

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO  
USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

Estandarización de primers mitocondriales y nucleares para futuros análisis filogenéticos en la especie *Gonatodes caudiscutatus*.

**Erika Gabriela Villacreses Arauz**

**INGENIERIA EN PROCESOS BIOTECNOLOGICOS**

Trabajo de integración curricular presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Quito, 8 de enero de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Estandarización de primers mitocondriales y nucleares para futuros análisis filogenéticos en la especie *Gonatodes caudiscutatus*.

**ERIKA GABRIELA VILLACRESES ARAUZ**

**Calificación:**

\_\_\_\_\_

**Nombre del profesor, Título académico:** Maria Jose Pozo, MSc.

**Firma del profesor:**

\_\_\_\_\_

Quito, 8 de enero del 2020

## DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

\_\_\_\_\_

Nombres y apellidos:

Erika Gabriela Villacreses Arauz

Código:

00124663

Cédula de identidad:

1722558457

Lugar y fecha:

Quito, 8 de enero del 2020

## RESUMEN

*Gonatodes caudiscutatus* es una especie de gecko que habita en las tres regiones del Ecuador continental y ha sido introducida en las Islas Galápagos. La distribución de esta especie en el territorio ecuatoriano fue descrita anteriormente mediante el estudio de características morfológicas y morfométricas.

Actualmente, el desarrollo de métodos moleculares que analizan las secuencias de nucleótidos de ADN, ARN o aminoácidos son utilizados para entender mejor la filogenia de diversos grupos de especies. Estudios previos describen relaciones evolutivas del género *Gonatodes* mediante el uso de marcadores moleculares mitocondriales y nucleares.

El objetivo de esta investigación fue estandarizar las condiciones de amplificación mediante PCR para las regiones 16S y 12S de ADN mitocondrial y siete regiones de los genes nucleares C-mos, ACM-4, Rag2 y NT3 en muestras de geckos. Es importante establecer las condiciones óptimas de amplificación del ADN para obtener patrones confiables y reproducibles de los productos de PCR. Se realizó la extracción de ADN genómico de 5 muestras de geckos y posteriormente se amplificaron las regiones mitocondriales y nucleares previamente mencionadas utilizando primers específicos para cada región, de acuerdo a las condiciones reportadas en la literatura. Para dos regiones, 12S y C-mos, fue necesario optimizar las condiciones de PCR, por lo que se incrementó la temperatura de hibridación y se disminuyó la concentración de iones divalentes (MgCl<sub>2</sub>). Las condiciones reportadas para la amplificación de las regiones 16S, ACM-4, Rag2 y NT3 rindieron buenos resultados sin tener que modificar los protocolos establecidos.

Los marcadores moleculares son útiles para llevar a cabo estudios filogenéticos y completar aquellos basados únicamente en características morfológicas y morfométricas. La modificación de ciertos parámetros en las reacciones de amplificación del ADN permite obtener productos de PCR de buena calidad, libres de inespecificidades y en cantidades suficientes. La optimización de las condiciones de amplificación de los marcadores moleculares analizados será la base para llevar a cabo la investigación: "Efecto de las barreras geográficas en la estructura genética de ''*Gonatodes caudiscutatus*'' que incluirá muestras recolectadas en las provincias de Esmeraldas, Santo Domingo, Bolívar, Los Ríos, Manabí, Guayas y Galápagos.

**Palabras claves:** Marcadores moleculares, Geckos, PCR, *Gonatodes caudiscutatus*, 16S, 12S, C-mos, ACM-4, Rag2 y NT3.

## ABSTRACT

*Gonatodes caudiscutatus* is a gecko species that inhabits the three regions of continental Ecuador and has been introduced into the Galapagos Islands. The distribution of this species in Ecuadorian territory has been previously reported in studies of morphological and morphometric characteristics.

The development of molecular methods that analyze the sequences of DNA, RNA or amino acids are used to better understand the phylogeny of many different groups. Previous studies describe evolutionary relationships of the *Gonatodes* genus using mitochondrial and nuclear markers.

The objective of this research was to standardize PCR amplification conditions for mitochondrial DNA regions 16S and 12S and seven regions of nuclear genes C-mos, ACM-4, Rag2 and NT3. To obtain reliable and reproducible patterns of PCR products optimal DNA amplification conditions must be established. DNA was purified from 5 gecko samples and the previously mentioned regions of mitochondrial and nuclear DNA were amplified using specific primers for each region. Amplifications were carried out following parameters found in literature. When needed, PCR conditions were optimized by increasing hybridization temperature and decreasing the concentration of divalent ions (MgCl<sub>2</sub>). The amplification parameters for regions 16S, ACM -4, Rag2 and NT3 found in literature yielded satisfactory results and no optimization was needed.

Molecular markers are useful tools in conducting phylogenetic studies, they can also be used to complement studies based on morphological and morphometric characteristics. Modifying certain parameters in amplification reactions yields PCR products in higher quantities and quality. The standardization of these 9 molecular markers will serve as the basis for carrying out the research project titled: "Effect of geographical barriers on the genetic structure of *Gonatodes caudiscutatus*" that will analyze samples collected in Esmeraldas, Santo Domingo, Bolívar, Los Ríos, Manabí, Guayas and Galapagos

**Keywords:** Molecular markers, Geckos, PCR, *Gonatodes caudiscutatus*, 12S, 16S, C-mos, ACM-4, Rag2, NT3.

## TABLA DE CONTENIDOS

### Contenido

DERECHOS DE AUTOR.....	3
RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
TABLA DE CONTENIDOS.....	6
INDICE DE TABLAS.....	8
INDICE DE FIGURAS.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
METODOLOGÍA.....	14
Extracción y cuantificación de ADN.....	14
Amplificación de regiones de ADN mitocondrial y nuclear.....	14
12S.....	14
16S.....	15
C-mos con primers G73 y G74.....	15
Cmos con primers FU-F Y FU-R.....	15
ACM-4 y Rag 2.....	16
NT3.....	16
Optimización de condiciones de PCR en regiones de ADN mitocondrial y nuclear..	17
12S.....	17
C-mos con primers G73 y G74.....	17
Verificación PCRs.....	17
RESULTADOS.....	18
Extracción y cuantificación de ADN.....	18
Amplificación de regiones de ADN mitocondrial y nuclear.....	18
12S.....	18
16S:.....	18
C-mos con primers G73 y G74:.....	18
C-mos con primers FUF Y FUR.....	18
ACM-4, Rag2 y NT3:.....	18
Optimización de condiciones de PCR en regiones de ADN mitocondrial y nuclear..	18
12S.....	18

C-mos con primers G73 Y G74.....	18
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIONES.....	21
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	22
TABLAS.....	24
FIGURAS.....	25

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Resumen de datos obtenidos en extracción de ADN genómico de <i>Gonatodes caudiscutatus</i> : Concentración de ADN e índice de calidad y pureza.....	24
<b>Tabla 2:</b> Primers específicos de las regiones de ADN mitocondrial ribosomal y ADN de genes nucleares. ....	24



## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar el ADN extraído de 5 muestras de *G. caudiscutatus* (PN 1004)(LP006)(T003(LP007(ZP015.) Ladder 100pb (Invitrogen)..... 25
- Figura 2:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar amplificación de primers 16F y 16D del gen 16S (450 pb) el ADN de 5 muestras de *G. caudiscutatus* (PN 1004) (LP006)(T003)(LP007(ZP015) Ladder 100pb (Invitrogen). ..... 25
- Figura 3:**Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar amplificación de primers: intF e intR del gen ACM4 (400 pb) el ADN de 5 muestras de *G. caudiscutatus* (ZP015) (LP007) (LP006) (T003) (PN 1004) Ladder 100pb (Invitrogen)..... 26
- Figura 4:** Amplificación de la región 12S a 62°C con un gradiente de MgCl<sub>2</sub> a 2.5 mM, 2mM y 1.5mM. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Ladder 100pb (Invitrogen). 26

## INTRODUCCIÓN

La región Neo tropical contiene las extensiones más grandes de selva tropical del planeta. Se extiende desde el sur de México hasta el sur de Brasil y Bolivia (Morrone, 2014). Esta región es considerada como el ecosistema más diverso y amenazado del mundo (Avila *et al.*, 2017). La gran diversidad se debe en buena parte a que los seres vivos de la región evolucionaron de manera aislada en Sur y Norteamérica, y al existir la eventual conexión de los dos continentes hubo un evento conocido como el gran intercambio americano (Morrone, 2014). Por otro lado, esta región se encuentra amenazada por el incremento de actividades ganaderas y agrícolas que ocasionan la pérdida de grandes extensiones de bosques y severos cambios climáticos que causan sequía, incendios y huracanes (Avila *et al.*, 2017).

El Ecuador forma parte de la región Neo tropical y es considerado uno de los 10 sitios con mayor diversidad en el mundo (Morrone, 2014). Hasta el 2015, se habían reportado 4,801 especies de aves, mamíferos, anfibios y reptiles de las que 432 han sido registradas como especies de reptiles (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2015).

Una interesante especie de reptil que habita en Ecuador y Perú es *Gonatodes caudiscutatus* (Carvajal & Torres, 2012). Los machos de esta especie se caracterizan por presentar una coloración amarilla con marrón oscuro o negro en su cabeza (Arteaga & Guayasamin, 2019) y pequeños ocelos azulados con bordes negros en sus dorsos (Carvajal & Torres, 2012). Las hembras y los juveniles son completamente marrones y se asemejan a otros geckos ecuatorianos (Arteaga & Guayasamin, 2019). Se conoce que estos geckos son diurnos y mucho más activos durante la mitad del día (Arteaga & Guayasamin, 2019). Por lo general, los individuos de esta especie viven en grupos, se

alimentan y toman el sol en troncos de árboles, raíces, paredes y madera, convirtiéndose típicamente en escaladores (Arteaga & Guayasamin, 2019; Carvajal & Torres, 2012). En las noches, se ubican dentro de grietas, debajo de madera, basura y escombros (Arteaga & Guayasamin, 2019).

*Gonatodes caudiscutatus* habita en las tres regiones del Ecuador y también ha sido introducido en las islas Galápagos. La distribución de esta especie fue descrita por Carvajal & Torres (2012) a través de análisis morfológicos y morfométricos. Las características morfológicas analizadas fueron: longitud, ancho y profundidad de cabeza; longitud de la tibia y longitud femoral. Se identificó el sexo de acuerdo a patrones de mancha y pequeños tamaños que diferencian a geckos juveniles. De acuerdo a las características morfológicas se identificaron variaciones geográficas entre poblaciones, sin embargo, no se conoce cómo esta especie se dispersó en la región Andina. Al ser desconocidos los patrones de migración, se presume que *G. caudiscutatus* migró accidentalmente cuando los colonos de la costa se mudaron a la región Andina (Carvajal & Torres, 2012). Se necesita realizar más investigación para conocer el origen y dispersión de esta especie.

Hasta el momento el enfoque filogenético en esta especie se ha basado únicamente en sus características morfológicas (Carvajal & Torres, 2012). El desarrollo de métodos moleculares que analizan las secuencias de nucleótidos de ADN, ARN o aminoácidos pueden ser utilizados para entender mejor la filogenia de diversos grupos de especies (Patwardhan, Ray, & Roy, 2014). Regiones que son consideradas como marcadores moleculares ideales deben ser de una sola copia, de alineamiento fácil y con una tasa de sustitución óptima que proporcione el número suficiente de sitios informativos para recuperar relaciones filogenéticas dentro de un clado (Rocha *et al.*, 2010).

En estudios previos se han identificado regiones de ADN mitocondrial (genes ribosomales 12S y 16S) y de genes nucleares (C-mos.ACM-4, Rag2 y NT3) que son útiles para establecer relaciones filogenéticas en el género *Gonatodes*. Estas regiones han sido empleadas en diferentes estudios para analizar relaciones evolutivas, determinar la diversificación de un clado e identificar nuevas especies del género *Gonatodes* (Gamble *et al.*, 2008; Schargel *et al.*,2010; Raselimanana *et al.*,2009 ). En la actualidad, el género está compuesto por 28 especies y es considerado como un excelente modelo para examinar la diversificación Neo tropical (Gamble *et al.*, 2008).

En el 2008, Gamble y sus colaboradores emplearon las regiones de ADN mitocondrial (genes ribosomales 12S y 16S) y de genes nucleares (C-mos, ACM-4 y Rag2) para establecer las relaciones entre taxones divergentes y probar hipótesis filogenéticas de las siguientes especies amazónicas del género *Gonatodes*: *G. eladioi*, *G. hasemani*, *G. annularis*, *G. concinnatus*, *G. humeralis*, *G. ocellatus* y *G. ceciliae*.

En el 2010, Schargel y sus colaboradores emplearon las regiones de ADN mitocondrial 12S y C-mos para analizar filogenéticamente e identificar a siete especies del género *Gonatodes* en Guayana, una de las nueve regiones que conforman Venezuela.

De igual forma, en 2009, Raselimanana y sus colaboradores usaron las regiones del gen nuclear C-mos y NT3 para analizar la taxonomía, relaciones evolutivas y explorar la historia biogeográfica del grupo endémico Gerrhosauridae de Madagascar.

Para analizar estas regiones, se debe realizar una amplificación de ADN por PCR usando primers específicos. Es importante estandarizar las condiciones de PCR para obtener patrones confiables y reproducibles de los productos que se van a analizar (Zapata,2011).

Algunos parámetros a considerar que se reportan en la literatura son: las concentraciones de ADN o reactivos necesarios para llevar a cabo la PCR, la temperatura, el tiempo de

hibridación, el tiempo de extensión, el número de ciclos y el uso de aditivos (Cortés *et al.*,2014).

La optimización de las condiciones de amplificación por PCR para dos regiones mitocondriales y siete regiones de genes nucleares será la base para llevar a cabo la investigación: “Efecto de las barreras geográficas en la estructura genética de “*Gonatodes caudiscutatus*” que incluirá muestras recolectadas en las provincias de Esmeraldas, Santo Domingo, Bolívar, Los Ríos, Manabí, Guayas y Galápagos.

## METODOLOGÍA

### **Extracción y cuantificación de ADN.**

La extracción de ADN genómico total de 5 muestras de *Gonatodes caudiscutatus* se realizó siguiendo el protocolo establecido por Carranza et al. (1999) y estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ. Adicionalmente se realizaron algunas modificaciones en el proceso de limpieza, en el cual se añadió acetato de amonio ( $\text{NH}_4$ ) y pistilos esterilizados para la completa pulverización del tejido muscular. La concentración y calidad del ADN obtenido fue evaluada en NANODROP 2000 y la inspección visual se realizó en geles de agarosa al 1,5% con SYBR Safe. Se procedió a diluir cada muestra de ADN para obtener una concentración final de 20 ng/ $\mu\text{l}$ .

### **Amplificación de regiones de ADN mitocondrial y nuclear**

Se realizó la amplificación para 2 regiones de ADN mitocondrial (16S y 12S), y 7 regiones de los genes nucleares C-mos, ACM-4, Rag2 y NT3 usando primers específicos obtenidos de los estudios de Schargel *et al.* 2010 y Gamble *et al.* 2008 (Tabla 2).

#### **12S**

Las condiciones de amplificación para esta región fueron: 20 ng/ $\mu\text{l}$  de ADN, 0,2  $\mu\text{M}$  de cada primers, 0,2  $\mu\text{M}$  de dNTPs, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2,5  $\mu\text{l}$  de buffer, 0.2 U de Taq en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  (Lobos, 2013).

Condiciones en el termociclador: Denaturación inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de denaturación de 94°C por 30 segundos, una temperatura de hibridación de 52°C por 60 segundos y una temperatura de extensión de 72°C por 1 minuto; finalmente, una extensión de 72°C por 10 minutos (Lobos, 2013).

El tamaño de banda esperado para esta región es: 398 pb (Lobos, 2013).

### **16S**

Las condiciones de amplificación para esta región fueron: 20 ng/μl de ADN, 0,2 μM de cada primers, 0,2 μM de dNTPs, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 μl de buffer, 0.2 U de Taq en un volumen final de 25 μl (Lobos, 2013).

Condiciones en el termociclador: Denaturación inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos de denaturación de 94°C por 30 segundos, una temperatura de hibridación de 52°C por 60 segundos y una temperatura de extensión de 72°C por 1 minuto; finalmente, una extensión de 72°C por 10 minutos (Lobos, 2013).

El tamaño de banda esperado para esta región es: 450 pb (Lobos, 2013).

### **C-mos con primers G73 y G74**

Las condiciones de amplificación para esta región fueron: 20 ng/μl de ADN, 0,2 μM de cada primer, 0,2 μM de dNTPs, 3mM McCl<sub>2</sub>, 2.5 μl de buffer, 1.25 U de Taq en un volumen final de 25 μl (Lobos, 2013).

Condiciones en el termociclador: denaturación inicial de 96°C por 3 minutos, seguido de 32 ciclos de denaturación de 94°C por 32 segundos, una temperatura de hibridación de 52°C por 45 segundos y una temperatura de extensión de 72°C por 1 minuto; finalmente, una extensión de 72°C por 10 minutos (Gamble , Simons, Colli , & Vitt, 2008).

### **Cmos con primers FU-F Y FU-R**

Las condiciones de amplificación para esta región fueron: 20 ng/μl de ADN, 0,2 μM de cada primer, 0,2 μM de dNTPs, 1,5 mM McCl<sub>2</sub>, 2.5 μl de buffer, 1.25 U de Taq en un volumen final de 25 μl (Lobos, 2013).

Condiciones en el termociclador: denaturación inicial de 96°C por 3 minutos, seguido de 32 ciclos de denaturación de 94°C por 32 segundos, una temperatura de hibridación de 52°C por 45 segundos y una temperatura de extensión de 72°C por 1 minuto; finalmente, una extensión de 72°C por 10 minutos (Gamble , Simons, Colli , & Vitt, 2008).

El tamaño de banda esperado para esta región fue: 400 pb (Lobos, 2013).

### **ACM-4 y Rag 2**

Las condiciones de amplificación para esta región fueron: 20 ng/μl de ADN, 0,2 μM de cada primer, 0,2 μM de dNTPs, 1.5 Mm MgCl<sub>2</sub>, 2.5 μl de buffer, 0.2 U de Taq en un volumen final de 25 μl. (Lobos, 2013).

Condiciones en el termociclador: denaturación inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 32 ciclos de denaturación de 94°C por 32 segundos, una temperatura de hibridación de 52°C por 45 segundos y una temperatura de extensión de 72°C por 1 minuto; finalmente, una extensión de 72°C por 5 minutos (Gamble *et al.*,2008).

El tamaño de banda esperado para esta región ACM-4 fue: 431 pb (Gamble *et al.*,2008).

El tamaño de banda esperado para esta región Rag2 fue: 777 pb (Gamble *et al.*,2008).

### **NT3**

Las condiciones de amplificación para esta región fueron: 20 ng/μl de ADN, 0,2 μM de cada primer, 0,2 μM de dNTPs, 1.5 Mm MgCl<sub>2</sub>, 2.5 μl de buffer, 0.2 U de Taq en un volumen final de 25 μl (Lobos, 2013).

Condiciones en el termociclador: denaturación inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de denaturación de 94°C por 40 segundos, una temperatura de hibridación de



48°C por 30 segundos y una temperatura de extensión de 72°C por 1 minuto; finalmente, una extensión de 72°C por 7 minutos (Mizsei,2017).

El tamaño de banda esperado para esta región fue: 498 pb (Mizsei,2017).

### **Optimización de condiciones de PCR en regiones de ADN mitocondrial y nuclear**

Para eliminar inespecificidades y tener un producto de mejor calidad, para las siguientes regiones se modificaron la temperatura de hibridación y concentración de iones divalentes.

#### **12S**

Se realizó una gradiente de temperatura de hibridación:53, 54 y 55;56, 58, 60 y 62° C.

Después de definir la temperatura óptima de hibridación, se realizó un gradiente de la concentración final de iones divalentes (MgCl<sub>2</sub>). Las concentraciones que se probaron fueron: 2.5 mM, 2 mM y 1.5 mM.

#### **C-mos con primers G73 y G74**

Se realizó una gradiente de la temperatura de hibridación de: 53, 54, 55, 56 ° C para definir la temperatura óptima de hibridación.

#### **Verificación PCRs**

Después de cada PCR se verificó la presencia del producto amplificado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% durante 30 minutos a 100 voltios. Además, se verificaron los tamaños de los pares de bases de los productos obtenidos en la PCR con los reportados en la literatura.

## RESULTADOS

### Extracción y cuantificación de ADN

La extracción y cuantificación del ADN genómico total se logró en las 5 muestras de *Gonatodes caudiscutatus* (Figura 1). La calidad de una de las muestras no fue óptima, de las 4 muestras restantes fue adecuada. Por otro lado, la concentración de ADN de todas las muestras fue apropiada. (Tabla 1)

### Amplificación de regiones de ADN mitocondrial y nuclear

**12S:** Los productos de la amplificación de esta región fueron inespecíficos.

**16S:** Los productos de la amplificación de esta región fueron específicos y dentro del tamaño esperado de banda, aproximadamente 450pb. (Figura 2).

**C-mos con primers G73 y G74:** Los productos de la amplificación de esta región fueron inespecíficos.

**C-mos con primers FUF Y FUR:** Los productos de la amplificación de esta región fueron específicos, dentro del tamaño esperado de banda, aproximadamente 400pb.

**ACM-4, Rag2 y NT3:** Los productos de la amplificación de las tres regiones fueron específicos y con bandas del tamaño esperado (Figura 3).

### Optimización de condiciones de PCR en regiones de ADN mitocondrial y nuclear

#### 12S

La temperatura óptima de hibridación se determinó en 62°C. Se logró eliminar inespecificidades a una concentración de MgCl<sub>2</sub> de 2mM. (Figura 4)

#### C-mos con primers G73 Y G74

Se determinó que la temperatura óptima de hibridación es 56°C.

## DISCUSIÓN

En 1999, Carranza y sus colaboradores propusieron un protocolo de extracción para ADN de lagartijas. El uso de esta metodología en esta investigación, con un cambio adicional fue estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, permitió la extracción exitosa de material genético de las 5 muestras de la especie *Gonatodes caudiscutatus*. El ADN que se obtuvo con este protocolo fue de buena calidad, no estaba fragmentado y fue usado para realizar PCRs exitosamente.

El éxito de este protocolo de extracción de ADN consiste en los reactivos que se utilizan. La proteinasa k es importante para degradar proteínas adheridas al ADN y Fenol-Alcohol-Cloroformo permite obtener material genético de alta calidad, eficiente y estable por varios meses. El uso de pistilos estériles, que fue un cambio que se realizó al protocolo, permitió lisar de manera más eficiente el tejido usado (Universidad de Salamanca, 2003).

En cuanto a la optimización de las condiciones de PCR, dos parámetros que fueron muy importantes para obtener productos de mejor calidad y libres de inespecificidades fueron la temperatura de hibridación y la concentración de iones divalentes en la reacción. La temperatura de hibridación es fundamental porque en esta fase los primers se unen por complementariedad al ADN molde y de esta forma se garantiza amplificación específica del segmento de interés. La literatura reporta que estas temperaturas pueden oscilar entre 35 y 60 °C de acuerdo a la longitud de los primers y la concentración de estos. Al aumentar la temperatura de hibridación, los primers se unen a la secuencia complementaria con más especificidad, evitando que se amplifiquen regiones que no son las de interés (Pérez, 2005).

Al amplificar la región del gen C-mos con los primers G73 Y G74 y la región 12S se encontraron productos de PCR del tamaño esperado, pero la intensidad de la banda era baja. Es por esto que se realizó la gradiente y se obtuvieron bandas más intensas a temperaturas más altas.

La concentración de iones divalentes ( $MgCl_2$ ) es fundamental en la PCR porque forman un complejo soluble con los dNTPs que ayuda a que estos sean incorporados, además, son cofactores que estimulan la actividad de la enzima polimerasa. La concentración final de iones divalentes en la reacción puede variar entre 0,5 y 5 mM. (Somma & Querci, 2012). Concentraciones elevadas de  $MgCl_2$  estimulan la actividad de la enzima polimerasa y se pueden acumular productos inespecíficos (Somma & Querci, 2012). Por este motivo, en los productos de PCR de la región 12S que tenían muchas inespecificidades, se bajó la concentración e  $MgCl_2$ , logrando así menos bandas inespecíficas.

Por otro lado, las condiciones reportadas para la amplificación de las regiones C-mos con los primers FU-F y FU-R, 16S, ACM-4, Rag2 y NT3 rindieron buenos resultados al usar las condiciones reportadas en la literatura. No se encontraron inespecificidades y las bandas del tamaño esperado tenían una intensidad adecuada.

Los resultados de esta investigación indican que los marcadores moleculares estandarizados en esta investigación pueden ser empleados para realizar análisis filogenéticos en la especie *Gonatodes caudiscutatus*.

## CONCLUSIONES

El protocolo sugerido por Carranza *et al* (1999) más la modificación contribuye a la extracción exitosa del ADN genómico de la especie en análisis.

La estandarización de las condiciones para la amplificación de las regiones de ADN mitocondrial y de genes nucleares permitió obtener productos de PCR confiables y reproducibles que pueden ser empleados para futuros estudios filogenéticos en la especie *Gonatodes caudiscutatus*. En específico esta investigación servirá como base para llevar a cabo el estudio: “Efecto de las barreras geográficas en la estructura genética de *Gonatodes caudiscutatus*” que incluirá muestras recolectadas en las provincias de Esmeraldas, Santo Domingo, Bolívar, Los Ríos, Manabí, Guayas y Galápagos.

En esta investigación se observó que la temperatura de hibridación es un parámetro importante que puede ser modificado para obtener mejores resultados. Para la región, 12S, a más de modificar la temperatura de hibridación, fue necesario disminuir la concentración del ion divalente  $MgCl_2$ . Esta modificación se realizó para eliminar inespecificidades en el producto de PCR. Gradientes de temperatura y de concentración de iones divalentes contribuyeron a la selección de las mejores condiciones

Con la estandarización realizada, las regiones de ADN mitocondrial 16S y 12S y de genes nucleares C-mos, ACM4, Rag2 y NT3 podrán ser empleadas como marcadores moleculares en la especie *Gonatodes caudiscutatus*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Arteaga , A., & Guayasamin, J. M. (2019). *Gonatodes caudiscutatus*. Obtenido de Arteaga A, Bustamante L, Guayasamin JM (Eds) Reptiles de Ecuador: [www.tropicalherping.com](http://www.tropicalherping.com)
- Avila, G., Cervera, L., Ordonez, L., Jara, A., Amador, L., Paladines, B., . . . Espinosa, I. (2017). Biodiversity patterns and ecological processes in Neotropical dry forest: the need to connect research and management for long-term conservation. *Neotropical Biodiversity*, 107-116. doi: 10.1080/23766808.2017.1298495
- Carvajal, A., & Torres, O. (2012). *Check list*, 525-527. Obtenido de <http://investigaciones.puce.edu.ec/handle/23000/575>
- Cortés , L., Hernández , D., Mantilla, M., & Medina, M. (2014). Optimización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la Detección del gen B1 de *T. gondii* . 137–142.
- Gamble , T., Simons, A., Colli , G., & Vitt, L. (2008). Tertiary climate change and the diversification of the Amazonian gecko genus *Gonatodes* (Sphaerodactylidae, Squamata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 269–277. doi:10.1016/j.ympev.2007.08.013
- Gamble, T., Bauer, A., Greenbaum, E., & Jackman, T. (2008). Blackwell Publishing Ltd Out of the blue: a novel, trans-Atlantic clade of geckos (Gekkota, Squamata). *Zoologica Scripta*, 355–366.
- Lobos, S. (2013). Sistemática molecular de las lagartijas del género *Alopoglossus* (Autarchoglossa:Gymnophthalmidae) en el Ecuador. Obtenido de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/5830/T-PUCE-5985.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2015). *Quinto Informe Nacional para el Convenio sobre la Diversidad Biológica*. Quito.
- Mizsei, E., Jablonski, D., Roussos, S., Dimaki5, M., Ioannidis, y., Nilson, G., & Nagy, Z. (2017). Nuclear markers support the mitochondrial phylogeny of *Vipera ursinii-renardicomplex* (Squamata: Viperidae) and species status for the Greek meadow viper. *Zootaxa*, 075–088.
- Morrone, J. (2014). Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa*, 001–110. Obtenido de <http://www.biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.3782.1.1>
- Patwardhan, A., Ray, S., & Roy, A. (2014). Molecular Markers in Phylogenetic Studies- A Review. *Phylogenetics & Evolutionary Biology*. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.4172/2329-9002.1000131>

- Pérez, A. M. (2005). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)* . Obtenido de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle>
- Raselimanana, A., Brice Noonan, Karanth, K., Gauthier, J., & Yoder, A. (2009). Phylogeny and evolution of Malagasy plated lizards. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 336–344.
- Rocha, S., Rösler, H., Gehrin, p.-s., Glaw, F., Posada, D., Harris, D., & Vences, M. (2010). Phylogenetic systematics of day geckos, genus *Phelsuma*, based on molecular and morphological data (Squamata: Gekkonidae). *Zootaxa*, 1-28.
- Schargel, W., Rivas, G., Makowsky, R., Senaris, C., Natera5, M., Barros, t., . . . Barriomotor, C. (2010). Phylogenetic systematics of the genus *Gonatodes* (Squamata:Sphaerodactylidae) in the Guayana region, with description of a new species from Venezuela. *Systematics and Biodiversity* , 321–339.
- Universidad de Salamanca. (2003). *Banco Nacional de ADN*. Obtenido de <http://www.bancoadn.org>

## TABLAS

**Tabla 1:** Resultados obtenidos de la extracción de ADN genómico de *Gonatodes caudiscutatus*: Concentración de ADN e índice de calidad y pureza.

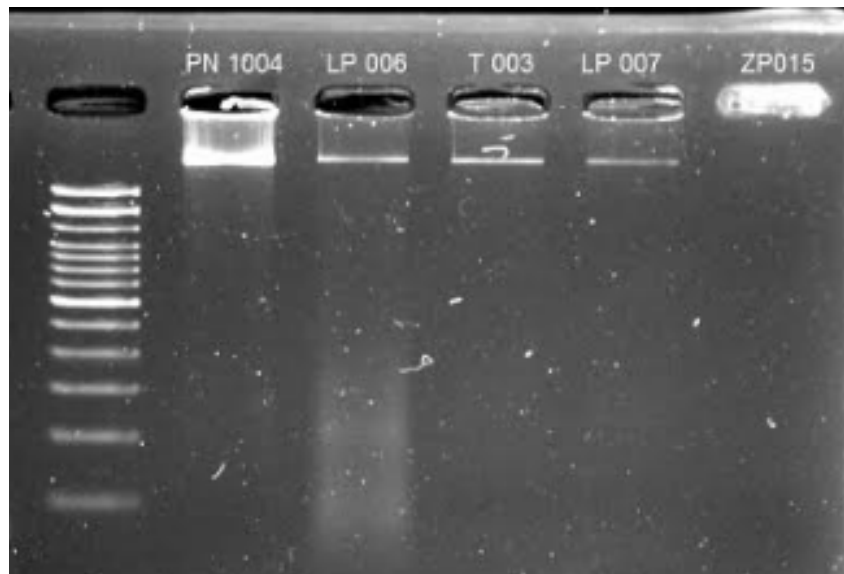
Muestra	Concentración de ADN( ng/ $\mu$ L)	Índice de calidad 260/280	Índice de Pureza 260/230
PN 1004	414.5	1.74	2.10
T003	15.9	1.39	0.36
LP007	12.3	1.43	0.26
LP006	57.2	1.83	1.31
ZP015	0	-0.02	0.01

**Tabla 2:** Primers específicos de las regiones de ADN mitocondrial ribosomal y ADN de genes nucleares.

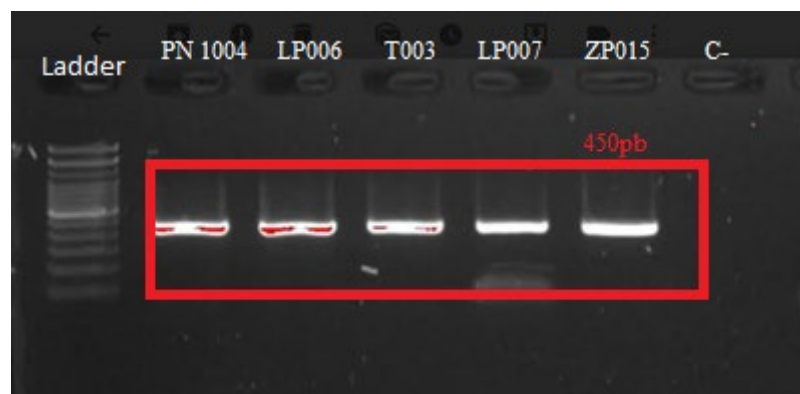
Gen	Primers	Secuencia (5' a 3')	Fuente
<i>12S</i>	12a	CTG GGA TTA GAT ACC CCA CTA	(Schargel <i>et al</i> , 2010)
	12b	TGA GGA GGG TGA CGG GCG GT	
<i>16S</i>	16S-F	CTAACCGTGCAAAGGTAGCGTAATCAC	(Gamble <i>et al</i> , 2008)
	16d	CTCCGGTCTGAACTCAGATCACGTAG	
<i>Rag2</i>	EMI-F	TGGAACAGAGTGATYGACTGCAT	(Gamble <i>et al</i> , 2008)
	EMI-R	ATTTCCCATATCAYTCCCAAACC	
	PY1-F	CCCTGAGTTTGGATGCTGTACTT	
	PY1-R	AACTGCCTRTTGTCCCCTGGTAT	
<i>C-mos</i>	G73	GCGGTAAAGCAGGTGAAGAAA	(Gamble <i>et al</i> , 2008)
	G74	TGAGCATCCAAAGTCTCCAATC	
	FU-F	TTTGGTTCKGTCTACAAGGCTAC	
	FU-R	AGGGAACATCCAAAGTCTCCAAT	
<i>ACM4</i>	tg-F	CAAGCCTGAGAGCAARAAGG	(Gamble <i>et al</i> , 2008)
	tg-R	ACYTGACTCCTGGCAATGCT	
	int-F	TTYCTGAAGAGCCCTCTGGTC	
	int-R	CAAATTTCTGGCAACATTRGC	
<i>NT3</i>	NT3-F3	ATA TTT CTG GCT TTT CTC TGT GGC	(Schargel <i>et al</i> , 2010)
	NT3-R4	GCG TTT CAT AAA AAT ATT GTT TGA CCG G	



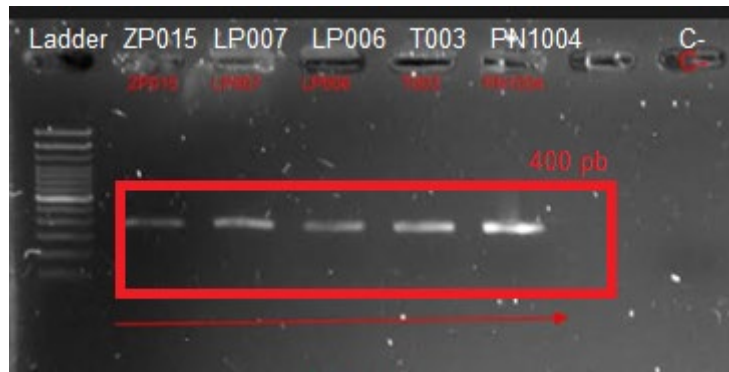
## FIGURAS



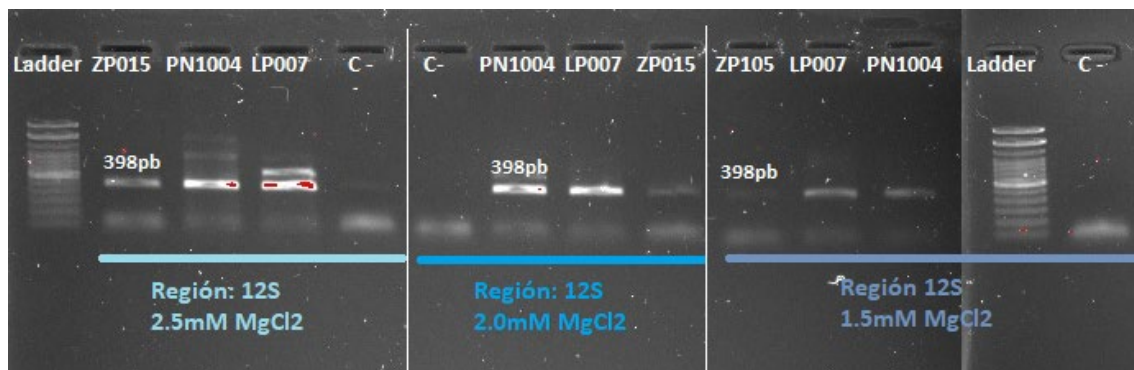
**Figura 1:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar el ADN extraído de 5 muestras de *G. caudiscutatus* (PN 1004) (LP006) (T003) (LP007) (ZP015.) Ladder 100pb (Invitrogen).



**Figura 2:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar amplificación de primers 16F y 16D del gen 16S (450 pb) el ADN de 5 muestras de *G. caudiscutatus* (PN 1004) (LP006) (T003) (LP007) (ZP015) Ladder 100pb (Invitrogen).



**Figura 3:** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar amplificación de primers: intF e intR del gen ACM4 (400 pb) el ADN de 5 muestras de *G. caudiscutatus* (ZP015) (LP007) (LP006) (T003) (PN 1004) Ladder 100pb (Invitrogen).



**Figura 4:** Amplificación de la región 12S a 62°C con un gradiente de  $MgCl_2$  a 2.5 mM, 2mM y 1.5mM. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Ladder 100pb (Invitrogen).