



**UNIVERSIDAD ESTATAL**  
**“PENÍNSULA DE SANTA ELENA”**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR**  
**CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA**

**TEMA**

Análisis comparativo de tres protocolos de extracción de ADN en cangrejo azul *Cardisoma crassum*, (Smith, 1870) del manglar del Cantón Eloy Alfaro, Esmeraldas-Ecuador, 2016.

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**  
**TRABAJO DE TITULACIÓN**

Previo a la obtención del Título de:

**BIÓLOGO MARINO**

**AUTOR**

Jonathan Gonzalo Rodríguez Pozo

**TUTOR**

Ing. Jimmy Villón MSc.

**LA LIBERTAD – ECUADOR**

2017

**UNIVERSIDAD ESTATAL  
“PENÍNSULA DE SANTA ELENA”  
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR  
CARRERA DE BIOLOGÍA MARINA**

**TEMA**

Análisis comparativo de tres protocolos de extracción de ADN en cangrejo azul *Cardisoma crassum*, (Smith, 1870) del manglar del Cantón Eloy Alfaro, Esmeraldas-Ecuador, 2016.

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN  
TRABAJO DE TITULACIÓN**

Previa a la obtención del Título de:

**BIÓLOGO MARINO**

**AUTOR**

**JONATHAN GONZALO RODRÍGUEZ POZO**

**TUTOR:**

**Ing. Jimmy Villón MSc.**

**COTUTORA:**

**Ph.D Nieves González Henríquez**

**LA LIBERTAD – ECUADOR**

**2017**

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad por hechos, ideas y resultados expuestos en este trabajo de titulación, me corresponden exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma, a la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

---

JONATHAN GONZALO RODRÍGUEZ POZO

C.I.0926670084

## **DEDICATORIA**

A Dios, por brindarme paciencia sabiduría y ayudarme a no darme por vencido y culminar esta etapa de formación académica. A mis padres, mi esposa y mi hijo que son mi fortaleza para seguir adelante.

JONATHAN GONZALO RODRÍGUEZ POZO

## **AGRADECIMIENTO**

A la UNIVERSIDAD ESTATAL PENÍNSULA DE SANTA ELENA y Facultad Ciencias del Mar, por brindarme el apoyo académico, y la oportunidad de culminar una etapa de desarrollo profesional.

A mis compañeros Kerly Balón, Diana Flores, Shirley Tómalá, y David Oñate por su apoyo y consejos en esta investigación.

Al tutor de tesis Jimmy Villón Moreno MSc, por su asesoramiento en el escrito y brindarme la confianza, al Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP), al Centro de Investigaciones Biológicas, Producción y Pasantías Académicas (CIBPA) de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), al Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la Escuela Politécnica del Litoral (ESPOL). A la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (Laboratorio BIOMOL), al programa PROMETEO SENESCYT por la coordinación, asesoramiento y cotutorización de la Dra. Nieves González Henríquez que me ha inculcado en el conocimiento de investigaciones científicas.

JONATHAN GONZALO RODRÍGUEZ POZO

## **TRIBUNAL DE GRADUACIÓN**

---

Blga. Dennis Tomalá Solano Ms.C.  
**DECANA DE LA FACULTAD  
DE CIENCIAS DEL MAR**

---

Blga. Herminia Cornejo R. Ph.D.  
**DIRECTORA DE LA CARRERA  
DE BIOLOGIA MARINA**

---

Blga. Janeth Galarza Tipán Ph.D.  
**DOCENTE DE ÁREA**

---

Ing. Jimmy Villón Moreno Ms.C  
**DOCENTE TUTOR**

---

Abg. Brenda Reyes Tomalá Mg.  
**SECRETARIA GENERAL**

**Análisis comparativo de tres protocolos de extracción de ADN en cangrejo azul *Cardisoma crassum*, (Smith, 1870) del manglar del Cantón Eloy Alfaro, Esmeraldas-Ecuador, 2016.**

**Comparative analysis of three DNA extraction protocols in the blue crab *Cardisoma crassum*, (Smith, 1870) of the mangrove swamp of the Canton Eloy Alfaro, Esmeraldas-Ecuador, 2016.**

Jonathan Rodríguez Pozo<sup>1</sup>, Nieves González Henríquez<sup>2</sup>, Jimmy Villón Moreno<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológica, Producción y Practicas Académicas (CIBPA) Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), P.O.BOX 240210, la Libertad, Ecuador.

E-Mail jonathan.rodriguezpozo1@Upse.edu.ec

<sup>2</sup>INCYT, Investigadora Prometeo Senecyt, Facultad de Ciencias del Mar, UPSE-Ecuador.

<sup>3</sup> Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Departamento de Biología, Campus de Tafira, Las Palmas de Gran Canaria, 35017 Las Palmas, España.

<sup>4</sup> Laboratorio de Sistemática Molecular (Unidad Asociada al CSIC), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Santiago de Compostela, CIBUS, Campus vida, 15782.

**Resumen**

*El cangrejo azul (*Cardisoma crassum*) es una especie representativa en la zona norte del manglar de Esmeraldas (Eloy Alfaro), esta especie tiene alto valor comercial, actualmente la especie se encuentra en un bajo nivel de población. sin embargo en cuanto a estudios en este crustáceo existen poca información, de esta manera se realizó este estudio en donde se permitió el uso de protocolos de extracción de ADN, con el fin de establecer la metodología óptima para obtener ADN de *Cardisoma crassum*, se evaluaron tres protocolos, Kit EZNA tissue DNA, Xiao o Fenol Cloroformo y Salino, en base a un análisis cualitativo comparativo de integridad de ADN a través de electroforesis en geles de agarosa y un análisis cuantitativo de concentración y pureza de los tres protocolos evaluados. Los resultados proporcionados por el Nanodrop 2000, en la obtención de concentración (ng/mg) y absorbancia (Abs260/Abs280nm), mostraron que el método salino posee un promedio de concentración de ADN de 193.38 ng/μl y una pureza de 1.978 (Abs260/Abs280). Los datos generados por los tres protocolos fueron sometidos a un análisis estadístico de ANOVA de un solo factor con un nivel de significancia  $\alpha$  del 5% y comparación en Tukey con los tres protocolos, tanto en concentración y pureza, determinándose que si existe diferencia significativa ( $P=0.000<0.05$ ) entre los tres protocolos; las comparaciones en Tukey de la concentración de ADN determina que el protocolo salino no muestra similitud con los métodos Kit y Fenol, y en la absorbancia de ADN el protocolo Kit EZNA muestra similitud en los resultados con el método Salino y no con Fenol.*

**Palabras claves:** ADN mitocondrial, protocolos extracción, Kit, Salino, *Cardisoma crassum*.

**Abstract**

*The blue crab (*Cardisoma crassum*) is a representative species in the northern area of the Esmeraldas mangrove (Eloy Alfaro), this species has high commercial value, the species is currently in a low population. However, in this crustacean there is little information, so this study was carried out where DNA extraction protocols were allowed, in order to establish the optimal methodology to obtain DNA of *Cardisoma crassum*, were evaluated Three protocols, Kit EZNA tissue DNA, Xiao or Phenol Chloroform and Salino, based on a qualitative comparative analysis of DNA integrity through electrophoresis in agarose gels and a quantitative analysis of concentration and purity of the three protocols evaluated. The results provided by Nanodrop 2000, in obtaining concentration (ng / mg) and absorbance (Abs260 / Abs280nm), showed that the saline method had an average DNA concentration of 193.38 ng / μl and a purity of 1,978 (Abs260 / Abs280). The data generated by the three protocols were subjected to a statistical analysis of single-factor ANOVA with a significance level  $\alpha$  of 5% and Tukey's comparison with the three protocols, both in concentration and purity, being determined that if there is a significant difference  $P = 0.000 < 0.05$ ) among the three protocols; Tukey's comparisons of DNA concentration determined that the Saline protocol did not show similarity with the Kit and Phenol methods, and in the DNA absorbance protocol the EZNA Kit shows similarity in the results with the Saline method and not with Phenol*

**Keywords:** mitochondrial DNA, protocols extraction, Kit, Saline, *Cardisoma crassum*.

## INTRODUCCIÓN

El cangrejo azul (*Cardisoma crassum*) posee una importancia socio-económica en la Provincia de Esmeraldas-Eloy Alfaro, en donde los residentes han visto en este crustáceo, una actividad productiva que consiste en la cría en cautiverio y comercialización durante todo el año, excepto durante el tiempo de veda establecidos por el Instituto Nacional de Pesca (INP), con la aspiración de evitar los índices de capturas por tallas, mantener un stock de la especie por más tiempo y su repoblación. Por otra parte el uso sostenible de la especie daría como resultado mantener a esta especie y evitar su extinción (Guerrero, 2014)

El cangrejo azul presenta esta coloración en su caparazón, característica morfológica única que diferencia al resto de organismos representados por el filo Artrópoda, con un máximo de 100 mm de ancho del caparazón. La distribución de esta especie va desde La Paz, Baja California, hasta Esmeraldas, norte de Ecuador (Vásquez, 2013). Vive en estuarios, manglares y en tierra firme situándose sobre terrenos fangosos o arcillosos, usando las raíces del mangle. Existe escasa información científica de esta especie, el único trabajo realizado en Ecuador es sobre el manejo para evaluar el estado del hábitat de *Cardisoma crassum* en bajo Borbón, provincia de Esmeraldas (Vera, 2012).

El ADN ha sido ampliamente sugerido y utilizado como marcador molecular; su condición haploide, herencia matrilineal, altas tasas de evolución y la presencia de regiones conservadas y variables, facilitan la tipificación molecular de individuos y su uso para la diferenciación de los mismos a diferentes escalas taxonómicas, ventajas que han sido aprovechadas en estudios con diversos grupos de especies comerciales (Behura, 2006). Es así como el ADN ha sido usado mayormente en estudios de filogenia en animales y plantas. El uso de este genoma en estudios filogenéticos es discutido debido a la presencia de rearrreglos del ADN y a la detección de ADN foráneo dentro de sus secuencias nucleotídicas (Palmer, 1992)

Para la extracción de ADN con otras especies de crustáceos, se utiliza la “Guía de procedimientos y protocolos genéticos de especies marinas” para obtener la concentración y pureza de ADN, a partir de tejido muscular, de esta manera se extraen los ácidos nucleicos, de acuerdo a cada método establecido (Quinteiro, 2012). Para la extracción de ADN realizados en ejemplares adultos de artrópodos se incluyen las sedas de pleópodo y pereiópodo como nuevos tejidos válidos para la obtención de ADN (Yue, 2010)

Los protocolos tradicionales de extracción del ADN consisten en cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Dundass, 2008). En la actualidad existen diferentes tipos de protocolos de extracción de ADN, cuyo propósito es obtener una óptima cantidad (concentración) y calidad (pureza) de ADN, los kits de extracción que se utilizan ahora son capaces de retener varios microgramos de ADN y separarlos del resto de las biomoléculas, permitiendo obtener un extracto libre de inhibidores (Alejos, 2009). Para la extracción de ADN con el uso del Kit EZNA se reduce el tiempo y procedimiento bajo las recomendaciones del proveedor garantizando una extracción de alta pureza ya que, tanto la recuperación de ADN como la eliminación de contaminantes, son muy eficientes (Quiagen, 2005). En diferentes especies de cangrejos también se han utilizado kits comerciales basados en lisis celular y precipitación del ADN (Li, 2007), no obstante, se ha reportado que el uso de kits puede sesgar los resultados (Carrigg 2007), esto ha llevado a la necesidad de adecuar y/o diseñar técnicas de extracción de ADN que aseguren el éxito de estudios posteriores, considerando las características de las muestra (Burke, 2008).

Una vez obtenido el ADN se procede a evaluar su concentración y pureza, utilizando la técnica de Espectrofotometría, en donde el método de análisis óptico es el más usado. Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría, para estudios posteriores de diversidad genética se requieren de 10 a 200 ng, debemos obtener al menos 5 ng/ul de ADN, concentraciones menores dificultaran la estandarización de otras técnicas. Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm, 1.8 como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminación (Alejos, 2009).

El protocolo Fenol cloroformo es uno de los métodos que permite obtener ADN libre de proteínas y enzimas aunque esta reportado como el más lento, laborioso y contaminante por el uso de sustancias tóxicas peligrosas para la salud humana por lo que es necesario que todo el proceso se lleve a cabo en una campana de extracción de productos químicos (Orfao, 2011), este reactivo tiende a contaminar fácilmente el ADN, por lo que se debe evitar acarrearlos en el proceso de purificación (Stulnig, 1994), mientras que el protocolo salino es de manera fácil, rápida y no contaminante, que permite obtener ADN de buena calidad (LoperaBarrero, 2008). Esta investigación propone estandarizar un protocolo óptimo para la extracción de ADN en el cangrejo azul (*Cardisoma crassum*) para estudios de diversidad genética, necesaria para su

manejo y conservación; permitiendo el análisis del potencial genético de esta especie. El objetivo de este estudio es determinar una metodología efectiva para la extracción de ADN mediante los protocolos, Kit EZNA tissue DNA, Xiao o Fenol Cloroformo y Salino, para establecer un procedimiento efectivo en la especie *Cardisoma crassum*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de las muestras

Se obtuvieron un total de 60 ejemplares de *Cardisoma crassum* mediante compra directa en el cantón Eloy Alfaro- Provincia de Esmeraldas (0°57'56.37"N y 79°39'1.97"O).



**Figura 1.** Área de obtención de especímenes de *Cardisoma crassum*- **Fuente:** Wikimedia

### Preprocesamiento de muestras

Los especímenes fueron colocados en refrigeración para su traslado a los laboratorios del Centro de Investigaciones Agropecuarias (CIAP) y del Centro de Investigaciones Biológicas, Producción y Pasantías Académicas (CIBPA) de la Universidad Estatal Península de Santa Elena (UPSE), posteriormente fueron codificados y se determinó medidas cefalotorácicas, ancho del caparazón y longitud total, utilizando un calibrador vernier, tomando como referencia lo propuesto por Poma (1995). De los 60 organismos se extrajo una porción de tejido muscular (45-56mg) de los apéndices torácico (coxopodito) y se colocaron en microtubos eppendorf, previamente rotulados, adicionando 2 ml de alcohol potable al 96% (Palomares, 2002), para luego almacenar el tejido a temperatura de -20°C en el Banco Genético de la UPSE, con el objetivo de preservar el material genómico hasta sus análisis.

### Extracción del ADN

Para el proceso de extracción de ADN se pesó una cantidad entre 45 mg y 56 mg de tejido, luego se maceró en seco y se trituró en un mortero de porcelana, previo al procedimiento de los tres protocolos establecidos. El método Kit EZNA se aplicó siguiendo las instrucciones del fabricante en donde se añadió 200 µL de Buffer y 25µL de OB Solution de proteasa y se incubó a 60° C en el bloque térmico con agitación durante 4 horas; para el método Fenol Cloroformo de Xiao (2011) y método salino (Martínez, 1997), se añadieron 600 µL utilizando un tampón de aislamiento de ADN que contiene 0.05M Tris – 0.1M EDTA, 70 µL de SDS al 10% y proteinasa K 20 µL, el segundo método se incubó a 60°C en el bloque térmico con agitación durante 4 horas y el tercer método se dejó incubar la muestra a 37°C durante 4 horas. El ADN extraído con cada uno de estos protocolos, se suspendió en 100 µL de H<sub>2</sub>O miliq (agua ultrapura) y se conservó el ADN a -20°C.

### Concentración y pureza de ADN

Se verificó la integridad del ADN genómico mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, utilizando el tampón TAE 1X, teñido con *SybrSafe*, se corrió el gel a 100 Voltios durante un tiempo de 45 min para luego visualizar las bandas de ADN en un transiluminador de UV. La cuantificación de ADN se determinó usando el espectrofotómetro Nanodrop 2000, (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), equipo para analizar la concentración y pureza del ADN a una longitud de onda mediante Abs260/Abs280. La pureza debe estar

en un rango de 1.8 – 2.0, datos menores y mayores indican presencia de impurezas y contaminación con ARN, carbohidratos y fenol (Broquet, 2007).

## **Análisis estadísticos de extracción de ADN**

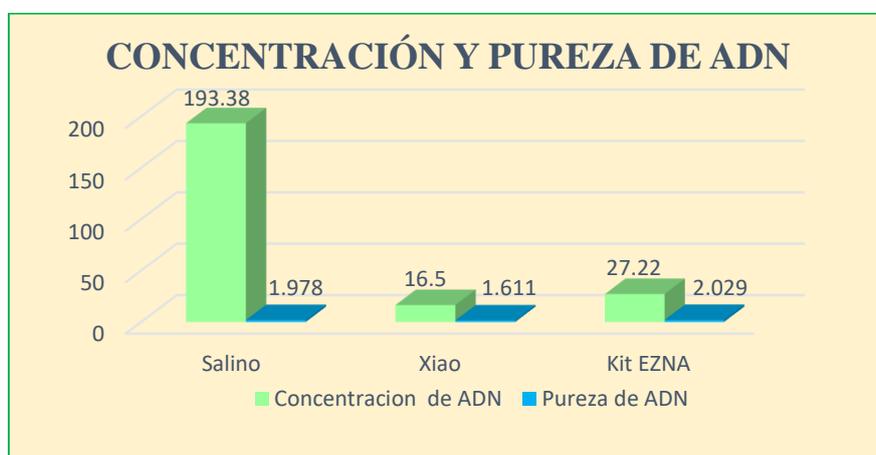
Se realizó un análisis estadístico en ANOVA de un solo factor para encontrar las diferencias significativas de concentración y calidad de ADN entre los tres protocolos y comparación en Tukey (Miller, 1996), previamente se realizó prueba de normalidad. Adicionalmente se evaluó los costos de cada protocolo.

## **RESULTADOS**

### **Análisis comparativo de los protocolos de extracción de ADN**

#### **a) Temperatura y tiempo de digestibilidad del tejido**

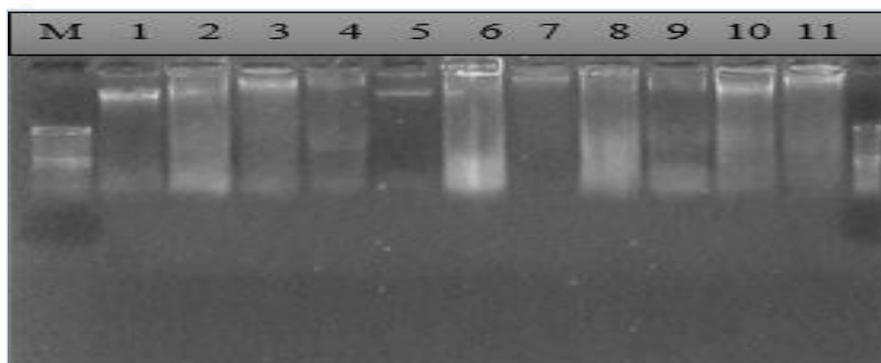
En la extracción de ADN, los tres tratamientos tuvieron una duración de cuatro horas; el protocolo kit Tissue EZNA. (Omega Bio-Tech) y Xiao (Fenol Cloroformo) presentaron resultados bajos en concentración y pureza de ADN debido a que en ambos métodos el tejido se incubó a una temperatura de 60°C. El protocolo salino fue el método que mejores resultados presentó debido a que el tejido se incubó a una temperatura de 37°C, inferior a la de los anteriores, siendo un procedimiento sencillo y económico (Figura 1).



**Figura 2.-** Digestión del tejido por cada protocolo en función a la concentración y pureza.

#### **b) Visualización del ADN en geles de agarosa**

Mediante análisis electroforético en geles de agarosa al 1%, el ADN extraído mediante los protocolos Kit EZNA y Xiao mostraron escasa visibilidad de las bandas, así como también baja concentración de ADN, con valores entre 8.3 – 53.5 ng/μl y 3.8 – 26.4 ng/μl respectivamente. Por otro lado, el protocolo salino presentó una mejor visibilidad de las bandas y mayor concentración de ADN respecto a los otros métodos mencionados, con valores entre 93.2 – 300.2 ng/μl.



**Figura 3.** Resultados de electroforesis en gel de agarosa al 1% con el protocolo Salino, muestra el carril M como marcador de peso molecular, los carriles 1, 3, 5, 7, 10, 11 muestran ADN genómico, los carriles 2, 6, 8, 9 muestran presencia de ARN o contaminación.

### c) Concentración y Pureza de ADN por espectrofotometría

El protocolo EZNA. tissue DNA kit dio como resultado una concentración de ADN promedio de 27.2 ng/μl y una pureza de 2.029 (Abs260/Abs280), el método de Xiao obtuvo baja concentración promedio de 16.11 ng/μl y pureza de ADN de 1.611 (Abs260/Abs280), y el protocolo salino mostró concentraciones promedio de 193.38 ng/μl y la pureza de 1.978 (Abs260/Abs280) óptimos de ADN (Tabla 1).

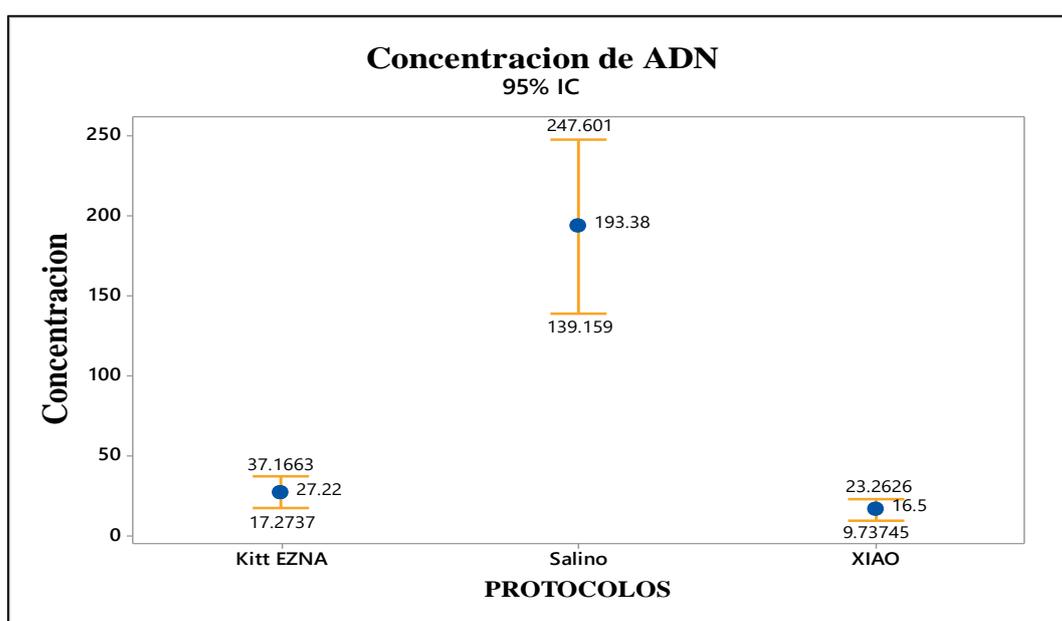
**TABLA 1.** Datos de concentración de ADN (ng/mg de tejido) y pureza (Abs260/Abs280) por cada protocolo de extracción de ADN.

N.- Muestra	Kit EZNA		Xiao		Salino	
	Concentraci n ng/μl	Pureza 260/280	Concentraci n ng/μl	Pureza 260/280	Concentraci n ng/μl	Pureza 260/280
1	43.6	1.93	2.3	1.41	168.6	1.97
2	30.5	2.00	25.3	1.47	93.2	1.95
3	35.5	1.95	24.9	1.45	137.4	2.01
4	25.9	2.05	17.4	1.90	266.7	2.0
5	19.8	1.95	12.6	1.42	271.8	2.01
6	21.5	2.15	6.7	1.44	230.1	1.97
7	21.1	2.10	26.4	1.82	102.3	1.96
8	12.5	2.05	24.2	1.88	131.4	1.87
9	8.3	2.03	21.4	1.45	300.2	1.93
10	53.5	2.08	3.8	1.87	232.1	1.95
<b>Rangos</b>	<b>8.3 – 53.5</b>	<b>1.77–2.08</b>	<b>3.8 – 26.4</b>	<b>1.41–1.90</b>	<b>93.2 – 300.2</b>	<b>1.93–2.01</b>
<b>Promedio</b>	<b>27.22</b>	<b>2.029</b>	<b>16.5</b>	<b>1.611</b>	<b>193.38</b>	<b>1.978</b>

### d) Análisis estadístico

#### Promedios de concentración de ADN

Los datos de concentración de ADN del protocolo Kit EZNA y Xiao presentaron los promedios más bajos, el primero con un promedio de 27.22 con intervalos de confianza al 95% de 37.1663-17.2737 y el segundo con un promedio 16.5 con intervalos de 23.2626-9.73745; el protocolo salino es el que posee un mejor promedio de concentración de ADN con 193.38 con intervalos de 247.601-139.159 (Figura 4).



**Figura 4.** Promedios de concentración de ADN (ng/ul)

### Concentración de ADN

El análisis exploratorio de los datos mostró el cumplimiento de los supuestos del ANOVA, encontrándose diferencias significativas entre los tres protocolos estudiados al 95 % de confianza ( $P = 0.000 < 0.05$ ). Para la comprobación de las diferencias encontradas entre protocolos, la prueba de Tukey mostró que los métodos kit y fenol presentan similitud, diferenciándose ambos de los resultados del protocolo salino. En el diagrama de cajas concentración de ADN, el protocolo salino muestra diferencias de los demás métodos de extracción de ADN (Figura 5).

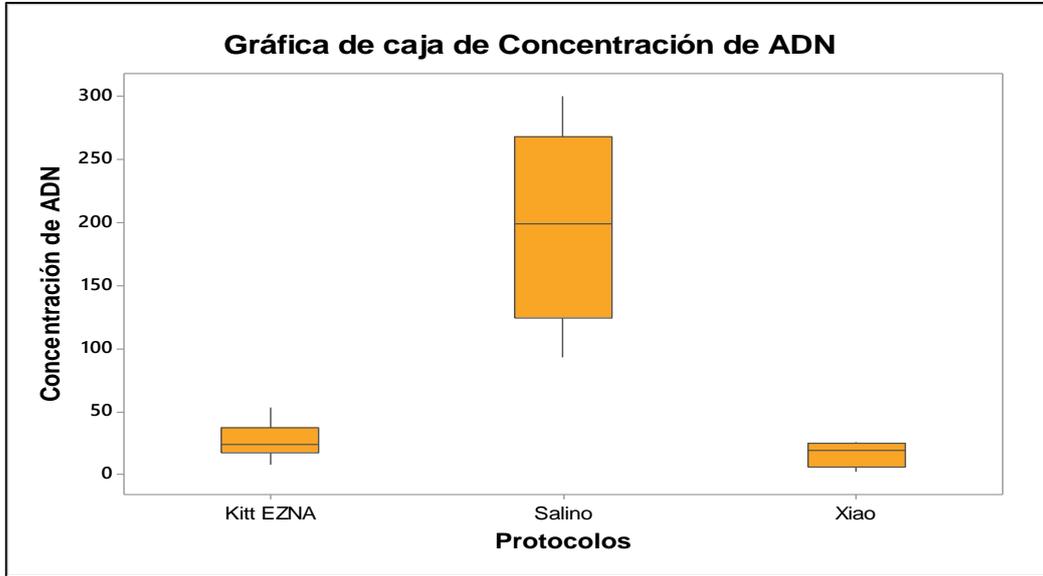


Figura 5. Concentración de ADN (ng/ul) de tres protocolos de extracción en *C. crasumm*

### Pureza de ADN

El análisis exploratorio de los datos mostró el cumplimiento de los supuestos del ANOVA, encontrándose diferencias significativas entre los tres protocolos estudiados al 95 % de confianza ( $P = 0.000 < 0.05$ ). Para la comprobación de las diferencias encontradas entre protocolos, la prueba de Tukey mostró que el protocolo kit EZNA tiene similitud con el método salino y ambos a la vez no muestran similitud con el de fenol. En el diagrama de cajas pureza de ADN, el protocolo Fenol muestra diferencias de los demás métodos de extracción de ADN (Figura 6).

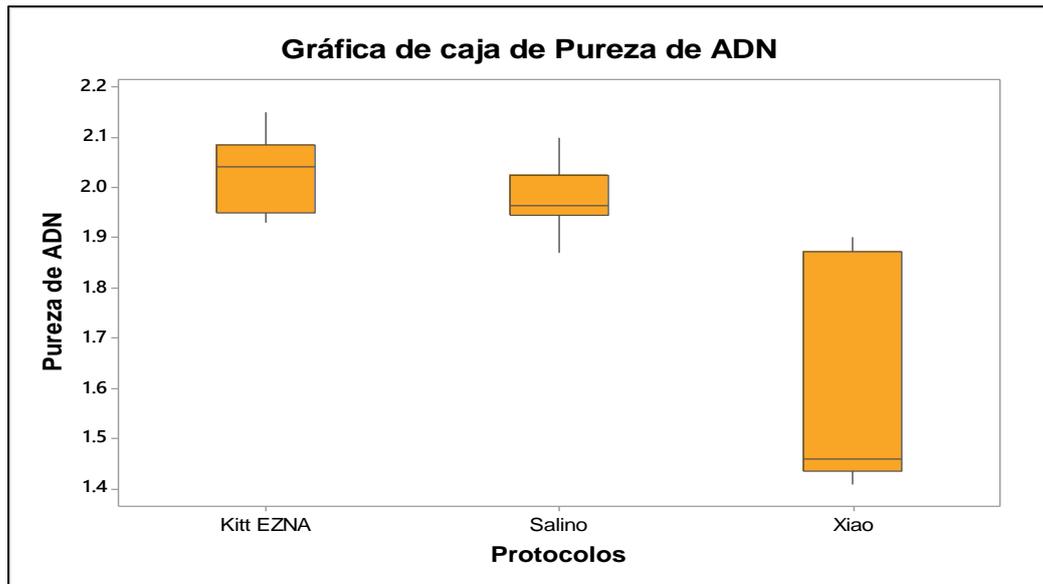


Figura 6. Análisis estadísticos en pureza de ADN de *C. crasumm*

## Evaluación de costos de los métodos de extracción de ADN.

Para cada protocolo se estimó un valor económico con el propósito de definir los costos de extracción; los reactivos del método kit EZNA, que incluye el análisis de 20 muestras, posee un valor comercial de \$ 25 debido a sus componentes químicos, para el método del Xiao (fenol cloroformo) el costo de reactivos es alrededor de \$ 22 para realizar extracciones en 20 muestras de *C. crassum*, y el método salino que fue el más económico, con un valor de \$ 20.2 para realizar 20 muestras de extracción de ADN (Tabla 2).

**Tabla.2.-** Costo estimado del valor unitario de cada protocolo y tiempo en horas usadas en el procedimiento, incluyendo las incubaciones

Muestras	Protocolo	Unidad (\$)	Total (\$)	Incubación (tiempo)	Pasos (tiempo)
20	Kit EZNA	\$1.25	\$25	4	13
20	Xiao	\$1.10	\$22	4	15
20	Salino	\$1.01	\$20.2	4	12

## DISCUSIÓN

Este estudio de extracción de ADN de *Cardisoma crassum* a partir de tejido muscular de los apéndices utilizó protocolos probados en otros trabajos con crustáceos, Quinteiro (2012) y Manent (2015), protocolo salino, fenol-cloroformo y Kit de EZNA, en donde solo el primer método presento los valores más altos en la concentración y pureza de ADN en comparación con los otros protocolos. El método salino utilizando proteinasa K y digestión a menor temperatura dió óptimos resultados para Alejos (2009), el uso del kit permite mejorar los resultados en poco tiempo, pero en el presente trabajo el protocolo con Kit EZNA y Fenol Cloroformo se vieron afectados por el periodo de tiempo de incubación y temperatura de digestión, provocando desnaturalización del ADN.

San Martin (2012) usó los protocolos salino, fenol-cloroformo y un kit comercial para la extracción de ADN en la raya *Dipturus chilensis* (Familia Rajidae), siendo todas las técnicas igualmente efectivas, obteniéndose ADN libre de impurezas y en concentración óptima para su posterior secuenciación. Rosimere (2015), realizó extracción de ADN con otras especies de *Cardisoma* (*C. guanhum*) donde determinó que el protocolo fenol cloroformo, utilizando proteinasa K, obtuvo los mejores resultados de concentración de ADN, igualmente Ordinola (2012), obtuvo resultados aceptables con *Ucides occidentales*, pero en el presente trabajo los resultados no fueron favorables en concentración y pureza de ADN con este protocolo. Por último, la extracción de ADN de *Cardisoma crassum* con el Kit Tissue EZNA, no obtuvo resultados favorables, en cambio Ratty (2010), trabajando con *Ucides occidentales*, extrajo ADN a partir de hemolinfa con el uso de mini-kit de Invitrogen, y Runni (2014) utilizó Kit comercial "EZNA. Tissue DNA kit" con *Pinnaxodes chilensis* (Crustacea: Decápoda), dando óptimos resultados de concentración de ADN.

Para la extracción de ADN se consideró la relación entre costos y tiempo de extracción de ADN, en donde se demostró que el protocolo salino es el método más económico, pero para Hleap (2009) el protocolo más eficiente y económico fue de Fenol Cloroformo (Xiao) modificándolo con reactivos de menor calidad, costo y durante pocas horas de trabajo de extracción de ADN en Osteíctios, a diferencia de Molina (2006) que utilizó el mismo protocolo y Kits comerciales resultando como métodos muy laboriosos y costosos, obteniendo bajos resultados en obtención de ADN. En trabajos de Mendoza (2010) para la extracción de ADN en diferentes especies de moluscos utilizó diferentes Kits comerciales dando como resultados una elaboración rápida, sencilla y económica para aislar el ADN.

El periodo de desnaturalización a una temperatura de 37° centígrados durante 4 horas fue óptimo para la extracción de ADN en *Cardisoma crassum*. San Martin (2012) con la especie *Mustelus schmitti* (tiburón) realizó la incubación a la misma temperatura (37°C) por un periodo de tiempo de 12 horas obteniendo buenos resultados. En la investigación realizada por Ratty (2010) incubó las muestras a una temperatura de 55° centígrados durante un periodo corto de tiempo de 10 minutos, lo mismo para LoperaBarrero (2008) en su trabajo realizado en Osteíctios donde incubó las muestras a una temperatura de 50° centígrados pero durante 12 horas con los protocolo Xiao y Kits comerciales, obteniendo resultados favorables.

La aplicación de los métodos de extracción de ADN en *C. crassum*, en cuanto a la obtención y uso de ADN, será de gran importancia en técnicas con marcadores moleculares y secuenciación de ADN mitocondrial, utilizados para el análisis de genética de poblaciones, taxonomía molecular y análisis filogenéticos de especies de importancia e interés comercial. El trabajo de Manent (2015) seleccionó a la especie *Grapsus*

*adscensionis* para llevar a cabo el análisis de la diversidad genética y su estructuración geográfica para obtener una imagen de la filogeografía marina. El estudio realizado por Rodríguez (2015) en *M. brachydactyla*, la extracción de ADN dio a conocer la diversidad en las poblaciones para la gestión de la pesca, al igual que la investigación realizada por Oñate (2012) que evaluó la diversidad genética para la conservación y la gestión de los recursos genéticos del *Rhynchocinetes Typus*. Tang (2005), recomienda que esta línea científica favorece a que los investigadores se enfoquen en analizar e interpretar la diversidad genética de la mayoría de especie de crustáceos y mejorar la precisión, con resultados reproducibles y confiables.

## CONCLUSIONES

Para la extracción de ADN de *Cardisoma crassum* se determinó que el método más aceptable en concentraciones y pureza es el protocolo salino, además es el método más económico y asequible. El tiempo de digestión juega un rol clave, siendo un factor importante para la obtención de ADN, el método salino se realizó a menor temperatura y menos tiempo en comparación con Fenol Cloroformo y Kit EZNA.

El costo y beneficio en los tres protocolos, depende del tiempo y recursos que son necesarios para la extracción de ADN en donde se demostró que el método salino obtuvo mayor cantidad y pureza de ADN con muy bajo costo, a diferencia de los métodos Xiao y Kit EZNA, debido a sus componentes químicos y procedimientos a seguir.

El tejido muscular de los apéndices de los individuos analizados en el presente estudio, fueron viables, por esta razón, este tejido es el más adecuado para la obtención de ADN; la calidad y pureza de extracción de ADN permitirá garantizar resultados positivos en estudios posteriores, siendo esencial para estudios genéticos, primer paso en la lista de metodologías moleculares.

## RECOMENDACIONES

Para realizar el proceso de extracción de ADN se debe evitar contaminación, requiriéndose total asepsia, considerando el tiempo de digestión y temperatura para cada método. Se recomienda extraer el ADN de muestras en estado fresco, donde el tejido no presenta degradación por inhibición de bacterias que afecte al aislamiento de ADN. Realizar estudios en aislamiento de ADN en especies comerciales, para así obtener información sobre el método de extracción adecuado para organismos marinos y complementarlos con estudios de diversidad genética, que servirá de herramienta para su manejo y sostenibilidad de poblaciones naturales y preservación de los recursos genéticos.

## BIBLIOGRAFÍA

Alejos, L.Aragon.M & Cornejo, A. (2009). Extracción y purificación del ADN. Revista de Biología, Vol 20, 1pp-25pp. Recuperado de <http://www2.inece.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extracciones.pdf>.

Behura, S.K. (2006). Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. Molecular ecology 15(11): 3087-113. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968257>.

Broquet, T. (2007) Noninvasive population Genetics; a review of sample, source, diet fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. Conservation Genetic: 8: 249-260. Recuperado de [https://www.researchgate.net/.../225923549\\_Noninvasive\\_populat](https://www.researchgate.net/.../225923549_Noninvasive_populat).

Burke, C. (2008). Selective Extraction of Bacterial DNA from the Surfaces of Macroalgae. Applied and Environmental Microbiology. 75:252-256. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/.../PubMedCentral> (PMC).

Carrigg, C. Rice O, Kavanagh S, Collins G, O'Flaherty V. (2007). DNA extraction method affects microbial community profiles from soils and sediment. Applied Microbiology and Biotechnology. 77:955-964. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17960375>.

Hleap, H. Cardenas H, & Garcia F. (2009). Preservación no criogénica de tejido y extracción de ADN: una aplicación para peces cartilaginosos. Pan-América Journal of aquatic of sciences, 545-555. recuperado en [www.panamjas.org/pdf\\_artigos/PANAMJAS\\_4\(4\)\\_545-555.pdf](http://www.panamjas.org/pdf_artigos/PANAMJAS_4(4)_545-555.pdf)

Dundass, B. (2008). Comparación de los métodos de extracción de ácidos nucleicos automatizados con la extracción manual. *Diagnosticos moleculares*, 311- 316. Recuperado de <https://translate.google.com.ec/translate>.

Guerrero, D. (2014). Estudio del cangrejo azul en el recinto vuelta larga, canton Rio Verde, Provincia de Esmeraldas y su propuesta gastronómica. Tesis de grado. Recuperado de [repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11943/1/58659\\_1.pdf](https://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11943/1/58659_1.pdf)

Martínez, A. (1997). Universal and rapid SALT-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 4692-4693. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9358185>

Mendoza, F. Fernández T. (2010) método de extracción de ADN de alta calidad en tejidos de moluscos bivalvos. *Desarrollo químico, Cip*. Recuperado de [patentados.com/patente/metodo-extraccion-adn-altacalidad-tejidos-moluscos/](https://patentados.com/patente/metodo-extraccion-adn-altacalidad-tejidos-moluscos/)

Molina, N. (2006). Comparación de métodos de lisis y extracción de ADN de trofozoítos de *Giardia lamblia*. *Parasitol Latinoam* 61: 133 - 137, 2006 FLAP. Recuperado de [www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-77122006000200006](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-77122006000200006)

Miller, R.G. (1996). *Simultaneous Statistical Inference*. McGraw-Hill. New York, pp. 272 Recuperado de [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bimj.../abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bimj.../abstract).

Ordinola, E. (2012). Diversidad y estructura genética poblacional del cangrejo del manglar (*Ucides occidentalis*) en la región Tumbes, Perú. *Diversidad y estructura genética poblacional*, 1-37. Recuperado de [www.veterinaria.org/descargas/articulos.a.arbitrar/OCT1203](http://www.veterinaria.org/descargas/articulos.a.arbitrar/OCT1203).

Palmer, I.D. (1992). Mitochondrial DNA in plant systematics : applications and limitations. In : Soltis, P. ; Soltis, D. and Doyle, J. (Eds) *Molecular systematics of plants*. New York, U.S.A. Chapman and Hall. p. 3649. Recuperado de [link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4615-3276-7\\_3](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4615-3276-7_3).

Poma, C. (1995). Dinámica poblacional y nivel de explotación del "cangrejo de los manglares" *Ucides occidentalis*, Tumbes-Perú. (Tesis de Maestro de en Ciencias), Universidad Nacional de Trujillo. Perú. Recuperado de [www.imarpe.gob.pe/tumbes/especies\\_comerciales/.../cangrejo\\_manglar.pdf](http://www.imarpe.gob.pe/tumbes/especies_comerciales/.../cangrejo_manglar.pdf).

Palomares, F. (2002). Faecal Genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology*; 11:2171-2182. Recuperado de [onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365...2002...x/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365...2002...x/abstract)

Quinteiro, J. Manet, P, Gonzalez, N. (2009). Guía de procedimientos y protocolos genéticos de especies marinas. Bagen, 1-35. Recuperado de [bagenpct.org/descargables/procedimientos...\\_...Protocolos geneticos.pdf](http://bagenpct.org/descargables/procedimientos..._...Protocolos geneticos.pdf).

Quiagen, I. Valencia. (2005). Manual de Plantas de ADN Biosprint. Recuperado [www.qiagen.com/hb/biosprintplantdnakit](http://www.qiagen.com/hb/biosprintplantdnakit), 1-9.

Ratty, M.M. (2010). Organización del sistema AFLP para determinación de variabilidad genética de *Ucides occidentalis* en tres zonas de manglar del golfo de Guayaquil. *Escuela Superior Politécnica del Litoral Centro de Investigación Científica y Tecnológica*, 1-6. Recuperado de <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/14660/1/D-90068.pdf>

Rosimere, M. Albrecht, M. (2015). Mitochondrial DNA Variation Reveals a Sharp Genetic Break within the Distribution of the Blue Land Crab *Cardisoma guanhumi* in the Western Central Atlantic. *Molecules* 2015, 20, 15158-15174. Recuperado de [www.mdpi.com/1420-3049/20/8/15158](http://www.mdpi.com/1420-3049/20/8/15158)

Runni, F. (2014). "Caracterización genético-poblacional y variabilidad morfológica de *Pinnaxodes chilensis* (decápoda: pinnotheridae) en la costa oriental del pacífico sur". Universidad Austral de Chile, 1123. Recuperado de [cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2014/fcr942c/doc/fcr942c.pdf](http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2014/fcr942c/doc/fcr942c.pdf).

San Martín, S. (2012). Identificación genética de las especies del género *Dipturus* mediante la técnica del ADFN mitocondrial: Comparación de métodos de extracción de ADN. Instituto nacional de investigación

y desarrollo pesquero. Chile. Recuperado de [www.inidep.edu.ar/publicaciones/catalogo/informes-decampana-2012-2/](http://www.inidep.edu.ar/publicaciones/catalogo/informes-decampana-2012-2/).

San Martin, S. (2012). Identificación de diferentes protocolos de extracción de ADN en muestras de musculo de espina dorsal de *Mustelus schmitti*. Instituto nacional de investigación y desarrollo pesquero. Chile Recuperado de [www.inidep.edu.ar/publicaciones/catalogo/informes-de-campana-2012-2/](http://www.inidep.edu.ar/publicaciones/catalogo/informes-de-campana-2012-2/).

Stulning, T. (1994). Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *BioTechniques* 16: 402404. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/751442>.

Vásquez, C. (2013). Experiencia en el manejo del *Cardisoma crassum*, en línea *Cardisoma crassum*. Archivo del Blog, 1 -1. Recuperado de [Cardisomacrassum.blogspot.com/2013/.../experiencias-en-elmanejo-del-cardisoma](http://Cardisomacrassum.blogspot.com/2013/.../experiencias-en-elmanejo-del-cardisoma).

Vera, A.A, (2012). Bases para el manejo del cangrejo azul (*Cardisoma crassum*) en la zona del bajo borbón, provincia de esmeraldas. *Investigación y saberes vol 1*, 43-53. Recuperado de [utelvt.edu.ec/ojs/index.php/is/article/view/10](http://utelvt.edu.ec/ojs/index.php/is/article/view/10)

Xiao, X., Zhang J., Zhang Q., Wang L., Tan Y., Guo Z & Zhou D. (2011). Two methods for extraction of high-purity genomic DNA from mucoïd Gram-negative bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4013-4018.

Lopera-Barrero, N.M. (2008). Diversidade genética de populações de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com a técnica de RAPD. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Brasil. 45 p.

Li, P. (2007). Dietary Supplementation of Short-Chain Fructooligosaccharides Influences Gastrointestinal Microbiota Composition and Immunity Characteristics of Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, Cultured in a Recirculating System. *Journal of Nutrition*. 137:2763-2768.

Yue, G.H. (2010). Molecular evidence for high frequency of multiple paternity in a freshwater shrimp species *caridina ensifera*, *Plos one*, 5, el 2721. Recuperado de [journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/...pone.0012721](http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/...pone.0012721).

Tang, Y.W, (2005). Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 4830-4833. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/.../PubMedCentral> (PMC)

# ANEXOS

## **ANEXOS 1**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar una metodología efectiva para la extracción de ADN mediante la comparación de los protocolos, Kitt EZNA tissue DNA, Xiao o Fenol Cloroformo y Salino, y establecer un procedimiento efectivo en la especie *Cardisoma crassum*.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Validar y evaluar una metodología efectiva y económica para la extracción de ADN: EZNA. Tissue DNA Kit (Omega Bio-tek), método salino modificado (Aljanabi y Martinez, 1997), método Xiao et al., (2011) modificado combinado con extracción salina.
- Obtener concentración y pureza de ADN por espectrofotometría.
- Definir el mejor protocolo de identificación para estudios posteriores de diversidad genética.

### **HIPÓTESIS**

HO. Existe diferencia de concentración y pureza de ADN en tres protocolos de extracción de ADN para la especie de *Cardisoma crassum*.

HA. No existe diferencia de concentración y pureza de ADN en tres protocolos de extracción de ADN para la especie de *Cardisoma crassum*.

## ANEXOS 2

### Preparación de las muestras y proceso de extracción de ADN



**Figura 1.-** *Cardisoma crassum*



**Figura 2.-** Traslado de especies



**Figura 3.-** Extracción de tejido



**Figura 4.-** Materiales de extracción



**Figura 5.-** Incubación del tejido



**Figura 6.-** Proceso de centrifugación

### ANEXOS 3

#### Obtención, visualización y espectrofotometría de ADN mitocondrial



**Figura 7.-**Codificación de crio-tubos



**Figura 8.-** Procedimiento de extracción



**Figura 9.-**Obtención del ADN



**Figura10.-** Materiales de Electroforesis



**Figura 11.-**Migración de ADN



**Figura 12.-** Nanodrop 2000

**ANEXOS 4**  
**Base datos de medidas cefalotorácicas de *Cardisoma crassum***

<b>Códigos y # de Muestras</b>	<b>LARGO (cm)</b>	<b>ANCHO (cm)</b>	<b>Peso de Tejido</b>
C. cra E. EL 422	60	70	0.047
C. cra E. EL 423	61	68	0.046
C. cra E. EL 424	63	71	0.047
C. cra E. EL 425	58	70	0.045
C. cra E. EL 426	71	83	0.047
C. cra E. EL 431	57	70	0.046
C. cra E. EL 438	56	73	0.047
C. cra E. EL 439	72	86	0.047
C. cra E. EL 440	66	85	0.048
C. cra E. EL 441	62	75	0.049
C. cra E. EL 442	70	82	0.048
C. cra E. EL 443	71	75	0.049
C. cra E. EL 444	72	79	0.045
C. cra E. EL 445	65	70	0.047
C. cra E. EL 446	71	81	0.047
C. cra E. EL 447	60	70	0.049
C. cra E. EL 458	76	70	0.048
C. cra E. EL 459	77	70	0.045
C. cra E. EL 460	61	71	0.049
C. cra E. EL 461	69	70	0.046
C. cra E. EL 462	69	81	0.055
C. cra E. EL 463	67	80	0.054
C. cra E. EL 464	71	80	0.06
C. cra E. EL 465	63	70	0.054
C. cra E. EL 466	64	71	0.05
C. cra E. EL 467	70	80	0.06
C. cra E. EL 468	66	73	0.05
C. cra E. EL 469	67	70	0.056
C. cra E. EL 470	59	68	0.053
C. cra E. EL 471	62	72	0.047
C. cra E. EL 472	69	80	0.047
C. cra E. EL 473	71	82	0.049
C. cra E. EL 474	67	75	0.046
C. cra E. EL 475	63	77	0.047
C. cra E. EL 476	74	81	0.045
C. cra E. EL 477	75	80	0.048
C. cra E. EL 478	59	70	0.047

C. cra E. EL 479	67	77	0.047
C. cra E. EL 480	63	75	0.046
C. cra E. EL 481	69	82	0.047
C. cra E. EL 482	72	80	0.049
C. cra E. EL 483	61	70	0.045
C. cra E. EL 484	67	78	0.047
C. cra E. EL 485	74	83	0.049
C. cra E. EL 486	68	79	0.048
C. cra E. EL 487	72	82	0.047
C. cra E. EL 488	56	75	0.049
C. cra E. EL 489	66	79	0.045
C. cra E. EL 490	69	74	0.048
C. cra E. EL 639	71	82	0.046
C. cra E. EL 640	61	79	0.056
C. cra E. EL 641	62	80	0.053
C. cra E. EL 642	59	72	0.047
C. cra E. EL 643	74	82	0.047
C. cra E. EL 644	64	79	0.049
C. cra E. EL 645	63	79	0.046
C. cra E. EL 646	61	79	0.047
C. cra E. EL 647	71	80	0.056
C. cra E. EL 648	68	79	0.053
C. cra E. EL 649	69	80	0.054

**ANEXO 5**  
**Base datos de Concentración ADN Ng/μl y Pureza 260/280**

Codigos	Concentración ADN Ng/μl	Pureza 260/280	Protocolos
C. cra E. EL 422	168.6	1.97	Salino
C. cra E. EL 423	93.2	1.95	Salino
C. cra E. EL 424	137.4	2.01	Salino
C. cra E. EL 425	266.7	2	Salino
C. cra E. EL 426	271.8	2.01	Salino
C. cra E. EL 431	17.3	1.86	Salino
C. cra E. EL 438	25.3	1.45	Salino
C. cra E. EL 439	24.9	1.88	Salino
C. cra E. EL 440	17.4	1.42	Salino
C. cra E. EL 441	230.1	1.97	Salino
C. cra E. EL 442	230.1	1.96	Salino
C. cra E. EL 443	102.3	1.96	Salino
C. cra E. EL 444	131.4	1.87	Salino
C. cra E. EL 445	300.2	1.93	Salino
C. cra E. EL 446	232.1	1.95	Salino
C. cra E. EL 447	19.8	1.95	Salino
C. cra E. EL 458	44.3	1.64	Salino
C. cra E. EL 459	18.7	1.86	Salino
C. cra E. EL 460	30.5	1.82	Salino
C. cra E. EL 461	48.5	1.78	Salino
C. cra E. EL 462	2.3	1.41	Xiao
C. cra E. EL 463	14.8	1.5	Xiao
C. cra E. EL 464	25.3	1.47	Xiao
C. cra E. EL 465	13.8	1.29	Xiao
C. cra E. EL 466	24.9	1.45	Xiao
C. cra E. EL 467	17.4	1.9	Xiao
C. cra E. EL 468	12.6	1.42	Xiao
C. cra E. EL 469	8.1	2.64	Xiao
C. cra E. EL 470	15.6	1.84	Xiao
C. cra E. EL 471	6.7	1.44	Xiao
C. cra E. EL 472	18.2	1.22	Xiao
C. cra E. EL 473	26.4	1.82	Xiao
C. cra E. EL 474	24.2	1.88	Xiao
C. cra E. EL 475	12.5	1.43	Xiao
C. cra E. EL 476	8.3	1.93	Xiao
C. cra E. EL 477	21.4	1.45	Xiao
C. cra E. EL 478	18.8	1.76	Xiao
C. cra E. EL 479	32.2	1.79	Xiao
C. cra E. EL 480	3.8	1.87	Xiao

C. cra E. EL 481	19.6	1.82	Xiao
C. cra E. EL 482	43.6	1.93	Kit EZNA
C. cra E. EL 483	30.5	2	Kit EZNA
C. cra E. EL 484	35.5	1.95	Kit EZNA
C. cra E. EL 485	55	1.41	Kit EZNA
C. cra E. EL 486	25	1.83	Kit EZNA
C. cra E. EL 487	25	1.83	Kit EZNA
C. cra E. EL 488	25.9	2.05	Kit EZNA
C. cra E. EL 489	19.8	1.95	Kit EZNA
C. cra E. EL 490	21.5	2.15	Kit EZNA
C. cra E. EL 639	44.1	1.47	Kit EZNA
C. cra E. EL 640	21.1	2.1	Kit EZNA
C. cra E. EL 641	50.2	1.69	Kit EZNA
C. cra E. EL 642	20.9	1.69	Kit EZNA
C. cra E. EL 643	35.7	1.85	Kit EZNA
C. cra E. EL 644	12.5	2.05	Kit EZNA
C. cra E. EL 645	53.6	1.82	Kit EZNA
C. cra E. EL 646	8.3	2.03	Kit EZNA
C. cra E. EL 647	53.5	2.08	Kit EZNA
C. cra E. EL 648	37.1	1.68	Kit EZNA
C. cra E. EL 649	24.7	1.68	Kit EZNA