



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES
INDICADORAS DE LA CALIDAD ATMOSFÉRICA EN
CIUDAD UNIVERSITARIA**

Autor: Javier Alía Bermejo

Tutor: Ana María Crespo de las Casas

Convocatoria: Junio 2018

ÍNDICE

- 1. Resumen.**
- 2. Introducción y antecedentes.**
 - 2.1 Introducción**
 - 2.2 Antecedentes**
- 3. Objetivos.**
- 4. Metodología.**
 - 4.1 Material**
 - 4.2 Metodología experimental**
 - 4.2.1 Preparación de las muestras**
 - 4.2.2 Protocolo extracción de ADN**
 - 4.2.3 Amplificación regiones específicas de ADN (ITS)**
 - 4.2.4 Posterior a la PCR**
 - 4.2.5 Secuenciación ADN**
 - 4.3 Metodología del análisis de datos**
- 5. Resultados y discusión.**
- 6. Conclusión.**
 - 6.1 Conclusiones generales**
 - 6.2 Conclusiones particulares**
- 7. Bibliografía.**

1 RESUMEN

Muchos organismos de distintas especies son difíciles de identificar únicamente en base a su morfología, bien sea debido a la falta o escasez de caracteres útiles para la diferenciación entre organismos próximos, o bien debido a procesos de convergencia (organismos con un lejano parentesco entre sí pero con morfología muy similar) o divergencia (organismos muy próximos en parentesco entre sí, pero con morfologías muy distintas) por razones ecológicas.

Es por esto que el análisis genético nos proporciona un instrumento para restar ambigüedad y dar mayor seguridad a las identificaciones de especies.

Hay establecidos distintos mecanismos y técnicas de identificación molecular. La técnica fundamental es la que se refiere al uso del ADN.

En este trabajo utilizaremos líquenes, ya que por un lado son bioindicadores de contaminación ambiental de amplio consenso y porque muchos de ellos requieren de la identificación molecular para refrendar la identificación morfológica y/o química.

Los líquenes utilizados son los que habitualmente se emplean en los estudios de contaminación atmosférica.

Para ello realizaremos una extracción de ADN, una amplificación de regiones específicas del mismo (que serán como un código de barras identificativo) y posteriormente su secuenciación y análisis de los datos obtenidos.

Este trabajo persigue formar al autor en la técnica de análisis molecular o análisis de ADN para identificación de especies.

2 INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

2.1 INTRODUCCIÓN

Los bioindicadores se pueden definir como organismos que sirven para la identificación y determinación cualitativa de factores medioambientales y que pueden utilizarse para monitorear el estado o salud del ambiente, o como indicadores del grado de perturbación o de la presencia de contaminantes ambientales(Hawksworth, Iturriaga, & Crespo, 2005).

Numerosos organismos pueden ser utilizados como bioindicadores; distintas especies de plantas vasculares, briofitas, algas, líquenes, hongos, animales invertebrados e incluso animales vertebrados. En lo que refiere a contaminación atmosférica, suele hablarse de “salubridad del aire”, son considerados buenos indicadores aquellos organismos como los líquenes, algunas de cuyas especies presentan sensibilidad gradual a contaminantes habituales de los presentes en el aire; entre ellos se buscan especies con una amplia distribución en el área de estudio y que presenten suficiente longevidad(Crespo, s. f.).

Operativamente, la contaminación se define en términos de concentraciones por encima de los niveles permitidos por la ley. Las técnicas empleadas para valorar dicha contaminación son muy costosas, por lo que la utilización de líquenes como biomonitores resulta muy atractiva y cada vez está más generalizada. Estos organismos permiten una medición prácticamente inmediata de los niveles de contaminación en áreas grandes y pueden actuar como señales de alarma ambiental(Hawksworth et al., 2005).

Los líquenes son asociaciones simbióticas de hongos (micobionte) con organismos fotobiontes (algas verdes clorófitas, o cianobacterias) de cuya interacción se origina un talo estable, el liquen propiamente dicho, con estructura y fisiología específicas. Los hongos que intervienen en esta asociación son principalmente ascomicota (Ascomycota) y basidiomicota (Basidiomycota), siendo principalmente en este caso los primeramente citados(Gómez-Serranillos, Fernández-Moriano, González-Burgos, Divakar, & Crespo, 2014).

Tienen características particulares como que carecen de raíz y sistema de vasos, no presentan estructuras selectivas para controlar el agua como cutícula o epidermis; por ello carecen de protección frente a cualquier agente o toxico en disolución. Así son vulnerables a pequeñas variaciones ambientales. Además son organismos autótrofos de lento crecimiento, y hay un buen número de especies que tienen amplia distribución por toda la superficie terrestre(Hawksworth et al., 2005).

Estas razones y otras, hacen que sean considerados bioindicadores excelentes de la calidad o salubridad del aire(Hawksworth et al., 2005). En síntesis:

1. Carecen de raíces, por lo que las sustancias que requieren para su desarrollo y crecimiento han de obtenerlas por toda su superficie y fundamentalmente en disolución en el aire.
2. Son organismos ubicuos, encontrándose en aumento las poblaciones liquénicas en zonas urbanas, sobre todo en países desarrollados, por la disminución en los niveles de dióxido de azufre en las ciudades.
3. No presentan cutícula protectora, por lo que captan agua y solutos del aire a través de la práctica totalidad de su superficie; en contraposición los vegetales, por ejemplo, al estar protegidos por cutícula los intercambios se restringen a los estomas.
4. Pueden vivir varios cientos de años, sin partes caducas como las plantas. Son perennes y pueden ser muestreados durante todo el año.
5. Su naturaleza simbiótica, que les confiere mayor vulnerabilidad (sensibilidad) ya que si uno de los simbioses se ve afectado por alguna razón, ambos organismos mueren.
6. Acumulan sustancias tóxicas en diferentes cantidades en función de la concentración de éstas en el aire.
7. Son organismos poiquilohídricos, es decir, no regulan el contenido de agua en sus células, permitiéndoles tolerar largos periodos de sequía o desecación.
8. Tienen una actividad metabólica lenta y su tasa de crecimiento es reducida.
9. Pueden permanecer expuestos al efecto nocivo durante largos periodos, proporcionando información de estados crónicos y no tanto de variaciones puntuales en el ecosistema.

La sensibilidad de estos organismos a los contaminantes es variable entre distintas especies y es precisamente debido al estar formados por dos organismos (micobionte + fotobionte), pues cualquier proceso o situación que altere el balance simbiótico podrá afectar y romper esta relación. En esta asociación, el organismo fotobionte (el alga) presenta mayor sensibilidad, afectando así a la supervivencia del otro simbiote (el hongo) si este no puede adquirir los nutrientes producidos por el alga durante la fotosíntesis(Hawksworth et al., 2005).

Es por todas estas razones que los líquenes resultan muy útiles como bioindicadores, ya que su longevidad y el hecho de que capten sus nutrientes del aire no es algo que se dé simultáneamente en otros organismos de sensibilidad comparable. De la misma manera, algunos líquenes presentan necesidades ecológicas restringidas o rangos de dispersión limitados. Estas características particulares hacen de ellos organismos sensibles a los cambios en su hábitat, lo que permite su uso como bioindicadores o biomonitores en distintos ecosistemas(Vargas, Pérez, Sánchez, & Mercado, 2016).

En particular, son los líquenes epífitos, es decir, que se desarrollan sobre la corteza de los árboles, aquellos que son considerados mejores bioindicadores de la contaminación aérea. Se trata de líquenes muy comunes sobre la corteza de numerosos árboles incluyendo aquellos que habitualmente se mantienen o se plantan en áreas urbanas e industriales (encinas, acacias, y con ciertas restricciones también pinos y otras coníferas)(Crespo, s. f.).

Entre ellos están las especies del género *Parmelina*, muy comunes en nuestro entorno territorial y que pueden crecer sobre una buena mayoría de los árboles más comunes. *Parmelina tiliácea* presenta talo foliáceo de color gris, formando una roseta laminar con lóbulos redondeados, densamente cubierto en la zona central del de numerosos isidios (propágulos vegetativos) concoloros, o apicalmente oscurecidos. El talo en su conjunto puede llegar a formar rosetas de tamaño considerable (alcanzando los 15 cm de diámetro). La cara inferior es de color pardo oscuro, encontrándose completamente cubierta de rizinas simples (algunas ramificadas)(Crespo, s. f.).

Esta especie utilizados en la biomonitorización tiene la capacidad de ofrecer información sobre el estado del medio en que se está desarrollando. Su abundancia y vitalidad en un determinado territorio, se correlaciona con el grado de contaminación.

La respuesta ante la contaminación aérea es distinta entre las diferentes especies. *Parmelina tiliácea* tiene una tolerancia media frente a la contaminación urbana del aire. Las especies más sensibles o toxisensibles desaparecen con las primeras alteraciones, mientras que las especies toxitolerantes permanecen e incluso inicialmente ven aumentada su presencia, hasta un punto de no retorno en el que el nivel de concentración de contaminantes es demasiado alto, lo que provoca su desaparición, llegando a producir el conocido como desierto liquénico (Hawksworth et al., 2005).

2.2 ANTECEDENTES

La primera vez que los líquenes fueron considerados como bioindicadores fue en torno al siglo XIX, aunque no fue hasta la segunda mitad del siglo XX cuando se identificó al SO₂ como factor fundamental en el desarrollo y distribución de la población líquénica cuando crecieron exponencialmente los estudios en que los líquenes eran utilizados como biomonitores (HAWKSWORTH & ROSE, 1970).

Fenómenos como la eutrofización y la lluvia ácida, incluso otros compuestos como el amoníaco, los fluoruros, hidrocarburos clorados y metales radiactivos, pueden ser monitorizados y detectados mediante el uso de distintas especies de líquenes (Cislaghi & Nimis, 1997).

El descenso en las poblaciones de líquenes se debe en la mayor parte de los casos a la contaminación producida por el dióxido de azufre. Otros, como los fluoruros también pueden ser muy tóxicos a nivel local. Contaminantes gaseosos como el ozono y los óxidos de nitrógeno liberados en la combustión en los coches son también responsables del descenso en el número de poblaciones de cambios en las especies presentes (González-Torres, s. f.).

En todo caso el uso de los bioindicadores requiere la correcta identificación de las especies; las distintas especies resultan sensibles a diferentes contaminantes; esto queda establecido desde los primeros estudios del siglo XIX pero sobre todo a partir de Harwksworth & Rose (1970).

3 OBJETIVOS

Como se ha indicado por un lado, para usar cualquier organismo como bioindicador se requiere poder identificar con seguridad la especie de que se trate. También se ha advertido que algunas especies no se pueden identificar con suficiente rigor si se atiende exclusivamente a caracteres morfológicos o químicos. Una especie que resulta especialmente útil por su grado de sensibilidad y por su abundancia relativa en el entorno territorial en que nos encontramos es *Parmelina tiliácea*. Esta especie puede confundirse fácilmente con una especie morfológicamente muy semejante que es *Parmelina cryptotiliacea*, de hecho, ambas se consideran “especies crípticas” o indistinguibles por caracteres fenotípicos (Gómez-Serranillos et al., 2014). Es por tanto un caso típico de especie que requiere identificación molecular para discernir si se trata de una o de otra. La identificación molecular de ambas especies en el entorno territorial dado es el objetivo de este trabajo; la identificación se realiza a través de secuencias específicas de ADN (regiones ITS) previa selección de muestras ya tomadas del

campo de estudio. Se pretende como objetivo docente o formativo conocer y practicar las técnicas de laboratorio que facilitan la identificación molecular de especies.

4 METODOLOGÍA

La extracción de ADN requiere en primer lugar, lisar la célula por medio de un método de fractura mecánica (nitrógeno líquido) y luego mediante distintos productos ir separando todos los demás componentes celulares. En este proceso se utiliza un kit comercial (especificado más abajo en el capítulo de Material). El ADN recogido como depósito resultante debe ser aún purificado.

La purificación de este material genético se hará mediante paso por columnas de otro kit comercias, hasta obtener el ADN puro.

Una vez obtenido, el ADN total es preciso seleccionar los fragmentos marcadores que pueden resultar operativos para distinguir entre especies. La secuencia de estos marcadores es la que resulta diferente en una y otra especie. El marcador que se busca es un fragmento de ADN ribosómico (región ITS) que es el que actúa como primera aproximación a la identificación molecular de las especies de hongos (DNA-barcode) que luego se podrá comparar con la información del Gen-Bank (Schoch et al., 2012).

Para aislar ese preciso fragmento se hace una amplificación selectiva mediante una reacción PCR (polimerase chain reaction), utilizando unos primers seleccionados para ello (ver en materiales). Posteriormente se amplifica de nuevo para obtener la secuencia que sirve de identificador. La secuenciación del fragmento llevada a cabo es tipo Sanger (Pérez Valencia, 2012).

Finalmente comparamos las secuencias obtenidas frente a una base de datos de Gen-Bank para identificar la especie que con mayor probabilidad (más similitud) hemos secuenciado.

4.1 MATERIAL

Líquenes (Familia *Parmeliaceae* del género *Parmelina*).

El objetivo es llevar a cabo la identificación de líquenes de la corteza de árbol. Cogemos pequeños trozos con las pinzas y el escalpelo y lo metemos en un eppendorf.

El líquen *Parmelina* es un líquen foliáceo, por lo que cogeremos pequeñas láminas que estén lo más limpias posibles. Lo ideal es coger muestras de tejido que parezca joven, limpio, sin signos de infección para así evitar amplificar posteriormente material contaminante. Intentamos no coger estructuras de reproducción, cogiendo trozos vegetativos.

El Kit de trabajo que utilizamos durante todo el proceso para la extracción del material genético DNA es **DNeasy Plant MiniKit** de laboratorios **Qiagen**.

4.2 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.2.1 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se toman los lóbulos periféricos del líquen, porque son las zonas del talo más joven y son susceptibles de contener menos metabolitos secundarios. Cortamos 2 o 3 trozos pequeños de dichos lóbulos libres de estructuras reproductoras y parásitos (de hongos liquenícolas u otros líquenes), se limpian de rizinas y otros restos y se introducen en tubos eppendorf.

Las muestras están numeradas y etiquetadas para una correcta identificación. Este número (código) lo usaremos para la identificación de las mismas durante todo el proceso.

Numeramos los eppendorf con el código, añadimos acetona para lavar metabolitos secundarios frecuentes que pudieran interferir en la PCR, y dejamos reposar unas dos horas. Posteriormente, retiramos la acetona con precaución para no tomar trozos de talo y dejamos abierto de un día para otro para dejar evaporar la acetona (CRESPO, BLANCO, CUBERO, & MOLINA, s. f.).

4.2.2 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN ADN

Las muestras deberán ir ordenadas de menor a mayor según el DNA Code (CRESPO et al., s. f.).

El buffer AP1 (ayuda a la lisis la muestra) lo ponemos a calentar en baño maría, ya que tiene que alcanzar una temperatura de 65°C mientras machacamos las muestras.

1. Machacado de las muestras: Para ello ponemos los eppendof con las muestras en nitrógeno líquido, iniciando así la lisis mecánica por ultracongelación. Posteriormente, machacamos las muestras con ayuda de varillas de vidrio estériles (autoclavadas), usando los eppendof como mortero.

2. Buffer AP1 y ARNasa (impide la degradación del ADN): Tras haber machacado las muestras, usamos el buffer AP1 que teníamos calentando a 65°C en el baño y lo añadimos (el volumen a añadir varía en función de la cantidad de muestra presente en el eppendorf). Minutos después, machacamos la muestra de nuevo con la ayuda deñ AP1 y volvemos a añadir más volumen del mismo hasta que alcanzamos el mismo volumen de buffer por muestra (400µL)

A cada muestra le añadimos 4µl de ARNasa sin diluir, pasando los eppendorf por el vortez para una buena mezcla. Los eppendorf se dejan en el Thermoblock a 65°C, siendo agitados cada 30 minutos.

Así pues, los volúmenes presentes en cada tubo hasta el momento son:

<u>DNA Code</u>	<u>Volumen(µL)</u>	<u>DNA Code</u>	<u>Volumen(µL)</u>
5111	450	5119	400
5112	400	5122	400
5116	450	5123	450

3. Añadimos 130µl del buffer AP2 (precipita detergente, proteínas y polisacáridos) y pasamos por el vortex. Incubamos durante 10 minutos en congelador y centrifugamos a 4°C durante 7 minutos a 15000 rpm. El ADN queda en el líquido sobrenadante del eppendorf, el cual cogemos con precaución de no llevarnos el pellet de células que queda en el fondo, para pasarlo seguidamente a la columna morada.

La columna morada elimina la mayoría de los precipitados y restos de células que no nos interesan. Se lleva a centrífuga a una temperatura de 4°C durante 3 minutos y a 15000 rpm. Mientras tanto, el buffer de elución (AE) se atempera a 65°C en el baño.

Tras la centrífuga, el líquido sobrante de la columna morada lo pasamos a nuevos eppendorfs (numerados).

4. Buffer de lavado AP3 (Contiene etanol, el cual ayuda a precipitar el ADN para que podamos aislarlo de cualquier otro compuesto de la solución). Se añade 1.5 veces el volumen extraído de buffer AP3. Mezclamos con la punta de micropipeta y vortex.
5. Paso a columna blanca. 650µl de la preparación a la columna blanca, la cual contiene pequeños granos de sílice. Pasamos por centrífuga durante 2 minutos a 10000rpm. El

ADN se queda fijado en el filtro de la columna debido al etanol presente en el buffer AP3. Añadimos el resto del líquido reservado en el eppendorf, mezcla de AP3 con ADN del paso anterior (unos 500µL). Tras volver a centrifugar durante 2 minutos a 10000 rpm, pasamos el contenido de la columna blanca a una nueva base de columna blanca.

6. Buffer de lavado Aw (Aw2, para purificar el ADN). Ya fijado el ADN al filtro de la columna, añadimos el buffer de lavado Aw2. Añadimos 500µL de este buffer a cada muestra en la columna. Se centrifuga 2 minutos a 8000 rpm. Nuevamente desechamos el líquido sobrenadante y volvemos a añadir 500µL de buffer de lavado. Repetimos la centrifuga, pero esta vez durante 1 minuto a 14000 rpm para separar todo el buffer Aw.
7. Buffer de elución de ADN (AE, buffer de elución en el cual recogeremos el ADN fijado en la columna blanca). Cuando llevamos a cabo una extracción de ADN, realizamos dos eluciones. Una primera elución sería con un DNA más puro que en la segunda elución. Nosotros trabajamos con E1 + E2. Cada elución tendrá un volumen de 60µL.

Este buffer AE recordamos que estaba a 65°C en el baño maría. Añadimos 50µl del mismo a las eluciones y las dejamos incubar en baño seco a 65°C durante 5 minutos. Después pasamos a centrifuga durante 2 minutos a 11000 rpm. El ADN ahora está tanto en la columna blanca como en el líquido sobrenadante del eppendorf E1. Guardamos esta elución E1 en una caja de almacenaje de muestras de ADN en el congelador.

Repetimos para la elución E2 los mismos pasos que hemos hecho con E1. Finalmente, antes de retirar la columna blanca, centrifugamos la muestra para asegurarnos que retiramos todo el buffer de elución AE con el ADN, durante 1 minuto a 14000rpm.

Por tanto, el ADN ahora lo tendremos en el líquido sobrenadante del eppendorf E2. Guardamos de igual manera la elución E2 en una caja de almacenaje de ADN en el congelador a la espera de hacer la PCR.

4.2.3 AMPLIFICACIÓN REGIONES ESPECÍFICAS DE ADN (ITS)

Para la PCR utilizamos como primers estándar (Medina, Alcántar, & Galván-, s. f.):

- ITS 4 “Reverse”
- ITS 1F “Forward”

El volumen total (Vf) de la reacción para la PCR es de 25µL. De este volumen, 12µL son de la Master Mix, 4.5µL de H₂O, 1.5µL de cada primer y 5µL de ADN (nuestro ADN está en elución con 4µL de H₂O). El DNA total a amplificar tiene que estar en un rango concreto. Si hay demasiado DNA de partida puede dar problemas a la polimerasa a la hora de amplificar. Antes de hacer la PCR, hay que comprobar la concentración de DNA molde. En la PCR, cualquiera de los componentes que esté en exceso, molesta en exceso. Sin embargo, el rango de dNTP es más flexible. Si hubiese muchísimo DNA molde es más que probable que la DNA polimerasa no pudiese acceder a los sitios de amplificación. La Master Mix contiene Mg⁺², dNTP y ADN polimerasa.

Amplificación de ITS(CRESPO et al., s. f.): Para la amplificación por PCR de la secuencia completa del ITS se utilizó un par de cebadores (ITS 1F e ITS 4) de acuerdo con las condiciones descritas en Guzmán-Dávalos et al. (2003), con algunas modificaciones.

Los ITS son la región del ADN nuclear de hongos más utilizada en la identificación genética. Las regiones del ADN mitocondrial y nuclear que tienen mayor interés son las que codifican para el ARN ribosómico (ADNr). Este ADN ribosómico mitocondrial consta de dos genes, 16S y 23S, que se repiten espaciados a lo largo de su genoma. Por el contrario, el ADN ribosómico nuclear tiene muchas copias. Las secuencias de estos genes están separadas por dos espaciadores (que también se transcriben), llamados ITS 1 e ITS 2 (espaciador transcribible interno). Entre estos genes hay igualmente un espaciador intergénico que no se transcribe, llamado IGS (espaciador intergénico no transcribible). Las zonas no codificantes del ADN ribosómico son más susceptibles de acumular mutaciones y por ello tienen gran interés en la identificación de especies.

La región ITS del ADN ribosómico nuclear contiene dos regiones variables que no codifican y que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del ADN ribosómico, entre la subunidad pequeña, la región 5.8 S y los genes codificantes para ARNr de la subunidad grande(Schoch et al., 2012).

La naturaleza multicopia de las repeticiones del ADN ribosómico hace de esta región una secuencia fácilmente amplificable. También permite el uso de pequeñas muestras de material genético, altamente degradadas o muy diluidas (material genético viejo).

Hacemos la preparación para 12 muestras: 150µL de Master Mix, 54µL de H₂O, 18µL de cada primer y 5µL de ADN en dilución 1:5 (E1 + E2). Numeramos los eppendorfs en función del DNA Code como hemos hecho hasta ahora. Centrifugamos a máxima velocidad durante 30 segundos para que quede todo en el fondo (un sprint o pulso).

4.2.4 POSTERIOR A LA PCR

Tras realizar la PCR procedemos a purificar los productos amplificados (aquellos que han dado resultado positivo). Lo llevamos a cabo mediante una enzima o por filtración en columna. En nuestro caso, lo haremos usando una enzima, GE Healthcare Lifescience™ **Illustra ExoProStar™**. Esta enzima degrada el primer y los dNTPs sobrantes y solo deja productos de la PCR (Cubero, Crespo, Fatehi, & Bridge, 1999).

Una vez purificado, se procede a la secuenciación en el CAI de Genómica y Proteómica de la UCM.

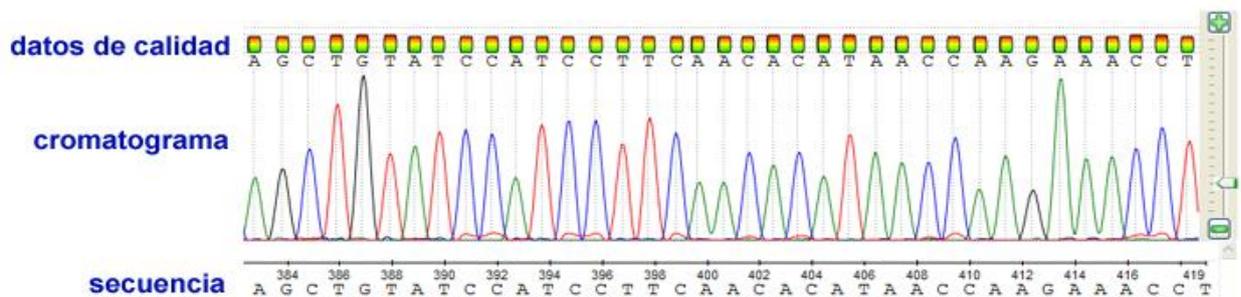
4.2.5 SECUENCIACIÓN DEL DNA

La secuenciación que llevamos a cabo es tipo Sanger (secuenciación estándar) (Peña-Castro, Gregorio-Ramírez, & Barrera-Figueroa, 2013). Es una PCR, pero que mete dNTPs y ddNTPs. Los dideoxinucleótidos son deoxinucleótidos modificados en su extremo 3' y marcados con cuatro colores. El primer se une y tendremos marcadas todas las posiciones. Al hacer una electroforesis de la mezcla de productos en el secuenciador, quedarían colocados por tamaño, desde el más pequeño al de mayor tamaño.

El método de Sanger o de los dideoxinucleótidos está basado en sintetizar, de forma secuencial, una hebra de ADN complementaria a una hebra de cadena simple (utilizada como molde), en presencia de ADN polimerasa, los cuatro deoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) y cuatro dideoxinucleótidos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP). Estos nucleótidos de parada están diseñados para que carezcan del grupo 3'-OH, lo cual impide la adición adyacente de otro nucleótido, de tal manera que cuando uno de ellos es incorporado por la polimerasa la síntesis de la nueva hebra se interrumpe. Así pues, en función del punto en que se incorpore el dideoxinucleótido, tendremos fragmentos secuenciados de distintos tamaños.

Partimos de cuatro tubos. Cada uno de ellos contiene una mezcla que contenga la misma cadena molde (ADN cadena simple obtenido previamente mediante desnaturalización), ADN polimerasa, un cebador marcado radiactivamente, los cuatro dNTPs y uno de los cuatro dideoxinucleótidos (ddNTPs). El cebador se une a la hebra molde (por complementariedad, permitiendo su reconocimiento por la ADN polimerasa y la síntesis de la nueva hebra. La ADN polimerasa añade dNTPs hasta que, aleatoriamente incorpora un dideoxinucleótido (el ddNTP que haya presente en ese tubo) e interrumpe la síntesis. Así de esta manera, en el tubo aparecen fragmentos secuenciados de distintos tamaños e interrumpidos por el mismo ddNTP. De este modo, con una electroforesis en gel de acrilamida se puede dilucidar la secuencia

haciendo correr el contenido de cada uno de los tubos. Gracias al cebador marcado radiactivamente, podemos contemplar diferentes bandas que podrán ser traducidas en diferentes nucleótidos (Peña-Castro et al., 2013).

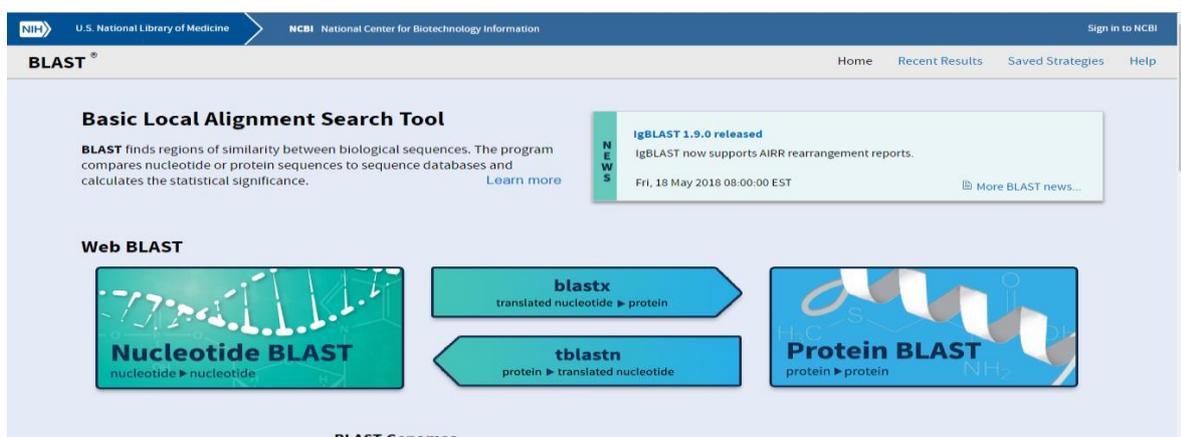


PROGRAMA SOFTWARE BIOEDIT PARA LA VISUALIZACION DE CROMATOGRAMAS Y EDICION DE SECUENCIAS DE ADN

4.3 METODOLOGÍA DEL ANÁLISIS DE DATOS

Llevamos a cabo el análisis de los datos obtenidos siguiendo el marco metodológico. Las secuencias obtenidas al final de todo el proceso anterior fueron comprobadas, editadas y exportadas a formato FASTA, en el cual tendremos nuestra secuencia para proceder a su análisis.

Queda finalmente el punto de identificación, lanzando nuestras secuencias contra una base de datos. Dicha base de datos se encuentra en la web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI en sus siglas en inglés), el cual forma parte de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos, una rama del Instituto Nacional de Salud.



Dirección web: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

La herramienta que utilizamos en esta base de datos es el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), más específicamente el BLASTn (nucleotide BLAST) (Buhler, Lancaster, Jacob, & Chamberlain, s. f.). Copiamos nuestra secuencia nucleotídica en formato FASTA en la ventana que le corresponde y seleccionamos la base de datos general “Nucleotide Collection”.

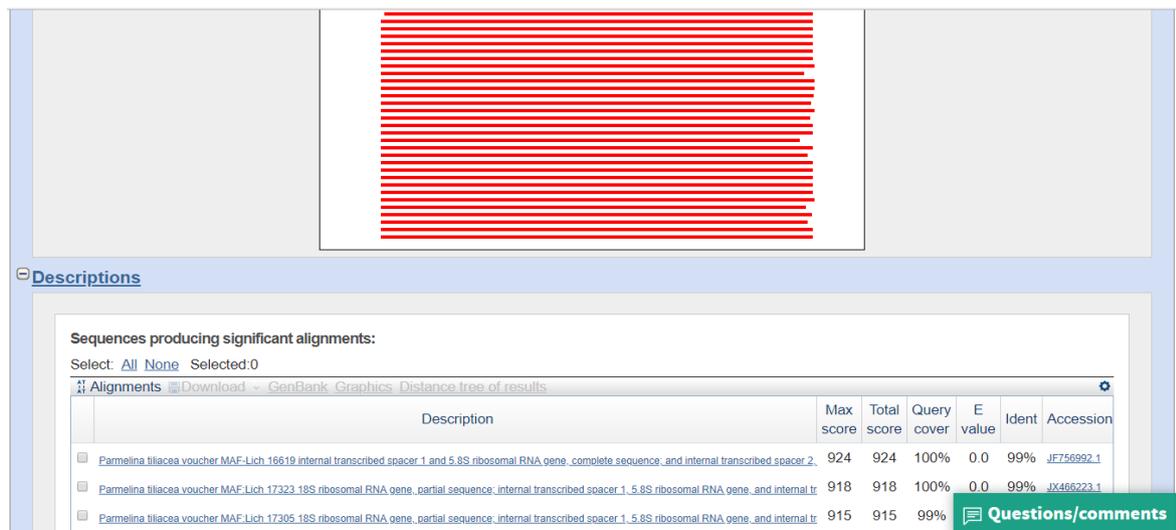
The screenshot shows the BLAST Standard Nucleotide BLAST interface. The 'Enter Query Sequence' section contains a FASTA sequence for '5116_ITS'. The 'Choose Search Set' section shows 'Database' set to 'Nucleotide collection (nr/nt)'. The 'Program Selection' section has 'Optimize for' set to 'Highly similar sequences (megablast)'.

Hay una optimización para llevar a cabo la búsqueda que son los distintos BLAST (megablast., discontinuous megablast y blastn). Nosotros optimizaremos la búsqueda con megablast ya que nos muestra secuencias con una elevada similitud (highly similar sequences).

Al realizar la búsqueda nos redirige a una ventana en la cual se observa un gráfico que nos muestra cómo de similar es nuestra secuencia a distintas especies, clasificándolas en función del score obtenido.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se puede ver en la imagen que sigue, correspondiente con la muestra de **DNA Code 5116** el resultado más repetido y el que mayor grado de similitud ha obtenido con respecto a nuestra secuencia problema, es el de la especie de *Parmelina tiliacea* con un 99% de probabilidades de acierto. Si bien es cierto que en otros casos también encontramos una alta coincidencia con otras especies como *Parmelina pastillifera*, *Parmelina sp* y *Parmelina quercina*.



The image shows a screenshot of a BLAST search results page. At the top, there is a visualization of sequence alignments represented by red horizontal bars. Below this, the 'Descriptions' section is expanded, showing 'Sequences producing significant alignments:'. There are three entries in the table below, all with 100% query cover and 99% identity. The first entry is for *Parmelina tiliacea* voucher MAF-Lich 16619, with a max score of 924 and accession JF756992.1. The second entry is for *Parmelina tiliacea* voucher MAF-Lich 17223, with a max score of 918 and accession JX466223.1. The third entry is for *Parmelina tiliacea* voucher MAF-Lich 17305, with a max score of 915 and accession JX466223.1. A 'Questions/comments' button is visible at the bottom right of the table.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Parmelina tiliacea voucher MAF-Lich 16619 internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2	924	924	100%	0.0	99%	JF756992.1
Parmelina tiliacea voucher MAF-Lich 17223 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tr	918	918	100%	0.0	99%	JX466223.1
Parmelina tiliacea voucher MAF-Lich 17305 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tr	915	915	99%			

En este tipo de análisis se elige el más probable, aunque eso es discutible, ya que a veces el más probable no es del todo convincente por razones diversas. Es por esto que seleccionamos los tres más probables (en este caso se corresponden con *Parmelina tiliacea*).

Esta técnica nos proporciona unos resultados muy útiles para el proceso de identificación, pero de ninguna manera son cien por cien fiables o definitivos. Ha de ser contrastada con otras técnicas morfológicas y de filogenia por un especialista.

Si hubiese dudas al respecto del resultado, habría que recurrir de igual manera al análisis filogenético con cualquier estadístico sencillo.

Este, por tanto, es un análisis rutinario que debe ser valorado siempre dentro de un combinado con otras técnicas (fundamentalmente filogenéticas y morfológicas).

6. CONCLUSIÓN

6.1 CONCLUSIONES GENERALES

Todo el proceso, desde la selección de muestras a la identificación molecular de las mismas me ha servido para formarme, conocer diferentes técnicas de laboratorio y adquirir mecanismos de los que previamente desconocía el uso real que podía hacerse de los mismos.

He llevado a cabo la identificación molecular de varias especies, el largo proceso que requiere realizar la extracción de su material genético, amplificarlo y finalmente secuenciarlo.

El conocimiento y aprendizaje del uso de una base de datos como el NCBI, particularmente el BLAST para la comparativa de secuencias problema con especies registradas

Asimismo saber que esta técnica nos proporciona un indicador/marcador de especies de muy alto valor que tiene que ser combinado para determinar la identificación de manera fiable. Este marcador puede dilucidar, resolver, descartar o apoyar identificaciones basadas en otros criterios.

6.2 CONCLUSIONES PARTICULARES

1. Los **bioindicadores** son organismos que nos sirven para identificar y determinar factores que afectan al medio ambiente, para monitorizar su estado, como indicadores del grado de perturbación o de la presencia de contaminantes en un ecosistema.
2. Los **líquenes** son asociaciones simbióticas de un hongo con un organismo fotobionte, y son considerados unos bioindicadores excelentes de la calidad del aire debido a que obtienen sus nutrientes del aire; son ubicuos y sus poblaciones están en aumento en las zonas urbanas; son perennes y pueden ser monitorizados durante todo el año; pueden permanecer expuestos al efecto nocivo durante largos periodos de tiempo, etc.
3. Para utilizar los líquenes como bioindicadores, tenemos que proceder a su **identificación**, tanto morfológica como molecular fundamentalmente.
4. En el proceso de identificación molecular de las especies de estos líquenes se ha llevado a cabo una extracción de su material genético, y posterior amplificación de las **regiones ITS**, regiones específicas de ADN ribosómico que utilizamos como un código de barras de estas especies.

5. Tras la amplificación de los ITS, se procede a su **secuenciación** de estos fragmentos. Se lleva a cabo por un proceso estándar y obtenemos nuestra secuencia problema a identificar.
6. Para el **Análisis** de los datos obtenidos, al enfrentar nuestra secuencia con una base de datos, observamos que se trata con alta probabilidad de la especie que era de esperar. Esto nos permite refrendar con cierto nivel de certeza que la muestra de especie líquénica de *Parmelina tiliacea*, recogida en la Ciudad Universitaria de Madrid, es un buen bioindicador de salubridad del aire.

7. BIBLIOGRAFÍA

Buhler, J. D., Lancaster, J. M., Jacob, A. C., & Chamberlain, R. D. (s. f.). MERCURY

BLASTN: FASTER DNA SEQUENCE COMPARISON USING A STREAMING
HARDWARE ARCHITECTURE, 10.

Cislaghi, C., & Nimis, P. L. (1997). Lichens, air pollution and lung cancer. *Nature*, 387, 463.

Crespo, A. (s. f.). flora y vegetación líquénicas de la Casa de Campo de Madrid (España), 30.

CRESPO, A., BLANCO, O., CUBERO, O. F., & MOLINA, M. C. (s. f.). Técnicas y métodos
para la iniciación en el estudio de la evolución molecular con aplicaciones especiales
para el análisis de los hongos liquenizados, 39.

Cubero, O. F., Crespo, A., Fatehi, J., & Bridge, P. D. (1999). DNA extraction and PCR
amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi.
Plant Systematics and Evolution, 216(3-4), 243-249.

<https://doi.org/10.1007/BF01084401>

Gómez-Serranillos, M. P., Fernández-Moriano, C., González-Burgos, E., Divakar, P. K., &
Crespo, A. (2014). Parmeliaceae family: phytochemistry, pharmacological potential
and phylogenetic features. *RSC Adv.*, 4(103), 59017-59047.

<https://doi.org/10.1039/C4RA09104C>

González-Torres, D. (s. f.). Determinación de la contaminación atmosférica en la ciudad de
Pontevedra mediante bioindicadores líquénicos, 10.

Hawksworth, D. L., Iturriaga, T., & Crespo, A. (2005). Líquenes como bioindicadores
inmediatos de contaminación y cambios medio-ambientales en los trópicos. *Revista
Iberoamericana de Micología*, 22(2), 71-82. [https://doi.org/10.1016/S1130-](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70013-9)

[1406\(05\)70013-9](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(05)70013-9)

HAWKSWORTH, D. L., & ROSE, F. (1970). Qualitative Scale for estimating Sulphur Dioxide Air Pollution in England and Wales using Epiphytic Lichens. *Nature*, 227, 145.

Medina, C. V. M., Alcántar, O. R., & Galván-, A. (s. f.). Obtención de secuencias ITS del DNAr en la sección Celuloderma del género *Pluteus* Fr. (Fungi, Agaricales) para su uso en análisis filogenéticos, 6.

Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O., & Barrera-Figueroa, B. E. (2013). Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación Química*, 24(2), 237-246.
[https://doi.org/10.1016/S0187-893X\(13\)72468-6](https://doi.org/10.1016/S0187-893X(13)72468-6)

Pérez Valencia, L. I. (2012). Extracción de ADN y amplificación de secuencias del ITS del ADNr de *Ganoderma* (Fungi, Basidiomycetes) para su uso en el análisis filogenético. *REVISTA INVESTIGACION BIODIVERSIDAD Y DESARROLLO*, 31(1).
<https://doi.org/10.18636/ribd.v31i1.281>

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... Schindel, D. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

Vargas, N. G., Pérez, M. L., Sánchez, G. N., & Mercado, R. F. (2016). Aplicabilidad de líquenes bioindicadores como herramienta de monitoreo de la calidad del aire en la ciudad de Cochabamba, 7, 28.