

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Ciencias Marinas

Oceanología



Estandarización de un protocolo de extracción de ADN
de *Megathura crenulata* (Sowerby, 1825)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
OCEANÓLOGO

PRESENTA

DIANA LAURA VÁZQUEZ ALFARO

Octubre, 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS

“Estandarización de un protocolo de extracción de ADN de *Megathura crenulata* (Sowerby, 1825)”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
OCEANÓLOGO

PRESENTA:

DIANA LAURA VÁZQUEZ ALFARO

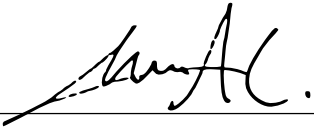
Aprobada por:

Comité de tesis



Dra. Fabiola Lafarga De la Cruz

Directora de tesis



Dra. Alicia Abadía Cardoso

Sinodal



Dra. Ivone Giffard Mena

Sinodal



Dr. Miguel Tripp Valdez

Secretario

RESUMEN

En las últimas décadas, el desarrollo de las técnicas de biología molecular ha permitido generar un gran conocimiento en muchas especies pesqueras de importancia ecológica y socio-económica. Sin embargo, para especies marinas aún existen pocos estudios relacionados con la obtención de ADN a partir de material genético obtenido de muestreos no destructivos. Por una parte, los muestreos destructivos son frecuentemente utilizados por su facilidad; y, en cuanto a los protocolos de extracción de ADN, estos se han diseñado para unas cuantas especies de importancia comercial. La lapa gigante *Megathura crenulata* es una especie con alto potencial de desarrollo, la cual en la actualidad se extrae comercialmente en la Península de Baja California. Este gasterópodo ha destacado mayormente por el uso inmunológico de la proteína KLH (por sus siglas en inglés “Keyhole Limpet Hemocyanin”) que se extrae de su hemolinfa. Esta especie, que tiene un importante rol nutricional y ecológico, no cuenta con un protocolo de extracción de ADN a partir de tejido obtenido de muestreos no destructivos.

El objetivo de este estudio consistió en estandarizar un protocolo de extracción de ADN a partir de la hemolinfa de *M. crenulata*, comparando dos kits comerciales de extracción de ADN: QIAGEN DNeasy Blood and Tissue y KingFisher Cell and Tissue DNA. Para esto, se colectó la hemolinfa de once lapas mediante un muestreo no destructivo (US # 6,852,338 B2). Para la estandarización del protocolo se diseñó un pre-tratamiento de las muestras en el cual se modificó el volumen de hemolinfa, tiempo de lisis y centrifugación. Para evaluar la calidad del ADN, se realizó la amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores del gen mitocondrial 16S (560 pb); como control positivo se utilizó muestra de branquia de *M. crenulata* y tentáculo epipodial de abulón amarillo (*Haliotis corrugata*) para descartar posible inhibición de la PCR por contaminación del ADN.

En este estudio se determinó que el mejor método de extracción de ADN a partir de hemolinfa fue el kit DNeasy Blood and Tissue, por las ventajas que proporciona en cuanto el volumen de muestra (20 μ L) y la preservación del ADN en el buffer de elusión. El ADN extraído tiene la calidad y concentración necesaria para ser usado en estudios moleculares posteriores diversos (e.g. genética poblacional, parentesco, identificación de especies). Con el kit KingFisher Cell and Tissue DNA también se logró obtener ADN, sin embargo, el buffer de elusión no resultó tan efectivo con la conservación del ADN.

ABSTRACT

In the last few decades, the development of molecular biology techniques has made it possible to generate a great deal of knowledge in many fishing species of ecological and socio-economic importance. However, for marine species there are still few studies related to obtaining DNA from genetic material through non-destructive sampling. On the one hand, destructive sampling is frequently carried out to their ease; regarding DNA extraction protocols, most have been designed for a few commercially important species. The giant limpet *Megathura crenulata* is a species with high development potential, which is currently commercially extracted in the Baja California Peninsula. This gastropod has mostly stood out due to the immunologic use of the KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) protein which is extracted from its hemolymph. This species, which has an important nutritional and ecological role, does not have a DNA extraction protocol from tissue obtained by non-destructive sampling.

The objective of this study consists of standardizing a DNA extraction protocol parting from the haemolymph of *M. crenulata*, comparing two commercial DNA extraction kits: QIAGEN DNeasy Blood and Tissue DNA and KingFisher Cell and Tissue DNA. For this, haemolymph from 11 limpets was collected by non-destructive sampling method. To standardize this protocol, a pre-treatment of the samples was designed, in which the haemolymph volume, lysis, and centrifugation times were modified. To assess the quality of the DNA, amplification was carried out by the polymerase chain reaction (PCR) technique with primers from the 16S mitochondrial gene (560 bp); as a positive control, a gill sample of *M. crenulata* and epipodial tentacle of yellow abalone (*Haliotis corrugata*) were used to rule out possible inhibition of PCR due to DNA contamination.

In this study, it was determined that the best DNA extraction method from haemolymph was the DNeasy Blood and Tissue kit, due to the advantages it provides in terms of sample volume (20 μ L) and the preservation of DNA in the elution buffer. The extracted DNA has the necessary quality and concentration to be used in various subsequent molecular studies (e.g. population genetics, kinship, species identification). With the KingFisher Cell and Tissue DNA kit it was also possible to obtain DNA, regardless, its elution buffer is ineffective for DNA conservation.

Porque nadie puede saber por ti. Nadie puede crecer por ti. Nadie puede buscar por ti.

Nadie puede hacer por ti lo que tú mismo debes hacer.

La existencia no admite representantes.

Jorge Bucay

DEDICATORIA

A mi padre. Jesús Vázquez Andrade, madre, María Soledad Alfaro Mejía, a todos mis hermanos, Erika, Juan Carlos, Luis Miguel y José Antonio, por aportarme parte de su esencia, por su apoyo económico, por apoyarme en circunstancias adversas y por su amor incondicional.

A mis leales amigos.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su inmenso amor. A mi papá por ser un gran ejemplo en mi vida, por su aceptación en cada una de mis decisiones, por su fuerza y por enseñarme que siempre se puede. A mi madre, por siempre cuestionarme y tratar de comprenderme. A mis hermanos, porque sin duda soy el resultado de todos ustedes. A Erika, por ser mi segunda madre, amiga y confidente, por su orientación en todos los aspectos de mi vida; Juan Carlos, por motivarme con su éxito, creatividad y buen humor ante las situaciones difíciles; Luis Miguel, por siempre hacerme ver las cosas desde una perspectiva diferente, por apoyar mi sentido creativo; José Antonio, por brindarme su apoyo incondicional en mis decisiones.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), por permitirme el ingreso y uso de las instalaciones. Al Dr. Rubén Lara Lara, por aceptarme como Ayudante de SNI III en el departamento de Oceanología y brindarme una beca que me permitió realizar mi proyecto de tesis. A mi directora de tesis la Dra. Fabiola Lafarga de la Cruz, por confiar en mí y aceptarme como su estudiante, por todos los recursos aportados para el desarrollo experimental de mi tesis, por las colaboraciones que me ayudo a formar con investigadores de México y EU, por permitirme colaborar en el trabajo realizado para Biosyn, por el tiempo brindado durante el transcurso de mi tesis y por incentivar me a ser más autodidacta. A M.C. Carmen Elvira Vargas Peralta, por su inmensa paciencia y calidez como persona, por guiarme con sus consejos, clases y experiencia durante mi estancia en el laboratorio de genética acuícola, por mostrarme mis errores de manera asertiva, por motivarme y por siempre dedicarme un tiempo para resolver mis dudas. ¡Gracias! A mis sinodales la Dra. Alicia Abadía Cardoso, Dra. Ivone Giffard Mena y el Dr. Miguel Tripp Valdez, por sus valiosas aportaciones en organización y sintaxis de mi tesis. Al Dr. Eernisse Douglas de la UC Fullerton (CA), por la información compartida de *M. crenulata*.

A mis personas favoritas, Carlos Gutiérrez, Carolina García, Mar Ramírez, Giovanni Durante, Juan Diego Castro, Esteban Miranda, Viridiana Galicia, Felipe García, Alejandro Domínguez, Alejandro Osuna y César Mendoza. Por su apoyo de forma directa o indirecta a mi trabajo, por su generosidad y por siempre sacarme una sonrisa. Los quiero.

ÍNDICE

RESUMEN	i
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
JUSTIFICACIÓN	5
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS	7
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
1. Área de estudio y muestreo no destructivo	8
2. Pruebas de extracción de ADN (genómico) a partir de la hemolinfa	11
<i>DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN)</i>	13
<i>Cell and Tissue DNA (KingFisher)</i>	14
3. Evaluación ADN	15
4. Amplificación del gen 16S.....	16
5. Determinar el mejor procedimiento de extracción de ADN.....	16
RESULTADOS	18
Muestras genéticas no destructivos.....	19
Pruebas de extracción de ADN (genómico) a partir de la hemolinfa	20
<i>DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN)</i>	21
<i>Cell and Tissue DNA (KingFisher)</i>	24
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	33
REFERENCIAS	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución de <i>Megathura crenulata</i> ..	8
Figura 2. Ejemplares vivos de <i>Megathura crenulata</i>	9
Figura 3. Técnica de muestreo.	10
Figura 4. Inserción del set colector de sangre (hemolinfa).	10
Figura 5. Esquema de las etapas de extracción de ADN con el kit QIAGEN.....	11
Figura 6. Esquema simplificado de procesamiento de muestras con KingFisher	12
Figura 7. Pellet obtenido después de centrifugar las muestras de hemolinfa	21
Figura 8. ADN genómico obtenido con kit QIAGEN	23
Figura 9. ADN genómico kit QIAGEN, muestras con pre-tratamiento.....	24
Figura 10. ADN genómico extracciones con KingFisher con pre-tratamiento	25
Figura 11. ADN genómico muestras KingFisher, muestras con/sin lisis.....	26
Figura 12. Productos de amplificación del gen mitocondrial 16S en muestras de ADN de ambos kits.	27
Figura 13. Producto de amplificación del gen mitocondrial 16S a partir de ADN obtenido de mucus de <i>M. crenulata</i>	29

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Estudios previos relacionados con <i>Megathura crenulata</i>	4
Tabla II. Pruebas con centrifugación y tiempos.....	12
Tabla III. Especificaciones muestras de hemolinfa procesadas con el kit de KingFisher.	14
Tabla IV. Preparación de la placa.....	15
Tabla V. Adición de reactivos en la etapa de purificación del ADN.....	15
Tabla VI. Concentraciones para el mix de PCR.....	16
Tabla VII. Secuencia de cebador para el gen mitocondrial 16S (universal)	17
Tabla VIII. Condiciones de amplificación para el gen mitocondrial 16S.	17
Tabla IX. Condiciones del programa optimizadas para el gen mitocondrial 16S.	17
Tabla X. Biometría del muestreo de <i>M. crenulata</i>	20
Tabla XI. Resultados de extracción de ADN con el kit de extracción QIAGEN (Q) usando diferentes volúmenes de muestra.	22
Tabla XII. Extracciones de ADN centrifugadas y procesadas con el kit QIAGEN (Q) en muestras con pre-tratamiento (centrifugadas, RNAasa, lisis)	23
Tabla XIII. Resultados de extracción de ADN con el kit de extracción KingFisher.....	25
Tabla XIV. Resumen de pruebas de extracción.	26

INTRODUCCIÓN

El ADN (ácido desoxirribonucleico) también conocido como el código de la vida, es la molécula que contiene la información genética de todos los seres vivos, y define a un organismo (tal como planta, animal, bacteria u hongo). Cada cadena de ADN tiene una parte central formada por un azúcar (desoxirribosa) y nucleótidos (ácido formado por el fosfato y la base nitrogenada: adenina, timina, citosina y guanina), los cuales en conjunto, constituyen toda la información heredable. Por ello, a través del tiempo, se ha buscado tener un mayor acceso a la información contenida en el ADN, pero para esto primero se han tenido que diseñar métodos de muestreo (colecta de material biológico), extracción y purificación de ADN adecuados para cada ser vivo.

México cuenta con una gran diversidad de especies, la cual destaca a nivel mundial por su biodiversidad marina (Lara-Lara, 2008). Los estudios moleculares se han aplicado a especies de importancia comercial, como el camarón (*Litopenaus stylirostris*, *Litopenaus setiferus*, *Penaeus vannamei*), atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y abulón (*Haliotis spp.*), por mencionar algunos de alto valor económico, para los cuales se cuenta con protocolos de extracción y análisis de ADN bien establecidos (Ball y Chapman, 2003; De la Rosa-Vélez *et al.*, 2000; Del Río-Portilla y González-Avilés, 2001; Scoles y Graves, 1993). Sin embargo, algunas especies de menor explotación comercial, como es el caso de *Megathura crenulata*, aún no cuentan con protocolos estandarizados para la extracción de ADN lo que limita la capacidad de realizar estudios genéticos.

Megathura crenulata, también conocida como concha lapa o lapa gigante, es un gasterópodo perteneciente a la subclase Prosobranchia, orden Archaeogastropoda y familia Fissurellidae (Armijo de-Vega, 1993; Smith y Carlton, 1975). El área de distribución geográfica de esta especie está limitada a una región litoral del Pacífico, que se extiende desde Punta Concepción, California (EUA) hasta Isla Asunción, Baja California Sur (México) (Morris *et al.*, 1980; Torres-Moye, 2012). La hemolinfa de este organismo ha sido

fuerza de estudio en la biomedicina desde la década de los 80's (Harris y Markl, 1999; Hodgson,1981; Oakes *et al.*, 2004). A partir de la hemolinfa se extrae la proteína KLH (por sus siglas en inglés "Keyhole Limpet Hemocyanin"), utilizada en la farmacéutica para el tratamiento de enfermedades inmunológicas (Swaminathan *et al.*, 2014).

A pesar de la relevancia de esta especie en la investigación biomédica, actualmente se carece de información detallada sobre su biología básica, genética y explotación. En México, la información sobre esta especie contiene discrepancias: aparece descrita en la ficha técnica de Bahía de La Paz, sitio fuera de su área de distribución geográfica natural (CONABIO, 2007). Por otra parte, su aparición en la Carta Nacional Pesquera (CNP) no es continua, ya que sólo aparece en los años 2004 y 2010 (INAPESCA, 2004, 2010). La ausencia del estatus de esta especie se hace notar en la Carta Estatal Pesquera de Baja California del 2000-2015 (SEPESCA, 2015), donde no se determina ningún estado de deterioro, posibilidad de desarrollo o aprovechamiento.

ANTECEDENTES

Los muestreos genéticos semi invasivos y no destructivos se han mejorado con el tiempo permitiendo obtener ADN de una mayor diversidad de muestras biológicas. Para el caso de los vertebrados, se ha utilizado muestras de sangre, pelo y plumas (Taberlet y Luikart, 1999). Por otra parte, para algunas especies de peces se ha colectado muestras de aletas y escamas de las cuales se ha extraído ADN tan viable como el que se extrae de tejidos (Wasko *et al.*, 2003). En moluscos bentónicos, como es el caso del abulón, se ha diseñado un muestreo no destructivo para extraer ADN de los tentáculos epipodiales y del mucus (Slabbert y Roodt-Wilding, 2006). También se ha logrado obtener ADN a partir de la hemolinfa del moluscos bivalvos *Mytilus sp.*, a partir del método fenol – cloroformo; y mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) los marcadores moleculares ITS y Glu-5' amplificaron en el 81 y 92 % de las muestras con lo que se logró identificar que todas estas pertenecían a la especie *Mytilus trossulus* (Yanick y Heath,

2000). Y más recientemente, se ha evidenciado que a partir del material genético liberado al agua de mar por el ostión europeo *Ostrea edulis*, con el uso de la técnica de ADN ambiental, es factible su genotipado no invasivo (Holman *et al.*, 2019).

La hemocianina de *M. crenulata* es investigada en el área de la biomedicina desde la década de los 80's (Harris y Markl, 1999; Hodgson,1981; Oakes *et al.*, 2004). Posteriormente, en 1999 se fundó la empresa Stellar[®], empresa dedicada a la investigación de la proteína KLH en California (EU). Oakes (2005) presidente y líder en la investigación desarrolló un método (US 6852338 B2) para coleccionar hemolinfa sin sacrificar la vida de moluscos gasterópodos. El método fue desarrollado idealmente para *M. crenulata*, pero puede ser usado para otros gasterópodos como, *Haliotis tuberculata* y *Concholepas concholepas*, de los cuales la hemocianina ha sido también fuente de estudio (Oakes, 2005).

La mayor parte de los estudios que se han realizado acerca de *M. crenulata* están enfocados a la biomedicina, ecología o fisiología de la especie (Tabla I), en los cuales se han utilizado principalmente métodos de muestreo destructivos. Y actualmente, no se ha publicado un protocolo estandarizado para la extracción de ADN a partir de la hemolinfa de moluscos gasterópodos. Aunado a la falta de un protocolo, cabe mencionar que la información acerca de la hemolinfa en moluscos es escasa y la información específica como composición, tipo de células, cantidad de células, estructura y función es poco detallada y, aún está sujeta a investigación.

En general, los moluscos cuentan con un sistema circulatorio abierto, algunos tienen venas o conductos aferentes y eferentes, los cuales permiten una distribución de la hemolinfa oxigenada a través del organismo (Schmidt-Rhaesa, 2007). La hemolinfa se compone en mayor porcentaje de agua, en una menor proporción, de hemocitos (células sanguíneas), proteínas (e.g. KHL), iones, nutrientes (aminoácidos, carbohidratos) y residuos como hormonas u otros metabolitos.

En *M. crenulata* se reconocen dos tipos de hemocitos: granulocitos y agranulocitos (no granulocitos). De acuerdo con [Martin y colaboradores \(2007\)](#) los hemocitos son ovoides a esféricos y miden entre 7 y 9 μm de diámetro. Estos se diferencian en que los granulocitos, tal como su nombre lo dice contienen gránulos citoplasmáticos que cumplen con la función de fagocitar agentes externos, debido a que el interior de la célula se encuentra ocupado por estos gránulos, el radio nuclear se reduce en tamaño. Por otra parte, los agranulocitos tienen una pobre capacidad de fagocitar, cuentan con pocos gránulos, lo que les permite tener un radio nuclear más grande.

Tabla I. Estudios previos relacionados con *Megathura crenulata*.

Año	Título	Autor
1993	Crecimiento y reproducción de la lapa <i>Megathura crenulata</i> en la Bahía de Todos Santos, Baja California, México	Armijo-De Vega
1993	Descripción del ciclo reproductivo mediante la fecundidad absoluta y relativa de la lapa <i>Megathura crenulata</i> , Sowerby, 1825; en Punta Banda, B.C. México.	Barajas-Santinelli
1999	Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH): A biomedical review	Harris y Markl
2005	Non-lethal method for extracting crude hemocyanin from gastropod molluscs. US 6852338 B2	Oakes
2007	Structure and function of haemocytes in two marine gastropods, <i>Megathura crenulata</i> and <i>Aplysia californica</i>	Martin
2012	Mainland and Island Kelp Forests in Northern Baja California, Mexico: Subtidal Community Structure, Dynamics, and Connectivity for the Design of Marine Protected Areas.	Torres-Moye
2013	Diet of the Keyhole Limpet <i>Megathura crenulata</i> (Mollusca: Gastropoda) in Subtropical Rocky Reefs	Mazariegos-Villareal
2015	Behavioral thermoregulation and critical thermal limits of giant keyhole limpet <i>Megathura crenulata</i> (Sowerby 1825) (Mollusca; Vetigastropoda)	Díaz

JUSTIFICACIÓN

Se ha comprobado que la hemolinfa de insectos y moluscos contiene proteínas específicas que son de utilidad en tratamientos inmunológicos. Esto ha propiciado su investigación y purificación (Chung y Ourth, 2000; Dan *et al.*, 1980; Manubens *et al.*, 2010; Oakes *et al.*, 2004). *Megathura crenulata* ha destacado mayormente por la importancia biomédica de la proteína KLH y sus isoformas (KLH1 y KLH2) (Oakes *et al.*, 2004). Aunque son menos conocidas sus características nutricionales y ecológicas, cabe destacar que las lapas son una buena fuente de proteínas, vitaminas A y D, fósforo, y hierro (Mau y Jha, 2018; Miller y Robbins, 1940). Además, *M. crenulata* forma parte de los ecosistemas de bosques de macroalgas ubicados en los sustratos rocosos de la zona submareal (Hernández-Velasco *et al.*, 2018). Dentro de estos, se ha encontrado asociada a bancos de abulón (*Haliotis spp.*) y al cangrejo moteado (*Opisthopus transversus*) (Armijo de-Vega, 1993; Torres Moye, 2012).

En Baja California, la Carta Estatal Pesquera muestra un declive en la captura de *M. crenulata* a partir de mediados del 2002 (SEPESCA, 2015). A su vez, Torres Moye (2012) reportó una disminución de las poblaciones de *M. crenulata* en los bosques de macroalga (*kelp*) de la región. Algunas de las causas reportadas en relación a la disminución de las poblaciones de lapas en Norteamérica y Hawái son sobrepesca y fragmentación del hábitat (Mau y Jha, 2018). Sin embargo, la falta de información y seguimiento de *Megathura crenulata* en la Península de Baja California deja en incógnita la causa de la disminución de las capturas, ya que puede asociarse a un bajo consumo local, bajo precio de mercado, capturas no registradas o disminución de las poblaciones.

A finales de 2015, se produjeron una serie de anomalías positivas en la temperatura superficial de mar en el Pacífico Nororiental (Desde Alaska hasta Baja California Sur), estas anomalías se nombraron “El Blob”. Este fenómeno representó repercusiones en una gran cantidad de invertebrados marinos, ya que incrementó la temperatura de 1°C a 4°C

con respecto de la temperatura promedio del mar. A su vez, afectó las condiciones químicas (pH, nutriclina, red alimentaria) y biológicas (cambios en las comunidades) (Cavole *et al.*, 2016). De acuerdo con los pescadores locales, se observaron mortalidades masivas de lapa (*M. crenulata*) de hasta el 90 % en Puerto Canoas, Baja California (J. Mercado, comunicación personal, 2016).

En este sentido, los estudios genéticos constituyen una herramienta auxiliar en el establecimiento de planes de manejo de especies bentónicas (Mejía-Ruíz *et al.*, 2020); por lo que resulta de gran importancia desarrollar técnicas no destructivas que permitan obtener ADN de calidad y que sea de utilidad para la evaluación de la diversidad y la estructura genética de las especies como *Megathura crenulata*. A la fecha no se encuentra publicada una metodología que cumpla con esta estrategia.

HIPÓTESIS

Es factible extraer ADN de la hemolinfa de *Megathura crenulata* a partir de un método no destructivo con la calidad necesaria para realizar estudios genéticos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estandarizar un protocolo de extracción de ADN a partir de muestreos genéticos no destructivos en hemolinfa de *Megathura crenulata*.

Objetivos específicos

- i. Obtener ADN a partir de muestreos genéticos no destructivos de la lapa gigante *Megathura crenulata*.
- ii. Evaluar la calidad, en términos de concentración, pureza e integridad, del ADN obtenido a partir de hemolinfa.
- iii. Evaluar el éxito en la amplificación del gen mitocondrial 16S a partir de ADN obtenido de muestras de hemolinfa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Área de estudio y muestreo no destructivo

Dentro del área de distribución geográfica de *M. crenulata* (desde Punta Concepción, California (EUA) hasta Isla Asunción, Baja California Sur) la localidad seleccionada fue Isla Todos Santos (ITS) a una latitud de 31°48'39.49"N y longitud 116°48'1" W (Fig. 1).

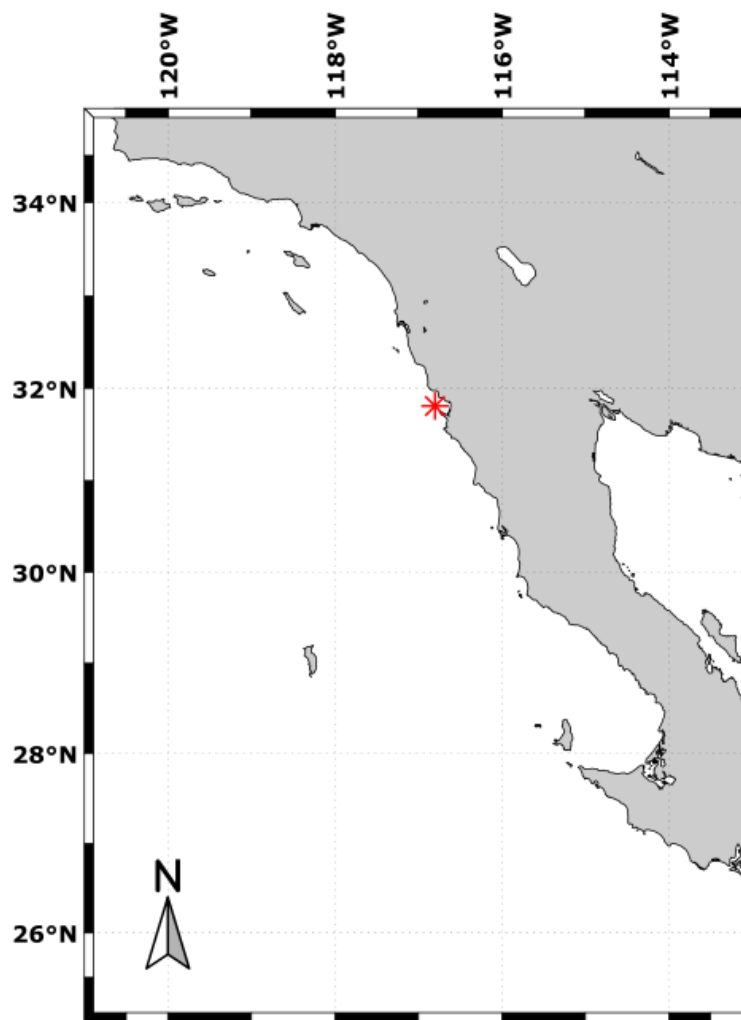


Figura 1. Mapa de distribución de *Megathura crenulata*. Punto de muestreo ITS (*).
BC, México.

A partir de buceo autónomo se colectaron 11 organismos del medio silvestre de la localidad ITS a una profundidad entre 10-15 m. Los organismos se conservaron a una temperatura alrededor de 16°C hasta su llegada al laboratorio, donde se colocaron en estanques acondicionados con una temperatura de 16°C y una salinidad de 35 ppm. Macroalga (*Macrocystis pyrifera*) y mejillón (*Mytilus californianus*) se utilizaron como alimento.



Figura 2. Ejemplares vivos de *Megathura crenulata*.

Los organismos no se manipularon durante una semana para evitar estrés fisiológico. Posteriormente, se realizó la colecta de muestras de hemolinfa mediante el método #6852338 B2 (Oakes, 2005). Antes de colectar la hemolinfa se les realizó una biometría (Fig. 2) (largo de la valva y peso húmedo). Se armó el sistema para la colecta de la hemolinfa (Fig.3) y se desinfectó con etanol al 70% los anzuelos y la zona del pie de la lapa donde se anclaron (Fig. 4). Después de 5-10 min, se tomó el set colector de sangre (Air-Tite), se colocó la parte inferior en el tubo Eppendorf estéril y se introdujo la jeringa (21 G $\frac{3}{4}$ ") en un espacio entre la rádula y el pie (Fig. 3). La hemolinfa fluyó por gravedad

hacia el tubo, hasta completar los 2 mL de muestra. Las muestras se preservaron a -20°C hasta su análisis en el Laboratorio de Genética Acuícola del Departamento de Acuicultura de CICESE. La herida del organismo fue desinfectada con etanol al 70% y los organismos fueron colocados en los estanques acondicionados para su recuperación.

No se agregó ningún tipo de anticoagulante para evitar problemas durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), ya que se ha reportado que reactivos como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y heparina causan inhibición (Schrader *et al.*, 2012).



Figura 3. Técnica de muestreo de *M. crenulata* (Oakes, 2005).

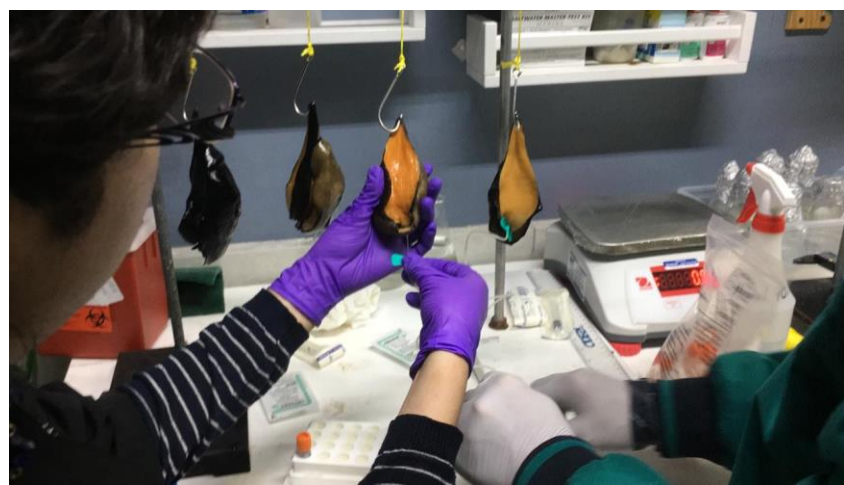


Figura 4. Inserción del set colector de sangre (hemolinfa).

2. Pruebas de extracción de ADN (genómico) a partir de la hemolinfa

Las alícuotas de hemolinfa estuvieron almacenadas de uno a seis meses después de su extracción. Las muestras de hemolinfa se procesaron con dos kits comerciales: DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN) y Cell and Tissue DNA (KingFisher). El primer kit, consiste en una columna de centrifugación (DNeasy Mini), a través de dicha columna se hace la purificación (lavados) del ADN, la columna incluye una membrana de sílice (Fig.5) la cual retiene el ADN y deja pasar todos los contaminantes restantes, fáciles de descartar.

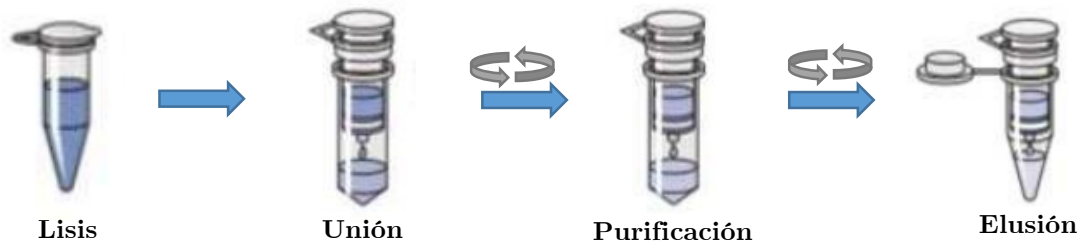


Figura 5. Esquema de las etapas de extracción de ADN con el kit QIAGEN.

El segundo kit (KingFisher), consiste en una extracción de ADN más automatizada a partir del uso de un instrumento que minimiza la manipulación de las muestras, el método funciona a partir de perlas magnéticas que recuperan el ADN (Fig. 6).

La hemolinfa es análoga a la sangre, pero difiere en composición, por lo cual, se utilizaron como guía de punto de partida los protocolos para eritrocitos (sangre de vertebrados) que los kits proporcionan. La estandarización consistió en modificar los tiempos e intensidad de centrifugación, lisis y los volúmenes de muestra (10 – 500 μ L). Se experimentó con cuatro diferentes velocidades de centrifugación (Tabla II), de las cuales se seleccionó la de 12,000 rpm.

Las muestras se procesaron con cada kit, siguiendo los protocolos recomendados por los fabricantes (QIAGEN, 2005; Thermo Fisher Scientific, 2015) y otras muestras

recibieron un pre-tratamiento, el cual consistió en centrifugar 500 μL de hemolinfa a 12,000 rpm (Fig. 7) durante cinco minutos a 4°C. Posteriormente, se removió el sobrenadante (400 μL) y se recuperaron 100 μL . A las muestras se les agregó 1.5 μL de ARNasa (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron durante 40 min.

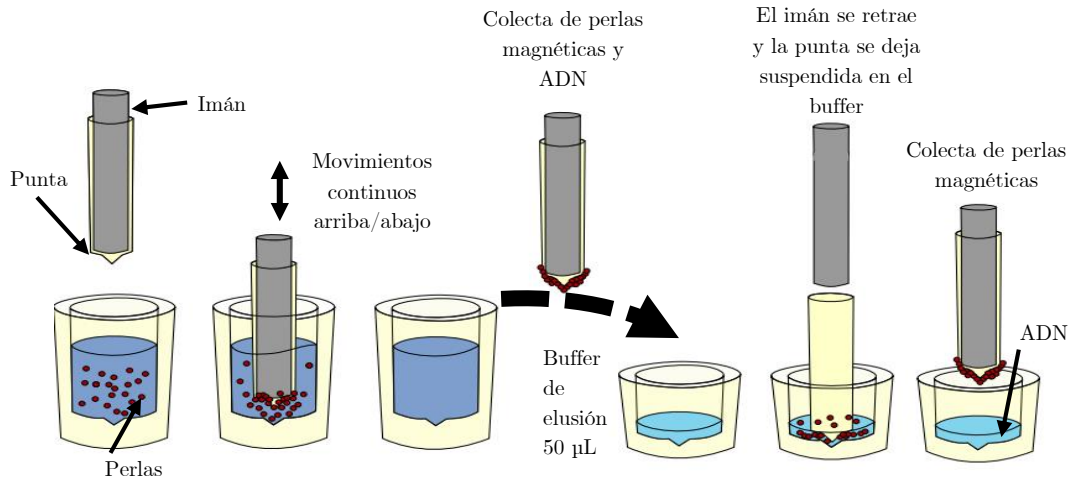


Figura 6. Esquema simplificado de procesamiento de muestras con KingFisher, modificado de [Thermofisher \(N16621\)](#).

Tabla II. Pruebas con centrifugación y tiempos, volumen utilizado: 200 μL . Centrifuga Eppendorf (Modelo 5415R). Temperatura controlada (4°C).

Prueba	Centrifugación (rpm)	Tiempo (min)
1	800	30'
2	1,600	15'
3	10,000	5'
4	12,000	5'

DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN)

Con el método de QIAGEN se trabajó un total de 5 muestras. Se trabajó con volúmenes de 10, 20 y 100 μL (centrifugada) de hemolinfa. Para la lisis celular se utilizó 10 μL de proteinasa K (QIAGEN), PBS (buffer fosfato salino) y buffer de lisis (buffer AL[®], QIAGEN). Se agitaron e incubaron a 56°C durante 10-15 minutos hasta que el pellet fue lisado por completo. Posteriormente, se agregó 200 μL de etanol (99%) a las muestras y se homogenizó con ligeras palmadas. El homogenizado (620 μL) se pipeteo dentro de la columna de centrifuga (DNeasy), puesta sobre el tubo colector de 2 mL.

La clarificación del ADN se realizó centrifugando a 8,000 rpm durante 1 min. Se descartó el tubo colector con residuos celulares y la columna que contenía el ADN unido a la membrana de la columna se pasó a un nuevo tubo colector. Para la purificación del ADN se agregó 500 μL de buffer AW1 (buffer de lavado) y se centrifugó durante 1 min a 8,000 rpm, de la misma forma se descartó el tubo colector. La columna se colocó en un nuevo tubo de centrifugación y se agregó 500 μL de buffer AW2 (buffer de lavado). La última centrifugación se realizó a 13,000 rpm durante 4 min, hasta secar por completo la membrana. Se colocó la columna en un tubo Eppendorf y se pipeteó 30 μL de buffer AE (buffer de suspensión del ADN) directamente sobre la membrana. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 min y luego se centrifugó a 8,000 rpm hasta eluir.

Cell and Tissue DNA (KingFisher)

Con el kit de KingFisher se utilizaron seis muestras (Tabla III) con 100 μL de muestra centrifugada de hemolinfa. Para la mezcla de lisis se utilizó 50 μL del buffer de lisis de KingFisher (cloruro de guanidino, polietileno-glicol). Posteriormente, se agregó 1.5 μL de ARNasa (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó durante 40 min a 37°C. Se agregó 10 μL de proteinasa K del kit QIAGEN (KingFisher no la incluye).

Tabla III. Especificaciones muestras de hemolinfa procesadas con el kit de KingFisher.

Muestra	Tiempo de Lisis	Proteinasa K (QIAGEN)
LK1	40'	Sí
LK2	40'	Sí
LK3	40'	Sí
LK4	40'	Sí
LK6	40'	Sí
SLK1	0	No
SLK2	0	No
SLK3	0	No
SLK4	0	No
SLK5	0	No
SLK6	0	No

Se preparó la placa como se muestra en la tabla IV y V, y se colocó en el instrumento, al mismo tiempo que se colocó la tira de elusión, la cual se cargó con 50 μL de buffer de elusión. En la etapa de purificación se añadió perclorato de sodio, el cual funciona en el kit de KingFisher como buffer de unión.

Tabla IV. Preparación de la placa (Microtiter deep well 96 plate).

Placa	Línea	Nombre de Línea	Contenido	Volumen
Placa de muestras	A	Muestra	Hemolinfa Buffer de Lisis Proteinasa K*	100 µL 50 µL 10 µL
	B	Puntas	Peine 12 puntas	-
	C	-	-	-
	D	-	-	-
	E	-	-	-
	F	Buffer de lavado 1_1	Buffer de lavado 1	450 µL
	G	Buffer de lavado 1_2	Buffer de lavado 1	400 µL
	H	Buffer de lavado 2	Buffer de lavado 2	400 µL

*Sólo se agregó a muestras con lisis.

Tabla V. Adición de reactivos en la etapa de purificación del ADN.

Línea	Nombre de Línea	Contenido	Reactivo
A	Muestra	Perlas Magnéticas	12.5 µL
		Buffer de unión	200 µL

3. Evaluación ADN

Para evaluar el éxito de la extracción y la calidad del ADN obtenido, se cuantificó la concentración (ng/µL) y pureza (260/280) del ADN mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop Termo Fisher (ND 2000). Asimismo, se evaluó la integridad (tamaño) mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% por 60 min a 80 V con buffer SB (Brody y Kern, 2004) a una concentración de 1X, las muestras se tiñeron con gelRed y se usó como referencia un marcador de peso molecular de 1 kb (Promega). Como control positivo se utilizó muestra de branquia de *M. crenulata* y tentáculo epipodial de abulón amarillo (*Halotis corrugata*). Para finalizar esta etapa, se visualizó el gel mediante el fotodocumentador (BioRad).

4. Amplificación del gen 16S

Mediante la técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés) se amplificó el gen mitocondrial 16S. Las concentraciones, cebador y condiciones se muestran en las tablas de la VI - IX, respectivamente. El equipo de amplificación que se utilizó fue el termociclador punto final T100 (BioRad).

5. Determinar el mejor procedimiento de extracción de ADN.

Una vez realizadas las pruebas de extracción y amplificación del gen mitocondrial 16S se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, y se evaluaron las ventajas y desventajas de cada método con el fin de determinar el procedimiento más efectivo.

Tabla VI. Concentraciones para el mix de PCR.

C_i	Compuesto	C_f	Muestra [1x]
	Agua PCR		*
10x	Buffer PCR (contiene $MgCl_2$)	1x	1.25
2.5 mM	dNTP's	0.2	1.0
10 μM	Cebador F	0.2	0.3
10 μM	Cebador R	0.2	0.3
5 $U \cdot \mu L^{-1}$	Taq polimerasa	0.1	0.1
$ng \cdot \mu L^{-1}$	ADN genómico		*
			$V_f = 12.5 \mu L$

C_i – Concentración inicial; C_f – Concentración final; V_f – Volumen final.

*Valores de agua y ADN genómico se ajustaron para obtener un volumen final de 12.5 μL

Tabla VII. Secuencia de cebador para el gen mitocondrial 16S (universal) (Palumbi *et al.*, 2002), tamaño esperado del fragmento: 560 bp.

Gen	Cebador	Secuencia 5' – 3'
16S	16SAR	CGCCTGTTTATCAAAAACAT
	16SBR	CCGGTCTGAACTCAGATCACGT

Tabla VIII. Condiciones de amplificación para el gen mitocondrial 16S.

Desnaturalización inicial	Ciclos (°C, tiempo)	Extensión final	Conservación
94 °C, 3'	10 ciclos (94°C, 1'; 40°C,1'; 72°C,2')	72°, 10'	12°C, ∞
	30 ciclos (94°C, 1'; 47°C,1'; 72°C,2')		

Tabla IX. Condiciones del programa optimizadas para el gen mitocondrial 16S.

Desnaturalización inicial	Ciclos (°C, tiempo)	Extensión final	Conservación
94 °C, 3'	30 ciclos (94°C, 1'; 56°C,1'; 72°C,1')	72°, 5'	12°C, ∞

RESULTADOS

Como resultado de este estudio se obtuvo un protocolo final para la extracción de ADN que puede ser utilizado con ambos kits. A continuación, se describen los pasos a seguir para implementar este protocolo:

1. Realizar el pre-tratamiento de las muestras de hemolinfa, el cual consiste en centrifugar las alícuotas de 500 μL (en el caso de trabajar con 100 μL de precipitado) a 12,000 rpm durante cinco minutos a temperatura controlada 4 $^{\circ}\text{C}$.
2. Agregar buffer de lisis (correspondiente al kit que se utilice) y el tratamiento de ARNasa 1.5 μL (e.g. 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubar durante 40 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. Incubar por más de este tiempo puede causar fragmentación y degradación de las muestras (Fig. 9).
3. En este experimento no hubo diferencias notables en la razón de pureza (260/280) al utilizar proteinasa K en las muestras con lisis (Tablas XII y XIII), así que su uso puede ser omitido. El periodo de tiempo recomendado de incubación es de 40 min a 56 $^{\circ}\text{C}$.
4. Posteriormente, se pueden seguir las recomendaciones del proveedor del kit, en relación a la clarificación, purificación y concentración del ADN.
5. En la etapa final de suspensión del ADN, en el buffer de elusión se recomienda utilizar un volumen de 30 – 50 μL (menor al recomendado por los proveedores), ya que es muy baja la concentración de ADN que se logra recuperar, generalmente, menor a 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Es importante mencionar que se recomienda utilizar una alternativa para sustituir el buffer de elusión de KingFisher, ya que este no permite conservar las muestras de ADN a largo plazo (mayor a dos meses). Por otra parte, el buffer de elusión de Qiagen no mostro fragmentación ni degradación (hasta en muestras conservadas desde el 2016).

Como recomendación adicional al muestreo de hemolinfa propuesto por [Oakes \(2005\)](#) se sugiere hacer alícuotas de 500 μL (se pueden coleccionar hasta un máximo de 4 alícuotas por organismo), para evitar congelar y descongelar las muestras constantemente durante su posterior uso. Las alícuotas pueden ser preservadas sin ningún aditivo (e.g. EDTA) a una temperatura de -20°C hasta por un periodo de seis meses.

A continuación, se muestra con mayor detalle los resultados de cada prueba:

Muestreos genéticos no destructivos

El protocolo utilizado para la colecta de hemolinfa US #6852338 B2 ([Oakes, 2005](#)), fue empleado correctamente debido a que se logró coleccionar la hemolinfa y el 100% de los organismos (Tabla X) de la localidad de ITS sobrevivió por varios meses después del tratamiento. Los organismos no mostraron cambios notables en su comportamiento, durante las tres semanas de observación. En las cuales fueron mantenidos en estanques a una salinidad de 35 ppm, temperatura entre 16 y 18°C con oxigenación continua; alimentados con macroalgas con briozoarios por los hábitos omnívoros de esta lapa. Sin embargo, después de las tres semanas de mantenimiento, se presentó un problema con el suministro de alimento, lo cual se vio reflejado en una disminución del peso de los organismos.

Tabla X. Biometría del muestreo de *M. crenulata*.

Muestra	Largo (cm valva)	Ancho (cm valva)	Peso (g)
1	6.6	4.0	94.5
2	7.5	6.6	98.5
3	8.3	7.5	180.0
4	7.9	8.3	136.5
5	8.0	7.9	133.5
6	8.8	5.7	295.5
7	8.8	5.8	222.5
8	8.2	5.4	188.0
9	9.0	5.6	237.5
10	9.0	5.9	220.5

Pruebas de extracción de ADN (genómico) a partir de la hemolinfa

Cuando las muestras no se centrifugaron las concentraciones de ADN fueron menores a 10 ng/ μ L (muestras 1Q, 2Q, 3Q, Tabla XI). Por lo cual, se decidió optar por centrifugar las muestras (Tabla XI). El volumen de muestra de hemolinfa que se centrifugó al inicio fue de 200 μ L, pero el pellet (precipitado) que se formó era casi imperceptible (\sim 1 mm) y la mayor parte de la muestra consistía en el sobrenadante. Los resultados con un volumen de 500 μ L permitieron obtener un pellet de mayor tamaño (\sim 3 mm, Fig. 7). El pellet formado en la muestra de hemolinfa a 10,000 y 12,000 rpm fue similar en tamaño, por lo cual se seleccionó la velocidad de 12,000 rpm. Se obtuvo un pellet de diferente tamaño en cada muestra, a pesar centrifugar el mismo volumen (Fig. 7). El resumen de las pruebas realizadas se muestra en la Tabla XIV.

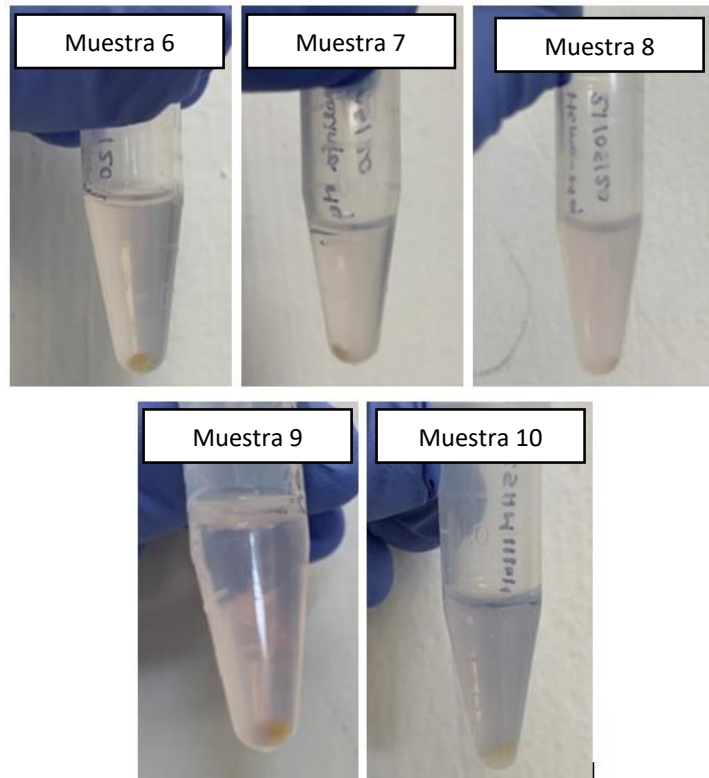


Figura 7. Pellet obtenido después de centrifugar las muestras de hemolinfa (Tabla X, correspondiente a las lapas de la 6 a la 10). Alícuotas centrifugadas a 12,000 rpm durante 5 min a 4 °C.

Evaluación ADN

DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN)

Como se mencionó en la metodología, al inicio de la estandarización se utilizó el kit comercial de QIAGEN, los valores obtenidos con este kit fueron poco favorables debido a que no se realizó un pre-tratamiento previo a las muestras ya que se utilizó el volumen recomendado (5-20 μL), esto resultó en valores de concentración menores a 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$. Mientras que, en las muestras de mayor volumen (100 μL) y a las que se les realizó pre-tratamiento tuvieron concentraciones mayores a 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$ (Tabla XI).

Tabla XI. Resultados de extracción de ADN con el kit de extracción QIAGEN (Q) usando diferentes volúmenes de muestra.

Muestra	Hemolinfa (μL)	Concentración ADN (ng/μL)	260/280
LQ1	10	1.0	1.04
LQ2	20	2.5	1.31
LQ3	20	5.0	1.83
LQ4	100	42.9	1.75
LQ5	100	62.0	1.90

Debido a las bajas concentraciones obtenidas con el kit de QIAGEN, se decidió realizar el pre-tratamiento de las muestras; centrifugar la muestra de hemolinfa y de esta forma precipitar una mayor cantidad de células en el tubo Eppendorf. Asimismo, se realizó lisis y se utilizó un volumen de 100 μL para la obtención del pellet (precipitado). Las muestras con pre-tratamiento brindaron mayores concentraciones de ADN (de 7-62 ng/μL; Tabla XII). En cuanto a la relación 260/280 estuvieron alrededor de 1.6 – 1.9, lo cual puede indicar la presencia de proteínas (e.g. KLH). En cuanto a la integridad, las muestras de ADN extraídas con QIAGEN presentaron una buena integridad, sin y con pre-tratamiento de las muestras, y se observó poca fragmentación en los geles de ADN genómico (Figs. 8 y 9).

Tabla XII. Extracciones de ADN centrifugadas y procesadas con el kit QIAGEN (Q) en muestras con pre-tratamiento (centrifugadas, RNAasa, lisis).

Muestra	Hemolinfa (μL)	Concentración ADN ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	260/280
LQ1	100	7.0	1.7
LQ2	100	42.9	1.74
LQ3	100	17.3	1.8
LQ4	100	18.5	1.54
LQ5	100	62.0	1.9

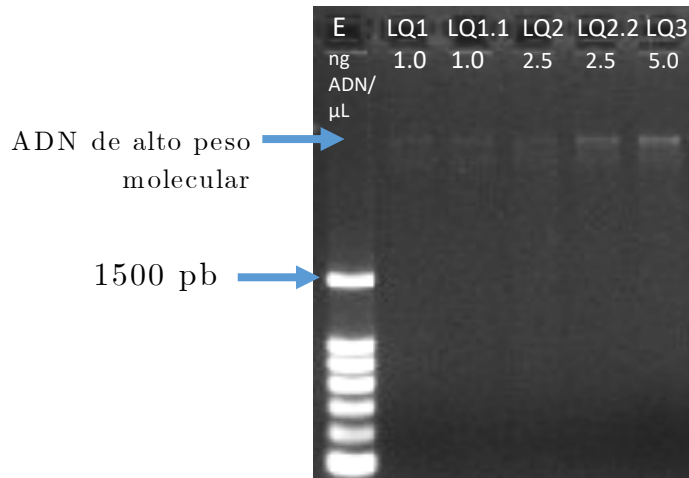


Figura 8. ADN genómico obtenido con kit QIAGEN (Q). Muestras sin centrifugar previo a la extracción. ADN extraído de hemolinfa (LQ1, LQ2, LQ3) y su respectiva réplica (LQ1.1, LQ2.2), excepto para Q3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Escalera Promega (E).

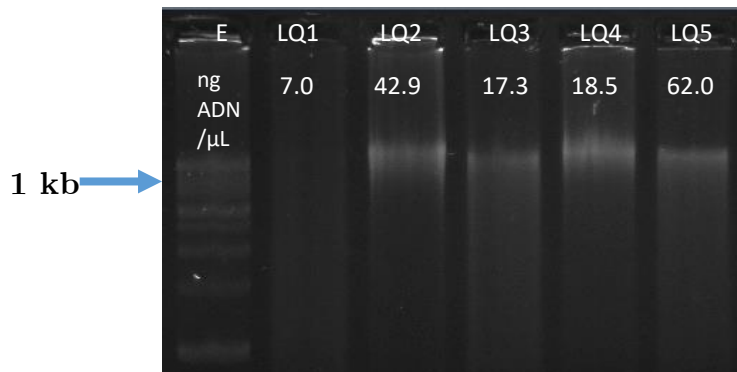


Figura 9. ADN genómico kit QIAGEN, muestras con pre-tratamiento (centrifugación, RNAasa). ADN extraído de hemolinfa (LQ1 – LQ5). Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Escalera Promega (E).

Cell and Tissue DNA (KingFisher)

Al igual que las muestras de QIAGEN, las muestras procesadas con el kit de KingFisher y con el pre-tratamiento brindaron mejores resultados en cuestión de concentración, obteniéndose concentraciones de ADN que variaron de 25.6 a 132.9 ng/ μL (Tabla XIII). La integridad del ADN varió en cada muestra, todas las muestras presentan una banda definida de alto peso molecular y fragmentación del ADN, a excepción de la muestra K6 (Fig. 10), lo cual se asocia a un error en el pipeteo de la muestra al momento de cargar las muestras en el gel de agarosa. Algo que puede provocar mayor fragmentación de las muestras es exceder el tiempo de lisis (Fig. 11), un tiempo mayor a 40 min puede provocar la desintegración del ADN.

Tabla XIII. Resultados de extracción de ADN con el kit de extracción KingFisher (K) (Fig 11).

Muestra	Concentración (ng/ μ L)	260/280
LK1	132.9	1.81
LK2	100.6	1.75
LK3	58.1	1.66
LK4	44.3	1.74
LK5	25.6	1.71
K1	77.3	1.79
K2	44.8	1.72
K3	40.5	1.62
K4	43.9	1.69
K5	79.9	1.70
K6	96.9	1.73

LK – Muestras lisadas KingFisher; K – Muestras procesadas con Kingfisher (sin lisis).

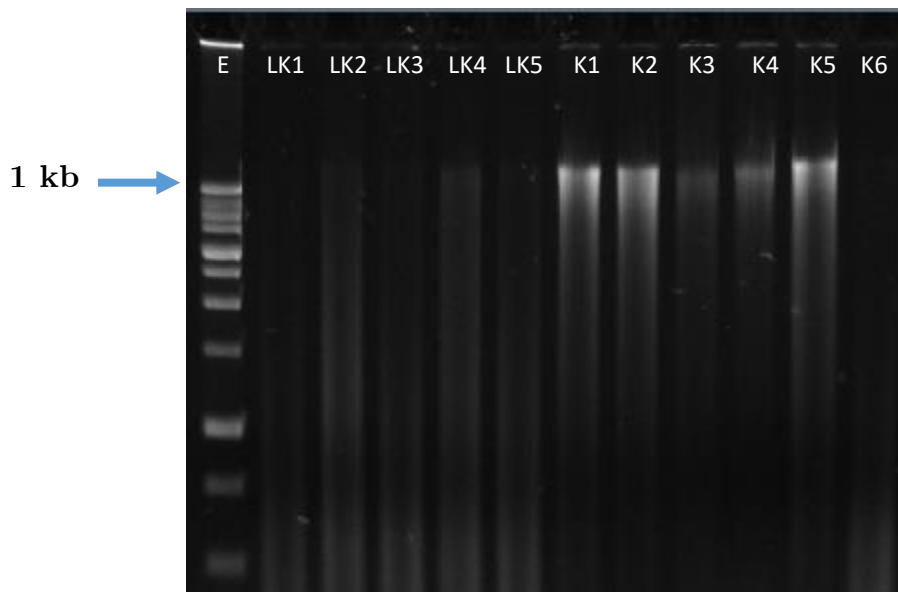


Figura 10. ADN genómico extracciones con KingFisher con pre-tratamiento (centrifugado y RNAasa), ejemplo de tiempo de lisis excedido. Muestras con nomenclatura LK fueron lisadas durante 60 min, mientras que en muestras K no se les realizó lisis. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Escalera Promega (E).

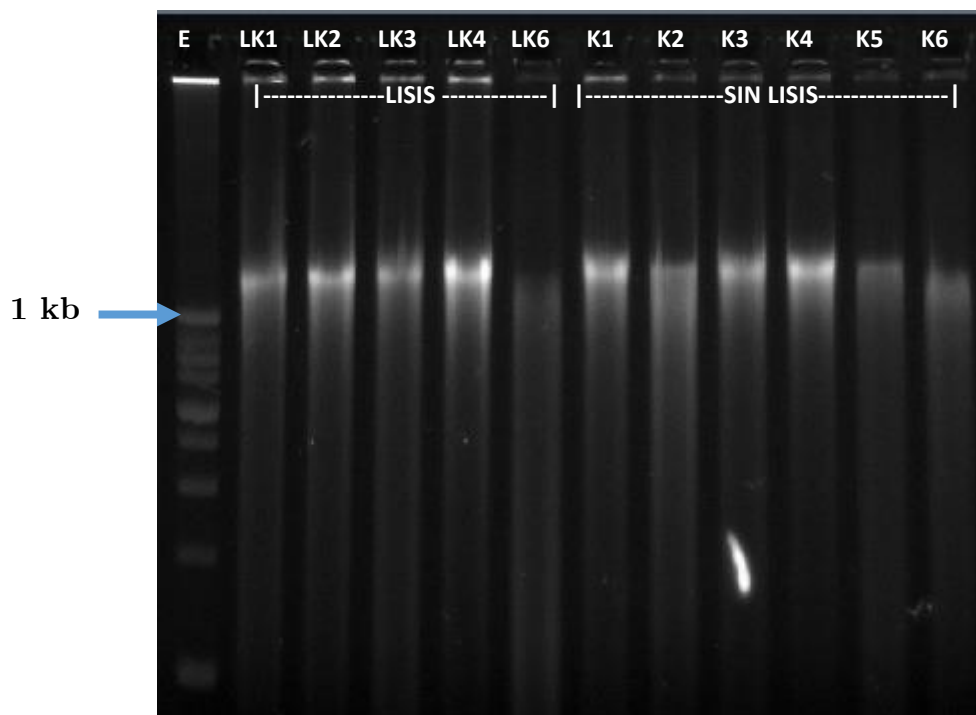


Figura 11. ADN genómico de muestras procesadas con KingFisher (K) con lisis (L) y sin lisis. Concentración 100 ng/ μ L. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Escalera Promega (E).

Tabla XIV. Resumen de pruebas de extracción.

Tipo de prueba	Observaciones	Resultado
Volumen de muestra	-	El incremento de muestra no siempre resulta en una mayor cantidad de ADN
Centrifugación	Formación de pellet	Incremento de ADN de \sim 30 ng
Tiempo de lisis	El pellet formado durante la centrifugación fue lisado después de 10-15 min.	Con una lisis de menor duración se obtuvo una mayor concentración (ng/ μ L) de ADN

Amplificación del gen mitocondrial 16S

Para la amplificación del gen mitocondrial 16S se seleccionaron las muestras con mejor rendimiento de ambos kits, con mayor concentración de ADN y pureza: las muestras 2Q y 5Q (QIAGEN con lisis), 1LK y 2LK (KingFisher con lisis), 5K y 6K (KingFisher sin lisis). Se puede observar que las muestras de ambos métodos amplificaron (Fig. 12). El tamaño del fragmento esperado del gen mitocondrial 16S para las muestras y el control positivo es de alrededor de 560 pares de bases (pb). Las muestras de QIAGEN (Q) presentan bandas con barrido que representan una mayor cantidad de ADN con respecto a las de KingFisher (K y LK). Las condiciones de PCR fueron reducidas de 40 ciclos a 30 ciclos (Tabla VIII y IX), debido a que en ocasiones se obtenían bandas inespecíficas a pesar de que, los primers usados son universales.

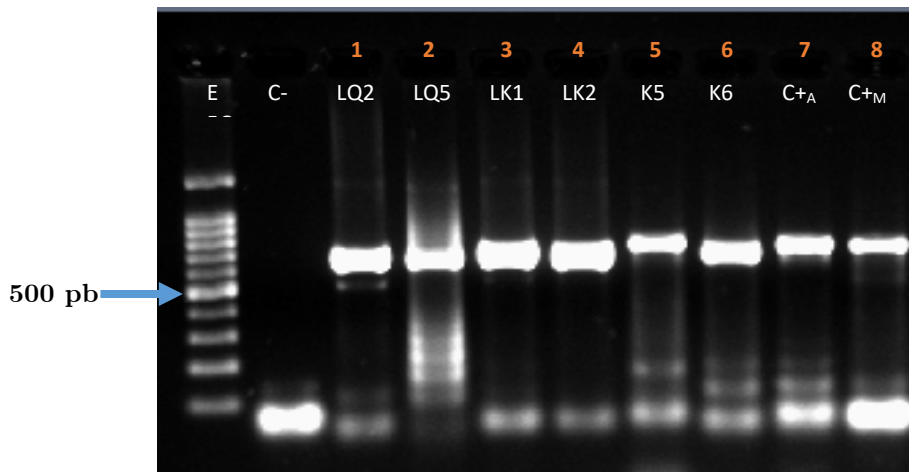


Figura 12. Productos de amplificación del gen mitocondrial 16S en muestras de ADN de lapa extraídas con kit QIAGEN (LQ2, LQ5) y King Fisher (K). Muestras con Lisis (LK1, LK2) y sin lisis (K5, K6). Controles: negativo (C-) de reactivos y positivos (C+) de abulón amarillo (A) y lapa (M). Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Concentración muestras 50 ng/ μ L. Escalera Promega de 100 pb (E).

DISCUSIÓN

En los métodos destructivos suelen utilizarse diferentes órganos o secciones del organismo para extraer el ADN, como puede ser branquia, tentáculos y tejido muscular, entre otros. Al realizar estudios que involucran un mayor tamaño de muestra poblacional, como son los estudios de diversidad genética, es necesario sacrificar una mayor cantidad de organismos. Esto debido al tamaño de muestra ($n > 20$) que se necesita para hacer inferencias estadísticas más robustas. En el estudio realizado por [Torres Moye \(2012\)](#), donde *M. crenulata* fue una de las especies bentónicas analizadas, se describe la colecta de muestras mediante la disección de una parte del pie del organismo; sin embargo, no se especifica cuanto se diseccionó, ni tampoco ningún seguimiento de la supervivencia de los organismos.

Anteriormente, se mencionó que la sangre era uno de los métodos no destructivos más utilizados en el caso de los vertebrados. Algunos de los problemas técnicos de extraer ADN de muestras como sangre, es que se obtiene una baja cantidad en el rango de los nanogramos (10^{-9} g) de ADN, por lo cual las condiciones de PCR tienen que ser también estandarizadas para lograr obtener un producto de amplificación a partir del escaso material genético (e.g. aumentar número de ciclos, aumentar reactivos como Mg, dinucleótidos, etc.) ([Cornejo Romero, Serrato Díaz, Rendón Aguilar, y Rocha Munive, 2014](#); [Taberlet y Luikart, 1999](#)).

Por otra parte, cuando se utilizan pelo o heces de animales, la cantidad de ADN total disponible para pruebas posteriores puede ser muy bajo (en el orden de los picogramos, 10^{-12} g), lo cual puede llevar a errores al detectar homocigotos en el genotificado de estas muestras ([Taberlet y Luikart, 1999](#)). Asimismo, se ha logrado obtener ADN de heces y mucus del tracto gastrointestinal de *M. crenulata* a partir de muestreos no destructivos, pero de baja concentración de ADN (< 20 ng/ μ L); sin embargo, los resultados con este material son inconsistentes y poco reproducibles. Esto debido a que

el mucus del tracto digestivo y las heces suelen contener inhibidores, tales como, polisacáridos, clorofila originaria de plantas (e.g. algas marinas), sales, glicolípidos, por mencionar algunos (Schrader *et al.*, 2012). En el caso de *M. crenulata*, pruebas preliminares realizadas con ADN obtenido a partir de mucus, **evidencian la presencia de inhibidores** que no permiten la amplificación del gen mitocondrial 16S, mientras que con ADN obtenido de branquias (control positivo) por muestreo destructivo resulta en una amplificación exitosa del producto esperado (Fig. 13).

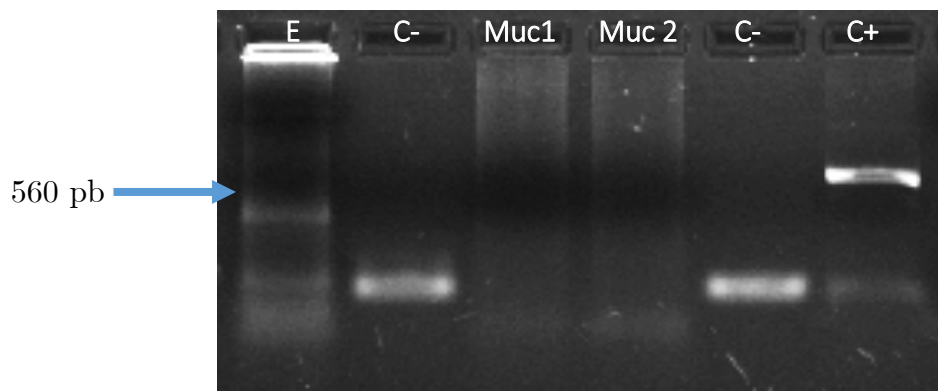


Figura 13. Producto de amplificación de PCR del gen mitocondrial 16S a partir de ADN obtenido de mucus de *M. crenulata* (Muc1 y Muc2). Electroforesis en gel de agarosa 1.5 %. Controles negativos (C-) de reactivos y positivo (C+) de ADN obtenido de branquia de *M. crenulata*. Escalera Promega de 100 pb (E).

La anatomía de *Megathura crenulata* es similar al género *Haliotis*, especie de la cual se remueven los tentáculos epipodiales para la extracción de ADN. Sin embargo, *M. crenulata* sólo posee dos tipos de tentáculos cefálicos, los cuales cumplen con una importante función sensorial y vital para su supervivencia (Marshall y Hodgson, 1990). Debido a lo anterior, la opción de muestreo más viable que se consideró en este estudio para la extracción de ADN fue la hemolinfa, que además cuenta con el método descrito y patentado por Oakes (2005).

En la sangre de vertebrados (hemoglobina) la fracción de elementos celulares es de aproximadamente el 45% y este porcentaje es conformado por los eritrocitos (glóbulos rojos), los leucocitos (glóbulos blancos) y los trombocitos (plaquetas) (Koolman y Röhm, 2005). Al igual que la hemolinfa, los leucocitos son las únicas células sanguíneas de las cuales se puede extraer ADN. Sin embargo, no existe un estudio definido acerca del porcentaje de leucocitos que componen la hemolinfa, por lo cuál es más difícil inferir un volumen de muestra idóneo para obtener la cantidad de ADN suficiente para estudios moleculares. El volumen final obtenido con el kit QIAGEN fue de 40-50 μL con concentraciones que varían de 7 a 62 ng de ADN por μL , mientras que con el kit KingFisher se obtuvo un volumen final de 30-40 μL con concentraciones de los 25 a los 133 ng de ADN por μL .

Es importante centrifugar la hemolinfa como un pre-tratamiento de muestras, porque de esta forma todas las células distribuidas en la hemolinfa quedan en la parte inferior del tubo de eppendorf (Fig. 7), esto permite formar un pellet que contiene en su mayor parte células (leucocitos) y algunas proteínas (e.g. KHL), mientras que el plasma (agua y restos celulares) queda en la parte superior del tubo. El centrifugado fue a una velocidad de 12,000 rpm, se podría utilizar una mayor velocidad o tiempo, pero en este experimento las condiciones permiten obtener visualmente un pellet, del cual se puede extraer ADN.

Cabe señalar que, en este estudio, las muestras de hemolinfa de *M. crenulata* no se coagularon después del muestreo ni durante la extracción de ADN, a pesar de no agregar ningún anticoagulante. Esto coincide con las observaciones descritas por Martin y colaboradores (2007). Dicho estudio, muestra que los hemocitos de la hemolinfa de *M. crenulata* pueden permanecer más de 1 hora a temperatura ambiente sin coagularse. Es importante mencionar que las muestras estuvieron conservadas a una temperatura de -20°C y estuvieron a temperatura controlada (16°C a 20°C temperatura del laboratorio) cuando se manipularon. Sin embargo, en la hemolinfa del mejillón (*Mytilus trossulus*)

existe evidencia de que se puede utilizar etanol al 96% como conservador, y no tiene repercusiones posteriores en cuestión de inhibición de la PCR (Yanick y Heath, 2000).

A pesar que el costo de procesamiento de la muestra por el protocolo de sales es más económico (alrededor de 50 MXN por muestra), se decidió utilizar estos kits por las ventajas que brindan en cuestión de pureza (Cornejo Romero *et al.*, 2014; QIAGEN, 2005; Thermo Fisher Scientific, 2015). Estos kits comerciales utilizan soluciones que no contienen fenol y permiten obtener mejores resultados que los métodos tradicionales, los cuales utilizan fenol, cloroformo y el alcohol isoamílico que pueden contaminar el ADN en el proceso de purificación (Cornejo Romero *et al.*, 2014; Eguiarte, Souza, y Aguirre, 2007) y además son nocivos para la salud de los operadores. Por otra parte, los actuales protocolos de secuenciación masiva requieren muestras de ADN obtenidas con kits comerciales para garantizar el éxito en los procedimientos.

El kit de KingFisher (*Cell and Tissue DNA*) proporciona ventajas en cuanto al tiempo, limpieza y bajas probabilidades de errores de contaminación debido a que involucra poca manipulación de las muestras. Sin embargo, el ADN genómico obtenido presenta fragmentación en todas las muestras (Fig. 10 y 11) y con los diferentes tratamientos, además de esto, la mayor desventaja es que el buffer de elusión no permite conservar muestras a largo plazo, ya que después de dos meses se observó una degradación del ADN en las seis alícuotas generadas en este estudio. En cambio, el kit de QIAGEN (*DNeasy Blood and Tissue*) permite obtener ADN genómico más integro (Fig. 8 y 9) a pesar de utilizar volúmenes mínimos de 10-20 μL , y hasta 100 μL . Cabe mencionar que se ha comprobado que el buffer de elusión del kit de QIAGEN es muy útil para conservar muestras a largo plazo, ya que el control positivo (branquia *M. crenulata*) fue procesado con este kit desde el 2016 y continúa dando buenos resultados de amplificación. La diferencia en composición de cada buffer de elusión es difícil de comparar, ya que QIAGEN sí comparte la composición del buffer (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0.), pero KingFisher no muestra la composición del reactivo (formula cerrada y patentada).

Adicionalmente, se realizó un análisis del costo de extracción con los diferentes kits comerciales, obteniéndose que el precio del kit de QIAGEN para 250 muestras tiene un costo de \$23,929.00 MXN, siendo el costo por muestra \$95.71 MXN. En contraste, el kit de KingFisher tiene un costo de \$16,243.00 MXN para 100 reacciones (ca. 250 muestras el costo sería un total de \$48,729.00 MXN), por lo cual el costo de muestra sería más del doble que el anterior, con un costo de \$194.16 MXN por muestra. Además del valor adicional del equipo KingFisher Duo Prime, donde se realiza la extracción que asciende a alrededor de los \$500,000.00 MXN y el resto de los consumibles que no fueron cuantificados.

CONCLUSIONES

Es factible extraer ADN de buena calidad y pureza a partir de hemolinfa de *M. crenulata* sin sacrificar ni afectar al organismo, utilizando kits comerciales (*DNeasy Blood and Tissue* – QIAGEN y *Cell and Tissue DNA* - KingFisher).

Con ambos kits comerciales se obtiene ADN, sin embargo, es más recomendable el uso del kit *DNeasy Blood and Tissue* de QIAGEN porque ofrece una mayor calidad del ADN genómico y un menor costo por muestra (\$95.71 MNX).

El ADN extraído es adecuado en cantidad (volumen y concentración) y calidad (pureza e integridad) para realizar estudios moleculares posteriores como: identificación de especies, genética poblacional, análisis parental y otros, con la técnica de PCR u otras técnicas de nueva generación (RAD-Seq, secuenciación genómica, etc).

Es importante seguir implementando protocolos de muestreo y extracción de ADN no destructivos para otras especies de importancia ecológica y socio-económica, principalmente aquellas bajo estatus de protección y conservación, que permitan evaluar y analizar las poblaciones sin comprometer a la especie de estudio.

REFERENCIAS

- Armijo de-Vega, C. (1993). Crecimiento y reproducción de la lapa *Megathura crenulata* en la Bahía de Todos Santos, Baja California, México. Universidad Autónoma de Baja California.
- Ball, A. O., y Chapman, R. W. (2003). Population genetic analysis of white shrimp, *Litopenaeus setiferus*, using microsatellite genetic markers. *Molecular Ecology*, 12(9), 2319–2330. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01922.x>
- Brody, J. R., y Kern, S. E. (2004). Sodium boric acid: a Tris-free , cooler conductive medium for DNA electrophoresis. 36(2), 1–2.
- Cavole, L. M., Demko, A. M., Diner, R. E., Giddings, A., Koester, I., Pagniello, C. M. L. S., ... Franks, P. J. S. (2016). Biological Impacts of the 2013–2015 Warm-Water Anomaly in the Northeast Pacific. *Oceanography*, 29(2), 273–285. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/24862690>
- Chung, K. T., y Ourth, D. D. (2000). Viresin. A novel antibacterial protein from immune hemolymph of *Heliothis virescens* pupae. *European Journal of Biochemistry*, 267(3), 677–683. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01034.x>
- CONABIO. (2007). Bahía de la Paz. Ficha técnica para la evaluación de los sitios prioritarios para la conservación de los ambientes costeros y oceánicos de México. Retrieved from www.conabio.gob.mx/gap/images/f/f4/28_Bahia_la_Paz.pdf
- Cornejo Romero, A., Serrato Díaz, A., Rendón Aguilar, B., y Rocha Munive, M. G. (2014). Herramientas moleculares. In SEMARNAT. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Dan, H., Steiner, H., Rasmuson, T., y Boman, H. (1980). Insect Immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized

pupae of *Hyalophora cecropia*. European Journal of Biochemistry / FEBS, 16(106), 7–16.

De la Rosa-Vélez, J., Escobar-Fernández, R., Correa, F., Maqueda-Cornejo, M., y De la Torre-Cueto, J. (2000). Genetic structure of two commercial penaeids (*Penaeus californiensis* and *P. stylirostris*) from the Gulf of California. Fishery Bulletin, 98, 674–683.

Del Río-Portilla, M. A., y González-Avilés, J. G. (2001). Population genetics of the yellow abalone, *Haliotis corrugata*, in Cedros and San Benito Islands: A preliminary survey. Shellfish Research, 20 (2), 765–770.

Eguiarte, L., Souza, V., y Aguirre, X. (2007). Ecología molecular. In Ecología Molecular. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Harris, J., y Markl, J. (1999). Keyhole limpet hemocyanin (KLH): A biomedical review. Micron, 30(6), 597–623. [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00036-0](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00036-0)

Hernández-Velasco, A., Precoma de la Mora, M., Gómez-Gómez, A., Beas-Luna, R., Villaseñor-Derbez, J. C., y Domínguez-Guerrero, I. (2018, March). Los bosques sumergidos de México. CONABIO, (137), 3–5.

Hodgson, P. (1981). The activity of poikilothermal animals in different latitudes. Nature, 78, 839–840.

Holman, L. E., Hollenbeck, C. M., Ashton, T. J., y Johnston, I. A. (2019). Demonstration of the Use of Environmental DNA for the Non-Invasive Genotyping of a Bivalve Mollusk, the European Flat Oyster (*Ostrea edulis*). Frontiers in Genetics, 10(November), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01159>

INAPESCA. (2004). Carta Nacional Pesquera. Retrieved from <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/carta-nacional-pesquera-51204>

- INAPESCA. (2010). Carta Nacional Pesquera. Retrieved from <https://www.gob.mx/inapesca/acciones-y-programas/carta-nacional-pesquera-51204>
- Koolman, J., y Röhm, K.-H. (2005). Bioquímica (M. Panamericana, Ed.).
- Lara-Lara, J. R. (2008). Los ecosistemas marinos. Capital Natural de México, I, 135–159. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.09.036>
- Manubens, A., Salazar, F., Haussmann, D., Figueroa, J., Campo, M. Del, Pinto, J. M., ... Becker, M. I. (2010). *Concholepas* hemocyanin biosynthesis takes place in the hepatopancreas , with hemocytes being involved in its metabolism. Cell y Tissue Research, 342, 423–435. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-1057-6>
- Marshall, D. J., y Hodgson, A. N. (1990). Structure of the cephalic tentacles of some species of prosobranch limpet (patellidae and fissurellidae). Journal of Molluscan Studies, 56(3), 415–424. <https://doi.org/10.1093/mollus/56.3.415>
- Martin, G. G., Oakes, C. T., Tousignant, H. R., Crabtree, H., y Yamakawa, R. (2007). Structure and function of haemocytes in two marine gastropods, *Megathura crenulata* and *Aplysia californica*. Journal of Molluscan Studies, 73(4), 355–365. <https://doi.org/10.1093/mollus/eym032>
- Mau, A., y Jha, R. (2018). Aquaculture of two commercially important molluscs (abalone and limpet): existing knowledge and future prospects. Reviews in Aquaculture, 10(3), 611–625. <https://doi.org/10.1111/raq.12190>
- Mercado, J. (2016). Comunicación personal. Pescador de la zona de Puerto Canoas.
- Mejía-Ruíz, P., Perez-Enriquez, R., Mares-Mayagoitia, J. A., y Valenzuela-Quiñonez, F. (2020). Population genomics reveals a mismatch between management and biological units in green abalone (*Haliotis fulgens*) . PeerJ, 8, e9722. <https://doi.org/10.7717/peerj.9722>

- Miller, C., y Robbins, R. (1940). Chemical analysis and vitamin assays of opihi, the Hawaiian limpet. *Philippine Journal of Science*, 71, 141–163. Retrieved from <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19401401307>
- Morris, R. H., Abbott, D. P., y Haderlie, E. C. (1980). *Intertidal Invertebrates of California*. Stanford University Press.
- Oakes, F. R. (2005). Non-lethal method for extracting crude hemocyanin from gastropod molluscs. US 6,852,338 B2. (p. 9). p. 9. California, US: Stellar Biotech Inc.
- Oakes, F. R., McTee, S., McMullen, J., Culver, C. S., y Morse, D. E. (2004). The effect of captivity and diet on KLH isoform ratios in *Megathura crenulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 138(2), 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2004.03.009>
- Palumbi, S. R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W. O., Stice, L., y Grabowski, G. (2002). *The simple fool's guide to PCR version 2*. University of Hawaii. <https://doi.org/10.1186/s13620-015-0060-3>
- QIAGEN. (2005). *DNeasy Blood y Tissue Handbook* (p. 62). p. 62. Retrieved from <https://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=68f29296-5a9f-40fa-8b3d-1c148d0b3030ylang=en>
- Schmidt-Rhaesa, A. (2007). *The Evolution of Organ Systems. The Evolution of Organ Systems*, 1–400. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198566687.001.0001>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., y Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Scoles, R. D., y Graves, J. E. (1993). Genetic Analysis of the population structure of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, from the Pacific Ocean. *Fishery Bulletin*, 91, 690–698.

- SEPESCA. (2015). Carta Estatal Pesquera de Baja California. Retrieved from <http://www.sepescabc.gob.mx/x/salaDePrensa/difusionAcciones/docs/CartaEstatalPesquera.pdf>
- Slabbert, R., y Roodt-Wilding, R. (2006). Non-destructive sampling of juvenile abalone using epipodial tentacles and mucus: Method and application. *African Journal of Marine Science*, 28(3–4), 719–721. <https://doi.org/10.2989/18142320609504221>
- Smith, C., y Carlton, J. (1975). Intertidal Invertebrates of the Central California Coast. In Light's manual (Third, pp. 464–500). Univ. Cal.
- Swaminathan, A., Lucas, R. M., Dear, K., y Mcmichael, A. J. (2014). Keyhole limpet haemocyanin – a model antigen for human immunotoxicological studies. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 78:5(Clin Pharmacol), 1135–1142. <https://doi.org/10.1111/bcp.12422>
- Taberlet, P., y Luikart, G. (1999). Non-invasive genetic sampling and individual identification. 41–55.
- Thermo Fisher Scientific. (2015). KingFisher Duo Prime. Brief User Manual, 1–28.
- Torres Moye, G. (2012). Mainland and Island Kelp Forests in Northern Baja California, Mexico: Subtidal Community Structure, Dynamics, and Connectivity for the Design of Marine Protected Areas. University of California Davis.
- Wasko, A. P., Martins, C., Oliveira, C., y Foresti, F. (2003). Non-destructive genetic sampling in fish . An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. 165, 161–165.
- Yanick, J., y Heath, D. (2000). Survival and growth of mussels subsequent to hemolymph sampling for DNA. *Biodiversity Heritage Library*, 19, 991–993.