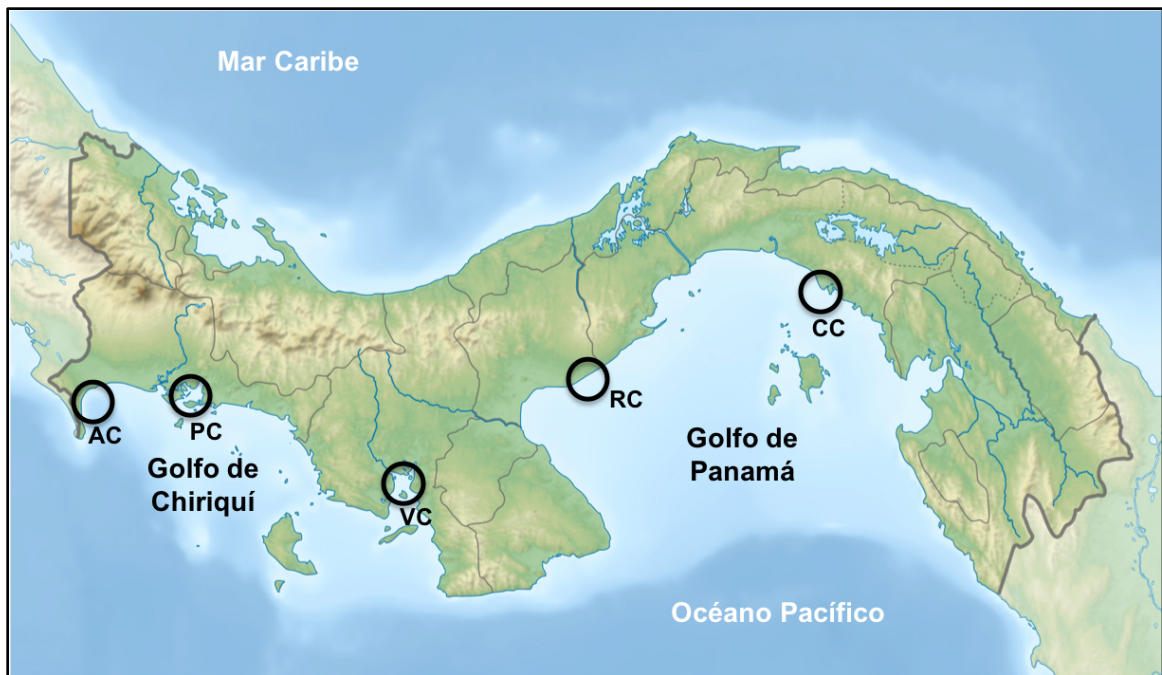


Fig. 2. Sitios de muestreo en cinco localidades de la costa del Pacífico de Panamá. **AC:** Puerto Armuelles, **PC:** Puerto Pedregal, **VC:** Veraguas, **RC:** Rio Hato, **CC:** Puerto de Coquira.

Se tomaron muestras de aleta caudal de cada espécimen, las cuales fueron inmediatamente conservadas en etanol absoluto de uso molecular (Sigma-Aldrich, Alemania) y almacenadas a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el proceso de extracción de ADN (Fig. 3). La extracción del ADN genómico de los tejidos recolectados se realizó mediante el uso de una solución que contenía tampón de lisis y la enzima proteinasa K para la digestión. En el siguiente paso, se separó el ADN de las proteínas mediante precipitación utilizando una solución de acetato de amonio. Por último, el ADN puro se obtuvo mediante precipitación por alcoholes

(Sambrook & Russell, 2001). El precipitado de ADN genómico posteriormente fue rehidratado y se midió su concentración utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™, Estados Unidos). El ADN extraído fue almacenado nuevamente a -20 °C hasta su uso para las pruebas de amplificación.



Fig. 3. Fotografía del róbalo *Centropomus armatus*. Tomada por: Olga Vásquez.

B. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Secuenciación

Las secuencias de un fragmento codificante del gen citocromo oxidasa subunidad I (COI) del ADN mitocondrial fueron amplificadas mediante el uso del siguiente par de cebadores (Ward, 2005):

COI-FishF2 5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3'

COI-FishR2 5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'

La PCR se llevó a cabo en el termociclador TaKaRa Dice™ TP650 (Takara Bio Inc., Japón); y el volumen final de la reacción fue de 25 µL, la misma incluía los siguientes reactivos (Ward, 2005):

- 2.5 µL Buffer (10X/15 mM MgCl₂)
- 0.25 µL de cada primer (10 µM)
- 1.0 µL MgCl₂ (25 mM)
- 0.125 µL Taq ADN polimerasa (5 U)
- 0.5 µL dNTPs (10 mM)
- 2.5 µL ADN (50 ng/µL)

Las reacciones de PCR para el gen COI se realizaron bajo las siguientes condiciones de temperatura (Ward, 2005):

- Un período de desnaturalización inicial a 94 °C durante 4 minutos.
- 35 ciclos compuestos de:
 - Una fase rápida de desnaturalización a 94 °C por 60 segundos.
 - Seguido por la fase de alineamiento a 55 °C por 60 segundos.
 - Finalizando con una fase de extensión a 72 °C por 90 segundos.
- Adicionalmente, una fase de extensión final a 72 °C por 10 minutos.

Posterior a la amplificación, todos los productos de PCR fueron verificados en geles de agarosa de 1.2% (TAE 1X) conteniendo bromuro de etidio. Los productos de PCR positivos fueron purificados utilizando el kit de limpieza enzimática Illustra ExoProStar 1-step (GE Healthcare Life Sciences) siguiendo el protocolo del fabricante, para liberar los fragmentos amplificados del exceso de

cebadores y nucleótidos. La secuenciación de los fragmentos amplificados utilizando el método Sanger y fue realizada por la compañía MacroGen Corp. (Maryland, Estados Unidos).

C. Análisis de datos

Las secuencias obtenidas del fragmento del gen mitocondrial COI fueron editadas y alineadas utilizando el algoritmo ClustalW en el programa BioEdit v.7.2.5 (Hall, 1999).

a) Diversidad genética

Los índices de diversidad genética, incluyendo el número de sitios polimórficos (N_s), la diversidad haplotípica (H_d), nucleotídica (π) y número de haplotipos (N_h) fueron calculados para cada una de las poblaciones geográficas, utilizando el método de Nei (1987) en el programa DnaSP 5.10.01 (Rozas *et al.*, 2003). Las relaciones entre los haplotipos obtenidos fueron inferidas utilizando el método MSN (*Minimum spanning network*) (Bandelt, Forster & Röhl, 1999) y la red de haplotipos fue generada utilizando el programa PopART (Leigh & Bryant, 2015).

b) Estructura genética

La diferenciación genética de las poblaciones fue evaluada a través del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) utilizando el programa Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Para el análisis del AMOVA se determinaron dos grupos Golfo de Panamá y Golfo de Chiriquí. Se realizó de esta manera, debido a que ambos golfos presentan características oceanográficas distintas, e.g. el fenómeno de afloramiento, temperatura y salinidad (Kwiecinski & Chial, 1983).

Para medir el efecto de los cambios demográficos sobre las secuencias de ADN de la población, se realizó la prueba de neutralidad utilizando los índices estadísticos D de Tajima (Tajima, 1989) y F de Fu (Fu, 1997). Estos permitieron investigar las desviaciones de la neutralidad, así como la expansión de la población. Los análisis de distribución del desajuste de diferencias por pares (*Mismatch*) y neutralidad también se realizaron con el programa Arlequin v.3.5.2.2. (Excoffier & Lischer, 2010).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

A. Diversidad genética.

De las 169 muestras procesadas, se utilizaron 137 secuencias del gen COI para realizar los análisis correspondientes al estudio poblacional. El resto de las secuencias no pudo ser utilizado debido a una baja calidad en el ADN extraído. Posterior al alineamiento y edición, el fragmento parcial del gen COI tuvo una longitud total de 592 pb, donde el promedio de las frecuencias nucleotídicas de A, T, G y C fue de 24.68%, 30.40%, 13.20% y 31.72%, respectivamente.

Entre las 137 secuencias de las cinco muestras geográficas de *Centropomus armatus*, se identificaron 21 haplotipos, de los cuales siete están presentes en la muestra de Puerto Armuelles (AC), seis en Puerto Pedregal (PC), cinco en Veraguas (VC), cuatro en Rio Hato (RC) y siete en Coquira (CC). Estos haplotipos variaron en 158 sitios polimórficos. Los haplotipos más comunes fueron: haplotipo_2 (H2) (83 individuos, 60.6% del total de individuos), H8 (19, 13.9%) y H4 (14, 10.2%). Más de la mitad de los haplotipos (16 de 21) fueron únicos para sus respectivas muestras geográficas (Fig. 4).

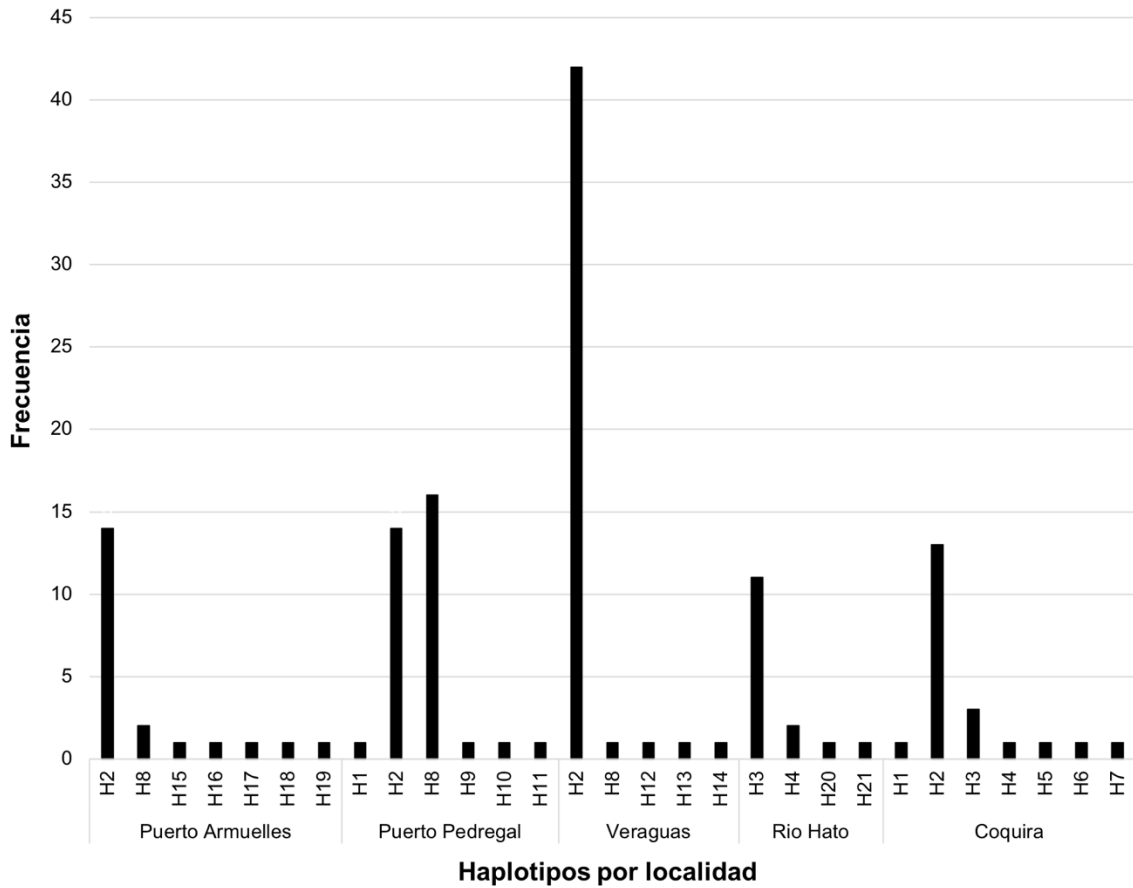


Fig. 4. Frecuencias haplotípicas para *Centropomus armatus* utilizando el marcador mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI), en cinco sitios muestreados en el Pacífico de Panamá.

La diversidad haplotípica (H_d) con COI mostró valores moderados, con un promedio de 0.6062, mientras que la diversidad nucleotídica (π) alta, con un promedio de 0.0639 (Tabla 2). La muestra de PC tuvo la diversidad haplotípica y nucleotídica más alta ($H_d = 0.6239$, $\pi = 0.0854$); y los valores más bajos se registraron en la muestra de VC ($H_d = 0.1681$, $\pi = 0.0073$).

Tabla 2. Índices de diversidad genética de *Centropomus armatus* basados en las secuencias de un segmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI).

Localidad	N	Ns	Nh	Hd	π
AC	21	121	7	0.5619	0.0377
PC	34	129	6	0.6239	0.0854
VC	46	97	5	0.1681	0,0073
RC	15	3	4	0.4668	0.0009
CC	21	119	7	0.6143	0.0499
Totales	137	158	21	0.6062	0.0639

N: número de individuos por población; Ns: número de sitios segregantes; Nh: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica; π : diversidad nucleotídica. **AC**: Puerto Armuelles, **PC**: Puerto Pedregal, **VC**: Veraguas, **RC**: Rio Hato, **CC**: Puerto de Coquira.

B. Estructura genética.

La estructura genética de la población de róbalo fue estudiada mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA). Para ello, las secuencias fueron separadas en dos grupos. En el primero se incluyeron las secuencias de las localidades Coquira y Rio Hato, las cuales corresponden al Golfo de Panamá; y en el segundo grupo a las localidades de Veraguas, Puerto Pedregal y Puerto Armuelles, correspondientes al Golfo de Chiriquí.

Los resultados del AMOVA revelaron que no existe diferencia genética significativa entre los grupos de *C. armatus* del Golfo de Panamá y los del Golfo de Chiriquí (COI $F_{CT} = 0.149$, $P > 0.05$). Por lo tanto, no hay una estructuración genética de la población. El análisis también reflejó un bajo porcentaje de variación entre grupos (14.88%), mientras que el mayor porcentaje de la variación genética se encuentra dentro de cada población, con un 48% (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las secuencias de *Centropomus armatus*, utilizando el marcador mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI).

Fuente de la Variación	<i>d.f.</i>	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Índices de fijación
Entre grupos	1	385.242	3.365 Va	14.88	$F_{CT}^a=0.149$
Entre poblaciones dentro de cada grupo	3	719.199	8.400 Vb	37.12	$F_{SC}^b=0.436$
Dentro de cada población	132	1433.647	10.861 Vc	48.00	$F_{ST}^c=0.520$
Total	136	2538.088	22.627		

Esta alta variabilidad fue estudiada posteriormente mediante un análisis de diferenciación genética F_{st} . De acuerdo con los valores de F_{st} obtenidos, existen diferencias significativas entre casi todas las muestras geográficas (Tabla 4). La

primera se deriva de la comparación entre la localidad de Puerto Armuelles (AC) con Puerto Pedregal (PC) y Río Hato (RC); al comparar la muestra de Puerto Pedregal (PC) con Veraguas (VC), Río Hato (RC) y Coquira (CC) también se encontraron diferencias significativas. De igual manera se registró diferencias entre la muestra de Veraguas (VC), Río Hato (RC) y Coquira (CC); y por último, el análisis también detectó diferencias entre Río Hato (RC) y Coquira (CC). Sin embargo, al comparar la muestra de Puerto Armuelles (AC) con las de Veraguas (VC) y Coquira CC no se obtuvieron valores significativos, indicando la existencia de un flujo génico entre estas localidades ($P > 0.05$).

Tabla 4. Índices de fijación (F_{st}) entre muestras geográficas de *Centropomus armatus* en el Pacífico de Panamá.

Localidades	AC	PC	VC	RC	CC
AC	0.00000				
PC	0.27013*	0.00000			
VC	0.02056	0.43417*	0.00000		
RC	0.80582*	0.66753*	0.95886*	0.00000	
CC	0.03080	0.29191*	0.14760*	0.67391*	0.00000

“*” $P < 0.05$. **AC:** Puerto Armuelles, **PC:** Puerto Pedregal, **VC:** Veraguas, **RC:** Río Hato, **CC:** Puerto de Coquira.

C. Test de neutralidad e historia demográfica.

Los valores obtenidos de los índices D de Tajima y F_s de F_u para todas las poblaciones estudiadas resultaron en valores negativos. La mayoría de las poblaciones no muestran diferencias significativas ($P > 0.10$), por lo que la hipótesis nula de neutralidad no puede rechazarse, indicando que posiblemente estas poblaciones no han tenido cambios en el tamaño de sus poblaciones. De esta manera, existiría un equilibrio neutral en el cual la mayoría de los cambios evolutivos ocurren por deriva genética y no están bajo presiones de selección. Sin embargo, los valores para la muestra de Veraguas (VC) sí mostraron diferencias significativas ($D: P < 0.001$; $F_s: P < 0.02$), esto puede ser indicativo de que esta localidad ha pasado por procesos de expansión, posiblemente posterior a un evento cuello de botella, donde el alto número de haplotipos únicos puede ser evidencia de esto (Tabla 5).

Los análisis de distribución del desajuste de diferencias por pares (frecuencias de diferencias por pares de haplotipos) se realizaron para explorar la historia demográfica de las poblaciones estudiadas. Este método asume que el crecimiento o reducción del tamaño poblacional deja señales distintivas en las secuencias de ADN en comparación con poblaciones cuyo tamaño poblacional es constante.

Tabla 5. Test de neutralidad con base en los índices D de Tajima y estadístico F_s de F_U , obtenidos a partir de datos de un fragmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) de muestras de *Centropomus armatus* del Pacífico de Panamá.

	AC	PC	VC	RC	CC
D Tajima	-1.53726	1.41481	-2.89888	-1.31654	-0.75918
$P(D$ Tajima)	$P > 0.10$	$P > 0.10$	$P < 0.001^{***}$	$P > 0.10$	$P > 0.10$
$F_U'F_s$	-0.37884	-0.04130	-6.38411	-1.30356	-1.60503
$P(F_U'S)$	$P > 0.10$	$P > 0.10$	$P < 0.02^{**}$	$P > 0.10$	$P > 0.10$

“*” $P < 0.05$. **AC:** Puerto Armuelles, **PC:** Puerto Pedregal, **VC:** Veraguas, **RC:** Río Hato, **CC:** Puerto de Coquira.

De acuerdo con los modelos de distribución poblacional propuestos por Patarnello *et al.* (2007). Las muestras de AC, PC y CC presentan una distribución bimodal. Este tipo de distribución usualmente está relacionado con un tamaño poblacional constante, mientras que las muestras de VC y RC parecen presentar una distribución unimodal, la cual está asociada con eventos repentinos de expansión (Fig. 5).

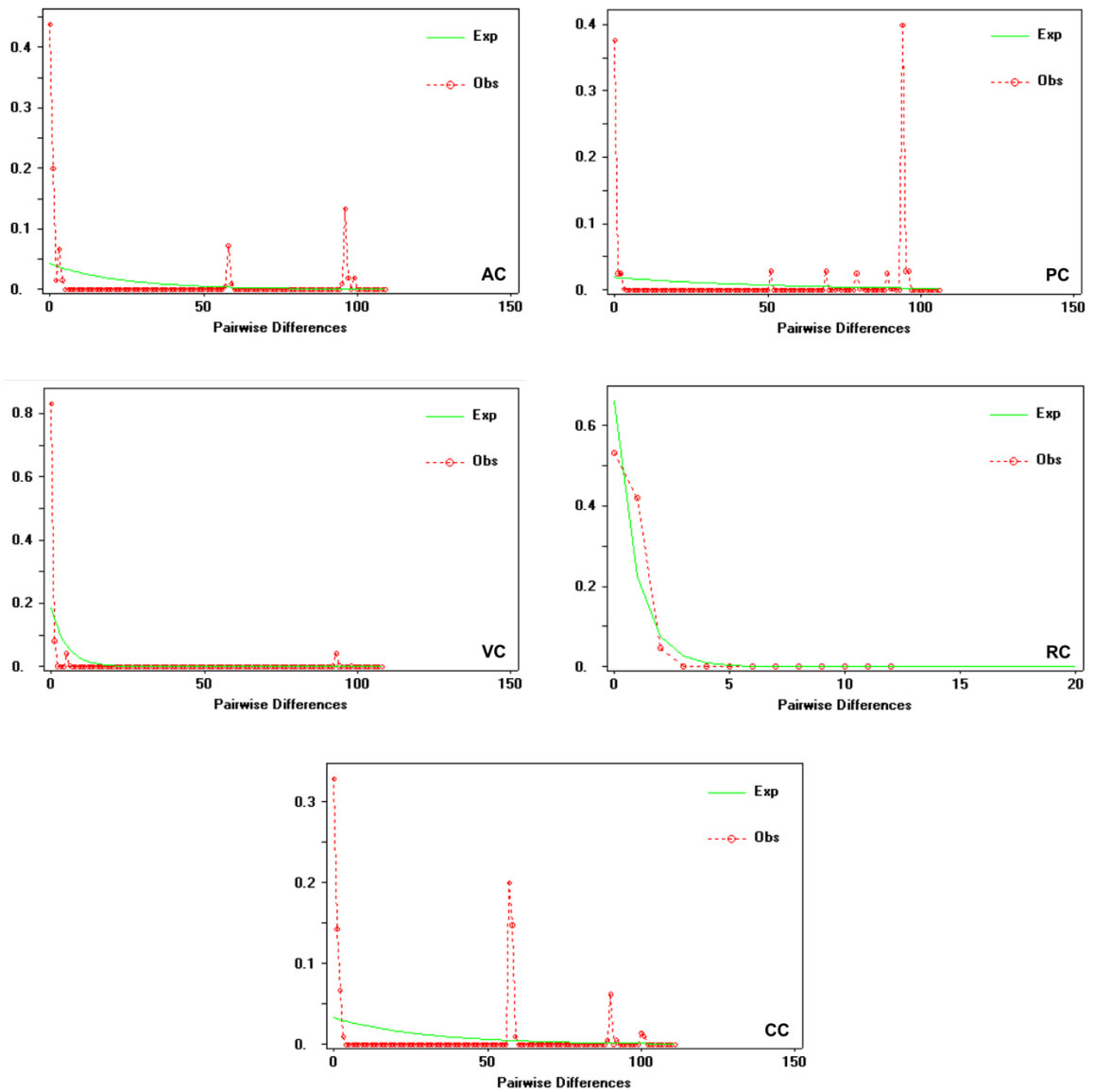


Fig. 5. Distribución de diferencias por pares de haplotipos para las cinco muestras geográficas de *Centropomus armatus* estudiadas en el Pacífico de Panamá, obtenida a partir datos de secuencias un segmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI).

La red de haplotipos se construyó con el objetivo de ilustrar las relaciones evolutivas entre las secuencias estudiadas. Los resultados revelan una distribución casi en forma de estrella, caracterizada por un alto número de haplotipos únicos rodeando un haplotipo central abundante. El haplotipo dominante (H2) representa el 60.6% del total de individuos muestreados y está presente en casi todas las poblaciones, excepto por Río Hato. Los otros dos grupos de haplotipos que se observaron fueron los compartidos por las localidades de Pedregal, Puerto Armuelles y Veraguas (H8). Este haplotipo se encontró en 19 individuos del total muestreado (13.9%), esto permite inferir que existe un flujo génico mayor entre estas localidades, debido a su cercanía geográfica. Por otro lado, las muestras de Coquira y Río Hato también comparten un par de haplotipos, que no comparten con el resto de las muestras (H3 y H4). El H3 se encontró en 14 individuos, lo que representa un 10.2% del total. Sin embargo, estas relaciones haplotípicas no son suficiente para indicar una estructura genética entre las poblaciones. Finalmente, observamos que la población de Puerto Armuelles es la que posee mayor número de haplotipos únicos (Fig. 6).

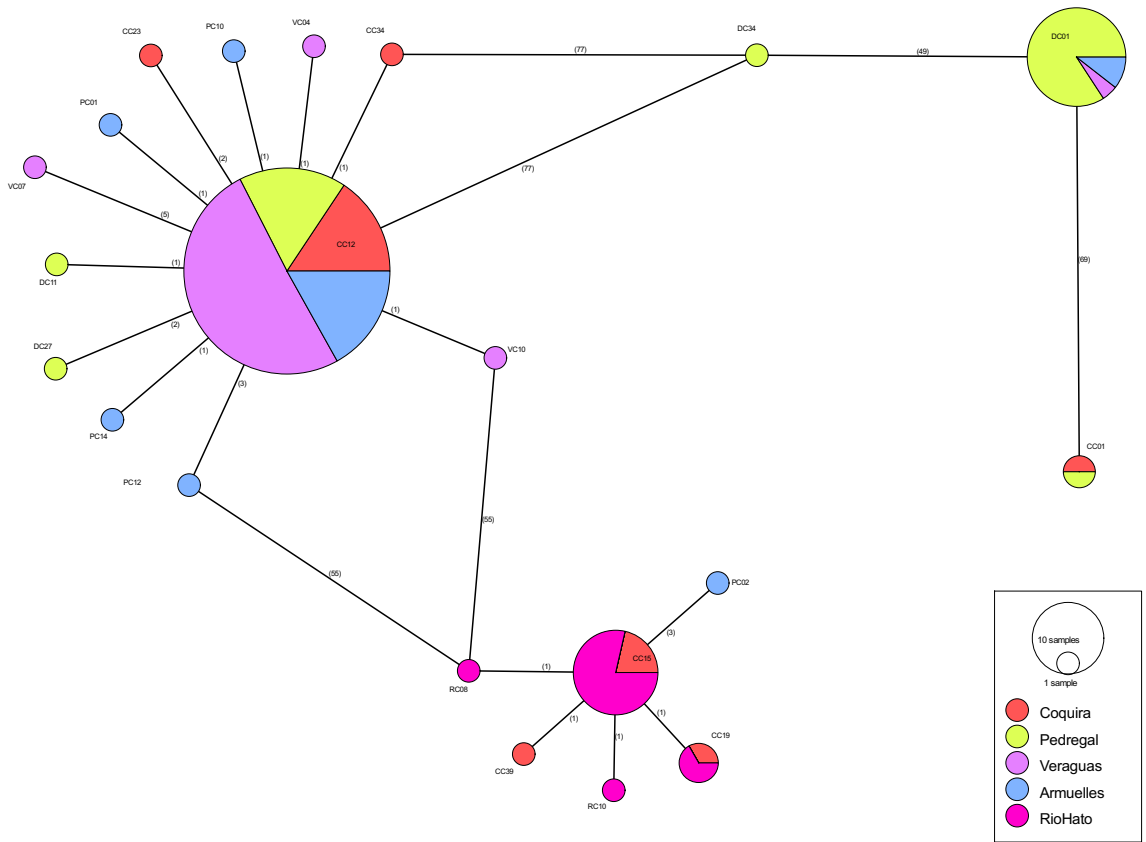


Fig. 6. Red haplotípica que muestra las relaciones genéticas entre los haplotipos detectados a partir de secuencias de un segmento del gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI) de *Centropomus armatus*. Cada círculo representa un haplotipo diferente y el tamaño de estos son proporcionales a la frecuencia haplotípica encontrada en las localidades muestreadas. Los números en paréntesis representan el número de mutaciones.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Las variaciones en las secuencias del gen mitocondrial COI han sido utilizadas para el análisis poblacional en varias especies de peces, especialmente por la eficacia de este marcador en la investigación de la diversidad genética y la estructura poblacional en peces marinos (Xu *et al.*, 2012; Healey *et al.*, 2017; Abbas *et al.*, 2018).

A. Diversidad genética.

En este estudio, se han encontrado 21 haplotipos en 137 individuos muestreados y 158 sitios segregantes (polimórficos) fueron detectados en secuencias de 592 pb del gen COI. Los resultados obtenidos indicaron que la diversidad haplotípica total para la población de *C. armatus* fue de 0.6062, indicando que el intercambio genético entre las distintas localidades muestreadas es moderado.

Grant & Bowen (1998) sugieren que los peces marinos pueden ser clasificados en cuatro categorías, de acuerdo con los valores obtenidos para la diversidad haplotípica y nucleotídica. Siguiendo los parámetros establecidos por los autores tenemos que, *C. armatus* se encuentra en la tercera categoría, ya que

la muestra presenta una diversidad haplotípica (H_d) de moderada a baja (**PC**: 0.6239; **VC**: 0.1681); mientras que para la diversidad nucleotídica (π) se obtuvieron valores de bajos a altos (**RC**: 0.0009; **PC**: 0.0854). Estos patrones son característicos de poblaciones con unos pocos haplotipos altamente divergentes. Esta condición puede ser el resultado de un fuerte cuello de botella sobre una población que solía ser grande y estable; o por el contacto secundario entre poblaciones aisladas. Dicho patrón ha sido reportado en peces que habitan en la zona costera (0 – 200 m de profundidad) sobre la plataforma continental (Burton, 1986; Planes & Doherty, 1997).

Factores históricos, actividad antropogénica, disponibilidad del hábitat y la baja tasa mutacional del genoma mitocondrial pueden influir sobre la diversidad genética (Zhang *et al.*, 2017). Los análisis filogenéticos realizados por Tringali *et al.* (1999), sugieren que *C. armatus* no tiene una especie gemela en el Atlántico, por lo que probablemente su especiación comenzó antes del surgimiento del Istmo. Adicionalmente, los autores mencionan que, debido a sus características morfológicas, e.g. pequeño tamaño y peso, esta especie forma parte del linaje más basal. Tomando en cuenta estos hallazgos filogenéticos y la amplia distribución actual de *C. armatus* (desde México hasta Ecuador) podríamos inferir que la creación de nuevos hábitats por causa del surgimiento del Istmo pudo reconectar poblaciones aisladas. Sin embargo, es necesario realizar muestreos más extensos, incluyendo mayor número de localidades y utilizar marcadores moleculares con diferentes tasas de mutación.

El comportamiento ecológico complejo de *C. armatus* también puede ser una causa del moderado intercambio genético entre las localidades muestreadas. Rivas (1986) reporta que esta especie está restringida a localidades donde existe un flujo de agua dulce constante, es decir estuarios y bahías cerca de desembocaduras de ríos. Por ello, la disponibilidad de un hábitat adecuado afecta directamente la diversidad genética de estas poblaciones. El comportamiento reproductivo de las especies de *Centropomus* también pueden ser un factor importante en la diversidad genética y la estructura de la población. Los estudios de Young *et al.* (2016) indican que la especie *C. undecimalis* tiene fidelidad por los sitios de desove y pueden retornar al mismo sitio hasta por cinco temporadas reproductivas consecutivas. También reportan que los individuos suelen permanecer cerca del sitio de desove principal incluso cuando no están en su época reproductiva.

Además, de la diversidad genética moderada, el gen COI nos permitió construir una red de haplotipos, en la cual pudimos analizar las relaciones entre los haplotipos encontrados en la población de *C. armatus*. En ella se observa la existencia de haplotipo común y dominante para cuatro de las cinco localidades y probablemente el más antiguo, y dos haplotipos divergentes que podrían estar asociados con la distribución geográfica de las localidades del Golfo de Chiriquí y el Golfo de Panamá. Sin embargo, esto no confirma que haya una estructuración en la población. Resultados similares fueron reportados en la especie estuarina

Nibeia albiflora (Xu *et al.*, 2012), otras de alto interés pesquero como *Thunnus albacares* (Li *et al.*, 2015) y *Caranx hippos* (Caiafa-Hernández *et al.*, 2018). En estos estudios, se sugiere que los resultados obtenidos con el gen COI pueden ayudar a inferir sobre la historia demográfica de las especies marinas. En este caso, aparentemente estas especies sufrieron una reducción drástica en el tamaño de sus poblaciones, evento conocido como cuello de botella; y posteriormente pasaron por un periodo de rápida expansión y crecimiento, lo que puede inferirse por la acumulación de pasos mutacionales entre algunos haplotipos.

Mediante los análisis de neutralidad y distribución del desajuste, hemos encontrado que *C. armatus* en las localidades muestreadas en el Pacífico de Panamá, excepto Veraguas y Rio Hato, no ha sufrido eventos que afecten drásticamente su tamaño poblacional, *i.e.* estas muestras geográficas han mantenido tamaños poblacionales constantes a lo largo de su historia demográfica. Los valores negativos significativos obtenidos a partir de los índices D de Tajima y F_s de F_U , para la localidad de Veraguas, en conjunto con la distribución unimodal (también presente en la localidad de Rio Hato) que presentó el gráfico de distribución del desajuste, son relacionados con una población con una reciente expansión, por ello el bajo número de haplotipos dominantes y haplotipos exclusivos (Xu *et al.*, 2012). La sobreexplotación del recurso pesquero también puede afectar negativamente la diversidad genética de las poblaciones,

y si se realiza de manera persistente puede incluso causar la extinción de la especie (Xu *et al.* 2012; Wang *et al.*, 2017).

B. Estructura genética.

La estructura genética de una población también puede verse influenciada por diversos factores como barreras geográficas, corrientes oceánicas, tiempos de reproducción, diferencias de hábitats, entre otros (Kelly & Palumbi, 2010; White *et al.*, 2010). En el caso particular de *C. armatus*, utilizando el análisis de varianza molecular (AMOVA), no se ha encontrado valores significativos que sugieran la existencia de una estructura genética en las muestras geográficas de *C. armatus* recolectadas en la costa del Pacífico panameño. El AMOVA sugiere que existe una conectividad entre las localidades muestreadas y que todas ellas forman un solo *stock* poblacional. Además de esto, el análisis calculó que la mayor diferenciación o varianza se encuentra dentro de cada localidad con un 48%, esto podría deberse al alto nivel de polimorfismo que presentaron las secuencias; mientras que la diferenciación entre los grupos de secuencias del Golfo de Chiriquí y Golfo de Panamá solo presentaron una variación del 14.88%, lo que apunta a que la Península de Azuero y la poca disponibilidad de hábitats estuarinos en esa zona, no representan un barrera para el intercambio de genes entre los individuos de las diferentes localidades. Esto podría deberse al gran potencial que tienen algunos peces marinos de dispersarse largas distancias entre cuerpos de agua o

a lo largo de la costa, ya sea durante el periodo de larva plantónica o adultos (Hewitt, 2000)

Aparte al análisis de AMOVA, se realizó un análisis de diferenciación genética calculando el F_{st} entre todas las localidades, y se encontró que en la mayoría de las localidades existe una alta variabilidad genética, incluso en aquellas localidades geográficamente cercanas. Este alto valor puede deberse a la gran cantidad de haplotipos únicos que se detectaron dentro de las mismas y a los pocos haplotipos compartidos (Xu *et al.*, 2012). Esto crea la interrogante sobre el estado real de la conectividad genética entre estas localidades. Para resolver esta pregunta sería necesario utilizar otro tipo de marcador molecular y aumentar el número de muestras por localidad, ya que en muchos casos el poder de resolución del AMOVA (*i.e.* la falta de significación) está relacionado con un bajo número de muestras (Fitzpatrick, 2009).

Otro resultado interesante fue la falta de diferenciación genética entre los individuos de las localidades de Puerto Armuelles, Veraguas y Coquira, a pesar de la gran distancia geográfica que existe entre ellas. Si bien no tenemos como confirmar la causa de ello, análisis posteriores podrían ayudarnos a comprender la historia evolutiva y expansión poblacional de esta especie. La poca diferenciación entre estas tres localidades podría estar relacionadas no solo con la falta de una barrera geográfica, sino también con una elevada capacidad de dispersión de individuos maduros y/o larvas, de una localidad a otra, con ayuda

de las corrientes marinas (Awise *et al.*, 1987; Hellberg *et al.*, 2002; Cowen & Sponaugle, 2009; Young *et al.*, 2016). Por otro lado, los individuos que componen las localidades de Pedregal y Rio Hato podrían estar presentando algún tipo de proceso de adaptación local relacionadas con las condiciones ambientales de los hábitats estuarinos (Luikart *et al.*, 2003; Schulte, 2007). Sin embargo, los análisis realizados empleando el gen COI no son suficientes para permitirnos explorar esta hipótesis.

A pesar de la poca información genética sobre las poblaciones de los róbalo, algunos estudios sobre este tema han contribuido con información novedosa para el entendimiento de estas especies. En 2008, Prodocimo *et al.*, realizaron estudios de genética poblacional en la especie *C. parallelus* a lo largo de la costa de Brasil. Utilizando un marcador mitocondrial (citocromo *b*) no encontraron evidencias que muestran una diferenciación genética entre las localidades estudiadas, sugiriendo la existencia de un alto flujo génico entre ellas. Sin embargo, proponen la importancia de aumentar el tamaño de la muestra e incluir otras localidades geográficas en el Atlántico Occidental. Esto debido a la posible expansión poblacional que experimentó esta especie durante su reciente historia evolutiva.

En un caso similar, Chapa (2012) realizó análisis de varianza molecular en poblaciones de *C. parallelus* y *C. undecimalis* de la costa de Texas, utilizando los marcadores mitocondriales 16S y región control, y no logró detectar diferencias

genéticas entre ellas, implicando la existencia de un alto flujo génico entre las localidades muestreadas. Posterior a esto, incluyeron secuencias de localidades fuera del Golfo de México (Florida y Costa Rica) y al comparar entre todas ellas, el AMOVA si detectó estructura poblacional significativa en *C. undecimales*, mas no para *C. parallelus*.

Los resultados encontrados nos permiten comprender lo que pudo haber ocurrido a lo largo de la historia evolutiva de *C. armatus*, incluyendo su expansión demográfica y posible adaptación a nuevos hábitats durante el surgimiento del Istmo de Panamá. Para poder comprender el estado actual de las poblaciones serán necesarias más investigaciones e incluir el uso de marcadores nucleares, así como el uso de nuevas técnicas moleculares, que nos permitan estudiar las poblaciones empleando tanto aproximaciones genéticas, como enfoques ecológicos.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A. Conclusiones

La diversidad genética de la especie *Centropomus armatus* inferida mediante análisis de secuencias del gen COI resultó ser moderada, con valores probablemente relacionados con los eventos históricos como la evolución de la especie y expansión demográfica de la misma, al colonizar nuevos hábitats. Asimismo, los niveles de diversidad genética podrían estar asociados a eventos que provocaron un drástico descenso en el tamaño de la población (cuello de botella), seguido de un rápido crecimiento poblacional, evidenciado en este estudio por la presencia de pocos haplotipos compartidos, así como haplotipos múltiples únicos y divergentes.

Las estimaciones sobre el grado de estructuración genética no fueron significativas, indicando la ausencia de diferenciación genética entre las muestras colectadas como consecuencia de barreras geográficas o ecológicas. Este resultado sugiere que las muestras de *C. armatus* del Golfo de Chiriquí y las del Golfo de Panamá constituyen una población panmíctica. Sin embargo, los valores de diferenciación genética (índices F_{st}) fueron significativos entre algunas de las poblaciones tales diferencias podrían estar impulsadas por la presencia de

haplotipos únicos en la población y el alto polimorfismo detectado en las secuencias del fragmento de COI estudiado.

B. Recomendaciones

Llevar a cabo análisis de diversidad genética utilizando otros marcadores mitocondriales como la región control, e incluir marcadores nucleares, que aporten información sobre el estado de diversidad actual de las poblaciones de *C. armatus*.

Aumentar el número de localidades y tamaño de muestra por grupo que permita obtener una mejor representación de toda la población. De ser posible, incluir muestras de distintas localidades en el Pacífico Oriental Tropical, debido a la amplia distribución de la especie.

Desarrollar una metodología que permita realizar comparaciones genéticas y fisiológicas con las condiciones del medio que habita la especie.

Además, es importante realizar un análisis filogenético de las especies de *Centropomus* que cohabitan en el Pacífico, debido a la poca información filogenética que hay en el grupo y serviría como base para resolver las incertidumbres taxonómicas que se generan debido a las similitudes morfológicas que comparten algunas especies de este género.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, E. M., Megahed, E. T., Hemeda, S. A., & FEI, A. (2018). DNA barcoding and molecular population structure of two species from genus *Diplodus* based on COI gene in the Egyptian Mediterranean Sea. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*; 6(1): 01-08.
- Adrian-Kalchhauser, I., Svensson, O., Kutschera, V. E., Rosenblad, M. A., Pippel, M., Winkler, S., ... & Burkhardt-Holm, P. (2017). The mitochondrial genome sequences of the round goby and the sand goby reveal patterns of recent evolution in gobiid fish. *BMC genomics*, 18(1), 177.
- Angeletti, D., Cimmaruta, R., Sebbio, C., Bellisario, B., Carere, C., & Nascetti, G. (2017). Environmental heterogeneity promotes microgeographic genetic divergence in the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Cyprinodontidae). *Ethology Ecology & Evolution*, 29(4), 367-386.
- ARAP. 2011. Guía de peces para la identificación de peces de interés comercial para el Pacífico de Panamá. Dirección General de Investigación y Desarrollo, Autoridad de Recursos Acuáticos de Panamá. Documento Técnico de Pesca. Ciudad de Panamá, Panamá. 93 pp.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 489-522.

- Avise, J. C. 1998. Conservation genetics in the marine realm. *Journal of Heredity*, 89:377-382.
- Avise, J. C. (2012). *Molecular markers, natural history and evolution*. Springer Science & Business Media.
- Bandelt, H. J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Billington, N., & Hebert, P. D. (1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(S1), 80-94.
- Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1967-1971.
- Burton, R. S. (1986). Evolutionary consequences of restricted gene flow among natural populations of the copepod, *Trigriopus californicus*. *Bulletin of Marine Science*, 39(2), 526-535.
- Burton, R. S. (1996). Molecular tools in marine ecology. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200(1-2), 85-101.
- Bussing, W. A. (1995). Centropomidae. Robalos. Guía FAO para Identificación de Especies para los Fines de la Pesca, 3, 987-995.
- Caiafa-Hernández, I., Narváez-Barandica, J., & Acero-Pizarro, A. (2018). Genetic variation and genetic structure of *Caranx hippos* (Teleostei: Carangidae) in the Colombian Caribbean. *Revista de Biología Tropical*, 66(1), 122-135.

- Castro-Aguirre, J. L. 1999. Ictiofauna estuarino-lagunar y vicaria de México. Editorial Limusa S.A. de C.V. 629 pp.
- Chapa, C. (2012). Early Life History and Resurgence of Snook (Family Centropomidae) in Texas (Doctoral dissertation, Texas A & M University).
- Cilleros, K., Valentini, A., Allard, L., Dejean, T., Etienne, R., Grenouillet, G., ... & Brosse, S. (2018). Unlocking biodiversity and conservation studies in high diversity environments using environmental DNA (eDNA): a test with Guianese freshwater fishes. *Molecular ecology resources*.
- Cowen, R. K., & Sponaugle, S. (2009). Larval dispersal and marine population connectivity. *Annu. Rev. Mar. Sci.* 1:443–66
- Duong, T. Y., & Scribner, K. T. (2018). Regional variation in genetic diversity between wild and cultured populations of bighead catfish (*Clarias macrocephalus*) in the Mekong Delta. *Fisheries Research*, 207, 118-125.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.
- Fitzpatrick, B. M. (2009). Power and sample size for nested analysis of molecular variance. *Molecular Ecology*, 18(19), 3961-3966.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National academy of Sciences*, 77(11), 6715-6719.

- Gilmore, R. G., Donohoe, C. J., & Cooke, D. W. (1983). Observations on the distribution and biology of east-central Florida populations of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Florida Scientist*, 313-336.
- Gong, J., Zhao, R., Deng, J., Zhao, Y., Zuo, J., Huang, L., & Jing, M. (2018). Genetic diversity and population structure of penis fish (*Urechis unicinctus*) based on mitochondrial and nuclear gene markers. *Mitochondrial DNA Part A*, 1-8.
- González, A. (2015). Population genetic structure of the crashed snook fishery (*Centropomus spp.*) (Doctoral dissertation).
- Grant, W. A. S., & Bowen, B. W. (1998). Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of heredity*, 89(5), 415-426.
- Gross, M. R. (1987). Evolution of diadromy in fishes. In American fisheries society symposium (Vol. 1, pp. 14-25).
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). London: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Healey, A. J., McKeown, N. J., Taylor, A. L., Provan, J., Sauer, W., Gouws, G., & Shaw, P. W. (2018). Cryptic species and parallel genetic structuring in Lethrinid fish: Implications for conservation and management in the southwest *Indian Ocean*. *Ecology and evolution*, 8(4), 2182-2195.
- Helfman, G., Collette, B. B., Facey, D. E., & Bowen, B. W. (2009). *The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology*. John Wiley & Sons.

- Hellberg, M. E., Burton, R. S., Neigel, J. E., & Palumbi, S. R. (2002). Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of marine science*, 70(1), 273-290.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907.
- Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S., & Gyllensten, U. (2000). Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature*, 408(6813), 708.
- Ito, H., Ishikawa, Y., Yoshimoto, M., & Yamamoto, N. (2007). Diversity of brain morphology in teleosts: brain and ecological niche. *Brain, Behavior and Evolution*, 69(2), 76-86.
- Iwasaki, W., Fukunaga, T., Isagozawa, R., Yamada, K., Maeda, Y., Satoh, T. P., ... & Nishida, M. (2013). MitoFish and MitoAnnotator: A mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline. *Molecular biology and evolution*, 30(11), 2531-2540.
- Keenleyside, M. H. (2012). *Diversity and adaptation in fish behaviour* (Vol. 11). Springer Science & Business Media.
- Kelly, R. P., & Palumbi, S. R. (2010). Genetic structure among 50 species of the northeastern Pacific rocky intertidal community. *PLoS One*, 5(1), e8594.
- Kwiecinski, B., & Chial, B. (1983). Algunos aspectos de la oceanografía del Golfo de Chiriquí, su comparación con el Golfo de Panamá. *Revista de Biología Tropical*, 31(2), 323-235.
- Leigh, JW, Bryant D (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol Evol* 6(9):1110–1116.

- Li, C., Ricardo, B. R., Smith, W. L., & Ortí, G. (2011). Monophyly and interrelationships of Snook and Barramundi (Centropomidae sensu Greenwood) and five new markers for fish phylogenetics. *Molecular phylogenetics and evolution*, 60(3), 463-471.
- Li, W., Chen, X., Xu, Q., Zhu, J., Dai, X., & Xu, L. (2015). Genetic population structure of *Thunnus albacares* in the Central Pacific Ocean based on mtDNA COI gene sequences. *Biochemical genetics*, 53(1-3), 8-22.
- Luikart, G., England, P. R., Tallmon, D., Jordan, S., & Taberlet, P. (2003). The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature reviews genetics*, 4(12), 981.
- McMichael Jr, R. H., Peters, K. M., & Parsons, G. R. (1989). Early life history of the snook, *Centropomus undecimalis*, in Tampa Bay, Florida. *Gulf of Mexico Science*, 10(2), 5.
- Miya, M., & Nishida, M. (1999). Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish, *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes. *Marine Biotechnology*, 1(5), 416-426.
- Moyle, P. B., & Moyle, P. R. (1995). Endangered fishes and economics: intergenerational obligations. *Environmental Biology of Fishes*, 43(1), 29-37.
- Mullis, K. B., Erlich, H. A., Arnheim, N., Horn, G. T., Saiki, R. K., & Scharf, S. J. (1987). *U.S. Patent No. 4,683,195*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University.
- Nelson, J. S. (2006). *Fishes of the World*. (John Wiley & Sons: Hoboken, NJ.).

- Patarnello, T., Volckaert, F. A., & Castilho, R. (2007). Pillars of Hercules: is the Atlantic–Mediterranean transition a phylogeographical break?. *Molecular ecology*, *16*(21), 4426-4444.
- Pinsky, M. L., & Palumbi, S. R. (2014). Meta-analysis reveals lower genetic diversity in overfished populations. *Molecular Ecology*, *23*(1), 29-39.
- Planes, S., & Doherty, P. J. (1997). Genetic and color interactions at a contact zone of *Acanthochromis polyacanthus*: a marine fish lacking pelagic larvae. *Evolution*, *51*(4), 1232-1243.
- Prodocimo, V., Tscha, M. K., Pie, M. R., Oliveira-Neto, J. F., Ostrensky, A., & Boeger, W. A. (2008). Lack of genetic differentiation in the fat snook *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae) along the Brazilian coast. *Journal of Fish Biology*, *73*(8), 2075-2082.
- Prodocimi, F., de Carvalho, D. C., de Almeida, R. N., & Beheregaray, L. B. (2012). The complete mitochondrial genome of two recently derived species of the fish genus *Nannoperca* (Perciformes, Percichthyidae). *Molecular biology reports*, *39*(3), 2767-2772.
- Rivas, L. R. (1986). Systematic review of the perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia*, 579-611.
- Robles, Y. & Vega, A.J. (2004). Caracterización física, química y biológica de la parte media-baja del río Santa María, Veraguas, Panamá. *Tecnociencia*, *6*(2): 75-89
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, *19*(18), 2496-2497.

- Salzburger, W., & Meyer, A. (2004). The species flocks of East African cichlid fishes: recent advances in molecular phylogenetics and population genetics. *Naturwissenschaften*, 91(6), 277-290.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Tercera Edición. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers—just a matter of fashion?. *Nature reviews genetics*, 5(1), 63.
- Schulman, A. H. (2007). Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica*, 158(3), 313-321.
- Schulte, P. M. (2007). Responses to environmental stressors in an estuarine fish: Interacting stressors and the impacts of local adaptation. *Journal of Thermal Biology*, 32(3), 152-161.
- Smith, C. L. (1997). National Audubon Society field guide to tropical marine fishes of the Caribbean, the Gulf of Mexico, Florida, the Bahamas, and Bermuda. Alfred A. Knopf, Inc., New York. 720 pp
- Soares, D., & Niemiller, M. L. (2013). Sensory adaptations of fishes to subterranean environments. *Bioscience*, 63(4), 274-283.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- Taanman, J. W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1410(2), 103-123.

- Tortora, G. J., & Derrickson, B. H. (2008). *Principles of anatomy and physiology*. John Wiley & Sons.
- Tringali, M. D., Bert, T. M., Seyoum, S., Bermingham, E., & Bartolacci, D. (1999). Molecular phylogenetics and ecological diversification of the transisthmian fish genus *Centropomus* (Perciformes: Centropomidae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 13(1), 193-207.
- Valentini, A., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2009). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(2), 110-117.
- Vega, A. J. 2004. *Evaluación del recurso pesquero en el Golfo de Montijo*. Agencia española de Cooperación Internacional. Impresiones Marín, Panamá.
- Vergara-Chen, C. 2014. Los róbalo (Pisces, Centropomidae) del Pacífico de Panamá: desafíos emergentes en investigación y conservación. *Tecnociencia* (Panamá) 16(1): 15-40.
- Wang, W., Ma, C., Chen, W., Zhang, H., Kang, W., Ni, Y., & Ma, L. (2017). Population genetic diversity of Chinese sea bass (*Lateolabrax maculatus*) from southeast coastal regions of China based on mitochondrial COI gene sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 71, 114-120.
- Ward, R. D., Zemlak, T. S., Innes, B. H., Last, P. R., & Hebert, P. D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1847-1857.
- White, C., Selkoe, K. A., Watson, J., Siegel, D. A., Zacherl, D. C., & Toonen, R. J. (2010). Ocean currents help explain population genetic structure. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb20092214.

- Wright, J. M., & Bentzen, P. (1995). Microsatellites: genetic markers for the future. In *Molecular genetics in fisheries* (pp. 117-121). Springer, Dordrecht.
- Xu, D., Lou, B., Shi, H., Geng, Z., Li, S., & Zhang, Y. (2012). Genetic diversity and population structure of *Nibea albiflora* in the China Sea revealed by mitochondrial COI sequences. *Biochemical systematics and ecology*, *45*, 158-165.
- Yamanoue, Y., Miya, M., Inoue, J. G., Matsuura, K., & Nishida, M. (2006). The mitochondrial genome of spotted green pufferfish *Tetraodon nigroviridis* (Teleostei: Tetraodontiformes) and divergence time estimation among model organisms in fishes. *Genes & genetic systems*, *81*(1), 29-39.
- Young, J. M., Yeiser, B. G., Ault, E. R., Whittington, J. A., & Dutka-Gianelli, J. (2016). Spawning Site Fidelity, Catchment, and Dispersal of Common Snook along the East Coast of Florida. *Transactions of the American Fisheries Society*, *145*(2), 400-415.
- Zhang, Y., Yang, F., Wang, Z., You, Q., Lou, B., Xu, D., Chen, R., Zhan, W. and Liu, F. (2017). Mitochondrial DNA variation and population genetic structure in the small yellow croaker at the coast of Yellow Sea and East China Sea. *Biochemical Systematics and Ecology*, *71*, 236-243.