

Técnicas y métodos para la iniciación en el estudio de la evolución molecular con aplicaciones especiales para el análisis de los hongos liquenizados

Ana CRESPO, Oscar BLANCO, Oscar F. CUBERO, M. Carmen MOLINA
y Paloma CUBAS

Departamento de Biología Vegetal II, Facultad de Farmacia.
Universidad Complutense. E-28040, Madrid.

Índice y contenidos

Introducción

1. Características generales del análisis molecular de los líquenes
2. Materiales de partida
3. Aislamiento o extracción del DNA
 - 3.1. Proceso de la extracción basado en CTAB
 - 3.1.1. Esquema del proceso
 - 3.1.2. Productos y soluciones necesarias
 - 3.1.3. Protocolo de extracción de DNA basado en CTAB
 - 3.2. Problemas en la extracción del DNA
 - 3.3. Almacenaje del DNA
4. Aislamiento del RNA
5. Amplificación del DNA por la PCR
 - 5.1. Proceso de preparación de la PCR
 - 5.1.1. Esquema y desarrollo del proceso
 - 5.1.2. Segmentos de DNA utilizados en los estudios sobre líquenes
 - 5.1.3. Reactivos necesarios
 - 5.1.4. Protocolo de la PCR
 - 5.1.5. Visualización del producto de la PCR y preparación del gel
 - 5.2. Problemas en la PCR
 - 5.3. Almacenaje del producto por PCR
 - 5.4. Purificación por columna del producto de la PCR
 - 5.5. Extracción de ácidos nucleicos
6. Secuenciación de DNA
 - 6.1. Alineamiento y análisis de secuencias
 - 6.2. Problemas en el alineamiento
7. Análisis de secuencias para filogenia
 - 7.1. Cladogramas
 - 7.2. Árboles de distancia
 - 7.3. Programas para el análisis de datos

8. Polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción (RFLPs)
 - 8.1. Procedimiento para preparación de los RFLPs
 - 8.1.1. Productos necesarios
 - 8.1.2. Protocolo para RFLP
 9. Amplificación al azar utilizando *primers* de selección arbitraria (RAPDs)
 - 9.1. Proceso para la preparación de RAPDs
 - 9.1.1. Esquema y recomendaciones para RAPDs
 - 9.1.2. Protocolo para RAPDs
 - 9.1.3. Programación del termociclador
 - 9.2. Problemas en los RAPDs
- Agradecimientos
Bibliografía
Anexo

INTRODUCCIÓN

Los estudios moleculares en líquenes se iniciaron con un relativo retraso, si se compara con otros grupos biológicos. Los primeros trabajos que se refieren al análisis de ácidos nucleicos fueron los de BLUM y KASHEVAROV (1986, 1992) que estimaban las diferencias genéticas totales entre *Lasallia* y *Umbilicaria* usando técnicas de hibridación DNA-DNA (ácido desoxirribonucleico). Otro trabajo pionero fue el de ARMALEO y CLERC (1991) que abordó el problema de los fotosimbiontes o fotomorfos (casos en que el mismo micobionte produce talos con diferente morfología según el fotobionte). Sin embargo, los estudios moleculares se generalizan en éste, como en otros grupos biológicos, a partir del uso de las técnicas basadas en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La realización *in vitro* de la PCR (MULLIS y FALOONA, 1987), es un progreso tecnológico clave que le vale el Premio Nobel a Kary Mullis en 1993. Este avance pudo llevarse a cabo porque, unos años antes, se descubrió una bacteria, *Thermus aquaticus*, que vive en aguas termales (60° a 80° C) a partir de la cual se aisló la polimerasa termorresistente, en la que se basa todo el proceso. La PCR se puede realizar de forma rutinaria en cualquier laboratorio y por investigadores y técnicos que provengan de campos científicos relativamente distantes. En liquenología se inicia esta línea de investigación de una forma continua y expansiva a partir de los trabajos de DEPRIEST (DEPRIEST y BEEN, 1992; DEPRIEST, 1993). En ellos se pone de manifiesto la sorprendente frecuencia de intrones en el DNA ribosómico nuclear de los líquenes. Casi simultáneamente, otros autores (WHITE *et al.*, 1990; GARDES y BRUNS, 1995; GARGAS y TAYLOR, 1992; GARGAS y DEPRIEST, 1996) facilitan iniciadores (en inglés *primers*, que es el término que utilizaremos en adelante) de secuencias específicas que, como se explicará luego, permiten paliar el problema de la multiplicidad genómica de los líquenes. A partir de 1995, con la demostración mediante el análisis molecular del origen polifilético de los líquenes (GARGAS *et al.*, 1995), estos estu-

dios adquieren relevancia y comienzan a despertar el interés general. Progresos y puntos críticos han sido abordados en una reciente revisión (CRESPO *et al.*, 1998).

El estudio molecular en los análisis de biodiversidad interesan actualmente porque permite abordar las relaciones evolutivas a través de la reconstrucción de filogenias y resolver, tanto problemas taxonómicos y de identificación individual, como ecológicos y biogeográficos. Estos objetivos afectan tanto a los líquenes como a cualquier otro grupo de organismos. En el caso de los líquenes se añade un aspecto que es especialmente estimulante. La biología molecular de estos organismos permite indagar en uno de los paradigmas de las ciencias evolutivas, la simbiosis. Quizá ciertas características del genoma de los líquenes, en principio sorprendentes, como son la elevada presencia de intrones en el DNA ribosómico (rDNA) y las características de muchos de estos intrones, ayuden a componer el rompecabezas del por qué, cómo y cuándo de una de las más espectaculares simbiosis de la naturaleza.

El propósito de este artículo es de carácter práctico. Se pretende ayudar a quienes se acercan por primera vez al estudio molecular de los líquenes, a familiarizarse con las técnicas y protocolos básicos. Se describen los procedimientos y métodos de forma detallada; se contemplan procesos sencillos, como la preparación del material y se discuten algunos protocolos de extracción de DNA que han resultado útiles para el estudio de numerosos líquenes. Asimismo, se explica esquemáticamente la técnica de la PCR y se facilitan los parámetros que han resultado más adecuados para la amplificación del DNA de los hongos liquenizados. También se describe el proceso de secuenciación y algunos de los procedimientos más habituales para el análisis de datos. Se tratará de ofrecer una información sencilla, más próxima a la de un manual de laboratorio que a la de una revisión crítica, aunque ambas componentes estarán presentes. Los contenidos expuestos están basados en la experiencia y se ha procurado abordar los problemas más frecuentes o más característicos que se presentan en los líquenes como material de análisis. La información aquí incluida, con las adaptaciones convenientes, puede usarse para hongos no liquenizados, e incluso para cualquier otro grupo de eucariotas.

1. Características generales del análisis molecular de los líquenes

Cuando se realiza una extracción de DNA a partir de una porción de un talo liquénico se pueden obtener, como mínimo, cinco genomas; los nucleares y mitocondriales del micobionte y del fotobionte, y el genoma plastidial del fotobionte. A éstos, pueden añadirse genomas procedentes de otro hongo o líquen parásito entre las células de la muestra o bien de xenobacterias asociadas a la simbiosis. Además, en el caso de los líquenes, como en otros muchos hongos, el concepto de individuo es difícil de precisar (HAWKSWORTH *et al.*, 1995). Nada permite descartar que un talo provenga de la germinación de más de una espora (o propágulo) y por lo tanto las posibilidades de hallar un solo genoma fúngico nuclear o mitocondrial son relativas. Estas circunstancias imponen ciertas limitaciones en el plantea-

miento experimental y deben ser tenidas en cuenta en la interpretación de algunos resultados y problemas ocasionales que pueden presentarse.

Como es bien sabido, aunque los componentes de la simbiosis pueden cultivarse en condiciones libres (aposimbióticas), el sistema no es demasiado práctico para el trabajo experimental, sobre todo por su lentitud (se tardan meses en obtener muestras visibles de cultivos monospóricos). No obstante, es conveniente tener acceso a material axénico o a las técnicas básicas de cultivo de manera que puedan ser utilizadas, al menos, como apoyo o contraste de ciertos datos importantes.

Afortunadamente ya no se parte de cero en el conocimiento molecular de los hongos. Así, hoy se puede saber, comparando informaciones de libre uso en los Bancos de Genes, si la secuencia que se ha obtenido a partir de un trozo de talo, corresponde o no a un hongo e incluso si es un hongo próximo a lo que cabría esperar. Con cierta frecuencia, el análisis revela que se han obtenido productos múltiples y, en tal caso, deben ser aislados para su estudio posterior.

2. Materiales de partida

Se puede extraer DNA a partir de muestras de herbario que no hayan sido tratadas en ningún momento con insecticidas o pesticidas de cualquier tipo. Con algunos protocolos experimentales (CUBERO *et al.*, 1998) se llega a obtener razonables rendimientos, incluso a partir de muestras muy antiguas. No obstante, cuando se utiliza material de herbario, u otros materiales conservados, con frecuencia se aísla un DNA que no amplifica por la PCR. Es posible que esto sea debido a la modificación y degradación de los ácidos nucleicos y/o a la acumulación de inhibidores enzimáticos durante el almacenamiento y la muerte del talo (DOYLE & DICKSON, 1987; SAVOLAINEN *et al.*, 1995; HÖSS *et al.*, 1996). Los rendimientos óptimos para extraer DNA se obtienen a partir de materiales frescos, recién desecados. Pueden considerarse materiales frescos los recolectados en los dos o hasta tres años anteriores a su uso. También resultan muy adecuados los materiales recolectados en cualquier momento pero que fueron congelados inmediatamente o al cabo de unos días a -20°C .

La recolección de muestras, debe realizarse como para cualquier otro uso científico; para hacer una extracción de DNA, son suficientes cantidades muy pequeñas de material, pero es mejor disponer de una muestra generosa, no sólo por si hay que repetir la extracción, sino también, porque es necesario guardar la muestra con la que se ha trabajado en un herbario consultable por cualquier científico. Además, para la gran mayoría de los experimentos, se requiere disponer de, al menos, dos talos independientes, recogidos en la misma localidad. Es posible utilizar cualquier tipo de material, incluyendo talos pequeños o muy incrustados en el sustrato. Asimismo, la recolección habrá de hacerse de tal forma que sea factible la identificación del taxón basada en los caracteres morfológicos y químicos. Es recomendable utilizar, salvo excepciones, ejemplares aparentemente jóvenes y de ta-

maños similares. La deshidratación de las muestras se realizará como para herbario, evitando el secado mediante aire caliente. Además, si la extracción se va a realizar en unos pocos meses, las muestras pueden ser manipuladas y tratadas igual que para herbario. Si la extracción se va a realizar transcurrido un periodo más largo, es recomendable, aunque no imprescindible, congelar en nitrógeno líquido o a -20°C .

3. Aislamiento o extracción del DNA

El aislamiento o extracción de los ácidos nucleicos es el primer paso en cualquier experimento basado en el análisis del DNA o RNA. Se puede llevar a cabo con equipamientos de laboratorio mínimos, y siguiendo protocolos sencillos. Los diferentes protocolos suelen tener una amplia base común pero difieren en ciertos pasos críticos que afectan a la cantidad, calidad o pureza del producto resultante. Los puntos más importantes a considerar, cuando se elige entre protocolos alternativos, son los relacionados con el tipo y cantidad del ácido nucleico que se necesita para el análisis concreto, la cantidad de muestra disponible y el tipo y cantidad presumible de componentes celulares que deban ser eliminados durante el proceso de aislamiento y/o purificación. Otro punto a considerar es el rendimiento en relación con el tiempo necesario para realizar la purificación.

Cuando se parte de ácidos nucleicos procedentes de líquenes, hay que enfrentarse con algunos problemas específicos ya aludidos. La complicación debida a la multiplicidad de genomas existente en el talo se puede resolver por distintos procedimientos. Se puede recurrir al cultivo por separado de foto y micobionte o a realizar la extracción a partir de algún tejido u órgano líquénico estrictamente fúngico. También se soslaya este problema mediante ciertas herramientas moleculares (se explicarán más adelante al hablar de la PCR y la selección de *primers* específicos de hongo). Un inconveniente adicional cuando se pretende obtener DNA a partir del talo líquénico, es la persistencia de componentes celulares después de la extracción; los líquenes producen compuestos fenólicos que, en el desarrollo de los procesos experimentales, inhiben la catálisis proteica (inhibiendo por tanto a las polimerasas). Además contienen grandes cantidades de polisacáridos los cuales, a altas concentraciones, inhiben también, la actividad enzimática. El principal problema para la eliminación de polisacáridos consiste en que éstos precipitan junto con los ácidos nucleicos cuando el proceso se lleva a cabo en alcohol, que es precisamente la forma más común de realizar la precipitación final del DNA en los protocolos de extracción.

Se han publicado varios protocolos para la extracción de DNA de hongos liquenzados. Algunos de ellos son protocolos generales diseñados para hongos (LEE y TAYLOR, 1990), mientras que otros son protocolos modificados, que incluyen pasos adicionales para asegurar la eliminación de polisacáridos o de compuestos fenólicos. Los más específicos para eliminar polisacáridos incluyen puri-

ficaciones mediante resinas o columnas cromatográficas (ARMALEO y CLERC, 1991) o mediante bromuros de amonio (ARMALEO y CLERC, 1995; CRESPO *et al.*, 1997; CUBERO *et al.*, 1999). Se han descrito también protocolos para casos particulares como el de GRUBE *et al.* (1995) donde se utiliza SiO₂ para obtener el DNA a partir de pequeños apotecios lecideoides y el de MURTAGH *et al.* (1999) para amplificaciones con *primers* arbitrarios (RAPDs).

Existen también protocolos que venden las casas comerciales, suministrados como *kits*, que permiten obtener rendimientos adecuados. El inconveniente que presentan es que resultan siempre mucho más caros que los desarrollados en el laboratorio; otra desventaja es que en un *kit*, el usuario desconoce la composición de cada producto, con lo cual, no se pueden realizar pequeños ajustes para optimizar los resultados. No obstante, la utilización de un *kit* comercial para extracción, puede ser muy recomendable en casos particulares y, sobre todo, cuando ha sido diseñado específicamente para el tipo de material con el que se está trabajando. No se sabe que esté a la venta ningún protocolo comercial expresamente indicado para líquenes.

En general, los protocolos con precipitación alcohólica o los comerciales que usan columnas de precipitación, son los más cortos y fáciles de desarrollar, y permiten obtener DNA con un grado de pureza suficiente para la mayoría de los análisis moleculares, como PCR y restricción enzimática de fragmentos polimórficos (RFLP). Sin embargo, ambos tipos eliminan menos polisacáridos y en algunos casos, debido a éstas u otras impurezas, no se tiene la garantía de que el DNA obtenido mantenga, por tiempo indefinido, las condiciones requeridas para permitir la amplificación. A veces el DNA así obtenido, tras unas semanas de almacenamiento deja de ser amplificable.

3.1. Proceso de la extracción de DNA basado en CTAB

Este protocolo (CUBERO *et al.*, 1999), que se describirá con detalle, está basado en el de ROGERS y BENDICH (1994) y es relativamente similar al publicado para líquenes por ARMALEO y CLERC (1995). Se basa en la capacidad del cetil-trimetil bromuro de amonio (CTAB) para precipitar el DNA evitando las coprecipitaciones con polisacáridos y en la de la polivinil polipirrolidona (PVPP) para eliminar compuestos polifenólicos. Este protocolo ha sido utilizado con éxito para obtener DNA amplificable por PCR a partir de diferentes tipos de material líquénico, como lóbulos talinos, rizinas, apotecios, lirelas, cordón condroide de *Usnea*, disecciones de médula y cultivos fúngicos axénicos. Puede ser desarrollado en un día y, el DNA así obtenido, conservado a -20 °C, se mantiene viable al cabo de tres años, incluso si la muestra ha sido ocasionalmente descongelada.

3.1.1. Esquema del proceso

El protocolo comprende cuatro puntos principales:

1. Disrupción de células y tejidos. Los tejidos y las células se rompen por acción mecánica y las membranas celulares son disueltas bajo condiciones de desnaturalización de proteínas (bajas temperaturas y presencia de detergentes) con el fin de inhibir las nucleasas existentes.

2. Extracción con cloroformo-isoamilalcohol. Este proceso se lleva a cabo lavando dos veces y tiene por objeto eliminar proteínas y compuestos orgánicos.

3. Precipitación no alcohólica en CTAB. Tiene por objeto eliminar la mayoría de los polisacáridos.

4. Precipitación en alcohol. Tiene por objeto precipitar el DNA en forma sólida para que pueda ser disuelto en agua o tampón, solución que ya puede ser almacenada.

3.1.2. Productos y soluciones necesarios

Se parte de los siguientes productos (los marcados con un * deben ser previamente esterilizados):

- 1 M Tris/HCl* pH 8,0.
- 0,5 M EDTA* pH 8,0 (el pH se ajusta con NaOH).
- 4 M NaCl*.
- 4% CTAB (peso/volumen en agua destilada estéril).

Para realizar la extracción se requieren las siguientes soluciones (las marcadas con un * deben ser previamente esterilizadas):

- Tampón de lisis* (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 30 mM EDTA, 1 M NaCl, 1% p/v CTAB).
- Tampón de precipitación* (40 mM NaCl, 0,5% p/v CTAB).
- Tampón TE modificado* (1 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA).
- Cl (cloroformo-isoamilalcohol 24:1).
- Isopropanol.
- Etanol 70%.

3.1.3. Protocolo de extracción de DNA basado en CTAB

1. Para la preparación de las muestras de talo completo, se recomienda un lavado previo, a presión, colocando el ejemplar en un colador fino bajo el chorro de agua. Una vez seca la muestra, con la ayuda de pinzas de disección, se aísla, a la lupa binocular, la porción de tejido del que se va a partir (entre 5 y 50 mg) limpia y carente de impurezas u organismos ajenos visibles; se deposita en tubos de ensayo de tipo eppendorf de 1,5 ml.

En el caso de muestras de cultivos axénicos del micobionte, los micelios de 1-2 mm de diámetro, deben ser cuidadosamente limpiados bajo la lupa, a fin de eli-

minar restos de agar que podrían interferir durante el proceso de extracción. A continuación, los cultivos se liofilizan para favorecer la rotura de las paredes celulares. Se depositan igualmente en eppendorf de 1,5 ml.

2. Triturado del material. Puede recurrirse a varios sistemas para triturar el material lo más finamente posible. Conviene señalar que este es uno de los pasos críticos de la extracción. Además de paredes celulares gruesas y resistentes, los líquenes, como muchos otros hongos, pueden presentar tejidos muy compactos; unas y otros tienen que ser rotos para liberar el contenido del interior de las células y orgánulos.

Puede triturarse la muestra añadiendo al eppendorf, como abrasivo, 5-10 mg de carburo, y 100 μ l del tampón de lisis (CTAB), usando el tubo como mortero y como mano una varilla de vidrio. Este sistema es lento y precisa tomarse el tiempo adecuado hasta homogeneizar perfectamente la muestra.

El procedimiento más eficaz es utilizar nitrógeno líquido. La técnica del congelado y triturado con nitrógeno líquido se va optimizando con la práctica y de acuerdo con cada tipo de muestra. A continuación se describe con detalle dicho procedimiento:

Los tubos eppendorf, bien cerrados, con 5-50-(100) mg de cada muestra seca se sumergen en un recipiente con nitrógeno líquido. En el mismo recipiente se habrá *sumergido varillas de vidrio de forma especial (un extremo deberá encajar, con holgura, en el fondo del eppendorf)* que se usarán como mano. Cuando los tejidos contenidos en los tubos estén completamente congelados (2 min es suficiente) se extrae un tubo del recipiente, se coloca en una gradilla de material aislante y se añade nitrógeno líquido hasta aproximadamente la mitad del tubo. El material aislante de la gradilla así como el minimizar el contacto con la superficie de los dedos, facilita que se mantenga la baja temperatura del eppendorf. Esto es importante para evitar que el nitrógeno burbujee al añadirlo y haga saltar parte del material. Mediante la varilla de vidrio se procede a triturar la muestra, procurando hacerlo contra las paredes del tubo y no aplastando hacia el fondo. La muestra tiene que quedar totalmente pulverizada. Si no es así, debe enfriarse de nuevo el tubo, sin sacar la varilla para no perder material, y añadir nuevamente una pequeña cantidad de nitrógeno. Para esta adición de nitrógeno, el tubo debe estar lo más frío posible porque el material triturado es aún más fácil que salte y se pierda. Una vez triturada la muestra, se introduce en hielo hasta que haya concluido la operación con todos los tubos.

3. Incubación. Se añade 400 μ l del tampón de lisis CTAB a cada tubo y se agitan ligeramente golpeándolos con los dedos hasta que todo el polvo esté resuspendido. Se añade 1% p/v de PVPP a cada tubo. La solubilidad de esta sustancia es baja, razón por la cual no se adiciona directamente al tampón. Cuando se adquiere cierta experiencia, la cantidad de PVPP (unos 4 mg) se puede añadir de forma aproximada. Luego, todos los tubos se llevan al baño a 60-70°C durante 1 hora. En una o dos ocasiones, a lo largo del tiempo de incubación, los tubos deben ser agitados, invirtiéndolos suavemente varias veces seguidas.

4. Primera purificación en cloroformo-isoamilalcohol. Después de la incubación, se añade 500 μ l de CI a cada tubo y se mezcla agitando vigorosamente. A

continuación se centrifuga a 10.000 g durante 5 min, a temperatura ambiente. Se observarán dos fases líquidas abundantes y una interfase oscura, de consistencia semisólida. El CI arrastra a la interfase los desechos celulares y la mayoría de las proteínas. El PVPP, con algunos compuestos polifenólicos ligados, también se concentran en la interfase. Los restantes compuestos polifenólicos se disuelven en la fase CI (basal) mientras que los ácidos nucleicos quedan en la fase superior.

Con cuidado para no mezclar las fases ni rozar la interfase con la punta de la micropipeta, transferir la fase líquida superior a un nuevo tubo y medirla (hacer, por ejemplo, 3 sucesivas succiones de 100 µl y un resto estimable de 25 a 50 µl).

5. Precipitación en CTAB. Se añade dos volúmenes del tampón CTAB de precipitación para disminuir la concentración de NaCl contenida en el tampón de lisis. Mezclar activamente y luego centrifugar a 10.000 g durante 5 min a temperatura ambiente. Entonces el CTAB precipitará con el DNA ligado. Tras esta centrifugación, debería poder observarse adherido en un lateral del fondo del tubo, un pequeño residuo (precipitado o *pellet*) blanquecino que es el complejo CTAB-DNA. Si no se observa, volver a centrifugar. Si se está trabajando con pequeñas cantidades de material, es conveniente que antes de la centrifugación se coloquen los tubos en frío (nevera a 4 °C) durante 5 min como mínimo, para facilitar la formación de los complejos CTAB-DNA.

A continuación, se elimina la fase acuosa, evitando desprender el *pellet* y luego se resuspende el residuo en 400 µl de solución 1,2 M de NaCl precalentada a 37 °C. Por regla general, el *pellet* se disuelve con facilidad, pero si esto no ocurre, los tubos se colocan en un baño a 50 °C, hasta lograr su disolución.

6. Segunda purificación en cloroformo-isoamilalcohol. Añadir 500 µl de CI y proceder como en el paso 4.

7. Precipitación en alcohol. Añadir 0,6 volúmenes de isopropanol (es decir, 180 µl si se han recuperado 300 µl de la fase superior) y centrifugar a 13.000 g durante 15 min a 4 °C. El *pellet* obtenido, si es visible, es blanco o prácticamente transparente en su estado óptimo, pero puede resultar más o menos opaco o coloreado según la cantidad de impurezas que contenga.

8. Lavado final. Eliminar la fase líquida, sin perder el *pellet*, y añadir 500 µl de etanol al 70 % para lavar el exceso de sal. Agitar manualmente y luego centrifugar durante 3 min a 13.000 g a 4 °C para precipitar de nuevo. Esta vez el *pellet* debe quedar totalmente seco, para lo cual primero se pueden eliminar las gotas que queden en el tubo con la micropipeta y luego los tubos abiertos se pueden colocar en estufa a 50 °C unos 15 min o hasta que se aprecie que no hay restos de humedad en el eppendorf. Luego se resuspende el residuo en 50 µl del tampón TE modificado, previamente calentado a 37 °C.

9. Cuantificación. La cantidad de DNA obtenido se estima por electroforesis en un gel 0,5-0,8 % de agarosa, comparando con diluciones conocidas de un marcador comercial. Los geles de agarosa se preparan utilizando un intercalante fluorescente (véase en *Visualización del producto de la PCR*) como el bromuro de etidio que nos permitirá visualizar la banda (la preparación de dichos geles se indicará posteriormente). La fluorescencia de la banda es proporcional al contenido

de DNA, de tal forma que, conocida la concentración de la banda patrón, se puede estimar la de la banda problema. La electroforesis también dará información sobre la pureza del DNA. Si tiene un alto grado de pureza, la banda se observará nítida. La fluorescencia en los pocillos o la residual a lo largo de la «calle», así como la deformación de las bandas, indica la presencia de proteínas contaminantes. El exceso de sales provoca bandas con puntos más intensos. La degradación del DNA produce rastros fluorescentes en lugar de bandas aisladas y claras. Si hay RNA aparecerá como una banda o huella en la parte terminal del gel.

Este método de extracción puede completarse en cinco horas. Puede interrumpirse a conveniencia en los pasos 5, 7 y 9. Si se necesita optimizar los rendimientos se puede prolongar la precipitación de los pasos 5 y 7 a lo largo de toda la noche.

Con este método se obtiene una cantidad aceptable de DNA con un grado de pureza suficiente para la mayoría de los usos moleculares y, particularmente, para la PCR. Las cantidades de RNA, DNA mitocondrial y plásmidos que se obtienen son inferiores a las que se logran con otros protocolos (que no incluyen precipitaciones no alcohólicas como las de CTAB) pero consigue eliminar impurezas que podrían, por ejemplo, inhibir la amplificación por la PCR.

3.2. *Problemas en la extracción de DNA*

A continuación se describen algunos de los problemas más frecuentes en la puesta a punto de estas técnicas sugiriendo algunas causas de los mismos y ofreciendo posibles soluciones alternativas.

- ¿Qué hacer si se ha obtenido menos DNA del esperado? En este caso, la causa más probable es la deficiente trituración de la muestra. Quizá no se ha pulverizado perfectamente la muestra por lo que las paredes no se han roto y los ácidos nucleicos no se han liberado. Se sugiere repetir la extracción añadiendo unos mg de carborundo a la muestra antes de verter el nitrógeno. Una posibilidad adicional para incrementar rendimientos es centrifugar más intensamente o por más tiempo. También puede resultar eficaz usar, en el paso 7, el isopropanol muy frío y mantener los tubos, una vez añadido el isopropanol, toda la noche en el congelador a -20°C . Como último recurso inténtese un protocolo sin CTAB (esta opción solo funcionará excepcionalmente debido a la presencia habitual de polisacáridos abundantes en líquenes).
- ¿Qué hacer si no se ha obtenido DNA en absoluto? Lo más probable es que se haya perdido el precipitado que lo contenía (pasos 5, 7 u 8). En sucesivas extracciones, eliminar el líquido más cuidadosamente.
- ¿Qué hacer si la solución final se observa coloreada? Esto probablemente significa que han quedado algunos polifenoles. Es posible que no tenga importancia dado que pequeñas cantidades de polifenoles pueden no afectar

para los usos posteriores. Sin embargo, para eliminarlos, en los pasos 4 y 6, después de añadir el CI, calentar los tubos durante 2 min a 50 °C (es preciso sellar los tubos con parafilm de forma que las tapas no se abran por la presión expansiva del vapor y tomar precauciones, tales como usar mascarilla, para evitar inhalar los vapores de cloroformo). Como alternativa, las muestras pueden lavarse en acetona antes de iniciarse el proceso de extracción del DNA.

- ¿Qué hacer cuando se sabe o se sospecha, que la muestra puede tener demasiados polisacáridos? De ser así, se habrá obtenido un residuo blanco y gelatinoso después del paso 8, que es difícil de resuspender. Para evitarlo, centrifugar a menor velocidad en el paso 5 (hay que ser consciente de que con ello se disminuye el rendimiento de DNA obtenido). También puede hacerse una segunda precipitación con CTAB: en el paso 5 resuspender en 0,5 ml del tampón CTAB de lisis (a 60-70 °C) en lugar de NaCl y continuar desde el paso 4.
- ¿Qué hacer cuando el DNA aparece degradado? Trabajando con cultivos o con talos frescos no hay razón para que esto ocurra. En cualquier caso, como medida precautoria, no secar los ejemplares con aire caliente. Si no se ha hecho tal cosa, comprobar que los tampones están en buen estado (principalmente, verificar el pH).
- ¿Qué hacer si después de tener un DNA aparentemente satisfactorio, no funciona, por ejemplo para PCR o para RFLP? Buscar posibles errores en la preparación o en el programa de PCR (cambiar las condiciones de la PCR, revisar los *primers*), cerciorarse de que los enzimas de restricción están en buen estado, etc. Por último intentarlo con otro protocolo o purificar la solución de DNA (ver más adelante).

3.3. Almacenaje del DNA aislado

El DNA extraído (stock) se debe almacenar a -20 °C. Es recomendable diluir la muestra, si la concentración lo permite, y hacer varias alícuotas para evitar la generalización de una posible contaminación y la congelación-descongelación excesiva del DNA, que favorece su degradación.

Si el DNA se va a utilizar a corto plazo, se almacena a 4 °C, para evitar que sufra daños tras sucesivas congelaciones y descongelaciones.

Es de la mayor importancia el riguroso etiquetado de los tubos y la referencia del pliego de herbario, que necesariamente ha de guardarse para futuras consultas.

4. Aislamiento de RNA

La mayoría de los protocolos diseñados para obtener DNA también funcionan para RNA total. Sin embargo el RNA tiende a degradarse durante el proceso de ex-

tracción o durante el almacenamiento, debido a los RNAasas liberados durante la lisis celular o que están simplemente contaminando los útiles y aparatos de laboratorio. Así pues, para obtener RNA ha de prestarse especial cuidado a la esterilización de los equipos y además se deben usar inhibidores de los RNAasas durante el proceso de extracción y almacenamiento. No obstante, el RNA también puede ser aislado de forma exclusiva (sin DNA). Hay también protocolos para separar o visualizar los diferentes tipos de RNA pero quedan fuera de los objetivos de este artículo (para algunos protocolos generales y orientaciones, véase SAMBROOK et al., 1989).

5. Amplificación de DNA por la PCR

Una vez que se dispone de DNA, puede ya abordarse su análisis. El tipo de análisis a realizar se elige según los objetivos o el diseño metodológico adecuado a cada problema. Como hemos dicho, el instrumento que ha permitido que los investigadores del campo de las ciencias biosistemáticas hayan podido incorporar las técnicas moleculares a sus planteamientos científicos, ha sido el desarrollo de la PCR. Esta técnica se ha simplificado extraordinariamente y no requiere un instrumental complejo ni caro. Dentro de pocos años, la PCR será una herramienta tan indispensable en los laboratorios de sistemática, como hoy la observación microscópica.

En la PCR se basan varios métodos de identificación o marcaje molecular. Muchos de ellos funcionan amplificando segmentos de DNA anónimos, mientras que otros se fundamentan en la amplificación de segmentos de DNA conocidos o, mejor dicho, cuya posición en el genoma está bien conocida.

La clave de la amplificación está en decidir qué segmento se desea amplificar (segmento diana) y ello estará en función del problema que se desea resolver.

Para poder estudiar segmentos de DNA, se hace necesario obtener una cantidad elevada de copias de ese segmento, es decir, amplificar la diana hasta tener una masa crítica que permita su manipulación para los usos y aplicaciones precisas. La PCR es una técnica que permite, mediante un protocolo y un instrumental sencillo, obtener un segmento específico de DNA en un número de copias suficientemente grande. Cada copia obtenida actúa, en cada ciclo de amplificación, como un nuevo molde (*template*) del que se obtendrá una nueva copia.

5.1. *Proceso de preparación de la PCR*

El proceso de la PCR se basa en hibridar pequeñas secuencias (15-25 nucleótidos), a los flancos del segmento diana. Ellos actuarán como iniciadores o *primers* de la reacción. El enzima que cataliza el proceso es la polimerasa. Para que la reacción tenga lugar se precisan desoxinucleótidos (dNTPs), tampón, un cofactor y agua ultrapura. La reacción se efectúa en un aparato llamado termociclador en el

cual, se realizan, de forma programada, una serie de ciclos a diferentes temperaturas. Existen en el mercado muchas marcas comerciales que ofrecen tanto termocicladores como los productos para la reacción.

5.1.1. Esquema y desarrollo del proceso

1. La reacción comienza con una primera fase de 5 min a 94 °C que asegura la desnaturalización (escisión de dos cadenas) de todo el DNA genómico.

2. Una etapa con una duración de uno a varios minutos a 94-96 °C durante la cual se asegura que la doble hélice del DNA se desnaturaliza.

3. Otra etapa con una duración de uno a varios minutos, a 50-65 °C, durante la cual los *primers* se hibridan, a través de los puentes de hidrógeno, con sus secuencias complementarias, a cada lado de la región diana, y en cadenas separadas (en inglés, a esta fase se le llama de *annealing*). Para decidir la temperatura de hibridación, se toma inicialmente unos 5 °C por debajo de la temperatura de fusión (*melting*) de los *primers*. La temperatura de fusión varía de acuerdo con el porcentaje de G+C de la secuencia del *primer*. Para calcularla se suman 4 °C por cada G ó C y 2 °C por cada A ó T. Por ejemplo, en un *primer* denominado ITS1F, cuya secuencia es 5' CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA 3', la temperatura de fusión sería 60 °C. Por tanto, la temperatura de hibridación adecuada podría estar entre 54 °C y 56 °C.

4. Fase de extensión. Se mantiene uno a varios minutos a 72 °C, (temperatura óptima de polimerización), durante la cual la polimerasa, usando como iniciador la secuencia de cada *primer*, va incorporando nucleótidos complementarios a la cadena del fragmento diana y así va construyendo la nueva cadena de DNA.

5. A partir de aquí se inicia un nuevo ciclo. El retorno al paso 2 se traduce en una nueva separación de las cadenas de la doble hélice. Los productos resultantes actuarán como nuevos moldes en el próximo ciclo de reacción. De esta forma, el número de cadenas de DNA copiadas aumenta de forma exponencial. Los pasos 2 al 5 se repiten un número de veces conveniente que suele oscilar entre 25 y 40 ciclos.

6. El sistema se mantiene durante 5 min a 72 °C para garantizar que el amplificado se termine de elongar.

7. Por último se instaura una fase de refrigeración, para inhibir la actuación de la polimerasa.

El número óptimo de ciclos depende principalmente de la concentración inicial de DNA pero también de otros factores (calidad y pureza del DNA). Este es uno de los parámetros susceptible de ser ligeramente variado para optimizar los resultados de la reacción, por ello, cuando se trabaja con un tipo nuevo de muestras, es importante estimar este número, por prueba y error.

Si los *primers*, que típicamente tienen no más de unos 25 nucleótidos, poseen una secuencia presente sólo en hongos (Tabla 1) y no en algas (ni cianobacterias) las co-

Tabla 1
Primers específicos para la amplificación de ITS del micobionte líquénico

<i>ITS nrDNA región</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Autores</i>
NSRI744-5' (ITS5-5')	GGAAG TAAAA GTCGT AACAA GG	White <i>et al.</i> , 1990
NSRI769-5' (ITS1-5')	TCCGT AGGTG AACCT GCGG	White <i>et al.</i> , 1990
ITS2-3'	GCTGC GTTCT TCATC GATGC	White <i>et al.</i> , 1990
ITS3-5'	GCATC GATGA AGAAC GCAGC	White <i>et al.</i> , 1990
ITS4-3'	TCCTC CGCTT ATTGA TATGC	White <i>et al.</i> , 1990
ITS1F-5'	CTTGG TCATT TAGAG GAAGT AA	Gardes & Bruns, 1993
SR6R-5'	AAGTA (G/A)GTCG TAACA AGG	DePriest, 1993
LR1-3'	GGTTG GTTTC TTTTC CT	Vilgalys & Hester, 1990

pias que se obtendrán pertenecerán exclusivamente al DNA del micobionte. Así pues, en el estudio molecular que parta de talos líquénicos completos, no cualquier *primer* puede ser eficientemente utilizado sino que es preciso restringirse a aquellos que resulten específicos, entre los disponibles en publicaciones y bancos de datos, o bien diseñar nuevos *primers* adecuados.

5.1.2. Segmentos de DNA utilizados en los estudios sobre líquenes

Los estudios liquenológicos existentes, basados en la biología molecular, parten casi todos, del análisis de los genes nucleares del rDNA del micobionte. Este gen (Fig. 1) tiene muchas ventajas y, en los últimos años, su uso se está imponiendo también en plantas, algas y hongos. Los genes de rDNA están constituidos por tres subunidades alineadas formando un grupo (*cluster*). Entre las ventajas del rDNA como base de análisis se pueden señalar las siguientes (BALDWIN *et al.*, 1995):

1. Se trata de un *cluster* que se repite cientos y miles de veces en cada célula, lo cual facilita el proceso de amplificación; dado que la PCR es un proceso competitivo, una alta presencia de los segmentos diana, favorece su localización por parte de los *primers*.

2. El *cluster* se compone de varias unidades (Fig. 1), funcionalmente distintas, cuya variabilidad (frecuencia de mutación) es diferente, lo que resulta ventajoso en otros aspectos concretos; la subunidad llamada 5.8S es la más conservada, le sigue en variabilidad la subunidad larga (LSU), a continuación la subunidad corta (SSU), después los espaciadores intragénicos (ITS1 e ITS2) y por fin los espaciadores intergénicos (IGS) que son los más variables. Si no hubiera en el *cluster* zonas con-

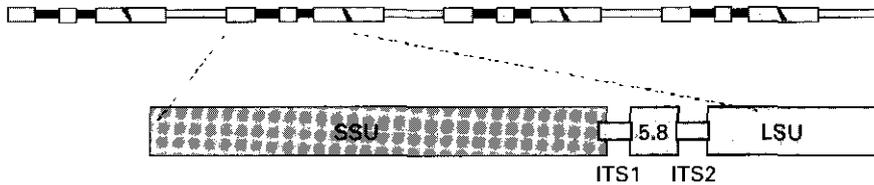


Figura 1.—Estructura del rDNA nuclear. Se observa aumentadas las subunidades (subunidad corta (SSU), subunidad 5.8 (5.8S) y subunidad larga LSU)) y los espaciadores internos (ITS). Entre cada tres subunidades se intercalan los IGS.

servadas (poco variables) sería prácticamente imposible comparar dos secuencias (alinear) o diseñar un *primer*. Por ejemplo, para amplificar el ITS1, basta con diseñar dos *primers* cuya secuencia sea complementaria a la de ambos flancos de esta diana. Tales flancos se corresponderán, uno con el extremo de la SSU, y el otro con el de la 5,8S que, en los dos casos, son zonas poco variables por lo que pueden ser identificadas fácilmente.

3. Dado que este *cluster* es el más estudiado para análisis de biodiversidad, en los bancos de datos hay cada vez más secuencias disponibles para comparaciones y esto facilita enormemente el trabajo y el avance en el conocimiento comparado de los grupos de organismos y de su filogenia.

5.1.3. Reactivos necesarios

Se requieren los siguientes reactivos además del DNA total de cada muestra:

- Polimerasa.
- Tampón apropiado para esa polimerasa.
- $MgCl_2$.
- *Primers*.
- Desoxinucleótidos (dNTPs).
- H_2O ultrapura.

5.1.4. Protocolo de la PCR

La preparación de la reacción debe hacerse, si es posible, en el interior de una cámara de flujo laminar con objeto de impedir posibles contaminaciones y, en cualquier caso, con las máximas condiciones de limpieza y esterilidad (bata y guantes son imprescindibles). Asimismo, las micropipetas y puntas que se usen en la preparación de la PCR deben reservarse exclusivamente para ese fin. También es necesario comprobar que todo el material a utilizar (puntas, tubos eppendorf, etc.) esté absolutamente esterilizado. La posición de las pipetas, durante su uso, debe ser lo

más vertical posible y con la punta hacia abajo. Los reactivos de la mezcla, para evitar su deterioro, deben mantenerse siempre en hielo especialmente la polimerasa.

Se describe a continuación un protocolo que se ha utilizado para la amplificación de la región del rDNA que comprende los ITS en estudios de filogenia de Parmeliaceae (CRESPO & CUBERO, 1998), Physciaceae (CUBERO & CRESPO, 1996) y otras familias de hongos liquenizados. Las cantidades están calculadas para 8 muestras.

1. Se preparan diluciones de las soluciones matrices de cada reactivo. La casa comercial suministra los reactivos liofilizados o en solución a unas determinadas concentraciones, por lo que es preciso preparar los productos a la concentración necesaria para este protocolo. Las diluciones se preparan considerando la concentración de la solución matriz así como el volumen final deseado para la dilución de forma que: volumen inicial (V_i) \times concentración inicial (C_i) = Volumen final (V_f) \times Concentración final (C_f).

A continuación se detalla un ejemplo real. Una casa comercial suministra los desoxinucleótidos a 40 mM. Se quiere preparar una reacción de 50 μ l en la que la concentración final de 1,6 mM. Por tanto:

$$V_i = \frac{50 \times 1,6}{40} = 2 \mu\text{l}$$

En el caso de los *primers*, las casas comerciales suelen suministrarlos de forma liofilizada, facilitándose la cantidad en masa (en ng o nmol, etc). Para diluirlo a 100 μ M (que es una concentración adecuada para su almacenamiento), es preciso añadir la cantidad correspondiente de agua pura al stock suministrado. El desarrollo del protocolo requiere ahora preparar una alícuota a 10 μ M para lo que se realiza una dilución 1/10, añadiendo 5 μ l de *primer* en 45 μ l de H₂O.

2. Se calculan las cantidades correspondientes al volumen de reacción. Normalmente este volumen es de 25, 50 ó 100 μ l. Para 25 μ l, la cantidad a utilizar de DNA será de 4 μ l; para 50 y 100 μ l las cantidades serán 8 y 16, respectivamente. En este ejemplo se utilizará un volumen de 50 μ l.

	DNA	H ₂ O	Tampón	MgCl ₂	dNTPs	Primer 1	Primer 2	Polimerasa
Concentración inicial de alícuotas			10 x	25mM	10 mM cada uno	10 μ M	10 μ M	1 unidad/ μ l
Concentración en la reacción			1 x	2,5 mM	1,6 mM	0,5 μ M	0,5 μ M	0,025 unidades/ μ l
Volumen para 50 μ l	8 μ l	23,75 μ l	5 μ l	5 μ l	2 μ l	2,5 μ l	2,5 μ l	1,25 μ l

3. Con el fin de evitar errores, se recomienda preparar tablas donde se representen las muestras y los componentes de reacción

Muestra	DNA	dH ₂ O	Tampón	dNTPs	Primer 1	Primer 2	Polimerasa
1		23,75	10	2	2,5	2,5	1,25
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
Positivo							
Negativo							
Extra							
Extra							
Total (µl)	8	285	120	24	30	30	15

4. Se prepara la mezcla básica de reacción en un eppendorf de 1,5 ml. El cálculo de las cantidades debe hacerse para 12 muestras (8 + 4). Las 4 suplementarias serán: control positivo, el cual contiene 8 µl de DNA de *Saccharomyces* o de cualquier otro cuya amplificación haya sido probada; control negativo, que contiene 8 µl de agua pura en lugar de DNA. Los dos volúmenes suplementarios se añaden para prevenir las pérdidas debidas a imprecisiones de dosificación en el pipeteo y/o a líquido adherido en las puntas desechables.

5. Una vez calculada la mezcla de reacción, se procede de la siguiente forma:

- Se etiquetan 10 tubos eppendorf de 0,5 ml.
- Se añaden a cada tubo 8 µl de DNA de cada una de las muestras y dos gotas de aceite mineral que luego evitará evaporaciones durante el proceso. En el caso del positivo y negativo se adicionan 8 µl del control y de agua respectivamente y también el aceite.
- A continuación, en un eppendorf de 1,5 ml se añaden las cantidades correspondientes de cada uno de los reactivos, que previamente habían sido calculadas, se agita y centrifuga.
- Se añade la cantidad correspondiente de mezcla de reacción, que en este caso serán 42 µl, a cada tubo. Seguidamente se lleva a cabo un centrifugado corto (1-2 segundos) para que todos los componentes y el DNA se mezclen y el aceite quede por encima formando una capa. Todos los tubos se mantienen en hielo para evitar que la polimerasa comience a actuar.
- El termociclador se programa con los parámetros siguientes:

- 94 °C: 5 min,
- 35 ciclos: 94 °C: 30 seg; 50 °C: 30 seg; 72 °C: 1 min.
- 72 °C: 5 min.
- 4 °C: 1 min.

5.1.5. Visualización del producto de la PCR y preparación del gel de agarosa

Para observar los productos de la reacción es preciso visualizar el DNA, mediante electroforesis en un gel de agarosa. Esta observación es posible gracias a que el agente intercalante utilizado en la tinción del gel (bromuro de etidio) emite a una longitud de onda visible bajo la luz ultravioleta. Para productos de PCR se utilizan normalmente geles de agarosa al 1-1,5 %. Como tampón se usa el TAE.

En un erlenmeyer se añade el tampón y la cantidad correspondiente de agarosa, y se introduce en un microondas, durante aproximadamente 1 minuto, hasta que la agarosa se disuelva totalmente. Posteriormente se adiciona bromuro de etidio en la relación: 5 µl (0,1 mg/ml) por cada 100 ml de tampón de electroforesis. Se agita el erlenmeyer para homogeneizar. En la bandeja de electroforesis se coloca el peine adecuado al número de muestras. Cuando la temperatura de la agarosa es de unos 40 °C se vierte en la bandeja y se deja solidificar. Se coloca la bandeja dentro de la cubeta de electroforesis y se añade el tampón hasta cubrir el gel. Por último se levanta cuidadosamente el peine.

Conviene advertir que el bromuro de etidio es un producto fuertemente mutágeno por lo que su manipulación es peligrosa y ha de hacerse tomando las mayores precauciones. Asimismo, una vez que se ha añadido hay que tener el mayor cuidado en la manipulación del gel. La seguridad e higiene en la evacuación de residuos tiene que estar garantizada.

Para poder visualizar el avance de la migración del producto de PCR a través del gel durante la electroforesis, se utiliza azul de bromofenol; además de esta función el azul de bromofenol evita que el DNA flote en el tampón de la cubeta.

Se preparan 12 nuevos tubos de 0,5 ml. En 10 de ellos se disponen 5 µl del correspondiente producto de PCR y 3 µl de azul de bromofenol. En los dos restantes se cargan, también con azul de bromofenol, dos marcadores de peso molecular (en cantidad suficiente para ser visibles) que se ubicarán en la primera y última calle. De este modo se puede conocer el tamaño y la concentración de las bandas amplificadas.

Normalmente, la diferencia de potencial utilizada en la electroforesis para productos de PCR, es aproximadamente de 100V. Una vez que el DNA ha migrado lo suficiente, se lleva el gel a un transiluminador de luz ultravioleta y se visualizan y fotografían las bandas de DNA (Fig. 2).

En el caso de observar una única banda, se realiza la purificación por columna del producto, como se explicará más adelante. Si se observa más de una banda procedente del mismo pocillo se lleva a cabo un proceso de aislamiento que también se describirá más abajo.



Figura 2.—Productos de PCR correspondiente a un segmento de ADN ribosómico nuclear obtenidos utilizando los *primers* ITS1F e ITS4, a partir de ADN obtenido de distintos individuos de *Phyconia venusta*.

5.2. Problemas en la PCR

— ¿Qué hacer si no ha amplificado ningún producto? Es posible que alguno de los parámetros del programa no haya sido debidamente ajustado. Con frecuencia, las temperaturas y tiempo de desnaturalización pueden ser el problema. Otro parámetro del programa que puede ser causante de complicaciones es la temperatura de hibridación de los *primers*; para optimizar esta variable se sugiere ensayar en un pequeño margen de oscilación (hasta $\pm 5^\circ\text{C}$).

Es posible que la polimerasa se haya inactivado durante su almacenamiento, por lo cual se recomienda usar otro stock o consultar a la casa comercial.

— ¿Qué hacer si sólo ha amplificado el control positivo? Puede haberse producido cualquiera de las situaciones que, a continuación, se abordan. Se recomienda ir descartándolas en el orden que sigue:

- Lo mas probable es que el DNA extraído haya arrastrado algún contaminante (polisacáridos u otros) que actúe como inhibidor de la PCR. Se recomienda o bien repetir el lavado del DNA (desde el punto 4 del protocolo de extracción).
- Puede ocurrir, en casos raros, que la región a la que debería unirse el *primer* no sea complementaria totalmente (por ejemplo si ha sufrido una mutación). En este caso debe probarse con *primers* alternativos.

— ¿Qué hacer si, de las muestras, sólo han amplificado algunas, además del control positivo? Si la presencia de DNA está probada, cabe pensar que algunas muestras presenten contaminantes de extracción (polisacáridos u otros), en cuyo caso se recomienda lo descrito anteriormente, referente a la purificación del DNA.

Cabe también pensar en la posibilidad de que, por causa de la secuencia nucleotídica, alguno de los *primers* no haya podido hibridar con el flanco correspondiente de la diana. En tal caso hay que recurrir a otro *primer*.

Esta situación de heterogeneidad en el éxito de la amplificación es muy frecuente cuando se trabaja con líquenes. Es factible que se deba a dificultades en la hibridación de los *primers*, por la presencia muy probable de intrones opcionales. Se recomienda o bien repetir la amplificación de esas muestras o bien repetir la extracción de DNA a partir de otro especimen.

— ¿Qué hacer si ha aparecido una banda (o más) en el control negativo? En tal caso hay que pensar que ha ocurrido una contaminación con ácidos nucleicos de cualquier origen. Es muy importante localizar esa contaminación. Para ello ha de procederse ordenadamente descartando los posibles vectores: pipetas, tubos eppendorf, puntas y reactivos, especialmente el agua o/y el TE.

— ¿Qué hacer si en alguna de las calles se aprecia la presencia de más de una banda (siempre que el control negativo no presente ninguna)? Este problema es frecuente en los líquenes, sin que se tenga absolutamente claro por qué ocurre. Lo más probable es que sea debido a alguna de las causas siguientes: presencia de más de un genoma fúngico en el especimen del que se extrae la muestra, falta de especificidad en los *primers* con la posible amplificación de DNA del fotobionte y posibilidad de que se den fallos en la evolución concertada de las múltiples copias del rDNA. Para aumentar la especificidad de un segmento diana en la PCR, se puede recurrir a elevar ligera y progresivamente la temperatura de hibridación de los *primers*.

5.3. Almacenaje del producto de la PCR

Los productos de PCR se almacenan indefinidamente a -20°C , al igual que los reactivos de la reacción (polimerasa, nucleotidos, etc.) con la excepción del tampón de polimerasa que debe guardarse a 4°C en frigorífico. Los marcadores moleculares de peso molecular también se almacenan a 4°C .

5.4. Purificación por columna del producto de la PCR

Si lo que se pretende es secuenciar el DNA contenido en el producto de la PCR, debe realizarse una purificación del mismo para eliminar restos de reactivos (polimerasa, *primers*, tampón y cofactor). El proceso de purificación se realiza mediante *kits* que ofrecen las casas comerciales. Éstos utilizan columnas de purifica-

ción aproximadamente del tamaño de un eppendorf para eliminar los componentes de la mezcla tras una serie de centrifugaciones. El proceso de purificación se realiza con el siguiente protocolo (se describe el de la casa Biotools):

1. En primer lugar, se extrae todo el producto amplificado, evitando coger aceite, y se introduce en otro eppendorf, previamente rotulado, de 1,5 ml.

Se añaden 200 μ l de Solución I, se mezcla bien, pipeteando (sin vórtex), y se adicionan 10 μ l de una matriz de sílice. Se deja incubar 10 min a temperatura ambiente. El polvo de sílice se unirá a los fragmentos grandes de DNA. La Solución I crea las condiciones necesarias para la unión.

2. Se añade la mezcla a la columna y se centrifuga durante 3 min a 10.000 g. Al centrifugar, todos los componentes de la mezcla traspasan la columna y el DNA unido a la matriz de sílice queda retenido.

3. Se descarta el eluyente y se añaden 300 μ l de Solución de lavado (*Cold Wash Solution*) a cada eppendorf. Es importante resuspender bien la matriz de sílice, agitando manualmente (sin vórtex).

4. Se vuelve a centrifugar 3 min a 10.000 g y luego se elimina el eluyente.

5. Se repiten los pasos 4 y 5. Posteriormente, las columnas se colocan en tubos nuevos.

6. Se recomienda realizar una nueva centrifugación en vacío a 10.000 g. En el caso de que queden restos de solución de lavado las columnas se colocan en tubos nuevos.

7. Se añaden 20-25 μ l de agua pura precalentada a 65 °C, para disolver el DNA.

8. Se centrifuga 3 min a 10.000 g y se recoge el eluyente, en el que se encuentra el DNA.

Es recomendable llevar a cabo una nueva electroforesis para comprobar que no se ha perdido la banda de DNA.

5.5. *Extracción de ácidos nucleicos a partir de geles*

Si en el gel de electroforesis se observa más de una banda, debido a la existencia de múltiples productos de PCR, probablemente interesará aislar una de ellas (por ejemplo para secuenciarla). Para hacerlo, las casas comerciales suministran *kits* de fácil manejo. A continuación se detalla el proceso para el *kit* de Amersham:

1. Se recorta la banda del gel de electroforesis con una cuchilla estéril. Se introduce en un eppendorf estéril, previamente tarado, para posteriormente calcular el volumen.

2. Se añaden 3 volúmenes de NaI.

3. Se incuba a 55 °C durante 3-5min, para que la agarosa se disuelva.

4. Se añaden 5 µl de polvo de vidrio que, al igual que en el caso de la purificación por columna, se trata de un sólido que se une al DNA y aumenta su peso. Se mezcla bien y se incuba 5 min en hielo.
5. Se centrifuga 1 min a 1.000 g. Se elimina el sobrenadante.
6. Se añaden 250 µl de tampón y se agita levemente. Posteriormente, se centrifuga a 1.000 g durante 1 min. A continuación se elimina el sobrenadante.
7. Se repite este último paso dos veces más y se seca lo mejor posible en la estufa a una temperatura de 37 °C-40 °C.
8. Se adicionan 30 µl de agua pura y se deja resuspender durante aproximadamente 1 hora o durante toda la noche.
9. Se centrifuga a 12.000 g durante 2 min.

Se realiza una electroforesis para comprobar que no se ha perdido la banda de DNA y seguidamente se realiza una purificación por columna como se ha descrito anteriormente.

6. Secuenciación del DNA

La secuenciación se realiza, por lo general, en servicios especializados, debido al elevado coste de los sofisticados sistemas de secuenciación automática y a la especialización que requiere el uso eficiente de los mismos. Por lo general, las universidades y centros de investigación facilitan el acceso a servicios centralizados que realizan la secuenciación a precios ventajosos para el usuario interno; ocasionalmente alguna empresa puede también ofrecer este servicio.

El método de secuenciación más generalmente usado consiste en una nueva reacción de PCR en la cual se utilizan nucleótidos especiales marcados con fluorescencia. Cada clase de nucleótido, Adenina (A), Timina (T), Citosina (C), Guanina (G), emite a una particular longitud de onda al pasar por un haz de láser; la señal emitida se recoge en un ordenador y se procesa en forma de picos en un gráfico denominado electroferograma (Fig. 3). Los picos del gráfico se corresponden con cada nucleótido, y así se obtiene la secuencia de los mismos.

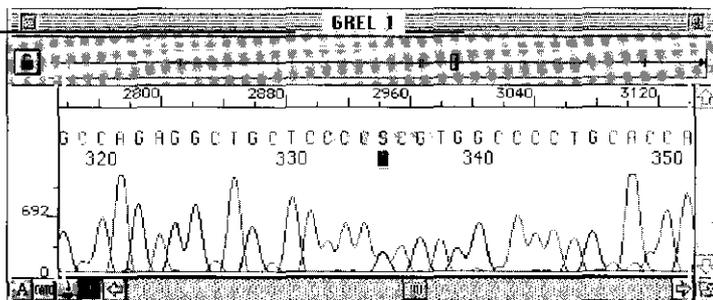


Figura 3.—Electroferograma.

Por regla general los servicios de secuenciación imponen unas condiciones mínimas para la aceptación de productos de PCR para su secuenciación. Estos requerimientos suelen estar relacionados con la concentración y cantidad de DNA (se requiere mayor cantidad de DNA cuanto mayor sea el tamaño del segmento) y su pureza. Normalmente también se requiere una pequeña cantidad de los *primers* que se van a utilizar en la secuenciación.

6.1. *Alineamiento y análisis de secuencias*

La información generada por los secuenciadores automáticos se almacena generalmente en dos ficheros: uno de ellos es el gráfico o electroferograma y el otro contiene la secuencia, propiamente dicha, en formato de texto. Cuando la señal que recibe el secuenciador automático no está suficientemente clara, el aparato responde asignando una N (indeterminación) a la posición dudosa. De esta forma, tanto en las curvas del electroferograma, como en la secuencia dada, aparecerán 5 caracteres: N, A, G, T, C. Un electroferograma nítido presenta picos bien definidos, con poco ruido de fondo y con pocas indeterminaciones (Fig. 3). Comparando la secuencia y el gráfico recibidos del aparato automático se pueden resolver un buen número de indeterminaciones. Aún así suelen quedar otras que, de ser necesario, pueden ser resueltas mediante una segunda secuenciación.

6.2. *Problemas en el alineamiento*

Una vez disponibles las secuencias, el primer paso para la interpretación es el alineamiento. El proceso de alineamiento consiste en generar una matriz de datos en el que las filas son las distintas secuencias a comparar y en las columnas se sitúan las posiciones homólogas de cada secuencia. El alineamiento sólo puede llevarse a cabo cuando las secuencias son suficientemente parecidas entre si, ya que ésta es la base que se utiliza para asumir homología entre dos posiciones. Así, si disponemos de las secuencias AATGCTGCA y AATGAAGCA podemos asumir que las posiciones 5.^a y 6.^a de ambas secuencias son homólogas, aunque sus nucleótidos sean diferentes, gracias a la semejanza de las secuencias que las rodean.

Los problemas (y, a su vez, la principal fuente de información) que pueden surgir en los procesos de alineamiento son debidos, por lo general, a la variabilidad (o grado de mutación) que presente una secuencia con relación a la otra. Los cambios, o mutaciones puntuales, de un nucleótido por otro, no ofrecen dificultades para el alineamiento cuando se producen en segmentos no muy variables porque los nucleótidos adyacentes sirven de orientación. Una mayor dificultad se presenta cuando la mutación es *indel* (inserción/delección) ya que puede afectar a un solo nucleótido, o a más de 200, si hay intrones.

Existen diversos algoritmos informáticos que ayudan al alineamiento inicial de las secuencias. Se pueden utilizar los programas Sequence Navigator (para Macintosh) o Clustal (accesible de forma gratuita por Internet). Dichos programas in-

producen guiones o huecos (*gaps*) donde ocurren *indels*, para conseguir alinear las secuencias. Normalmente sin embargo, los alineamientos resultantes del desarrollo automático de estos programas no son óptimos y se necesita introducir algunas modificaciones, a ojo, para conseguir la máxima homología en el alineamiento.

— ¿Qué hacer cuando una de las secuencias muestra una excesiva discrepancia con las demás, es decir, que su alineamiento resulta prácticamente imposible? Esto puede deberse, al menos, a alguna de las dos opciones siguientes:

- Lo más probable es que la secuencia esté invertida porque proceda del *primer* alternativo. En este caso, solo habría que cambiar el sentido de la secuencia discrepante y traducirla en su complementaria.
- Puede también suceder que se haya amplificado, por error o contaminación, un genoma que no es el deseado.

Una vez que se han usado las secuencias, es indispensable que se depositen en alguno de los bancos universales que existen (EMBL, GenBank y DDBJ a los que se accede a través de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las revistas científicas de distribución amplia, exigen, para la aceptación de un trabajo, que las secuencias hayan sido depositadas. Los bancos son abiertos y disponibles para todos los investigadores de forma gratuita. El autor puede concertar una fecha antes de la cual el acceso a sus datos esté cerrado o protegido.

7. Análisis de secuencias para filogenia

La aplicación más inmediata del análisis molecular en el campo de los estudios de biodiversidad se orienta hacia problemas evolutivos de distinto tipo en particular al conocimiento de las relaciones filogenéticas y de parentesco; todo ello se encuadra actualmente bajo el concepto de evolución molecular. En las más recientes publicaciones de síntesis (PAGE y HOLMES, 1998) *molecular evolution* es el término que se va imponiendo como clave.

Las relaciones moleculares y evolutivas entre los organismos se representan por lo general en árboles que no son más que modelos gráficos de la interpretación de las semejanzas y diferencias entre los caracteres. Para establecer relaciones evolutivas (de parentesco) es imprescindible que los caracteres manejados sean hereditarios. El uso en estudios evolutivos de los caracteres morfológicos, químicos, etc., presenta dificultades que se derivan de la permanente duda de si el carácter es genético o es sólo fenético. En el caso que nos ocupa, los caracteres son las secuencias del DNA que, por definición, son genéticas. Además, las secuencias, están reflejando, en su variación, los cambios que se han producido en el organismo estudiado a lo largo de su historia; es decir, la filogenia del organismo. El grado de semejanza entre dos secuencias homólogas indica el grado de parentesco entre ellas. Dos secuencias son más semejantes entre sí, cuantas menos mutaciones exhiban entre ellas.

No todas las secuencias tienen la misma frecuencia de mutación (variación). Por eso se habla de secuencias variables y secuencias conservadas. En los segmentos silenciosos del DNA, esto es, en aquellos segmentos que al no ser codificantes no se traducen (intrones, separadores intergénicos, separadores intragénicos, etc) la frecuencia de mutación es mucho mayor y además, su variación no es corregida por el propio organismo debido a que no entraña riesgos. Se trata, pues de mutaciones neutras. Sin embargo los segmentos donde se producen estas variaciones neutras, están tan sujetos a evolución como un segmento codificante; por ello los segmentos silenciosos tienen la misma utilidad como base para reconstruir filogenias que los que codifican para proteínas, y adicionalmente ofrecen la gran ventaja de ser mucho más variables, es decir, más informativos. De hecho, los estudios filogenéticos que abordan análisis de relaciones entre taxones del rango de género o menor (típicamente, especie o subespecie), han de basarse necesariamente en la comparación de segmentos silenciosos (por ejemplo los ITS).

Todos los sistemas de análisis, consisten en programas estadísticos que hoy están preparados para cualquier tipo de ordenador. Aunque no son programas difíciles de manejar, requieren horas de entrenamiento.

Los programas que suelen usarse son de dos tipos fundamentales que en ambos casos pueden presentar sus resultados en forma de árbol: los filogenéticos, que conducen a representaciones en los que las longitudes de las ramas no son informativas (cladogramas en sentido amplio) y los de distancias, en los cuales la longitud de las ramas está en relación con la medida de la variación genética entre los taxones o entre las muestras.

7.1. Cladogramas

Este concepto se usa aquí en el sentido de PAGE y HOLMES (1998). Se considera que un cladograma es un árbol evolutivo en el cual las longitudes de las ramas no son informativas. Entre los cladistas se suele establecer distinción entre lo que consideran un árbol evolutivo y un cladograma. En un cladograma, los taxones terminales están siempre en las ramas extremas del árbol, tanto si lo que se compara son seres actuales como si están extinguidos; en un cladograma tampoco se tiene en cuenta si alguno es ancestro de otro u otros de los representados. Por el contrario en un árbol evolutivo, según el concepto cladista, alguno o algunos de los taxones pueden ser ancestros de otro. En la inmensa mayoría de los casos que se analizan, ninguna de las secuencias que se compara es ancestro de otras por lo cual cladograma y árbol evolutivo pueden considerarse sinónimos.

Los cladogramas se pueden elaborar mediante dos sistemas de comparación de los datos (FELSENSTEIN, 1993): por parsimonia y por máxima verosimilitud (*maximum likelihood*, MLH). El análisis parsimónico se fundamenta en el principio filosófico de *la navaja de Occam* (YNDURAIN, 1997), considerando como mejor representación el árbol al que se llegue con el menor número de mutaciones. El

análisis por MLH, partiendo del mismo principio, elabora matemáticamente un árbol de máxima probabilidad teórica con el cual compara todas las representaciones posibles; el árbol que el programa considera como definitivo es el que resulte más semejante al modelo matemático. Con uno u otro sistema de análisis, los cladogramas deben presentarse con un valor en cada uno de los nodos o bifurcaciones que indique la probabilidad con que se obtiene ese nodo (valor de *bootstrap*) en la comparación realizada. Por ejemplo, si una rama termina en una bifurcación cuyo *bootstrap* es de 90, quiere decir que ese es el porcentaje de veces que se obtuvo un árbol en el que esa bifurcación aparecía. Una bifurcación con una probabilidad por debajo de 50, no debe ser tenida en cuenta y, por lo general, en los programas más utilizados, una bifurcación con tan bajo grado de confianza no se acepta. Por esta razón con frecuencia se obtienen cladogramas que, más que forma típica de árbol, la tienen de peine (estructura pectinada).

En cualquiera de los sistemas de comparación, parsimónico o MLH, las formas o topografías de los árboles que se obtienen, son muy parecidas y normalmente se usa el que ofrezca resultados más consistentes (por ejemplo los más altos valores de *bootstrap*).

7.2. Árboles de distancia

Dado que entre dos secuencias siempre hay un ancestro común, la medida de la divergencia entre dos secuencias puede ser utilizada para estimar el número de cambios evolutivos ocurridos entre ellas. Las distancias pueden representarse en forma de árboles que persiguen traducir la distancia entre secuencias en árboles evolutivos (PAGE & HOLMES, 1998). Se han descrito varios sistemas para estimar las distancias que dan lugar a otros tantos tipos de métodos (Jukes-Cantor, Kimura, etc). En los árboles basados en distancia, las longitudes de las ramas son proporcionales a las distancias genéticas halladas (número de mutaciones entre las secuencias comparadas). Como consecuencia, además del valor de la probabilidad de los nodos, estos árboles muestran un segmento de referencia cuya longitud es proporcional al número de mutaciones.

7.3. Programas para análisis de datos

Entre los programas más utilizados están los siguientes:

- PHYLIP. Es un programa para hacer filogenias a partir de caracteres numerosos (secuencias). Permite hacer cladogramas basados tanto en parsimonia como en máxima verosimilitud y árboles de distancia por distintos métodos (Jukes-Cantor, Kimura, maximum likelihood). Se obtiene de forma gratuita a través de Internet (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html> General).

- El programa PHYLIP no dibuja árboles, por lo que es necesario disponer de un programa complementario que lo haga. Uno de ellos es el TREEVIEW.
- PAUP. Es el más utilizado en la bibliografía aunque no es gratuito. Permite hacer cladogramas por parsimonia, MLH y distancias; actualmente dispone de versiones para todo tipo de ordenador.

8. Polimorfismo en tamaño de fragmentos de restricción (RFLPs)

Algunos problemas de identificación de muestras pueden resolverse, sin tener que secuenciar el segmento de DNA, mediante el reconocimiento por ciertos enzimas, los enzimas de restricción, de pequeñas secuencias. Los enzimas de restricción hidrolizan enlaces fosfodiéster en el DNA y se caracterizan por cortar las dos cadenas del DNA de forma específica tras reconocer una secuencia diana. La frecuencia con la cual un enzima corta un DNA depende del tamaño de la secuencia de reconocimiento. Los enzimas de restricción se han clasificado en tres tipos (I, II y III) según su diferente funcionalidad y tienen como principal propiedad la alta especificidad. Una molécula de DNA genera un conjunto constante de fragmentos (patrón de restricción) al ser digerida con una endonucleasa de restricción (Fig. 4). Los análisis basados en este hecho se suelen llevar a cabo sobre producto de PCR. Aunque en otros ascomicetes y en muchos y variados estudios sobre diversidad, se han usado los RFLPs, en líquenes aún no han sido aplicados. Actualmente estos análisis ya no se realizan para estudios filogenéticos, sin embargo, son interesantes (y más baratos que los métodos que requieren secuenciación) para estudios poblacionales. Una vez más, la dificultad en los líquenes estriba en encontrar *primers* específicos para la PCR de partida. Pueden aplicarse para esta primera fase los *primers* relacionados en la Tabla 1, si el diseño experimental no requiere mayor variabilidad.

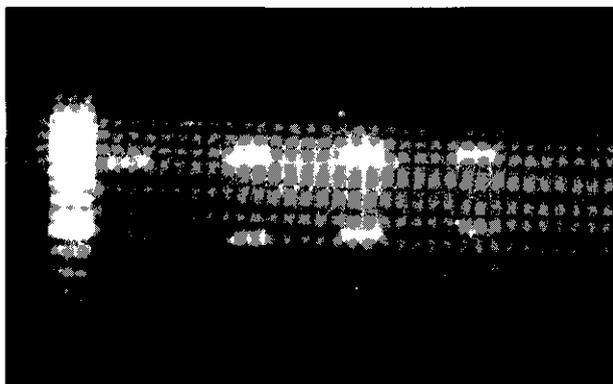


Figura 4.—Resultado de la restricción de una región de ADN ribosómico utilizando el enzima *HindIII* de diferentes individuos de *Parmelia sulcata*.

8.1. Procedimiento para preparación de los RFLPs

El método para realizar esta técnica es sencillo y consiste en la preparación de una mezcla conteniendo el producto de PCR, enzimas, tampón y agua; posteriormente, el producto de la PCR se somete a una incubación durante un tiempo óptimo preestablecido para que se produzca la actuación de los enzimas de restricción.

8.1.1. Productos necesarios

- Producto de la PCR.
- Enzima de restricción.
- Tampón apropiado para la correspondiente enzima.
- H₂O ultrapura.

8.1.2. Protocolo para los RFLP

La preparación debe hacerse en el interior de una cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones. Debe cuidarse también la esterilidad de todo el material que se use. Los componentes de la mezcla deben mantenerse en hielo. En la siguiente tabla se esquematizan los volúmenes de cada producto:

	<i>μl por muestra</i>
Tampón (10% volumen total)	2,0
H ₂ O ultrapura	7,8
Enzima de restricción (2 u por muestra)	0,2
Producto de PCR	10,0
Volumen total	20,0

1. Se añade 10 μl de producto de PCR a 10 tubos eppendorf rotulados.
2. En otro tubo se realiza una mezcla con los restantes componentes de la reacción. Se agita con vórtex suavemente.
3. A cada tubo de los que contienen el producto de la PCR, se añaden 10 μl de la mezcla y se agita con vórtex suave.

Este esquema se sigue para tantos enzimas como se desee utilizar. Cada tubo se lleva a bloque térmico o baño a la temperatura requerida para cada enzima. El tiempo de incubación es variable pero se sugiere no menos de 3 horas ni más de 12.

El resultado de la restricción será un patrón de bandas que se visualiza en electroforesis siguiendo un procedimiento como el ya descrito. Dado que pueden presentarse fragmentos de muy pocas bases (cortos) es recomendable preparar geles de poliacrilamida en los que la resolución es mayor. Hay también agarosas especiales de alta resolución.

9. Amplificación al azar utilizando primers de selección arbitraria (RAPDs)

Una técnica muy utilizada (HENRY, 1997) para caracterización de DNA amplificarlo utilizando *primers* cortos de secuencia arbitraria; como resultado se obtiene un patrón de bandas (Fig. 5) que puede ser usado como marcador genético de una población. Esta técnica tiene dos grandes ventajas. La primera es que no es necesario tener un conocimiento previo del genoma o genomas a comparar y en segundo lugar, es una técnica muy sensible porque hace intervenir a todo el genoma donde, como se sabe, hay ingentes cantidades de DNA silencioso, muy variable, que permite establecer diferencias no sólo entre taxones próximos entre si sino incluso entre individuos de la misma especie.

La técnica de RAPD ha sido ampliamente aceptada para los más diversos objetivos, pero su aplicación al estudio de los líquenes presenta ciertas dificultades (MURTAGH *et al.*, 1999). La dificultad principal es que, dado que el DNA que se aísla a partir de talo líquénico es DNA total, siendo los *primers* arbitrarios, no podemos deducir, entre las bandas obtenidas, cuáles corresponden a foto o a micobionte. Esto ha sido visto como una insalvable dificultad por algunos autores (MURTAGH *et al.*, 1999). A pesar de estos inconvenientes, la técnica será aún utilizada y discutida en los estudios sobre líquenes y, por tal razón, ha sido recogida en el presente trabajo. Además tiene, sin duda, aplicaciones inmediatas si se parte de cultivos axénicos.

Como se ha señalado, los RAPDs suelen utilizarse en estudios poblacionales ya que permiten estimar variabilidad genotípica entre muestras muy parecidas. Un patrón de bandas (Fig. 5), resultado de una prueba de RAPD, puede ser específico de razas, variedades y/o individuos.

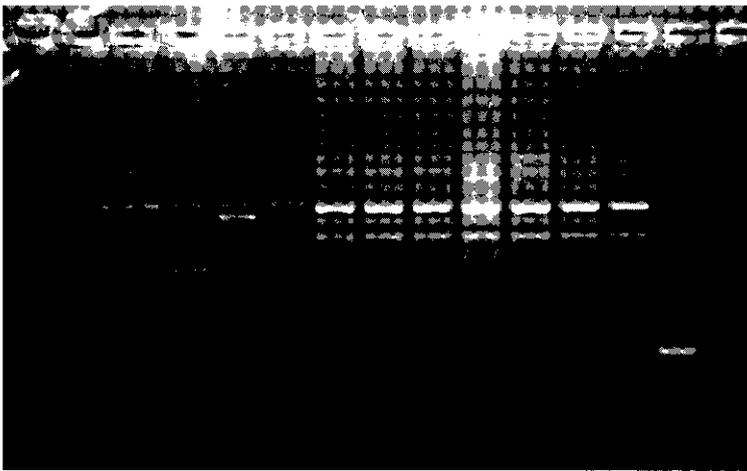


Figura 5.—Resultados de la amplificación por RAPDs de diferentes individuos de *Physconia distorta* utilizando el mismo *primer*.

9.1. Proceso para la preparación de RAPDs

Consiste en una PCR cuyos principios básicos no difieren de los descritos anteriormente. No obstante, existen ciertas diferencias que se detallan a continuación:

- Mientras en la PCR se trabaja con una pareja de *primers* generalmente específicos que amplifican copias de una región conocida de DNA, en los RAPD se utilizan series de *primers* de secuencia arbitraria que hibridan con un cierto número de regiones del DNA, en principio desconocidas, originándose múltiples copias de tamaño diferente.
- Dado que la unión de los *primers* es inespecífica, la temperatura de hibridación que se usa es más baja, oscilando entre 35-38 °C, según los protocolos.
- En general, se alargan los tiempos de polimerización, lo que permite la amplificación tanto de segmentos de bajo como de alto peso molecular.
- En general, el número de ciclos suele ser ligeramente mayor (habitualmente entre 40 y 45 ciclos).
- Las polimerasas utilizadas han de ser más activas (mejor una *Taq* procedente de *Thermus aquaticus* que una *Tth*, procedente de *Thermus thermophilus*). La concentración de las mismas en el volumen final de reacción, suele ser más alta que en el caso de una PCR convencional.
- Puesto que el mismo DNA debe servir de molde para diferentes *primers* y puesto que suele utilizarse esta técnica para estudios poblacionales, donde se analizan un número elevado de individuos, se recomienda disminuir el volumen de reacción y cargar todo el producto de reacción en los pocillos del gel.

9.1.1. Esquema y recomendaciones para RAPDs

- Los dNTPs suelen comprarse en forma de solución matriz concentrada, a partir de la cual se deben preparar los stock con una concentración de 5 mM.
- Deben utilizarse micropipetas exclusivas para RAPDs.
- Todos los productos de reacción deben ser agitados en el vórtex antes de ser utilizados. El enzima se agita y se somete a un pulso de centrifuga (*spin*) para no perder volumen.

9.1.2. Protocolo para RAPDs

Se calculan las cantidades correspondientes al volumen de reacción, utilizando 2 µl de DNA por cada 10,5 µl de mezcla de reacción.

	DNA	H ₂ O	Tampón	MgCl ₂	dNTP	Primer*	Polimerasa
Concentración inicial de alícuota			10x	25 mM	5 mM	5 mM	10 unidad/μl
Concentración en la reacción			1x	4 mM	200 μM	0,2 mM	0,064 unidad/μl
Volumen para 12,53 μl	2 μl	6,2 μl	1,25 μl	2 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,08 μl

* Se repetirán tantas reacciones como *primers* se vayan a utilizar de forma que el ADN de todos los individuos analizados reaccionará con todos los *primers*.

Con el fin de evitar errores se recomienda preparar una tabla donde se representen las muestras y los componentes de la reacción, en este caso, para 12 muestras. Todos los volúmenes se darán en μl.

Muestra	DNA	H ₂ O	Tampón	MgCl ₂	dNTP	Primer*	Polimerasa
1		6,2	1,25	2	0,5	0,5	0,08
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							
Positivo							
Negativo							
Extra							
Extra							
Total	2x tubo	99,2	20	32	8	8	1,28

* Se repetirán tantas reacciones como *primers* se vayan a utilizar de forma que el ADN de todos los individuos analizados reaccionará con todos los *primers*.

9.1.4. Programación del termociclador

Los pasos 2, 3 y 4 constituyen el ciclo que se repetirá 45 veces. Entre el paso 3 y 4 se establece un gradiente de temperatura en ascenso con una velocidad de 0,4°C/seg. Al final del proceso, los productos de reacción permanecerán a 4 grados para inactivar la polimerasa .

Pasos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	6 min
2	94°C	1 min
3	36°C	1 min
4	72°C	6 min
5	72°C	6 min
6	4°C	cte

9.2. Problemas en los RAPDs

Los problemas que puede ofrecer una reacción de este tipo son similares a los descritos para otros tipos de amplificación y se deben abordar de igual forma. Sin embargo, existe un problema adicional con los RAPDS. Dado que un *primer* inespecífico puede unirse a una gran cantidad de regiones de DNA, cualquier pequeña variación de los parámetros de reacción puede modificar los resultados. Es imprescindible regular ampliamente este proceso.

AGRADECIMIENTOS

Los autores quieren agradecer al Comité Editorial de la Revista *Botanica Complutensis* la invitación recibida para realizar este artículo. También quieren agradecer la revisión crítica del manuscrito a X. Llimona cuyas sugerencias han mejorado notablemente contenidos y expresiones. Los errores que se hayan podido deslizar, en el fondo o en la forma, son exclusivamente imputables a los autores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMALEO, D. y CLERC, P., (1991). Lichen chimeras; DNA analysis suggests that one fungus forms two morphotypes. *Exp. Mycol.* 15: 1-10.
- (1995). A rapid and inexpensive method for the purification of DNA from lichens and their symbionts. *Lichenologist* 27: 207-213.
- BALDWIN, B. G.; SANDERSON, M. J.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; CAMPBELL, C. S. y DONOGHUE, M. J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- BLUM, O. B. y KASHEVAROV, G. P. (1986). The DNA homologies as a proof of the legitimacy of the establishment of the lichen genus *Lasallia* Merat (Umbilicariaceae). *Doklady Akademii Nauk Ukrainskoi SSR, Ser. B* 1986: 61-64 (en ruso).
- (1992). The DNA homologies as a proof of the legitimacy of the establishment of the lichen genera *Lasallia* Merat, *Cladina* (Nyl.) Harm. and *Pseudevernia* Zopf. En *Karne-*

- felt, I. (ed) IAL2 Abstracts, Lund, p. 1.
- CRESPO, A., BRIDGE, P. D. y HAWKSWORTH, D. L. (1997). Amplification of fungal rDNA-ITS regions from non-fertile specimens of the lichen-forming genus *Parmelia*. *Lichenologist* 29: 275-282.
- CRESPO, A. y CUBERO, O. F. (1998). A molecular approach to the circumscription and evaluation of some genera segregated from *Parmelia* s. Lat. *Lichenologist* 30: 369-380.
- CRESPO, A., CUBERO, O. F. y GRUBE M. (1998). PCR applications in studies of lichen-forming fungi. En *Applications of PCR in Mycology* (P. D. Bridge, Arora, D. K., Reddy C. A. and Elander, R. P., eds): 85-105. CAB International, UK.
- CUBERO, O. F. y CRESPO, A. (1996). Genetic variability in populations of *Physconia enteroxantha* (Nyl.) Poelt. *IAL 3 Abstracts* Salzburg: 151.
- CUBERO, O. F., CRESPO, A., FATEHI, J. y BRIDGE, P. D. (1999). DNA extraction and PCR amplification method suitable for fresh, herbarium-stored, lichenized, and other fungi. *Pl. Syst. Evol.* 216: 243-249.
- DEPRIEST, P. T. (1993). Small subunit rDNA variation in a population of lichen fungi due to optional group I introns. *Gene* 134: 67-74.
- DEPRIEST, P. T. y BEEN, M. D. (1992). Numerous group I introns with variable distribution in the ribosomal DNA of a lichen fungus. *J. Mol. Biol.* 228: 315-321.
- DOYLE, J. J. y DICKSON, E. E. (1987). Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon* 36(4): 715-722
- FELSENSTEIN, J. (1993). PHYLIP version 3.5C. Seattle: Department of Genetics, University of Washington.
- GARDIES, M. y BRUNS, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes. Application to the identification of mycorrhizae and rust. *Mol. Ecol.* 2: 113-118.
- GARGAS, A. y DEPRIEST, P. T. (1996). A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA. *Mycologia* 88: 745-748.
- GARGAS, A. y TAYLOR, J. W. (1992). Polymerase chain reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S DNA from lichenized fungi. *Mycologia* 84: 589-592.
- GARGAS, A., DEPRIEST, P. T., GRUBE, M. y TEHLER, A. (1995). Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* 268: 1492-1495.
- GRUBE, M., DEPRIEST, P., GARGAS, A. y HAFELLNER, J. (1995). DNA isolation from lichen ascomata. *Mycol. Res.* 99: 1321-1324.
- HENRY, R. J. (1997) *Practical applications of Plant Molecular Biology*. Chapman & Hall. London.
- HÖSS M., JARUGA P., ZASTAWNY T. H., DIZDAROGLU M. y PÄÄBO S. (1996). DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research* 24(7): 1304-1307.
- LEE, S. B. y TAYLOR, J. W. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. En *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, eds): 282-287. Academic Press, San Diego.
- MULLIS, K. B. y FALOONA, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- MURTAGH G. J., DYER P. S., MCCLURE, P. C. y CRITTENDE, P. D. (1999). Use of randomly-amplified polymorphic DNA markers as a tool to study variation in lichen-forming fungi. *Lichenologist* 31(3): 257-267.
- PAGE, R. D. M. y HOLMES, E. (1998). *Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach*.

- Blackwell Science. Cambridge.
- ROGERS, S. O. y BENDICH, A. J., (1994). Extraction of total cellular DNA from basidiomycetes for ribosomal RNA hybridization. *Cand. J. Bot.* 67: 1235-1243.
- SAMBROOK, E., FRITSCH, F. y MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Press. New York.
- SAVOLAINEN, V., CUÉNOUD, P., SPICHTER, R., MARTÍNEZ, M. D. P., CRÈVECOEUR, M. y MANEN, M. J. (1995). The use of herbarium specimens for DNA phylogenetics; evaluation and improvement. *Pl. Syst.Evol.* 197: 87-98
- WHITE, T. J., BRUNS, T. D., LEE, S. y TAYLOR, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenetics. En INNIS, M. A. et al. (Eds.) *PCR, Protocols: A guide to methods and applications*: 315-322. Academic Press, New York.
- WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., LAVAK, K. J., RAFALSKI, J. A. y TINGEY, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- YNDURÁIN, F. J. (1997). *¿Quién anda ahí? Civilizaciones extraterrestres y el futuro de la humanidad*. Temas de Debate. Madrid.

Aceptado: 28 de Julio de 1999.

ANEXO

A continuación se relacionan los reactivos más usuales en las concentraciones necesarias para la mayoría de protocolos. Por razones prácticas, se ha incluido alguno no citado en el texto. Puede encontrarse información más detallada en SAMBROOK *et al.* (1989).

PREPARACIÓN DE STOCKS

STOCKS	Concentración que queremos en el stock	Volumen de stock que queremos preparar	Peso Molecular	Cantidad de producto que hay que usar
Tris 1M pH 8.0	1 M	0,500 l	121,14	60,57 g + agua destilada hasta 500 ml
EDTA 0,5 M pH 8,0	0,5 M	0,250 l	372,24	46,53 g + agua destilada hasta 250 ml
CTAB 4% w/v	4% w/v	0,100 l	—	4 g + agua destilada hasta 100 ml
NaCl 4 M	4 M	0,100 l	58,44	23,376 g + agua destilada hasta 100 ml
NaCl 5 M	5 M	0,100 l	58,44	29,22 g + agua destilada hasta 100 ml
SDS 10% w/v pH 7,2		0,100 l		10 g + agua destilada hasta 100 ml

Tris 1 M pH 8.0

- Disolver 60,57 g de Tris base (hidroximetil aminometano) en 400 ml de H₂O.
- Ajustar el pH añadiendo HCl concentrado.

Como referencia, las cantidades aproximadas de HCl que hacen falta para conseguir los pHs indicados (para 500 ml de solución) son:

pH	HCl
7,4	35 ml
7,6	30 ml
8,0	21 ml

Ej.: para conseguir pH 8,0 añadir 17 ml y poco a poco ir añadiendo más hasta ajustar el pH adecuado.

Permitir que la solución se enfríe a temperatura ambiente antes de realizar el ajuste final del pH.

- Ajustar el volumen de la solución a 500 ml con agua destilada.
- Esterilizar.
- Guardar en nevera (4 °C).

Observaciones

- El pH de las soluciones Tris depende de la temperatura y decrece aproximadamente 0,03 unidades de pH por cada 1 °C de incremento de temperatura. Por ejemplo una solución 0,05 M tiene valores de pH de 9,5, 8,9 y 8,6 a 5 °C, 25 °C y 37 °C respectivamente.

EDTA 0.5 M pH 8.0

- Añadir 46,53 g de etilen-diamin-tetraacetato disódico dihidratado (= ac. etilen-dinitrilo-tetracético sal disódica dihidratada) en 200 ml de agua destilada (EDTA).
- Agitar vigorosamente con agitador magnético.
- Ajustar el pH hasta 8,0 con NaOH (~ 5 g de NaOH en pellets).
- Enrasar a 250 ml con agua destilada.
- Esterilizar.
- Guardar en nevera (4 °C).

Observaciones

- La sal disódica de EDTA no se solubiliza hasta que la solución está ajustada aproximadamente a 8,0 por adicción de NaOH.

CTAB (hexadeciltrimetilamonium bromuro) 4 % w/v

- Disolver 4 g de CTAB en 100 ml de agua miliQ.
- Guardar en nevera (4 °C).

NaCl 4 M

- Disolver 23,376 g de NaCl en 80 ml de agua destilada.
- Ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada.
- Esterilizar.
- Guardar en nevera (4 °C).

NaCl 5 M

- Disolver 29,22 g de NaCl en 80 ml de agua destilada.
- Ajustar el volumen a 100 ml con agua destilada.
- Esterilizar.
- Guardar en nevera (4 °C).

SDS 10 %

- Disolver 10 g de SDS en 90 ml de agua destilada. Calentar a 68 °C para facilitar la disolución.
- Ajustar el pH a 7,2 añadiendo unas pocas gotas de HCl concentrado.
- Enrasar el volumen a 100 ml con agua destilada.

Observaciones

- Hay que usar mascarilla, guantes y limpiar todo bien cuando se pesa porque los cristales de SDS se dispersan con mucha facilidad. No necesita esterilización. En nevera (4 °C) se precipita y hay que calentar y agitar a 65 °C antes de usar.

TAMPONES DE ELECTROFORESIS

	<i>Cantidad a añadir</i>	<i>Volumen que queremos preparar</i>	<i>Concentración del stock concentrado 50x</i>
Tris (sólido)	242 g	1.000 ml	2 M
Ácido acético puro	57,1 ml		1 M
EDTA 0,5 M pH 8,0 (en nevera)	100 ml		0,05 M
Agua destilada	hasta 1 l		

1. TAE (Tris acetato-EDTA) (stock concentrado 50x)

2. TAE 1x

- El tampón con el que se rellenan las cubetas y se hace el gel, se prepara con las si-

	<i>Concentración en el stock 50x</i>	<i>Volumen que hemos puesto del stock 50x</i>	<i>Volumen preparado de solución de trabajo 1x</i>	<i>Concentración en la solución de trabajo 1x</i>
Tris Ácido acético EDTA 0,5 M Agua destilada	2 M 1 M 0,5 M	40 ml stock 50x 1.960 ml	2.000 ml	0,04 M* 0,001 M**

* 0,04 M Tris-acetato = 40 ml × 2 M / 2.000 ml.

** 0,001 M EDTA = 40 ml × 0,05 / 2.000 ml.

güentes cantidades: 40 ml TAE 50x en 1960 ml de agua destilada (para 2 litros).

— Las concentraciones que hay en esta solución se indican en la tabla siguiente.

TAMPONES DE EXTRACCIÓN DE DNA

<i>TAMPÓN A</i>	<i>Volumen de tampón A que queremos</i>	<i>Concentración que queremos en tampón A</i>	<i>Concentración que tenemos en el stock</i>	<i>Volumen de stock a utilizar</i>
Tris 7 mM EDTA 30 mM CTAB 1,4 % w/v NaCl 1 M H ₂ O	250 ml	7 mM 30 mM 1,4 % w/v 1 M	1.000 mM 500 mM 4 % w/v 4 M	1,75 ml 15 ml 87,5 ml 62,5 ml hasta 250 ml

1. Tampón A (lisis) para extracción de DNA con CTAB

- Esterilizar.
- Guardar en nevera (4°C).

2. Tampón B (precipitación) para extracción con CTAB

<i>TAMPÓN B</i>	<i>Volumen de tampón B que queremos</i>	<i>Concentración que queremos en tampón B</i>	<i>Concentración que tenemos en el stock</i>	<i>Volumen de stock a utilizar</i>
CTAB 0,5% w/v NaCl 40 mM H ₂ O	250 ml	0,5 % w/v 40 mM	4 % w/v 4 M	31,25 ml 2,5 ml hasta 250 ml

- Esterilizar.
- Guardar en nevera (4 °C).

SOLUCIONES DIVERSAS

1. TE 10:1 (Tris-EDTA) pH 8,0

	<i>Concentración que queremos</i>	<i>Volumen que queremos</i>	<i>Concentración del stock que tenemos</i>	<i>Cantidad a utilizar</i>
Tris Cl pH 8,0 10 mM 1 mM EDTA pH 8,0 Agua destilada	10 mM 1 mM	100 ml	1M (= 1.000 mM) 0,5 M (= 500 mM)	1 ml stock 0,2 ml de stock 98,8 ml de agua destilada

2. Tampón de carga de la muestra en el pocillo del gel

- 0,25% bromofenol azul.
- 30 % glicerol en agua..

Se preparan 50 ml, y se almacena en nevera (4 °C).

3. BrEt (Bromuro de etidio) stock 10 mg/ml (ver Precauciones)

- 1 g de bromuro de etidio en 100 ml de agua destilada.
- Agitar con agitador magnético durante varias horas hasta asegurarse de que el colorante se ha disuelto.
- Empaquetar en papel de aluminio o transferir la solución a bote oscuro
- Guardar doblemente protegido en varios botes y almacenar en el cajón de la nevera (4 °C).

4 Cloroformo: isoamil alcohol 24:1 v/v (= triclorometano: 3-metilbutanol 24:1)

- Se preparan 100 ml.
- Poner 96 ml de cloroformo en 4 ml de isoamil alcohol.
- Guardar en nevera (4 °C).

Observaciones

Esta mezcla se evapora fácilmente. Cuando se coloca en el baño hay que tapparla.

5. Isopropanol

Guardar en congelador.

6. Etanol al 70 %

Guardar a 4°C.

Precauciones

El bromuro de etidio es un potente mutágeno y moderadamente tóxico. Hay que usar guantes (a ser posible dobles) cuando se trabaje con soluciones que lo contengan, y usar mascarilla cuando se vaya a pesar.