

Estandarización de la técnica de PCR para amplificar el genoma mitocondrial de las tortugas cabezona (*Caretta caretta*) y carey (*Eretmochelys imbricata*) anidantes del Caribe colombiano

Gerson Beltrán-Torres, Katherin Otálora, Ledy Angélica Daza, Javier Hernández-Fernández*

Universidad Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias e Ingeniería. Grupo de Investigación Genética, Biología Molecular y Bioinformática – GENBIMOL, Carrera 4 N° 22-61 Bogotá D.C., Colombia. * Autor para correspondencia: javier.hernandez@utadeo.edu.co

PCR Standardization to amplify the mitochondrial genome of nesting loggerhead turtles (*Caretta caretta*) and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) in the Colombian Caribbean

Abstract

The hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, and loggerhead, *Caretta caretta*, are distributed in tropical waters of the Indo-Pacific and Atlantic, this species are considered important into ecosystems. Both turtles are listed as critically endangered since they have been exploited by their shell, eggs and meat. Population of both species are found in a significant population decline in the Colombian Caribbean. Genetic studies of mitochondrial DNA allow the support of management and conservation plans. In the present study the best conditions for the PCR have been standardized for the amplification of 22 fragments of 800 bp overlapping in 50 bp of hawksbill and loggerhead turtles mitogenoma. Primers-oligonucleotides were designed for amplification of these mitogenomas from previously described sequences of the *Chelonia mydas* green turtle. The concentration of Mg²⁺, DNA, primers-oligonucleotides and the annealing temperature were evaluated. The standard PCR reaction was obtained in a final volume of 25 µl containing 20-70 ng of DNA, 0,5-1 mM each primers-oligonucleotide, 1.5-3.0 mM Mg²⁺, 1 U of *Taq* polymerase and 0.2 mM of dNTP's. Optimized amplification parameters were: initial denaturation of 5 min at 94 °C, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 37-50 °C for 1 min (according to the primer-oligonucleotide) and 72 °C for 1 min. 63 % of the sequence of the hawksbill turtle and 68 % of the loggerhead turtle were obtained. These sequences had 99-100 % identity with the sequences previously reported.

Keywords: Mitochondrial DNA, PCR, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata*.

Editor: Pataquiwa A.

Citation: Beltrán-Torres G, Otálora K, Ledy Angélica Daza Hernández-Fernández J. (2013) PCR Standardization to amplify the mitochondrial genome of nesting loggerhead turtles (*Caretta caretta*) and hawksbill (*Eretmochelys imbricata*) in the Colombian Caribbean. *Revista Mutis*. vol. 3 (2) pag. 21-30

Received: June 1, 2013; **Accepted:** September 29, 2013; **Published online:** December 15, 2013

Copyright: ©2013 Beltrán-Torres *et al.* This is an open-access article, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Competing Interests: The authors have no conflict of interest

Resumen

Las tortugas marinas, *Eretmochelys imbricata* y *Caretta caretta* se encuentran distribuidas en aguas tropicales del Indo-Pacífico y Atlántico y son consideradas especies importantes dentro del ecosistema. Estas tortugas se han catalogado en peligro crítico ya que han sido explotadas por su caparazón, huevos y carne. Las poblaciones de ambas especies se encuentran



en un declive poblacional significativo en el Caribe colombiano. Los estudios genéticos del ADN mitocondrial permiten el apoyo de planes de manejo y conservación. En el presente estudio se estandarizaron las mejores condiciones de la técnica de PCR para la amplificación de 22 fragmentos de 800 pb solapadas en 50 pb del mitogenoma de las tortugas *E. imbricata* y *C. caretta*. Se diseñaron oligonucleótidos-*primers* para la amplificación de estos mitogenomas a partir de secuencias previamente descritas de la tortuga verde *Chelonia mydas*. Se evaluó la concentración de Mg^{+2} , ADN, oligonucleótidos-*primers* y la temperatura de anillamiento. La reacción estandarizada de PCR se obtuvo en un volumen final de 25 μ l, conteniendo 20-70 ng de DNA, 0,5-1 mM de cada oligonucleótidos-*primers*, 1,5-3,0 mM de Mg^{+2} , 1 U de *Taq* polimerasa y 0,2 mM de cada dNTP's. Los parámetros de amplificación optimizados fueron: desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 37-50 °C por 1 min (de acuerdo a los oligonucleótidos-*primers*) y 72 °C por 1 min. Se obtuvo el 63 % de la secuencia de la tortuga carey y el 68 % de la tortuga cabeza. Estas secuencias presentaron un 99-100 % de identidad con las secuencias previamente reportadas.

Palabras clave: ADN mitocondrial, PCR, *Caretta caretta*, *Eretmochelys imbricata*.

Introducción

La tortuga carey, *Eretmochelys imbricata* (Linnaeus, 1766) y la tortuga cabeza *Caretta caretta* (Linnaeus, 1758) pertenecientes a la familia Cheloniidae, son especies consideradas componente relevante de diferentes hábitats vitales para el ecosistema (arrecifes de coral, praderas de pastos marinos, fondos blandos, etc.) (Eckert *et al.*, 2000); reportadas en latitudes templadas tropicales y subtropicales, estas tortugas anidan en los mares del Caribe colombiano, pero a pesar de su amplia distribución *E. imbricata* esta reportada por la UICN en la categoría A2bd de "en peligro crítico" (Meylan & Donnelly, 1999, y *C. caretta* "en peligro" A1 abd de extinción (IUCN, 2013). Estas tortugas están protegidas por leyes nacionales y acuerdos internacionales que pretenden mitigar

la disminución de hembras anidantes por causas de origen antrópico (Barreto, 2011, SWOT, 2012, IUCN, 2013). Las poblaciones de estas tortugas evidencian una problemática en los niveles de abundancia debido a sus estrategias de reproducción K, debido a que tardan entre 20 y 30 años en alcanzar la madurez sexual (Machado y Bermejo, 2012) y producen muy pocos descendientes. El declive de las poblaciones de estas tortugas en el Caribe colombiano es un fenómeno recurrente (Amorocho, 1999, Invemar, 2003, Barreto, 2011). Ese declive poblacional se está produciendo debido a factores como: comercialización de la carne y los caparzones y el consumo de los huevos y aceite (Rueda, 2001, SWOT, 2012). A esto se suma la captura incidental por pesquerías industriales y artesanales, la pérdida del hábitat (Eckert, 2000, Barreto, 2011) y la polución marina (Barreto, 2011, SWOT, 2012). El Ministerio de Ambiente y la Dirección Nacional de Ecosistemas en Colombia han evaluado a estas tortugas como especies problema debido al bajo número de hembras anidantes en el mar Caribe, problemática que genera gran interés para adelantar investigaciones en áreas como la filogenética, filogeografía, conservación genética, evolución y la genética de poblaciones.

El uso de herramientas moleculares como el ADN mitocondrial (ADNmt) han alcanzado gran importancia en los últimos años como aporte a metodologías de conservación genética en tortugas marinas. El ADNmt consiste en una molécula circular de doble cadena la cual codifica para 22 tRNA, 2 rRNA y 13 proteínas además de una región mayor no codificable (región control, D-loop) (Drosopoulou *et al.*, 2012). Una de las técnicas utilizadas para la obtención del genoma mitocondrial de tortugas marinas es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la que se demuestra la presencia de los fragmentos amplificados del ADN mitocondrial del organismo. La amplificación del genoma mitocondrial completo de las tortugas carey y cabeza permitirá realizar mejores análisis descriptivos, filogenéticos y evolutivos, además de aportar y mejorar la información sobre su estado genético ofreciendo aportes a estudios de planes de manejo y conservación de estas tortugas marinas en el Caribe colombiano. Por tal razón el propósito de este estudio fue estandarizar las mejores condiciones de la técnica de PCR para la amplificación del genoma mitocondrial de las tortugas cabeza y carey anidantes del Caribe colombiano, con el fin de vali-

dar y mejorar protocolos establecidos para futuras investigaciones.

Metodología

Obtención de muestras de sangre

Se colectaron muestras de sangre periférica de las tortugas carey (*E. imbricata*) y cabeza (*C. caretta*) en dos regiones del Caribe colombiano, el Oceanario Ceiner en la Isla de San Martín de Pajarales (Bolívar) y Playa Don Diego. Las muestras de sangre se obtuvieron a nivel de los senos dorsales cervicales, utilizando la metodología de Dutton (1996) y se almacenaron en tubos estériles con solución 0,1 M Tris-EDTA (GreinerBio-one®, Kremsmünster, Austria). Las muestras se transportaron en neveras con geles refrigerantes a 4 °C hasta el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Jorge Tadeo Lozano en Bogotá para su posterior análisis.

Extracción de ADN

El ADN se obtuvo utilizando el kit de extracción Handbook GF-1 *vivantis* Tissue DNA Extraction (MALASIA, HQ) siguiendo el protocolo de la casa comercial fabricante (versión 2.2). Las extracciones se revelaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % p/v en solución tampón TBE 0,5X con tinción de bromuro de etidio (2 µg/ml) en una cámara horizontal GeXL UltraV-2 (Labnet International, Inc. New Jersey, EE. UU.). El resultado de la separación se registró con el fotodocumentador UVP GelDoc-It™ System (UVP, Upland, EE. UU.) y se analizaron con el programa *Vision Works*® LS Image Acquisition and Analysis Software (ImagingSystem, EE. UU.). Los DNA fueron cuantificados en el nanodrop 1000 Spectrophotometer y analizados con el programa ND-1000 V3.7.1.

Diseño de oligonucleótidos-primers

Se diseñaron 22 pares de oligonucleótidos-primers basados en la secuencia del genoma mitocondrial de la tortuga verde *Chelonia mydas* (Kumazaway Nishida, 1999) para amplificar los 16.500 pb del mito-genoma de las dos tortugas en fragmentos de 800 pb solapados en 50 pb, para generar secuencias contiguas y facilitar el ensamblaje de la molécula (Figura 1).

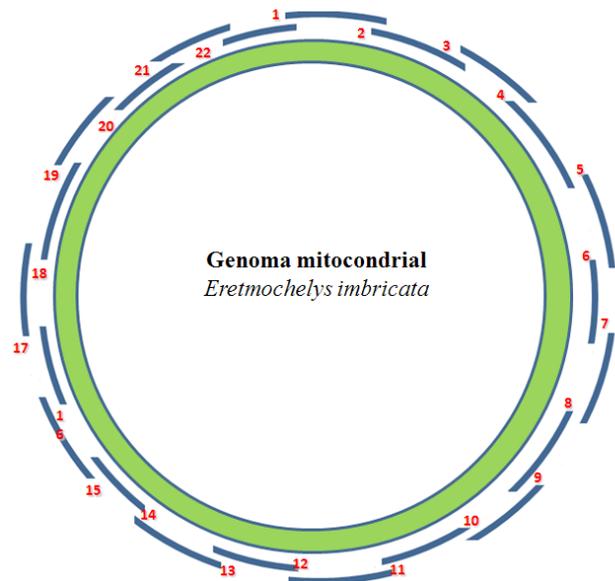


Figura 1. Estrategia de amplificación y ensamble de los 22 fragmentos de 800 pb solapados en 50 pb.

Estandarización de la PCR

Se evaluó la concentración de Mg^{+2} entre 1-3 mM, la de DNA entre 10-100 ng, 0,5-2 oligonucleótidos-primers y la temperatura de anillamiento. Se identificó la temperatura teórica de cada uno de los oligonucleótidos-primers (IDT Olygo-analyzing) y a partir de esta se variaron para encontrar la temperatura óptima en la amplificación de una única banda de 800 pb.

Para determinar la calidad de los productos de la PCR, 2µl de cada amplificación se mezclaron con el mismo volumen (2µl) de buffer de carga (30 % glicerol y 0,05 % azul de bromofenol p/v), esta mezcla se sirvió en los pozos de un gel de agarosa preparado al 1 % (p/v) en TBE 0,5X y teñido con bromuro de etidio (2 µg/ml). La amplificación de los fragmentos de ADNmt de *C. caretta* y *E. imbricata* se verificaron evidenciando en el gel la presencia de una única banda de 800 pares de bases (bp) utilizando el marcador de peso molecular Hiperladder IV (Bioline Inc., California, EE. UU.). El anterior proceso se registró con el fotodocumentador UVP Gel-Doc-IT™ System (UVP, Upland,

EE. UU.) y se analizó con el programa VisionWorksLS (Imaging System, EE. UU.).

Secuenciación

Se obtuvo la secuencia nucleotídica en ambas direcciones (5'-3' y 3'-5') utilizando el método automatizado tagDyeDeoxy Terminator Cycle-sequencing en un secuenciador 3730XL (Applied Biosystems).

Análisis de datos

Las secuencias del ADNmt obtenidas por PCR de las tortugas *C. caretta* y *E. imbricata* se ensamblaron y alinearon utilizando el programa Geneious R6 (Auc-

kland, Nueva Zelanda). La comparación de las secuencias obtenidas con las reportadas en la base de datos del NCBI se realizaron con la herramienta de búsqueda de alineamiento básico local, BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para determinar su identidad.

Resultados

Para amplificar el genoma mitocondrial de las tortugas *C. caretta* y *E. Imbricata*, se diseñaron manualmente 22 pares de oligonucleótidos-*primers* (Tabla 1) a partir de la secuencia del genoma mitocondrial de la tortuga verde *Chelonia mydas* (Kumazawa y Nishida, 1999). Estos amplifican regiones de 800 pb que se solapan en 50 pb con el fin de realizar el ensamblaje de estos fragmentos generando un solo *contig* (Figura 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos-*primers* diseñados para amplificar el genoma mitocondrial de la tortuga cabeza (*C. caretta*) y carey (*E. imbricata*) con la región de amplificación dentro del genoma.

#	5'-3'	#	3'-5'	pb	Gen
Nombre	oligonucleótido directo	nombre	oligonucleótido reverso	pares de bases	
CC1F	GTTATTGTAGCTTATTATAT	CC1R	TCTCCATCTCAGTTAGCTA	1-800	12s
CC2F	CCTAAACAATTAATAAGTCA	CC2R	TTAAGTACTTTATGTTGTTT	750- 1550	12s-16s
CC3F	TAGCTGGTTGCTCAATAAAA	CC3R	TCGCCCAACCAAAAATATAG	1500- 2300	16s
CC4F	TATAACTAAGTAGTACTTGAC	CC4R	AAGGCTAATATTGGGGATAT	2250- 3050	16s-ND1
CC5F	CCATCAAACATCCATTAC	CC5R	CAAGGTGATCCTTTGTTTCAG	3000-3800	ND1
CC6F	GGACTCCCACCTATACCATAG	CC6R	TTGTAATTATTCATCCTAGATGGG	3750-4550	ND2
CC7F	TACGAAAAATCATAGCATTC	CC7R	ATTGCAAATTTAAAGATATATCT	4500-5300	ND2
CC8F	TAAAAGCGGGAAAACCCAG	CC8R	GTTGTATTTAGATTTTCGGTCTGT	5250-6050	COI
CC9F	GTACTCGCCGAGGCATTACCA	CC8R	ATAACTACTGCTACTATAGAGA	6000-6800	COI
CC10F	AACTCTATTTTCATCAATTGG	CC10R	TCAGCTGAGATTAGTATTC	6750- 7550	COI-COII
CC11F	ATCGCATAGTAATACCAATA	CC11R	TCATATTGGAATAGCTAGTC	7500-8300	COII-ATP8-ATP6
CC12F	CTACTAGCCTTCTACCCTA	CC12R	TGGGGTAATCCTGTAGGTG	8250-9050	ATP6-COIII
CC13F	CCCCTACCCAGAACTAGGA	CC13R	AAGGTGAGAGTTGGGGATGG	9000-9800	COIII-ND3-ND4L
CC14F	CTCCTACCCCTACCATGA	CC14R	GTAGTAGGATAATGGTGAAGATA	9750-10550	ND4L-ND4
CC15F	CACTGAACCAACTTCACGAA	CC15R	TTAGTGGGAGTAAGAGTTGT	10500-11300	ND4
CC16F	CCAACACAA ATTACGAACG	CC16R	GAATGTGGATGTAGTTGATC	11250-12050	ND4-ND5
CC17F	TGAATCTATCATACCAACT	CC17R	TAGTTGTGGTTGATTTAGGC	12000-12800	ND5
CC18F	GCCAACTGGGCCTCATAATA	CC18R	CTCATCACAAAAAGGCCTAA	12750-13550	ND5
CC19F	TGAAATATTGGTCCAAAAGGA	CC19R	CTTGGTAGGTGCGTACTA	13500-14300	ND5-ND6
CC20F	CCCACCAATAATAAAAATT	CC20R	GTATCATTCTGGTTTGATGT	14250-15050	Citocromo B
CC21F	CACCAGCCAACCTCTATCC	CC21R	CAATTACTGTGACGATATTC	15000- 15800	Citocromo B
CC22F	TAAAATTAACCTATTACT	CC22R	ATATTATATATAATATATATA	15750-16497	D-loop-12s

La Figura 2 muestra la extracción de ADN total realizada a un individuo de la tortuga carey y a otro de la tortuga cabezona respectivamente, en esta se puede ver la calidad y apariencia de las extracciones, sin rastros de contaminantes ni residuos de ARN que puedan modificar las reacciones de PCR.

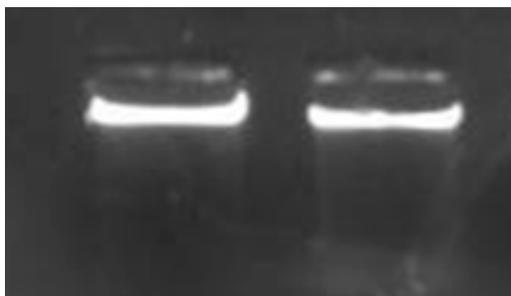


Figura 2. ADN total de las dos tortugas marinas Carril 1: tortuga carey. Carril 2: tortuga cabezona. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñida con bromuro de etidio

La estandarización del cloruro de magnesio ($MgCl_2$) en la mezcla de reacción se varió entre 1 y 3 mM. La Figura 3 muestra el efecto en las variaciones de este componente para los fragmentos 2 (carril 1 y 2) y 16 (carril 3 y 4) de la tortuga carey, se pudo observar que en concentraciones menores de $MgCl_2$ no se presentan las bandas deseadas, mientras que mayores concentraciones inducen la amplificación de un buen número de bandas, dentro de las cuales se encuentra la banda de interés de 800 pb. Como se observa en la Figura 3, una concentración de 1,5 mM amplifica el fragmento 2, mientras la concentración 2 mM de $MgCl_2$ mejora la amplificación del fragmento 16.

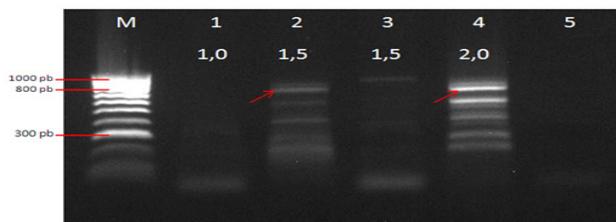


Figura 3. Estandarización de $MgCl_2$ (mM) de los fragmentos 2 y 16 de la tortuga carey. Carril 1 y 2: fragmento 2, Carril 3 y 4: fragmento 16, Carril 5: Control negativo. M: Marcador de peso HyperLadder IV. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Las flechas señalan las bandas de interés.

De la misma forma se realizó el procedimiento para la estandarización de la concentración de los oligonucleótidos-*primers*. La Figura 4 muestra variaciones en la concentración, de entre 0,5 y 1 uM en la amplificación de dos fragmentos diferentes de la tortuga carey, se observa cómo para el fragmento 4 (carriles 1, 2 y 3) la concentración de 1 μ M amplifica una banda de 800 pb más intensa y nítida, mientras que para el fragmento 12 (carriles 5, 6 y 7), la banda esperada de 800 pb se obtiene con 0,8 μ M de oligonucleótidos-*primers*. De esta misma manera se evaluaron las demás 20 parejas de oligonucleótidos-*primers* (Tabla 2).

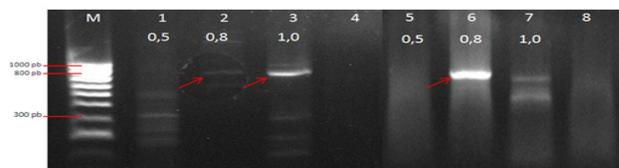


Figura 4. Evaluación de la concentración de oligonucleótido-*primer* 4 y 12 del mitogenoma de la tortuga carey. Carril 1, 2 y 3: oligonucleótido-*primer* 4. Carril 5, 6 y 7: oligonucleótido-*primer* 12. Carril 4 y 8: Controles negativos. M: Marcador de peso HyperLadder IV. Debajo de los números de los carriles se muestran las concentraciones de oligonucleótidos-*primers* en concentración mM. Electroforesis de agarosa al 1 % teñida con bromuro de etidio. Las flechas señalan las bandas de interés.

Para estandarizar la temperatura de *melting* o anillamiento (T_m) se calculó la temperatura teórica y se realizaron reacciones con temperaturas 5 °C por debajo (BIOTOOLS,2009). En la Figura 5A se observan reacciones de PCR donde se evalúan diferentes temperaturas para 3 fragmentos (fragmento 7, en los carriles 1, 4 y 7; fragmento 10 en los carriles 2, 5 y 8 y fragmento 11 en los carriles 3, 6 y 9) para el mitogenoma de la tortuga carey. La primera amplificación se realizó a 35 °C (carriles 1, 2 y 3), la siguiente a 36 °C (carriles 4, 5 y 6) y la última a 37 °C (carriles 7, 8 y 9). Se observa que en la medida en que la temperatura aumenta 1 °C las bandas inespecíficas desaparecen, generando mayor especificidad en la amplificación del fragmento esperado. En la Figura 5B se observa la amplificación del fragmento 5 de la tortuga cabezona, una primera amplificación a 43 °C (carril 1) y posteriormente a 45 °C (carril 2), el aumento en 2 °C genera la aparición de la banda esperada. La Figura 5C presenta la amplificación de los fragmentos 3, 15 y 16 (fragmento 3, en los

carriles 1 y 4; fragmento 15, en los carriles 2 y 5 y fragmento 16, en los carriles 3 y 6) de la tortuga cabeza, la primera amplificación se realizó a 40 °C (carriles 1, 2 y 3) y la segunda a 45 °C (carriles 4, 5 y 6, aumentando la Tm en 5 °C para obtener una mayor especificidad en las bandas esperadas).

Tabla 2. Condiciones estandarizadas de la reacción de PCR para cada uno de los 22 fragmentos que amplifican el genoma mitocondrial de las tortugas cabeza (*Caretta caretta*) y carey (*Eretmochelys imbricata*).

Organismo	<i>Caretta caretta</i>					<i>Eretmochelys imbricata</i>				
	elt Teórica (°C)	Tm Práctica (°C)	Primer (μM)	ADN (ng/μl)	MgCl ₂ (mM)	Tm Teórica (°C)	Tm Práctica (°C)	Primer (μM)	ADN (ng/μl)	MgCl ₂ (mM)
1	48.8	33	-	60	-	48,8	33	1	60	2.5
2	42	35	1	60	2	42,2	35	1	60	1,5
3	51	47	0.5	50	2	51,0	46	0,8	50	1,5
4	45.7	40	0.8	60	2	45,7	42	1	60	1,5
5	49.85	45	0.8	70	2.5	49,9	44	0,8	70	1,5
6	51.03	45	1	30	2	51,3	45	0,8	30	1,5
7	44.9	37	1	60	2	45,0	37	1	60	1,5
8	52.15	46	1	30	2	52,2	46	0,8	30	1,5
9	46.2	45	1	30	2	46,3	45	0,8	30	1,5
10	45.5	37	1	50	1.5	45,5	37	1	50	1,5
11	45.8	37	1	60	2	45,8	37	1	60	1,5
12	52.8	44	0.8	40	2	52,9	45	0,8	40	1,5
13	57.6	50	1	50	2	57,2	50	1	50	1,5
14	50.55	47	0.8	60	2.5	50,6	45	0,8	60	2.5
15	51.5	45	1	30	2	51,6	46	0,8	30	1,5
16	48.9	44	0.8	50	2	48,9	43	1	50	2
17	49.1	43	0.8	70	2	49,2	43	1	70	2,5
18	52.3	42	0.8	70	2	52,6	43	1	70	2
19	50.4	42	0.8	60	2	50,4	46	0.8	60	2,5
20	46.7	35	0.8	60	1.5	46,8	38	1	60	2,5
21	49.3	40	1	40	1.5	49,4	43	1	40	1,5
22	32.7	-	-	-	-	32,7	28	2	50	3

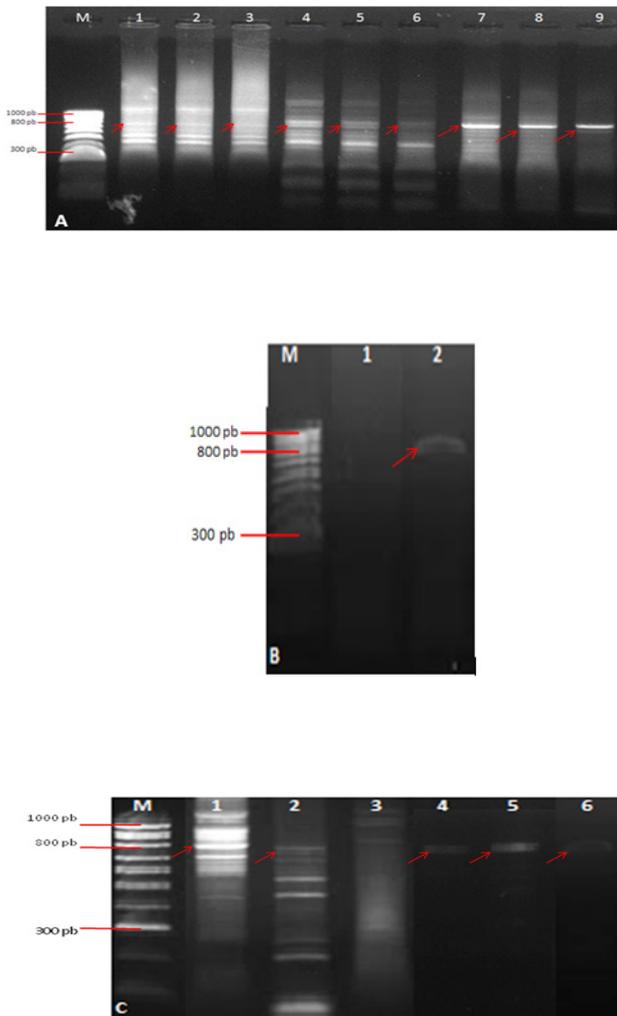


Figura 5. Evaluación de la temperatura de *melting* (T_m) o anillamiento sobre diferentes fragmentos del DNAmT de las tortugas Carey y cabezona. 5A) T_m de los fragmentos 7, 10 y 11 del DNAmT de la tortuga Carey. Carril 1, 2 y 3: T_m 35 °C. Carril 4, 5 y 6: T_m 36 °C. Carril 7, 8 y 9: T_m 37 °C. 5B) T_m del fragmento 5 del DNAmT de la tortuga cabezona. Carril 1: T_m 43 °C. Carril 2: T_m 45 °C. 5C) T_m de los fragmentos 3, 15 y 16 del DNAmT de la tortuga cabezona. Carril 1, 2 y 3: T_m 40 °C. Carril 4, 5 y 6: T_m 45 °C. M: Marcador de peso HyperLadder IV. Electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Las flechas señalan las bandas de interés.

La Figura 6 presenta la amplificación por PCR de nueve fragmentos (fragmentos 3, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 18) de DNAmT de la tortuga Carey después de haber realizado la estandarización para cada una de las variables evaluadas, se observan bandas únicas de 800 pb. La variación en la intensidad y ancho de cada una de las bandas sugiere la concentración del ADN (ng/ μ l) que fue cuantificada en nanodrop. En la Figura 6 se observan ban-

das con concentraciones que oscilaron entre 40-60 ng/ μ l (Tabla 3). Los productos obtenidos fueron almacenados a -20 °C para enviar posteriormente a secuenciar.

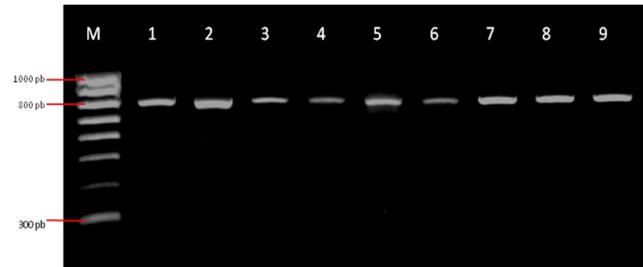


Figura 6. Amplificación por PCR de 9 fragmentos amplificados de la tortuga Carey, mostrando un peso de 800 pb. Marcador de peso molecular HyperLadder IV (100-1000 pb). Electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñida con bromuro de etidio.

Tabla 3. Cuantificación por nanodrop de 9 fragmentos de ADN amplificados para el mitogenoma de la tortuga Carey.

Carril	Fragmento	Concentración de ADN (ng/ μ l)
1	3	50,5
2	6	60,0
3	7	49,7
4	8	40,0
5	9	50,1
6	10	40,3
7	11	59,8
8	13	59,2
9	18	58,9

La mezcla de reacción estandarizada se realizó en volumen final de 25 μ l, que incluyó 20-50 ng de DNA, 0,5-1 mM de cada *primer*, 1,5-3 mM de $MgCl_2$, 1 U de *Taq* polimerasa y 0,2 mM de cada dNTP's, condiciones específicas para cada uno de los fragmentos de los mitogenomas de las tortugas analizadas (Tabla 2). El programa del termociclador se inició con una desnaturalización por 5 min a 94 °C, seguida por 25-35 ciclos (dependiendo del fragmento) de 94 °C por 1 min, 30-50 °C por 1 min (de acuerdo al oligonucleótido-*pri-*

mer) y 72 °C por 1 min, con una extensión final de 10 min a 72 °C.

Los fragmentos amplificados de la tortuga cabeza y carey se enviaron a secuenciar a la empresa Macrogen (Korea), utilizando la metodología de Sanger. Las secuencias obtenidas se sometieron a un análisis preliminar de BLAST para corroborar la identidad con las secuencias previamente reportadas, posteriormente se ensamblaron utilizando el programa Geneious R6, generándose los *contigs*. Se obtuvo el 63 % de la secuencia de la tortuga carey y el 68 % de la tortuga cabeza. Estas secuencias presentaron un 99-100 % de identidad con las secuencias previamente descritas y dentro de estas se pudieron identificar 6 genes completos y 13 tRNA para la tortuga carey y 6 genes completos y 14 tRNA para la tortuga cabeza (Tabla 4).

Tabla 4. Genes identificados en el mitogenoma secuenciado de las tortugas cabeza y carey.

<i>Caretta caretta</i>	<i>Eretmochelys imbricata</i>
COI	COI
ND2	ND2
COII	COII
COIII	COIII
ATP6	ATP6
ATP8	ATP8
14 tRNAs	13 tRNAs

Discusión

Las variaciones realizadas a la concentración del cloruro de magnesio, oligonucleótidos-*primers* y *Tm* permitieron la optimización en la amplificación por PCR de 22 fragmentos del ADNmt de las dos tortugas (carey y cabeza), nueve fragmentos amplificados se observan en la Figura 6, donde se evidencia una única banda de 800 pb. Se obtuvo entre el 60-70 % de la secuencia nucleotídica del mitogenoma de las dos tortugas. La

estandarización de un protocolo de PCR es un proceso que genera un alto costo en tiempo y reactivos, especialmente dado por las propias reacciones que pueden llegar a ser impredecibles y variables. Los pequeños cambios realizados en alguno de los reactivos o temperaturas usadas van a afectar directamente el resultado de la amplificación del genoma, de este manejo en las variables y sus modificaciones va a depender la calidad y pureza de la amplificación final, ya sea cambiando las concentraciones de los reactivos (cloruro de magnesio, dNTP's, *primers*, DNA) así como las temperaturas y tiempos en el termociclador (Roux, 2002).

Uno de las variables principales a considerar para una óptima amplificación es la temperatura de anillamiento; la unión o rehibridación de las hebras de ADN se efectúa a una temperatura generalmente de entre 55 y 65 °C (Cortázar & Rincón, 2004). Sin embargo, la temperatura máxima de amplificación del genoma mitocondrial de las tortugas cabeza (*C. caretta*) y carey (*E. imbricata*) fue de 50 °C para el oligonucleótido-*primer* 13, mientras que la temperatura más baja fue de 28 °C para el 22 (Tabla 1 y 2). Con estas temperaturas se logró el anillamiento y producir la unión del ADN molde con el cebador para la óptima amplificación, difiriendo considerablemente entre las temperaturas ya descritas (Cortázar & Rincón, 2004). Se corrobora que temperaturas de hibridación muy elevadas pueden ocasionar que el cebador no se una correctamente con la región homóloga, y por ende, no se produzca amplificación (Quiñones, 2011), razón por la cual a que ninguno de los fragmentos de los mitogenomas amplificaron a temperaturas mayores a los 50 °C.

Para una excelente estandarización es de considerar la especificidad de los oligonucleótidos-*primers* que es en parte dependiente de su longitud (Pinzón, 2006). Los oligonucleotidos-*primers* deben ser elegidos de modo que tengan una secuencia única dentro del DNA que será amplificado. Un *primer* diseñado con una secuencia altamente repetida dará lugar a productos no deseados (Cortázar & Rincón, 2004), siendo el caso de los oligonucleótidos-*primers* 3, 7, 10, 11, 15 y 16 (Figuras 5A y 5C) que amplifican más de una banda mostrando una baja especificidad. Para el caso de oligonucleótidos-*primers* de la Figura 5B se evidencia una alta especificidad que se presenta principalmente por el contenido de GC (Pinzón, 2006) y el contenido de MgCl₂ utilizado en la reacción.

Una buena especificidad en las bandas deseadas de los productos de PCR también depende en gran medida de la T_m para que los *primers* se unan a los sitios exactos dentro de la cadena molde. La T_m usada para la amplificación de un fragmento se basa en el promedio generado por las temperaturas de los *primers* implicados en la reacción, por lo general se utiliza una T_m menor a la obtenida en el consenso y en base a este se inicia el proceso de estandarización para encontrar el punto que genere una mayor especificidad (Kolmodin y Birch, 2002), como se puede observar en las Figuras 3 y 6, el aumento de la T_m para la amplificación de los diferentes fragmentos fue generando una mayor especificidad en la obtención de las bandas de 800 pb. Se ha mencionado que la máxima diferencia de temperatura para la amplificación experimental es de 5 °C en relación a la temperatura teórica (Avila *et al.*, 1993, BIOTOOLS, 2009), para el caso del genoma mitocondrial la temperatura de anillamiento teórica respecto a la experimental varía considerablemente en algunos casos, siendo el intervalo de diferencia más alto de 10 °C, sugiriendo que estos patrones observados de altas diferencias de rangos de temperaturas son dependientes de la longitud de los *primers* (Pinzón, 2006).

La concentración de cloruro de magnesio es un factor importante en la mezcla de reacción para la PCR. Los iones magnesio sirven como cofactores de la enzima *Taq* polimerasa, la cual impulsa a los *primers* para iniciar la replicación de la cadena molde (Kolmodin y Birch, 2002). Según lo reportado por Llauger *et al.* (2003), concentraciones bajas de $MgCl_2$ (1,5 mM), tienen una intensidad del producto amplificado muy débil y los resultados no son reproducibles, mientras que concentraciones altas (2,5 mM) teniendo en cuenta la homogeneidad de los resultados con respecto al tamaño de la banda, nitidez, intensidad y reproducibilidad son ideales, coincidiendo con los resultados de optimización para la concentración de cloruro de magnesio descritas en este estudio.

Pinzón (2006) reporta un indicador importante para la optimización de resultados de PCR, mencionando que la temperatura de fusión de los *primers* depende principalmente del contenido de G+C, permitiendo estabilizar la molécula por la presencia de los 3 enlaces de hidrogeno que presentan este par de bases nitrogenadas. El contenido en G+C del *primer* debe ser entre 40 y 60 % siendo óptimo el 50 %. Los *primers* con un menor contenido en GC deben diseñarse algo más largos

para conseguir una T_m por encima de la recomendada (Cortázar & Rincón, 2004). Los contenidos de G+C de los *primers* 1 y 22 corresponden al 30 % y 15 % respectivamente (OligoAnalyzer 3.1- IDT), con las temperaturas de anillamiento prácticas más bajas de los dos genomas, evidenciándose poca especificidad y problemas en la amplificación de los fragmentos de interés. Por tal razón se sugiere la modificación del tamaño de los *primers* 1 y 22, para una óptima amplificación.

Estos resultados hicieron posible la estandarización de una metodología de gran utilidad para la obtención de la secuencia del genoma mitocondrial de tortugas marinas del Caribe colombiano, generando aportes significativos en el proceso de conocimiento genético de estas especies. Las secuencias obtenidas serán analizadas bioinformáticamente.

Conclusiones

Se confirma en este estudio que las concentraciones de $MgCl_2$, *primers*-oligonucleótidos y la variación en temperatura de anillamiento permiten una mayor especificidad de la amplificación de bandas de interés. Para la reacción estandarizada de PCR de los genomas mitocondriales de las tortugas carey y cabeza, la temperatura de anillamiento no superó los 50 °C, la concentración de cada oligonucleótido-*primer* y Mg^{+2} osciló entre los 0,5-1 mM y 1,5-3,0 mM, confirmando temperaturas y concentraciones previamente descritas. La concentración de *Taq* polimerasa y dNTP's se mantuvo constante 1 U y 0,2 mM respectivamente. La finalización de la secuenciación de los genomas mitocondriales de estas tortugas permitirá realizar diversos análisis (filogenéticos, evolutivos y filogeográficos, entre otros) que apoyen proyectos de conservación de estas tortugas en el Caribe colombiano.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Oceanario Ceiner y a la profesora Aminta Jáuregui por la ayuda en la consecución de las muestras de sangre de las dos tortugas marinas. A la Dirección de Investigación, Creatividad e Innovación de la Universidad Jorge Tadeo Lozano por el apoyo a este estudio. Las muestras fueron obtenidas bajo permiso de investigación concedido por el Ministerio de Medio Ambiente y Desarrollo Territorial (N° 24, del 22 de junio de 2012) y el Contrato de Acceso a los Recursos Genéticos (N° 64, del 23 de abril de 2013).

Referencias

- Amorocho, D. F., & Network, W. C. S. T. C. (1999, November). Status and distribution of the hawksbill turtle, *Eretmochelys imbricata*, in the wider Caribbean region. In Proceedings of the Regional Meeting "Marine Turtle Conservation in the Wider Caribbean Region: A Dialogue for Effective Regional Management", Santo Domingo (pp. 16-18).
- Avila, J. T., De Vera, A. M., Calzadilla, C. H., & Martín Vasallo, P. (1993). Análisis del DNA. II: Clonar, secuenciar y PCR. *Nefrología*, 13, 267-267.
- BIOTOOLS, Biotechnological & Medical Laboratories, S.A. © (2009). Biotools dna polymerase gel form. Consultado: 10-X-2013. Disponible en: http://www.biotools.eu/esp/pdf/Boletines%20de%20Producto/Enzimas/Enzimas%20Tiempo%20Final/DNA_Polimerasa_Gel.esp.ed14.jul11.pdf
- Cortázar, A., & Rincón, E. (2004). *Métodos Físico-Químicos en Biotecnología PCR*. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Biotecnología. (pp, 43).
- Drosopoulou, E., Tsiamis, G., Mavropoulou, M., Vitas, S., Katselidis, K. A., Schofield, G., & Scouras, Z. G. (2012). The complete mitochondrial genome of the loggerhead turtle *Caretta caretta* (Testudines: Cheloniidae): Genome description and phylogenetic considerations. *Mitochondrial DNA*, 23(1), 1-12.
- Dutton, P. (1996). Methods for collection and preservation of simple for sea turtle genetic studies, p. 17-24. En: B. W. Bowen y W. N. Witzell (Editores), *Proceedings of the International Symposium on Sea Turtles Conservation Genetics*, NOAA Technical memorandum NMFS-SEFSC-396.173.
- Eckert, K. L., Bjorndal, K. A., Abreu-Grobois, F. A., & Donnelly, M. (2000). *Técnicas de Investigación y Manejo para la Conservación de las Tortugas Marinas*. Grupo Especialista en Tortugas Marinas. UICN/CSE.(Traducción al español). Publicación, (4), 270.
- Kolmodin, L. A., & Birch, D. E. (2002). Polymerase Chain Reaction: Basic Principles and Routine Practice. EN: Chen, B-Y. y Janes, H. W. 2002. *PCR Cloning Protocols. Methods in Molecular Biology*. 2nd Edition. 192. Humana Press Inc. Totowa, NJ.
- Kumazawa, Y., & Nishida, M. (1999). Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: statistical evidence for archosaurian affinity of turtles. *Molecular Biology and Evolution*, 16(6), 784-792.
- Liu, Z. J., & Cordes, J. F. (2004). DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238(1), 1-37.
- Llauger, R., Peralta, E. L., Dollet, M., Cueto, J., Rodríguez, M., Fajardo, D., & González, V. *Diversidad y optimización del diagnóstico del fitoplasma asociado al amarillamiento letal del cocotero en Cuba*. Documento FAO 2254
- Machado, A., & Bermejo J. A. (2012). Estado de Conservación de la Tortuga Boba (*Caretta caretta*) en las Islas Canarias. Plan de Seguimiento de la Tortuga Boba en Canarias. Santa Cruz de Tenerife: *Observatorio Ambiental Granadilla*, (pp, 154).
- Márquez, R. (1990). *Las tortugas marinas y nuestro tiempo*. Fondo de Cultura Económica, Secretaría de Educación Pública. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. México.
- Meylan, A. B., & Donnelly, M. (1999). Status justification for listing the hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) as critically endangered on the 1996 IUCN Red List of Threatened Animals. *Chelonian Conservation and Biology*, 3(2), 200-224.
- Pinzón V, A. (2006). Introducción al diseño "in silico" de primers. Centro de Bioinformática del Instituto de Biotecnología en la Universidad Nacional de Colombia. Laboratorio de Micología y Fitopatología Universidad de los Andes, Colombia, (pp, 9).
- Quiñonez Sánchez, A. M. (2012). Estandarización de las condiciones de PCR para la amplificación de citocromo oxidasa C, subunidad I (COI) y evaluación de su contenido informativo en dos poblaciones de *Urotrygon aspidura* del Pacífico vallecaucano [recurso electrónico] (Doctoral dissertation).
- Roux, K. H. (2002). Single-step PCR optimization using touchdown and stepdown PCR programming. In *PCR Cloning Protocols* (pp. 31-36). Humana Press.