

TESIS DOCTORAL:
Contribución taxonómica y molecular al estudio de la Myxobiota ibérica

Ángela López Villalba

Una tesis se trata de un trabajo de investigación en el que una persona obtiene el título de doctor. El tiempo de realización de la tesis se ha visto acortado a 3-4 años encontrándome ahora mismo en la mitad de dicho periodo. En esta exposición me voy a centrar en lo que son los propósitos y en el, llamémosle, apartado de “Material y métodos” de mi tesis. En un futuro próximo espero realizar otra ponencia con los resultados obtenidos.

Los propósitos principales de mi doctorado son:

- Actualizar y completar el listado de especies de Myxomycetes nivales.
- Determinar la relación filogenética dentro del grupo de las *Lamproderma* maculadas (*L. maculatum*, *L. pseudomaculatum*, *L. echinosporum* y *L. acanthosporum*).

Otros propósitos de gran interés son:

- Comparar las especies que aparecen en función de diversos factores abióticos.
- Comparar las especies de la Península con las encontradas en el Teide (2016) y en los Alpes franceses (2018) e italianos (2019).

Los primeros pasos que di al comenzar mi tesis se enfocaron en la tarea de formarme y conocer los Myxomycetes y, más concretamente, los nivales. Durante este periodo tuve que leer libros especializados, artículos científicos y monografías. Por otro lado, siempre es de gran interés conocer, hablar y escribirse con científicos expertos en el tema, además de con aficionados, que suelen tener un elevado nivel de conocimientos. Aparte de esto, los taxónomos siempre deben recurrir al estudio directo del material guardado en los distintos herbarios.

Tras un proceso adecuado de documentación, debe comenzarse a salir al campo para recolectar material. Para ello son necesarios, en primer lugar, los permisos de recolección y, en muchas ocasiones, de acceso a vehículos, debido al frágil carácter de los ecosistemas de alta montaña y al control que deben llevar desde Parques Nacionales. En lo que respecta al material, llevamos en la mochila cajas de plástico con compartimentos, navaja y tijeras de podar, cuentahilos, y un GPS o una aplicación en el móvil (ZamiaDroid en mi caso) para obtener los datos de recolección.

A continuación, en el laboratorio, una vez que el sustrato sobre el que están los Myxos se ha secado, se pegan muestra y sustrato con cola en cartulinas que se adecúan al tamaño de las cajitas de cartón de las que disponemos. Se anotan los datos de recolección en la tapa de la cajita de cartón y se deja secar la cola para estudiarlos posteriormente.





En primer lugar, se lleva a cabo un estudio macroscópico con la lupa binocular o estereomicroscopio. Con este estudio podremos, en algunas ocasiones, determinar la especie que hemos recogido, pero siempre es recomendable realizar una preparación fija para microscopio. De esta forma, nos aseguramos de que estamos frente a la especie que pensábamos y no frente a una nueva y desconocida especie.



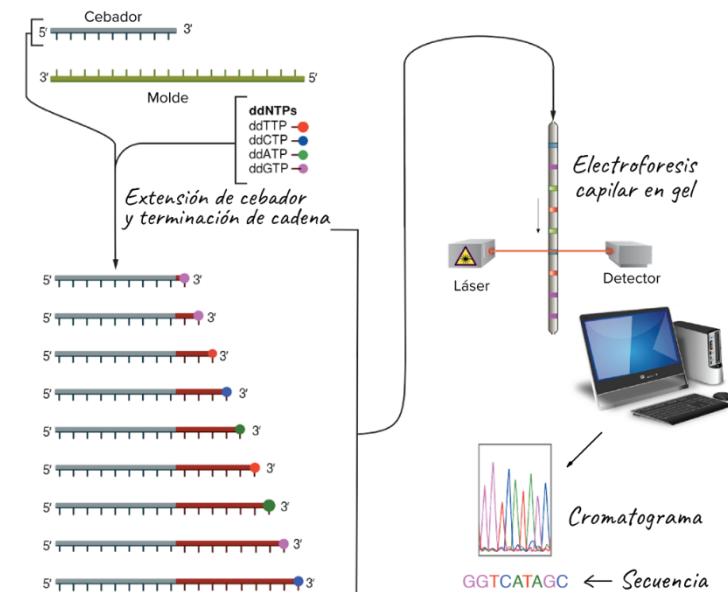
Después se realiza el estudio microscópico, tanto al microscopio óptico como al electrónico de barrido (MEB, o SEM en inglés). Para microscopía óptica se realizan preparaciones fijas semipermanentes en medio de Hoyer, que perduran cientos de años y evitan la ruptura innecesaria de material. En cuanto al MEB, el tratamiento que recibe la muestra es más complejo y requiere de la técnica del punto crítico, con la que las esporas recuperan su forma original (normalmente globosa). Las imágenes obtenidas muestran la ornamentación esporal, vital en la determinación de los Myxomycetes, además de su diámetro.



Actualmente la biología molecular está a la orden del día en lo que a taxonomía y determinación de especies se refiere. Desde mi punto de vista, estas técnicas deberían ser complementarias a la taxonomía y determinación clásicas. Las técnicas moleculares son costosas y requieren deservoltura tanto en el manejo de material de laboratorio como de informática y bioestadística. En primer lugar, debe homogeneizarse la muestra para extraer con kits comerciales el ADN de las esporas de los Myxos nivales. El ADN debe guardarse en congeladores a una temperatura máxima de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, con lo que se evita su degradación. En segundo lugar, el ADN se amplifica a través del método de la PCR (Polimerase Chain Reaction, o reacción en cadena de la polimerasa), para lo cual es necesario un kit de PCR y un termociclador. Debe comprobarse después que el ADN se ha amplificado correctamente, para lo cual se realiza una electroforesis en gel de agarosa, cuyos resultados se visualizan con luz ultravioleta en una cámara oscura o transiluminador. Finalmente, se purifica el ADN amplificado para limpiar posibles impurezas, y se secuencia.

Los resultados de la secuenciación consisten en archivos informáticos que incluyen un cromatograma y la secuencia de nucleótidos del ADN en forma de texto plano. Para trabajar con ellos pueden utilizarse distintos programas gratuitos y servidores en línea también gratuitos, además de ser muy útiles los datos ya almacenados en bases de datos en línea (NCBI). Las secuencias obtenidas deben limpiarse con un editor de secuencias y, después, alinearlas buscando bases repetidas en las distintas secuencias. Esto nos va a dar una información previa relevante, ya que nos permite ver posibles errores cometidos a través de la taxonomía clásica.

Tras el alineamiento de las secuencias, se añade un *outgroup* o grupo externo que sirve de raíz y referencia en el árbol. Los árboles que se obtienen son distintos en función de los parámetros y umbrales que nosotros consideremos oportunos. Finalmente, los árboles dan una información detallada de las relaciones filogenéticas entre las especies.



<https://es.khanacademy.org/science/biology/bio-tech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/dna-sequencing>

