EFECTIVIDAD DEL GEN ITS (CÓDIGO DE BARRAS) EN LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE LA LÍQUENOBIOTA DEL ALTO EL TABLAZO, SUBACHOQUE.

DANIELA LUCÍA RIVERA RUBIANO

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.
2017

EFECTIVIDAD DEL GEN ITS (CÓDIGO DE BARRAS) EN LA DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE LA LÍQUENOBIOTA DEL ALTO EL TABLAZO, SUBACHOQUE.

DANIELA LUCIA RIVERA RUBIANO

Plan de trabajo de Investigación – Innovación para optar al título de Licenciado en Biología

Director
Dra. BIBIANA MONCADA

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CLADAS
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA
BOGOTÁ D.C.
2017

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN 5
INTRODUCCIÓN 6
1. **MARCO TEÓRICO** 8
1.1. Generalidades de los líquenes 8
1.2. Inventarios Florísticos 9
1.3. Determinación clásica 9
1.4. Gen ITS en líquenes 10
1.5. OBJETIVOS 11
1.5.1. General 11
1.5.2. Específicos 12
2. **MATERIALES Y METODOS** **12**
2.1. Materiales o recursos 12
2.1.1. Reactivos para extracción y pcr 12
2.1.2. Equipos 12
2.2. Selección de área 13
2.2.1. Selección del transecto: 14
2.3. Recolección de material 14
2.4. Curaduría del material 14
2.5. Determinación clásica 14
2.6. Determinación por gen its 15
2.6.1. Extracción de ADN 15
2.6.2. Amplificación 16
2.6.3. Evaluación de los productos de amplificación por electroforesis: 17
2.6.4. Ciclo de secuenciación, limpieza de producto del ciclo de secuenciación y secuenciación: 19
2.7. Comparación de secuencias (blast) 19
2.8. Elaboración de guía de campo 20
3. RESULTADOS **20**
3.1. Determinación clásica 20
3.2. Comparación determinaciones 22
3.3. Guía rápida de campo 30
4. **ANÁLISIS DE RESULTADOS** **33**

CONCLUSIONES.....**33**
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....36

TABLA DE FIGURAS		
Figura 1.	Ubicación en el ADN nuclear y mitocondrial los cebadores de PCR.	10
Figura 2.	Electroforesis 1. BGBM	18
Figura 3.	Electroforesis 2. BGBM	18
Figura 4.	Hyperladder II^{TM} (Marcador molecular)	18
Figura 5.	Electroforesis 1. UDFJC	19
Figura 6.	Electroforesis 2. UDFJC	19
Figura 7.	Electroforesis 3. UDFJC	19
Figura 8.	Electroforesis 4. UDFJC	19
Figura 4.	Secuencia *Bunodophoron melanocarpum.*	20
Figura 5.	Formato Guía rápida Field Museum de Chicago.	20
TABLA DE IMÁGENES		
Imagen 1.	Paramo el Tablazo- Por María Rivera	14
TABLA DE GRÁFICOS		
Grafico 1.	Efectividad.	27
Grafico 2.	Tiempo invertido	28
Grafico 3.	Costos.	29
TABLAS		
Tabla 1.	Géneros y Autores trabajados.	15 - 16
Tabla 2.	*Master mix por tubo de acuerdo: BGBM; FM; UD.*	17
Tabla 3.	Estandarización PCR.	17
Tabla 4.	Cantidad de géneros y especies determinadas.	21
Tabla 5.	Comparación determinaciones.	22-23-24-25-26-27
Tabla 6.	Tiempo invertido.	28
Tabla 7.	Costos.	28

RESUMEN

Buscando evaluar la efectividad del uso del gen ITS Código de barras como herramienta en la determinación a especie de líquenes en inventarios florísticos, se realizó la recolección de 130 individuos en un minitransecto del Alto del Tablazo (Cundinamarca-Colombia.). Para la evaluación se realizó una comparación de determinaciones por tres métodos: 1) La determinación clásica realizada por un estudiante, 2) la determinación clásica hecha por un experto y la determinación por medio de la comparación en el Banco de Genética (GENBank) de las secuencias del Gen ITS código de barras. Para cada uno de los casos se evaluó el tiempo, la precisión de la determinación y los costos. Los resultados permiten inferir, que en cuanto al tiempo se nota un ahorro significativo con el método del Gen ITS código de barras, promoviendo asi la utilidad de este tiempo en investigaciones alternas o en procesos de enseñanza y preparación de futuros investigadores, para el caso de la precisión en la determinacion se reafirma la certeza frente los géneros presentados por los diferentes métodos pero en cuanto a las especies se posee un margen de incertidumbre debido al no compendio de todas las secuencias de líquenes existentes en el (GENBank), y por último en cuanto al costo se ve un aumento significativo en el desarrollo de la determinación por el Gen ITS. Con base en estos resultados se concluye que la efectividad del Gen ITS código de barras para la elaboración de inventarios florísticos es una herramienta muy buena que está sujeta a factores positivos como la disminución del tiempo invertido y precisión en la determinación; y negativos como aumento notable de costos y carencia de secuencias de código de barras de la totalidad de especies existentes en GENBank.

PALABRAS CLAVES: Parmotrema, líquenes de Colombia, Inventarios florísticos, Diversidad Alfa.

INTRODUCCIÓN

La determinación taxonómica vista inicialmente como producto de una valoración morfo- anatómica de los organismos biológicos, esta provista de diversas observaciones propuestas por el investigador; debido a esto pueden surgir variaciones en cuanto la aseveración de la taxonomía; partiendo de este principio se han realizado varios acercamientos moleculares para generar una mayor certeza frente a esta problemática, uno de estos avances ha sido la utilización del gen ITS conocido como Código de barras el cual provee una mayor exactitud frente a la determinación taxonómica; como prueba de la eficacia de dicho gen (Moncada et al, 2014) reportan la filogenia para el género *Sticta* en Colombia en la cual presentan aproximadamente 150 especies, utilizando como principal herramienta el gen ITS, mostrando además que los caracteres morfológicos no siempre son el resultado de procesos evolutivos aislados, sino que las especies de este género adoptan morfodemas que evolucionan de forma independiente, haciendo que existan denominaciones como *Sticta fuliginosa* y *Sticta weigelii* que agrupan cerca de 20 especies diferentes.

Partiendo de estas dos técnicas: Determinación Clásica, Determinación Gen ITS código de barras se busca obtener una amplia comparación frente a los aspectos de efectividad, costos y tiempos utilizados por cada uno de los mecanismos y por consiguiente la realización de inventarios que permitan saber y reconocer el estado de la líquenobiota presente en nuestro país.

Con este proyecto se desea contribuir al conocimiento taxonómico de la líquenobiota presente en el Páramo el Tablazo caracterizando y brindando una comparación frente a los métodos: Determinación Clásica y Determinación por Gen ITS código de barras; para esto se tomó un micro-transecto en el Páramo el Tablazo del cual se obtuvieron 127 muestras por medio de muestreo oportunísimo (Cáceres et al, 2008); las cuales fueron transportadas al Herbario Forestal Universidad Distrital (UDBC) sección criptógamas, posteriormente, las muestras se ubicaron en sobres de papel libre de ácido, con etiquetas del (UDBC) para su ingreso en la colección de la Universidad, luego se procedió a la determinación taxonómica por medio de claves dicotómicas; en cuanto a la Determinación por el Gen ITS código de barras, se realizó la extracción de la medula de las muestras colectadas, posteriormente fueron sometidas a extracción de ADN con el Kit: Extract- N-AMP-RED PLANT KIT SIGMA, luego se procedió a realizar la PCR; con el producto de esta se procedió a amplificar el ADN por medio de la electroforesis, y por ultimo para el proceso de secuenciación las muestras que amplificaron fueron enviadas a Macrogen, al recibir las secuencias arrojadas se procedió a compararlas con el programa Blast el cual contiene gran cantidad de secuencias que permitieron saber a qué especie de liquen pertenecían las muestras colectadas.

Por último, se procedió a realizar la comparación entre los diferentes resultados arrojados, comparando así tres factores principales: Tiempo invertido, Costos, y Efectividad, los resultados arrojaron la determinación clásica de 130 individuos correspondientes a 6 familias 22 géneros y 76 especies, luego se compararon las determinaciones realizadas por

los expertos Bibiana Moncada y Harrie Spman ; el estudiante y el Gen ITS código de barras, mostrando muy poca coincidencia entre las diferentes determinaciones, debido a la inexperiencia presentada por el estudiante y mayor coincidencia frente a los experto teniendo en cuenta el tiempo de estudio realizado por años y a la falta de totalidad de las especies secuenciadas frente a las registradas hasta la actualidad; seguido de esto se evalúa el factor tiempo invertido por cada uno de los métodos siendo el Gen ITS código de barras el que emplea el menor tiempo posible, aunque sea un factor subjetivo sujeto a factores negativos que implican su utilización en la determinación; como la falta de estabilidad en la energía utilizada en la electroforesis ; por último se compara el factor costos siendo el Gen ITS el que necesita de una mayor inversión económica por los reactivos empleados y el avaluó de los equipos a utilizar así mismo el proceso de secuenciación debido a que no pudo ser realizado dentro de los espacios de la Universidad sino que fueron remitidas a un agente externo en este caso Macrogen.

Al relacionar los tres factores se analizó que la efectividad brindada por el Gen ITS código de barras para realizar inventarios florísticos es un valioso mecanismo, aunque se encuentre ceñido a variables tanto positivas, en cuanto a la precisión de la determinación y el tiempo invertido; y negativas como el aumento en los costos y la carencia de secuencias de código de barras de la totalidad de especies existentes GENBank.

Se concluye que la iniciativa de promover trabajos como este; que permiten la elaboración de inventarios florístico por medio del Gen ITS código de barras; posibilita tener mayor certeza frente a la determinación, siendo así más fiable y generando parámetros importantes para futuras investigaciones como el fortalecimiento en las secuencias encontradas en las diferentes bases de datos.

1. MARCO TEORICO

1.1. GENERALIDADES DE LOS LÍQUENES

Los líquenes son seres simbióticos conformados por dos o tres organismos pertenecientes a reinos biológicos diferentes, su composición radica en un organismos micobionete (hongo) y 1 o 2 fotobiontes (cianobacterias o algas) (Nash, 2008). Dicha relación es considerada como mutualismo debido a que existe un beneficio mutuo entre los organismos que lo componen, aunque se ha visto como parasitismo por parte del hongo debido a que este se alimenta de los carbohidratos generados por el fotobionte lo cual implica un mayor tiempo para su crecimiento (Ahmadjian, 1993). Pero en ocasiones se ha visto que esta simbiosis le permite al alga y al hongo vivir en lugares en los cuales sería imposible su supervivencia de forma aislada, permitiéndoles así una amplia posibilidad de adaptación (Morales et al, 2003).

La unión de estos organismos no es meramente física sino también química, debido a que el hongo es el encargado de absorber gran cantidad de productos que posibilitan el funcionamiento del alga y, por tanto, asegura el flujo de productos de la fotosíntesis. A su vez el hongo se encarga de la producción de metabolitos secundarios los cuales van a proveer protección al líquen; dichos metabolitos en ocasiones solo pueden generarse en presencia del alga (Huneck & Yoshimura, 1996).

A pesar de la gran diversidad de comunidades liquénicas en el trópico y en américa latina, han sido estudiadas de manera poco atenta por parte de la comunidad científica, a diferencia de las regiones templadas como Norteamérica y Europa que registran un estudio abundante e histórico sobre estos organismos, en contraste con la baja diversidad de estos en estas tierras (Purvis O. , 1992) .

En la actualidad se conocen 19.387 especies para el mundo, distribuidas en 995 generos,115 familias y 39 ordenes (Lücking et al, 2016) donde todas acuden a innumerables formas, variados tamaños (desde diminutos microlíquenes hasta unos cortos metros) y gran cantidad de colores (Purvis W. , 2000). De esta gran cantidad de especies de líquenes se han podido conocer varias sustancias químicas con diferentes propiedades, entre ellas cosmetológicas y farmacéuticas entre muchas otras (Brodo et al, 2001).

En cuanto a la importancia de estudio de estas comunidades, partiendo de la gran extensión en la superficie terrestre haciéndose cada vez más grande debido a los nuevos descubrimientos que se generan constantemente; a partir de los años 70 los líquenes han sido reconocidos como organismos con gran sensibilidad a los cambios antrópicos que se dan en su entorno; debido a la gran distribución que los caracteriza desde ecosistemas urbanos y

naturales hasta hábitats extremos como desiertos; la capacidad que poseen de crecer en gran cantidad de sustratos y la larga duración de sus ciclos de vida, los han convertido en un grupo llamativo para la valoración del ambiente principalmente en la calidad del aire (Nimis et al, 2002).

1.2. INVENTARIOS FLORÍSTICOS

Los inventarios florísticos son los encargados de cuantificar las especies presentes en un territorio, además de la distribución de estas especies, (Noss, 1990) (València, 2017) siendo de vital importancia para el conocimiento de la biodiversidad de un terreno determinado, y apoyando las estrategias para la conservación de dichos terrenos.

La información arrojada por los inventarios permite evaluar los grados de conservación, cambios ecológicos y biológicos y por tanto una estimación de la biodiversidad faltante por inventariar (Alvarez et al, 2004) además de ser procesados para la aplicación en estudios biogeográficos, sistemáticos, ecológicos entre otros.

En cuanto a la realización de inventarios florísticos se busca la utilización de metodologías estandarizadas que permitan la repetición en variados terrenos e incluso con diversos investigadores (anterior a la toma de datos es de gran importancia tener claro el método de muestreo, la unidad de muestreo, la muestra y el esfuerzo implicado en el muestreo) (Alvarez et al, 2004) en segunda instancia se requiere que el muestreo proporcione información representativa, en ocasiones es necesario la utilización de metodologías complementarias que permitan abarcar de mejor manera el lugar de estudio. (Alvarez et al, 2004)

1.3. DETERMINACIÓN CLÁSICA

La determinación clásica inicio con (Acharius, 1803) dándole una organización debido a su hábito de crecimiento y la variación de los cuerpos fructíferos; seguido de su estudiante (Nylander, 1858), mejorando su clasificación con la utilización de microscopios mostrando dos tipos de algas, y lo clasifica entre los hongos y las algas agregando a los caracteres las formas de reproducción; los denomina clase y lo encierra en diversas familias; continuando (Zahlbruckner, 1907) recolecta información de los líquenes del mundo y realiza un catálogo universal conservando varios de los caracteres ya mencionados y clasificándolos en clases y subclases, años más adelante (Henssen & Jahns, 1974) realizan una publicación histórica sobre su forma, clasificación, tipo de crecimiento, tipo de estructuras reproductivas entre otros caracteres; con la caracterización anatómica y morfológica de las estructuras de los líquenes (Barreno & Rico, 1984) se realizó una recopilación de varios conceptos

referentes a diversas estructuras, además de aportar varios términos a los vocablos de la liquenología.

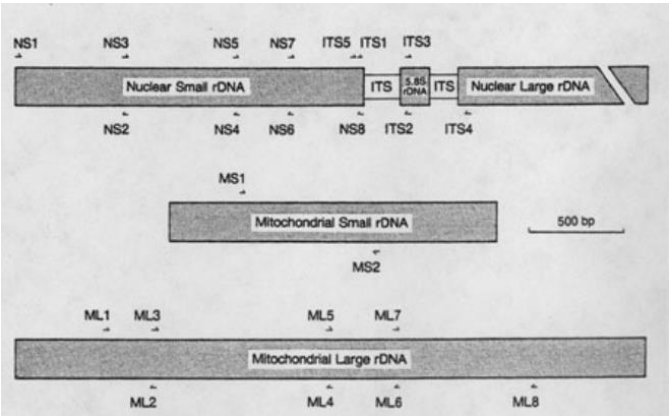
Partiendo de esto se han logrado varios avances que inicialmente solo podían agruparlos como líquenes y que actualmente, permiten la diferenciación de la mayoría de géneros pertenecientes a los líquenes; además de aportar a la elaboración de diversos inventarios que contribuyan al reconocimiento adecuado de las especies de líquenes en diversos lugares, como los presentados en (LijteRoff et al, 2009) tomando 6 áreas en el centro de la Ciudad de San Ángel, Argentina; y a su vez seleccionando diferentes forofitos en los cuales se realizó un muestreo selectivo sobre la presencia o ausencia de diferentes líquenes.

1.4. GEN ITS EN LÍQUENES

El Gen ITS o Internal Transcribed Spacer o Espaciador Transcrito Interno hace referencia al espaciador situado entre el ADN y el ARN ribosómico; a razón de esto se realizaron dos primers Taxón-selectivo para dicha región; estos cebadores ITS1-F e ITS4-R que son específicos para Hongos (Gardes & Bruns, 1993); los cebadores ITS hacen uso de regiones conservadas de los genes rRNA 18s; 5.8s y 28s para amplificar las regiones no codificantes entre ellas.

Para la corroboración de su eficiencia fueron probados frente a 14 especies de basidiomicetes, 15 plantas y 13 ascomicetes, estudio en el cual se observó cuando la región ITS4 se emparejaba con un cebador específico para hongos se amplifico efectivamente el ADN de todos los basidiomicetes discriminando el ADN de los ascomicetes (Gardes & Bruns, 1993).

Figura 1. Ubicación en el ADN nuclear y mitocondrial los cebadores de PCR tomado de: (White et al,1990)



Para la determinación eficaz de los líquenes se han implementado nuevos métodos como la utilización del gen ITS (código de barras) el cual ha permitido el descubrimiento de especies cripticas y algunas divergencias genéticas (Crawford et al, 2011); actualmente se considera la utilización del Gen ITS código de barras como un complemento en la determinación correcta de las especies sin dejar de lado la determinación clásica por medio de caracteres morfo-anatómicos y químicos (Moncada et al, 2014).

Inicialmente la técnica de análisis molecular por medio del gen ITS fue usada para la clasificación filogenética en angiospermas, (Baldwin, 1993) debido a que se encuentran altamente expresados en el genoma y por esto se posibilita la amplificación con pequeñas porciones de ADN, además de que las secuencias se encuentran muy conservadas y por tanto son muy útiles para el diseño de "primers universales" facilitando la amplificación en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Liston et al, 1996).

El estudio que permitió la unificación del Gen ITS código de barras para la determinación en el segundo reino más grande de los eucariotas, Fungí; fue el realizado partiendo de 6 regiones específicas del ADN entre las cuales se encontró la región del espaciador transcrito interno (ITS) teniendo este la mayor probabilidad de determinación exitosa para el rango taxonómico más alto en hongos (Schoch et al, 2012).

Partiendo de esto surgen distintos estudios más cercanos al presente; estudios en los cuales se evaluó la efectividad de los cebadores ITS (ITS1F e ITS4) en cuanto a la amplificación de la PCR corroborando un éxito total de las secuencias de las especies de hongos analizadas (Manter & Vivanco, 2007)

Uno de los casos particulares referente a especies cripticas (Steven et al,2013) fue desarrollado con la especie *Rhizoplaca melanophthalma* determinando por medio del gen ITS la distancia tanto filogenética como fitogeográfica presente en esta especie y dando como resultado 5 nuevas especies; *R. occulta, R. pirilis, R. polimorpha, R. porterii, R. shushanii* las cuales fueron sustentadas en una posterior base de datos con sus respectivas secuencias.

1.5. OBJETIVOS

1.5.1. General

Determinar la efectividad del gen ITS código de barras en el reconocimiento de la diversidad Alfa del páramo El Tablazo, Subachoque.

1.5.2. Específicos

Determinar los líquenes encontrados en el área de estudio bajo el sistema de clasificación clásica, utilizando claves especializadas basadas en el estudio de caracteres morfológicos, anatómicos y químicos.

Obtener secuencias del gen ITS (código de barras) de las muestras recolectadas, utilizando los primers especializados para hongos ITS1F e ITS4.

Comparar los resultados de la determinación clásica y las pruebas de ITS como gen código de barras en cuanto a tiempo, costos y efectividad.

Elaborar una guía rápida de campo de las especies determinadas de manera clásica y corroboradas mediante gen ITS (código de barras).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES O RECURSOS

2.1.1. Reactivos para extracción y PCR

A. Kit: Extract- N-AMP-RED PLANT KIT SIGMA

B. PCR clásica:

Taq Polimerasa Bioline
H_2O destilada
$MgCl_2$ PCR
Buffer PCR
DNTPs PCR
Primer ITS1F (forward) (Gardes & Burns 1993)
Primer ITS 4 (reverse) (White et al.1990)
Tampón Tris, Borato y EDTA TBE 1X
GelRed™.
Agarosa
Marcador de peso molecular Hyperladder II™

2.1.2. Equipos

MICROPIPETAS 5µL, 20 µL, 200 µL,1000 µL
Centrifuga eppendorf®
Termociclador Esco®

Nanodrop 2000®
Vortex Boeco
Nevera -20° Panasonic
Fuente de poder electroforesis Bio-rad®
Documentador de geles Bio-rad®
Microscopio Óptico Leica
Estereoscopio Óptico
GPS Garmin

2.2. SELECCIÓN DE ÁREA

El alto El Tablazo, ubicado en 5° 0' 39,55" N 74° 12' 22,15" W, en la vereda Paramo del municipio de Subachoque, Cundinamarca, hace parte del complejo de paramos Guerrero, el cual contiene un total 42.329 ha (Sarmiento et al, 2013).

La región se caracteriza por tener temperaturas promedio de 10°C, manteniendo los índices de precipitación de la sabana de Bogotá con dos periodos de lluvia (Abril-Junio y Octubre-Diciembre) y dos secos (Enero-Marzo y Julio- Septiembre) (Montero & Ortiz, 2013) presentando alturas entre 3200 hasta los 3450 msnm.

En cuanto a la vegetación predominan familias de Asteraceae, Ericaceae, Rosaceae, Melastomataceae y Rubiaceae identificando como especies dominantes, *Espeletiopsis corymbosa*, *Espeletia chocotana*, *E. cayetana*, *E. barclayana* siendo endémicas de la región. (Montero & Ortiz, 2012)

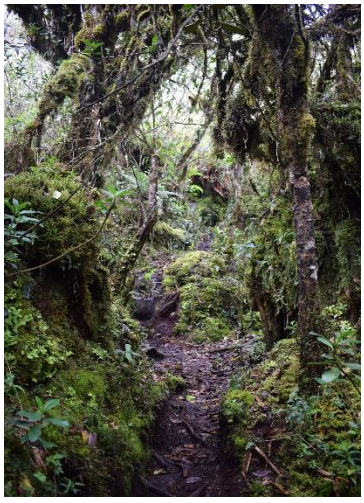




Imagen1. Paramo el Tablazo- Por María Rivera

Para la elaboración de este trabajo, se tomó un micro transecto en el área de estudio, para realizar una prueba diagnóstica de la eficacia del gen ITS (código de barras) frente a la determinación clásica

2.2.1. Selección del transecto:

Por ser un trabajo primero en su género en el cual se utiliza el Gen ITS (código de Barras) como elemento para la determinación de la biota liquénica de un sector, se planteó realizarlo en un minitransecto de 50 metros longitudinales a largo de un camino ya existente, entre los 3.439 y 3.494 m alt.

2.3. RECOLECCIÓN DE MATERIAL

La colecta del material liquénico se realizó de manera representativa, siguiendo la metodología de muestreo oportunístico de (Cáceres et al, 2008), a lo largo de todo el transecto. En lo posible se recolecto el mayor número de especies presentes en el área de estudio, teniendo como propósito evitar la repetición de especies a colectar.

Las muestras se recolectaron en bolsas de papel kraft, tomando nota de caracteres que se puedan perder (luminosidad, humedad, sustrato, coloración, asociaciones con otros organismos).

2.4. CURADURÍA DEL MATERIAL

Una vez se recolectaron las muestras, fueron transportadas al Herbario Forestal Universidad Distrital (UDBC) sección criptógamas, donde fueron sometidas a un proceso de deshidratación y limpieza. Posteriormente, las muestras se ubicaron en sobres de papel libre de ácido, con etiquetas del (UDBC) para su ingreso en la colección de la Universidad.

2.5. DETERMINACIÓN CLÁSICA

Para la determinación clásica se hicieron las observaciones correspondientes a los caracteres anatómicos, morfológicos y pruebas químicas (C, K, P, KC, I) necesarias. De igual manera se utilizaron claves taxonómicas genéricas tales como (Sipman, 2005) (Barreno & Pérez-Ortega, 2003) y para especie de cada una de las muestras colectadas.

Inicialmente las muestras fueron determinadas al taxón género, (Sipman, 2005) partiendo de su hábito de crecimiento y sustrato; luego de esta primera clasificación, de acuerdo al género perteneciente de las muestras fueron clasificados con claves dicotómicas, evaluando las estructuras reproductivas, coloración, estructuras de fijación al sustrato, coloración, reacciones químicas entre otras; dejando como resultado una determinación morfo- anatómica con registro fotográfico de cada uno de las muestras estudiadas.

Tabla 1. Géneros y Autores trabajados

Géneros	Autor
Bunodophoron	Wedin (2001)
Cladia	Sipman H. (1997)
Cladonia	Ahti & Sipman (2013)
Cora	Lücking R. et al (2013)
Dibaeis	Sipman H. (1997)
Dictyonema	Lücking et al (2013)
Everniastrum	Sipman H. (1986)
Glossodium	Sipman H. (2005)
Herpothallon	Aptroot et al (2009)
Hypotrachyna	Sipman H. (1998)
Leprocaulon	Lamb & Ward (1974)
Leptogium	Cunha (2007)
Pannaria	Jorgensen (2004)
Parmotrema	Sipman H.(2005)
Peltigera	Vitikainen (1998)
Phyllobaeis	Sipman H. (1997)
Pseudocyphellaria	Galloway (1986)
Stereocaulon	Sipman H. (2002)
Sticta	Moncada B. (2012)
Usnea	Truong & Clerc (2012)
Yoshimuriella	Yoshimura I. (1998)

2.6. DETERMINACIÓN POR GEN ITS

2.6.1. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Distrital. Para la extracción de DNA se realizó un raspado en el córtex de líquen; exponiendo la médula de este luego se extrajo un fragmento. La extracción del material genético de las muestras seleccionadas se realizó con el Kit: Extract- N-AMP-RED PLANT

KIT SIGMA comercial siguiendo las indicaciones de la casa comercial, se utilizó este Kit debido a que no requiere tampones de carga ni colorantes de seguimiento para el análisis del gel, además de ser compatible con los requisitos de rendimiento para el análisis genético de plantas para este caso específico de líquenes.

2.6.2. Amplificación

Las amplificaciones se hicieron en dos laboratorios diferentes, debido principalmente a la falta de reactivos para el desarrollo de esta, continuando con dificultades en la energía que debía ser estable en las instalaciones de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas; por tanto las muestras se llevaron en la temporada de vacaciones (tiempo que se pidió con anterioridad) al BGBM (Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin) laboratorio en el cual se logró la amplificación de gran parte de las muestras, tan solo 31 no fueron amplificadas. Luego de recibir los reactivos y de varios intentos se logró realizar la amplificación de las 31 muestras faltantes Universidad Distrital.

Se realizó protocolo de reacción en cadena de la polimerasa, con el producto de la extracción, utilizando como primer forward ITS-1F (Gardes & Bruns, 1994) y como reverse ITS 4 (White et al.1990). Las fórmulas de mezcla maestra variaron de acuerdo con el lugar en el cual fueron desarrolladas como se indica (Tabla 2.).

Estas variaciones reflejaron mejores resultados en la amplificación de las muestras enviadas al BGBM debido particularmente a la utilización de mayor cantidad de µl de DNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) y Taq polimerasa.

Tabla 2. *Master mix por tubo de acuerdo: BGBM; FM; UD*

Reactivos	**Volumen por tubo (BGBM)**	**Volumen por tubo (FM)**	**Volumen por tubo (UD)**
H_2O	14,4 µl	13,75 µl	15,5 µl
Buffer *10	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
$MgCl_2$ 25nM	1,0 µl	2 µl	1,25 µl
DNTPs	3,0 µl	0,5 µl	0,5 µl
Primer F	1 µl	2,5 µl	1,5 µl
Primer R	1 µl	2,5 µl	1,5 µl
Taq	0,1 µl	0,25	0,25 µl
DNA	2 [1:10] µl	1 µl	2 µl
Total	**25** µl	**25** µl	**25** µl

Posteriormente cada muestra fue llevada al termociclador en el cual se realizan una serie de ciclos a variadas temperaturas para poder observar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) procedimiento que permitió centrar su aplicación en la secuenciación de las muestras a trabajar. (Ver Tabla 3.)

Tabla 3. Estandarización PCR

Temperatura	**Tiempo**	**Reacción**
94°C	5min	Desnaturalización (Separación de las dos cadenas de ADN)
94°C	30 seg	
48°C	30 seg	Alineamiento (unión de los primers a las moléculas de ADN que están separadas)
72°C	1:30 min	Alargamiento (La Taq polimerasa comienza a sintetizar la doble cadena de ADN a los cuales se adhirieron los primers)
72°C	5min	
4°C	Para siempre	

2.6.3. Evaluación de los productos de amplificación por electroforesis:

Para el análisis y caracterización de ácidos nucléicos se ha implementado la electroforesis en geles de agarosa los cuales son como un tamiz molecular permitiendo separar moléculas de acuerdo a su tamaño forma y función. (Tiselius, 1937)

Para este estudio los productos de la PCR fueron valorados por medio de geles de agarosa 1.5%, adicionando 1,5 µl de GelRed™ para teñir el DNA y por consiguiente revelar su posición en el gel, se utilizó como marcador de peso molecular Hyperladder II™ de la empresa Bioline® el cual produce un patrón de 15 bandas espaciadas regularmente que van de 50 a 2000 pb (pares de bases) presentando mayor intensidad en las bandas 300, 1000 y 2000 ; para la separación de las moléculas se empleó una fuente de poder *Bio-rad*® a 120 V y 60 mA durante 40 minutos; por último, se tomó registro fotográfico bajo luz ultra violeta por el documentador de geles *Bio-rad*®.

Inicialmente se muestran las amplificaciones realizadas en el BGBM de la totalidad de muestras, evidenciando el despliegue del marcador molecular y así mismo la amplificación exitosa de 96 muestras; posteriormente se observa el registro fotográfico de las 31 muestras faltantes que fueron realizada en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad.

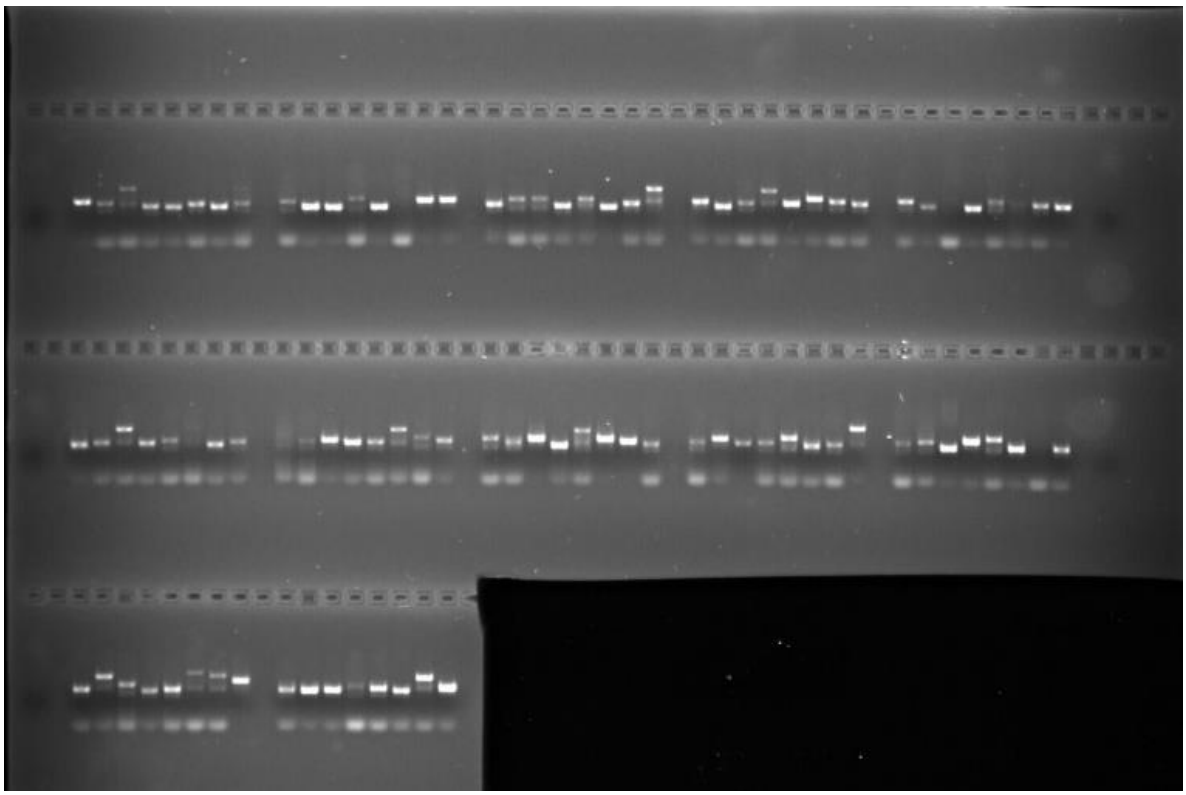


Figura 2. Electroforesis 1 BGBM

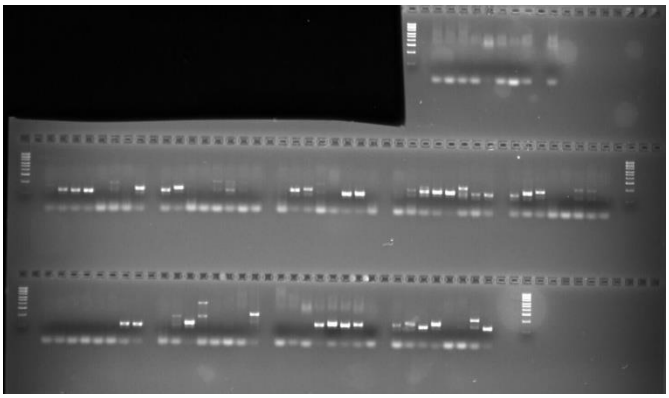


Figura 3. Electroforesis 2 BGBM



Figura 4. Hyperladder II™ (Marcador molecular)

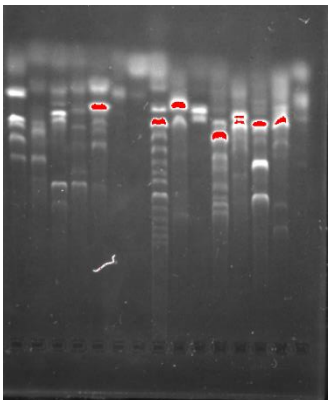


Figura 5. Electroforesis 1 UDFJC

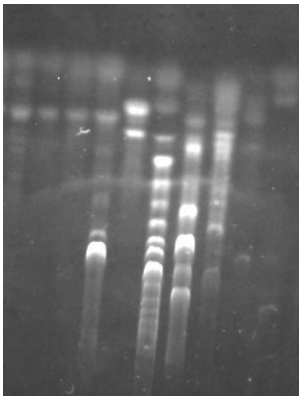


Figura 6. Electroforesis 2 UDFJC

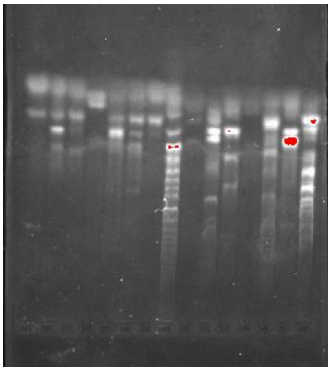


Figura 7. Electroforesis 3 UDFJC

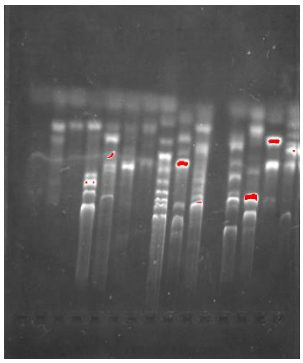


Figura 8. Electroforesis 4 UDFJC

2.6.4. Ciclo de secuenciación, limpieza de producto del ciclo de secuenciación y secuenciación:

Estos procesos se llevaron a cabo en la empresa Macrogen, donde se enviaron 10 ul de producto de PCR de cada una de las muestras que dieron positivo en la electroforesis.

2.7. COMPARACIÓN DE SECUENCIAS (BLAST)

A continuación se compararon las secuencias arrojadas por MACROGEN, las cuales son tomadas en su totalidad sin realizar ningún tipo de limpieza o modificación; posteriormente fueron corroboradas con las registradas en la herramienta online Blast® (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) arrojando por ultimo las determinaciones obtenidas luego del ciclo de secuenciación.

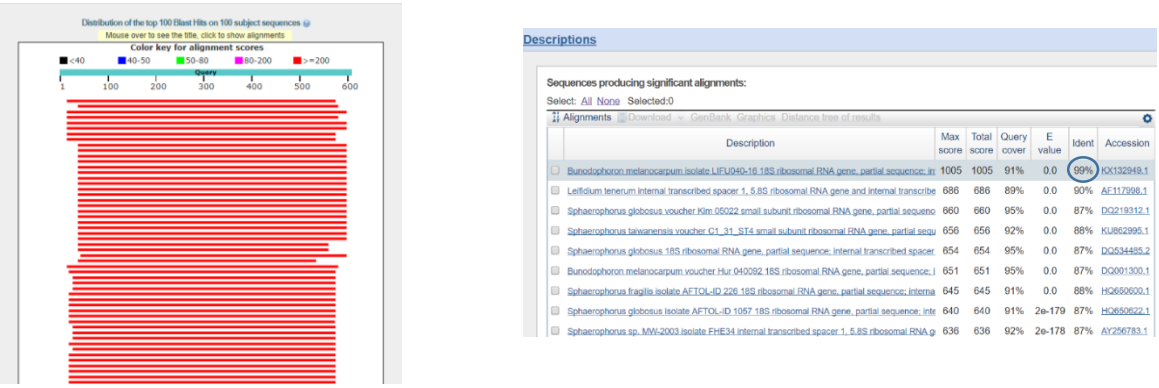
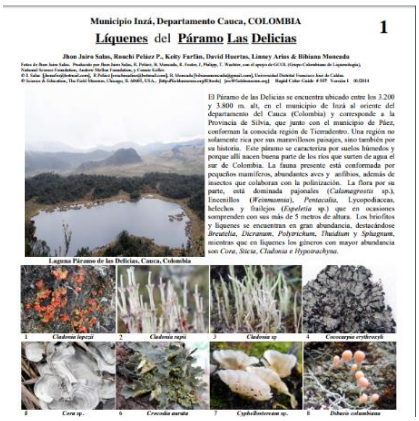


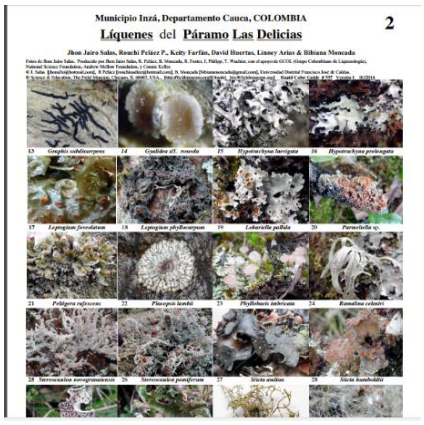
Figura 4. Secuencia *Bunodophoron melanocarpum*

2.8. ELABORACIÓN DE GUÍA DE CAMPO

Siguiendo el formato del Field Museum de Chicago, se realizó una guía rápida de campo con los resultados de la comparación anterior. Dicha guía se realizó con fotografías en campo y en el laboratorio.

Figura 5. Formato Guía rápida Field Musseum de Chicago





3. RESULTADOS

3.1. DETERMINACIÓN CLÁSICA

Se realizó la determinación de 127 individuos correspondientes a 6 Familias 22 géneros diferentes, conteniendo a su vez 72 especies (Ver tabla 4.)

Tabla 4. Cantidad de géneros y especies determinadas

Géneros	Especies por genero
Bunodophoron	*B. melanocarpum (5)*
Cladia	*C. aggregata (2)*
Cladonia	*C. secundana (8); C. corallifera (1); C. ahtii (1); C. meridionalis (1); C. miniata (1); C. calycantha (1); C. flagellaris (1); C. squamosa (1); C. divaricata (1); C. subcoriosa (3); C. chimantae (1); C. leprocephala (1) ; C. granulosa (1); C. rappi (1)*
Cora	*C. casanarensis (2); C. arachnoidea (1)*
Dibaeis	*D. columbiana (1)*
Dictyonema	*D. giganteum (2)*
Everniastrum	*E. cirrhatum (3); E. columbiense (2); E. vexans (1)*
Glossodium	*G. aversum (2)*
Herpothallon	*H. globossum (1)*
Hypotrachyna	*H. physodalica (2); H. sinuosa (3); H. dactylifera (1); H. costarricensis (1); H. sinuosella (2); H. velloziae (2); H. divaricata (1); H. endoclora (1); H. protochlorina (1); H. spinulosa(1) ; H. physcicoides (1); H. protoboliviana (1)*
Leprocaulon	*L. microsporum (1) ; L. subalbicans (1)*
Leptogium	*L. laceroides (1); L. decipiens (1); L. rugulosum (1); L. ulvaceum (1); L. foveolatum(1); L. phyllocarpum (1); L. azureum (1)*
Pannaria	*P. andina (1); P. rubiginosa (2)*
Parmotrema	*P. chinense (2); P. rampoddense (1);P.mellissii (1)*
Peltigera	*P. rufescens (1); P. horizontalis (1); P. dolchorrhiza (3); P. polydactyla (2)*
Phyllobaeis	*P.imbricata (2)*
Pseudocyphellaria	*P. mallota (1)*
Stereocaulon	*S. strictum (1)*
Sticta	*S. macrofuliginosa (1); S. macrocyphellata (1); S. pseudolobaria (2); S. dioica (1); S. andina (3); S. andensis (1); S. lumbschiana (2); S. lobarioides (5); S. pulmonarioides (1); S. plumbeociliata (1); S. rhizinata (2); S. dioica isidiada (1)*
Usnea	*U. transitoria (1); U. angulata (3);U. ceratina (1); U. subdasaea (1)*
Yoshimuriella	*Y. peltigera (2); Y. flendleri (1); Y. subcorrosa (1); Y. subdissecta (1)*

3.2. COMPARACIÓN DETERMINACIONES

Para la fase de comparación de las determinaciones se tomaron los datos arrojados por la determinación del estudiante, el aporte de las determinaciones de expertos en algunos de los géneros: *Sticta (Bibiana Moncada); Cladonias (Harrie Spman)*; y por último los resultados arrojados de la secuenciación del Gen ITS; realizando así una tabla comparativa (Ver tabla 5.)

Tabla 5. Comparación determinaciones

Muestra	Estudiante	Experto	ITS/Sec	Gen ITS /Blast >98
1	*Peltigera rufescens*	*Peltigera membranacea*	X	*Peltigera pulverulenta*
2	*Usnea transitoria*		X	*Hongos sin cultivar*
3	*Parmotrema chinense*	*Parmotrema dilatatum*	X	*Parmotrema xanthinum/ Parmotrema madagascariaceum*
4	*Sticta macrofuliginosa*	*Sticta albocyphellata*	X	*Sticta brevior*
5	*Sticta macrocyphellata*	*Sticta andina*	X	*Sticta andina*
6	*Bunodophoron melanocarpum*	*Bunodophoron melanocarpum*	X	*Bunodophoron melanocarpum*
7	*Sticta pseudolobaria*	*Sticta pseudolobaria*		
8	*Hypotrachina physodalica*	*Hypotrachyna galbanica*	X	*Hypotrachyna bogotensis*
9	*Hypotrachyna sinuosa*		X	*Hypotrachyna sinuosa*
10	*Sticta dioica*	*Sticta rhizinata*	X	*Sticta rhizinata*
11	*Yoshimuriella peltigera*		X	*Lobaria subdissecta*
12	*Leptogium laceroides*	*Leptogium ulvaceum*		
13	*Sticta andina*	*Sticta andina*	X	*Sticta andina*
14	*Bunodophoron melanocarpum*	*Bunodophoron melanocarpum*		
15	*Peltigera horizontalis*	*Peltigera horizontalis*	X	*Peltigera dolichorrhiza*
16	*Peltigera dolichorrhiza*	*Peltigera neopolydactyla*	X	*Peltigera sp1*
17	*Sticta andensis*	*Sticta aff impressula*	X	*Sticta pulmonariodes*
18	*Cladonia secundana*	*Cladonia squamosa*	X	*Cladonia cenotea/ Cladonia squamosa*

19	*Cladonia secundana*	*Cladonia scabriuscula*	X	*Cladonia cenotea*
20	*Sticta lumbschiana*	*Sticta lumbschiana*	X	*Sticta lumbschiana*
21	*Usnea angulata*		X	*Ptenothrix monochroma*
22	*Sticta andina*	*Sticta andina*	X	*Sticta andina*
23	*Bunodophoron melanocarpum*	*Bunodophoron melanocarpum*	X	*Bunodophoron melanocarpum*
24	*Sticta lobarioides*	*Sticta lobariodes*	X	*Hongos sin cultivar*
25	*Hypotrachyna dactylifera*	*Hypotrachyna laevigata*	X	*Basidiomycota sp4 / Hongos sin cultivar*
26	*Sticta lumbschiana*	*Sticta lumbschiana*	X	*Sticta lumbschiana*
27	*Bunodophoron melanocarpum*	*Bunodophoron melanocarpum*	X	*Bunodophoron melanocarpum*
28	*Cladonia secundana*	*Cladonia andesita*	X	*Cladonia sp*
29	*Peltigera dolichorriza*	*Peltigera dolichorrhiza*	X	*Peltigera evansiana/Peltigera canina*
30	*Leptogium decipiens*	*Leptogium phyllocarpum*	X	*Leptogium sp*
31	*Cladia aggregata*	*Cladia aggregata*	X	*Cladia aggregata*
32	*Hypotrachyna sinuosa*	*Hypotrachyna brevidactylata*	X	*Hypotrachyna sinuosa*
33	*Cladonia secundana*	*Cladonia scabriuscula*	X	*Cladonia cenotea*
34	*Hypotrachyna costaricensis*	*Hypotrachyna aff dactilifera*	X	*Hypotrachyna laevigata*
35	*Cladonia secundana*	*Cladonia andesita*	X	*Cladonia andesita*
36	*Sticta andina*	*Sticta andina*	X	*Sticta andina*
37	*Cladonia corallifera*	*Cladonia didyma/coccifera*	X	*Hongo sp*
38	*Cladonia ahtii*	*Cladonia granulosa*	X	*Cladonia granulosa*
39	*Hypotrachyna sinuosella*	*Hypotrachyna aff densirhizinata*	X	*Hypotrachyna imbricatula*
40	*Leprocaulon microscopicum*	*Leprocaulon alpin*	X	*Lepraria pacifica/Lepraria rigidula*
41	*Pannaria andina*	*Pannaria andina*	X	*Pannaria rubiginosa*
42	*Hypotrachyna sinuosella*	*Hypotrachyna densirhizinata*	X	*Hypotrachyna longiloba*
43	*Cladonia meridionalis*	*Cladonia andesita/otras*	X	*Cladonia subulata*
44	*Hypotrachyna velloziae*	*Hypotrachyna densirhizinata*	X	*Hypotrachyna longiloba*
45	*Everniastrum cirrhatum*		X	*Everniastrum nepalense / Hypotrachyna laevigata*
46	*Cladonia secundana*	*Cladonia sp*	X	*Cladonia sp*

47	*Sticta pseudolobaria*	*Sticta pseudolobaria*	X	*Sticta pulmonarioides*
48	*Hypotrachyna velloziae*	*Hypotrachyna laevigata*	X	*Hypotrachyna laevigata*
49	*Cladonia secundana*	*Cladonia meridensis/otras*	X	*Cladonia meridensis/otras*
50	*Usnea ceratina*		X	*Usnea nipparensis*
51	*Cladonia miniata*		X	*Cladonia glauca/ Cladonia coniocraea*
52	*Phyllobaeis imbricata*	*Phyllobaeis imbricata*	X	*Phyllobaeis imbricata*
53	*Everniastrum columbiense*		X	*Everniastrum nepalense /Hypotrachyna cirrhata*
54	*Cladonia calycantha*		X	*Cladonia subilata*
55	*Cladonia arbuscula*	*Cladonia confusa*	X	*Hongos sin cultivar / Cladonia rangiferina*
56	*Cladonia arbuscula*	*Cladonia arcuata*	X	*Cladonia arcuata*
57	*Cladonia arbuscula*	*Cladonia confusa*	X	*Hongos sin cultivar*
58	*Dibaeis columbiana*	*Dibaeis columbiana*	X	*Dibaeis arcuata / Dibaeis baeomyces*
59	*Dictyonema giganteum*	*Dictyonema giganteum*	X	*Dictyonema sp /Dictyonema sericeum*
60	*Yoshimuriella fendleri*	*Yoshimuriella subdissecta*	X	*Lobaria subdissecta /Lobaria cf. fendleri*
61	*Cladonia flagellaris*		X	*Cladonia subulata*
62	*Dictyonema giganteum*	*Dictyonema giganteum*	X	*Cora sp/ Dictyonema sericeum*
63	*Cora casanarensis*	*Cora terrestris*	X	*Cora aff applanda /Cora sp*
64	*Sticta pulmonariodes*	*Sticta pulmonarioides*	X	*Sticta pulmonariodes*
65	*Peltigera dolichorrhiza*	*Peltigera dolichorrhiza*	X	*Peltigera sp1*
66	*Cora casanarensis*	*Cora byssoidea*	X	*Cora arachnoidea*
67	*Everniastrum cirrhatum*	*Everniastrum cirrhatum*	X	*Everniastrum nepalense /Hypotrachyna cirrhata*
68	*Leptogium rugulosum*		X	*Leptogium sp*
69	*Sticta lobarioides*	*Sticta lobariodes*	X	*Sticta pulmonariodes*
70	*Sticta plumbeociliata*	*Sticta lobariodes*	X	*Sticta pulmonariodes*
71	*Parmotrema chinense*		X	*Parmotrema xanthinum/Parmotrema madagascariaceum*
72	*Usnea angulata*		X	*Usnea florida/Usnea intermedia*

73	*Hypotrachyna sinuosa*	*Hypotrachyna isolopezii/ pseudolopezii*	X	*Hypotrachyna sinuosa*
74	*Pannaria rubiginosa*	*Pannaria rubiginosa*	X	*Pannaria rubiginosa*
75	*Peltigera polydactyla*		X	*Peltigera sp1*
76	*Leptogium ulvaceum*	*Leptogium ulvaceum*	X	*Leptogium sp*
77	*Pseudocyphellaria mallota*	*Pseudocyphellaria xanthosticta*	X	*Pseudocyphellaria hawaiiensis / Pseudocyphellaria xanthosticta*
78	*Leptogium foveolatum*			
79	*Sticta lobarioides*	*Sticta lobariodes*	X	*Sticta pulmonariodes*
80	*Bunodophoron melanocarpum*	*Bunodophoron melanocarpum*	X	*Bunodophoron melanocarpum*
81	*Cladonia arbuscula*	*Cladonia furcata*	X	*Cladonia sp*
82	*Cladonia squamosa*	*Cladonia furcata*	X	*Cladonia cenotea/ Cladonia squamosa*
83	*Sticta lobarioides*		X	*Sticta pulmonariodes*
84	*Sticta lobarioides*	*Sticta lobariodes*	X	*Sticta pulmonariodes*
85	*Parmotrema rampoddense*	*Parmotrema gardneri*	X	*Parmotrema xanthinum/ Parmotrema madagascariaceum*
86	*Usnea subdasaea*		X	*Usnea patagonica/Usnea strigosa*
87	*Peltigera polydactyla*		X	*Peltigera sp1*
88	*Hypotrachyna divaricata*	*Hypotrachyna imbricatula*	X	*Hypotrachyna longiloba*
89	*Everniastrum vexans*	*Everniastrum soróchela*	X	*Everniastrum nepalense/ Hypotrachyna cirrhata*
90	*Hypotrachyna endocolora*	*Hypotrachyna exsplendens*	X	*Hypotrachyna laevigata*
91	*Sticta rhizinata*	*Sticta andina*		
92	*Everniastrum columbiense*		X	*Everniastrum neplanse/Hypotrachyna cirrhata*
93	*Sticta dioica isidiada*	*Sticta dioica isidiada*		
94	*Cladonia secundana*	*Cladonia furcata*	X	*Cladonia sp*
95	*Peltigera dolichorrhiza*		X	*Peltigera evansiana/ Peltigera canina*
96	*Everniastrum cirrhatum*	*Everniastrum cirrhatum*	X	*Everniastrum neplanse/Hypotrachyna cirrhata*

97	*Cladonia divaricata*	*Cladonia squamosa*	X	*Cladonia cenotea/ squamosa*
98	*Pannaria rubiginosa*	*Pannaria rubiginosa*	X	*Pannaria rubiginosa*
99	*Leptogium phyllocarpum*	*Leptogium phyllocarpum*	X	*Leptogium sp*
100	*Cladonia subcoriosa/ rappi*	*Cladonia andesita*	X	*Cladonia andesita*
101	*Glossodium aversum*	*Glossodium aversum*	X	*Icmadophila aversa*
102	*Cladonia arbuscula*	*Cladonia confusa*	X	*Cladonia borealis /Cladonia scabriuscula*
103	*Leprocaulon subalbicans*	*Leprocaulon subalbicans*		
104	*Cladonia chimantae*	*Cladonia meridensis*	X	*Cladonia meridensis*
105	*Hypotrachyna protochlorina*	*Hypotrachyna lineari /lineariloba*	X	*Hypotrachyna longiloba*
106	*Yoshimuriella peltigera*	*Yoshimuriella peltigera*	X	*Lobaria subdissecta*
107	*Glossodium aversum*	*Glossodium aversum*	X	*Icmadophila aversa*
108	*Cladonia subcariosa/rappi*	*Cladonia andesita*	X	*Cladonia andesita*
109	*Cladonia subcariosa*	*Cladonia squamosa*	X	*Cladonia squamosa*
110	*Cladia aggregata*		X	
111	*Leptogium azureum*	*Leptogium azureum*	X	*Leptogium sp*
112	*Sticta rhizinata*	*Sticta andina*	X	*Sticta andina*
113	*Cora arachnoidea*	*Cora arachnoidea*	X	*Cora arachnoidea*
114	*Hypotrachyna spinulosa*	*Hypotrachyna singularis*		
115	*Cladonia leprocephala*	*Cladonia meridensis/otras*	X	*Cladonia meridensis/otras*
116	*Parmotrema mellissii*			
117	*Hypotrachyna physodalica*	*Hypotrachyna intercalsude*	X	*Hypotrachyna partita*
118	*Usnea angulata*			
119	*Hypotrachyna physcioides*	*Hypotrachyna physcioides*		
120	*Cladonia granulosa*	*Cladonia granulosa*	X	*Cladonia granulosa*
121	*Hypotrachyna protobaloviana*	*Hypotrachyna physcioides*	X	*Parmelinopsis subfatiscens / Hypotrachyna britanica*
122	*Stereocaulon strictum*		X	*Stereocaulon atlanticum*
123	*Cladonia rappi*			
124	*Phyllobaeis imbricata*	*Phyllobaeis imbricata*		

125	*Yoshimuriella subcorrosa*	*Yoshimuriella subdissecta*	X	*Lobaria subdissecta*
126	*Yoshimuriella subdissecta*	*Yoshimuriella subdissecta*	X	*Lobaria subdissecta*
127	*Herpothallon globossum*	*Herpothallon rubrocinctum*		

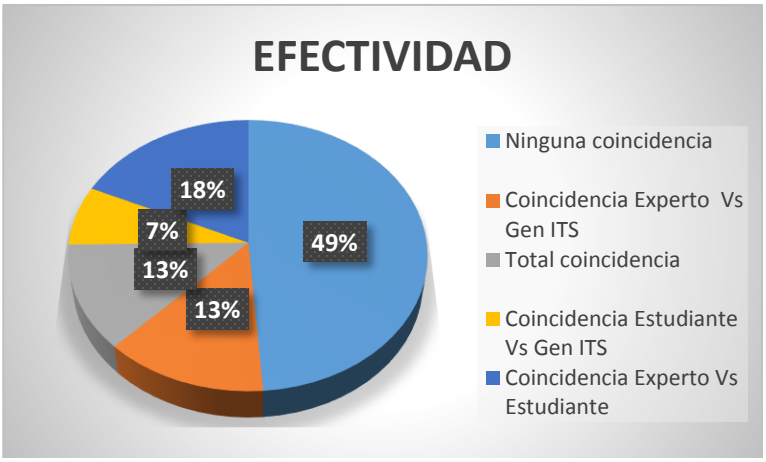


Grafico 1. Efectividad

En cuanto a la efectividad se observa poca coincidencia frente a las determinaciones realizadas tanto de forma clásica, como por determinación molecular; entendiéndose como un mínimo porcentaje reflejado en la gráfica entre la determinación realizada por el estudiante frente a la arrojada por el ITS; debido a diversos factores que impidieron la total coincidencia entre estos, como lo fueron la inexperiencia del estudiante entre otros; a pesar de que se logró la secuenciación de la mayoría de las muestras no fueron secuenciadas en su totalidad; otro de los aspectos importantes en cuanto a la efectividad.

Como se menciono con anterioridad otro de los factores a evaluar era el tiempo empleado en cada uno de los metodos a realizar (ver Tabla 6.)

Tabla 6. Tiempo invertido

METODO	TIEMPO INVERTIDO (HORAS)
EXPERTO	72
ESTUDIANTE	120
DETERMINACION ITS	38

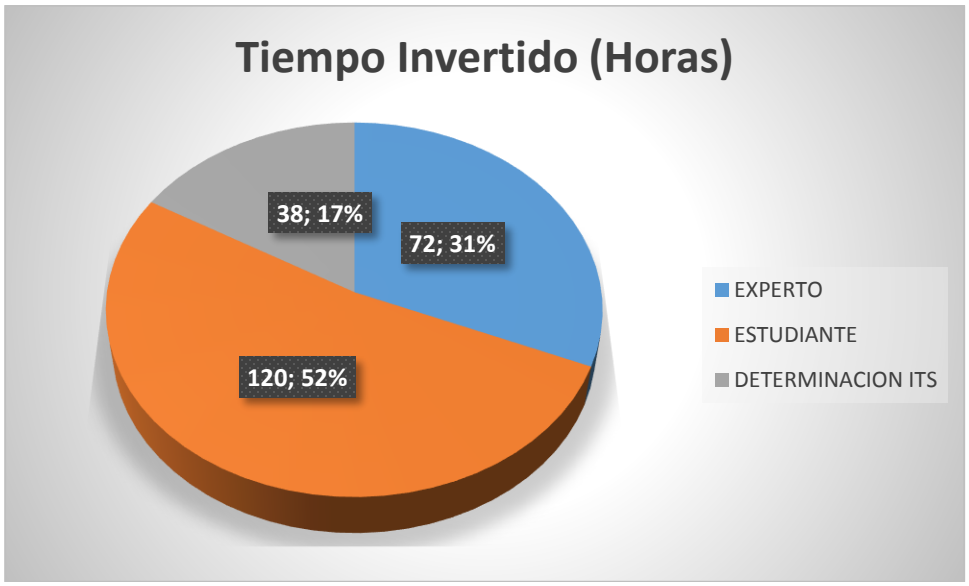


Grafico 2. Tiempo invertido

De acuerdo con la gráfica se puede apreciar que, debido a la poca experiencia y habilidad frente a la determinación, el estudiante es quien invierte mayor parte del tiempo en el desarrollo de estas determinaciones frente a los docentes expertos que han desarrollado diversas habilidades durante el tiempo en la determinación clásica de los líquenes.

Por ultimo en el factor costos se calculó el salario tanto del Estudiante como del Experto de acuerdo al tiempo invertido, y en cuanto a la determinación del Gen ITS el valor total de la secuenciación. (Ver Tabla 7.)

Tabla 7. Costos

COSTO	PRECIO
EXPERTO	$ 3.000.024
ESTUDIANTE	$ 2.250.000
DETERMINACION ITS	$ 3.519.424

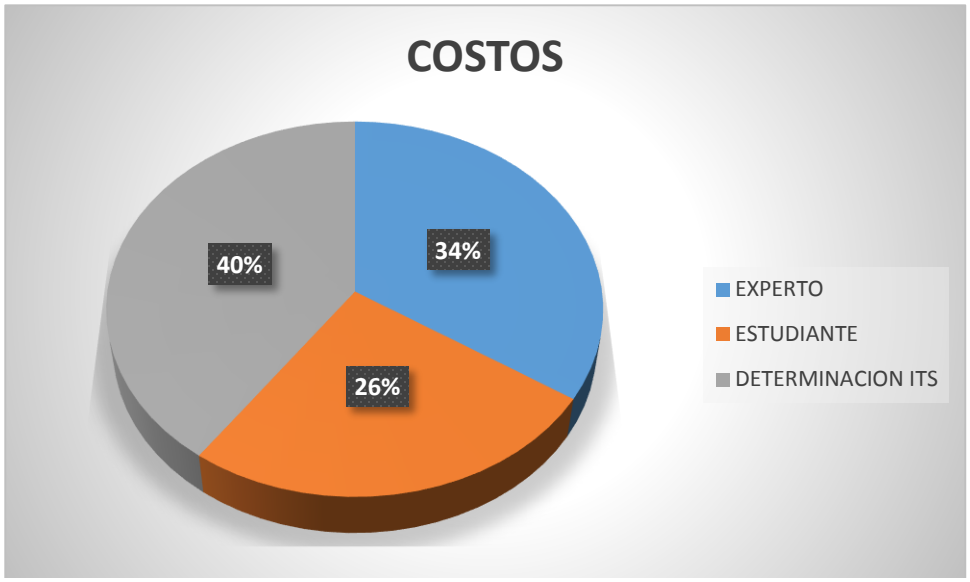


Grafico 3. Costos

Debido a esto se observa que el método más costoso a trabajar es la determinación por el Gen ITS puesto que este proceso no fue realizado en la UD donde el ciclo de secuenciación tenía un valor mayor al de Macrogen; además de que el fragmento a secuenciar era muy pequeño respecto a la cantidad que se usa del genoma en la UD.

3.3. GUÍA RÁPIDA DE CAMPO

Depto. Cundinamarca, COLOMBIA

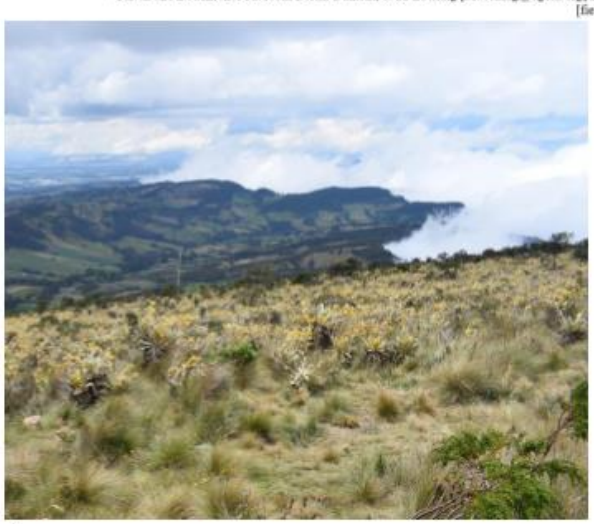
LIQUENOBIOTA del Páramo el **TABLAZO**, Subachoque

1

Daniela Rivera, Bibiana Moncada, Harrie Sipman & Robert Lücking

[1]Universidad Distrital Francisco José de Caldas, [2] Universidad Distrital Francisco José de Caldas

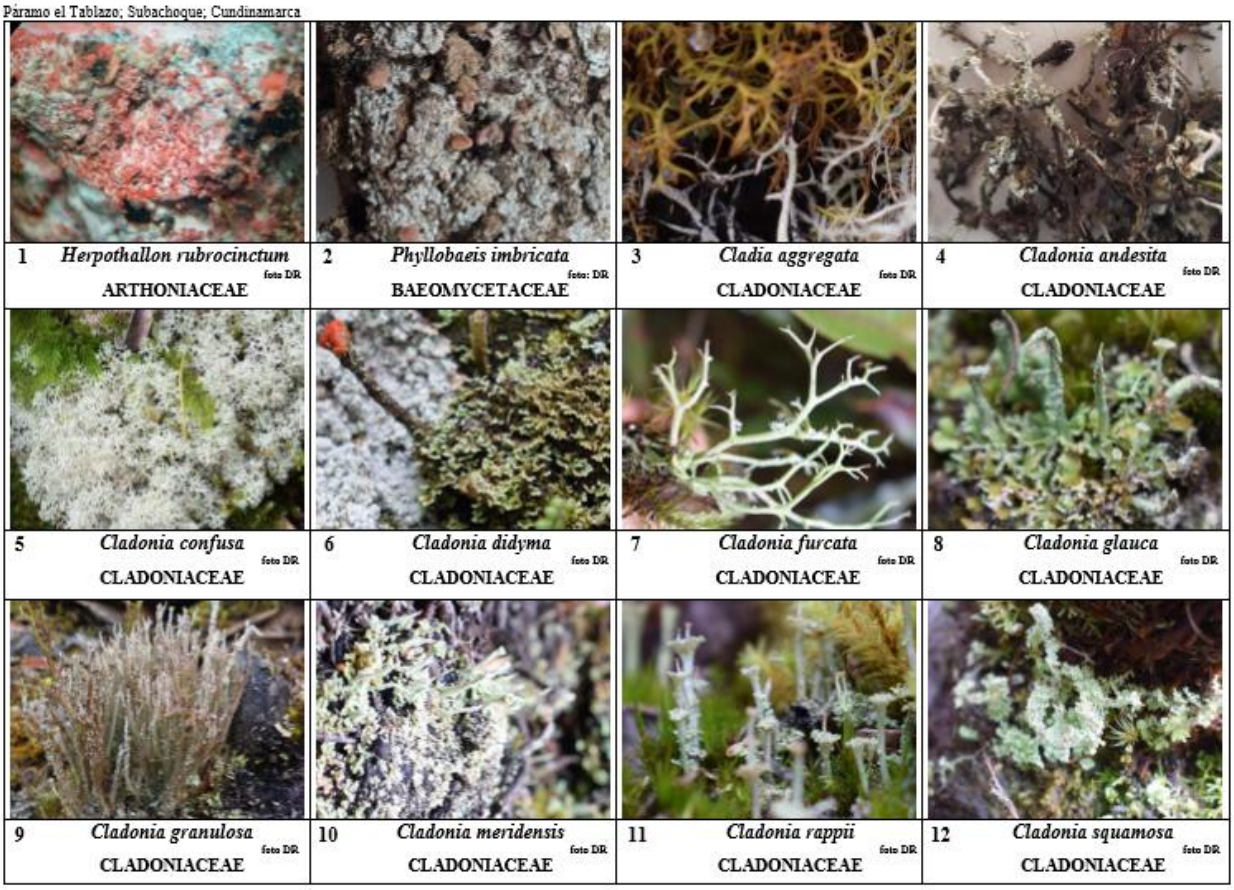
Fotos por Daniela Rivera. Producido por: Daniela Rivera, Bibiana Moncada, Harrie Sipman, Robert Lucking con el apoyo de GCOL (Grupo Colombiano de Liquenología).
©D. Rivera [dani181128@gmail.com], B. Moncada [bibianamoncada@yahoo.com] Universidad Distrital Francisco José de Caldas; H. Sipman [h.sipman@bgbm.org] Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem; & R. Lücking [r.luecking@bgbm.org] Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem
[fieldguides.fieldmuseum.org] **[número de la guía – dado por nuestro equipo] version 1**



El alto El Tablazo, ubicado en 5° 0' 39, 55'' N 74° 12' 22,15'' W, en la vereda Páramo del municipio de Subachoque, Cundinamarca, hace parte del complejo de páramos Guerrero, el cual contiene un total 42.329 ha (Sarmiento, Cadena, Sarmiento, Zapata, & León, 2013).

En cuanto a la vegetación predominan familias de Asteraceae, Ericaceae, Rosaceae, Melastomataceae y Rubiaceae identificando como especies dominantes, *Espeletiopsis corymbosa, Espeletia chocotana, E. cayetana, E. barclayana* siendo endémicas de la región. (Montero & Ortiz, 2012). En la presente guía rápida se muestra una pequeñas fracción de los líquenes pertenecientes a este páramo; encontrando, 13 familias, 22 géneros, 47 especies.

Páramo el Tablazo; Subachoque; Cundinamarca



1 *Herpothallon rubrocinctum* foto DR ARTHONIACEAE	2 *Phyllobaeis imbricata* foto: DR BAEOMYCETACEAE	3 *Cladia aggregata* foto DR CLADONIACEAE	4 *Cladonia andesita* foto DR CLADONIACEAE
5 *Cladonia confusa* foto DR CLADONIACEAE	6 *Cladonia didyma* foto DR CLADONIACEAE	7 *Cladonia furcata* foto DR CLADONIACEAE	8 *Cladonia glauca* foto DR CLADONIACEAE
9 *Cladonia granulosa* foto DR CLADONIACEAE	10 *Cladonia meridensis* foto DR CLADONIACEAE	11 *Cladonia rappii* foto DR CLADONIACEAE	12 *Cladonia squamosa* foto DR CLADONIACEAE

Depto. Cundinamarca, COLOMBIA

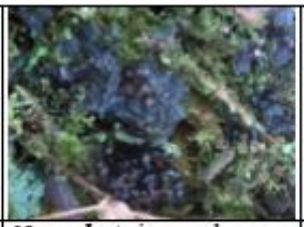
LIQUENOBIOTA del Páramo el TABLAZO, Subachoque

2

Daniela Rivera, Bibiana Moncada, Harrie Sipman & Robert Lücking

[1]Universidad Distrital Francisco José de Caldas, [2] Universidad Distrital Francisco José de Caldas

Fotos por Daniela Rivera. Producido por: Daniela Rivera, Bibiana Moncada, Harrie Sipman, Robert Lucking con el apoyo de GCOL (Grupo Colombiano de Liquenologia).
CO: Rivera [dani181128@gmail.com], B. Moncada [bibianamoncada@yahoo.com] Universidad Distrital Francisco José de Caldas; H. Sipman [h.sipman@bgbm.org] Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem; & R. Lücking [r.lucking@bgbm.org] Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem
[fieldguides.fieldmuseum.org] [**número de la guia – dado por nuestro equipo**] **versión 1**

			
13 *Leptogium azureum* Foto DK. COLLEMATACEAE	14 *Leptogium phyllocarpum* Foto COLLEMATACEAE	15 *Leptogium rugulosum* Foto DK. COLLEMATACEACE	16 *Leptogium ulvaceum* Foto DK. COLLEMATACEACE
			
17 *Cora arachnoidea* Foto DK. HYGROPHORACEAE	18 *Cora byssoidea* Foto DK. HYGROPHORACEAE	19 *Dictyonema giganteum* Foto DK. HYGROPHORACEAE	20 *Dibaeis columbiana* Foto DK. ICMADOPHILACEAE
			
21 *Glossodium aversum* Foto DK. ICMADOPHILACEAE	22 *Leprocaulon alpin* Foto DK. LEPROCAULACEAE	23 *Leprocaulon subalbicans* Foto DK. LEPROCAULACEAE	24 *Pseudocyphellaria xanthosticta* LOBARIACEAE
			
25 *Sticta andina* Foto DK. LOBARIACEAE	26 *Sticta dioica isidiada* Foto DK. LOBARIACEAE	27 *Sticta lobarioides* Foto DK. LOBARIACEAE	28 *Sticta lumbschiana* Foto DK. LOBARIACEAE
			
29 *Sticta pulmonarioides* Foto DK. LOBARIACEAE	30 *Yoshimuriella peltigera* Foto DK. LOBARIACEAE	31 *Yoshimuriella subdissecta* Foto DK. LOBARIACEAE	32 *Pannaria andina* Foto PANNARIACEAE

Depto. Cundinamarca, COLOMBIA

LIQUENOBIOTA del Páramo el **TABLAZO**, Subachoque

3

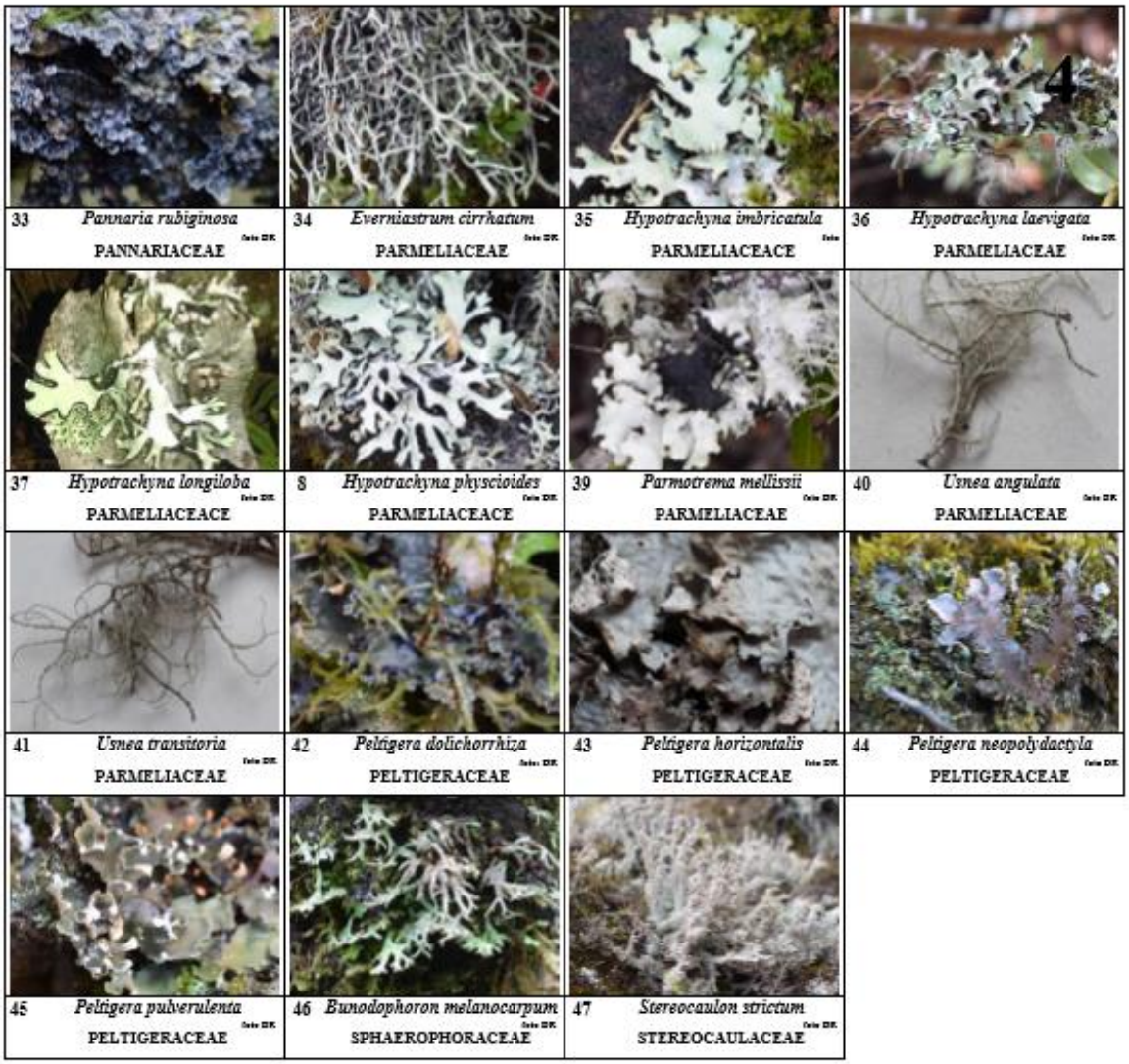
Daniela Rivera, Bibiana Moncada, Harrie Sipman & Robert Lücking

[1]Universidad Distrital Francisco José de Caldas, [2] Universidad Distrital Francisco José de Caldas

Fotos por Daniela Rivera. Producido por: Daniela Rivera, Bibiana Moncada, Harrie Sipman, Robert Lucking con el apoyo de GCOL (Grupo Colombiano de Liquenologia).

©D. Rivera [dmr181128@gmail.com], B. Moncada [bibianamoncada@yahoo.com] Universidad Distrital Francisco José de Caldas; H. Sipman [h.sipman@bgbm.org] Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem; & R. Lücking [r.luecking@bgbm.org] Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem

[fieldguides.fieldmuseum.org] **[número de la guía – dado por nuestro equipo] version 1**



33 *Pannaria rubiginosa* PANNARIACEAE	34 *Everniastrum cirrhatum* PARMELIACEAE	35 *Hypotrachyna imbricatula* PARMELIACEACE	36 *Hypotrachyna laevigata* PARMELIACEAE
37 *Hypotrachyna longiloba* PARMELIACEACE	8 *Hypotrachyna physcioides* PARMELIACEACE	39 *Parmotrema mellissii* PARMELIACEAE	40 *Usnea angulata* PARMELIACEAE
41 *Usnea transitoria* PARMELIACEAE	42 *Peltigera dolichorrhiza* PELTIGERACEAE	43 *Peltigera horizontalis* PELTIGERACEAE	44 *Peltigera neopolydactyla* PELTIGERACEAE
45 *Peltigera pulverulenta* PELTIGERACEAE	46 *Bunodophoron melanocarpum* SPHAEROPHORACEAE	47 *Stereocaulon strictum* STEREOCAULACEAE	

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Ante la poca coincidencia expuesta entre los diferentes métodos comparados: Determinación Clásica (Estudiante) y (Experto) y la determinación por el Gen ITS código de barras, siendo sólo un 13% de coincidencia, debemos retomar lo que menciona Orock et al (2012), refiriéndose a que existen limitantes como la no totalidad de las secuencias necesarias para la determinación y que por tanto en ocasiones no es posible llegar al taxón más alto esperado. Sin embargo confirmamos su posición frente a la coincidencia en su totalidad al observar que frente a los géneros hay un porcentaje del 99 % de coincidencia; y que a pesar de ser un trabajo pionero en la realización de inventarios florísticos por medio de comparación de diferentes métodos de determinación (Hebert & Gregory, 2005); (Lahaye et al, 2008); se observó un acercamiento a la líquenobiota presente en El Páramo el Tablazo; teniendo en cuenta las variables evaluadas para reconocer la efectividad del Gen ITS Código de barras.

Se puede confiar plenamente en aquellas secuencias que arrojan nombres específicos con un 99% o 100% en el programa BLAST puesto que estas secuencias han sido evaluadas con anterioridad por taxónomos y sistemáticos presentando así una base de datos que provee valores confiables. De esta manera se confirma lo expresado por Orock et al (2012), mostrando en su estudio que las técnicas moleculares como herramienta adicional para la determinación de especies son de gran utilidad.

En cuanto a los factores positivos que se presentan como resultado de la utilización del gen ITS en la determinación de organismos liquénicos está la disminución significativa del tiempo invertido debido a que los procedimientos son mecánicos y poseen menor margen de error. Adicionalmente, se pueden realizar los diferentes procedimientos a varias muestras al mismo tiempo; caso contrario para la determinación clásica debido a que en esta se evalúan caracteres particulares de cada una de las muestras aparte de encontrarse casos específicos en los cuales debido a que las muestras son juveniles o se encuentran fragmentadas es imposible determinarlas a especie, factores corroborados por Orock et al (2012). De igual manera como lo mencionan Miller et al (2016) los códigos de barras en particular la secuenciación libera a los investigadores de la determinación clásica, la cual claramente consume bastante tiempo, permitiendo mayor probabilidad de desarrollo de nuevas investigaciones y para el caso particular de expertos promueve la preparación de jóvenes científicos.

La generación de estos códigos de barras permite además la difusión pública de la información arrojada por esta técnica sin aumentar costos de desplazamientos para el reconocimiento de los especímenes sino como lo es el BOLN (The Barcode of Life Database) una base de datos que permite observar tanto imágenes, secuencias y datos biogeográficos de los diferentes especímenes, y que a su vez puede nutriste con herramientas bioinformáticas como GenBank ofrece por tanto la información en línea siendo de mayor acceso y

disponibilidad en cualquier idioma y por tanto para cualquier tipo de población estudiantil. Miller et al (2016)

Quince (15) muestras no fueron amplificadas satisfactoriamente, probablemente por mala extracción de ADN, contaminación de la misma por otros micobiontes o por sustancias fenólicas presentes. Plaza et al (2014), afirma que en casos como la Familia Cladoniaceae los fenoles presentes pueden impedir una adecuada extracción y posterior amplificación, por lo tanto, recomienda la purificación de los fenoles y demás ácidos en procesos anteriores a la extracción de ADN.

Los cebadores ITSIF (Gardes & Bruns 1993) e ITS4 (White et al. 1990), empleados en este estudio fueron diseñados para el reconocimiento de Hongos Ascomycetes y Basidiomycetes sin importar si son liquenizados o de vida libre, esta podría ser la razón por la cual en siete casos en particular en los géneros: Cladonia, Hypotrachyna, Sticta y Usnea se amplificaron y secuenciaron hongos asociados a la simbiosis liquénica tales como: *Ptenothrix monochroma*, Basidiomycota sp4 y hongos no identificados.

Otro aspecto que se debe tener en cuenta al momento de determinar con el gen ITS y su comparación con las secuencias almacenadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI National Center for Biotechnology Information) a través del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), es que a pesar de todas las secuencias incluidas hasta el día de hoy, la base de datos del NCBI no posee la totalidad de secuencias de líquenes registrados a la fecha, y por lo tanto no se posee una certeza total frente a los resultados arrojados con porcentajes menores a 99%. Este resultado se debe a que el programa no posee información de la muestra secuenciada y por tanto arroja resultados de la secuencia más próxima a la de la muestra a revisar, buscando un equilibrio constante entre la determinación clásica y la molecular, para proveer una taxonomía integrada que evalué no solo los factores genéticos. (Ebach & Holdrege, 2005).

CONCLUSIONES

La determinación clásica a pesar de las ambigüedades que pueda presentar al ser usada, garantiza el llegar al taxón más alto (especie) para cualquier género de liquen; claramente llega a ser mucho más certera si es realizada por un Experto.

La habilidad y la facilidad en la determinación de especies de líquenes de la forma clásica, depende fundamentalmente de la experiencia que posea el investigador y por tanto el trabajo que desarrolle cada día con estos organismos.

Como factores negativos se observó principalmente que si ocurre algún tipo de alteración en alguno de los procesos antecesores a la secuenciación; como la no estandarización en la PCR o dificultades frente a la estabilidad de la energía o la temperatura particularmente en la Electroforesis impide una amplificación total de las muestras por tanto deben repetirse estos procesos, y a su vez se incrementaría el costo.

Como aporte potencial del presente trabajo se agregarán a la base de datos GenBank todas las muestras de estudio; y por tanto contribuir al conocimiento de las secuencias de Gen ITS código de barras de las especies presentes en Colombia.

La utilización del Gen ITS código de barras permite un gran acercamiento a la clasificación taxonómica a pesar de los factores anteriormente mencionados que puedan alterar los resultados de esta.

La iniciativa que promueve el presente trabajo frente a la elaboración de inventarios florísticos por medio de la implementación del Gen ITS código de barras, permite poseer una mayor certeza frente a la determinación de las muestras colectadas, dándole mayor fiabilidad respecto a la presencia de las especies del lugar de muestreo, siendo este un parámetro para futuros investigadores.

Para un total reconocimiento de la secuencia de ADN por medio del Gen ITS en los Géneros *Cladonia y Cladia* se sugiere realizar una limpieza exhaustiva al producto de la extracción con acetona, para obtener resultados satisfactorios

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Acharius, E. (1803). Methodus qua omnes detectos Lichenes. Stockholm: FDD Ulrich

Ahmadjian, V. (1993). The lichen photobiont: What can it tell us about lichen systematics?. Bryologist, 310-313.

Ahti, T., & Sipman, H. J. (2013). Ten new species of *Cladonia* (Cladoniaceae, Lichenized

Fungi) from the Guianas and Venezuela, South America. Phytotaxa, 93(1), 25-39.

Alvarez, M., Córdoba, S., Escobar, F., Fagua, G., Gast, F., Mendoza, H., ... & Villarreal, H. (2006). Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. Programa de inventarios de Biodiversidad Grupo de Exploración y Monitoreo Ambiental (GEMA). Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humbold. Bogotá, Colombia

Aptroot, A., & Sipman, H. J. (1997). Diversity of lichenized fungi in the tropics. Biodiversity of tropical microfungi, 93-106.

Aptroot, A., Thor, G., Lucking, R., Elix, J., & Chaves, J. L. (2009). The lichen genus *Herpothallon* reinstated.

Baldwin, B. G. (1993). Molecular phylogenetics of *Calycadenia* (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. American Journal of Botany, 222-238.

Barreno Rodríguez, E., & Pérez-Ortega, S. (2003). Líquenes de la reserva natural integral de Muniellos, Asturias. KRK ediciones.

Barreno, E., & Rico, V. J. (1984). Sobre la biología de los líquenes. I. Anatomía, morfología y estructuras vegetativas. In Anales de Biología (No. 1, pp. 161-195).

Brodo, I. M., Sharnoff, S. D., & Sharnoff, S. (2001). Lichens of north America. Yale University Press.

Cáceres, M. E., Lücking, R., & Rambold, G. (2008). Efficiency of sampling methods for accurate estimation of species richness of corticolous microlichens in the Atlantic rainforest of northeastern Brazil. Biodiversity and Conservation, 17(6), 1285-1301.

Crawford, A. J., Paz, A., & Gonzalez, M. (2011). Códigos de barras de la vida: introducción y perspectiva. Acta Biológica Colombiana, 16(3), 161-176.

CUNHA, I. (2007). Fungos liquenizados do gênero *Leptogium* (Ascomycetes) no litoral sul do Estado de São Paulo, Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Galloway, D. J. (1986). Non-glabrous species of Pseudocyphellaria from southern South America. The lichenologist, 18(2), 105-168.

Gardes, M., & Bruns, T. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology, 113-118.

Gardes, M., & Bruns, T. (1994). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. Mol. Ecol., 2: 113-118.

Henssen, & Jahns. (1974). División Líquen según Henssen & Jahns. 76-78.

Huneck, S., & Yoshimura, I. (1996). Identification of Lichen Substances. Berlin: Springer.

Jorgensen. (2004). Key to species Pannaria. Ecuador.

Lamb, I. M., & Ward, A. (1974). A preliminary conspectus of the species attributed to the imperfect lichen genus Leprocaulon Nyl. Journal of the Hattori Botanical Laboratory.

Leavitt, S., Fernández-Mendoza, F., Pérez-Ortega, S., Divakar, P., Lumbsch, T., & Clair, L. S. (2013). DNA barcode identification of lichen-forming fungal species in the Rhizoplaca melanophthalma species-complex (Lecanorales, Lecanoraceae), including five new species. MycoKeys, 7, 1.

LijteRoff, R., Lima, L., & PRieRi, B. (2009). Uso de líquenes como bioindicadores de contaminación atmosférica en la ciudad de San Luis, Argentina. Revista internacional de contaminación ambiental, 25(2), 111-120.

Liston, A., Robinson, W. A., Oliphant, J. M., & Alvarez-Buylla, E. R. (1996). Length variation in the nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region of non-flowering seed plants. Systematic Botany, 109-120

Lücking, R., Dal-Forno, M., Lawrey, J. D., Bungartz, F., Rojas, M. E. H., Marcelli, M. P., ... & Spielmann, A. A. (2013). Ten new species of lichenized Basidiomycota in the genera Dictyonema and Cora (Agaricales: Hygrophoraceae), with a key to all accepted genera and species in the Dictyonema clade. Phytotaxa, 139(1), 1-38.

Lücking, R., Hodkinson, B. P., & Leavitt, S. D. (2016). The 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota–Approaching one thousand genera. The Bryologist, 119(4), 361-416.

Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2007). Use of the ITS primers, ITS1F and ITS4, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. Journal of Microbiological Methods, 71(1), 7-14.

Miller, S. E., Hausmann, A., Hallwachs, W., & Janzen, D. H. (2016). Advancing taxonomy and bioinventories with DNA barcodes. *Phil. Trans. R. Soc. B*, *371*(1702), 20150339.

Moncada, B. (2012). El género Sticta en Colombia, Taxonomía, Ecogeografía e Importancia. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá DC[Links].

Moncada, B., Lücking, R., & Betancourt, L. (2013). Phylogeny of the Lobariaceae (lichenized Ascomycota: Peltigerales). The Lichenologist, 203-263.

Moncada, B., Lücking, R., & Suárez, A. (2014). Molecular phylogeny of the genus Sticta (lichenized Ascomycota: Lobariaceae) in Colombia. Fungal Diversity. Vol 64, 205-231.

Montero, f., & ortiz, m. (2012). Estados inmaduros e historia natural de algunas especies de la subtribu pronophilina (Nymphalidae: Satyrinae) presentes en el páramo del Tablazo, Colombia. Trop.lepid. Res., 32-41.

MORALES, E., Lücking, R., & Anze, R. (2009). Una Introducción al Estudio de los Líquenes de Bolivia. Cochabamba, Universidad Católica Boliviana" San Pablo". [Links].

NASH III, T. (2008). Lichen Biology. Arizona State University

Nimis, P. L., & Purvis, O. W. (2002). Monitoring lichens as indicators of pollution (pp. 7-10). Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Noss, R. F. (1990). Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. Conservation biology, 4(4), 355-364.

Nylander, W. (1858). SYNOPSIS METHODICA LICHENUM. VIA DICTA MIGNON.

Plaza, C. M., de Torres, L. E. D., Lücking, R. K., Vizcaya, M., & Medina, G. E. (2014). Antioxidant activity, total phenols and flavonoids of lichens from Venezuelan Andes. Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research, 2(5), 138-147.

Purvis, O. W. (1992). Lichen Flora of Great Britain and Ireland. Natural History Museum Publications in association with the British Lichen Society.

Purvis, W. (2000). Lichens. London: Natural History Museum. Google Scholar.

Sarmiento Pinzón, C. E., Vargas, C., Giraldo, C. E. S., Jiménez, M. V. Z., & Pinzón, J. A. C. E. S. (2013). Aportes a la conservación estratégica de los páramos de Colombia: actualización de la cartografía de los complejos de páramo a escala 1: 100.000 (No. Doc. 26773) CO-BAC, Bogotá).

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., ... & Miller, A. N. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences, 109(16), 6241-6246.

Sipman, H. (1998). Revised key to Hypotrachyna (Parmeliaceae) in tropical America. Recuperado de http://www. bgbm. org/sipman/keys/Neohypot. htm.

Sipman, H. J. M. (2002). Key to the Stereocaulon species in the Neotropics [en línea].

Sipman, H. (2005). Identification Key and Literature Guide to the Genera of Lichenized Fungi (Lichens) in the Neotropics [En línea].

Sipman, H. (1997). Key to lichens with PODETIA (incl. pseudopodetia) (genera *Baeomyces, Cladia, Cladonia, Dibaeis, Phyllobaeis*). Lichen determination keys. Berlin: Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem.

Sipman, H. (2005). List of treated genera with addittional information. Lichen determination keys.

Sipman, H. J. M. (2004). Mason Hale's key to Parmotrema, revised edition: key to wide-lobed parmelioid species occurring in Tropical America (*genera Canomaculina,*

Parmotrema, Rimelia, Rimeliella). Mason Hale's key to Parmotrema, revised edition: key to wide-lobed parmelioid species occurring in Tropical America (genera Canomaculina, Parmotrema, Rimelia, Rimeliella).

Tiselius, A. (1937). A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. Transactions of the Faraday Society, 33, 524-531.

Truong, C., & Clerc, P. (2012). The lichen genus *Usnea* (Parmeliaceae) in tropical South America: species with a pigmented medulla, reacting C+ yellow. The Lichenologist, 44(5), 625-637.

València, U. d. (12 de 07 de 2017). Jardí Botànic de la Universitat de València. Obtenido de http://jardibotanic.org/investigacio_floristica.php?t=54

Vitikainen, O. (1998). Key *Peltigera* Notes on Distribution. 138-139.

Wedin, M. (2001). BUNODOPHORON. Flora of Australia, 58A.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1), 315-322.

YOSHIMURA, I. (1998). Lobaria in Latin America: taxonomic, geographic and evolutionary aspects: 129-134 (en) Marcelli, Mp & Seaward, Mrd (Ed.) Lichenology in Latin America History, Current Knowledge and Applications

Zahlbruckner, A. (1907). Die natürlichen PFLANZENFAMILIEN. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann