



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**SECUENCIAMIENTO DE ADN DE ALTO PESO MOLECULAR MEDIANTE
NANOPORE: GENÉTICA DESCRIPTIVA MITOCONDRIAL DE UNA ESPECIE
DE BUFONIDAE (*Atelopus bomolochos*)**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: RICARDO XAVIER CAIZA ORTIZ
TUTOR. PH.D. HUGO MAURICIO ORTEGA ANDRADE

Napo – Ecuador

2024

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Yo, Ricardo Xavier Caiza Ortiz, con documento de identidad N° 1850103670, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniero 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 la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 26 de febrero de 2024



Ricardo Xavier Caiza Ortiz

C.I: 1850103670

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Yo, Ricardo Xavier Caiza Ortiz, con documento de identidad N°1850103670, en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Secuenciamiento de ADN de alto peso molecular mediante nanopore: Genética descriptiva mitocondrial de una especie de Bufonidae (*Atelopus bomolochos*)” 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, 26 de febrero de 2024



Ricardo Xavier Caiza Ortiz

C.I: 1850103670

Certificado de dirección de trabajo de titulación

Certifico que el trabajo de titulación: "Secuenciamiento de ADN de alto peso molecular mediante nanopore: Genética descriptiva mitocondrial de una especie de Bufonidae (Atelopus bomolochos)" en la modalidad de: artículo, fue realizado por Ricardo Xavier Caiza Ortiz, 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 Ikiam, para su entrega y defensa.

Tena, 26 de febrero de 2024



Hugo Mauricio Ortega Andrade

C.I: 1717270811

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por “ORG.one Nanopore” y el proyecto “Whole-genome sequencing with Nanopore technology of *Atelopus spp.* (Anura: Bufonidae) Critically Endangered toads in Ecuador”. De manera especial quiero agradecer a todas las personas que me han apoyado en todo este proceso: Mauricio Ortega, Katherine Apunte y Walter Quilumbaquin los cuales bajo su tutela me han sabido guiar durante todo el desarrollo de mi proyecto de tesis.

A mis amigos, los cuales con su apoyo en momentos de flaqueza me han sabido dar ánimos y la fortaleza para continuar durante mi trayecto en la Universidad.

A mi familia, el pilar fundamental que hasta el día de hoy permanecen constantes y pendientes de mi bienestar.

A todo el personal académico: docentes, técnicos que ha sabido impartir de la mejor manera sus conocimientos hacia mi persona.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener ningún posible conflicto de interés.

Índice general

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad	ii
Autorización de publicación en el repositorio institucional	iii
Certificado de dirección de trabajo de titulación	iv
Agradecimientos	v
Índice general	vi
Índice de figuras	vii
Índice de tablas	viii
Resumen	ix
Abstract	x
Introducción	1
Metodología	4
Sitio de muestreo	4
Permiso de colecta y procesamiento de la muestra	6
Extracción de ADNg de alto peso molecular	6
Secuenciación con plataforma nanopore	6
Procesamiento bioinformático	7
Reconstrucción filogenética	9
Resultados	10
Organización del genoma	11
Reconstrucción filogenética	13
Discusión	14
Avances en el procesamiento Bioinformático	14
Organización del genoma	15
Reconstrucción filogenética	16
Conclusiones	19
Referencias	
Material suplementario	

Índice de figuras

Figura 1. Locación de colecta de la muestra de tejido donada por el biocentro Amaru.....	5
Figura 2. Pipeline desarrollado por autoría propia con referencia en el trabajo de Sierra et al. (2020)	8
Figura 3. Genoma mitocondrial de <i>A. bomolochos</i>	100
Figura 4. Reconstrucción filogenética de 134 mitogenomas.	13
Figura suplementaria 1. Electroforesis Extracción de ADNg de anfibios 10 Kb Fast DNA Ladder (<i>Biolabs</i>). Carril 1: ADNg extraído de la falange <i>A. bomolochos</i>	
Figura suplementaria 2. Reconstrucción filogenética de 134 mitogenomas	

Índice de tablas

Tabla 1. Características organizativas del genoma mitocondrial completo de <i>A. bomolochos</i>	11
--	----

Resumen

La histórica Evaluación Global de Anfibios (GAA2) del 2022 revela que el 40,7% de anfibios registrados están globalmente Frente a esta situación, la obtención del genoma mitocondrial (mitogenoma) se considera esencial para la conservación y estudios filogenéticos efectivos. Es crucial secuenciar y anotar éstos mitogenomas, debido a que aún existen vacíos en la información genética. La secuenciación de próxima generación (NGS) ofrece una alternativa para obtener y analizar grandes cantidades de datos genéticos en un corto periodo de tiempo, con mayor precisión y actualmente a un costo relativamente bajo. Este enfoque, combinado con innovadoras herramientas bioinformáticas, nos permitió caracterizar el mitogenoma completo de *Atelopus bomolochos*, sapo de la familia Bufonidae, considerado en Peligro Crítico de extinción. Se logró *codificar* un total de 18399 pb, siendo el primer mitogenoma secuenciado y anotado para esta especie. Además, se presenta la filogenia con datos de 133 mitogenomas de anfibios disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Estos avances constituyen un gran aporte a la genómica de la conservación, herramientas y técnicas genéticas para preservación y gestión de especies en peligro de extinción, garantizando su supervivencia a largo plazo de las poblaciones silvestres y la biodiversidad en general.

Palabras clave: Mitogenoma, conservación, genómica de la conservación, secuenciación de próxima generación (NGS), bioinformática, filogenia

Abstract

The historic Global Amphibian Assessment (GAA2) of 2022 reveals that 40.7% of registered amphibians are globally threatened. Faced with this situation, obtaining the mitochondrial genome (mitogenome) is considered essential for effective conservation and phylogenetic studies. It is crucial to sequence and annotate these mitogenomes as there are still gaps in genetic information. Next-generation sequencing (NGS) provides an alternative to obtain and analyze large amounts of genetic data in a short period, with greater precision and currently at a relatively low cost. This approach, combined with innovative bioinformatic tools, allowed us to characterize the complete mitogenome of *Atelopus bomolochos*, a toad from the Bufonidae family, considered critically endangered. A total of 18,399 base pairs were encoded, marking the first sequenced and annotated mitogenome for this species. Additionally, the phylogeny is presented with data from 133 amphibian mitogenomes available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database.

These advancements constitute a significant contribution to conservation genomics, employing genetic tools and techniques for the preservation and management of endangered species, ensuring their long-term survival in the wild and overall biodiversity.

Keywords: Mitogenome, conservation, conservation genomics, next-generation sequencing (NGS), bioinformatics, phylogeny.

Secuenciamiento de ADN de alto peso molecular mediante nanopore: Genética descriptiva mitocondrial de una especie de Bufonidae (*Atelopus bomolochos*)

^{1*}Ricardo Xavier Caiza Ortiz

¹Grupo de investigación en Biogeografía y Ecología Espacial, Universidad Regional
Amazónica Ikiam, Parroquia Muyuna, Kilómetro 7 vía a Alto Tena, Ecuador

Introducción

Los anfibios son uno de los grupos de vertebrados que exhiben una extraordinaria riqueza convergente a la variabilidad de sus ecosistemas [1,2]. Pese a esto, se los considera como uno de los taxones más amenazados, produciéndose extinciones de especies y disminuciones de poblaciones en todo el mundo, incluso en hábitats protegidos y aparentemente prístinos [3–5]. Su ectotermia los vuelve particularmente vulnerables a cambios ambientales (humedad y temperatura principalmente), así como, a enfermedades infecciosas [6–8]. La pérdida de hábitat, el cambio climático y las enfermedades infecciosas, son importantes factores que amenazan a las poblaciones de anfibios [3,9,10].

La histórica Evaluación Global de Anfibios (GAA2) llevada a cabo en el 2022 revela que de las 8011 especies de anfibios registradas en la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN, por sus siglas en inglés) a nivel global [11,12], el 40,7% (2.873) están globalmente amenazados (es decir, las categorías de la Lista Roja de la UICN En Peligro Crítico, En Peligro y Vulnerable), en comparación con el 37,9% (2.681) en 1980 y el 39,4% (2.788) en 2004 [11]. Según Luedtke et al. (2023) éste incremento se debe a la pérdida y degradación de hábitat debido a factores antrópicos, efectos del cambio climático y las enfermedades como los brotes de quitridiomycosis [11,13].

Ecuador es uno de los países con mayor número de anfibios [1]. En el estudio publicado por Ortega et al. (2021), registra 635 especies de anfibios en el Ecuador de las cuales el 57% (363 especies) están categorizadas como Amenazadas, el 12% (78 especies) como Casi Amenazadas, el 4% (26 especies) como Datos Insuficientes y el 27% (168 especies) como Preocupación Menor [10]. Según el portal Bioweb de la Pontificia

Universidad Católica del Ecuador (PUCE) en el Ecuador habitan 678 especies de anfibios en el Ecuador, siendo 325 endémicas, Ecuador cuenta con la abundancia más alta por unidad de área (~2590 especies por cada millón de km²) lo cual lo convierte en la región del planeta con la concentración más variada de ranas y sapos [2,14,15]. Esta inmensa diversidad numérica va de la mano de la diversidad genómica, proteómica, morfológica, ecológica, etológica, de formas de vida, de usos biomédicos potenciales, de conocimientos ancestrales, las cuales por sí solas o en conjunto justifican por demás que ésta riqueza anfibia sea considerada un patrimonio natural de la humanidad y por ende su investigación y conservación sean prioritarias [2,14].

Atelopus bomolochos es una especie de sapo perteneciente a la familia Bufonidae. Esta especie se distribuye en las estribaciones surorientales de la cordillera de los Andes de Ecuador (registrado únicamente en las provincias de Cañar, Azuay y Loja) [16,17]. Habita en bosques nubosos de alta montaña entre los 2800 y 3200 metros sobre el nivel del mar [17–19]. Debido a su distribución restringida, especialistas de la UICN afirman que se encuentra en peligro crítico de extinción, debido a la pérdida y fragmentación de su hábitat, la contaminación y las enfermedades infecciosas [10]. *A. bomolochos* es una rana mediana de color amarillo, amarillo con café o verde amarillento, por lo general con puntos negros en el dorso y vientre de amarillo a naranja. Presenta verrugas en los flancos, patas cortas y el primer dedo de la mano no tiene membrana; llegando a medir en su longitud rostro cloacal (LRC) un promedio de 39.6 mm en machos y 47.5 mm para las hembras. Su alimentación se basa en pequeños insectos y arácnidos [17]. Desafortunadamente, la riqueza de los anfibios Andinos es casi desconocida, esto se debe a que muchos de ellos habitan en áreas de difícil acceso, son relativamente pequeños y de hábitos nocturnos, e incluso, algunas especies pueden llegar a extinguirse sin antes haberse registrado o haber conocido su existencia [5,14]. Aunque la principal ruta para preservar la biodiversidad engloba la protección de especies y la restauración de hábitats y ecosistemas, la genómica proporciona una gama de herramientas novedosas en rápida expansión para caracterizar la biodiversidad y ayudar a dichos esfuerzos de conservación [20–22].

Los avances en las tecnologías de secuenciamiento se basan en una combinación de secuenciación de lectura larga (del inglés, long reads) de una sola molécula, ya sea secuenciación en tiempo real de molécula única (SMRT) de PacBio o secuenciación de Oxford Nanopore Technologies (ONT)] [20,23]. El método de secuenciamiento de nanoporos ONT, constituye un gran avance en la biología molecular debido a sus

múltiples ventajas: portabilidad (dispositivo de bolsillo MinION), costo reducido y relativa simplicidad para su configuración y operación en comparación con las plataformas de secuenciación tradicionales [24]. Esto ha dado lugar a la era de la genómica, en la que los enfoques holísticos de todo el genoma están reemplazando rápidamente los enfoques tradicionales de conservación [25,26]. El mantener la diversidad genética es un componente importante de la viabilidad de la población, ya que ayuda a mitigar los efectos negativos asociados con la endogamia y arma a las poblaciones con el potencial de adaptarse a futuros cambios ambientales [20,21,27].

El genoma mitocondrial (mitogenoma) de una especie es un recurso esencial para su conservación efectiva y estudios filogenéticos, siendo de tamaño compacto en animales [28]. Normalmente están organizados en una sola molécula circular de aproximadamente 16 Kb (11 - 50 Kb) de longitud. El secuenciamiento y anotación del mismo permite acuñar esfuerzos en lo que se denomina como genómica de la conservación la cual, gracias a los genomas de referencia (ensamblajes de genoma altamente contiguos, precisos y anotados), mejoran en gran medida los estudios genómicos, tanto experimental como analíticamente [20,26,28,29].

Los mitogenomas de Anura son moléculas circulares bicatenarias cerradas, con una longitud aproximada de 16-24 kb [30]. Estas se consideran marcadores moleculares valiosos para el análisis de la estructura poblacional, relaciones filogenéticas y el tiempo de divergencia [31,32]. Su pequeño tamaño, la ausencia de recombinación, una tasa de evolución rápida, conservación genética y organización genómica, así como la herencia materna, los convierten en herramientas significativas en estudios relacionados [31,33].

Este es el primer estudio a nivel local enfocado en la genómica de conservación. La presente investigación tuvo por objetivo aportar con nuevos conocimientos sobre el mitogenoma completo de *A. bomolochos* permitiendo explorar su variabilidad genética y posición filogenética.

Metodología

Sitio de muestreo

El sitio de muestreo se ubica en la localidad de Cerro Negro (3.15675° S, 78.84538° W, a 3064 m.s.n.m.) (**Figura 1**). Cerro Negro se localiza en la zona andina (páramo), su temperatura media es de 15 °C, la lluvia cae sobre todos los meses del año, y la precipitación media anual es 1045 mm. La muestra fue donada por el Bioparque Amaru de la ciudad de Cuenca, siguiendo el protocolo de embalaje y transporte de órganos, tejidos, células del Instituto Nacional de Donación y Trasplante de Órganos, Tejidos y Células [34].

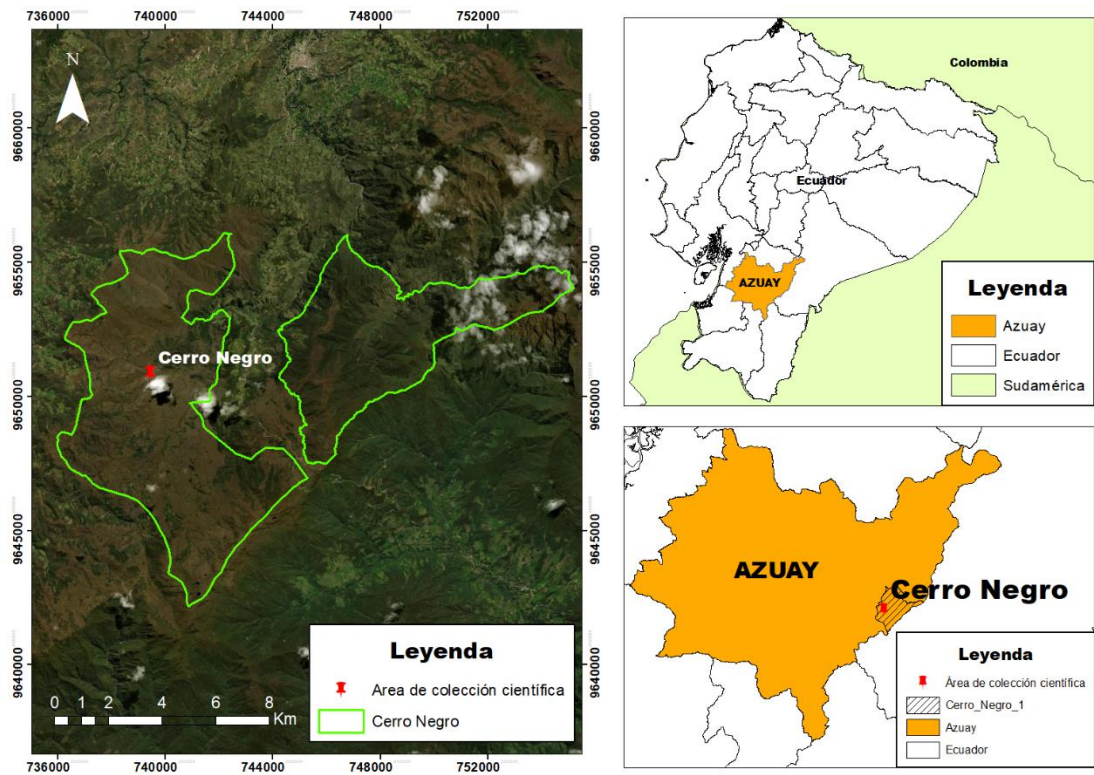


Figura 1. Locación de colecta de la muestra de tejido donada por el Biocentro Amaru, Localidad de Cerro Negro, 3.15675°S, 78.84538° W, 3064 m.s.n.m.
Realizado por: Ricardo Caiza

Permiso de colecta y procesamiento de la muestra

Este proyecto de investigación fue realizado bajo el Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos Nro. MAE-DNB-CM2018-0081, dentro del proyecto titulado: “Whole-genome sequencing with Nanopore technology of *Atelopus spp.* (Anura: Bufonidae) Critically Endangered toads in Ecuador”.

Extracción de ADNg de alto peso molecular

La extracción de ADNg se llevó a cabo a partir de los 20 mg de tejido dactilar, tomados de la falange de un espécimen macho adulto de *A. bomolochos*, siguiendo el protocolo de *Monarch HMW DNA Extraction Kit for Tissue (3060)* (**Material suplementario**). Para la cuantificación y determinación de la pureza del ADNg extraído se utilizó el equipo NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) empleando 2 µl de la muestra.

Para visualizar y estimar el tamaño del ADNg se utilizó un gel de agarosa al 1%, con el sistema de electroforesis BlueGel™ (MiniPCR, Cambridge, MA, EE. UU.) y la tinción Safe DNA gel Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) junto con un marcador de peso 10Kb, Fast DNA Ladder (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA).

Secuenciación con plataforma nanopore

La muestra fue preparada de acuerdo al protocolo: *Ligation sequencing kit (SQK-LSK110)* (ONT, Oxford, UK) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la reparación del ADNg y preparación de terminales, los 2.36 µg de ADNg obtenidos se diluyeron en un volumen final de 49 µL con agua libre de nucleasas, utilizando la mezcla de NEBNext FFPE Repair Mix (NEB, M6630) y NEBNext Ultra II End repair/dA-tailing Module (NEB, E7546) respectivamente. La muestra obtenida fue purificada con perlas magnéticas Mag-Bind® TotalPure NGS (Omega Bio-tek, Inc., Norcross, GA) y se cuantificó con el kit de fluorómetro Qubit 4 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Para la ligadura y limpieza del adaptador se trabajó con los reactivos suministrados por el kit de ADN genómico por ligación (SQK-LSK110; ONT, Oxford, Reino Unido). Se utilizó una celda de flujo R10.4.1 MinION para la secuenciación (FLO-MIN111; ONT, Oxford, Reino Unido). Antes de cargar la librería, la celda de flujo se preparó utilizando Flow Cell Priming kit (EXP-FLP002). La mezcla de carga tuvo un volumen final de 75 µL y se preparó con 37.5µL

de Sequencing Buffer II (SBII), 25µL de Loading Beads II (LBII) y 19 fmol de biblioteca de ADNg contenida en 12 µl.

La secuenciación se realizó en un secuenciador MinION mk1b (ONT, Oxford, Reino Unido), con el software MinKNOW v22.08.9 que integra el software Guppy v5.0.11 y se seleccionó la llamada de bases de super precisión (basecalling) para filtrar lecturas por calidad >8. Otros parámetros se mantuvieron en sus valores predeterminados. El tiempo de secuenciación fue de 15 horas. Una vez transcurrido el tiempo de secuenciación, se desconectó el equipo y se limpió la celda de flujo (FLO-MIN111; ONT, Oxford, Reino Unido) con el kit de limpieza (EXP-WSH004; ONT, Oxford, Reino Unido) siguiendo las instrucciones de fábrica. Finalmente, la celda de flujo se almacenó a -4 °C.

Procesamiento bioinformático

Los archivos FASTQ resultantes del software MinKNOW fueron concatenados en un solo archivo. Para evaluar su rendimiento de secuenciación, se realizaron recuentos de bases y lecturas, y se trazaron histogramas de longitud de lectura para el conjunto de datos mediante la herramienta NanoPlot [35]. Se usó la herramienta desarrollada por Sierra et al. (2020) mtBlaster una estrategia basada en BLAST (disponible en <https://github.com/nidafra92/squirrel-project/blob/master/mtblaster.py>), para seleccionar únicamente las lecturas correspondientes a ADN mitocondrial (ADNmt) [24]. Se utilizó el mitogenoma de *Bufo gargarizans* (GenBank: NC_008410.1) como secuencia de referencia [24].

Para el archivo FASTQ resultante se utilizó Porechop para descartar las secuencias que contienen adaptadores o regiones no deseadas en el medio de la lectura [36]. Para filtrar por calidad Q>8 se utilizó la herramienta NanoFilt [37], de acuerdo a los histogramas obtenidos mediante NanoPlot [35]. El borrador del ensamblaje de lecturas de ADNmt se pulió utilizando Flye/minimap2 [38,39]; para posteriormente pulir el borrador de ADNmt resultante con una corrida en el software de Racon [40]. Para el pulido final, se modificaron parámetros en la línea de comando “Variantes de Nanopolish”, como: ploidía que se estableció en “1” (--ploidía 1), combinaciones máximas de haplotipos se restringieron a 1 (-x 1) y se habilitó el llamador de homopolímero (--fix-homopolymers) [24].

La anotación mitogenoma fue realizada en MITOS Web Server (disponible en:

<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/>), con lo que se obtuvo un archivo .bed que contiene las anotaciones del mitogenoma de *A. bomolochos*. Finalmente, para corregir errores y corroborar las anotaciones se utilizó la secuencia anotada del mitogenoma de *Phyllobates terribilis* (NC_037380.1) a través del algoritmo de alineamiento por referencia en el programa Geneious Prime® v2023.2.1. El procedimiento completo para la reconstrucción del mitogenoma se esquematiza en la **Figura 2**.

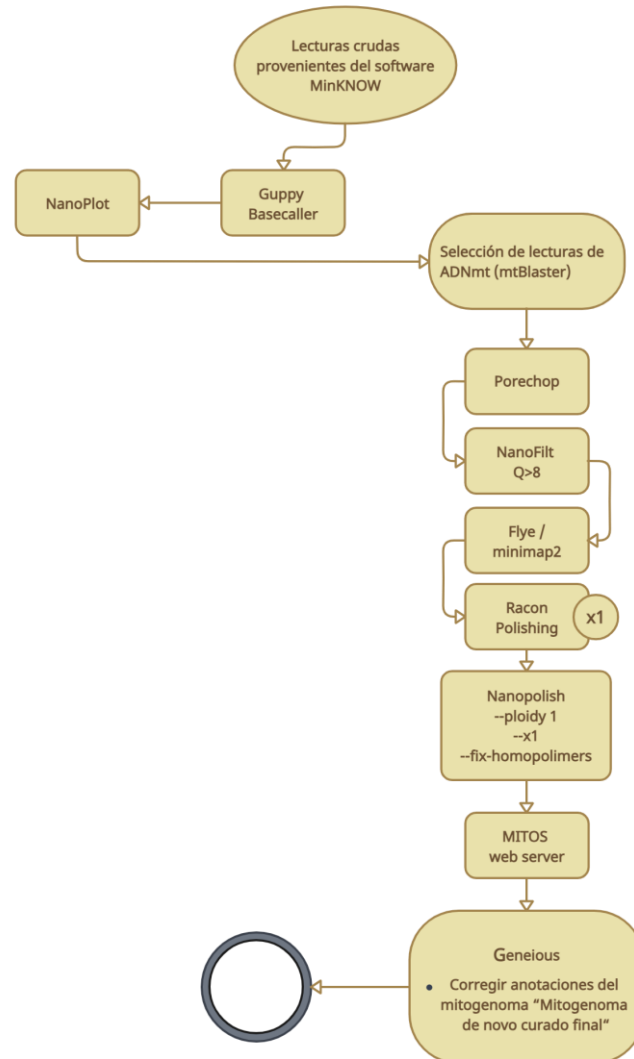


Figura 2. Pipeline desarrollado por autoría propia con referencia en el trabajo de Sierra et al. (2020).

Realizado por: Ricardo Caiza

Reconstrucción filogenética

La reconstrucción filogenética se realizó descargando los mitogenomas completos anotados, disponibles en El Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) para construir una base de datos. La búsqueda se realizó bajo los siguientes parámetros: "complete mitochondrial genome"[All Fields] AND ("Amphibia"[Organism] OR amphibia[All Fields]) AND (animals[filter] AND mitochondrion[filter]), con lo cual se obtuvo un total de 269 mitogenomas; además se añadió a la base de datos el mitogenoma de *Atelopus flavescens* (GenBank: OM461330.1) el cual se encuentra secuenciado, mas no anotado. Posteriormente se hizo una selección manual de mitogenomas, separando aquellos que se encontraban duplicados o no cumplían con el tamaño (10.000 – 25.000 pb), para ser considerados como genomas mitocondriales, obteniendo así un total de 133 mitogenomas.

La alineación se realizó utilizando la herramienta MAFFT V7.490 con los siguientes parámetros: Algoritmo de alineación: automático, matriz de puntuación: 200PAM / k=2, la penalización por apertura de gap (Gap open penalty) = 1.53 y el valor de compensación o desplazamiento (offset value) = 0.123 [41,42]. Una vez obtenida la alineación se procedió a seleccionar y eliminar zonas no homólogas y regiones con vacíos de información (GAPs), para así poder tener una matriz de homología para la reconstrucción de un árbol filogenético. El modelo de distancia genética: "Tamura-Nei", el método de construcción de árboles: "Neighbor-Joining" y se seleccionó como grupo externo a *Ambystoma mexicanum* (GenBank: AJ584639.1) (**Figura 3**).

Resultados

Se estimó en 30 Kb aproximadamente el tamaño del ADN extraído y visualizado en gel de agarosa al 1% (**Figura suplementaria 1**), lo que se consideró un tamaño adecuado para proceder con la secuenciación ONT. El procesamiento de datos secuenciados (**Figura 2**) resultó en un mitogenoma de 18,399 pb para *A. bomolochos* (**Figura 3**).

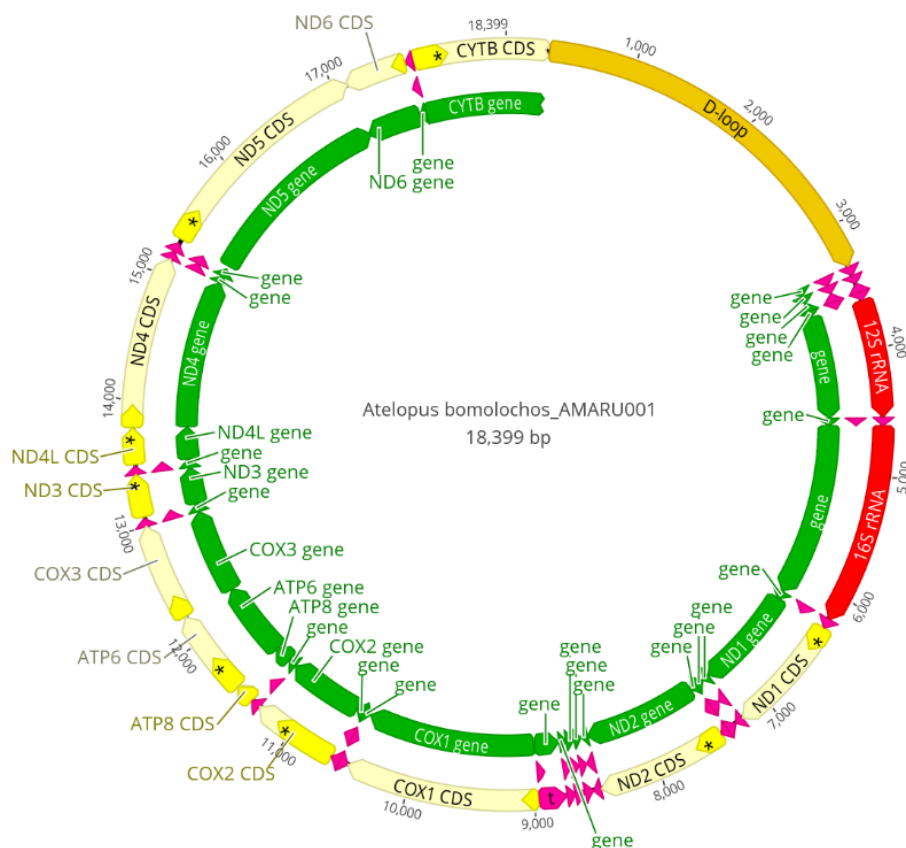


Figura 3. Genoma mitocondrial de *A. bomolochos*. El mitogenoma exhibe una configuración de 2 genes de ARN ribosomal (ARNr 12S y 16S), 22 genes de ARN de transferencia (ARNt), 13 genes codificadores de proteínas (PCG) y una región de control (D-loop).
Realizado por: Ricardo Caiza

Organización del genoma

Se encontró que la composición en general de nucleótidos del mitogenoma de *A. bomolochos* estaba sesgado hacia los contenidos de A + T (63,7%, A = 30,7% y T = 32,5%) sobre los contenidos de G + C (37,1%, G = 13,8% y C = 23,3%). Este mitogenoma es una molécula circular cerrada de 18 399 pb de tamaño. Posee una combinación de 37 genes, que incluye: 13 genes codificadores de proteínas, 23 genes de ARNt, dos genes para subunidades de ARN ribosomal (16SrRNA y 12SrRNA) y una región no codificante (región de control, D-loop y origen de la cadena ligera) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Características organizativas del genoma mitocondrial completo de *A. bomolochos* (Bufonidae)

Name	Type	Minimum	Maximum	Length	Direction
CYTB CDS	CDS	17659	>327	>1068	forward
tRNA-Glu	tRNA	17588	17656	69	reverse
trnE(ttc)	tRNA	17588	17655	68	reverse
ND6 CDS	CDS	17097	17586	490	reverse
ND5 CDS	CDS	15313	17112	1800	forward
tRNA-Ser	tRNA	15208	15274	67	forward
trnS1(gct)	tRNA	15208	15274	67	Forward
tRNA-His	tRNA	15140	15207	68	forward
trnH(gtg)	tRNA	15140	15207	68	forward
ND4 CDS	CDS	13779	15139	1361	forward
ND4L CDS	CDS	13484	13785	302	forward
tRNA-Arg	tRNA	13413	13483	71	forward
trnR(---)	tRNA	13413	13479	67	forward
ND3 CDS	CDS	13072	13412	341	forward
tRNA-Gly	tRNA	13004	13071	68	forward
trnG(tcc)	tRNA	13002	13070	69	forward
COX3 CDS	CDS	12227	13003	777	forward
ATP6 CDS	CDS	11545	12227	683	forward
ATP8 CDS	CDS	11392	11554	163	forward
tRNA-Lys	tRNA	11320	11390	71	forward
trnK(ttt)	tRNA	11320	11390	71	forward
COX2 CDS	CDS	10634	11319	686	forward
tRNA-Asp	tRNA	10564	10632	69	forward
trnD(gtc)	tRNA	10564	10632	69	forward
tRNA-Ser	tRNA	10492	10561	70	reverse
trnS2(tga)	tRNA	10492	10561	70	reverse

COX1 CDS	CDS	8959	10491	1533	forward
trnY(gta)	tRNA	8887	8957	71	reverse
tRNA-Tyr	tRNA	8737	8957	221	reverse
tRNA-Cys	tRNA	8673	8736	64	reverse
trnC(gca)	tRNA	8673	8736	64	reverse
tRNA-Asn	tRNA	8600	8671	72	reverse
trnN(gtt)	tRNA	8600	8671	72	reverse
tRNA-Ala	tRNA	8530	8599	70	reverse
trnA(tgc)	tRNA	8530	8598	69	reverse
tRNA-Trp	tRNA	8461	8529	69	forward
trnW(tca)	tRNA	8461	8529	69	forward
ND2 CDS	CDS	7431	8459	1029	forward
tRNA-Met	tRNA	7364	7430	67	forward
trnM(cat)	tRNA	7364	7430	67	forward
tRNA-Gln	tRNA	7295	7364	70	reverse
trnQ(ttg)	tRNA	7295	7364	70	reverse
tRNA-Ile	tRNA	7225	7295	71	forward
trnI(gat)	tRNA	7225	7295	71	forward
ND1 CDS	CDS	6269	7224	956	forward
tRNA-Leu	tRNA	6195	6268	74	forward
trnL2(taa)	tRNA	6195	6268	74	forward
16S rRNA	rRNA	4617	6193	1577	forward
tRNA-Val	tRNA	4549	4616	68	forward
trnV(tac)	tRNA	4549	4616	68	forward
12S rRNA	rRNA	3613	4548	936	forward
tRNA-Phe	tRNA	3545	3612	68	forward
trnF(gaa)	tRNA	3545	3612	68	forward
tRNA-Pro	tRNA	3477	3545	69	reverse
trnP(tgg)	tRNA	3477	3545	69	reverse
tRNA-Thr	tRNA	3407	3477	71	forward
trnY(gta)	tRNA	3407	3477	71	forward
trnL1(tag)	tRNA	3335	3406	72	forward
tRNA-Leu	tRNA	3335	3405	71	forward
D-loop	D-loop	330	3333	3004	forward

Realizado por: Caiza, Ricardo, 2024

Reconstrucción filogenética

La matriz alineada de homología final tuvo un total de 134 mitogenomas y 16,008 caracteres. El clado filogenético que incluye a las especies de *Atelopus* (**Figura 4a**, **Figura suplementaria 2**), corresponde a la familia Bufonidae (**Figura 4b**). *A. bomolochos* tiene un porcentaje de identidad comprendido en un rango desde 52.2 – 72.8 % (promedio = 65.75 +/- 4.8).

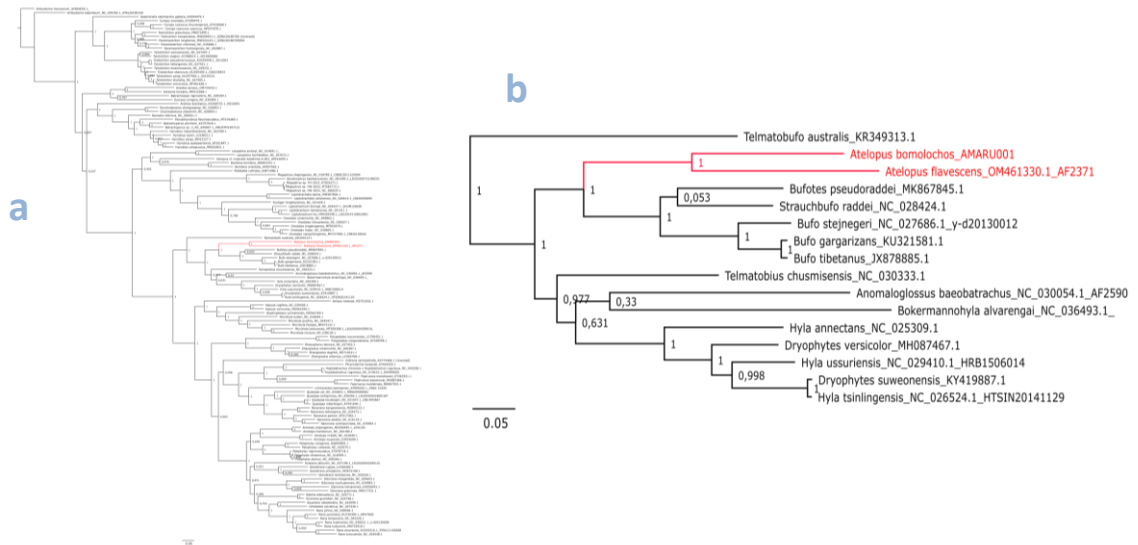


Figura 4. Filogenia mitogenómica en Amphibia, (a) Reconstrucción filogenética de 134 mitogenomas disponibles en la base de datos del NCBI y el mitogenoma de *A. bomolochos* obtenido mediante ONT. La filogenia en extenso se detalla en la Figura Suplementaria 2; b) Clado que incluye a las especies de la familia Bufonidae, donde se ubica el linaje de *Atelopus*.

Realizado por: Ricardo Caiza

Discusión

Los avances en la secuenciación del genoma permiten la generación a gran escala de datos moleculares de referencia, mismos que representen la biodiversidad global [20,21]. Éstos genomas proporcionan información única sobre la diversidad y la arquitectura genética de los organismos, lo que permite análisis sobre la diversidad poblacional, estructural y funcional, y se espera que revolucionen la genómica de la conservación [20].

La “genómica de la conservación” abarca la idea de que los datos a escala del genoma mejorarán la capacidad de los administradores de recursos para proteger las especies [21]. Aunque los enfoques genéticos se han utilizado durante mucho tiempo en la investigación de la conservación, sólo recientemente se ha vuelto factible generar datos de todo el genoma a una escala que sea útil para la conservación esto debido al avance y a la reducción de costos y avances en la tecnología de secuenciación [21,43].

En este estudio se abarca la obtención del mitogenoma completo de *A. bomolochos*, dado énfasis en que es considerado en Peligro Crítico respecto a su categoría estado de conservación [10], presentando por primera vez datos de base genómica de esta especie, para abordar preguntas evolutivas, hipótesis biogeográficas, estudios genéticos y a la vez ayudar a los tomadores de decisiones a encausar de una mejor manera al uso de recursos.

Avances en el procesamiento Bioinformático

El empleo de datos moleculares tal como es el caso de las tecnologías de NGS han tenido un impacto significativo en los esfuerzos de identificación de especies, ya que complementan la información taxonómica que previamente se obtenía únicamente a partir de la morfología [24], tal como es el caso de las tecnologías de Secuenciación de nanoporos de Oxford. Se han utilizado múltiples métodos de procesamiento de datos para ensamblar y anotar mitogenomas de novo [24,44], los cuales evalúan la mejor alternativa para procesar, pulir y ensamblar los archivos crudos de secuenciamiento, minimizando el rango de error producido por la secuenciación ONT de lectura larga.

En este trabajo se adaptó la propuesta metodológica de Sierra et al. (2020) [24] con

variaciones (**Figura 2**) que incluyen, por ejemplo, incorporar Porechop [36], para recortar adaptadores y eliminar secuencias no deseadas. Por otro lado, se sustituyó Miniasm [24] por MiniMap2 para alinear secuencias con el genoma de *Bufo gargarizans* (GenBank: ASM1485885v1) tomándolo como referencia. Además, no se utilizó GeSeq (Annotation of Organellar Genomes) debido a que éste requiere cargar de forma manual referencias ya anotadas para tomarlas como base de anotación de los genes dentro del mitogenoma [24]. En su reemplazo, se usó MITOS Web Server (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/>), el cual alberga una base de datos de mitogenomas de referencia, lo que permitió una mejor anotación precisa genes, a diferencia de GeSeq.

Finalmente, se usó Geneious Prime, para validar, corregir y completar la anotación de los genes del mitogenoma de *A. bomolochos* utilizando el mitogenoma anotado de *Phyllobates terribilis* (NC_037380.1).

Organización del genoma

En los animales, los diferentes tipos de células tienen un número variable de mitocondrias, normalmente cientos o miles, y cada mitocondria suele albergar entre 1 y 10 copias de ADNmt [45]. En los vertebrados, el ADNmt varía de 14 a más de 20 kb de tamaño, y aunque el orden de los genes puede variar, su contenido genético está altamente conservado. Por lo general, contiene 37 genes que codifican, 2 ARN ribosómicos (ARNr), 13 proteínas y 22 ARN de transferencia (ARNt) [45]. En relación a lo planteado por Formenti et al. (2021) [45] el mitogenoma de *A. bomolochos* exhibe una combinación de 37 genes, que incluye: 13 genes codificadores de proteínas, 22 genes de ARNt, dos genes para subunidades de ARN ribosomal (16SrRNA y 12SrRNA) y una región no codificante (región de control, D-loop y origen de la cadena ligera).

Para el caso de los mitogenomas del orden Anura, estos incluyen: 2 genes de ARN ribosomal (ARNr 12S y 16S), 22 genes de ARN de transferencia (ARNt), 13 genes codificadores de proteínas (PCG) y una región de control (D-loop) como lo plantea Cai et al. (2020) [30,46]. Esto se corrobora de acuerdo a los mitogenomas que forman parte del clado Bufonidae, donde se encuentra *A. bomolochos* y *A. flavescens* (GenBank: OM461330.1) que como se explicó, sus genes no se encontraban anotados. Sus linajes hermanos filogenéticos: *Bufotes pseudoraddei* (GenBank: MK867845.1), *Strauchbufo raddei* (GenBank: NC_028424.1), *Bufo stejnegeri* (NC_027686.1), *Bufo gargarizans* (GenBank: NC_008410.1) y *Bufo tibetanus* (GenBank: JX878885.1) poseen una

caracterización del mitogenoma similar en cuanto al número de genes y tamaños de regiones.

Reconstrucción filogenética

Para la construcción de la base de datos de mitogenomas se utilizó 134 secuencias de mitogenomas de anfibios obtenidos de la base de datos del NCBI, que incluye el mitogenoma anotado de *A. bomolochos* obtenido en esta investigación mediante ONT y el mitogenoma, no anotado de *A. flavescens* (GenBank: OM461330.1) [47]. El mitogenoma de *A. bomolochos*, puede ser útil como referencia para ensamblar anotar y pulir mitogenomas de otras especies de *Atelopus* y otras cercanas filogenéticamente dentro de la familia Bufonidae, como el caso de *A. flavescens* (GenBank: OM461330.1) [47], que a partir de los genes de *A. bomolochos*, se puede anotar por homología sus genes.

Conclusiones

En este estudio se presenta el primer mitogenoma ensamblado y anotado de una especie del género *Atelopus* para Ecuador. Se logró estandarizar un método de trabajo para secuenciar y documentar la estructura y organización del mitogenoma de esta especie, permitiendo a su vez, explorar su variabilidad genética y posición filogenética respecto a otros anfibios. Contribuyendo al desarrollo de un campo de investigación reciente que tiene como objetivo proporcionar una identificación de especies basada en ADNmt, aportar al conocimiento de la diversidad y la arquitectura genómica, lo que permite análisis exhaustivos de la genómica poblacional y funcional, esperando que revolucione la genómica de la conservación.

Referencias

1. Amphibian Species of the World. [cited 30 Dec 2023]. Available: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>
2. Centro Jambatu de Investigación y Conservación de Anfibios. [cited 30 Dec 2023]. Available: <http://www.anfibiosecuador.ec/index.php>
3. Beebee TJC, Griffiths RA. The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology? *Biol Conserv.* 2005;125: 271–285. doi:10.1016/J.BIOCON.2005.04.009
4. Moulatlet GM, Ambriz E, Guevara J, López KG, Rodes-Blanco M, Guerra-Arévalo N, et al. Multi-taxa ecological responses to habitat loss and fragmentation in western amazonia as revealed by rapid biodiversity surveys. *Acta Amaz.* 2021;51: 234–243. doi:10.1590/1809-4392202004532
5. Edwards AW, Harrison XA, Smith MA, Díaz MMC, Sasa M, Janzen DH, et al. Amphibian diversity across three adjacent ecosystems in Área de Conservación Guanacaste, Costa Rica. *PeerJ.* 2023;11: 1–27. doi:10.7717/peerj.16185
6. Hof C, Araújo MB, Jetz W, Rahbek C. Additive threats from pathogens, climate and land-use change for global amphibian diversity. *Nature.* 2011;480: 516–519. doi:10.1038/nature10650
7. McCain CM, Colwell RK. Assessing the threat to montane biodiversity from discordant shifts in temperature and precipitation in a changing climate. *Ecol Lett.* 2011;14: 1236–1245. doi:10.1111/J.1461-0248.2011.01695.X
8. Scheele BC, Pasmans F, Skerratt LF, Berger L, Martel A, Beukema W, et al. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. Available: <http://science.sciencemag.org/>
9. Kiesecker JM, Blaustein AR, Belden LK. Complex causes of amphibian population declines. *Nature.* 2001;410: 681–684. doi:10.1038/35070552
10. Ortega-Andrade HM, Rodes Blanco M, Cisneros-Heredia DF, Guerra Arévalo N, López De Vargas-Machuca KG, Sánchez-Nivicela JC, et al. Red List assessment of amphibian species of Ecuador: A multidimensional approach for their conservation. *PLoS One.* 2021;16. doi:10.1371/journal.pone.0251027
11. Luedtke JA, Chanson J, Neam K, Hobin L, Maciel AO, Catenazzi A, et al. Ongoing declines for the world's amphibians in the face of emerging threats. *Nature.* 2023;622: 308–314. doi:10.1038/s41586-023-06578-4
12. IUCN Red List of Threatened Species. [cited 30 Dec 2023]. Available: <https://www.iucnredlist.org/es>
13. Lenker MA, Savage AE, Becker CG, Rodriguez D, Zamudio KR. *Batrachochytrium dendrobatidis* infection dynamics vary seasonally in upstate New York, USA. *Dis Aquat Organ.* 2014;111: 51–60. doi:10.3354/dao02760
14. Anfibios Ecuador. [cited 30 Dec 2023]. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/>
15. Bioweb Ecuador. [cited 30 Dec 2023]. Available: <https://bioweb.bio/faunaweb.html#anfibios>
16. Coloma LA, Lötters S, Duellman WE, Miranda-Leiva A. A taxonomic revision of *Atelopus pachydermus*, and description of two new (extinct?) species of *Atelopus* from Ecuador (Anura: Bufonidae). *Zootaxa.* 2007;1557: 1–32. Available: www.mapress.com/zootaxa/
17. *Atelopus bomolochos*. [cited 5 May 2023]. Available: [https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Atelopus bomolochos](https://bioweb.bio/faunaweb/amphibiaweb/FichaEspecie/Atelopus_bomolochos)
18. Rueda J, Rodríguez J, La Marca E, Lotters S, Kahn T, Angulo A. Ranas arlequines. 2005 [cited 8 Jan 2024]. Available: https://www.researchgate.net/publication/259363493_Ranas_Arlequines_Miniguia_Atelopos
19. Marta S. Iniciativa atelopos investigación y conservación de anfibios tropicales andinos amenazados. 2007; 1–5.
20. Formenti G, Theissinger K, Fernandes C, Bista I, Bombarely A, Bleidorn C, et al. The era of reference genomes in conservation genomics. *Trends Ecol Evol.* 2022;37: 197–202. doi:10.1016/j.tree.2021.11.008
21. Supple MA, Shapiro B. Conservation of biodiversity in the genomics era. *Genome Biol.* 2018;19. doi:10.1186/s13059-018-1520-3
22. de Meyer APRR, Ortega-Andrade HM, Moulatlet GM. Assessing the conservation of eastern Ecuadorian cloud forests in climate change scenarios. *Perspect Ecol Conserv.* 2022;20: 159–167. doi:10.1016/j.pecon.2022.01.001
23. Rhie A, McCarthy SA, Fedrigo O, Damas J, Formenti G, Koren S, et al. Towards complete and error-free genome assemblies of all vertebrate species. *Nat* 2021 5927856. 2021;592: 737–746. doi:10.1038/s41586-021-03451-0

24. Franco-Sierra ND, Díaz-Nieto JF. Rapid mitochondrial genome sequencing based on Oxford Nanopore Sequencing and a proxy for vertebrate species identification. *Ecol Evol.* 2020;10: 3544–3560. doi:10.1002/ece3.6151
25. Allendorf FW. Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. *Mol Ecol.* 2017;26: 420–430. doi:10.1111/MEC.13948
26. Brandies P, Peel E, Hogg CJ, Belov K. The value of reference genomes in the conservation of threatened species. *Genes (Basel).* 2019;10. doi:10.3390/genes10110846
27. Fuentes-Pardo AP, Ruzzante DE. Whole-genome sequencing approaches for conservation biology: Advantages, limitations and practical recommendations. *Mol Ecol.* 2017;26: 5369–5406. doi:10.1111/mec.14264
28. Zardoya R. Recent advances in understanding mitochondrial genome diversity [version 1; peer review: 4 approved]. 2020 [cited 24 May 2023]. doi:10.12688/f1000research.21490.1
29. Rhie A, McCarthy SA, Fedrigo O, Damas J, Formenti G, Koren S, et al. Towards complete and error-free genome assemblies of all vertebrate species. *Nature.* 2021;592: 737–746. doi:10.1038/s41586-021-03451-0
30. Cai YT, Li Q, Zhang JY, Storey KB, Yu DN. Characterization of the mitochondrial genomes of two toads, *Anaxyrus americanus* (Anura: Bufonidae) and *Bufo peswowski* (Anura: Bufonidae), with phylogenetic and selection pressure analyses. *PeerJ.* 2020;2020. doi:10.7717/peerj.8901
31. Masta SE, Sullivan BK, Lamb T, Routman EJ. Molecular systematics, hybridization, and phylogeography of the *Bufo americanus* complex in Eastern North America. *Mol Phylogenet Evol.* 2002;24: 302–314. doi:10.1016/S1055-7903(02)00216-6
32. Igawa T, Kurabayashi A, Usuki C, Fujii T, Sumida M. Complete mitochondrial genomes of three neobatrachian anurans: a case study of divergence time estimation using different data and calibration settings. *Gene.* 2008;407: 116–129. doi:10.1016/J.GENE.2007.10.001
33. Zhang P, Chen YQ, Zhou H, Wang XL, Qu LH. The complete mitochondrial genome of a relic salamander, *Ranodon sibiricus* (Amphibia: Caudata) and implications for amphibian phylogeny. *Mol Phylogenet Evol.* 2003;28: 620–626. doi:10.1016/S1055-7903(03)00059-9
34. Almeida U, De la Calle D, Yerovi R. Protocolo De Embalaje Y Transporte De Organos, Tejidos, Celulas. Resolución 33 Regist Of Supl 482 17-abr-2015. 2017; 1–26. Available: http://www.donaciontrasplante.gob.ec/indot/wp-content/uploads/2017/06/Protocolo_embalaje_y_transporte_organos_tejidos_celulas.pdf
35. GitHub - wdecoster/NanoPlot: Plotting scripts for long read sequencing data. [cited 8 Jan 2024]. Available: <https://github.com/wdecoster/NanoPlot>
36. GitHub - rrrwick/Porechop: adapter trimmer for Oxford Nanopore reads. [cited 8 Jan 2024]. Available: <https://github.com/rrrwick/Porechop>
37. GitHub - wdecoster/nanofilt: Filtering and trimming of long read sequencing data. [cited 8 Jan 2024]. Available: <https://github.com/wdecoster/nanofilt>
38. GitHub - fenderglass/Flye: De novo assembler for single molecule sequencing reads using repeat graphs. [cited 8 Jan 2024]. Available: <https://github.com/fenderglass/Flye>
39. GitHub - lh3/minimap2: A versatile pairwise aligner for genomic and spliced nucleotide sequences. [cited 8 Jan 2024]. Available: <https://github.com/lh3/minimap2>
40. GitHub - isovic/racon: Ultrafast consensus module for raw de novo genome assembly of long uncorrected reads. <http://genome.cshlp.org/content/early/2017/01/18/gr.214270.116> Note: This was the original repository which will no longer be officially maintained. Please use the new official repository here: [cited 8 Jan 2024]. Available: <https://github.com/isovic/racon>
41. Katoh K, Misawa K, Kuma KI, Miyata T. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002;30: 3059–3066. doi:10.1093/nar/gkf436
42. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013;30: 772–780. doi:10.1093/molbev/mst010
43. Rubio S, Pacheco-Orozco RA, Gómez AM, Perdomo S, García-Robles R. Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Univ Médica.* 2020;61. doi:10.11144/javeriana.umed61-2.sngs
44. Islam MN, Sultana S, Alam MJ. Sequencing and annotation of the complete mitochondrial genome of a threatened labeonine fish, *cirrhinus reba*. *Genomics and Informatics.* 2020;18: 1–7. doi:10.5808/GI.2020.18.3.e32
45. Formenti G, Rhie A, Balacco J, Haase B, Mountcastle J, Fedrigo O, et al. Complete vertebrate mitogenomes reveal widespread repeats and gene duplications. *Genome Biol.* 2021;22: 1–22. doi:10.1186/s13059-021-02336-9
46. Cai Y-Y, Shen S-Q, Lu L-X, Storey KB, Yu D-N, Zhang J-Y. The complete mitochondrial genome of *Pyxicephalus adspersus*: high gene rearrangement and phylogenetics of one of the world's largest frogs. doi:10.7717/peerj.7532
47. UNVERIFIED: *Atelopus flavescens* voucher AF2371 mitochondrion sequence - Nucleotide - NCBI. [cited 15 Feb 2024]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OM461330.1/>

Material suplementario

Metodología en extenso estandarizada

El kit Monarch HMW DNA Extraction Kit for Tissue (3060), cuenta con dos fases que son:

Lisis de tejido

Se emplearon 20 mg de tejido muscular del espécimen (AMARU001). Se procedió a cortar el tejido en pequeños fragmentos mediante pinzas y bisturí estériles, depositándolos en un tubo Monarch de 2 mL previamente etiquetado. Se llevó a cabo una meticulosa maceración del tejido utilizando un pistilo suministrado por el kit hasta obtener una capa muy fina. A continuación, se lavó el pistilo dentro del tubo y se añadieron 600 μ L de una solución master mix de lisis (que contenía 600 μ L de HMW ADNg Tampón de lisis de tejidos y 20 μ L de Proteinasa K).

Con la ayuda de una micropipeta de 1000 μ L, se homogeneizó la muestra durante 5 repeticiones. El tubo se colocó en un termobloque a 56°C durante 15 minutos, realizando un vórtex a 2000 rpm cada minuto. Al finalizar este periodo, el tubo se mantuvo en el termobloque durante 30 minutos, seguido de un vórtex a 2000 rpm y un leve spin para recoger la muestra en el fondo del tubo. Luego, se añadieron 10 μ L de RNAsa y se homogeneizó por inversión (10 veces), tras lo cual se colocó en el termobloque a 56°C durante 10 minutos, seguido de un vórtex a 2000 rpm.

A continuación, se transfirió la muestra a un bloque frío durante 3 minutos. Posteriormente, se añadieron 300 μ L de solución de separación de proteínas y se mezcló por inversión durante 1 minuto. Después de esto, el tubo se sometió a centrifugación a 16000 g durante 15 minutos, y se transfirieron 800 μ L del sobrenadante a un tubo Monarch de 2 mL previamente etiquetado.

Unión y elución

Con la ayuda de una pinza estéril se colocaron 2 perlas en el tubo que contenía el sobrenadante. Luego, se añadieron 550 μ L de isopropanol y se mezclaron por inversión 25 veces. Después, con una pipeta de 1000 μ L, sin tocar las perlas, se retiró todo el líquido. A continuación, se añadieron 500 μ L de tampón de lavado de ADNg y se mezclaron por inversión 3 veces. Seguidamente, se procedió a retirar todo el líquido nuevamente 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 transfirieron las perlas contenidas en el tubo de 2 mL. Luego, se realizó una centrifugación y se colocó el retenedor con las perlas en un tubo Monarch de 2 mL, descartando el tubo de colección. Después, se transfirieron las perlas a un tubo Monarch de 2 mL y el retenedor a un tubo Eppendorf de 1.5 mL (no provisto por el kit).

Seguidamente, al tubo que contenía las perlas se añadieron 60 μ L 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 de que las perlas no estuvieran pegadas al tubo. Después, se transfirieron las perlas con el líquido al tubo que contenía el retenedor de perlas, se centrifugó a 12000 g durante 1 minuto y se descartó el retenedor con las perlas. Finalmente, se dejó el tubo que contenía el ADN durante la noche a temperatura ambiente y posteriormente se almacenó a -4°C para su uso posterior.

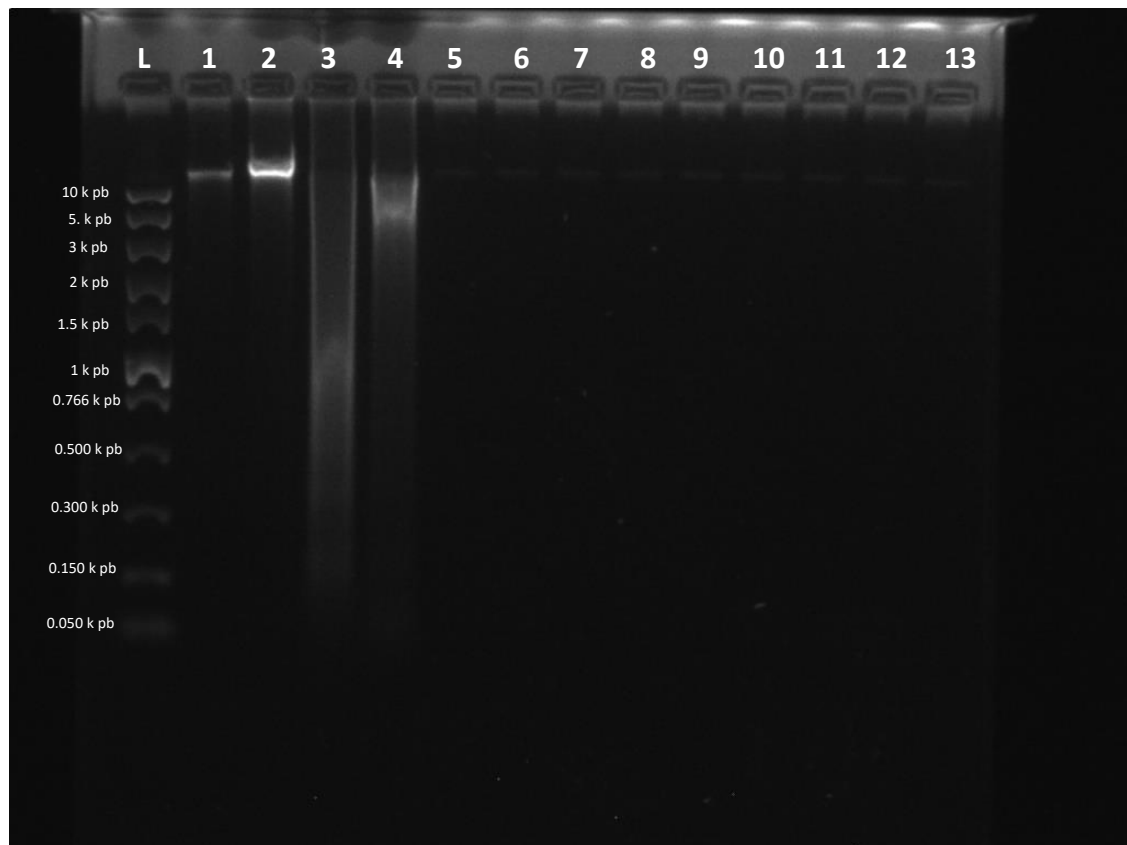


Figura suplementaria 1. Electroforesis Extracción de ADN_g de anfibios 10 Kb Fast DNA Ladder (Biolabs). Carril 1: ADN_g extraído de la falange A. bomolochos.
Realizado por: Ricardo Caiza



Figura suplementaria 2. Reconstrucción filogenética de 134 mitogenomas en total, 133 mitogenomas de anfibios disponibles en la base de datos del NCBI y el mitogenoma de *A. bomolochos* obtenido mediante ONT, El número de acceso de GenBank de cada especie se muestra junto a su nombre científico.

Realizado por: Ricardo Caiza