

# EXTRACCIÓN DE ADN MITOCONDRIAL DE DISTINTAS ESPECIES DE LA FAMILIA *Formicidae* PERTENECIENTES AL GÉNERO *Camponotus* PARA SU POSTERIOR SECUENCIACIÓN Y ESTUDIO

MITOCHONDRIAL DNA EXTRACTION OF SEVERAL SPECIES OF *Formicidae* GENDER *Camponotus* FOR POSTERIOR SEQUENCING STUDY

Raya L.<sup>1\*</sup>, Landi V.<sup>2</sup>, Garrido J.J.<sup>3</sup>, Reyes J.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba, España. \*laurarayaruiz@gmail.com

<sup>2</sup>Programa de máster de Reproducción Animal Sostenible de la Universidad de Córdoba.

<sup>3</sup>Universidad de Córdoba, Departamento de Genética.

<sup>4</sup>Universidad de Córdoba. Área de Ecología, Departamento de Botánica.

**Keywords:** Mitochondrial DNA; Barcoding; Ant.

**Palabras claves:** ADN mitocondrial; Barcoding; Hormiga.

## Abstract

Like also in higher animals in the world of insect the understanding of genetics composition of a environment is helpful to bring ecologic and evolutive conclusion. The classification of the genus *Camponotus* (ants) is carried out so far by morphological characteristics. Over the last few years a classification methods using the mitochondrial DNA has been introduced. Specimens which are similar from the point of view of phenotypic behavior could be easily distinguished. We present the initial setup of a study of classification trough DNA mitochondrial sequence.

## Resumen

Tanto como para los animales superiores, en el mundo de los insectos entender la composición genética de un ecosistema es de gran ayuda para extraer conclusiones de tipo evolutivo y ecológico. La clasificación de especies del género *Camponotus* (hormigas) se ha venido llevando a cabo hasta ahora por rasgos morfológicos. Sin embargo, en los últimos tiempos se han introducido métodos de clasificación por medio del ADN mitocondrial que permite distinguir entre especímenes que son similares desde un punto de vista fenotípico. En este trabajo presentamos la puesta a punto inicial de un estudio de clasificación a través de dicho ADN.

## Introducción

La composición e interacción de las especies que forman parte de un ecosistema determinan las características del mismo. Por tanto, la dispersión de estas especies trae consigo consecuencias ecológicas y evolutivas. Tanto la dispersión como la estructura de las poblaciones locales y el mantenimiento del flujo de genes van dando forma a las trayectorias evolutivas y modelando las distintas especies. La clasificación de especies del género *Camponotus* se suele llevar a cabo por rasgos morfológicos. Son un género ecológicamente ubicuo, ya que pueden encontrarse en todo el mundo. Su característica principal es que la inserción de las antenas está alejada de la base del cípeo y la glándula metapleurale está ausente en la mayoría de ellas. El objetivo del presente trabajo es validar una técnica de extracción de ADN, seguida de una amplificación mediante la técnica de PCR del material genético mitocondrial de ejemplares de 7 especies distintas de *Camponotus*, para su posterior estudio con secuenciación sanger.

## Material y métodos

Se llevaron a cabo tres métodos de extracción y amplificación distintos. Se extrajeron dos patas de cada ejemplar de *Camponotus* con una pinza estéril. Las hormigas se encontraban conservadas en Ethanol 96° y pertenecían a las especies descritas como: *Camponotus barbaricus* (Emery, 1905), *C. cruentatus* (Latreille, 1802), *C. pilicornis* (Roger, 1859), *C. sylvaticus* (Olivier, 1792), *C. aethiops* (Latreille, 1798), *C. serotinus* (Cagniant, 1996) y *C. fallax* (Nilander, 1856). Tras un breve secado previo para la evaporación del exceso de etanol se realizaron varios lavados con buffer TE (Tris-HCL ph 9, EDTA) para rehidratar los tejidos celulares.

Método 1: Se incubaron durante tres horas a 56°C en una suspensión de chelex 100 al 5% y 5 µl de proteinasa K (20mg/ml). Finalmente se incubaron las muestras a 95°C 15 minutos y a 99°C 3 minutos para inactivar la proteinasa K.

Método 2: Se incubaron durante 15 minutos a 95°C en una suspensión de chelex 100 al 5% y 5 µl de proteinasa K (20mg/ml). Finalmente se incubaron las muestras a 60°C 20 minutos y a 99°C 5 minutos para inactivar la proteinasa K.

Método 3: Se incubaron durante una hora a 57°C en una suspensión de chelex 100 al 5% y 5 µl de proteinasa K (20mg/ml). Finalmente se incubaron las muestras a 95°C 15 minutos para inactivar la proteinasa K.

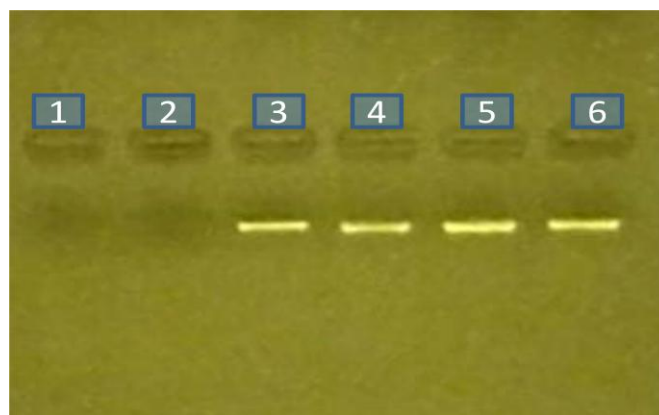
Los resultados se cuantificaron con el nanodrop para conocer así el grado de pureza de la muestra extraída (absorbancia a 260 y 280) y la concentración de ADN. Tras la extracción mediante los tres métodos se procedió a la amplificación del gen citocromo oxidasa, utilizando una pareja de cebadores. La amplificación por PCR se llevó a cabo en 25 µl de reacción, de los cuales: 50 ng ADN, PCR buffer 1x, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTPs 800µM, Taq 1u, con el siguiente programa térmico: desnaturalización inicial 94°C 2 minutos, seguida de 35 ciclos de (94°C, 30 s, 52°C, 30 s, 72°C, 45 s) con una extensión final de 72°C 5 minutos. Para comprobar el resultado de la amplificación, se visualizaron 5 µl de amplificado en un gel de agarosa al 1,5% con 5V por cm (figura 1).

## Resultados

Las mediciones mediante el nanodrop tras la extracción muestran la concentración de ADN de cada muestra, así como su grado de pureza. Ambos resultados fueron muy variables, ya que dependen de diversos factores como el tamaño de la muestra (que depende a su vez de la especie) y de la capacidad de romper eficazmente la envoltura de quitina que presentan los formícidos. No obstante, la cantidad de ADN obtenida fue medianamente alta. Los resultados de pureza obtenidos, como media entre la absorbancia a 260 y 280, igualmente fueron muy variables y generalmente bajos. Esta es la pureza media esperada en extracciones directas de tejido con resina chelex. La presencia de bandas en el gel de agarosa tras la amplificación, indica que el fragmento ha amplificado correctamente, por lo que el gen está preparado para su estudio. En la figura 1 podemos observar las bandas pertenecientes a distintas muestras.

**Tabla I.** Datos obtenidos en el nanodrop (*nanodrop instrument value*)

Concentración ADN (ng/µl)	Abs 260/Abs 280
18,8	1,46
73,2	0,88
19,4	1,42
84,1	0,89
48,875 ± 34,7	1,1625 ± 0,3



**Figura 1.** Resultados de la electroforesis en gel de agarosa tras PCR. Método 1: bandas 1 y 2; método 2: bandas 3 y 4; método 3: bandas 5 y 6 (*agarose gel electrophoresis results of PCR for the 3 methods. Method 1 well 1 and 2; method 2 well 3 and 4 and method 3 well 5 and 6*).

**Conclusiones**

La utilización de la técnica de PCR para la amplificación de un fragmento de ADN conocido, permite obtener un gran número de copias del fragmento deseado para su posterior estudio. Tras probar distintas técnicas de extracción y distintos programas de amplificación, el utilizado ha sido el método dos, pero el tres podría en principio haber resultado igualmente óptimo, puesto que los valores de absorbancia son prácticamente idénticos, al igual que los fragmentos de ADN observados en el gel de agarosa. Es importante la rotura de las patas antes de incubarlas, ya que sin ello, es casi imposible que la extracción de ADN sea exitosa. Antes de la amplificación las muestras fueron complementadas con 16  $\mu$ l de aceite mineral para evitar así la posible evaporación durante la ejecución del programa de PCR.

**Bibliografía**

Michael J. Jowers, Laurianne Leniaud, Xim Cerdá, Samer Alasaad, Stephane Caut, Fernando Amor, Serge Aron, Raphael R. Boulay. 2013. Social and Population Structure in the Ant *Cataglyphis emmae*. Public Library of Science.