



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Obtención de microsatélites de *Leptodactylus melanonotus*

QUE PRESENTA EL ALUMNO

Luis Angel Cruz Hernández

Matrícula
2153060436

ASESORES:

Asesor Interno

Dr. Gabriel Ricardo Campos Montes (NE 34761)

Asesor Externo

M. en C. Andrea Rubí Jiménez Marín (4809057)

Ciudad de México

29/Noviembre/2022

Resumen

La diversidad de especies de anfibios de México es una de las más altas del mundo. Debido a la sensibilidad de los anfibios a los cambios en el ambiente, estos organismos pueden ser utilizados como bioindicadores del estado de los ecosistemas. Una de las aproximaciones para el estudio de anfibios como bioindicadores, se realiza con marcadores moleculares, entre los que destaca el uso de los microsatélites, que son parte de los marcadores basados en el análisis del DNA y son obtenidos mediante la amplificación por PCR. Estos marcadores cuentan con una tasa elevada de polimorfismo y se puede trabajar con cantidades reducidas de DNA; son particularmente útiles para resolver diversas cuestiones relacionadas con la conservación de la diversidad genómica. Para este trabajo, se extrajo DNA de 94 muestras de tejido de *Leptodactylus melanonotus*, colectadas en la cuenca del estado de Colima. Se estandarizaron las condiciones de amplificación de 16 marcadores microsatélites específicos para la especie, de los cuales 14 amplificaron con todas las muestras probadas y 2 tuvieron resultados variables. Esta estandarización servirá para obtener microsatélites que ayuden a estudiar la variabilidad genética de las poblaciones de *Leptodactylus melanonotus* y su relación con el estado de conservación de su hábitat.

Palabras clave: Anfibios, Bioindicadores, Marcadores moleculares, Microsatélites

Índice

1. Marco Institucional.....	4
2. Introducción.....	5
3. Ubicación geográfica.....	5
4. Objetivo general del programa	6
5. Especificación y fundamento de las actividades desarrolladas	6
5.1 Extracción de DNA.	6
5.2 Estandarización de las condiciones para la amplificación de marcadores microsatélites en <i>L. melanonotus</i>	6
6. Impacto de las actividades del servicio social en programa de adscripción.....	7
7. Aprendizaje y habilidades obtenidas durante el desarrollo del servicio social	8
8. Fundamento de las actividades del servicio social	8
9. Referencias	9

1. Marco Institucional

El Instituto de Biología es una de las más grandes y complejas dependencias universitarias dedicadas a la investigación. Desde 1929, año de su fundación, la mayor parte de los proyectos realizados en el Instituto, están orientados a incrementar nuestro conocimiento de la biodiversidad, con un énfasis particular en el estudio de la composición, la distribución, los orígenes y los usos potenciales de los elementos de la flora, la fauna y los hongos de México (1).

Desde sus orígenes, el Instituto ha mantenido la responsabilidad de formar, enriquecer, custodiar y estudiar las Colecciones Biológicas Nacionales. Es así como actualmente el Instituto cuenta con diez Colecciones Zoológicas Nacionales, que son: La colección nacional de Helmintos, de Insectos, de Moluscos, de Peces, de Ácaros, de Anfibios y Reptiles, de Arácnidos, de Aves, de Crustáceos y finalmente la de Mamíferos. Además, el Instituto también alberga el Herbario Nacional de México (MEXU) con más de 1,300,000 ejemplares. En el área de botánica están la Colección de Algas, de Hongos, de Líquenes, de Briofitas, de Plantas Vasculares, la Colección Etnobotánica, la de Frutos y Semillas, la Palinoteca y la Colección de Maderas (2).

El Instituto de Biología también cuenta con varios laboratorios temáticos pertenecientes al Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LANABIO), que fue creado en 2014 con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través del programa Laboratorios Nacionales. De manera muy importante, el LANABIO cuenta con el respaldo de las Colecciones Biológicas Nacionales. Estas Colecciones Nacionales representan un legado patrimonial desde el Siglo XIX y los más de siete millones de especímenes biológicos que albergan en su conjunto, constituyen el más importante, mejor documentado y mejor preservado acervo de la diversidad biológica de México (3).

Finalmente cabe destacar que el Instituto de Biología tiene como misión desarrollar investigación científica sobre el origen, el mantenimiento, las interacciones, la distribución, la composición actual, el aprovechamiento y la conservación de diversidad biológica. Asimismo, es su misión participar en la formación de recursos humanos de alto nivel en su área y difundir el conocimiento entre la sociedad mexicana, con el propósito de contribuir a la comprensión y conservación de la biodiversidad nacional y mundial (4).

2. Introducción

La gran diversidad de la herpetofauna en México constituye uno de los elementos más importantes de la fauna del país. En particular, los anfibios contribuyen considerablemente a que México sea considerado un país megadiverso, pues poseen un grado de endemismo cercano al 60% de sus especies, y cuentan con una diversidad total de 376 especies lo cual posiciona a México como el quinto país en riqueza de anfibios (5).

Los anfibios son considerados como buenos bioindicadores, ya que pueden dar indicios de las condiciones tanto en ecosistemas terrestres como en acuáticos (6). La ranita hojarasca (*Leptodactylus melanonotus*) es una especie que se distribuye por las vertientes del Pacífico y del Golfo de México, incluyendo la península yucateca (7), y ha sido ampliamente estudiada desde el punto de vista helmintológico (8), debido a que los anfibios y sus parásitos son excelentes sistemas para el estudio de las relaciones parásito-hospedero, que su vez los convierte en “centinelas” de las condiciones ambientales (9).

Los microsatélites son secuencias cortas de 1 a 6 pares de bases nucleotídicas que se repiten en tándem un elevado número de veces (SSRs, Short o Simple Sequence Repeats) y son muy abundantes en los genomas nucleares de todos los eucariotas, algunos procariontes, en los genomas de cloroplastos de las plantas, e incluso hay evidencias de su presencia en algunos genomas mitocondriales de vertebrados. Resultan apropiados para el estudio de genética de poblaciones en diversas especies porque se pueden amplificar a partir de muestras de pelo, heces, hueso, plumas, biopsias, sangre, etc., que no suponen el sacrificio de los individuos a estudiar. De esta forma es posible analizar el área de distribución, movimiento y estructura social de las poblaciones sin tener que tomar contacto directo con los individuos. Además, puede utilizarse con muestras conservadas en museos y colecciones biológicas de muchos años de antigüedad (10).

En este trabajo se estandarizaron las condiciones para la amplificación de microsatélites que posteriormente puedan ser utilizados para el análisis de la variabilidad genética de las poblaciones de *Leptodactylus melanonotus* de las cuencas del estado de Colima y su relación con el estado de conservación de su hábitat.

3. Ubicación geográfica

El Instituto de Biología de la UNAM se encuentra ubicado dentro de Ciudad Universitaria en Ciudad de México, sobre Circuito Zona Deportiva S/N, C.P. 04510, en la alcaldía Coyoacán.

4. Objetivo general del programa

Impulsar la investigación sobre los organismos vivos, enfatizando la descripción de sus atributos genómicos, cromosómicos, ontogenéticos, anatómicos y morfológicos en el sentido más amplio; su distribución geográfica y en biomas; sus relaciones filogenéticas y su clasificación; sus interacciones bióticas y con el ambiente físico; y los procesos micro y macroevolutivos que le dieron origen y la mantienen. Adicionalmente, se relaciona estrechamente con las aplicaciones que la sociedad humana da a la biodiversidad.

5. Especificación y fundamento de las actividades desarrolladas

Las siguientes actividades se realizaron en el laboratorio de biología molecular del Instituto de Biología de la UNAM del 16 de mayo de 2022 al 16 de noviembre de 2022 con la finalidad de obtener secuencias de ADN que ayuden a caracterizar las poblaciones de *Leptodactylus melanonotus* en cuencas del estado de Colima.

5.1 Extracción de DNA.

Se realizó extracción de DNA de 94 muestras de tejido (falange de la parte posterior de cada ejemplar) de *Leptodactylus melanonotus* utilizando el kit "Animal and Fungi DNA Preparation kit" de la marca Jena Bioscience ®. Cada muestra de DNA obtenida fue cuantificada mediante espectrofotometría y analizada mediante electroforesis para determinar su integridad. La extracción fue necesaria para continuar a la siguiente actividad.

5.2 Estandarización de las condiciones para la amplificación de marcadores microsatélites en *L. melanonotus*.

Se desarrolló un protocolo para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Figura 1) que permitiera la amplificación de microsatélites utilizando las muestras de DNA de *L. melanonotus* previamente obtenidas.

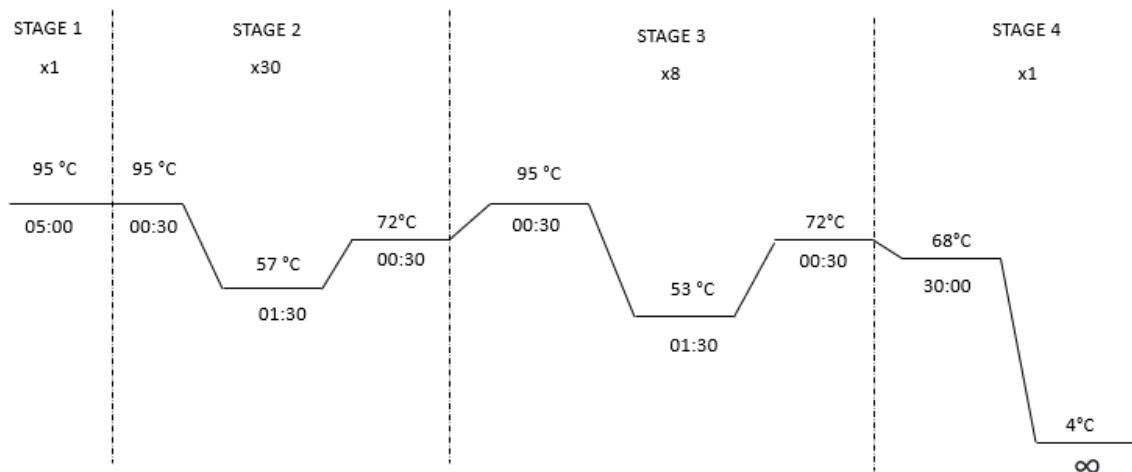


Figura 1 Protocolo utilizado en termociclador para la amplificación de marcadores microsatélites en *L. melanonotus*.

Para comprobar la funcionalidad del protocolo desarrollado, se utilizaron las primeras 10 muestras de DNA previamente obtenidas con cada uno de los pares de iniciadores utilizados en este proyecto (16 pares de iniciadores), en total se obtuvieron 160 productos de PCR que fueron analizados mediante electroforesis en geles de acrilamida para corroborar que tanto los iniciadores como el protocolo utilizado en el termociclador funcionara y existiera una amplificación de marcadores microsatélites. En este caso, amplificaron exitosamente 142 muestras, de las cuales 110 corresponden a 11 pares de iniciadores que amplificaron en un 100% en las muestras utilizadas, 27 corresponden a 3 pares de iniciadores que amplificaron en el 90% de las muestras y 5 a un solo par de iniciadores que amplifico solo al 50% de las muestras utilizadas.

6. Impacto de las actividades del servicio social en programa de adscripción.

En el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México se desarrollan numerosas investigaciones, las actividades realizadas durante el servicio social contribuirán a una de ellas, esta investigación está enfocada a conocer la estructura genética de las poblaciones de *Leptodactylus melanonotus* en cuencas del estado de Colima para determinar el grado de perturbación de los sitios donde fueron colectados los ejemplares y obtener información sobre el estado de conservación del ecosistema, para posteriormente establecer algunas propuestas encaminadas a la protección y conservación de dichas zonas y su fauna asociada.

7. Aprendizaje y habilidades obtenidas durante el desarrollo del servicio social

Al realizar el servicio social en el laboratorio de biología molecular del Instituto de Biología de la UNAM, aprendí a:

- Utilizar correctamente equipo de laboratorio como micropipetas de distintos volúmenes, centrifugas, termocicladores, potenciómetro, balanzas de precisión, cámaras de electroforesis, agitadores de tipo vortex, espectrofotómetro, fotodocumentador e incubadoras de bloque seco.
- Identificar diversos reactivos utilizados en múltiples técnicas del laboratorio de biología molecular.
- Extraer DNA de tejido animal, así como los pasos necesarios para llevar a cabo correctamente la extracción.
- Cuantificar DNA
- Elaborar geles de acrilamida.
- Llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa.

8. Fundamento de las actividades del servicio social

Los marcadores moleculares nos ayudan a tener una estimación de la diversidad genética. Los estudios con marcadores moleculares resultan relativamente baratos y, sobre todo, ofrecen resultados rápidamente (11).

Uno de los marcadores moleculares que más se ha ido utilizando en los últimos años en estudios de conservación de la biodiversidad, son los microsatélites. El "genotipado", a partir de ellos, resulta relativamente fácil y automatizable, con la posibilidad de realizar amplificaciones múltiples en una misma reacción de PCR, con resultados fiables, repetitivos y fáciles de analizar. Su utilización se debe a dos características principales: su elevada tasa de polimorfismo y la posibilidad de poder trabajar con reducidas cantidades de DNA, que se pueden obtener sin que resulte necesario el sacrificio de ejemplares (es decir, no invasivas). Son particularmente útiles para resolver diversas cuestiones relacionadas con la conservación de la diversidad genómica, como la detección de posibles cuellos de botella, medida del flujo génico e hibridación entre poblaciones, asignación de individuos a su población de origen y determinación de la estructura poblacional, entre otras (10).

Como se observa, los microsatélites son importantes marcadores moleculares que ayudan a conocer la biodiversidad genética del país, esto representa una base importante para comprender y conocer el resto de la biodiversidad y a su vez elaborar estrategias para el uso y conservación de los recursos naturales. Durante el servicio social se aplicaron las habilidades y conocimientos adquiridos durante la licenciatura en Biología de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, para visualizar a la biodiversidad como un recurso natural, analizar los procesos fundamentales que originan a la biodiversidad desde un punto de vista genético, taxonómico, ecológico y biogeográfico, así como analizar los diferentes modos humanos de relacionarse con la naturaleza y de usar a la biodiversidad desde un punto de vista genético, ecológico y biogeográfico. Estas habilidades y conocimientos me permitieron participar en este proyecto relacionado con la biodiversidad con un enfoque a nivel genético, que pretende ayudar al diagnóstico, conservación y restauración de los recursos naturales, cumpliendo así con la misión de la Universidad Autónoma Metropolitana.

9. Referencias

1. IBUNAM. Acerca del Instituto de Biología [19/03/2022]. Disponible en: <http://www.ib.unam.mx/estructura-interna/acerca-de>.
2. CONABIO. Instituto de Biología, UNAM [19/03/2022]. Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/biodiversidad/curiosos/instituto-de-biologia-unam>.
3. IBUNAM. Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LANABIO) [19/03/2022]. Disponible en: <http://www.ibiologia.unam.mx/lanabio.html>.
4. IBUNAM. Misión y Visión del Instituto de Biología de la UNAM [19/03/22]. Disponible en: <http://www.ib.unam.mx/estructura-interna/mision>.
5. Parra-Olea G, Flores-Villela O, Mendoza-Almeralla C. Biodiversidad de anfibios en México. *Revista mexicana de biodiversidad*. 2014;85:460-6.
6. Suárez González LF. Reptiles y anfibios como bioindicadores para implementar en estudios de impacto ambiental y planes de manejo ambiental.
7. CONABIO. Ranita hojarasca (*Leptodactylus melanonotus*) [26/11/22]. Disponible en: <https://enciclovida.mx/especies/35080>.
8. Goldberg SR, Bursley CR. Helminth parasites of seven anuran species from northwestern Mexico. *Western North American Naturalist*. 2002:160-9.
9. Hoberg EP. Invasive processes, mosaics and the structure of helminth parasite faunas. 2010.
10. González EG. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*. 2003;59(2-3):377-88.
11. Jiménez P, Collada C. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Forest Systems*. 2000;9(4):237-48.