



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**FILOGENIA MITOGENÓMICA DE LA ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN
ATELOPUS EXIGUUS (ANURA: BUFONIDAE), BASADO EN TECNOLOGÍA DE
SECUENCIACIÓN POR NANOPOROS.**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR

LIZBETH ESTEFANIA ROJAS ESTRADA

Napo-Ecuador

2024



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**FILOGENIA MITOGENÓMICA DE LA ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN
ATELOPUS EXIGUUS (ANURA: BUFONIDAE), BASADO EN TECNOLOGÍA DE
SECUENCIACIÓN POR NANOPOROS.**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: LIZBETH ESTEFANIA ROJAS ESTRADA

TUTOR: Ph.D. HUGO MAURICIO ORTEGA ANDRADE

Napo-Ecuador

2024

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

De mi consideración:

Yo, Lizbeth Estefania Rojas Estrada con documento de identidad 1501168288, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniera en biotecnología son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en el presente documento son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 29 de febrero de 2024



.....
Lizbeth Estefania Rojas Estrada

CI: 1501168288

AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, LIZBETH ESTEFANIA ROJAS ESTRADA, con documento de identidad N° 1501168288 en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: "FILOGENIA MITOGENÓMICA DE LA ESPECIE EN PELIGRO DE EXTINCIÓN *ATELOPUS EXIGUUS* (ANURA: BUFONIDAE), BASADO EN TECNOLOGÍA DE SECUENCIACIÓN POR NANOPOROS" de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 29 de febrero de 2024



.....
Lizbeth Estefania Rojas Estrada

CI: 1501168288

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación: “Filogenia mitogenómica de la especie en peligro de extinción *Atelopus exiguus* (Anura: Bufonidae), basado en tecnología de secuenciación por nanoporos”, en la modalidad de: artículo, fue realizado por Lizbeth Estefania Rojas Estrada, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiám, para su entrega y defensa.

Tena, 29 de febrero de 2024



.....
Hugo Mauricio Ortega Andrade

CI: 1717270811

DEDICATORIA

A mi madre, fuente inagotable de amor, sabiduría y apoyo incondicional. Su constante aliento y sacrificio han sido mi mayor inspiración a lo largo de este viaje académico.

A mi hermana Erika Rojas, quien ha sido mi confidente, consejera y fuente constante de inspiración. Su apoyo incondicional y su fe en mis capacidades han sido el motor que me impulsó a alcanzar este logro. Gracias por tu paciencia, amor y comprensión a lo largo de este viaje.

A mi amado hijo Sebastián Quintanilla, quien ha sido mi mayor motivación. Cada paso que he dado en esta travesía académica ha sido con la esperanza de construir un futuro mejor para ti. Tu sonrisa ha iluminado incluso los días más difíciles, recordándome por qué este esfuerzo vale la pena.

A mi tutor Mauricio Ortega, cuyas enseñanzas han iluminado mi camino y moldeado mi comprensión del mundo que investigo. Agradezco su dedicación y paciencia.

A mis amigos y seres queridos, quienes han compartido risas, ánimos y momentos de alivio en cada etapa de este desafío académico. Su amistad ha sido un bálsamo para los momentos difíciles.

A los que han contribuido a este logro, mi agradecimiento. Este trabajo es también vuestro. Este trabajo está dedicado a ustedes, quienes han sido los faros que iluminaron mi camino a lo largo de esta travesía académica.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que contribuyeron de manera significativa a la realización de esta tesis.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, Mauricio Ortega, por su orientación experta, su paciencia y su apoyo constante a lo largo de este viaje académico. Sus valiosas sugerencias y comentarios han sido fundamentales para dar forma a esta investigación.

Agradezco a mis profesores y miembros del comité de tesis por su tiempo, dedicación y valiosas contribuciones que enriquecieron el contenido y la metodología de este trabajo. Mi gratitud se extiende a mis compañeros de investigación y colaboradores, cuyas discusiones e ideas han sido una fuente constante de inspiración y enriquecimiento. No puedo pasar por alto el apoyo incondicional de mi familia y amigos. Agradezco por su paciencia, comprensión y aliento constante durante este desafiante pero gratificante proceso.

Gracias a todos los que formaron parte de este viaje. Este logro no habría sido posible sin su colaboración y apoyo.

ÍNDICE GENERAL

CARATULA	
DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACION DE PUBLICACION EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
ÍNDICE GENERAL	vii
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS	4
RESULTADOS.....	9
DISCUSIÓN	16
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Rendimiento de secuenciación de MinION utilizando ADN genómico total extraído del tejido muscular del <i>Atelopus exiguus</i>	9
Tabla 2.	Tabla de atributos de los componentes del genoma mitocondrial de <i>Atelopus exiguus</i>	10
Tabla 3.	Porcentajes de similitudes de 10 especies de Bufonidae con respecto a <i>A. exiguus</i>	15
Tabla 4.	Secuencias más cercanas respecto a las distancias filogenéticas patristicas	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Sitio de colecta de la muestra de <i>A. exiguus</i> en el Bioparque AMARU, Chico Soldados, Azogues, Ecuador.	4
Figura 2.	Diagrama de flujo del ensamblaje del genoma mitocondrial de <i>A. exiguus</i> utilizando datos de secuencia de Nanopore.	7
Figura 3.	Mapa circular del genoma mitocondrial de <i>Atelopus exiguus</i> obtenido de la secuenciación ONT.	10
Figura 4.	Filogenia de la especie <i>Atelopus exiguus</i> basada en los genomas mitocondriales completos de anfibios obtenidos del NCBI.	14

ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo A.** Fotografía gel de agarosa 1% donde se evidencia el contraste en los resultados de la extracción de ADN genómico de alto peso molecular con el Kit Monarch HMW for Tissue.
- Anexo B.** Protocolo de extracción de ADN genómico de alto peso molecular.
- Anexo C.** Protocolo de preparación de preparación de librerías.
- Anexo D.** Pipeline de la paquetería usada en Linux.
- Anexo E.** Programas utilizados en la creación de la paquetería en Linux.

RESUMEN

Los nuevos avances en la tecnología de secuenciación y el análisis de nucleótidos nos han permitido generar datos genómicos que aportan a la exploración en la reconstrucción de la filogenia de los Anuros. En este estudio se ha secuenciado y caracterizado el genoma mitocondrial completo de *Atelopus exiguus*, que pertenece a la familia Bufonidae. Proporcionamos la descripción de un mitogenoma completo de *A. exiguus* y examinamos su posición filogenética respecto a otras especies relacionadas. Su mitogenoma es una molécula circular cerrada de 18.475 pb de longitud que incluye 13 genes codificadores de proteínas (CDS), 22 genes codificadores de ARNt, 2 genes codificadores de ARNr y una región de control (CR) que se conservan en la mayoría de los mitogenomas de Bufonidae. Nuestros datos proporcionan un recurso útil para los estudios filogenéticos del género *Atelopus*. El análisis filogenético comparativo de los genomas mitocondriales de *A. exiguus* con los mitogenomas disponibles de otros anfibios confirmó la estrecha relación de la familia Bufonidae respecto a otras familias de Anuros y mostró que el clado de los *Atelopus* es un grupo hermano de *Anaxyrus*. A pesar de varias diferencias morfológicas y de historia de vida distintas entre las familias de Anuros, las estimaciones de distancias genéticas de ADNmt corroboran la posición filogenética del género *Atelopus* dentro de la familia Bufonidae. El mitogenoma completo de *A. exiguus* puede proporcionar datos importantes para los estudios sobre relaciones filogenéticas y genética de poblaciones para explorar más a fondo el estado taxonómico de esta especie, y, en consecuencia, su conservación.

PALABRAS CLAVE: *Atelopus exiguus*, mitogenoma completo, filogenia

ABSTRACT

New advances in sequencing technology and nucleotide analysis have allowed us to generate genomic data that contribute to the exploration in the reconstruction of the phylogeny of Anurans. In this study we have sequenced and characterized the complete mitochondrial genome of *Atelopus exiguus*, which belongs to the family Bufonidae. We provide the description of a complete mitogenome of *A. exiguus* and examine its phylogenetic position relative to other related species. Its mitogenome is a closed circular molecule 18,475 bp in length that includes 13 protein-coding genes (CDS), 22 tRNA-coding genes, 2 rRNA-coding genes, and a control region (CR) that are conserved in most Bufonidae mitogenomes. Our data provide a useful resource for phylogenetic studies of the genus *Atelopus*. Comparative phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes of *A. exiguus* with available mitogenomes of other amphibians confirmed the close relationship of the family Bufonidae to other Anuran families and showed that the *Atelopus* clade is a sister group to *Anaxyrus*. Despite several distinct morphological and life history differences among Anuran families, mtDNA genetic distance estimates corroborate the phylogenetic position of the genus *Atelopus* within the family Bufonidae. The complete mitogenome of *A. exiguus* may provide important data for studies on phylogenetic relationships and population genetics to further explore the taxonomic status of this species, and consequently, its conservation.

KEY WORDS: *Atelopus exiguus*, complete mitogenome, phylogeny.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el decrecimiento de anfibios se considera una emergencia ecológica progresiva a nivel mundial, con poblaciones que han disminuido paulatinamente y restringido sus rangos de distribución. Ecuador no es la excepción, por lo que se han determinado factores antropogénicos que influyen en la disminución de poblaciones de anfibios, tales como destrucción de su hábitat, enfermedades emergentes, cambio climático, contaminación del agua por agentes químicos, entre otras [1]. Ecuador tiene 669 especies de anfibios registradas, 261 endémicas, siendo Anura el orden con mayor riqueza, incluyendo 608 especies de ranas [2]. En Ecuador, 57 % de las especies de anfibios están amenazadas, ubicándose como el tercer país a nivel mundial en poseer un alto número de especies amenazadas [1]. Entre los anfibios ecuatorianos, el género *Atelopus* es el grupo que contiene al 100% de las especies de ranas en categoría de amenaza. Entre ellas, la especie *Atelopus exiguus* Boettger (1892), conocida como Jambato de Mazán, perteneciente al orden Anura, familia Bufonidae, es considerada como “En Peligro Crítico de extinción”. Esta especie es endémica del Ecuador, distribuida hacia el centro y sur la Cordillera de los Andes, en el ecosistema de páramo de la provincia del Azuay [3].

Desde el punto de vista de la genómica poblacional, a nivel global hay que llenar vacíos de información porque los estudios sobre anfibios se basan en descripciones taxonómicas, distribución geográfica, evolución, dinámica poblacional, entre otros. Sin embargo, es limitada la documentación de información genómica de las especies en peligro de extinción que sirvan como base para la conservación e investigación de las mismas [4]. El genoma mitocondrial (mitogenoma) de los animales es una parte importante de su material genético y desempeña un papel fundamental en la caracterización de genes para la producción de energía y el metabolismo celular. El estudio del genoma mitocondrial de los animales ha sido útil para investigaciones evolutivas, filogenéticas y de poblaciones, ya que su estructura y secuenciación pueden proporcionar información sobre la historia ancestral y los vínculos genéticos entre diferentes especies [5]. El mitogenoma de anfibios sigue la estructura general del genoma mitocondrial, con genes codificantes y regiones no codificantes. Sin embargo, hay variaciones en la longitud, organización y secuencia del mitogenoma entre especies de anfibios. En cuanto a la variabilidad del mitogenoma entre especies de anfibios, se han observado diferencias en la longitud total del mitogenoma y en la organización de

genes. Además, las secuencias de nucleótidos pueden variar entre especies y dentro de una misma especie, lo que brinda información útil para estudios de filogenia y genética de poblaciones [6].

Existen varias tecnologías de secuenciación que se utilizan para generar mitogenomas completos a partir de muestras de tejido [7]. La tecnología de secuenciación Oxford Nanopore Technologies (ONT) tiene la capacidad de generar lecturas largas (kilobases) y la capacidad de secuenciar directamente el ADN o ARN sin la necesidad de amplificación previa. Esta tecnología se basa en el paso de una hebra de ADN o ARN a través de un nanoporo, que es un pequeño canal en una membrana. A medida que la molécula pasa a través del nanoporo, las bases individuales modifican la corriente eléctrica, lo que permite la identificación de las bases secuenciales [8]. La tecnología Oxford Nanopore se utiliza comúnmente para secuenciar mitogenomas debido a varias ventajas que ofrece en comparación con otras técnicas de secuenciación. Las ONT permite generar datos en tiempo real, obteniendo resultados de secuencias casi instantáneamente. Esto reduce el tiempo total requerido para la secuenciación de mitogenomas y permite una rápida toma de decisiones durante el proceso de investigación [7]. Las ONT son dispositivos portátiles y compactos, facilitando su uso en diferentes entornos, incluido el campo [8]. Esto es beneficioso cuando se trabaja con muestras de especies que no son fácilmente accesibles en un entorno de laboratorio, como muestras de campo o conservadas en museos. Y por su parte, las ONT nos ofrece una alternativa más económica en comparación con otras tecnologías de secuenciación de próxima generación, lo que permite un acceso más amplio a la secuenciación de mitogenomas [9].

El análisis filogenético es una herramienta poderosa para comprender su historia evolutiva y sus relaciones con otras especies [9]. Ayuda a responder preguntas sobre la diversificación, la adaptación y la evolución de las especies en el contexto más amplio de la vida en la Tierra. La filogenia a partir de mitogenomas es una técnica comúnmente utilizada para inferir las relaciones filogenéticas entre diferentes especies debido a que los mitogenomas, que son los genomas completos de las mitocondrias, son ampliamente utilizados en estudios filogenéticos debido a su tamaño compacto, alta tasa de evolución y herencia materna [10]. Por consiguiente, se emplean técnicas filogenéticas para llevar a cabo el análisis correspondiente de la filogenia, tales como: el método de máxima verosimilitud, el método de distancia o el método de parsimonia, para inferir el árbol filogenético a partir de la matriz de datos de mitogenomas. Estos

métodos evalúan diferentes suposiciones y criterios para encontrar el árbol que mejor se ajuste a los datos [11]. Es por eso que este estudio busca aportar información sobre la filogenia mitogenómica de la especie en peligro de extinción *Atelopus exiguus* mediante el uso de tecnología de secuenciación por nanoporos, con los siguientes objetivos: 1) Caracterizar el genoma mitocondrial completo; 2) Analizar la variabilidad genética del ADN mitocondrial y la distancia filogenética de *A. exiguus* con respecto a otros anuros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo

La muestra de *A. exiguus* fue provista por el Centro de Conservación de Anfibios-Amaru (CCA), bajo su programa de manejo de fauna amenazada. Se recolectó la muestra fresca de tejido dactilar de la pata trasera proveniente de una hembra adulta que fue recolectada por el BIOPARQUE AMARU (2.940219°S, 79.224130°W) en la localidad de Chico Soldados, Azogues, Ecuador (**Figura 1**). Dicha muestra fue conservada en etanol al 70% en el Laboratorio de Biología Molecular y bioquímica de la Universidad Regional Amazónica IKIAM.

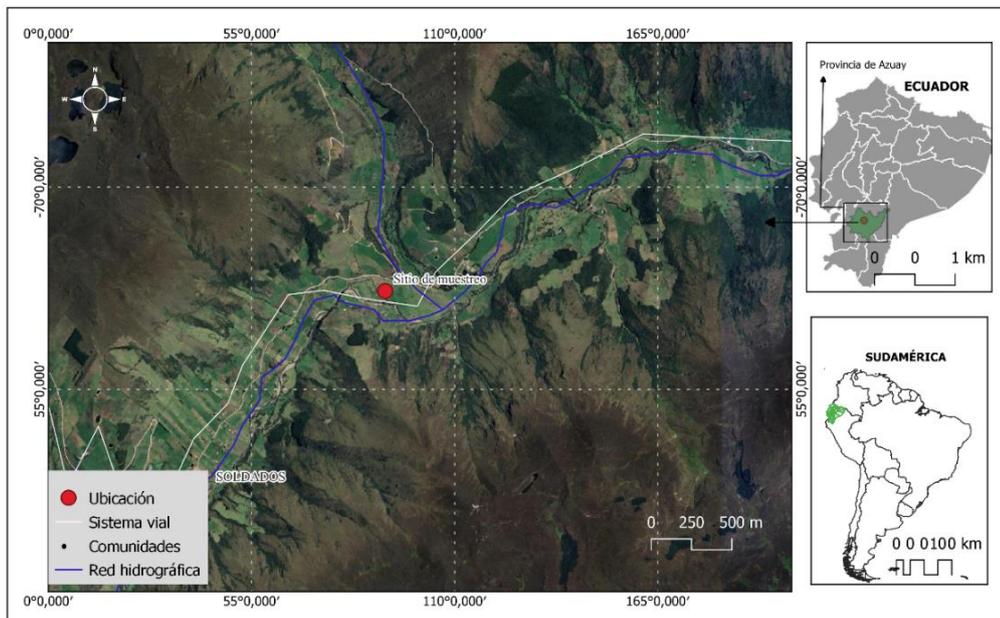


Figura 1. Sitio de colecta de la muestra de *Atelopus exiguus* en el Bioparque AMARU, Chico Soldados, Azogues, Ecuador.
Realizado por: Lizbeth Rojas, 2024

Consideraciones éticas

Debido a que los anfibios ecuatorianos son considerados un recurso genético del país, la presente investigación se reglamentó con base en las consideraciones éticas soportadas en el Ministerio del Ambiente del Ecuador para obtener el Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos registrado con código Nro. MAE-DNB-CM2018-0081 con fines de investigación científica. Así como también bajo la patente provisional

de funcionamiento de medios de conservación y manejo ex situ del Biocentro Amaru (Nro. TEMP- MAATE-MCMEVS-2023-219).

Extracción de ADN de alto peso molecular (HMW DNA)

Para la extracción de ADN genómico de alto peso molecular con 18 mg de tejido muscular se utilizó el Kit Monarch® HMW DNA Extraction Kit for Tissue (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) [12], adecuando el protocolo establecido por el kit comercial de acuerdo con la disponibilidad de equipos en el laboratorio LBMB Ikiam [**Anexo 1**]. Para determinar la pureza y cantidad de ADN genómico extraído se evaluó mediante espectrofotometría en NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) considerando la proporción de la absorbancia (A260/A280) y (A260/A230). La integridad del ADN se evaluó a través de electroforesis en gel de agarosa. El gel se preparó utilizando 25 mL de TBE (Tris-borato-Edta) 1X con agarosa al 1% (0.25 g). La tinción del gel se la realizó utilizando 1 µL de Safe DNA gel station. En la cámara de electroforesis (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) se colocó el gel preparado y se introdujo la escalera 10Kb Fast DNA Ladder (5 µL), ADN genómico 5 µL (4µL de ADNg+ 1 µL de Loading Buffer). La corrida se realizó durante 90 minutos a 80V. A través del transiluminador, se visualizó el ADN genómico bajo luz ultravioleta del equipo.

Secuenciación mediante ONT

El ADN genómico extraído se utilizó para la construcción de la biblioteca utilizando el kit de preparación de librerías se inició con la reparación y preparación final del ADN utilizando el kit NEBNext® (New England Biolabs, MA, EE. UU) siguiendo el protocolo establecido por el kit comercial [**Anexo 2**]. Por otra parte, para la ligación de adaptadores se utilizó el kit Genomic DNA by Ligation SQK-LSK110 (ONT, Oxford, Reino Unido) [13]. La secuenciación se realizó utilizando celdas de flujo (MinION R10: FLO-MIN111, ONT, Oxford, Reino Unido), mismas que fueron acondicionadas con el kit Flow cell priming kit (EXP-FLP002, ONT, Oxford, Reino Unido). La librería de secuenciación se preparó añadiendo 37.5µL de SBII, 25µL de LBII y 12µL de librería de ADN. Posterior, se colocó la muestra en el dispositivo MinION mk1b (ONT, Oxford, Reino Unido), para así proceder a secuenciar. La ejecución de secuenciación MinION se controló utilizando el software MinKNOW v22.10.7 (ONT, Oxford, Reino Unido) estableciendo un tiempo de ejecución de 15 horas. Posterior a su uso, el equipo fue desconectado y la celda de flujo (FLO-

MIN111, ONT, Oxford, Reino Unido) se limpió con el kit de limpieza (EXP-WSH004; ONT, Oxford, Reino Unido) siguiendo las instrucciones de fábrica, y la celda se almacenó a 4 °C.

Reconstrucción del mitogenoma

Para el procesamiento de datos obtenidos del software MinKNOW se manejó un pipeline descrito en el **Anexo 3**. La calidad de los datos de secuenciación sin procesar (en formato FASTQ) se evaluó utilizando NanoPlot v1.41.0, mientras que la búsqueda y eliminación de adaptadores de lecturas ONT se realizó con Porechop 0.2.4. Para el filtrado y recorte de secuencias de lectura larga se utiliza Nanofilt. Las lecturas presumiblemente asignadas al ADNmt se seleccionaron mediante una estrategia basada en BLAST utilizando mtBlaster (<https://github.com/nidafra92/squirrel-project/blob/master/mtblaster.py>) [14], la cual nos permite la identidad taxonómica de nuestra especie. La secuencia de *Bufo gargarizans* (GenBank: NC_008410.1) se utilizó como datos de referencia. Con el objetivo de corregir los errores típicos de codificación de bases de Nanopore el ensamblaje se realizó utilizando Flye v2.9.2. Posterior, se realizó un borrador del ensamblaje utilizando minimap v2.1 en el que se pulió aplicando 5 rondas de lecturas de mapeo en comparación con el ensamblaje anterior y posteriormente los ensamblajes (“contigs”) resultantes se pulieron usando Racon v1.2.1 [15]. Se implementó un paso de pulido final con Nanopolish 0.8.5 [15] en las 5 veces del ensamblaje pulido con Racon. Para este pulido final, se modificaron los siguientes parámetros en la línea de comando “Variantes de Nanopolish”: el estado de ploidía se estableció en “1” (--ploidía 1), las combinaciones máximas de haplotipos se restringieron a 1 (-x 1) y el llamador de homopolímero estaba habilitado (--fix-homopolymers).

Se cargó la secuencia del mitogenoma completa ensambladas en el servidor web MITOS (<http://mitos2.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>) [16] para anotaciones funcionales. Se seleccionó el código de vertebrados y se dejó correr, el programa nos generó el archivo que contiene todas las anotaciones del mitogenoma en formato .bed (conting1.bed). Para alinear las secuencias se utilizó Geneious versión 2023.2.1 (<http://www.geneious.com>) utilizando el algoritmo de alineador Geneious. Se inspeccionó la región completamente alineada y se produjo un consenso de referencia, comprobando cuidadosamente las posiciones homólogas para garantizar la integridad de los marcos de lectura de los genes codificadores de proteínas y la estructura secundaria esperada de los ARNt y ARNr. El Diagrama de flujo del ensamblaje del

genoma mitocondrial lo podemos encontrar en la **Figura 2**, mientras que los programas usados en Linux y los comandos en línea se detallan en la **Tabla Suplementaria TS1** y **Anexo 3**, respectivamente.

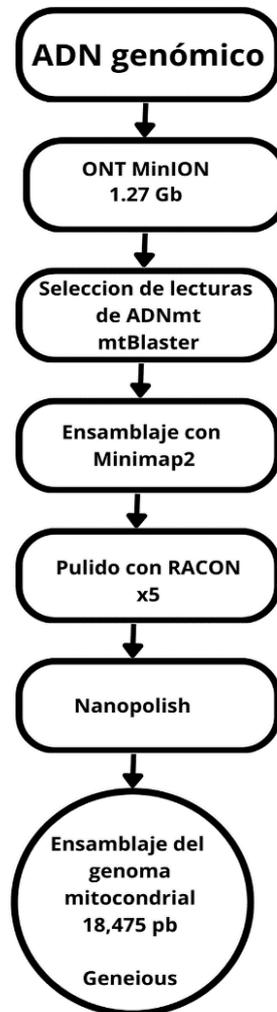


Figura 2. Diagrama de flujo del ensamblaje del genoma mitocondrial de *Atelopus exiguus* utilizando datos de secuencia de Nanopore.

Realizado por: Lizbeth Rojas, 2024.

Análisis filogenético

Para realizar los análisis filogenéticos, descargamos los mitogenomas completos de 1 321 secuencias de anfibios que se han caracterizado hasta la fecha (01 de diciembre del 2023) de la base de datos de secuencias de referencia del NCBI [17]. Se extrajeron las secuencias duplicadas y las secuencias mayores a 21 000 pb, quedando un total de 382 secuencias a ser utilizadas en el programa Geneious versión 2023.2.1. A esta base de datos se añadió el mitogenoma secuenciado de *Atelopus exiguus*, así como tres especies de peces (*Premnas biaculeatus_KJ833754*, *Epinephelus bontoides_KT619054*, *Amphiprion clarkii_KJ174498*) las cuales sirvieron como grupo externo para enraizar el árbol filogenético, quedando un total de 386 especies en la matriz de homología.

Para la creación de un alineamiento múltiple, se utilizó el servidor en línea de MAFFT versión 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/index.html>) en el cual se cargaron las 386 secuencias exportadas previamente y se utilizó el algoritmo automático para seleccionar el método de alineación de acuerdo a la configuración predefinida [18]. Por otra parte, se utilizó Mesquite versión 3.81 que nos ayudó a dar formato al archivo para poder reconstruir el árbol filogenético (<https://www.mesquiteproject.org/>) realizando una preparación de datos, ubicamos al grupo externo en las primeras posiciones y se lo exportó en formato "NEXUS for MrBayes". Posterior a esto, en Geneious cargamos el archivo .nex y se reconstruyó el árbol filogenético usando el software FastTree. Este algoritmo nos ayuda a reconstruir arboles filogenéticos a partir de alineamientos de secuencias de manera rápida. FastTree primero construye un árbol inicial basándose en distintos árboles iniciales, luego realiza reordenamientos hasta buscar el árbol final. Aunque la precisión de FastTree puede no ser tan alta como la de algunos otros programas convencionales, sin embargo, limita el número de búsquedas de árboles lo que le convierte en un método rápido y eficiente. SE generaron 100 réplicas de Bootstrap para estimar los valores de soporte de los nodos. El árbol filogenético se exportó en formato Newick con valores de soporte para abrirlo y editarlo en FigTree versión 1.4.4. Este programa nos permitió comparar y evaluar la robustez de las agrupaciones filogenéticas representadas a través de los valores de bootstrap para cada clado filogenético.

RESULTADOS

Rendimiento del ADN genómico y las secuencias de ONT

De la extracción de ADN genómico de alto peso molecular con el kit Monarch HMW for Tissue se obtuvo una concentración de [63.3 ng/ μ L]. Por otra parte, la evaluación de la integridad del ADN en gel de agarosa mostró poca fragmentación y un tamaño aproximado de 15,000 pb (**Figura S1**) En cuanto a la secuenciación de ADN genómico extraído se obtuvo los siguientes resultados, tal como se describe en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Rendimiento de secuenciación de MinION utilizando ADN genómico de Alto Peso Molecular total extraído del tejido muscular del *Atelopus exiguus*.

Versión de la celda de Flujo	FLO-MIN111, R10
Rendimiento de la ejecución de secuenciación	573.68 Mb 1.27 Gb
Numero de lecturas generadas	331.6 K
Calidad de las lecturas N50	11.33 Kb

Realizado por: Lizbeth Rojas, 2024.

Genoma mitocondrial completo de *Atelopus exiguus*

Se reconstruyó una molécula de ADN mitocondrial a partir del ensamblaje de las lecturas de la librería de ADN-HMW. De acuerdo a la **Figura 3**, observamos el genoma mitocondrial completo tiene un tamaño de 18,475 pb. Además, en la **Tabla 2** observamos que esta molécula de ADNmt consta de 1 región de control, 13 CDS, 61 genes mitocondriales, 2 rRNA y 22 tRNA.

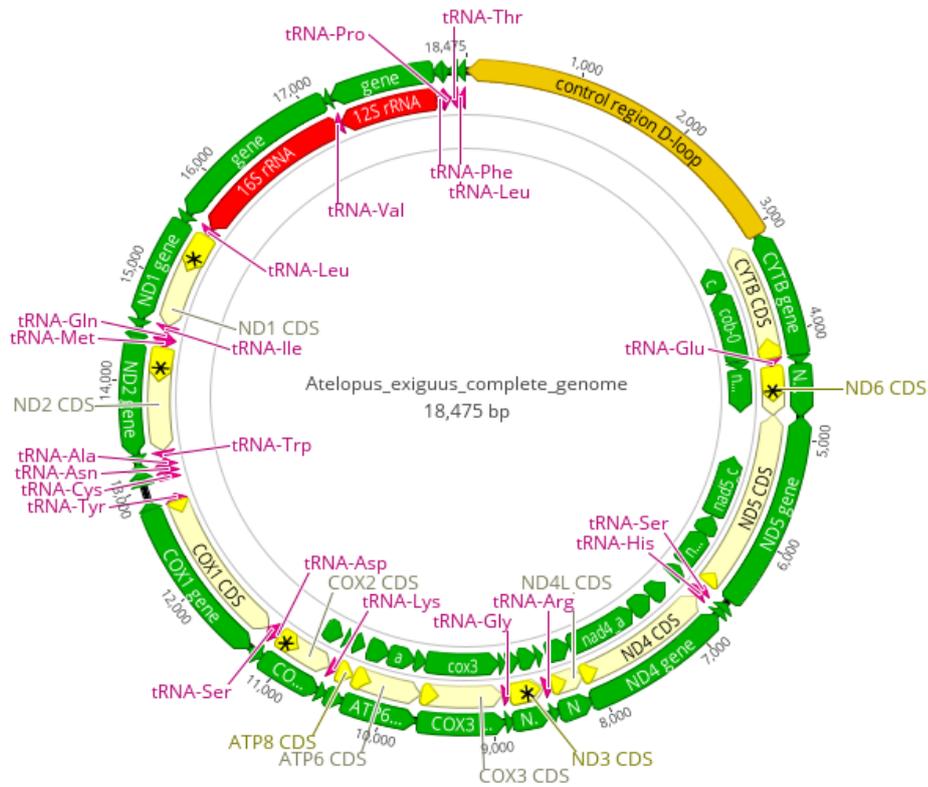


Figura 3. Mapa circular del genoma mitocondrial de *Atelopus exiguus* obtenido de la secuenciación ONT.
Realizado por: Lizbeth Rojas, 2024.

Tabla 2. Tabla de atributos de los componentes del genoma mitocondrial de *Atelopus exiguus*

Name	Type	Minimum	Maximum	Length	Direction
ATP6 CDS	CDS	9668	10350	683	reverse
ATP8 CDS	CDS	10341	10504	164	reverse
COX1 CDS	CDS	11294	12831	1538	reverse
COX2 CDS	CDS	10577	11152	576	reverse
COX3 CDS	CDS	8888	9668	781	reverse
CYTB CDS	CDS	3082	4234	1153	reverse
ND1 CDS	CDS	14571	15526	956	reverse
ND2 CDS	CDS	13331	14361	1031	reverse
ND3 CDS	CDS	8478	8818	341	reverse
ND4 CDS	CDS	6752	8109	1358	reverse
ND4L CDS	CDS	8103	8405	303	reverse
ND5 CDS	CDS	4785	6578	1794	reverse
ND6 CDS	CDS	4307	4800	494	forward
control region D-loop	D-loop	13	3080	3068	reverse
ATP6 gene	gene	9668	10350	683	reverse
atp6_a	gene	10067	10312	246	reverse
atp6_b	gene	9792	10070	279	reverse
atp6_c	gene	9674	9793	120	reverse
atp8	gene	10347	10472	126	reverse
ATP8 gene	gene	10341	10504	164	reverse
cob-0	gene	3422	4225	804	reverse

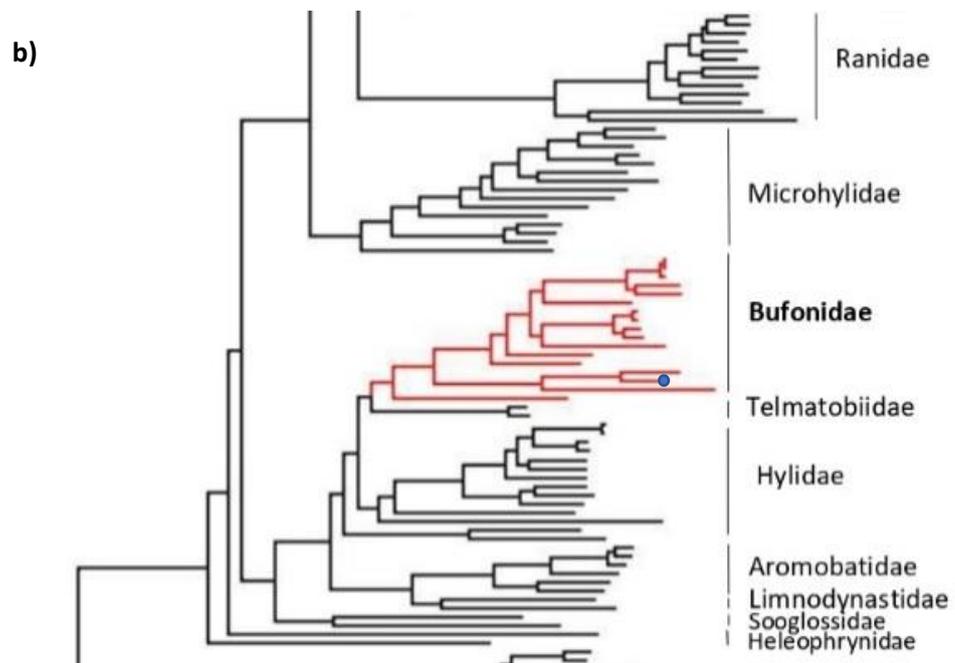
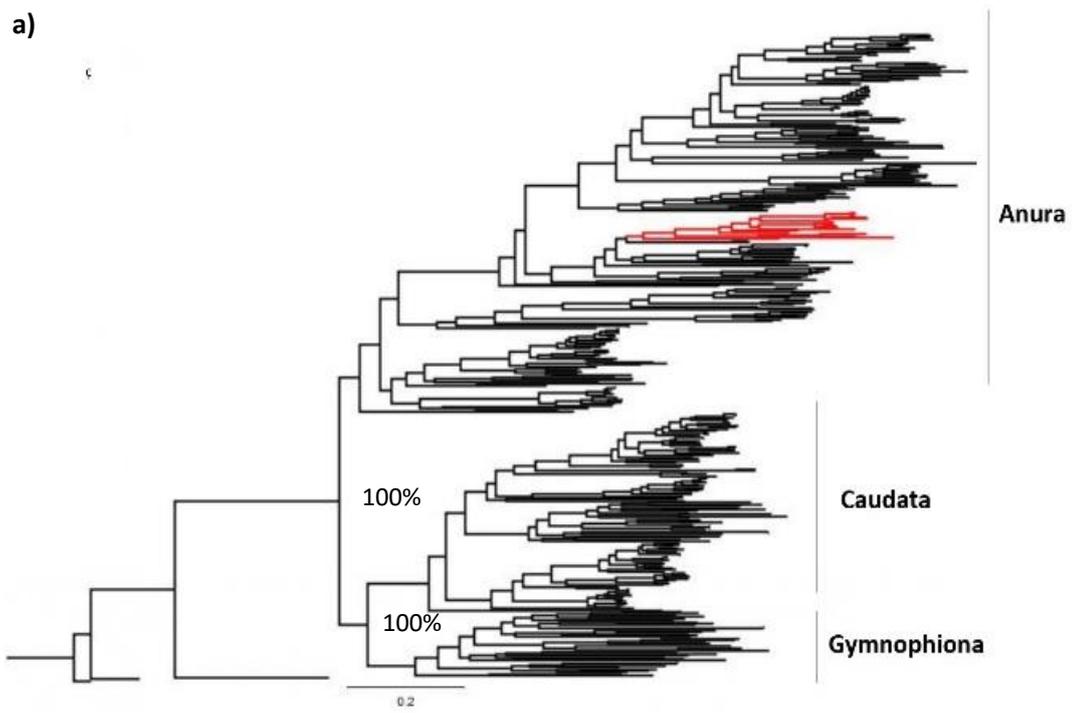
cob-1	gene	3148	3420	273	reverse
COX1 gene	gene	11294	12831	1538	reverse
COX2 gene	gene	10577	11152	576	reverse
cox2_b	gene	10603	10812	210	reverse
cox3	gene	8889	9668	780	reverse
COX3 gene	gene	8888	9668	781	reverse
CYTB gene	gene	3082	4234	1153	reverse
gene	gene	18399	18470	72	reverse
gene	gene	18329	18398	70	reverse
gene	gene	18261	18329	69	forward
gene	gene	18194	18261	68	reverse
gene	gene	17260	18193	934	reverse
gene	gene	17191	17259	69	reverse
gene	gene	15601	17190	1590	reverse
gene	gene	15527	15600	74	reverse
gene	gene	14500	14570	71	reverse
gene	gene	14430	14500	71	forward
gene	gene	14362	14430	69	reverse
gene	gene	13261	13329	69	reverse
gene	gene	13192	13260	69	forward
gene	gene	13119	13190	72	forward
gene	gene	13054	13117	64	forward
gene	gene	12833	12902	70	forward
gene	gene	11224	11293	70	forward
gene	gene	11153	11221	69	reverse
gene	gene	10506	10576	71	reverse
gene	gene	8819	8887	69	reverse
gene	gene	8406	8477	72	reverse
gene	gene	6685	6751	67	reverse
gene	gene	6618	6684	67	reverse
gene	gene	4239	4306	68	forward
nad3_a	gene	8657	8806	150	reverse
nad3_b	gene	8479	8676	198	reverse
nad4_a	gene	7327	8109	783	reverse
nad4_b	gene	7079	7324	246	reverse
nad4_c	gene	6855	7076	222	reverse
nad4l	gene	8106	8363	258	reverse
nad5_a	gene	6151	6567	417	reverse
nad5_b	gene	5975	6169	195	reverse
nad5_c	gene	5271	5960	690	reverse
nad6	gene	4307	4771	465	forward
ND1 gene	gene	14571	15526	956	reverse
ND2 gene	gene	13331	14361	1031	reverse
ND3 gene	gene	8478	8818	341	reverse
ND4 gene	gene	6752	8109	1358	reverse
ND4L gene	gene	8103	8405	303	reverse
ND5 gene	gene	4785	6578	1794	reverse
ND6 gene	gene	4307	4800	494	forward
trnE(gaa)	gene	4239	4306	68	forward

trnG(gga)	gene	8819	8887	69	reverse
trnH(cac)	gene	6685	6751	67	reverse
trnK(aaa)	gene	10506	10576	71	reverse
trnR(cga)	gene	8410	8477	68	reverse
trnS1(agc)	gene	6618	6684	67	reverse
12S rRNA	rRNA	17260	18193	934	reverse
16S rRNA	rRNA	15601	17190	1590	reverse
tRNA-Ala	tRNA	13192	13260	69	forward
tRNA-Arg	tRNA	8406	8477	72	reverse
tRNA-Asn	tRNA	13119	13190	72	forward
tRNA-Asp	tRNA	11153	11221	69	reverse
tRNA-Cys	tRNA	13054	13117	64	forward
tRNA-Gln	tRNA	14430	14500	71	forward
tRNA-Glu	tRNA	4239	4306	68	forward
tRNA-Gly	tRNA	8819	8887	69	reverse
tRNA-His	tRNA	6685	6751	67	reverse
tRNA-Ile	tRNA	14500	14570	71	reverse
tRNA-Leu	tRNA	18399	18470	72	reverse
tRNA-Leu	tRNA	15527	15600	74	reverse
tRNA-Lys	tRNA	10506	10576	71	reverse
tRNA-Met	tRNA	14362	14430	69	reverse
tRNA-Phe	tRNA	18194	18261	68	reverse
tRNA-Pro	tRNA	18261	18329	69	forward
tRNA-Ser	tRNA	11224	11293	70	forward
tRNA-Ser	tRNA	6618	6684	67	reverse
tRNA-Thr	tRNA	18329	18398	70	reverse
tRNA-Trp	tRNA	13261	13329	69	reverse
tRNA-Tyr	tRNA	12833	12902	70	forward
tRNA-Val	tRNA	17191	17259	69	reverse

Realizado por: Lizbeth Rojas, 2024.

Reconstrucción filogenética

Según la **Figura 3** nos indica la filogenia construida, en la sección **a)** encontramos la distribución de los tres órdenes que tienen los anfibios, en el cual encontramos al grupo más abundante el orden Anura con 167 especies, seguido del orden Caudata con 117 especies y finalmente el orden Gymnophiona con 39 especies. Por otra parte, en el literal **b)** podemos encontrar a ciertas familias de los anuros, entre las cuales está la familia de interés que es Bufonidae la cual está enmarcada de color rojo. En el apartado **c)** se puede observar las diferentes especies que conforman la familia de los Bufonidae en el que de color azul ya encontramos a nuestra especie de estudio (*A. exiguus*). Además, se puede observar que la especie más antigua de los Bufonidae es el *Melanophryniscus*, así como también denotamos que los *atelopus* son familia de *Anaxyrus*.



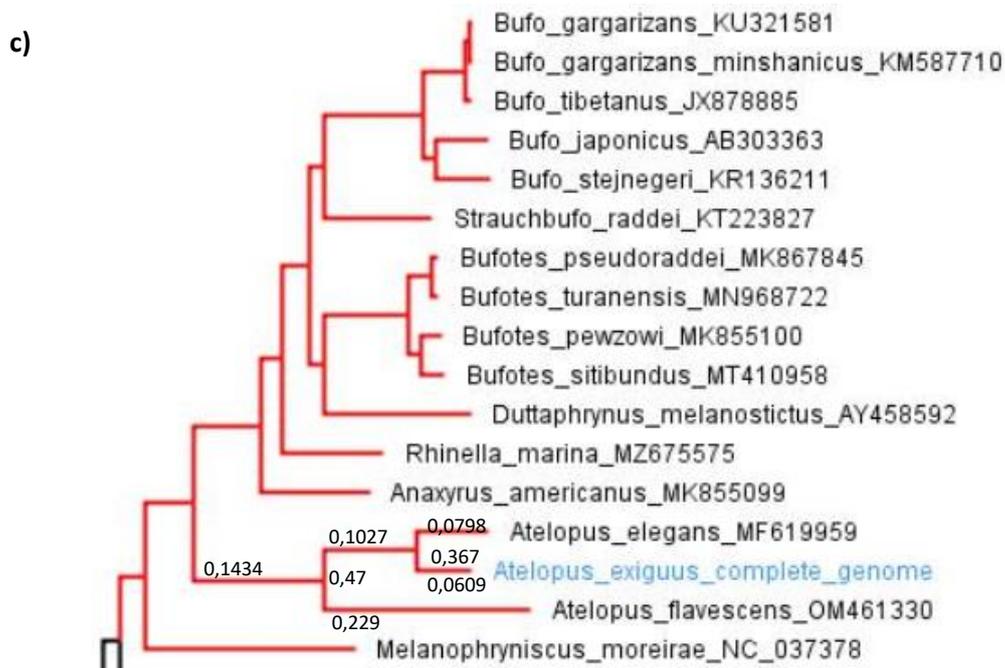


Figura 4. Filogenia de la especie *Atelopus exiguus* basada en los genomas mitocondriales completos de anfibios obtenidos del NCBI. **a)** Clasificación del orden de los anfibios (Anura Caudata y Gymnophiona) con un porcentaje de soporte entre estos del 100%. **b)** Algunas familias de los anuros, en donde la familia de Bufonidae está resaltada de rojo **c)** La secuencia generada en este estudio se marca en azul. La anotación se realizó utilizando el programa FigTree v1.4.4.

Realizado por: Lizbeth Rojas, 2024.

Distancias genéticas

Las distancias genéticas entre las 10 especies más cercanas filogenéticamente se describen en la **Tabla 3**, donde *Atelopus elegans* (MF619959) tiene un 91.16% de similitud genética respecto a *A. exiguus*.

Tabla 3. Porcentajes de similitud de 10 especies cercanas filogenéticamente dentro del clado de Bufonidae, con respecto a *Atelopus exiguus*.

Especies	% similitud
<i>Atelopus elegans</i> _MF619959	91,16
<i>Atelopus flavescens</i> _OM461330.1	78,67
<i>Rhinella marina</i> _MZ675575	77,03
<i>Anaxyrus americanus</i> _MK855099	76,8
<i>Bufo pewzowi</i> _MK855100	75,97
<i>Strauchbufo raddei</i> _KT223827	75,95
<i>Bufo sitibundus</i> _MT410958	75,89
<i>Bufo turanensis</i> _MN968722	75,83
<i>Bufo pseudoraddei</i> _MK867845	75,71
<i>Bufo japonicus</i> _AB303363	75,46

Realizado por: Lizbeth Rojas, 2024.

Distancias filogenéticas

Las distancias filogenéticas representan las distancias que tienen las ramas del árbol respecto a la raíz, mismas que se detallan en la Tabla 4. La especie más alejada filogenéticamente la salamandra *Plethodon petraeus*_AY728222 con una distancia de 164, mientras que la especie más cercana dentro del clado de Bufonidae es *Atelopus elegans*_MF619959, con una distancia en las ramas de 14.

Tabla 4. Secuencias más cercanas respecto a las distancias filogenéticas patristicas

Especie	Distancias filogenéticas
<i>Plethodon petraeus</i> _AY728222	164
<i>Bufo pewzowi</i> _MK855100	58
<i>Bufo pseudoraddei</i> _MK867845	58
<i>Bufo sitibundus</i> _MT410958	58
<i>Bufo turanensis</i> _MN968722	58
<i>Strauchbufo raddei</i> _KT223827	57
<i>Rhinella marina</i> _MZ675575	52
<i>Anaxyrus americanus</i> _MK855099	50
<i>Atelopus flavescens</i> _OM461330.1	39
<i>Atelopus elegans</i> _MF619959	14

Realizado por: Lizbeth Rojas, 2024.

DISCUSIÓN

Secuenciación de mitogenomas

Los genomas mitocondriales seguirán siendo marcadores fundamentales para abordar cuestiones biológicas, pero la obtención de nuevos mitogenomas son una labor intensiva en mano de obra y recursos metodológicos que van desde la preparación de librerías, análisis de datos y revisiones sistemáticas de grupos poco estudiados para implementar completamente un enfoque metodológico para la secuenciación de orgánulos y la identificación de especies basada en ADN [19].

Una extracción de ADN de alta calidad garantiza la integridad de las moléculas de ADN, siendo ésta crucial para la secuenciación y el ensamblaje del mitogenoma [20]. Por ende, de acuerdo al diseño y metodología, investigaciones recientes respaldan la eficiencia del kit Monarch HMW en la obtención de ADN de alto peso molecular en diversas muestras de tejido [21]. Estudios comparativos han demostrado una mejora significativa en la integridad del ADN extraído en comparación con otros kits populares disponibles en el mercado [22].

Variabilidad genética y distancias filogenéticas

En nuestra investigación sobre las relaciones filogenéticas y los alineamientos de secuencias mitocondriales de diferentes especies de anfibios se han realizado utilizando plataformas que ofrecen una amplia gama de funciones que facilitan la manipulación y comparación de secuencias mitocondriales [23]. Dentro de estas herramientas utilizadas esta Geneious la cual es una plataforma altamente recomendada para el análisis de alineamientos de mitogenomas debido a su excepcional versatilidad y eficiencia. Una de las funciones que nos ofrece Geneious es el software FastTree, conocido por ser un algoritmo rápido y eficiente para la construcción de árboles filogenéticos. La velocidad es especialmente importante cuando se analizan grandes conjuntos de datos, como los que podrían surgir al trabajar con mitogenomas de distintas especies [24].

Muchas especies de anuros aún no han sido nombradas ni descritas formalmente, siendo ésta la primera vez en que se genera el ensamblaje del mitogenoma de *A. exiguus*. Sin embargo, las características del mitogenoma fue muy similar a *Atelopus*

elegans y otros bufonidos, en términos de tamaño y organización del mitogenoma (**Figura 3, Tabla 2**); y composición de nucleótidos de ARNr, ARNt, región de control, pues mostraron patrones similares con otras especies de anfibios reportadas anteriormente [25]. Varios estudios recientes han señalado el riesgo de recuperar relaciones filogenéticas engañosas entre taxones distantes, cuando solo se analizan conjuntos de datos de secuencias cortas [26], pues en comparación con el uso de genomas mitocondriales completos, hay un incremento en el número de caracteres filogenéticamente informativos usados para resolver filogenias más completas [28], un aspecto que es sostenido por nuestros resultados filogenéticos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la **Tabla 4**, se observa que la especie que más alejada (*Plethodon petraeus*) de nuestra especie de interés *A. exiguus* es muy notoria con respecto a la especie más cercana la cual es de la misma familia (*Atelopus elegans*_MF619959). Esto se debe a que la proximidad en el árbol filogenético indica una mayor similitud genética y evolutiva entre esas especies. Las características de los genomas mitocondriales y la disposición genética proporcionan conocimientos novedosos sobre las relaciones filogenéticas entre varios linajes importantes de Anuros [27].

Aunque los valores de soporte de nuestros árboles filogenéticos son altos, muchas secuencias completas de mitogenomas dentro del género Bufonidae todavía son deficientes [26]. Por lo tanto, se requieren completar la base de datos mitogenómicos para comprender mejor la relación filogenética entre Anuros. Así, la secuencia del mitogenoma de *A. exiguus* puede ampliar el conocimiento filogenético del género Bufonidae, al utilizar un conjunto de datos moleculares de 383 especies de anfibios, nuestro análisis da como resultado una filogenia respaldada con los principales linajes de anfibios.

Finalmente, este trabajo aporta con un protocolo estandarizado para la generación de datos genómicos mitocondriales en sapo *Atelopus*, lo que establece un antecedente importante en el campo de la genómica de la conservación en este grupo, considerado como amenazado de extinción a nivel global.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ortega-Andrade, H. M., Rodes Blanco, M., Cisneros-Heredia, D. F., Guerra Arévalo, N., López de Vargas-Machuca, K. G., Sánchez-Nivicela, J. C., ... & Yáñez Muñoz, M. H. (2021). Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation. *PLoS one*, 16(5), e0251027.
- [2] Ron, S. R., Merino-Viteri, A. Ortiz, D. A. 2022. Anfibios del Ecuador. Version 2022.0. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. < <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb>>, fecha de acceso 3 de enero, 2022.
- [3] Coloma, Luis A., Stefan Lötters, and Antonio W. Salas. "Taxonomy of the *Atelopus ignescens* complex (Anura: Bufonidae): designation of a neotype of *Atelopus ignescens* and recognition of *Atelopus exiguus*." *Herpetologica* (2000): 303-324.
- [4] IUCN, S. (2021). Amphibian Specialist Group (2020). *Tylototriton yangi*. <https://www.iucn-amphibians.org/working-groups/thematic/genome-resources/>
- [5] Prada, Carlos F., et al. "Complete mitochondrial genome of *Phoneutria depilata* (Araneae, Ctenidae): New insights into the phylogeny and evolution of spiders." *Gene* 850 (2023): 146925.
- [6] Wan Chen, Weiya Qian, Keer Miao, Ruen Qian, Sijia Yuan, Wei Liu, Jianhua Dai, Chaochao Hu, Qing Chang, Comparative Mitogenomics of True Frogs (Ranidae, Anura), and Its Implications for the Phylogeny and Evolutionary History of *Rana*, *Animals*, 10.3390/ani12101250, 12, 10, (1250), (2022).
- [7] Xuanqi Liu, Guang Xu, Chengshui Chen, Yuanlin Song, Wei Wang, Xiangdong Wang, Evaluation of pulmonary single-cell identity specificity in scRNA-seq analysis, *Clinical and Translational Medicine*, 10.1002/ctm2.1132, 12, 12, (2022).
- [8] Marin, C., Marco-Jiménez, F., Martínez-Priego, L., De Marco-Romero, G., Soriano-Chirona, V., Lorenzo-Rebenaque, L., & D'Auria, G. (2022). Rapid Oxford Nanopore Technologies MinION Sequencing Workflow for *Campylobacter jejuni* Identification in Broilers on Site—A Proof-of-Concept Study. *Animals*, 12(16), 2065.
- [9] Jiménez, M., Goodchild, SC, Stockwell, CA y Lema, SC (2017). Caracterización y análisis filogenético de genomas mitocondriales completos de dos peces ciprinodontoides del desierto, *Empetrichthys latos* y *Crenichthys baileyi*. *Gen*, 626, 163-172
- [10] Mendoza, P. X. R., Martínez, J. M. J., Rodríguez, J. G., Sáenz, E. S., & Riverón, A. Z. (2023). Caracterización del genoma mitocondrial y filogenia del complejo *Stenopelmatus talpa* del centro de México (Orthoptera: Stenopelmatidae: Stenopelmatini). *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 94(1), 12.
- [11] Pie, M. R., Ströher, P. R., Belmonte-Lopes, R., Bornschein, M. R., Ribeiro, L. F., Faircloth, B. C., & McCormack, J. E. (2017). Phylogenetic relationships of diurnal, phytotelm-breeding *Melanophryniscus* (Anura: Bufonidae) based on mitogenomic data. *Gene*, 628, 194-199.
- [12] New England Biolabs. (2020, 27 octubre). *Protocol for High Molecular Weight DNA (HMW DNA) Extraction from Tissue (NEB #T3060) | NEB*. <https://international.neb.com/protocols/2020/10/27/protocol-for-high-molecular-weight-dna-hmw-dna-extraction-from-tissue>

- [13] Oxford Nanopore Technologies. Ligation sequencing gDNA (SQK-LSK112) Before start checklist Ligation sequencing gDNA (SQK-LSK112). 2022; 1–5.
- [14] Franco-Sierra, N. D., & Díaz-Nieto, J. F. (2020). Rapid mitochondrial genome sequencing based on Oxford Nanopore Sequencing and a proxy for vertebrate species identification. *Ecology and Evolution*, 10(7), 3544-3560.
- [15] Vaser, R., Sović, I., Nagarajan, N., & Šikić, M. (2017). Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome Research*, 27(5), 737–746. <https://doi.org/10.1101/gr.214270.116>
- [16] Loman, N. J., Quick, J., & Simpson, J. T. (2015). A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nature Methods*, 12(8), 733–735. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3444>
- [17] Tillich, M., Lehwerk, P., Pellizzer, T., Ulbricht-Jones, E. S., Fischer, A., Bock, R., & Greiner, S. (2017). GeSeq – versatile and accurate annotation of organelle genomes. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W6–W11. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx391>
- [18] Donath, A.; Jühling, F.; Al-Arab, M.; Bernhart, SH; Reinhardt, F.; Stadler, PF; Middendorf, M.; Bernt, M. Anotación mejorada de los límites de los genes codificadores de proteínas en genomas mitocondriales de metazoos. *Ácidos nucleicos res.* 2019 , 47 , 10543–10552.
- [19] O'Leary, NA; Wright, MW; Brister, JR; Ciuffo, S.; Haddad, D.; McVeigh, R.; Rajput, B.; Robbertse, B.; Smith-White, B.; Ako-Adjei, D. Base de datos de secuencias de referencia (RefSeq) en NCBI: estado actual, expansión taxonómica y anotación funcional. *Ácidos nucleicos res.* 2016 , 44 , D733–D745.
- [20] Leal-León, I., Moreno-Velázquez, M., Sánchez-Pale, J. R., & Quezada-Salinas, A. (2023). Identification of *Puccinia sherardiana* in *Sphaeralcea angustifolia* in Mexico State. *Revista mexicana de fitopatología*, 41(2), 257-267.
- [21] Mulder, K. P. (2020). Identifying local adaptation in large amphibian genomes.
- [22] Cui, L., Huang, A., He, Z., Ao, L., Ge, F., Fan, X., ... & Zhang, M. (2022). Complete Mitogenomes of Polypedates Tree Frogs Unveil Gene Rearrangement and Concerted Evolution within Rhacophoridae. *Animals*, 12(18), 2449.
- [23] Trigodet, F., Lolans, K., Fogarty, E., Shaiber, A., Morrison, HG, Barreiro, L., ... & Eren, AM (2022). Estrategias de extracción de ADN de alto peso molecular para la secuenciación de lectura larga de metagenomas complejos. *Recursos de ecología molecular* , 22 (5), 1786-1802.
- [24] Volarić, M., Veseljak, D., Mravinac, B., Meštrović, N., & Despot-Slade, E. (2021). Isolation of high molecular weight DNA from the model beetle *Tribolium* for nanopore sequencing. *Genes*, 12(8), 1114.
- [25] Asaeda, Y., Shiraga, K., Suzuki, M., Sambongi, Y., Ogino, H., & Igawa, T. (2023). Rapid and collective determination of the complete “hot-spring frog” mitochondrial genome containing long repeat regions using Nanopore sequencing. *Plos one*, 18(10), e0280090..
- [26] Luo, H., Cui, L., Han, F., He, Z., Fan, X., Zeng, B., ... & Zhang, M. (2022). Complete Mitogenome of *Oreolalax omeimontis* Reveals Phylogenetic Status and Novel Gene Arrangement of Archaeobatrachia. *Genes*, 13(11), 2089.
- [27] Feng, Y. J., Blackburn, D. C., Liang, D., Hillis, D. M., Wake, D. B., Cannatella, D. C., & Zhang, P. (2017). Phylogenomics reveals rapid, simultaneous diversification of three major clades of Gondwanan frogs at the Cretaceous–Paleogene boundary. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 114(29), E5864-E5870.

ANEXOS

ANEXO A

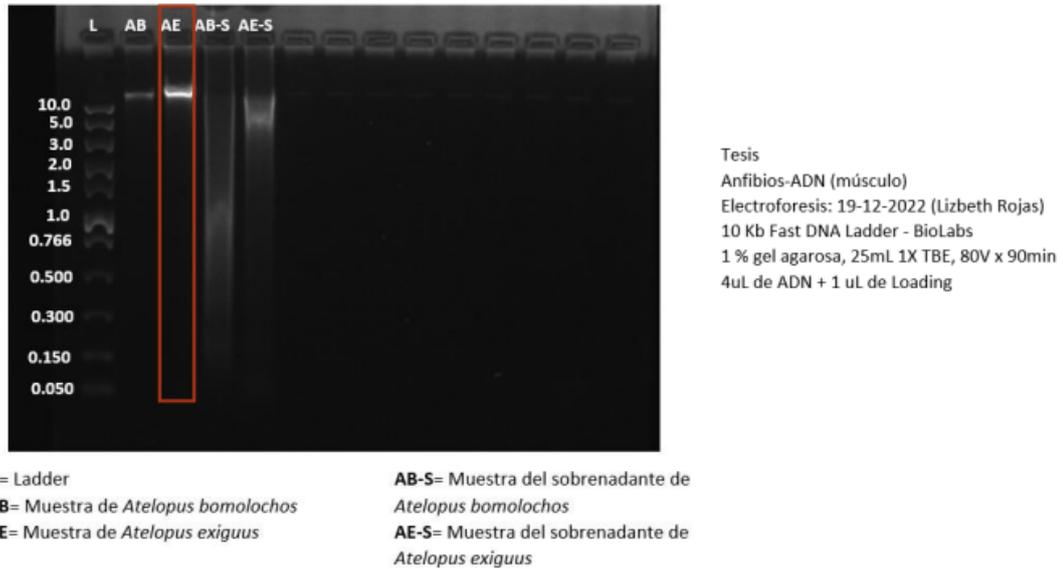


Figura S1. Fotografía gel de agarosa 1% donde se evidencia el contraste en los resultados de la extracción de ADN genómico de alto peso molecular con el Kit Monarch HMW for Tissue.

Realizado por: Lizbeth Rojas, 2024.

Anexo B.

Protocolo de extracción de ADN genómico de alto peso molecular

Para la extracción de ADN se utilizó el Kit Monarch HMW DNA Extraction for Tissue para lo cual se adecuó el protocolo establecido por el kit comercial [12] de acuerdo con la disponibilidad de equipos en el laboratorio LBMB Ikiam. Inicialmente se evaluó el método de extracción con muestra de tejido muscular y a partir de los resultados obtenidos se definió el método de extracción utilizando tejido fresco dactilar. Para la extracción de ADN de alto peso molecular se siguieron las especificaciones del fabricante, las cuales se detallan a continuación.

Lisis del tejido

Se utilizaron 18 mg (pesado en la mini balanza digital) de tejido muscular de la especie, cortando el tejido en pedazos pequeños, con la ayuda de pinzas y bisturí estériles, en un tubo Monarch Pestle previamente etiquetado. El tejido se sometió a una cuidadosa maceración con un pistilo provisto por el kit hasta obtener una capa muy fina. Luego, haciendo un lavado al pistilo que estaba dentro del tubo, se adicionó 600 μ L de una solución master mix de lisis (contenía 600 μ L de HMW gDNA Tissue Lysis Buffer y 20 μ L de Proteinasa K). Seguido, con la ayuda de una micropipeta de 1000 se homogenizó la muestra por 5 veces. A continuación, se colocó el tubo en un termobloque a 56°C durante 15 minutos, cada minuto se realizaba un vórtex a 2000 rpm. Transcurrido los 15 minutos se dejó el tubo en el termobloque durante 30 minutos, al finalizar este tiempo se realizó un vortex a 2000 rpm y un spin para colectar la muestra al fondo del tubo. Después, se añadió 10 μ L de RNAsa y se homogenizó 10 veces por inversión, posterior se colocó en el termobloque a 56°C durante 10 minutos, finalizado el tiempo se realizó un vórtex a 2000 rpm. Seguidamente, se transfirió la muestra a un bloque frío durante 3 minutos. Luego se añadió 300 μ L de Protein Separation Solution y se mezcló por inversión durante 1 minuto. Posterior a esto, se colocó el tubo en la centrifuga a 16000 g durante 15 minutos, seguido se transfirió 800 μ L del sobrenadante a un tubo Monarch de 2mL previamente etiquetado, retirando 600 μ L primero y 200 μ L después, sin tocar el pellet.

Unión y elución

Con la ayuda de una pinza estéril se colocó 2 perlas al tubo que contenía el sobrenadante.

Seguido, se añadió 550 μ L de isopropanol y se mezcló por inversión 25 veces. Luego, con una pipeta de 1000, sin tocar las perlas, se retiró todo el líquido. A continuación, se añadió 500 μ L de gDNA Wash Buffer y se mezcló por inversión 3 veces y nuevamente se procedió a retirar todo el líquido sin tocar las perlas, este proceso se repitió una vez más. En un tubo Monarch de colección se colocó un retenedor de perlas y se procedió a transferir las perlas que estaban contenidas en el tubo de 2mL. Seguido, se realizó un spin y se colocó el retenedor con las perlas en un tubo Monarch de 2mL y se descartó el tubo de colección. Seguido, se transfirió las perlas a un tubo Monarch de 2mL y el retenedor a un tubo Eppendorf de 1.5 mL no provisto por el kit. A continuación, al tubo

que contenía las perlas se añadió 60 µL de Elution buffer II y se incubó en el termobloque a 56°C durante 5 minutos, a los 2.30 minutos se sacó del termobloque y se inclinó horizontalmente para asegurarse que las perlas no estén pegadas al tubo. Después, se transfirió las perlas con el líquido al tubo que contenía el retenedor de perlas, se centrifugó a 12000 g durante 1 minuto. Se descartó el retenedor con las perlas. Finalmente, el tubo que contenía el ADN se dejó overnight a temperatura ambiente y posterior se almacenó a 4°C para sus posteriores usos.

Cuantificación

Si las muestras fueron congeladas por largo tiempo, antes de cuantificar dejar que las muestras alcancen temperatura ambiente y homogenice. Si el ADN fue extraído sin agitación, realizar la cuantificación 3 veces para verificar que el valor sea similar.

Consideraciones para Nanopore Sequencing

Una secuenciación Nanopore exitosa requiere un procesamiento estándar de biología molecular que incluye DNA repair, end-repair, adapter ligation y clean ups.

Para el protocolo estándar basado en ligación de ONT se recomienda un tamaño de fragmentos de ADN entre 50-250KB para resultados óptimos, lo que se obtiene con agitaciones de 2000rpm. Usar menos agitación incrementa el tamaño de los fragmentos, sin embargo, mayor tamaño puede producir resultados inferiores.

Anexo C.

Protocolo de preparación de preparación de librerías

Para la secuenciación de una muestra de ADN se utilizó el kit Genomic DNA by Ligation (SQK- LSK110), siguiendo las especificaciones del fabricante, mismas que se detallan a continuación:

Reparación y preparación de ADN genómico

Inicialmente, se descongeló el CS (DCS), se homogenizó por pipeteo y se colocó en hielo. Además, se preparó 500 μL de etanol al 70% con agua libre de nucleasas. Posteriormente, se dio un vórtex y spin al ADN genómico (ADNg) y de acuerdo a la cantidad y calidad obtenida previamente se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL 25.5 μL de ADNg y se aforó a 47 μL con 21.5 μL de Nuclease free water, se homogenizó por pipeteo 3 veces. A continuación, en un tubo de PCR de 0,2 mL se mezclaron los siguientes componentes: 1 μL de DSC, 47 μL de ADNg, 3.5 μL de NEBNext FFPE DNA Repair Buffer, 2 μL de NEBNext FFPE DNA Repair Mix, 3.5 μL de Ultra II End-prep reaction buffer y 3 μL de Ultra II End-prep enzyme mix, seguido se homogenizó por inversión 3 veces y se dio un spin. Después, se llevó a un termociclador a 20°C por 5 min y a 65°C durante 5min. Mientras tanto, se re-suspenden las AMPure XP beads mediante vórtex. Luego, en un tubo Eppendorf de 1.5mL etiquetado se transfirió 60 μL de la mezcla y se añadió 72 μL de AMPure XP beads. Posterior a esto, se homogenizó por inversión durante 7min y se dio un spin. Seguidamente, se colocó el tubo en la gradilla magnética durante 5min. Sin sacar el tubo de la gradilla se retiró el sobrenadante sin topar el pellet. Luego, se colocó 200 μL de etanol al 70% en agua libre de nucleasas y se retiró el sobrenadante sin tocar el pellet, este proceso se realizó una vez más. Se dejó secar el tubo en la gradilla sin que se agriete. Posterior, se retiró el tubo de la gradilla y se añadió 61 μL de Nuclease free water y se homogenizó por pipeteo. Se dejó reposar a RT durante 2min. Luego, se colocó el tubo en la gradilla magnética durante 5min, se transfirió los 61 μL de sobrenadante a un tubo Eppendorf de 1.5mL y se etiquetó.

Ligadura y limpieza del adaptador

Para la ligadura y limpieza de adaptadores se tomaron los siguientes reactivos provistos por el kit: Adapter Mix F (AMX-F), Ligation Buffer (LNB), Elution Buffer (EB), Short Fragment Buffer (SFB) y adicional se requirió de Quick T4 Ligase no provisto por el kit. Estos reactivos se descongelaron, homogeneizó por spin (LNB se homogenizó por spin y pipeteo) y se colocó en un bloque frío. A continuación, en un tubo Eppendorf se mezclaron los siguientes reactivos: 60 μL de ADN obtenido en el paso anterior, 25 μL de LNB, 10 μL de T4 Ligase y 5 μL de AMX-F; se homogenizó con un spin de 3seg. Seguido, se dejó reposar la mezcla a RT durante 10min. Se re-suspendió las perlas por vórtex. Luego, se añadió 40 μL de AMPure XP beads a la mezcla anterior y se mezcló por

inversión durante 5 minutos. Seguido, se colocó el tubo en la gradilla magnética durante 5min y se procedió a retirar el sobrenadante. A continuación, se añadió 250µL de SFB al tubo que contenía las perlas, se dejó en la gradilla magnética durante 5min y se retiró el sobrenadante, este proceso se repitió una vez más. Se dio un spin y se dejó secar el tubo en la gradilla sin que se agriete. Posterior, se retiró el tubo y se añadió 15µL de EB, se homogeneizó por inversión 3 veces y se colocó el tubo en un termobloque a 37°C durante 10min. Se dio un spin al tubo y colocó en la gradilla magnética hasta que la elución se vuelva incolora, se retiró el sobrenadante y se lo conservó los 15µL en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

Cuantificación Qubit

Para la cuantificación por Qubit se utilizaron los siguientes reactivos: Se etiquetó 3 tubos para Qubit, un tubo para la muestra y dos para los estándares. Luego, al tubo de la muestra se añadió 199 µL del stock y 1µL de la muestra de librería de ADN previamente obtenida. Seguido, se colocó 200µL de estándar 1 en un tubo y 200µL de estándar 2 en el otro tubo, se homogeneizó por vórtex y spin los tubos. Seguidamente, se encendió el equipo Qubit y se seleccionó la opción ADN de doble cadena (dsDNA), luego la opción High sensitivity y después la opción "Read standards". El equipo pide cargar el primer estándar, se colocó el tubo del estándar 1 en la cavidad de la parte superior, se cerró la cubierta y se presiona en leer estándar. Seguido se retira el tubo del estándar 1 y se coloca el tubo de estándar 2 y se presiona nuevamente leer estándar. Seguido, se colocó el tubo de la muestra y se presionó leer muestra. Finalmente, al terminar la lectura de la muestra el valor final aparece en la pantalla.

Cebado y carga de la celda de flujo

Para la carga de la librería se utilizaron los siguientes reactivos: Sequencing Buffer II (SBII), Loading Beads II (LBII), Flush Tether (FLT) y un tubo de Flush Buffer (FB), se homogeneizó por spin y descongeló a temperatura ambiente. Luego, se colocó 30µl de FTL al tubo FB. Seguido, se abre la tapa del MinION Mk1B y se deslizó la celda de flujo debajo del clip. Luego se deslizó la cubierta del puerto de cebado en el sentido horario para abrir el puerto de cebado. Con cuidado de no introducir aire en la celda, se configuró una micropipeta de 1000 a 200 y se insertó la punta en el puerto de cebado y se succionó hasta ver un pequeño volumen de buffer entrando en la punta de la pipeta. Seguido, se inyectó 800 µL de la mezcla de cebado en la celda de flujo a través del

puerto de cebado, evitando la introducción de burbujas de aire. A continuación, en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se preparó la librería con los siguientes reactivos: 37.5µL de SBII, 25µL de LBII (mezclar antes de usar) y 12µL de librería de ADN. Después, se levantó con cuidado la cubierta del puerto de muestra SpotON. En el puerto de cebado de la celda de flujo se cargó 200µL de la mezcla de cebado. Seguidamente se inyectó 75µL de la librería a la celda de flujo a través del puerto de muestra SpotON gota a gota sin ocasionar excesos. Finalmente, se cerró el puerto de muestra SpotON, se cerró el puerto de cebado y se volvió a colocar la tapa del MinION Mk1B, para así proceder a secuenciar.

Anexo D. Pipeline de la paquetería usada en Linux.

- **Nanoplot**

Tomando el archivo Fastq producido por MinKNOW, con NanoPlot se generó una cantidad de diferentes gráficos que nos permiten observar la calidad de las secuencias

```
Nanoplot -t 4 --fastq a_exiguus.fastq --maxlength 40000 --plots kde  
(a_exiguus.fastq -> secuencia obtenida en MinKNOW).
```

- **Porechop**

```
Porechop -i a_exiguus.fastq -o seq_porech.fastq -t 4 --discard_middle
```

- **Nanofilt**

```
NanoFilt -q8 seq_porech.fastq > SeqNanofilt.fastq (seq_porech.fastq -> archivo  
obtenido del Porechop)
```

- **MtBlaster**

```
Python3 mtblaster.py SeqNanofilt.fastq bufo_ref.fasta (mtblaster.py -> script del  
mtblaster en Python, SeqNanofilt.fastq -> archivo obtenido del Nanofilt,  
bufo_ref.fasta -> archivo con la secuencia de referencia)
```

- **Nanofilt**

```
NanoFilt -q8 reads_w_hits.fastq > SeqNanofilt.fastq (reads_w_hits.fastq ->  
archivo obtenido del mtblaster)
```

- **Flye**

```
Flye --nano-raw reads_w_hits.fastq --out -dir out_flye -t 4 -i 10 -m 1000 -g 3000
```

- **Minimap2-ensamblaje 1**

```
minimap2 assembly.fasta reads_w_hits.fastq > alignment_1.paf (assembly.fasta -  
> archivo obtenido del ensamblaje con Flye)
```

- **Racon-ensamblaje 1**

```
racon -t 4 reads_w_hits.fastq alignment_1.paf assembly.fasta > r_alignment1.fasta
```

- **Minimap2-ensamblaje 2**

```
minimap2 r_alignment1.fasta reads_w_hits.fastq > alignment_2.paf
```

- **Racon-ensamblaje 2**

```
racon -t 4 reads_w_hits.fastq alignment_2.paf assembly.fasta > r_alignment2.fasta
```

- **Minimap2-ensamblaje 3**

```
minimap2 r_alignment2.fasta reads_w_hits.fastq > alignment_3.paf
```

- **Racon-ensamblaje 3**

```
racon -t 4 reads_w_hits.fastq alignment_3.paf assembly.fasta > r_alignment3.fasta
```

- **Minimap2-ensamblaje 4**

```
minimap2 r_alignment3.fasta reads_w_hits.fastq > alignment_4.paf
```

- **Racon-ensamblaje 4**

```
racon -t 4 reads_w_hits.fastq alignment_4.paf assembly.fasta > r_alignment4.fasta
```

- **Minimap2-ensamblaje 5**

```
minimap2 r_alignment4.fasta reads_w_hits.fastq > alignment_5.paf
```

- **Racon-ensamblaje 5**

```
racon -t 4 reads_w_hits.fastq alignment_5.paf assembly.fasta > r_alignment5.fasta
```

- **Nanopolish**

```
nanopolish index -d fast5_pass/ reads_w_hits.fastq
```

- **Minimap2**
- Minimap2 -ax map-ont -t 4 r_alignments.fasta reads_w_hits.fastq | samtools sort --FILE reads.sorted.bam -PREFIX reads.tmp samtools index reads.sorted.bam
-
- **Nanopolish**
- nanopolish variants --consensus --ploidy1 --max-haplotypes1 --fix-homopolymers -o polished.vcf -r reads_w_hits.fastq -b reads.sorted.bam -g r_aligment5.fasta
- Nanopolish vcf2fasta --skip-checks -g r_aligment5.fasta polished.vcf > polished_mitogenome.fasta

Anexo E

Tabla S1. Programas utilizados en la creación de la paquetería en Linux.

Paquetería	Instalador
Anaconda	https://docs.anaconda.com/free/anaconda/install/linux/
Python	https://pip.pypa.io/en/stable/installation/
NanoPlot	https://github.com/wdecoster/NanoPlot#installation
Porechop	https://github.com/rrwick/Porechop#installation
NanoFilt	https://github.com/wdecoster/nanofilt#installation-and-upgrading
Flye	https://github.com/fenderglass/Flye/blob/flye/docs/INSTALL.md#flye-installation
Minimap2	https://github.com/lh3/minimap2#installation
Racon	https://github.com/isovic/racon#installation
Nanopolish	https://github.com/jts/nanopolish#installation-instructions

Realizado por: Lizbeth Rojas, 2024.