

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Ciencias de la Vida



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nuevos marcadores genómicos para estudios de biodiversidad en fotobiontes liquénicos. Microalgas eucarióticas como fuente de recursos de utilidad biotecnológica**

*Alicia del Hoyo Pérez*

Alcalá de Henares, 2014



UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Ciencias de la Vida



TESIS DOCTORAL

**Desarrollo de nuevos marcadores genómicos para estudios de biodiversidad en fotobiontes liquénicos. Microalgas eucarióticas como fuente de recursos de utilidad biotecnológica**

Memoria presentada en la Universidad de Alcalá por la Licenciada *Alicia del Hoyo Pérez* para optar al grado de Doctor en Biología Evolutiva y Biodiversidad.



LEONARDO CASANO MAZZA, Profesor Titular del Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá, y

EVA MARÍA DEL CAMPO LÓPEZ, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria titulada **“Desarrollo de nuevos marcadores genómicos para estudios de biodiversidad en fotobiontes liquénicos. Microalgas eucarióticas como fuente de recursos de utilidad biotecnológica”** ha sido realizada por Dña. Alicia del Hoyo Pérez en el Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá, con nuestra inmediata dirección y autorizamos su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, mayo de 2014

Fdo.: Dr. Leonardo Casano Mazza      Fdo.: Dra. Eva M<sup>a</sup> del Campo López



GONZALO PÉREZ SUÁREZ, Director del Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá

CERTIFICA:

Que la presente Memoria titulada **“Desarrollo de nuevos marcadores genómicos para estudios de biodiversidad en fotobiontes liquénicos. Microalgas eucarióticas como fuente de recursos de utilidad biotecnológica”** ha sido realizada por Dña. Alicia del Hoyo Pérez en el Departamento de Ciencias de la Vida de la Universidad de Alcalá, y cumple todos los requisitos para su presentación como Tesis Doctoral.

Alcalá de Henares, mayo 2014

Fdo.: Dr. Gonzalo Pérez Suárez





*Por fin hemos llegado al final de esta carrera y me gustaría agradecer a todas las personas que me han acompañado durante estos años.*

*A mis directores de Tesis, los Dres. Eva M<sup>a</sup> del Campo y Leonardo Casano. Son muchas cosas las que he aprendido de cada uno de vosotros. Gracias por los consejos aportados, siempre interesantes y ayudando en todo lo posible. El esfuerzo mereció la pena.*

*A la Dra. Eva Barreno y el Dr. Francisco García. Gracias por esa foto tan bonita que forma parte de la portada. Sin duda los fotobiontes son bonitos.*

*A los miembros del Dpto. de Ciencias de la Vida. En especial al Dr. Carlos Illana, por sus muchas conversaciones hablando de cine e intentando arreglar el mundo. A la Dra. Carmen Bartolomé, por sus consejos y su forma de ser (mira Carmen, ya lo he conseguido). A Fernando Flores, siempre dispuesto a ayudarme cuando le he necesitado.*

*A otras personas que componen la Universidad y con la que he compartido conversaciones muy interesantes, especialmente Antonio, Rufino y mi amigo Txomin. Se aprenden muchas cosas con vosotros, seguid siendo como sois: auténticos. Txomin, ya sabes, quiero verte pronto hablando de carábidos.*

*A mi familia, que siempre ha estado apoyándome en los momentos más difíciles de este proceso. Mamá, papá, simplemente gracias. Me habéis enseñado tantas cosas... Sois los mejores. A ti Loren, mi hermano, te debo tiempo que no he podido disfrutar contigo y mi pequeña Lucía... Todo eso cambiará. Y a mis abuelos Alicia y Jesús, por haberme cuidado desde pequeña y ser otros padres para mí. Sin duda soy una afortunada de poder disfrutarlos.*

*A todos mis amigos, pero de forma muy especial a Raquel, porque lo de compartir camino se agradece. Gracias por todo, las conversaciones, el apoyo, esos viajes cargadas de morteros, pipetas y fotobiontes... Estoy segura de que vamos a conseguir todo lo que nos propongamos, ya sabes, somos SD y eso se nota. Mucha suerte amiga con lo que te queda, que ya es mucho menos que cuando empezamos.*

*Y a ti Jorge, por ayudarme siempre en todo lo que necesito. Porque cuando el pánico cunde allí estás tú para poner tranquilidad... Y porque despertar cada día a tu lado es un regalo.*



*A Jorge*



## ***Índice de abreviaturas***

Para facilitar la lectura de los capítulos, tablas, esquemas y figuras incluidas en esta memoria, a continuación se incluye una ordenación alfabética de las abreviaturas más utilizadas:

aá	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosomal
ARN	Ácido ribonucleico
C	Citosina
c.a.	Cifra aproximada
ADNc	ADN copia
EDTA	Ácido etilen diaminotetraacético
G	Guanina
GR	Glutación reductasa
GSSG	Glutación oxidado
HE	<i>Homing</i> Endonucleasa
IC	Índice de consistencia
IPTG	isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
ITS	Espaciadores transcritos internos
Kb	Kilobase
KDa	KiloDalton
ML	Máxima verosimilitud
MP	Máxima Parsimonia
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio
NJ	<i>Neighbor Joining</i>
nt	Nucleótido
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (marco de lectura abierta)
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PF	Peso fresco
pl	Punto isoeléctrico

Pm	Peso molecular
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
SOD	Superóxido dismutasa
Tm	Temperatura de fusión
U	Unidades enzimáticas
ufc	Unidades formadoras de colonias
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido

**ÍNDICE**

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
1.1. LAS MICROALGAS .....	5
1.1.1. Las algas verdes (División Chlorophyta) .....	8
1.1.2. Análisis de la biodiversidad de algas verdes: código de barras molecular.....	8
1.1.3. Problemas de clasificación en algas verdes.....	11
1.1.4. Marcadores moleculares utilizados en algas verdes .....	13
1.2. LAS ALGAS LIQUÉNICAS .....	14
1.2.1. Las algas verdes en el contexto de la simbiosis liquénica .....	14
1.2.2. Estudios moleculares y fisiológicos de la diversidad de algas liquénicas.....	17
1.3. APLICACIONES DE LAS ALGAS VERDES. LAS ALGAS VERDES COMO FUENTE DE <i>HOMING</i> ENDONUCLEASAS (HEs) .....	18
1.3.1. Principales aplicaciones prácticas.....	18
1.3.2. Características generales de las <i>Homing</i> Endonucleasas.....	19
1.3.3. Mecanismos de <i>homing</i> .....	21
1.3.4. Familias de <i>Homing</i> Endonucleasas.....	23
1.3.5. <i>Homing</i> Endonucleasas de la familia LAGLIDADG .....	25
1.3.6. Aplicabilidad práctica de las <i>Homing</i> Endonucleasas.....	26
1.3.7. Diversos intrones de tipo I codifican <i>Homing</i> Endonucleasas en algas verdes .....	30
1.3.8. Presencia de intrones de tipo I y <i>Homing</i> Endonucleasas en algas liquénicas .....	31
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	33
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
3.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	39

3.2. MÉTODOS .....	39
3.2.1. Aislamiento de fotobiontes liquénicos .....	39
3.2.2. Cultivo de microalgas.....	40
3.2.3. Aislamiento de ADN total .....	41
3.2.4. Diseño de cebadores .....	41
3.2.5. Amplificación por PCR del ADN aislado .....	42
3.2.6. Separación electroforética y purificación de productos de amplificación ....	43
3.2.7. Clonación de un fragmento del gen <i>psbB</i> de <i>Coccomyxa</i> sp. ....	43
3.2.7.1. Ligación del fragmento al vector y transformación de células de <i>E.coli</i>	43
3.2.7.2. Purificación del ADN plasmídico .....	44
3.2.8. Análisis bioinformático de secuencias de ADN y proteínas .....	45
3.2.8.1. Análisis filogenético y construcción de árboles .....	45
3.2.8.2. Análisis bioinformático de proteínas .....	47
3.2.9. Análisis de parámetros fisiológicos .....	47
3.2.9.1. Determinación de pigmentos fotosintéticos .....	47
3.2.9.2. Extracción de proteínas solubles .....	48
3.2.9.3. Zimogramas de actividad de enzimas antioxidantes .....	48
3.2.9.3.1. Revelado de actividad Superóxido dismutasa .....	49
3.2.9.3.2. Revelado de actividad Glutation reductasa .....	49
3.3. PRODUCTOS .....	50
3.3.1. Aparatos y equipos .....	50
3.3.2. Esterilización de material y disoluciones .....	51
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>53</b>
4.1. DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO DE AISLAMIENTO DE ADN .....	55
4.1.1. Evaluación de la calidad y la cantidad de ADN extraído.....	57
4.1.2. Amplificación por PCR de los ADNs aislados con el método de DMSO.....	58



---

4.2. DISEÑO DE UN MARCADOR <i>UNIVERSAL</i> BASADO EN EL GEN CLOROPLÁSTICO QUE CODIFICA EL ARNr 23S.....	60
4.2.1. Ensayo de los nuevos cebadores <i>universales</i> en amplificación y secuenciación de ADN de diversos organismos .....	63
4.2.2. Ensayo del nuevo marcador molecular en análisis filogenéticos de organismos fotosintéticos en general .....	64
4.2.3. Relaciones filogenéticas entre géneros de algas liquénicas.....	69
4.3. BÚSQUEDA, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE INTRONES DE TIPO I EN EL GEN 23S ADNr DE FOTOBIONTES LIQUÉNICOS.....	74
4.3.1. Elaboración de mapas genéticos del gen 23S ADNr.....	76
4.3.2. Caracterización de los intrones de tipo I encontrados en el gen 23S ADNr..	79
4.4. <i>HOMING</i> ENDONUCLEASAS (HEs) CODIFICADAS EN INTRONES DE TIPO I DE ALGAS LIQUÉNICAS.....	84
4.4.1. Caracterización físico-química .....	88
4.4.2. Estructuras secundarias hipotéticas .....	89
4.4.3. Relaciones filogenéticas.....	93
4.4.3.1. Análisis filogenéticos de las HEs presentes en intrones L1917, L1931 y L1951 .....	95
4.4.3.2. Análisis filogenéticos de las HEs presentes en intrones L2263 y L2512 .	97
4.4.3.3. Algunas HEs son similares al extremo C-terminal de proteínas PPR de plantas.....	98
4.5. ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE FOTOBIONTES DE LÍQUENES RECOLECTADOS	102
4.5.1. Caracterización molecular y fisiológica de los fotobiontes del ascoliquen <i>Ramalina farinacea</i> .....	103
4.5.1.1. Aislamiento de los fotobiontes de <i>Ramalina farinacea</i> .....	104
4.5.1.2. Secuenciación del gen 23S ADNr de los fotobiontes aislados de <i>Ramalina farinacea</i> .....	105

4.5.1.3. Evidencias moleculares de la coexistencia de TR1 y TR9 en los talos de <i>Ramalina farinacea</i> .....	106
4.5.1.4. Representación de los fotobiontes TR1 y TR9 en diferentes especies liquénicas en base a las secuencias de ITS nucleares depositadas en GenBank .....	111
4.5.1.5. Caracterización fisiológica preliminar de TR1 y TR9 .....	113
4.5.2. Caracterización molecular del fotobionte del basidioliquen <i>Lichenomphalia umbellifera</i> .....	116
4.5.2.1. Aislamiento del fotobionte de <i>Lichenomphalia umbellifera</i> .....	117
4.5.2.2. Secuenciación parcial del gen 23S ADNr de <i>Coccomyxa</i> sp. (Lu).....	118
4.5.2.3. Relaciones filogenéticas entre <i>Coccomyxa</i> sp. (Lu) con otras algas del género <i>Coccomyxa</i> .....	119
4.5.2.4. Estudio de una <i>Homing</i> Endonucleasa en el gen <i>psbB</i> de <i>Coccomyxa</i> sp. (Lu) .....	123
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	127
5.1. EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE AISLAMIENTO DE ADN .....	129
5.2. UTILIDAD DEL MARCADOR <i>UNIVERSAL</i> PARA RESOLVER LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS EN FOTOBIONTES LIQUÉNICOS Y ALGAS RELACIONADAS .....	130
5.3. DIVERSIDAD DE INTRONES DE TIPO I EN EL GEN 23S ADNr DE FOTOBIONTES LIQUÉNICOS Y ALGAS RELACIONADAS .....	135
5.4. DIVERSIDAD DE <i>HOMING</i> ENDONUCLEASAS CODIFICADAS EN INTRONES DE TIPO I EN EL GEN 23S ADNr DE FOTOBIONTES LIQUÉNICOS Y ALGAS RELACIONADAS ....	137
5.5. LAS HES DE FOTOBIONTES LIQUÉNICOS ESTÁN ESTRECHAMENTE RELACIONADAS CON HES DE BACTERIAS.....	141
5.6. <i>Ramalina farinacea</i> REPRESENTA UN NUEVO PATRÓN DE SIMBIOSIS LIQUÉNICA EN LA QUE COEXISTEN DOS ESPECIES DEL GÉNERO <i>Trebouxia</i> .....	143
5.7 <i>Lichenomphalia umbellifera</i> PRESENTA UNA ÚNICA ESPECIE DE <i>Coccomyxa</i> CON CARACTERÍSTICAS SIMILARES A OTRAS ALGAS DEL GÉNERO .....	146

---

5.8. <i>Coccomyxa</i> sp. (Lu) REPRESENTA UN POSIBLE RECURSO GENÉTICO DE APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA.....	148
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	151
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	155
<b>ANEXOS</b> .....	171
Anexo 1. Listado de algas verdes (división Chlorophyta) y cianobacterias empleadas en este estudio. ....	173
Anexo 2. Listado de macroalgas marinas y plantas empleadas en este estudio.....	176
Anexo 3. Localización de las diferentes recolecciones de <i>Ramalina farinacea</i> y <i>Lichenomphalia umbellifera</i> empleadas en este estudio.....	179
Anexo 4. Localización de las recolecciones de los talos de <i>Ramalina farinacea</i> y accesos GenBank de los ITSnr de TR1 y TR9. ....	181
Anexo 5. Accesos GenBank de las diferentes secuencias de organismos utilizadas para realizar filogenias en el apartado 4.4. ....	182
Anexo 6. Listado de los principales cebadores empleados a lo largo de la presente Tesis Doctoral. ....	183
<b>PUBLICACIONES</b> .....	185

**Índice de figuras**

<b>Figura</b>	<b>Página</b>	<b>Figura</b>	<b>Página</b>
Figura 1.1	6	Figura 4.18	92
Figura 1.2	20	Figura 4.19	93
Figura 1.3	21	Figura 4.20	94
Figura 1.4	23	Figura 4.21	96
Figura 1.5	24	Figura 4.22	97
Figura 1.6	27	Figura 4.23	99
Figura 3.1	41	Figura 4.24	100
Figura 4.1	59	Figura 4.25	103
Figura 4.2	61	Figura 4.26	106
Figura 4.3	62	Figura 4.27	107
Figura 4.4	64	Figura 4.28	108
Figura 4.5	65	Figura 4.29	109
Figura 4.6	66	Figura 4.30	112
Figura 4.7	67	Figura 4.31	114
Figura 4.8	67	Figura 4.32	115
Figura 4.9	68	Figura 4.33	116
Figura 4.10	70	Figura 4.34	117
Figura 4.11	72	Figura 4.35	118
Figura 4.12	73	Figura 4.36	120
Figura 4.13	76	Figura 4.37	122
Figura 4.14	77	Figura 4.38	124
Figura 4.15	79	Figura 4.39	125
Figura 4.16	83	Figura 4.40	126
Figura 4.17	91		

## RESUMEN

Las microalgas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos fotosintéticos resultado de los procesos endosimbióticos que han sucedido en la historia evolutiva de los plastidios. Uno de los grupos más importantes y diversos de microalgas es el que constituyen las algas verdes. Dentro de ellas cabe destacar a los fotobiontes liquénicos, un grupo que es capaz de establecer asociaciones simbióticas con hongos para constituir los líquenes.

La complejidad de formas y características dificulta enormemente la clasificación taxonómica basada en caracteres morfológicos, tanto de algas verdes en general como fotobiontes en particular. Sin embargo, la disponibilidad de un mayor número de secuencias genéticas y el desarrollo de marcadores moleculares ha permitido construir una nueva taxonomía y sistemática de estos organismos, que está en continua remodelación. Además, la correcta clasificación de las algas verdes es un paso crucial si se desea trabajar en biotecnología. Actualmente, diversos géneros son empleados en industria con diferentes propósitos. Entre estos cabe destacar el interés biomédico que suscitan unas enzimas (llamadas *Homing* Endonucleasas), codificadas en intrones de tipo I insertos en diversas regiones del genoma de estos organismos.

La presente memoria de Tesis Doctoral describe los experimentos llevados a cabo en diferentes especies de fotobiontes liquénicos y otras microalgas con el objetivo de determinar su biodiversidad y posible aplicabilidad biotecnológica. Para ello, se han desarrollado herramientas moleculares destinadas a mejorar la clasificación y el estudio de las relaciones filogenéticas de estos organismos. Además, se ha explorado una región del genoma cloroplástico con elevada frecuencia de intrones de tipo I que codifican para *Homing* Endonucleasas. Las herramientas desarrolladas fueron utilizadas para caracterizar la diversidad genética de fotobiontes aislados de dos especies muy diferentes de líquenes recolectados en su hábitat natural. En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la generación y revisión constante de nuevas herramientas moleculares en microalgas puede contribuir, por una parte, a aumentar el conocimiento de las características genéticas de estos organismos y las interacciones que establecen con su entorno; y por otra parte, a sustentar su aplicabilidad como fuente de recursos de utilidad biotecnológica.



## ***1. INTRODUCCIÓN***

---

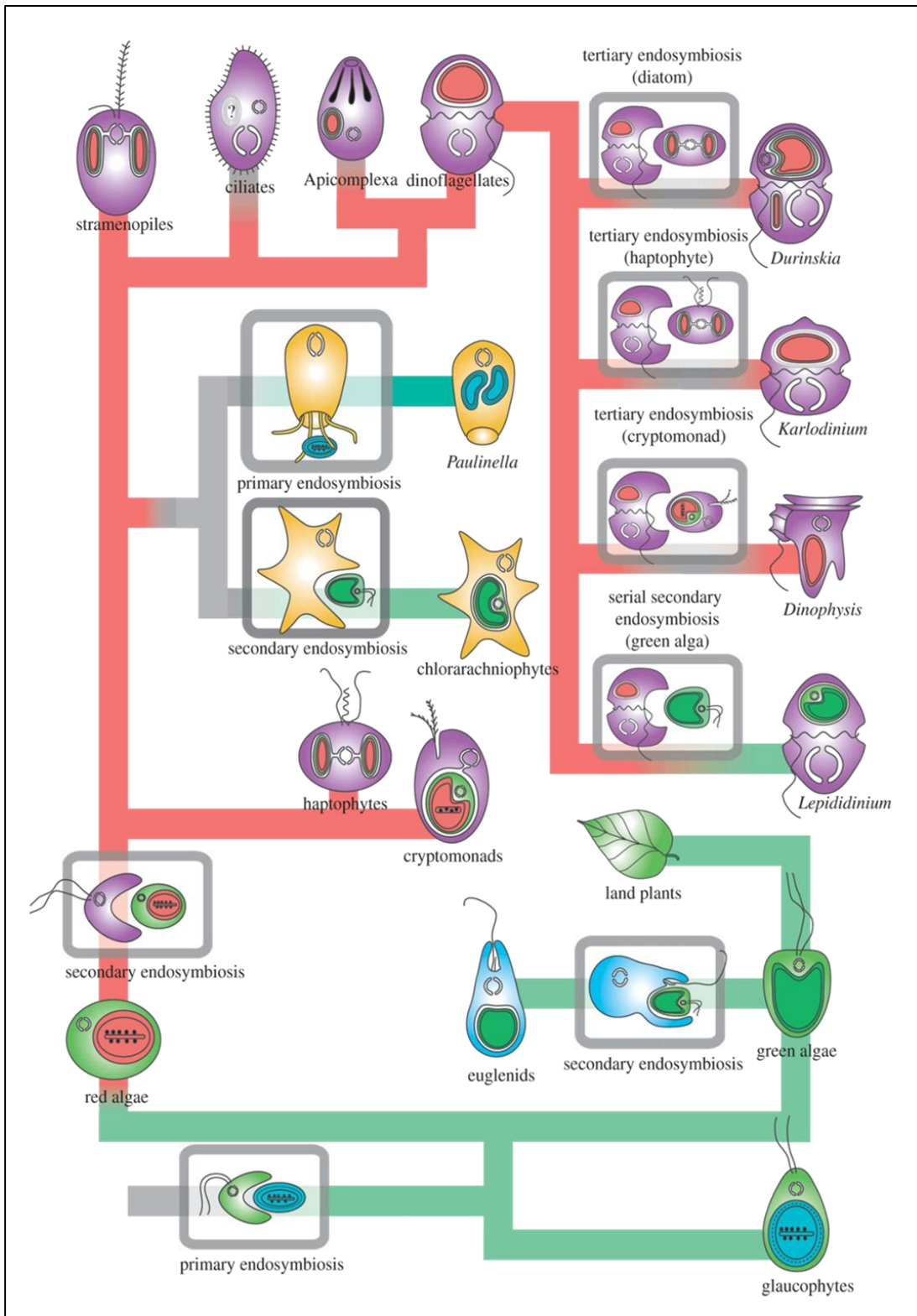




### 1.1. LAS MICROALGAS

Los organismos provistos de cloroplastos son filogenéticamente muy diversos y se distribuyen entre cuatro de los cinco grupos principales de eucariotas (Keeling, 2010). Generalmente se acepta que este particular grupo de organismos deriva de un proceso de endosimbiosis entre un hospedador eucariota y una cianobacteria, generándose una unión estable que dio lugar a la aparición de los plastidios (Archibald, 2009; Keeling, 2010). Esta endosimbiosis primaria marcó el origen de los primeros organismos eucariotas fotosintéticos (Leliaert *et al.*, 2012), también conocidos como *Archaeplastida*. La subsecuente diversificación de estos eucariotas con plastidios dio origen a tres linajes: algas verdes, algas rojas y glaucófitas (Figura 1.1). Una vez establecidos, los plastidios primarios se distribuyeron en otros eucariotas mediante nuevos fenómenos de endosimbiosis secundarias y terciarias, los cuales implicaron la captura de algas verdes y rojas en el interior de protistas no fotosintéticos (Keeling, 2010). Estos eventos contribuyeron a generar la gran diversidad actual de organismos que contienen plastidios en su interior (Figura 1.1).

El término *microalga* se utiliza para designar a un grupo heterógeno de microorganismos fotosintéticos que pueden crecer rápidamente y, en muchos casos, soportar condiciones muy limitantes para otro tipo de organismos. Las causas de esta capacidad son complejas y, en muchos casos, desconocidas. Las microalgas están presentes en todos los ecosistemas terrestres existentes, no sólo acuáticos sino también terrestres, lo que representa una gran variedad de especies viviendo en una amplia gama de condiciones ambientales. Se estima que existen más de 50.000 especies, pero sólo un número limitado, de alrededor de 30.000, se han estudiado y analizado. Una descripción detallada de microalgas en general se presenta en Richmond (2004).



**Figura 1.1** Visión esquemática de la evolución de los plastidios en la historia de los eucariotas fotosintéticos. Los eventos endosimbióticos están recuadrados y las líneas muestran diferentes colores en función de los linajes: sin plastidios (gris), algas verdes (verde), algas rojas (rojo). Imagen tomada de Keeling (2010).

Durante las últimas décadas extensas colecciones de microalgas han sido creadas por los investigadores de diferentes países de varios continentes. En Europa destacan las colecciones de la Universidad de Coimbra en Portugal y la de la Universidad de Göttingen en Alemania. La colección de la Universidad de Coimbra tiene más de 4.000 cepas y 1.000 especies. La colección de la Universidad de Goettingen, Alemania (SAG) y que comenzó a principios de 1920, tiene alrededor de 2.213 cepas y 1.273 especies de las que aproximadamente el 77% son algas verdes. En América destaca la colección de algas de la Universidad de Texas (UTEX), fundada en 1953 y que incluye 2.300 cepas diferentes de algas de agua dulce entre algas verdes y cianobacterias. En Asia, la colección del Instituto Nacional de Estudios del Medio Ambiente (ERI) en Ibaraki, Japón, posee una colección de aproximadamente 2.150 cepas, con alrededor de 700 especies de algas. En Oceanía, la colección de microalgas CCLM en Australia tiene cerca de 800 cepas de diferentes algas, incluyendo representantes de la mayoría de las clases de algas marinas y algunas microalgas de agua dulce, siendo la mayoría de las cepas aisladas de aguas australianas.

El contenido de estas colecciones demuestra la gran variedad de microalgas disponibles que pueden ser empleadas en una amplia diversidad de aplicaciones prácticas, tales como la producción de fármacos u otros recursos biomédicos, de alimentos para el consumo humano y de biocombustibles, entre otras. Sin embargo, la utilización de las algas en algunos objetivos aplicados como por ejemplo la producción de biodiesel está aún muy lejos de ser comercialmente viable. Parte del problema se debe al escaso conocimiento de las algas en general, y a la deficiente integración de la biología y la ingeniería (Scott *et al.*, 2010). En este sentido, cabe destacar que las microalgas se encuentran entre los organismos más diversos del planeta. La configuración de las rutas metabólicas principales es muy variable en este tipo de organismos. Existen diferencias sustanciales en la fotosíntesis, el almacenamiento del carbono fijado y la distribución de los procesos celulares y metabólicos entre los diferentes compartimentos sub-celulares. El estudio de estas diferencias supone establecer una base de conocimiento para la selección de diversas clases de microalgas según el objetivo práctico para el que se quiera emplearlas (Hildebrand *et al.*, 2013).

### **1.1.1. Las algas verdes (División Chlorophyta)**

Las algas verdes (Chlorophyta) presentan una serie de características comunes a las plantas superiores, poniéndose de manifiesto la relación de parentesco existente entre ambos grupos. Sus cloroplastos están rodeados por una doble envoltura membranosa (resultado del proceso de endosimbiosis primaria) y en el interior se sitúan los tilacoides agrupados en lamelas. Los pigmentos fotosintéticos son las clorofila *a* y *b*, existiendo además una serie de pigmentos accesorios como carotenos y xantofilas, implicados en mecanismos de fotoprotección. A pesar de estas características comunes, las algas verdes exhiben una extraordinaria variabilidad en morfología y ecología, reflejando su diversificación evolutiva (Leliaert *et al.*, 2012). Su morfología engloba desde pequeños organismos unicelulares hasta estructuras pluricelulares más complejas. Son especialmente abundantes en ambientes de agua dulce, aunque también se pueden encontrar en los mares y en ambientes terrestres. Más aún, las algas verdes son capaces de establecer simbiosis con una amplia variedad de organismos. Algunos ejemplos son los líquenes, resultado de asociaciones simbióticas con hongos (Chapman & Margulis, 1998); algunas plantas vasculares como *Ginkgo biloba* (Tremouillaux-Guiller *et al.*, 2002); ciliados como *Paramecium bursaria* (Hoshina & Imamura, 2008); corales (Meyer & Weis, 2012) y la salamandra *Ambystoma maculatum* (Baxter *et al.*, 2014).

### **1.1.2. Análisis de la biodiversidad de algas verdes: código de barras molecular**

El estudio de la diversidad de organismos presentes en el planeta ha sido posible gracias a la utilización de diferentes criterios de clasificación, basados tanto en caracteres morfológicos como bioquímicos y moleculares. Sin embargo, es tal la diversidad de especies existente en la Tierra que a menudo existen problemas para la realización de una clasificación exhaustiva de las mismas (Kress & Erickson, 2012). Para solventar este problema, es necesario crear un sistema de identificación de especies basado en criterios uniformes, superando las clasificaciones morfológicas, las cuales a menudo, tienen un alto componente subjetivo y no son capaces de dar respuesta al

estudio de especies crípticas<sup>1</sup> (Hebert *et al.*, 2003). El descubrimiento del código genético fue sin duda el impulsor de un nuevo sistema que permitió la rápida identificación de cualquier especie, basándose en el uso de la molécula genética presente en el núcleo de todas las células: el ADN.

La utilización del ADN para la identificación y clasificación de los organismos recibe el nombre de *Código de Barras Molecular* (*DNA Barcoding* en inglés) y fue propuesto inicialmente por el investigador canadiense Paul D. N. Hebert en el año 2003 (Hajibabaei, 2012). Mediante el uso de secuencias cortas de ADN obtenidas a partir de una región del genoma mitocondrial, concretamente del gen que codifica para la citocromo c oxidasa I (*cox1*), los autores crearon un código de barras para la identificación de diferentes especies de lepidópteros. El éxito de estas investigaciones fue tal que en el año 2004 se fundó el *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL), una iniciativa internacional de colaboración entre diferentes asociaciones relacionadas con la historia natural (museos, herbarios y conservaciones), con expertos en genómica, taxonomía y ciencias computacionales (<http://www.barcodeoflife.org/>). La función de este consorcio interdisciplinar es el almacenamiento de multitud de secuencias genéticas de distintos organismos, facilitando la tarea de identificación de especies y creando un inventario de la biodiversidad (Schindel & Miller, 2005).

Aunque inicialmente los estudios de código de barras fueron realizados sobre todo en animales, han ido surgiendo grupos de trabajo alternativos entre los que destacamos los de plantas (*Plant Working Group*, PWG) y protistas (*Protist Working Group*, ProWG). El propósito de estos grupos es explorar las particularidades del genoma de este tipo de organismos, ya que en numerosas ocasiones lo que es válido para animales no lo es para plantas superiores o protistas (Cowan & Fay, 2012). De hecho, en animales existe una alta tasa de sustitución de nucleótidos en el genoma mitocondrial que no sucede para plantas, con lo que el uso del gen *cox1* es muy limitado para el estudio de la diversidad en comunidades vegetales ya que no permite la correcta identificación de las especies.

---

<sup>1</sup>Especies crípticas: aquellas especies que son extremadamente similares en apariencia pero se hallan reproductivamente aisladas entre sí.

Para que una región genética pueda ser considerada un buen marcador susceptible de ser empleado en la creación de códigos de barras debe satisfacer tres criterios (Kress *et al.*, 2005; CBOL Plant Working Group, 2009; Kress & Erickson, 2012):

1. Contener variabilidad genética y divergencia significativa a nivel de especie.
2. Tener una longitud adecuada que facilite la amplificación y secuenciación del ADN (400-800 pb).
3. Poseer regiones flanqueantes conservadas que permitan el desarrollo de cebadores universales de amplia aplicación taxonómica.

Además de esos tres requisitos fundamentales, también es deseable que las regiones del genoma seleccionadas como marcadores moleculares permitan la obtención de secuencias fáciles de alinear, que contengan pocas inserciones/delecciones para facilitar un buen análisis en estudios filogenéticos y de evolución molecular (Chase *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta los criterios anteriormente citados, existen genes con una larga trayectoria de uso como marcadores moleculares. Entre ellos podemos destacar las subunidades pequeña y grande del ARN ribosomal nuclear (*SSU* y *LSU*), junto a sus espaciadores transcritos internos (*ITS1* e *ITS2*), la citocromo c oxidasa I mitocondrial (*cox1*) y la ribulosa bisfosfato carboxilasa cloroplástica (*rbcL*) (Blaxter, 2004). Más específicos para hongos se encuentran las subunidades 1 y 2 de la ARN polimerasa II, el factor de elongación  $1\alpha$  (*tef-1\alpha*) o la ATP sintasa mitocondrial (Walker *et al.*, 2012).

El gen *cox1* ha sido ampliamente aceptado como núcleo de un sistema de identificación global para animales (Hebert *et al.*, 2003), debido en parte a la posibilidad de diseño de cebadores universales muy robustos y a poseer un gran rango de señal filogenética, mucho mayor que otros genes mitocondriales. En plantas, sin embargo, han existido más inconvenientes a la hora de aceptar un marcador molecular universal que permita clasificar a los diferentes tipos de taxones vegetales. Uno de los más utilizados han sido los ITS nucleares (ITSnr) ya que, en general, cumplen bien los requisitos establecidos para un marcador, mostrando grandes valores de divergencia entre especies pero existiendo aun así ciertas limitaciones de uso, como la presencia de múltiples copias incorrectas en diversos grupos vegetales (Cowan & Fay, 2012). Además, pueden presentar problemas cuando se quiere amplificar muestras

ambientales en las que existe más de un individuo presente (Kress *et al.*, 2005). La citocromo oxidasa ha resultado no ser apropiada para la mayoría de especies vegetales debido a su menor tasa de evolución en mitocondrias de plantas vasculares (Kress *et al.*, 2005; Chase *et al.*, 2007). Por lo que la mejor alternativa para este tipo de organismos era explorar un genoma característico de ellos, como el del cloroplasto. Este genoma es generalmente de herencia uniparental, no recombinante y de estructura generalmente estable. Numerosos estudios se han centrado en examinar las regiones codificantes y no codificantes de este genoma en busca de un potencial marcador. Actualmente se acepta como marcador para plantas la propuesta presentada por el PWG, basada en la combinación de los genes *rbcL* y *matK* (CBOL Plant Working Group, 2009).

Por último, los genomas mitocondrial y cloroplástico presentan una ventaja añadida a la hora de ser seleccionados para la búsqueda de potenciales marcadores moleculares. Esta ventaja está relacionada con la existencia de varias copias de estos genomas en cada célula, siendo capaces de perdurar durante más tiempo en especímenes de herbario o pertenecientes a colecciones de museos (Chase *et al.*, 2005). Esto permite amplificar ADN a partir de muestras que están bastante degradadas, algo que a veces resulta necesario para completar correctamente los estudios filogenéticos de una determinada especie.

### **1.1.3. Problemas de clasificación en algas verdes**

El progreso en la creación de códigos de barras para la identificación de especies ha ido ligado a los avances en los métodos de secuenciación del ADN, que han permitido generar gran cantidad de datos en poco tiempo y con precios cada vez más asequibles. Aunque el propósito fundamental de la creación de estos códigos de barras es aumentar el conocimiento sobre la diversidad de organismos del planeta, a menudo surgen problemas en la obtención de secuencias de algunos grupos, existiendo numerosas especies para las que aún no se ha determinado con éxito un código de barras molecular (Hajibabaei, 2012). De hecho, en lo que respecta a algas verdes, aun no se ha conseguido establecer un código de barras debido en parte a la complejidad y enorme diversidad de organismos que abarca esta división. Además, este grupo ha

sido comúnmente estudiado desde perspectivas taxonómicas más relacionadas con la morfología comparada y la ultraestructura (Medlin *et al.*, 2007).

Las clasificaciones morfológicas de las algas verdes han variado a lo largo del desarrollo de la ficología, basándose principalmente en estudios ultraestructurales de flagelos y cloroplastos, composición de paredes celulares así como caracteres citológicos de los estados vegetativos del ciclo de vida de estos organismos (Leliaert *et al.*, 2012). Tradicionalmente, se reconocían cuatro clases dentro de la división Chlorophyta: Chlorophyceae, Prasinophyceae, Trebouxiophyceae y Ulvophyceae (Leliaert *et al.*, 2012). Sin embargo, con el desarrollo de marcadores moleculares durante los años 90 y la aplicación de análisis filogenéticos se estableció una nueva sistemática y taxonomía de estos organismos.

Así, si se consulta el apartado de taxonomía del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/>) se observa que en la actualidad se distinguen siete clases dentro de la división Chlorophyta: (i) Chlorophyceae (Christensen, 1994); (ii) Mamiellophyceae (Marin & Melkonian, 2010); (iii) Nephroselmidophyceae (Cavalier-Smith, 1993); (iv) Pedinophyceae (Moestrup, 1991); (v) Prasinophyceae (Cavalier-Smith, 1998); (vi) Trebouxiophyceae (Friedl, 1995) y (vii) Ulvophyceae (Mattox & Stewart, 1984). Sin embargo, esta clasificación puede verse modificada con la adición de una octava clase, llamada Chlorodendrophyceae, que es contemplada por Adl *et al.* (2012) en su última revisión de la clasificación de organismos eucariotas así como en la base de datos de algas *AlgaeBase* (Guiry & Guiry, 2014).

Por tanto, hay que destacar las exhaustivas revisiones a las que están siendo sometidos estos organismos durante las últimas décadas, generándose nuevas categorías taxonómicas y separación de linajes que antes no existían. Estos hechos son coincidentes con avances en técnicas de cultivo, bioquímica analítica, microscopía y, como ya se comentó con anterioridad, tecnologías de secuenciación de genes (De Clerck *et al.*, 2013).



#### 1.1.4. Marcadores moleculares utilizados en algas verdes

Desde 1990, los rápidos avances en técnicas moleculares como la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR) y el desarrollo de la bioinformática han hecho posible generar y analizar un gran número de datos (Leliaert *et al.*, 2012). El análisis exhaustivo de las secuencias de nucleótidos ha permitido, a su vez, determinar las regiones del ADN más idóneas para ser utilizadas como marcadores moleculares en especies de algas verdes. Así, el gen nuclear que codifica el ARNr 18S (18S ADNr) ha sido uno de los marcadores más utilizados para inferir relaciones filogenéticas entre algas verdes y otros grupos de protistas (Leliaert *et al.*, 2012; Pawlowski *et al.*, 2012). Entre las ventajas de este marcador destacan su elevado número de copias por genoma, así como su elevado nivel de expresión, pudiendo ser utilizado en investigaciones moleculares y ecológicas a nivel del ARN (Pawlowski *et al.*, 2012). Otros marcadores que han sido empleados en diferentes estudios de algas verdes son los ITS nucleares, el 28S ADNr, los genes *rbcl*, *tuf A*, *atpB* (Leliaert *et al.*, 2012) y el 23S ADNr (Sherwood & Presting, 2007; del Campo *et al.*, 2010a).

Como se ha mencionado anteriormente, dada la diversidad de especies y complejas historias evolutivas que presentan las algas verdes (Figura 1.1), es virtualmente imposible encontrar un único marcador molecular para ser empleado a modo de código de barras. Se hace por tanto necesario contar con un gran número de genes que permitan la realización de filogenias combinadas con gran resolución. Una propuesta de interés es la que proponen desde el *Protist Working Group* (ProWG, (Pawlowski *et al.*, 2012)). Este grupo recomienda el uso de dos aproximaciones; por un lado, la utilización de un código de barras universal para eucariotas (llamado *Pre-barcode*), que permita una primera identificación del organismo de estudio. Después se emplearía un código de barras específico para el grupo de especies que se desee estudiar (llamado *Specific barcode*). Como propuesta de código de barras universal estos autores sugieren el uso de una región del 18S ADNr, una elección razonable si se tienen en cuenta las ventajas anteriormente citadas y su tradicional uso como marcador de algas verdes y protistas.

Es por tanto necesario reconocer la importancia que tiene la obtención de unos marcadores moleculares adecuados para discriminar las diferentes clases de

organismos que componen la división Chlorophyta. Las clasificaciones morfológicas pueden ser de utilidad en el descubrimiento inicial de las especies, pero deberían ser contrastadas con otros métodos, preferiblemente basados en el ADN (Verbruggen, 2014).

Hasta la fecha de elaboración de la presente Tesis Doctoral (actualizada a 11 mayo de 2014), se han secuenciado 29 genomas cloroplásticos y 25 mitocondriales de algas de la división Chlorophyta, una cifra muy inferior a la de los 442 genomas cloroplásticos y 69 mitocondriales disponibles de la división Streptophyta, la inmensa mayoría de plantas vasculares. Esta diferencia de cifras podría responder, en nuestra opinión, a varios factores entre los que destacamos dos: (i) Una mayor presencia de las plantas superiores en la vida cotidiana del ser humano, marcada desde el origen de la agricultura; (ii) Las plantas vasculares, al ser visibles macroscópicamente, constituyen elementos cotidianos del paisaje, por lo que han sido objeto de clasificaciones taxonómicas desde la antigüedad.

Las microalgas, al ser organismos mayoritariamente microscópicos, requieren de un minucioso estudio taxonómico para ser identificadas correctamente. Este proceso, esencial para determinar exitosamente una especie, es crucial si además se quiere garantizar la aplicabilidad de la misma en investigación básica e industria. De los antecedentes expuestos previamente, surge la necesidad de desarrollar nuevos marcadores moleculares que complementen los ya existentes, mejorando la identificación y análisis filogenéticos de algas verdes.

## **1.2. LAS ALGAS LIQUÉNICAS**

### **1.2.1. Las algas verdes en el contexto de la simbiosis liquénica**

Como se ha indicado en párrafos anteriores, muchas especies de algas verdes son capaces de establecer simbiosis con una amplia variedad de organismos. Un ejemplo de ello es la simbiosis liquénica. Los líquenes son sistemas complejos, entidades nuevas que se individualizan a partir de asociaciones simbióticas cíclicas (Chapman & Margulis, 1998) entre, al menos, un micobionte heterótrofo y un socio fotosintético (fotobionte).

En las simbiosis liquénicas el 90-95% de los fotobiontes son algas verdes unicelulares, existiendo en menor proporción líquenes que contienen cianobacterias como fotobionte. Al contrario de lo que sucede en micobiontes, son muy pocos los géneros de algas susceptibles de liquenizar. En la actualidad, se conocen unos 40 géneros de algas (ficobiontes) y cianobacterias (cianobiontes) que establecen simbiosis liquénicas (Friedl & Büdel, 2008). Los géneros *Asterochloris*, *Coccomyxa*, *Dictyochloropsis*, *Trentepohlia* y *Trebouxia* son los más comunes entre los ficobiontes, mientras que el género *Nostoc* es el más común entre los cianobiontes. Los ficobiontes de los géneros *Asterochloris* y *Trebouxia* raramente son encontrados en estado de vida libre; de hecho, se piensa que el alto grado de coevolución que han adquirido durante la simbiosis es uno de los motivos por el que estos géneros serían simbiontes obligados (Ahmadjian, 1988; 1993).

Aproximadamente el 90% de los ficobiontes son algas de la división Chlorophyta, perteneciendo mayoritariamente a la clase Trebouxiophyceae (Friedl & Büdel, 2008). El género *Trebouxia* es el más frecuente y se encuentra en aproximadamente el 20% de los líquenes, la mayor parte pertenecientes al orden Lecanorales. El género *Coccomyxa* es común en la familia Peltigeraceae así como en basidiolíquenes del género *Lichenomphalia*. Además, existen otras algas que pueden formar parte de los talos liquénicos y que pertenecen a la división Heterokontophyta. Este es el caso de los géneros *Heterococcus* (Clase Xantophyceae) y *Petroderma* (clase Phaeophyceae) (Gärtner, 1992).

La identificación de fotobiontes en el talo liquénico no resulta una tarea fácil, pues a menudo las formas, tamaños y colores de estos organismos se ven modificados por la asociación establecida con el hongo (DePriest, 2004). En los ficobiontes suele ser frecuente encontrar cambios en la morfología de los cloroplastos. Por todo ello, las investigaciones centradas en clasificar estos organismos han recurrido al cultivo axénico y a la realización de análisis genético-moleculares con el uso de marcadores específicos. En los talos liquénicos, las hifas del micobionte se disponen rodeando a los fotobiontes, estableciendo en algunos casos contacto con ellos a través de unas estructuras de contacto estrecho y/o penetración denominadas haustorios. Estas estructuras son variables, resultando a veces muy evidentes y otras difíciles de observar, ya que en ocasiones no profundizan en las células algales (Ahmadjian, 1993).

En cualquier caso, la interacción fisiológica producida entre los simbioses permite el intercambio de sustancias, haciendo de la liquenización una estrategia nutricional muy eficaz (Honegger, 1998) en la que el micobionte se alimenta de fotoasimilados producidos por el fotobionte.

Este grado de integración morfológico y metabólico de los simbioses posibilita que emerjan nuevas propiedades no aditivas que representan innovaciones evolutivas (Margulis & Barreno, 2003; Barreno, 2004). Según Starr (1975), *la mayoría de las simbiosis resultan, al menos temporalmente, en algo más que la suma de las partes*. Así, los talos liquénicos presentan, frente a los simbioses aislados, gran originalidad morfológica, fisiológica, adaptativa, de modos de vida y de reproducción que les ha hecho ser considerados como *microecosistemas peculiares* (Honegger, 1998). En líquenes, la forma, color y tamaño del talo es completamente diferente a la de los simbioses crecidos en cultivo axénico (DePriest, 2004), indicando que las características liquénicas particulares van más allá de aquellas que muestran mico y fotobionte aisladamente. Quizás la más sobresaliente de dichas características es el amplio rango de distribución geográfica y ecológica de los líquenes, que los convierte en uno de los grupos más ubicuos del planeta. Es precisamente la asociación entre los simbioses lo que aumenta la capacidad de colonizar hábitats donde cada uno de ellos por separado no podría vivir (de Vera *et al.*, 2008), lo que demuestra el éxito evolutivo de la simbiosis liquénica. El reciente descubrimiento de fósiles bien conservados sustenta el criterio de que estos organismos han estado interviniendo desde el Proterozoico ( $\pm$  600 ma.) sobre la meteorización de las rocas y los ciclos biogeoquímicos globales del sistema Tierra (Yuan *et al.*, 2005; Karatygin *et al.*, 2009), antes incluso que las plantas vasculares.

La clasificación y denominación de los líquenes se hace en referencia al micobionte, rigiéndose por las normas establecidas en el Código de Nomenclatura Botánica. Se estima que al menos un 35% de los hongos conocidos, pertenecientes mayoritariamente a la división Ascomycota, han adoptado algún tipo de asociación, existiendo aproximadamente entre 13.500-17.000 especies fúngicas formadoras de asociaciones liquénicas (Nash, 2008). Los hongos formadores de líquenes pertenecen mayoritariamente a la división Ascomycota, contando con unas 14.000 especies, todas pertenecientes a la subdivisión Pezizomycotina (Honegger, 2008). Existe además un

pequeño grupo de hongos basidiomicetos (pertenecientes a la familia Agaricomycetes) que establecen simbiosis líquénicas. La variedad morfológica observada en talos de ascolíquenes no se produce en este grupo de basidiolíquenes. Estos organismos presentan estructuras más sencillas y modos de interacción hongo-alga diferentes a los hallados en ascolíquenes (Oberwinkler, 2012).

### **1.2.2. Estudios moleculares y fisiológicos de la diversidad de algas líquénicas**

La mayoría de los estudios publicados sobre la diversidad de algas líquénicas eucariotas (ficobiontes) se han limitado fundamentalmente a la utilización de una región muy concreta del genoma nuclear consistente en el operón de ARNs ribosomales. En general, se han venido utilizando tanto el gen que codifica el 18S ARNr como las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 (ITSnr). Si bien las secuencias del 18S ARNr se utilizan fundamentalmente para estudios en taxones superiores al de especie, los ITSnr se utilizan para estudios de diferentes poblaciones de la misma especie. En menor medida, en algunos estudios se han utilizado marcadores adicionales, algunos de ellos de codificación plastidial como el *rbcl*, que codifica la subunidad grande de la proteína Rubisco, y algunas regiones intergénicas; y otros codificados en el núcleo, como genes de actina.

En definitiva, la disponibilidad de marcadores moleculares para este tipo de organismos es muy limitada, sobre todo de cebadores *universales* que permitan amplificar el ADN de ficobiontes de al menos los géneros más representativos (*Asterochloris*, *Coccomyxa*, *Dictyochloropsis* y *Trebouxia*). Hemos comprobado mediante el uso de nuevos marcadores adicionales diseñados por nuestro grupo, que la utilización de los ITSnr como único marcador, supone generalmente una infravaloración de la diversidad real de especies en el género *Trebouxia*.

La escasez de marcadores moleculares para poder identificar y estudiar la diversidad y relaciones filogenéticas de los fotobiontes líquénicos no es la única limitación al estudio de estos organismos. También hay una enorme escasez de datos sobre su fisiología y la presumiblemente gran diversidad de respuestas funcionales que cabe esperar en un grupo tan numeroso y variado de especies, adaptadas a muy diferentes condiciones ambientales. Esta situación dificulta enormemente tanto los estudios básicos como aplicados, incluyendo el seguimiento y monitorización de las

poblaciones de algas verdes en el contexto de la simbiosis liquénica así como sus respuestas a perturbaciones del ambiente.

### **1.3. APLICACIONES DE LAS ALGAS VERDES. LAS ALGAS VERDES COMO FUENTE DE HOMING ENDONUCLEASAS (HES)**

#### **1.3.1. Principales aplicaciones prácticas**

La importancia que tienen las algas verdes no sólo tiene relación con su ecología, formando parte de simbiosis y cadenas tróficas, sino también con su aplicabilidad en diversos estudios científicos y procesos industriales. Su gran variabilidad de formas y capacidad de crecer en condiciones ambientales variables hace a estos organismos idóneos para ser utilizados en diversos procesos industriales, habiéndose generado en los últimos años un gran interés por la investigación biotecnológica de microalgas (Skjanes *et al.*, 2013). Desde hace décadas varios géneros de algas verdes (sobre todo microalgas) han sido empleados como sistemas modelo de importancia económica, debido a sus aplicaciones relacionadas con alimentación, acuicultura, cosmética, medicina y, más recientemente, en la producción de biocombustibles.

Sin la realización previa de estudios básicos destinados a determinar qué características las hacen adecuadas para determinados procesos industriales, no sería posible la utilización práctica de cultivos de algas. Algunas especies como *Chlamydomonas reinhardtii* y *Chlorella vulgaris* han sido estudiadas desde hace décadas con objeto de conocer los mecanismos bioquímicos y fisiológicos relacionados con fotosíntesis, biogénesis de cloroplastos y reproducción (Leliaert *et al.*, 2012). Se han desarrollado métodos de transformación de cloroplastos en *C. reinhardtii* (Rochaix, 1995), contribuyendo a ampliar enormemente las posibilidades de trabajo con estos organismos.

En la actualidad, al menos unos 50 géneros de algas verdes son utilizados para usos industriales, destacando *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus* y *Tetraselmis*. Entre los productos que se extraen de estos organismos se incluyen sobre todo diferentes antioxidantes, ácidos grasos, polisacáridos, glicoproteínas, enzimas y antibióticos (Skjanes *et al.*, 2013). Carotenoides y xantofilas constituyen el grupo de

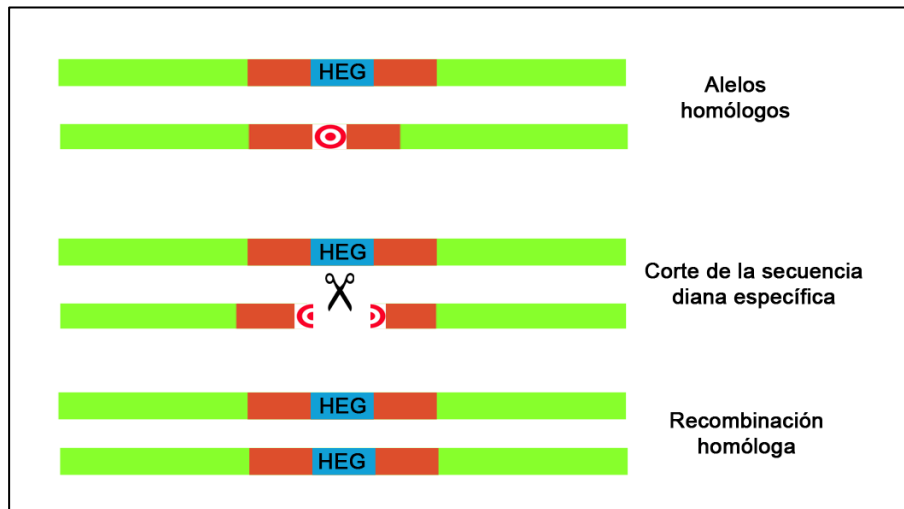
antioxidantes más importantes y con mayor comercialización obtenido de microalgas, destacando los compuestos  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, luteína y astaxantina. Por ejemplo, el alga *Dunaliella salina* es una de las más utilizadas para la extracción de  $\beta$ -caroteno (Leliaert *et al.*, 2012), mientras que *Haematococcus pluvialis* es cultivada para la sobreproducción de astaxantina (Zhang *et al.*, 2014). La cepa *Chlorella sorokiniana* SAG 211-32 es una de las más empleadas en la actualidad para la extracción de luteína (Cordero *et al.*, 2011). Otros antioxidantes que se extraen de cultivos de microalgas verdes son diversas vitaminas (E y C), Hidroxitolueno butilado (BHT) y glutatión (Skjanes *et al.*, 2013). Algunas algas verdes son fuente de un tipo particular de endonucleasas conocidas como *Homing* endonucleasas. El alga verde *Chlamydomonas eugametos* codifica una de estas enzimas (I-Ceul), actualmente comercializada por la firma *New England Biolabs®Inc.* Este tipo de enzimas, de los que se hablará más extensamente en el apartado siguiente, son muy interesantes por sus aplicaciones en biomedicina (Marcaida *et al.*, 2010).

### 1.3.2. Características generales de las *Homing* Endonucleasas

Las *Homing* Endonucleasas (HEs) son enzimas capaces de cortar el ADN de doble cadena, reconociendo dianas de un tamaño grande (14-40 pb), por lo que también son conocidas por el nombre de meganucleasas. La secuencia de reconocimiento a la que se unen es lo suficientemente larga como para que su presencia aparezca al azar con una probabilidad muy reducida, encontrándose habitualmente una única repetición por genoma. A diferencia de las enzimas de restricción estándar, las HEs toleran ciertas sustituciones en la secuencia diana, por lo que reconocen y cortan de forma eficaz familias de secuencias.

Las HEs están presentes en todas las ramas de la vida (Eubacterias, Arqueas y Eucariotas) codificadas en marcos de lectura abiertos (*Open Reading Frame*, ORF) dentro de intrones de tipo I y II, intrones de arqueas y en forma de inteínas. Estas secuencias son móviles, pues las HEs cortan y se insertan en medio de la secuencia de reconocimiento de un alelo afín que carece de ese elemento genético. En rasgos generales, cuando en una célula existe un gen que contiene un intrón que contiene una HE y un alelo de este mismo gen sin el intrón, la HE reconoce y corta la secuencia diana específica en el gen sin intrón. La reparación de la rotura de la doble hélice se

produce vía recombinación homóloga, utilizando como molde el alelo que contiene el intrón, propagándose así la secuencia codificante de la HE (Stoddard, 2006) (Figura 1.2). Este proceso de conversión génica o *homing* conduce a la transmisión dominante de estos elementos genéticos móviles en las poblaciones (Goddard & Burt, 1999).



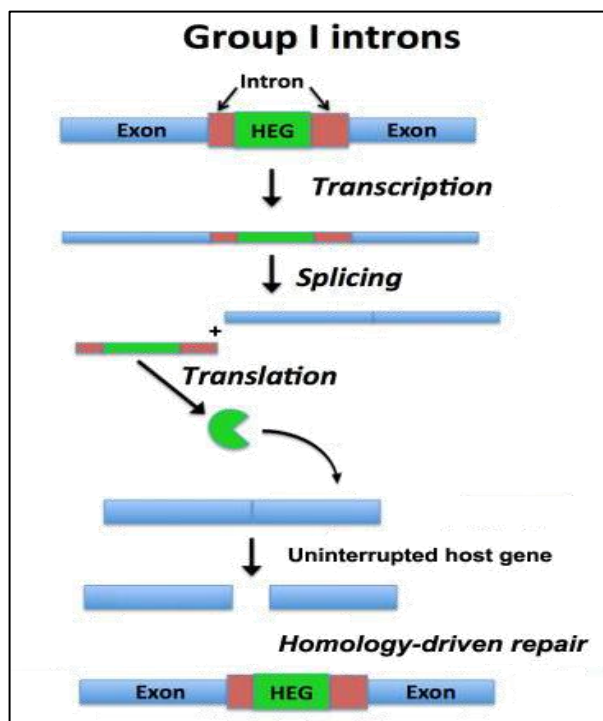
**Figura 1.2** Esquema general del mecanismo de acción de las HEs. La HE contenida en uno de los alelos (HEG) reconoce la secuencia diana del alelo homólogo para cortarla. La propagación de la HE se lleva a cabo mediante el fenómeno de recombinación homóloga.

El fenómeno genético de *homing* fue descrito por primera vez en 1970, al estudiarse la transferencia unidireccional del marcador molecular  $\omega$  desde cepas  $\omega^+$  a cepas  $\omega^-$  de *Saccharomyces cerevisiae* (Dujon, 2005). Este marcador correspondía a un intrón de tipo I insertado en el gen que codifica para la subunidad grande del ARNr del genoma mitocondrial de este organismo. Estudios posteriores indicaron que este fenómeno de conversión genética específica requería de una rotura de doble cadena de ADN en el sitio de inserción del intrón, unido a la expresión del ORF presente dentro del mismo intrón. El análisis de la actividad enzimática de la proteína codificada demostró que se trataba de una endonucleasa capaz de reconocer y cortar secuencias diana de los alelos que carecen del intrón, promoviendo así la dispersión de la secuencia intrónica (Dujon, 2005; Stoddard, 2006).



### 1.3.3. Mecanismos de *homing*

Las HEs emplean diferentes mecanismos de *homing* según la naturaleza de la secuencia que las codifica. En intrones de tipo I, el mecanismo de *homing* requiere de la actividad endonucleasa de la propia HE codificada por el intrón. Esta proteína se une específicamente al sitio diana presente únicamente en el alelo que carece del intrón. Esta diana está formada por secuencias de exón que flanquearán al intrón copiado una vez que este quede insertado. La HE unida a la secuencia diana produce un corte del ADN de doble cadena, que es posteriormente reparado por recombinación homóloga entre los alelos (Stoddard, 2006; 2014) (Figura 1.3).



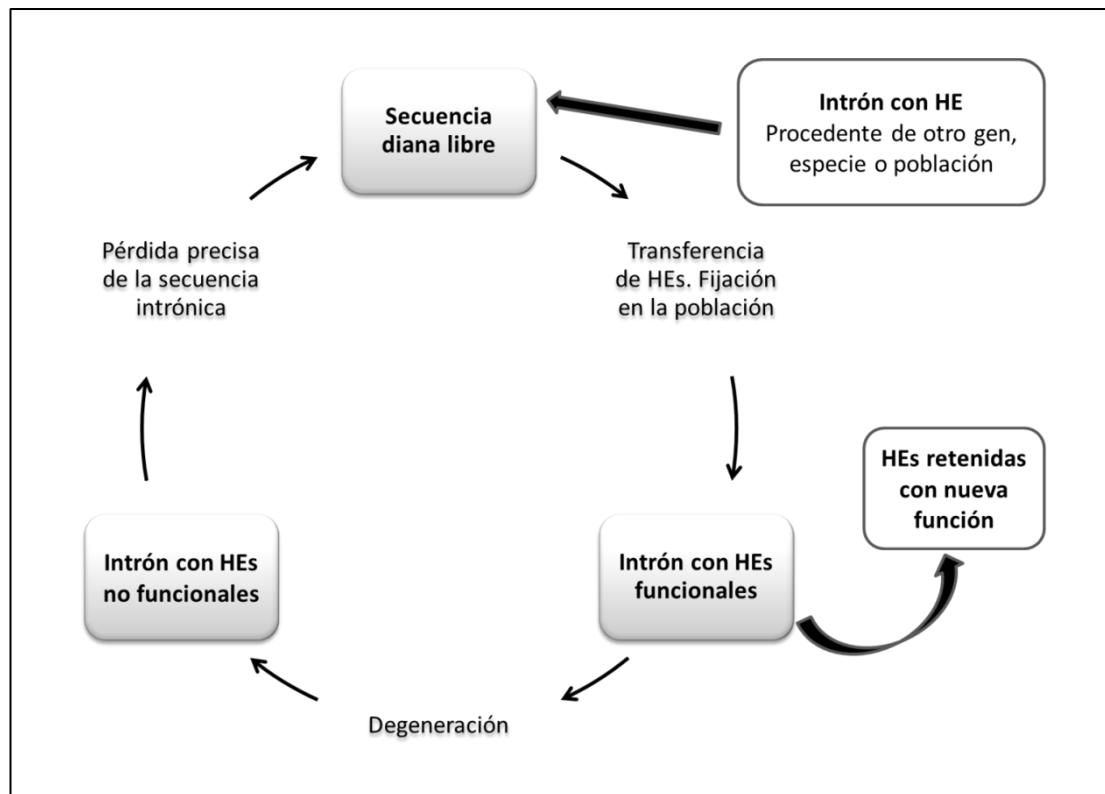
**Figura 1.3** Mecanismo general de *homing* para intrones de tipo I. HEG: gen que codifica para HE. Imagen adaptada de Stoddard (2014).

Los diferentes mecanismos de *homing* siempre resultan en la expansión de los genes que codifican para HEs, por invasión de nuevos alelos dentro de las poblaciones. Cuando un individuo hereda un alelo portador de HE de uno de los parentales, la frecuencia de este alelo en su progenie será de aproximadamente el 95%. La dispersión de estos elementos genéticos se produce por su actividad catalítica de

autopropagación, sin proporcionar un beneficio aparente para el hospedador. Por este motivo han sido llamados elementos genéticos parásitos (Gogarten & Hilario, 2006).

El éxito evolutivo de los genes que codifican para HEs depende en gran medida de su carencia de toxicidad para los genomas hospedadores, pero también de la eficacia con la que son capaces de propagarse entre genomas mediante transferencia horizontal. Las HEs evitan la interrupción de genes funcionales del hospedador al insertarse en secuencias autocatalíticas a nivel de ARN (intrones de tipo I, de tipo II y de arqueas) y a nivel de proteínas (inteínas), o incluso en regiones intergénicas. El gran tamaño de las secuencias de reconocimiento facilita una inserción precisa en estos lugares concretos del genoma. Sin embargo, la dispersión de las HEs siempre queda garantizada por la flexibilidad en el reconocimiento de las secuencias diana, en el caso de que éstas sufrieran variación en el hospedador (Stoddard, 2014).

Los alelos que codifican HEs se dispersan en las poblaciones aumentando su frecuencia hasta que colonizan los sitios de reconocimiento en todos los organismos que las constituyen. El elemento genético parásito, una vez fijado en la población, soporta poca selección contra las mutaciones que alteran la actividad endonucleasa, por lo que la función HE degenera. A menudo su secuencia se pierde junto con la del intrón, de forma tan precisa, que puede reconstruirse el sitio diana posibilitando de nuevo la re-invasión (Goddard & Burt, 1999). Según este modelo cíclico de *homing* (Figura 1.4), tras la dispersión y fijación en las poblaciones, las secuencias de HEs degeneran perdiéndose la función endonucleasa hasta terminar desapareciendo. Probablemente, la persistencia de las HEs a lo largo del tiempo evolutivo se deba a su transferencia de forma regular a nuevas especies, al menos una vez antes de degenerar.



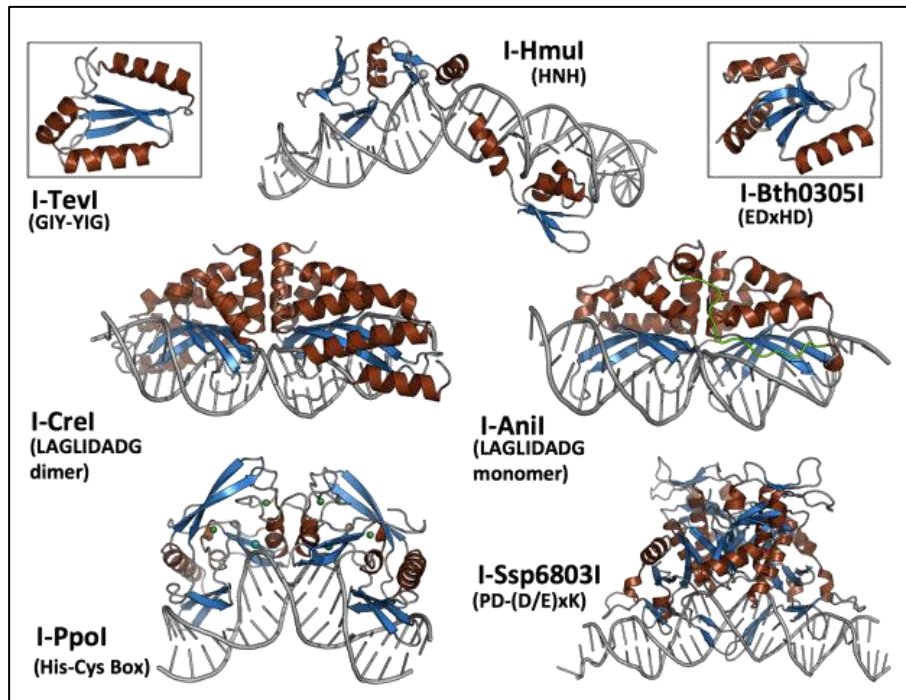
**Figura 1.4** Ciclo de *Homing* para intrones codificantes de HEs. Adaptado de Goddard & Burt (1999) y Gogarten & Hilario (2006).

Existen diversos ejemplos de HEs que poseen funciones beneficiosas, permaneciendo durante largos periodos de tiempo en un mismo linaje hospedador, por lo que desafían la aplicabilidad general de este modelo cíclico de *homing* (Gogarten & Hilario, 2006). Como ejemplo podemos destacar las maturasas, proteínas que colaboran en el plegamiento y correcto *splicing* de los intrones que las codifican. Estas proteínas han evolucionado a partir de HEs (Belfort, 2003; Haugen *et al.*, 2005). Otro ejemplo son las HEs encontradas en genomas de bacteriófagos, que parecen conferirles gran ventaja adaptativa por su capacidad de destruir específicamente el genoma de otros bacteriófagos competidores (Gogarten & Hilario, 2006).

#### 1.3.4. Familias de *Homing* Endonucleasas

En los últimos 25 años se han descrito y caracterizado seis familias de HEs: LAGLIDADG, HNH, GIY-YIG, His-Cys Box, PD-(D/E)xK y EDxHD (Stoddard, 2014) (Figura 1.5). La clasificación atiende principalmente a diferencias en la estructura de los dominios conservados, mecanismos catalíticos, distribución en los genomas y su

relación filogenética con otras endonucleasas. La existencia de al menos estas seis familias distintas indica que las HEs tienen orígenes evolutivos diversos e independientes.



**Figura 1.5** Familias estructurales de HEs. Imagen adaptada de Stoddard (2014).

Las HEs pertenecientes a la familia LAGLIDADG constituyen la familia filogenéticamente más diversa. Se encuentran codificadas mayoritariamente en genomas de cloroplastos de algas y plantas, en mitocondrias de hongos y protozoos, y en arqueas. Su nombre se debe a la existencia de una secuencia de aminoácidos consenso (llamada también motivo o dominio) conocida como LAGLIDADG, que interviene directamente en la catálisis de la actividad enzimática.

Las familias HNH e His-Cys Box poseen características estructurales y funcionales lo suficientemente diferentes como para englobarlas en familias separadas. Sin embargo, parece que ambas derivan de una nucleasa ancestral, ya que conservan el motivo  $\beta\beta\alpha$ -metal donde radica la actividad nucleasa. Las HEs de la familia HNH se encuentran codificadas sobre todo en intrones de fagos y poseen una estructura modular monomérica, a diferencia que las de la familia His-Cys Box que están codificadas en intrones de genes ADNr nucleolares y que han adquirido estructura homodimérica. Mientras que la familia HNH es capaz de reconocer y cortar

sitios diana asimétricos en ADN de cadena simple, la familia His-Cys Box reconoce secuencias diana simétricas, generando roturas de doble cadena.

Las HEs GIY-YIG se asemejan a las HNH en su estructura monomérica y por estar codificadas en intrones de fagos. Los contactos entre las enzimas de estas dos familias durante infecciones mixtas a bacterias han sido frecuentes, produciéndose probablemente intercambios entre sus dominios de unión al ADN (Shen *et al.*, 2004).

Las endonucleasas de la familia PD-(D/E)xK están presentes en bacterias y además son responsables de la presencia y transferencia horizontal de intrones de tipo I entre los genes ARNt en cianobacterias. En su centro catalítico se encuentra el dominio PD-(D/E)xK, al que deben su nombre, y que es típico de endonucleasas de restricción (Zhao *et al.*, 2009). Esta familia junto con la EDxHD fueron descubiertas durante el análisis de secuencias procedentes de bases de datos de metagenómica: *Global Ocean Sampling* (GOS) (Stoddard, 2011). La familia EDxHD, hallada en bacteriófagos, presenta tres dominios cortos conservados que tienen la peculiaridad de ser homólogos a los motivos catalíticos encontrados en las endonucleasas *Very short patch repair* (Vsr, endonucleasas bacterianas capaces de reparar desapareamientos). Su sitio activo es una variación del que poseen las HEs de la familia PD-(D/E)xK (Taylor *et al.*, 2011). Este descubrimiento a partir de datos obtenidos mediante metagenómica pone de manifiesto que es posible encontrar nuevas HEs con características propias y diferentes de las ya descritas, en especies poco conocidas.

### 1.3.5. *Homing* Endonucleasas de la familia LAGLIDADG

La familia LAGLIDADG constituye una de las principales familias de HEs, de la que se conocen más de 200 miembros (Chevalier & Stoddard, 2001). Es la mejor caracterizada estructuralmente y en la que más se han estudiado los mecanismos de catálisis. Los miembros de esta familia pueden clasificarse en dos grupos, según posean una o dos copias del motivo LAGLIDADG. Así, las HEs de la familia LAGLIDADG 1 poseen una copia del motivo y actúan como homodímeros, cortando secuencias de ADN palindrómicas o cuasi-palindrómicas. Las HEs que poseen dos copias del motivo se clasifican en la familia LAGLIDADG 2 y actúan como monómeros que reconocen dianas de ADN totalmente asimétricas. Las HEs LAGLIDADG homodiméricas están codificadas exclusivamente en intrones de tipo I, mientras que las monoméricas están

ampliamente distribuidas, pudiéndose encontrar en inteínas, intrones de tipo I y de arqueas, e incluso como ORFs libres (Lucas *et al.*, 2001). Varios autores postulan el origen de las HEs de la familia LAGLIDADG 2 a partir de un evento de duplicación de las LAGLIDADG homodiméricas (Belfort & Roberts, 1997; Lucas *et al.*, 2001; Haugen & Bhattacharya, 2004).

La estructura de esta familia ha sido estudiada exhaustivamente mediante técnicas cristalográficas. De esta forma se ha determinado la existencia de un núcleo central conservado con dos pliegues o dominios característicos  $\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha$ , situados uno enfrente del otro y unidos a través de un doble eje simétrico o pseudosimétrico. En esta estructura central los pliegues pueden ser aportados por dos monómeros, en el caso de las HEs LAGLIDADG 1; o por dos motivos, en el caso de las LAGLIDADG 2. La unión al ADN se realiza mediante las láminas beta que constituyen cada dominio (Chevalier & Stoddard, 2001; Arnould *et al.*, 2006). En todos los casos las LAGLIDADG constituyen una de las HEs más específicas, reconociendo dianas con tamaños superiores a los 20 nt pero con cierta flexibilidad, tolerando polimorfismos en alguna de las posiciones (Chevalier *et al.*, 2003).

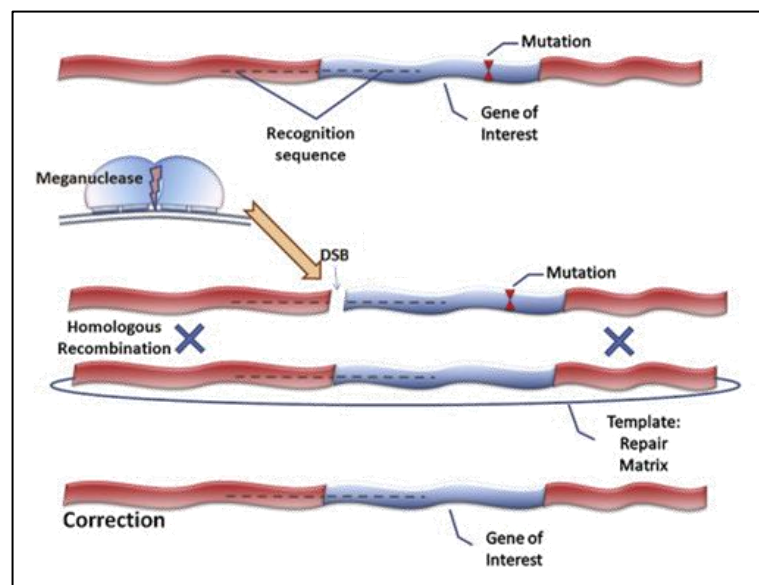
### **1.3.6. Aplicabilidad práctica de las *Homing* Endonucleasas**

La alta especificidad y frecuencia de unión al ADN que presentan las HEs LAGLIDADG, ha llevado a estas enzimas a ser una de las más comúnmente utilizadas en diversas aplicaciones de ingeniería genética (Stoddard, 2014). Estas enzimas pueden ofrecer una buena base para la creación de nuevas proteínas que potencialmente dirijan una reparación de genes defectuosos de forma altamente específica y con una toxicidad muy baja.

La terapia génica está emergiendo como una herramienta fundamental para el tratamiento de enfermedades genéticas desde su origen. La mayoría de estrategias ideadas para la corrección o compensación del gen causante de la enfermedad se han basado en el diseño de vectores virales portadores del gen corregido. El uso de este tipo de vectores implica la integración del virus en el genoma hospedador de una forma semi-aleatoria, lo que conlleva una serie de inconvenientes y limitaciones como el silenciamiento génico, pérdida de función de genes endógenos y activación de genes vecinos. La reparación de mutaciones utilizando HEs podría ser una alternativa al uso

de vectores virales, permitiendo la eliminación de la mutación causante de la enfermedad y la restauración de la función fisiológica, sin los inconvenientes derivados del uso de dichos vectores (Marcaida *et al.*, 2010).

La aplicación en terapia génica de una HE concreta requiere que ésta sea capaz de cortar lo más cerca posible del sitio de la mutación. Además, cuando se introducen en la célula junto con un fragmento de ADN, que contiene la secuencia corregida del gen pero guardando homología con las regiones cercanas a la diana, la HE debe inducir activamente la reparación de la rotura por recombinación homóloga, sustituyendo así al gen defectuoso (Pessach & Notarangelo, 2011) (Figura 1.6).



**Figura 1.6** Mecanismo de corrección e inserción de genes mediante el uso de HEs. Las HEs producen roturas de doble cadena en secuencias diana específicas, induciendo la reparación de la rotura por recombinación homóloga. En presencia de una secuencia que contiene la versión corregida del gen, se produce la corrección de la mutación al emplearse esta secuencia como molde para la recombinación homóloga. Imagen modificada de Pessach & Notarangelo (2011).

Sin embargo, todavía existen aspectos técnicos que deben mejorarse antes de la aplicación clínica de HEs en terapia génica. Uno de los problemas principales a los que se enfrentan los investigadores en este campo es el número limitado de dianas reconocidas por las HEs caracterizadas hasta el momento. Por ello, los esfuerzos se han centrado en construir nuevas HEs capaces de reconocer dianas de interés, modificando la especificidad de las HEs pre-existentes mediante ingeniería genética

(Takeuchi *et al.*, 2011; Hafez & Hausner, 2012; Stoddard, 2014). Para el diseño y construcción de estas nuevas enzimas han sido necesarios estudios previos que aporten un conocimiento profundo sobre las propiedades bioquímicas de las HEs pre-existentes y los mecanismos que permiten a estas proteínas reconocer sus secuencias diana.

Es precisamente la especificidad que exhiben las HEs por sus dianas la que hace que hayan sido propuestas como las enzimas que ofrecen una mejor base para la fabricación de endonucleasas hechas a medida, capaces de reconocer dianas concretas. Diferentes estudios han demostrado que la modificación del dominio de unión al ADN en algunas HEs hace que adquieran una nueva especificidad, reconociendo y cortando dianas diferentes (Seligman *et al.*, 2002; Stoddard, 2014). Otros estudios se han centrado en fusionar dominios de dos meganucleasas que reconozcan dianas diferentes, formándose una nueva enzima quimérica que reconocería las dianas de ambas HEs fusionadas. Por último, existen estudios focalizados a crear HEs monoméricas a partir de homodiméricas. Estas investigaciones han sido llevadas a cabo en la HE I-Crel (Li *et al.*, 2009).

Otra de las principales limitaciones en la aplicación de HEs en terapia génica era la ausencia de modelos animales sobre los que realizar estudios clínicos. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que HEs naturales son capaces de cortar secuencias diana presentes en genes humanos y, sorprendentemente, también los genes homólogos correspondientes de diferentes especies de animales modelo. La diversidad y plasticidad de HEs naturales son todavía poco conocidas, pero su uso en terapia génica podría ser mucho más económico e inmediato que el de las HEs artificiales (Barzel *et al.*, 2011). La Tabla 1.1 muestra los avances realizados con este tipo de enzimas durante las últimas décadas.



**Tabla 1.1** Lista de algunas aplicaciones de las HEs. Adaptado de Hafez & Ausner (2011).

HE	Organismos	Gen diana/elemento genético	Aplicación
I-CreI <sup>m</sup>	<i>Homo sapiens</i>	RAG1	Terapia génica
I-CreI <sup>m</sup>	<i>Homo sapiens</i>	XPC	Terapia génica
I-OnuI <sup>m</sup>	<i>Homo sapiens</i>	MAO-B	Terapia génica
I-SceI <sup>wt</sup>	<i>Mus musculus</i>	Neomycina	Señalización
I-CreI <sup>m</sup>	<i>Zea mays</i>	LIGUELELESS-1	Mutagénesis dirigida
I-SceI <sup>wt</sup>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	URA3	Mutagénesis dirigida
I-CreI <sup>wt</sup>	<i>Drosophila melanogaster</i>	White (color ojos)	Mutagénesis dirigida
I-PpoI <sup>wt</sup>	<i>Anopheles gambiae</i>	Cromosoma X (SSU ARNr)	Control plagas
I-AniI <sup>wt</sup>	<i>Aedes aegypti</i>	Construcción <i>reporter</i>	Control plagas
I-CreI <sup>wt</sup>			
I-PpoI <sup>wt</sup>			
I-SceI <sup>wt</sup>			
I-SceI <sup>wt</sup>	<i>Trypanosoma brucei</i>	Construcción <i>reporter</i>	Estudio mecanismos reparación DSB
I-AniI <sup>wt</sup>	<i>Homo sapiens</i>	Lentivirus basado en construcción <i>reporter</i>	Terapia antiviral

m: HE modificada

wt: HE *wild-type*

A pesar del número de HEs caracterizadas hasta la fecha (132 en mayo de 2014 según Rebase <http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/genomes/madanm/pres/rebase1.htm>), el rango de dianas específicas no es todavía suficiente para su utilización efectiva, como viene haciéndose habitualmente para las nucleasas de restricción comerciales. Actualmente, la empresa *New England Biolabs® Inc* comercializa cuatro HEs diferentes: I-CeuI, codificada dentro de un intrón de tipo I en el gen que codifica el 23S ARNr de cloroplastos en el alga verde *Chlamydomonas eugametos*; I-SceI, codificada en un intrón de tipo I mitocondrial del ascomiceto *Saccharomyces cerevisiae*; PI-PspI y PI-SceI, codificadas en inteínas en la bacteria del género *Pyrococcus* y *S. cerevisiae*, respectivamente. Este hecho da una idea sobre el elevado potencial que presentan las HEs como herramienta para ser utilizada en ingeniería genética aplicada a diversos campos relacionados con biomedicina y biotecnología (Tabla 1.1).

### 1.3.7. Diversos intrones de tipo I codifican *Homing* Endonucleasas en algas verdes

Los intrones se definen como secuencias que interfieren en los genes y que son eliminadas del ARN precursor mediante un proceso de corte y empalme denominado comúnmente con la palabra inglesa *splicing* (Haugen *et al.*, 2005). Se distinguen cuatro clases de intrones en función de su mecanismo de *splicing*: intrones autocatalíticos de tipo I y II, intrones spliceosomales, intrones del ARNt y/o intrones de arqueas (Haugen *et al.*, 2005).

Los intrones de tipo I están presentes en una amplia variedad de organismos, habiéndose encontrado en el ADN nuclear y genomas organulares de plantas, hongos y algas, así como en el genoma de eubacterias, bacteriófagos y virus de eucariotas (Hausner *et al.*, 2014). Los intrones de tipo II han sido hallados en bacterias y genomas organulares de plantas, hongos y algas. Los intrones spliceosomales son las inserciones más comunes halladas en genes nucleares y los intrones del ARNt son hallados en núcleo de eucariotas y en arqueas.

Los intrones de tipo I son particularmente interesantes desde el punto de vista de sus estructuras, ya que se pliegan para formar sitios activos que favorecen su *splicing*, actuando como ribozimas (Cech, 1988). En su estructura se pueden distinguir cuatro secuencias conservadas P, Q, R y S. Estas secuencias siempre se sitúan en el mismo orden a lo largo de la secuencia del intrón (5'-P-Q-R-S-3'), variando sus distancias entre 20-100 nt aproximadamente (Cech, 1988). Además, se distinguen cinco clases de intrones de tipo I, basadas en la conservación de estas secuencias conservadas. El último nucleótido de estos intrones de tipo I es siempre una G; este nucleótido junto con las secuencias conservadas son parte esencial para desencadenar la eliminación auto-catalítica de estos intrones.

Los intrones de tipo I se insertan eficazmente en el ADN mediante dos mecanismos principales. Por un lado, un mecanismo denominado *homing*<sup>2</sup>, mediado por unas enzimas codificadas en el interior de estos intrones: *Homing* Endonucleasas (HEs). Por otro, un mecanismo denominado *splicing reverso*<sup>3</sup>, en el que un intrón libre

---

<sup>2</sup>*Homing*: proceso por el cual un intrón se propaga en posición homóloga de un alelo que carece de ese intrón (Haugen *et al.*, 2005).

<sup>3</sup>*Splicing reverso*: proceso mediante el cual un intrón de tipo I llega a integrarse establemente dentro del genoma, facilitado por mecanismos de retrotranscripción (Haugen *et al.*, 2005).

se inserta dentro de un ARN reconociendo una secuencia corta de nt (4-6 nt) del extremo 5' (Haugen *et al.*, 2004). Este mecanismo requiere de pasos adicionales de transcripción reversa del intrón, seguido de la integración del ADNc del genoma mediante recombinación, aunque no existen evidencias experimentales que apoyen esta vía de integración (Hausner *et al.*, 2014).

### 1.3.8. Presencia de intrones de tipo I y *Homing* Endonucleasas en algas liquénicas

La mayoría de intrones de tipo I se distribuyen en genes ribosomales nucleares y en genomas cloroplásticos y/o mitocondriales de hongos y protistas (Haugen *et al.*, 2007). Como ya se ha mencionado, en algas de la división Chlorophyta, el gen 23S ADNr cloroplástico está invadido por un número variable de intrones de tipo I en un número significativo de especies (Turmel *et al.*, 1993), muchos de los cuales codifican HEs de la familia LAGLIDADG. Trabajos recientes de nuestro grupo de investigación han mostrado la presencia de un elevado número de intrones en algas liquénicas de los géneros *Trebouxia* y *Asterochloris* (del Campo *et al.*, 2009; 2010a). En las 15 especies estudiadas se han localizado y secuenciado un total de 31 intrones de tipo I, 22 de los cuales (aprox. 71%) codifican HEs. Estos intrones se encontraron insertos en 10 sitios diferentes a lo largo del gen cloroplástico 23S ADNr (cL781, cL1917, cL1931, cL1951, cL2263, cL2449, cL2500, cL2505, cL2593 y cL2596), dos de las cuales (cL781 y cL2505) resultaron ser sitios de inserción en el genoma de cloroplastos no documentados en ningún trabajo previo. Este reciente descubrimiento del elevado número de HEs en el 23S ADNr cloroplástico de fotobiontes liquénicos de los géneros *Trebouxia* y *Asterochloris* (que son los géneros a los que pertenecen la inmensa mayoría de fotobiontes liquénicos) nos ha llevado a interesarnos por otros géneros de algas liquénicas como fuente de nuevas endonucleasas que reconozcan dianas previamente documentadas o nuevas. La disponibilidad de un mayor número de HEs y de nuevas dianas, puede servir de material de partida para la generación de una mayor diversidad de HEs por ingeniería genética incrementando las posibilidades de aplicabilidad en corrección de mutaciones concretas, cuya principal limitación es encontrar HEs que reconozcan una secuencia diana lo más próxima posible a la mutación que se pretende corregir por recombinación homóloga.



## **2. OBJETIVOS**

---



La mayoría de los estudios sobre la biodiversidad de algas liquénicas se han basado en la utilización de un número limitado de marcadores moleculares. El estudio de los recursos genéticos de este tipo de organismos ha sido prácticamente ignorado. Los trabajos centrados en el comportamiento fisiológico de los fotobiontes liquénicos aislados son todavía muy escasos. Todo ello ha derivado en una gran falta de información acerca de este tipo de algas, especialmente en lo que se refiere a su caracterización genética y fisiológica que permita determinar fehacientemente la identidad de dichos organismos, así como relaciones filogenéticas y ecofisiología.

Por todos estos motivos, el objetivo general de este trabajo es la caracterización de fotobiontes liquénicos en tres aspectos fundamentales:

- (i) Biodiversidad.
- (ii) Aplicaciones biotecnológicas de recursos genéticos.
- (iii) Comportamiento ecofisiológico.

(i) Respecto a la biodiversidad, nos proponemos el estudio de sus bases moleculares. (ii) Respecto a las posibles aplicaciones biotecnológicas, nos proponemos la adquisición de nuevas secuencias de *Homing* endonucleasas. (iii) Respecto a la ecofisiología, pretendemos realizar un estudio preliminar de algunos parámetros informativos de posibles diferencias en el comportamiento fisiológico. De forma más concreta, se pueden describir los siguientes objetivos:

1. Desarrollar nuevas herramientas moleculares que contribuyan a actualizar la clasificación y estudiar la diversidad de fotobiontes líquenicos y microalgas en general. Estas herramientas son fundamentalmente dos:
  - Método rápido de extracción de ADN.
  - Nuevos marcadores moleculares.
2. Aplicar las nuevas herramientas moleculares desarrolladas para ampliar el conocimiento de la diversidad genética de fotobiontes liquénicos.
3. Explorar, secuenciar y caracterizar intrones de tipo I en el gen que codifica el 23S ARNr plastidial, tanto en fotobiontes aislados de líquenes mediterráneos como de cultivos axénicos procedentes de bancos oficiales.

4. Adquirir nuevas secuencias de *Homing* Endonucleasas, tanto en fotobiontes aislados de líquenes mediterráneos como en cultivos axénicos procedentes de bancos oficiales.
5. Seleccionar y clonar secuencias codificantes de *Homing* Endonucleasas de especial interés por su peculiaridad respecto a las publicadas o comercializadas.
6. Conocer las bases moleculares de la diversidad de fotobiontes tanto en líquenes en los que el micobionte es un ascomiceto como en los que es un basidiomiceto, los cuales previsiblemente desarrollen modelos de asociación simbiótica diferentes. Las especies seleccionadas como modelo serán:
  - *Ramalina farinacea* como modelo de ascomiceto asociado a algas del género *Trebouxia*.
  - *Lichenomphalia umbellifera* como modelo de basidiomiceto asociado a algas del género *Coccomyxa*.
7. Aislar fotobiontes a partir de poblaciones de *Ramalina farinacea* y *Lichenomphalia umbellifera* con la finalidad de explorar nuevos genotipos todavía desconocidos y que pueden albergar *Homing* Endonucleasas de interés.
8. Realizar una caracterización fisiológica preliminar de los fotobiontes aislados.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

---



### 3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para la realización del presente trabajo de investigación se emplearon, por una parte, microalgas (algas verdes y cianobacterias) provenientes de bancos de algas como el *Sammlung von Algenkulturen* de la Universidad de Göttingen (Alemania) (SAG) (<http://www.uni-goettingen.de/en/184982.html>) y *The Culture Collection of Algae* de la Universidad de Texas (USA) (UTEX) (<http://web.biosci.utexas.edu/utex/>) (Anexo 1). La colección de organismos provenientes de bancos incluye tanto algas simbioses (fotobioses liquénicas) como de vida libre. Adicionalmente, se trabajó con macroalgas marinas y plantas tanto vasculares como no vasculares (Anexo 2).

Por otra parte, se aislaron y analizaron los fotobioses de dos especies liquénicas: *Ramalina farinacea* y *Lichenomphalia umbellifera*. *Ramalina farinacea*, liquen fruticuloso cuyo micobionte es un ascomiceto que da nombre a la especie y cuyo(s) fotobionte(s) es(son) microalga(s) verde(s) perteneciente(s) al género *Trebouxia*. Los talos de este liquen fueron recolectados en diferentes localidades de España y California (EE. UU.) (Anexos 3 y 4). *Lichenomphalia umbellifera*, cuyo micobionte es un basidiomiceto que da nombre al liquen y cuyo fotobionte es una microalga verde del género *Coccomyxa*. Los talos de esta especie fueron recolectados en una localidad de la provincia de Guadalajara (Anexo 3).

### 3.2. MÉTODOS

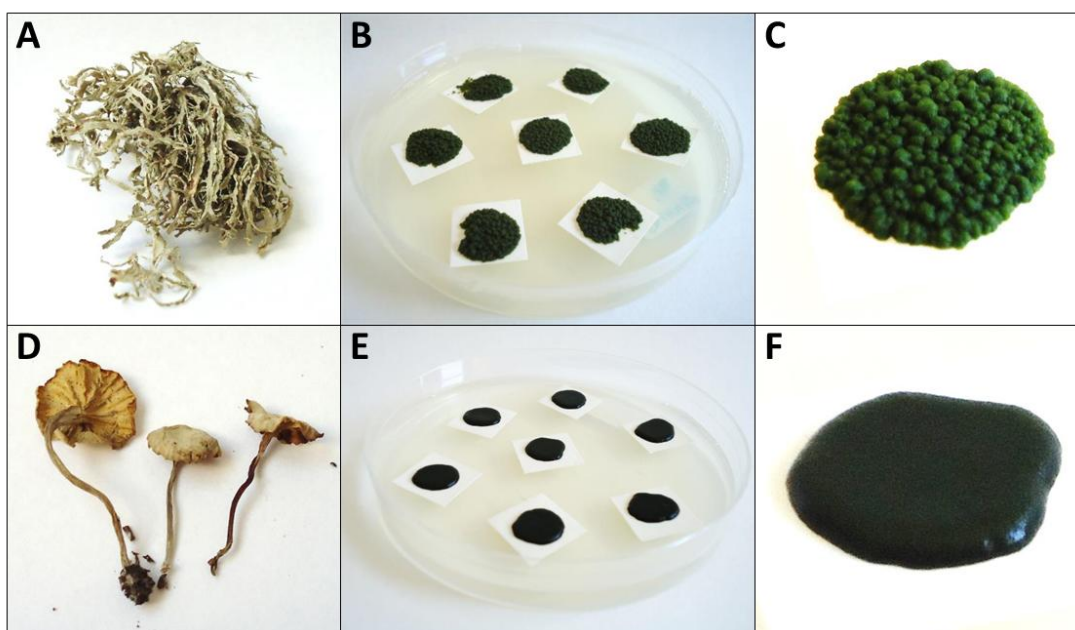
#### 3.2.1. Aislamiento de fotobioses liquénicas

Se siguieron diferentes procedimientos dependiendo del tipo de liquen estudiado. En el caso de *Ramalina farinacea*, se empleó el método propuesto por Gasulla y colaboradores (2010) añadiendo algunas modificaciones. Para *Lichenomphalia umbellifera* se siguió un protocolo específico, desarrollado en condiciones de esterilidad. Los detalles del aislamiento de fotobioses se detallan en los apartados 4.5.1.1. y 4.5.2.1. de Resultados.

### 3.2.2. Cultivo de microalgas

El cultivo de las microalgas objeto de este estudio fue realizado en medio Bold 3N (Bold & Parker, 1962) suplementado con glucosa (20 g/l) y caseína (10 g/l) (Ahmadjian, 1973) para favorecer el crecimiento, especialmente en el caso de las algas simbióticas, ya que, a pesar de ser organismos autótrofos, crecen lentamente una vez que son aisladas del talo liquénico. El medio Bold 3N contiene por litro los siguientes elementos: 0,75 g NaNO<sub>3</sub>; 0,175 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,075 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,075 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 0,025 g CaCl y 0,025 g NaCl. Además, 1 l de medio contiene los siguientes micronutrientes: 11,42 mg B(OH)<sub>3</sub>; 4,98 mg FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 8,82 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,44 mg MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; 0,71 mg MoO<sub>3</sub>; 1,57 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O; 0,49 mg Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 50 mg EDTA y 31 mg KOH.

Los cultivos fueron desarrollados generalmente en medio semisólido (Figura 3.1), conteniendo 15% de agar bacteriológico, aunque en algunos experimentos ciertas algas fueron cultivadas en medio líquido. En medio semisólido, los fotobiontes crecían sobre discos de acetato de celulosa o membranas de nylon, que permitían una mayor localización de la biomasa de algas, favoreciendo además su crecimiento y su posterior manipulación. Los cultivos algales se desarrollaron bajo condiciones ambientales controladas: temperatura de 15°C, ciclos de luz/oscuridad de 14/10 horas y con una irradiancia de 25 μE m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>.



**Figura 3.1** (A) Talo de *Ramalina farinacea* (deshidratado). (B) Cultivo de *Trebouxia* sp. en medio semisólido. (C) Detalle de la morfología externa de un cultivo de *Trebouxia* sp. de 25 días. (D) Talos de *Lichenomphalia umbellifera* (deshidratados). (E) Cultivo de *Coccomyxa* sp. en medio semisólido. (F) Detalle de la morfología externa de un cultivo de *Coccomyxa* sp. de 30 días.

### 3.2.3. Aislamiento de ADN total

Se extrajo el ADN de todas las muestras siguiendo diferentes procedimientos, los cuales fueron seleccionados en función del material con el que trabajamos a lo largo de las diferentes etapas del trabajo experimental. Para macroalgas y gimnospermas se siguió el protocolo de Reynolds & Williams (2004). Para talos liquénicos completos, microalgas aisladas en cultivo (algas verdes y cianobacterias) y para la mayoría de las plantas (excepto gimnospermas y briófitos) se siguió el procedimiento de Cenis (1992). En el caso de los talos liquénicos se añadió un paso previo de lavado con NaClO al 3% seguido de aclarado con agua destilada. Los briófitos fueron procesados según Pedersen *et al.* (2006). Complementariamente, se empleó el kit comercial *DNeasyPlant Mini Kit* de Qiagen (Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Asimismo, se desarrolló un nuevo método rápido de aislamiento de ADN basado en la extracción con dimetil-sulfóxido (DMSO), que se describe detalladamente en el apartado 4.1 de Resultados.

### 3.2.4. Diseño de cebadores

Durante los diversos experimentos desarrollados en la presente Tesis Doctoral se utilizaron una gran variedad de cebadores en las reacciones de amplificación y secuenciación de ADN. Algunos de estos oligonucleótidos fueron seleccionados a partir de diferentes fuentes bibliográficas y otros, diseñados en nuestro laboratorio. Para ello, se tuvieron en cuenta diferentes variables, como la longitud, el contenido en G y C, así como su homología con secuencias de algas verdes depositadas en GenBank y las generadas en nuestro laboratorio, en especial en el extremo 3'. En general, todos los cebadores diseñados tienen un tamaño comprendido entre los 18-23 nucleótidos, un contenido de GC del 50% y se trató de que los extremos de las últimas bases contuvieran algún residuo de G o C para incrementar la eficiencia de la reacción de

PCR. Además se trató de evitar, siempre que fue posible, la selección de cebadores que contuvieran largas secuencias de una misma base. Dada la cantidad y diversidad de cebadores empleados en el presente trabajo hemos decidido elaborar unas tablas específicas para cada gen, las cuales se muestran en el Anexo 6.

Todos los cebadores utilizados fueron sintetizados por la empresa Invitrogen, a través de la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá.

### **3.2.5. Amplificación por PCR del ADN aislado**

Los ADNs aislados de los diferentes organismos utilizados fueron amplificados por el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con cebadores específicos de acuerdo con los objetivos de cada desarrollo experimental (Anexo 6). En general, las reacciones de amplificación se realizaron empleando los reactivos para PCR estables a temperatura ambiente *Illustra Hot StartMix RTG* (GE Healthcare) en un volumen variable, empleando 25  $\mu$ l para reacciones analíticas y 50  $\mu$ l para preparativas. La utilización de este sistema permitió mejorar la reproducibilidad y minimizar las posibles contaminaciones debido a que sólo era necesario adicionar la muestra de ADN, los cebadores específicos y agua ultrapura estéril. En cada ronda de amplificación se incluyeron controles negativos, sin muestra de ADN, para asegurar la ausencia de falsos positivos causados por la presencia de contaminantes en los reactivos. Las condiciones de amplificación empleadas fueron las siguientes: 1 ciclo de: 2 min a 94°C; 30 ciclos de: 30 s a 94°C, 30 s a x°C, y min a 72°C; 1 ciclo de: 5 min a 72°C. La temperatura x de hibridación varió en función de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de cada pareja de cebadores, oscilando entre 50° y 55°C. El tiempo y de extensión se fijó en relación al tamaño del fragmento a amplificar, variando entre 1-5 minutos según el experimento (ver Resultados). A lo largo de la exposición de los resultados se incidirá en estas condiciones variables, concretando las temperaturas y tiempos empleados.

### 3.2.6. Separación electroforética y purificación de productos de amplificación

Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,2-1,5%. Estos geles fueron pre-teñidos con el reactivo SYBR® Safe, que permite visualizar las bandas correspondientes a los productos de amplificación en un transiluminador de luz azul (Safe Imager™ 2.0). Las bandas visibles fueron recortadas y purificadas con el kit de purificación suministrado por GE Healthcare, siguiendo las instrucciones generales del fabricante. El volumen de elución fue de 20 µl, tras lo cual se ajustó la concentración de ADN en función del tamaño del fragmento purificado para su secuenciación. Dicha secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá o en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Para confirmar la especificidad de las reacciones de PCR, siempre se secuenciaron las dos hebras de los amplificadores resultantes.

### 3.2.7. Clonación de un fragmento del gen *psbB* de *Coccomyxa* sp.

Con el objetivo de obtener la secuencia completa del intrón inserto en el gen *psbB* del alga aislada de *Lichenomphalia umbellifera* (*Coccomyxa* sp. (Lu)) desarrollamos una estrategia de clonación de un fragmento de dicho gen, que contenía el intrón. Inicialmente, se amplificó el fragmento de interés a partir de ADN extraído del alga aislada y cultivada, mediante el uso de dos cebadores específicos (Anexo 6). El amplificado (1,2 Kb) fue purificado de un gel de agarosa y se ligó al vector de clonación *pGEM*®-T (Promega). Este plásmido es lineal y presenta varias timinas en sus extremos que aparean con las adeninas que añaden las ADN polimerasas utilizadas en los extremos de los productos de las reacciones de amplificación por PCR. Con ello se evita la necesidad de cortes con endonucleasas específicas.

#### 3.2.7.1. Ligación del fragmento al vector y transformación de células de *E.coli*

La reacción de ligación entre el fragmento amplificado y el vector se llevó a cabo con la ligasa T4 (Promega). Para ello se utilizaron 50 ng de vector, 20 ng del fragmento amplificado y 5 U de ligasa T4. La reacción se incubó toda una noche a 4°C. Para la transformación de *E. coli* (*JM109 Competent Cells*, High Efficiency, Promega), se incubaron 2 µl de la mezcla de la reacción de ligación con 50 µl de células competentes

( $\geq 1 \times 10^8$  ufc/ $\mu$ g ADN) durante 20 minutos en hielo, seguidos de 50 segundos a 42°C y 2 minutos en hielo. Posteriormente se añadieron 950  $\mu$ l de medio SOC pH 7,0 (20 g/l de bacto-triptona; 5 g/l de extracto de levadura; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 10 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 20 mM glucosa). La mezcla se incubó durante una hora y media a 37°C con agitación (150 rpm). Posteriormente se extendió sobre dos placas de Petri con medio LB (10 g/l de bacto-triptona; 5 g/l de extracto de levadura; 5 g/l de NaCl), ampicilina (100 g/l) y una mezcla de IPTG/X-Gal (0,1 M IPTG / 80 mg/l X-Gal) que permitiera la selección de células con plásmido (que fuesen resistentes a ampicilina) y con plásmido e inserto [que no manifestasen actividad  $\beta$ -galactosidasa, IPTG/X-Gal-dependiente, (fenotipo colonias blancas)]. Las placas se incubaron una noche a 37°C. Se seleccionaron varias colonias blancas, que se cultivaron en 10 ml de medio LB una noche a 37°C. Una vez crecidas las bacterias, se procedió a la purificación del ADN plasmídico.

### **3.2.7.2. Purificación del ADN plasmídico**

Se partió de 1,4 ml de cultivo. Las bacterias transformadas fueron separadas por centrifugación (1 min. a 10.000 *xg*) y re-suspendidas en 100  $\mu$ l de agua ultrapura estéril. Posteriormente se adicionaron 200  $\mu$ l de solución de lisis (0,2 M NaOH; 1% SDS (Dodecilsulfato sódico) y se mezcló por inversión hasta que la mezcla quedó transparente. Se añadieron 5 ml de 3 M acetato potásico pH 5,0 y se centrifugó 5 minutos a 10.000 *xg* para precipitar el ADN plasmídico. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se secó y se re-suspendió en 100  $\mu$ l de una mezcla de tampón TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) y ARNasa A (40  $\mu$ g/ml). Para eliminar la ARNasa se añadieron 100  $\mu$ l de una mezcla de fenol/cloroformo (1/1, v/v), se agitó y se centrifugó 5 minutos a 10.000 *xg*. Se recogió el sobrenadante al que se añadieron 100  $\mu$ l de cloroformo, se volvió a centrifugar 5 minutos a 10.000 *xg* y se recuperó el sobrenadante, que se precipitó con 100  $\mu$ l de HN<sub>4</sub>Acetato y 200  $\mu$ l de isopropanol durante 5 minutos. Se centrifugó y se lavó el precipitado con etanol al 70%, se secó y se re-suspendió en 35  $\mu$ l de agua ultrapura estéril para su posterior secuenciación con los cebadores específicos para el vector *pGEM*<sup>®</sup>-T (SP6 y T7).



Tras analizar todos los clones seleccionados y las secuencias de sus insertos, decidimos elegir un clon que presentaba una secuencia idéntica en nucleótidos y aminoácidos a la secuencia obtenida directamente a partir del ADN extraído del alga. Para preservar ese clon de cara a experimentos futuros, las bacterias que portaban ese vector se cultivaron en medio LB y se congelaron a -80°C con glicerol al 20%.

### **3.2.8. Análisis bioinformático de secuencias de ADN y proteínas**

Los electroforegramas resultantes de las reacciones de secuenciación fueron analizados inicialmente con el programa Bioedit 7.0 (Hall, 1999). Este programa permitía estimar la calidad de cada una de las secuencias obtenidas. La comparación de las secuencias obtenidas con las de otros organismos depositados en GenBank se realizó con la herramienta BLAST del NCBI (Altschul *et al.*, 1990). Los mapas genéticos presentados en diversas figuras se construyeron con el programa CLC SequenceViewer 6.5.2 (<http://www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer/>). Este programa también se utilizó para buscar marcos de lectura abierta u *Open Reading Frames* (ORFs) dentro de las secuencias intrónicas y para manipulaciones generales de las secuencias.

Las genealogías de haplotipos se construyeron con el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), que considera ciertos fenómenos genéticos que ocurren a nivel de poblaciones como recombinación y la posible persistencia en el tiempo de haplotipos ancestrales, que no se consideran en los métodos de análisis filogenéticos descritos anteriormente.

#### **3.2.8.1. Análisis filogenético y construcción de árboles**

Para las reconstrucciones filogenéticas se realizaron alineamientos de secuencias de nucleótidos y proteínas con el programa Muscle 2.6 (Edgar, 2004) implementado en el software SeaView v4 (Gouy *et al.*, 2010). La inter-conversión de los alineamientos obtenidos en distintos formatos de lectura para análisis filogenéticos se realizó utilizando el programa ALTER (González-Peña *et al.*, 2010).

Para los alineamientos de genes ribosomales como el 23S ADN<sub>r</sub> se implementó el programa Gblocks (Castresana, 2000), que excluye zonas del alineamiento que podrían interferir en la filogenia.

Los alineamientos obtenidos fueron utilizados para análisis filogenéticos empleando diferentes métodos: máxima parsimonia (MP) y análisis de distancias (NJ: Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) utilizando el programa PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003); máxima verosimilitud (ML) utilizando los programas PAUP 4.0b10 y PhyML (Guindon *et al.*, 2010) y análisis Bayesiano utilizando el programa BEAST (Heled & Drummond, 2010).

El modelo de substitución de nucleótidos se estableció con el programa jModelTest 0.1 (Posada, 2009) y el de aminoácidos con el programa Prottest v3.3 (Abascal *et al.*, 2005). Los árboles filogenéticos se construyeron con el programa FigTree v1.3.1. (Rambaut, 2008).

El soporte de la topología de los árboles filogenéticos construidos con los métodos MP, ML y NJ se estableció mediante valores de “bootstrap” (Felsenstein, 1985) sobre la base de 100 réplicas.

Para los análisis MP y ML se realizó una búsqueda del mejor árbol utilizando los algoritmos “random stepwise addition”, “tree bisection-reconnection” (TBR) y “branch-swapping”. Para los análisis ML la razón entre transiciones y transversiones “transition/transversion” se estimó para el árbol construido en base a un criterio de mínima evolución “minimum evolution” (Pauplin, 2000), tal como está implementado en el programa PAUP. La longitud de cada árbol filogenético (Tree length, TL) se utilizó para seleccionar el árbol que mejor se aproximara a la realidad (True tree), que correspondería un criterio de mínima evolución “minimum evolution” (Pauplin, 2000).

Para los análisis Bayesianos se utilizó el método conocido como “Markov chain Monte Carlo” (MCMC) durante  $10^8$  generaciones. El muestreo se realizó cada 100 generaciones. Después del análisis de la convergencia de las cadenas “Chain convergence analysis”, todas las muestras obtenidas durante las primeras 50.000 generaciones fueron eliminadas como “burnin”. El soporte de cada nodo fue calculado en base a valores de probabilidades posteriores “posterior probabilities” que se representaron en el árbol consenso.

Los test de congruencia entre topologías de diferentes árboles filogenéticos obtenidas se realizaron con el “Test de Farris” (Partition Homogeneity Test, PHT) (Farris *et al.*, 1995).

### 3.2.8.2. Análisis bioinformático de proteínas

Para el análisis de las proteínas deducidas de las secuencias de nucleótidos obtenidas se utilizaron los siguientes programas:

- ProtParam tool:  
(<http://web.expasy.org/protparam/>) (Gasteiger *et al.*, 2005) para la predicción de propiedades físico-químicas.
- PROSECSC SCFBio:  
(<http://www.scfbio-iitd.res.in/software/proteomics/secstr/index.jsp>) para la predicción de las estructuras secundarias.
- MOTIF Search:  
(<http://www.genome.jp/tools/motif/>) para la predicción de motivos con funciones concretas.
- TargetP 1.1:  
(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Enmanuelsson *et al.*, 2007), para la predicción de localizaciones de proteínas dentro de la célula.

### 3.2.9. Análisis de parámetros fisiológicos

Con el propósito de realizar una caracterización fisiológica inicial en los fotobiontes aislados de *Ramalina farinacea* se estudiaron una serie de parámetros fisiológicos: niveles de pigmentos y actividad de enzimas antioxidantes.

#### 3.2.9.1. Determinación de pigmentos fotosintéticos

Se utilizaron alícuotas de 10 mg de algas en condiciones control. Estas alícuotas fueron re-suspendidas en 1 ml de 100% DMSO e incubadas durante 30 minutos a 65°C, siguiendo un procedimiento similar al de Nikolopoulos *et al.* (2008). Después de una centrifugación a 10.000 *xg* durante 5 minutos, se midió espectrofotométricamente el contenido de pigmentos clorofila *a*, clorofila *b* y carotenoides de acuerdo con Wellburn (1994).

### **3.2.9.2. Extracción de proteínas solubles**

Se tomaron alícuotas de cada fotobionte en condiciones control (aprox. 200-250 mg) que fueron homogeneizadas en mortero previamente enfriado a -80°C junto con tierra silíceas (aprox. 100 mg) y 500 µl de medio de extracción: 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM EDTA; 10% (v/v) glicerol y 1% (p/v) PVPP (Polivinilpolipirrolidona). Los homogeneizados fueron centrifugados a 4°C durante 20 minutos a 20.000 xg para obtener las proteínas solubles en el sobrenadante.

La concentración de proteínas obtenida fue valorada siguiendo el ensayo de Bradford (1976), utilizando seroalbúmina bovina como patrón.

### **3.2.9.3. Zimogramas de actividad de enzimas antioxidantes**

Para valorar la actividad de las posibles isoformas de las enzimas antioxidantes Superóxido dismutasa (SOD) y Glutathion reductasa (GR) presentes en los extractos de proteínas solubles, se realizaron zimogramas utilizando geles de poliacrilamida nativos o ND-PAGE (Davis, 1964) seguidas de tinciones específicas que permiten revelar únicamente aquellas bandas proteicas que presentan la actividad enzimática buscada.

Los geles se construyeron siguiendo el procedimiento descrito por Davis (1964). Brevemente, estos geles estaban compuestos por un gel de concentración al 4% de acrilamida y 0,22 M Tris-HCl pH 7, seguido de un gel de separación conteniendo acrilamida al 10% y 1,3 M Tris-HCl pH 8,2. Se empleó un tampón de electrodo compuesto por 25 mM Tris-HCl pH 8,3 y 20 mM glicina.

Las muestras de proteínas se mezclaron con el tampón de carga (0,5 M Tris-HCl pH 6,8; 20% (v/v) glicerol; 0,01% (p/v) azul de bromofenol) en proporción 3/1 (proteínas/tampón) e inmediatamente fueron cargadas en cantidades comprendidas entre 2,5 y 10 µg de proteínas por carril, con el objetivo de comprobar el grado de correlación entre la intensidad de las actividades obtenidas y los niveles de muestra sembrados en cada carril. La electroforesis se corrió a 100 V hasta que las proteínas concentraron creando un frente para posteriormente subir el voltaje a 180 V durante 2 horas, todo ello realizado a 4°C y con agitación. Cuando el frente del marcador (azul de Bromo fenol) alcanzó el límite inferior del gel de separación, las actividades SOD y GR

fueron desarrolladas mediante tinciones específicas según se describe en Lascano *et al.* (2001).

### **3.2.9.3.1. Revelado de actividad Superóxido dismutasa**

Los geles fueron incubados en oscuridad durante 20 minutos a 37°C con una mezcla de reacción (25 ml/gel) que incluía los siguientes componentes: Riboflavina (1,25 mg); nitro-azul de tretazolio (NBT, 2,5 mg); 10 mM EDTA y 50 mM Tris-HCl pH 8,3. Posteriormente, los geles se transferían a luz fluorescente suave hasta que comenzaban a aparecer bandas sin color sobre un fondo gris. En ese momento, se retiraba la mezcla de reacción, se añadían 5 ml de 50% glicerol a cada gel y se los transfería a luz más intensa. Controlábamos el viraje de color en el gel hasta que las bandas de actividad se veían nítidas (transparentes) sobre el fondo oscurecido (azul-gris oscuro). La reacción se detenía añadiendo una disolución de 0,01% ácido acético.

La enzima SOD presenta típicamente tres tipos de isoformas según el cofactor metálico que forma parte de su grupo prostético: Mn-SOD; Fe-SOD y Cu-Zn-SOD (Asada, 1988). Cada uno de estos tipos presenta una sensibilidad diferencial frente a inhibidores específicos como KCN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Con el objetivo de distinguir los diferentes tipos de isoformas dentro de cada patrón isoenzimático observado, los geles fueron cortados en tres fragmentos, incubándose cada uno con:

- (1) Mezcla de reacción o control.
- (2) Mezcla de reacción + 2mM KCN.
- (3) Mezcla de reacción + 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Mn-SOD es resistente a KCN y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Fe-SOD es resistente a KCN pero inhibida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ambos inhibidores inactivan Cu/Zn-SOD (Fridovich, 1986).

### **3.2.9.3.2. Revelado de actividad Glutation reductasa**

Los geles eran incubados con una mezcla de reacción (25 ml/gel) conteniendo: DPIP (2,6-diclorofenol indofenol) (2,5 mg); MTT (5 mg); GSSG (62,5 mg); NADPH (6,25 mg); 3 mM EDTA; 3 mM MgCl<sub>2</sub>; 200 mM Tris-HCl pH 8,0; a temperatura ambiente y con agitación suave. La reacción no era instantánea, sino que transcurrían 10-20 minutos hasta la aparición de bandas azules intensas. A fin de disminuir la coloración

inespecífica del fondo del gel, éste se lavaba repetidamente con agua destilada, y posteriormente se mantenía a 4°C para evitar la difusión de las bandas.

### **3.3. PRODUCTOS**

Durante el desarrollo del presente trabajo se han utilizado productos de casas comerciales conocidas (GE Healthcare, Invitrogen, Merck, Panreac, Promega, Pronadisa, Qiagen, Serva, Sigma-Aldrich y Thermo Scientific), siendo químicamente puros o de la máxima calidad disponible.

Las disoluciones y tampones empleados se elaboraron utilizando agua ultrapura obtenida con el sistema “Milli-Q Academic” y agua destilada “Elix 10”, ambas de Millipore.

Para el trabajo experimental con ADN y clonación de muestras se emplearon los siguientes productos:

- Polimerasa *Hot StartMix RTG*, estable a temperatura ambiente, de GE Healthcare.
- *PCR Master Mix*, de Promega.
- Kit de PCR directa de tejidos vegetales (*PhirePlantDirect PCR Kit*) de ThermoScientific.
- Marcadores de peso molecular *1kb DNA Ladder*, de Promega.
- Sistema de teñido de geles SYBR® Safe de Invitrogen.
- Kit de aislamiento de ADN (*DNeasy® Plant Mini Kit*) de Qiagen.
- Kit de purificación de bandas de geles de agarosa (*PCR DNA and Gel Band Purification Kit*), de Healthcare.
- Sistema de clonación *pGEM®-T Vector System II*, de Promega.

#### **3.3.1. Aparatos y equipos**

En el transcurso de este trabajo se utilizaron, entre otros, los siguientes aparatos:

- Cámaras climatizadas para el cultivo de fotobiontes liquénicos (Fisher y SnijdersScientific).
- Centrífugas refrigeradas Thermo Scientific (modelos Heraeus Multifuge X1R y Fresco 21).

- Termocicladores Senso Quest Labcycler y Boeco.
- Transiluminador de luz azul Safelmager™ 2.0 (Invitrogen).
- Analizador de imágenes Quantum ST4 (VilberLourmat).
- Arcón congelador de -85°C Labfrost (LabNet).
- Cabina de flujo laminar Cruma 870 FL.
- Autoclave modelo Med 20 de Selecta.

Para la cuantificación de ADN se utilizó un espectrofotómetro ND-100 Nanodrop (Nucliber) de la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá. Para la secuenciación de ADN se emplearon los secuenciadores de la Unidad de Biología Molecular de la Universidad de Alcalá (ABI Prism 3130XL) y del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) (ABI Prism 3730), ambos de Applied Biosystems.

Adicionalmente, se utilizó un variado equipo de laboratorio que incluía cubetas de electroforesis, microcentrífugas, microondas, termobloque, transiluminador, etc.

### **3.3.2. Esterilización de material y disoluciones**

Todo el material de plástico y vidrio utilizado para trabajar con ADN fue esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 121°C y 0,8 atm de presión. Las disoluciones y medios de cultivo empleados se esterilizaron en autoclave, en las mismas condiciones descritas anteriormente.





## **4. RESULTADOS**

---



#### 4.1. DESARROLLO DE UN MÉTODO RÁPIDO DE AISLAMIENTO DE ADN

Para realizar el análisis molecular del elevado número de microalgas con las que se ha trabajado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, creímos necesario desarrollar un protocolo de extracción de ADN que fuera rápido y requiriera cantidades mínimas de material de partida. Para el desarrollo de este nuevo método de aislamiento de ADN se seleccionaron diferentes cultivos de algas (Tabla 4.1) y algunas especies de plantas con las cuales ajustar las condiciones de extracción y comprobar la eficacia del procedimiento. Los cultivos algales fueron obtenidos y mantenidos en condiciones óptimas de crecimiento, según se describe en Materiales y métodos. Dentro del grupo de plantas, se probaron tanto vasculares (por ejemplo *Malva sylvestris*, *Pelargonium zonale* y *Petroselinum crispum*) como no vasculares (por ejemplo *Porella platiphylla* y *Equisetum* sp.) (Anexo 2).

En los casos de cultivos líquidos, se centrifugaban entre 100-400  $\mu$ l (equivalente a  $5 \times 10^6$  –  $20 \times 10^6$  células) a 14.000 *xg* durante 1 minuto. Se descartaba el sobrenadante y se re-suspendía el pellet en un volumen igual (vol.) de DMSO, mezclando suavemente con la micropipeta. Para algas crecidas en medio semisólido y plantas, se empleaban aproximadamente 15 mg de tejido fresco (correspondiente en algas a  $14 \times 10^6$  células) y se incubaba con 400  $\mu$ l de DMSO. En otras ocasiones, en las que se pretendía analizar un número relativamente elevado de clones de algas crecidas en medio semisólido, se picaba una pequeña alícuota de células de cada cultivo con una punta de micropipeta, re-suspendiéndolas después en 100  $\mu$ l de DMSO.

**Tabla 4.1** Especies de algas estudiadas en el aislamiento de ADN con DMSO. Se incluyen los números de acceso de GenBank correspondientes a las secuencias obtenidas a partir del ADN extraído.

Especie	Cepa	Acceso Genbank
<b>ALGAS EUCARIOTAS</b>		
<b>CHLOROPHYTA</b>		
<i>Asterochloris erici</i>	SAG 32.85	FJ626729
<i>Asterochloris glomerata</i>	SAG 100.80	FJ626731
<i>Asterochloris irregularis</i>	SAG 33.85	FJ626732
<i>Elliptochloris bilobata</i>	SAG 245.80	GQ168945
<i>Elliptochloris reniformis</i>	SAG 2200	GQ168955
<i>Leptosira obovata</i>	SAG 445-1	GQ168956
<i>Myrmecia bisecta</i>	SAG 2043	GQ168957
<i>Picochlorum atomus</i>	SAG 14.87	GQ168947
<i>Pseudochlorella aquatica</i>	SAG 2149	GQ168949
<i>Stichococcus bacillaris</i>	SAG 335-3	GQ168950
<i>Tetraselmis chui</i>	SAG 8-6	GQ921943
<i>Trebouxia angustilobata</i>	SAG 2204	FJ626724
<i>Trebouxia arboricola</i>	SAG 219-1A	FJ626725
<i>Trebouxia asymmetrica</i>	SAG 48.88	AJ249565
<i>Trebouxia australis</i>	SAG 2205	FJ626726
<i>Trebouxia brindabellae</i>	SAG 2206	FJ626727
<i>Trebouxia decolorans</i>	UTEX B781	FJ626728
<i>Trebouxia gelatinosa</i>	UTEX906	FJ626730
<i>Trebouxia jamesii</i>	UTEX 2233	FJ626733
<i>Trebouxia showmanii</i>	SAG 2009	FJ626734
<i>Trebouxia simplex</i>	SAG 101.80	FJ626735
<i>Trebouxia sp.</i>	de <i>Ramalina farinacea</i>	FJ418565
<i>Trebouxia suecica</i>	SAG 2207	FJ626736
<i>Trentepohlia annulata</i>	SAG 20.94	GQ168951
<i>Trentepohlia spec.</i>	SAG 118.80	GQ168952
<i>Trochiscia gutwinskii</i>	SAG 102.80	GQ168953
<i>Trochiscia hystrix</i>	SAG 103.80	GQ168954
<b>HETEROKONTOPHYTA</b>		
<i>Heterococcus brevicellularis</i>	SAG 835-1	GQ168958
<i>Heterococcus mainxii</i>	SAG 835-6	GQ168946
<b>CYANOBACTERIAS</b>		
<i>Nostoc insulare</i>	SAG 54.79	GQ168959
<i>Nostoc ellipsosporum</i>	SAG 1453-7	GQ168948

Tras una incubación a 65°C durante 10 minutos, los tubos se centrifugaban a 10.000 *xg* durante 5 minutos. El sobrenadante que contenía el ADN disuelto en DMSO era directamente precipitado por dos métodos alternativos:

1. Incubación con 1 vol. de acetato amónico 4M (NH<sub>4</sub>OAc) y 2 vol. de isopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Incubación con 1 vol. de acetato sódico 3M pH 5,2 y 2 vol. de etanol 100% durante 30 minutos a -80°C.

Después de centrifugar a 14.000 *xg* durante 10 minutos, a temperatura ambiente en (1) o a 4°C en (2), los pellet resultantes fueron lavados dos veces con etanol 70%. Se secaron los tubos al aire y se re-suspendieron los precipitados en 15-50 µl de agua ultrapura estéril, conservándose a 4°C hasta su utilización en PCR.

#### **4.1.1. Evaluación de la calidad y la cantidad de ADN extraído**

Este nuevo protocolo resultó ser rápido y eficaz para aislar ADN con una proporción  $A_{260}/A_{280}$  de 2,28. El rendimiento de las extracciones osciló entre 5-35 ng de ADN por 10<sup>6</sup> células. Esta cantidad y calidad fue suficiente para realizar hasta 40 amplificaciones por PCR, dependiendo del material de partida. Este nuevo método resultó ser adecuado tanto para algas crecidas en medio líquido como en medio semisólido, así como para algunas plantas. En la Tabla 4.2 se muestra la comparación del método propuesto con otros protocolos existentes (Doyle & Doyle, 1990; Cenis, 1992). Para este método, no se requiere de etapas de homogenización de material y el único solvente empleado es el DMSO, por lo que la optimización en el número de pasos es acompañada de un menor tiempo de ejecución. En cuanto a la pureza obtenida, los valores de  $A_{260}/A_{280}$  fueron ligeramente superiores a los indicados en los métodos de la Tabla 4.2 y al protocolo propuesto por (Wang *et al.*, 2011).

**Tabla 4.2** Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN.

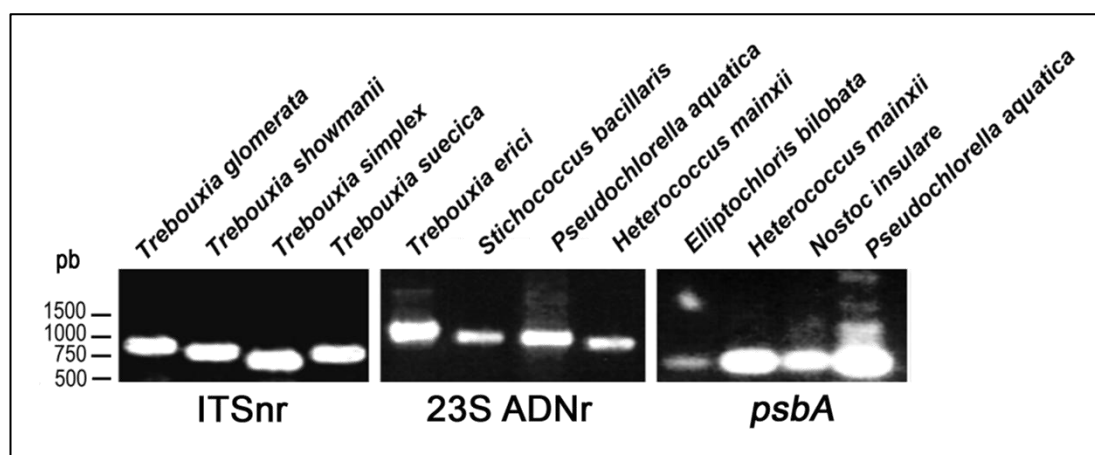
	DMSO	Cenis, 1992	Doyle & Doyle, 1990
Etapas del procedimiento:			
Nitrógeno líquido	-	-	+
Pulverización	-	+	+
Buffer de extracción	-	+	+
DMSO	+	-	-
$\beta$ -mercaptoetanol	-	-	+
Fenol-cloroformo	-	-	+
Congelación	-	+	-
Rendimiento (ng ADN/10 <sup>6</sup> células)	5-35	5-96	11-14
Pureza ( $A_{260}/A_{280}$ )	2,28	1,97	2,12
Tiempo	30	35 min	60 min

#### 4.1.2. Amplificación por PCR de los ADNs aislados con el método de DMSO

Los ADNs aislados mediante este método fueron utilizados como molde en reacciones de PCR, amplificando porciones de diferentes genes tanto nucleares como cloroplásticos. Para llevar a cabo estas amplificaciones se utilizaron varios cebadores que amplificaban tres marcadores moleculares diferentes: (i) El par de cebadores ITS-1T/ITS-4T (Kroken & Taylor, 2000), que amplifican una región de ADN que comprende el ITS1, el ARNr 5.8S y el ITS2 del operón que codifica los ARNs ribosomales de *Trebouxia*. (ii) El par de cebadores *psbA-chl1/psbA-chl2* (Anexo 6), que amplifican un fragmento del gen cloroplástico *psbA*, que codifica la proteína D1 del fotosistema II. (iii) El par de cebadores 23S-U1/23S-U2 (Anexo 6), que amplifican una región del 23S ADNr cloroplástico que codifica el ARNr 23S. Este último par de cebadores será objeto de un análisis exhaustivo como marcador molecular de amplio espectro en posteriores capítulos.

Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ l, incluyendo en cada ronda controles negativos. Las condiciones de amplificación fueron las indicadas en Materiales y métodos, hibridando los cebadores a 50°C y con un tiempo de extensión de 1 minuto, puesto que no esperábamos obtener tamaños de

amplificado superiores a 1000 Kilobases (Kb). Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de los productos amplificados utilizando el método de aislamiento de ADN con DMSO y con cebadores para genes nucleares y cloroplásticos. Los pares de cebadores empleados en cada set de amplificaciones fueron los siguientes: ITS-1T/ITS-4T (Kroken & Taylor, 2000), 23S-U1/23S-U2 y *psbA*-chl1/*psbA*-chl2 (Anexo 6). Los tamaños de los marcadores de peso molecular están señalados a la izquierda.

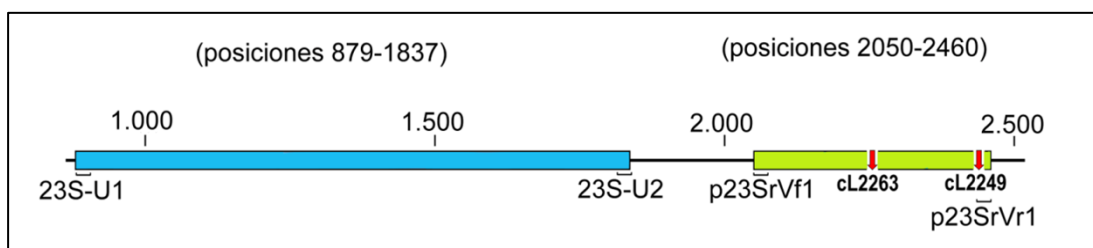
Todos los productos de amplificación fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron contrastadas con las depositadas en el NCBI mediante la aplicación BLAST. Todas las secuencias fueron a su vez depositadas en GenBank con los números de acceso indicados en la Tabla 4.1.

Los resultados indicaron amplificaciones exitosas y exactas de todos los ADNs aislados con el método de DMSO propuesto. Además, el ADN aislado fue estable al menos durante cuatro meses (conservado a 4°C) y permitía amplificar tamaños de hasta 2000 pb. La sencillez de este nuevo método de extracción de ADN podría resultar útil a ficólogos y liquenólogos para examinar fotobiontes de una forma más rápida y sencilla que otros métodos disponibles. Además, ya que en el desarrollo experimental propuesto también se emplearon algunas plantas, este método podría ser útil para realizar trabajos moleculares en biología vegetal en general, sobre todo si se requiere de un aislamiento de material genético de forma rápida y se dispone de poca cantidad de material de partida.

#### 4.2. DISEÑO DE UN MARCADOR *UNIVERSAL* BASADO EN EL GEN CLOROPLÁSTICO QUE CODIFICA EL ARNr 23S

Como se ha indicado anteriormente, uno de los objetivos de la presente Tesis Doctoral ha sido el de incrementar el número y versatilidad de marcadores moleculares disponibles para el estudio de fotobiontes liquénicos. Partiendo de los buenos resultados con el gen 23S ADNr para la reconstrucción de filogenias en los géneros *Trebouxia* y *Asterochloris* (del Campo *et al.*, 2010a), se planteó el diseño de un par de cebadores que funcionara en el rango más amplio posible de organismos y que el fragmento amplificado por los mismos fuera útil para la construcción de filogenias.

En un primer momento se trató de utilizar la pareja de cebadores “bastante universales” para algas eucarióticas y cianobacterias propuesta por Sherwood & Presting (2007). Las reacciones de amplificación realizadas con ellos proporcionaban un tamaño de amplificado de aproximadamente 410 nucleótidos. Sin embargo, nos encontramos con la imposibilidad de amplificar el gen 23S ADNr con estos dos cebadores en diversas especies de algas pertenecientes a los géneros *Asterochloris*, *Coccomyxa*, *Dilabifilum*, *Dictyochloropsis* y *Trebouxia*. El motivo por el que no se obtenía amplificado es la presencia del intrón cL2449, que precisamente interrumpe la diana del cebador p23SrV\_r1, resultando imposible que este pueda hibridar con su secuencia complementaria. La presencia de este intrón se puso de manifiesto primeramente en trabajos realizados en *Asterochloris* y *Trebouxia* (del Campo *et al.*, 2010a) y posteriormente en los demás géneros (Figura 4.2). Adicionalmente, se constató la presencia de intrones en la región comprendida por estos dos cebadores en muchas algas de los géneros *Asterochloris* y *Trebouxia*. Un ejemplo es el intrón cL2263 (Figura 4.2).





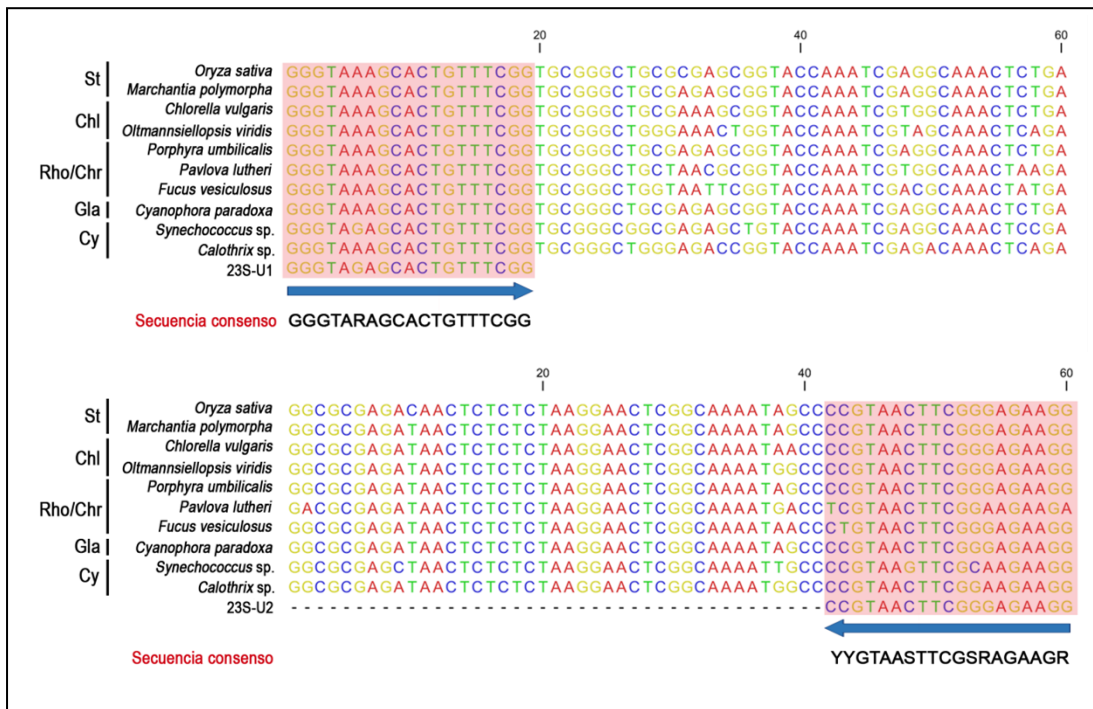
**Figura 4.2** Mapa genético de la región del 23S ARNr en *E. coli* cubierta por los cebadores 23S-U1/23S-U2 (azul) diseñados en este trabajo y los propuestos por Sherwood & Presting (2007) (verde). Las flechas rojas indican posiciones de los intrones de tipo I cL2263 y cL2449 (del Campo *et al.*, 2009; 2010a).

A continuación se detallan los principales problemas generados por la presencia de intrones en las regiones de ADN que se esperan amplificar y/o secuenciar:

- Largos tiempos de extensión, al tener que amplificar fragmentos que frecuentemente superan los 1000 nt.
- Repeticiones de Adeninas y Timinas, que pueden ser causantes de errores en la secuenciación.
- Fuertes estructuras secundarias, que a menudo dificultan tanto la amplificación como la secuenciación.

Aparte de todos estos problemas técnicos, los intrones de tipo I, dada su naturaleza de elementos móviles sujetos a frecuentes fenómenos de transferencia horizontal (Haugen *et al.*, 2005), no pueden utilizarse para inferir filogenias y deben ser eliminados de los análisis para evitar árboles filogenéticos con topologías alteradas y alejadas de la realidad.

Por todos estos motivos nos planteamos buscar, en algas verdes, una región más o menos amplia (de al menos 500 nt) y con baja frecuencia de intrones. Para ello, nos basamos en las secuencias de las algas estudiadas por del Campo y colaboradores (2010a) y otras presentes en GenBank. Después del análisis bioinformático de estas secuencias, se encontró una región comprendida entre las posiciones 781 y 1917 del gen ortólogo de *Escherichia coli* (Ohnishi *et al.*, 2000) con ausencia de intrones en todas las especies analizadas. El siguiente paso fue conseguir regiones idénticas o prácticamente idénticas en la mayor parte de organismos posibles. Para ello, se compararon secuencias disponibles en GenBank de un amplio rango de organismos que englobaban desde las cianobacterias a las plantas, incluyendo las diversas divisiones de algas existentes (Figura 4.3).



**Figura 4.3** Alineamiento de las regiones del gen 23S ADNr que comprenden las secuencias de los cebadores 23S-U1 y 23S-U2. Se seleccionaron 60 nt de cada región del gen de un amplio rango de organismos. La secuencia de los cebadores es incluida en los alineamientos. La posición de la flecha azul indica la dirección de los cebadores. Se indica una secuencia consenso generada a partir del alineamiento de las diferentes especies. St: Streptophyta; Chl: Chlorophyta; Rho/Chr: Rhodophyta y Chromista; Gla: Glaucophyta; Cy: Cyanobacteria.

Para el diseño de los cebadores se utilizó la aplicación BatchPrimer3 (You *et al.*, 2008) teniendo en cuenta, además de la posible homología con la secuencia de ADN que se quería amplificar y secuenciar, otra serie de criterios como los citados en (Ye *et al.*, 2012):

- El tamaño medio de los cebadores debía ser del orden de 20 nucleótidos, es decir, lo suficientemente extenso para asegurar su unión específica a la región homóloga, pero no tanto como para dificultarla. Estas dificultades a menudo están relacionadas con las estructuras secundarias y las interacciones que pueden darse entre cebadores cuanto más extensos sean las secuencias de los mismos.
- La composición en G+C debía igualar a la composición en A+T y distribuirse lo más alternadamente posible. En caso de no poder cumplir este criterio, se procuraría que la acumulación de G+C ocurriera en el extremo 3', lugar por el

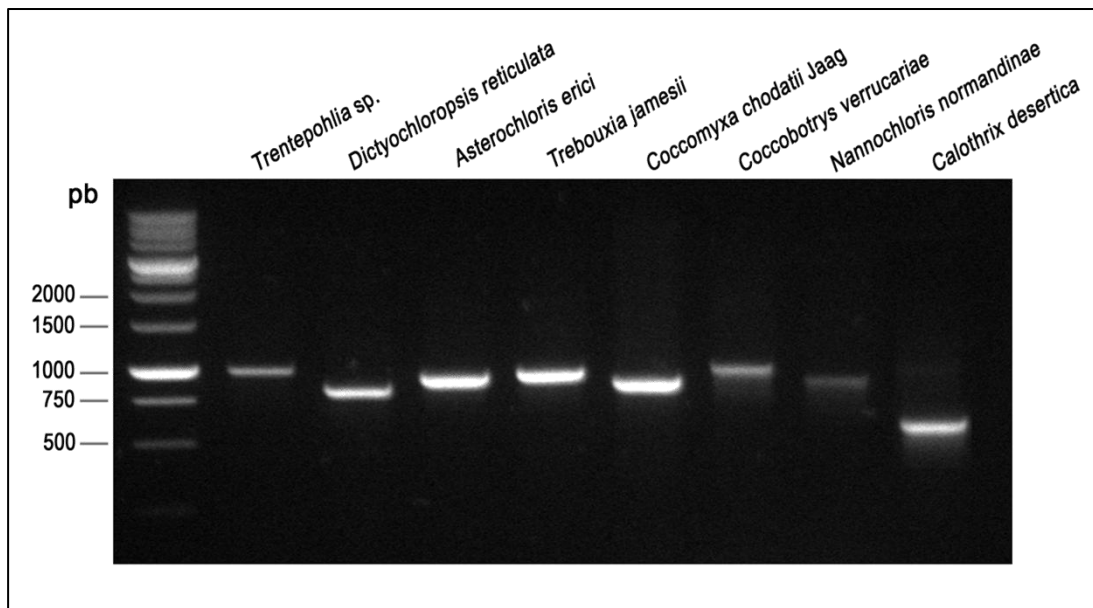
que se produce la unión de la polimerasa al cebador para la elongación del ADN. Se trató además de evitar la repetición de una base nitrogenada más de tres veces seguidas, disminuyendo así la probabilidad de uniones inespecíficas a zonas donde se repiten bases, hecho bastante frecuente en el genoma de cloroplastos, sobre todo en regiones intergénicas.

Finalmente, se diseñaron dos cebadores (23S-U1 y 23S-U2) que abarcaban las posiciones 879-1837 del gen ortólogo de *Escherichia coli*, cuyas secuencias se muestran en el Anexo 6. Ambos cebadores mostraron amplia similitud en un alto número de organismos sobre todo a nivel de la región 3', región muy importante para que se produzca correctamente la reacción de amplificación.

#### **4.2.1. Ensayo de los nuevos cebadores *universales* en amplificación y secuenciación de ADN de diversos organismos**

Estos nuevos cebadores sintetizados se ensayaron en una gran variedad de organismos (Anexos 1 y 2): cianobacterias y microalgas eucariotas provenientes de los bancos de algas SAG y UTEX, así como aisladas de líquenes; macroalgas proporcionadas por la empresa Española *Porto Muiños*<sup>®</sup>; briófitos, pteridófitos y plantas vasculares, obtenidos de diferentes localizaciones.

Para el aislamiento del ADN se siguieron diferentes procedimientos, mostrados en Materiales y métodos así como el diseñado por nosotros mismos (apartado 4.1 de Resultados). Los ADNs aislados fueron amplificados por PCR con las condiciones establecidas en Materiales y métodos, empleando 1 minuto de extensión ya que se esperaba obtener fragmentos entre 600-800 nt. Los productos obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. El tamaño medio de los productos amplificados fue de 800 nt, máximo en el caso de la división Chlorophyta (800 nt en *Asterochloris erici* y 900 nt en *Trentepohlia* sp.) y mínimo en Cyanobacteria (aprox. 600 nt en *Calothrix desertica*) (Figura 4.4). Las bandas obtenidas fueron cortadas y purificadas para su posterior secuenciación.



**Figura 4.4** Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de los productos amplificados por PCR con los cebadores 23S-U1 y 23S-U2 en diversos organismos. Los tamaños en pares de bases (pb) de los marcadores de peso molecular están señalados a la izquierda. Los tamaños de los diferentes productos de amplificación obtenidos oscilan entre los 600-900 pb.

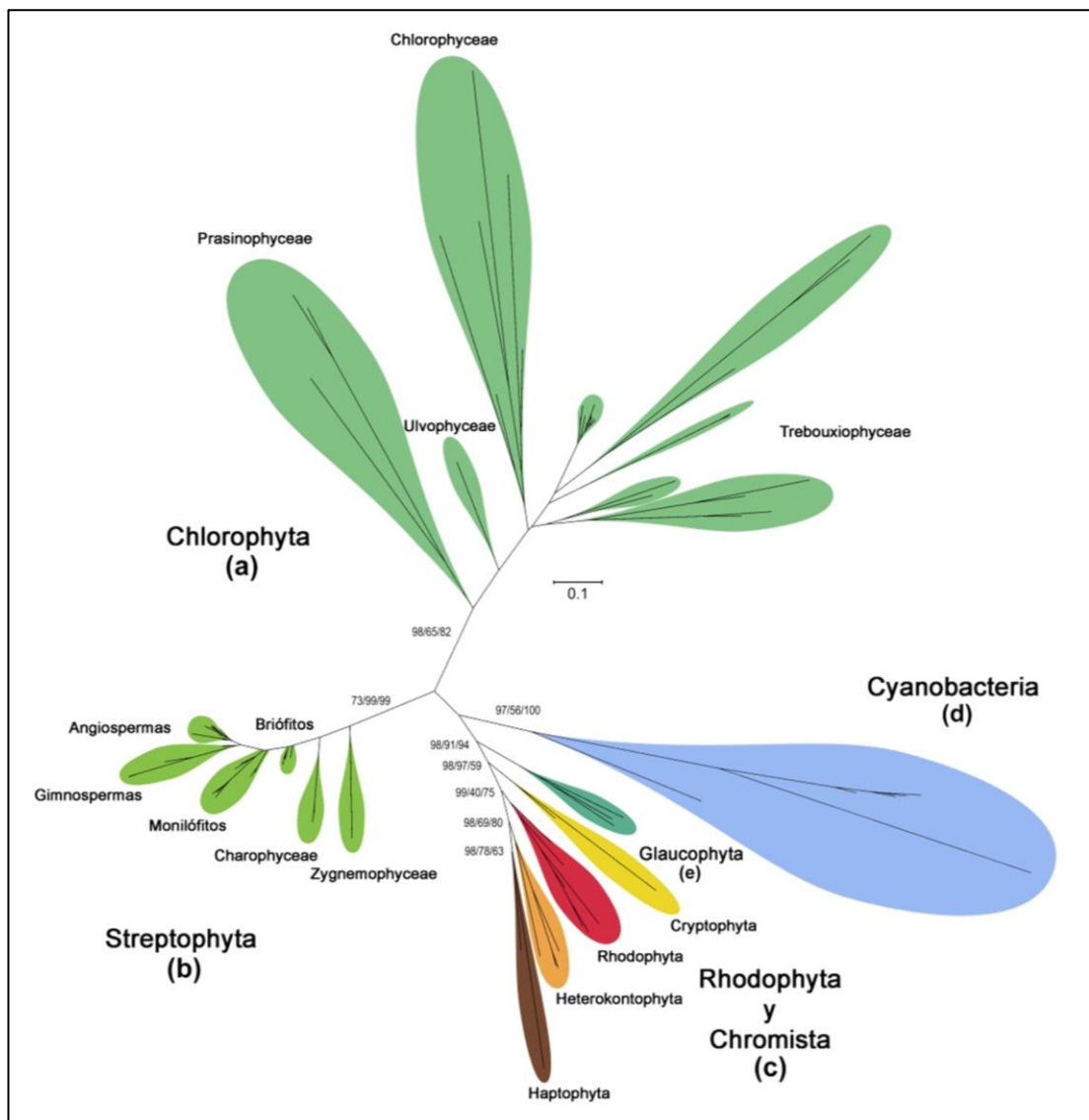
Un primer análisis con la herramienta BLAST (Altschul *et al.*, 1990) de las secuencias obtenidas confirmó el éxito inicial de la pareja de cebadores diseñada para una gran diversidad de organismos (Anexos 1 y 2). Las secuencias obtenidas fueron depositadas en GenBank con los números de acceso indicados en los Anexos 1 y 2.

#### 4.2.2. Ensayo del nuevo marcador molecular en análisis filogenéticos de organismos fotosintéticos en general

Para representar la enorme diversidad de organismos amplificados mediante esta pareja de cebadores, así como sus relaciones filogenéticas, construimos el árbol filogenético de la Figura 4.5 sobre la base de las secuencias depositadas en GenBank por nosotros (Anexos 1 y 2) y por otros investigadores. El árbol fue obtenido siguiendo una aproximación de máxima verosimilitud (ML) empleando el programa PhyML v3.0 (Guindon & Gascuel, 2003) y representado mediante el uso del programa FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2008).

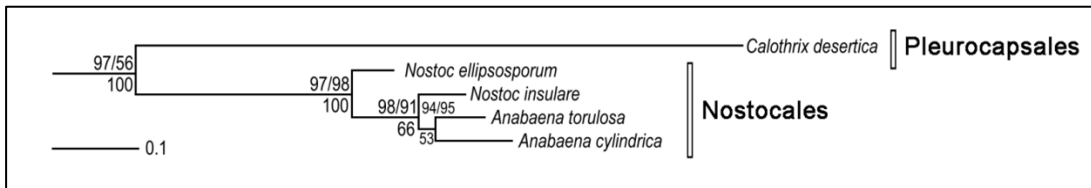
Para mostrar un mayor detalle de las relaciones filogenéticas representadas en la Figura 4.5, se construyó un árbol filogenético utilizando la cianobacteria

*Chroococidiopsis cubana* como grupo externo. Este árbol se dividió en varias partes, correspondientes a los principales grupos de organismos (Figuras 4.6-4.9).



**Figura 4.5** Árbol filogenético sin raíz basado en la región amplificada y secuenciada del gen 23S ADNr cloroplástico con los cebadores 23S-U1 y 23S-U2. Los valores de la izquierda corresponden a las probabilidades inferidas mediante análisis Bayesiano, los del medio mediante análisis de Máxima Parsimonia (MP) y los de la derecha corresponden a valores de bootstrap de 100 réplicas inferidos mediante análisis de distancias con el método de Neighbor Joining (NJ). Los valores de soporte son indicados solo en aquellos linajes con un soporte superior a 50. La escala indica el número de sustituciones/sitio.

Las relaciones filogenéticas entre las cianobacterias ensayadas se muestran en la Figura 4.6. La aparición de cloroplastos hace aproximadamente 600 millones de años como resultado de un fenómeno de endosimbiosis entre una cianobacteria y un protozoo justifica que el gen 23S ADNr haya evolucionado a partir de un gen 23S ADNr cianobacteriano. La secuencia de los cebadores diseñados alinea perfectamente con todas las secuencias cianobacterianas incluidas en la figura.



**Figura 4.6** Porción de la reconstrucción filogenética correspondiente a cianobacterias.

La Figura 4.7 muestra la filogenia correspondiente a la división Streptophyta. Las relaciones filogenéticas dentro de esta división se resolvieron mucho mejor que en el caso de la división Chlorophyta, como se verá más adelante. Como puede apreciarse, los dos clados principales corresponden a plantas (angiospermas, gimnospermas, monilófitos, musgos y hepáticas) y a algas (divisiones Charophyceae y Zygnemophyceae).

La Figura 4.8 muestra las relaciones filogenéticas en la división Rhodophyta y el grupo de Chromistas. Al igual que en el caso de organismos de la división Streptophyta, las relaciones parecen bien resueltas, indicando un origen monofilético de los plastidios en Rhodophyta, Haptophyta y Heterokontophyta. Los plastidios de Cryptophyta parecen ser los primeros en haber divergido en el grupo de Chromistas.

La Figura 4.9 muestra las relaciones filogenéticas inferidas para varios grupos de algas de la división Chlorophyta, en la que se pueden apreciar algunos clados claramente diferenciados. Sin embargo, el escaso soporte de los mismos no permitió inferir la secuencia de las ramificaciones.

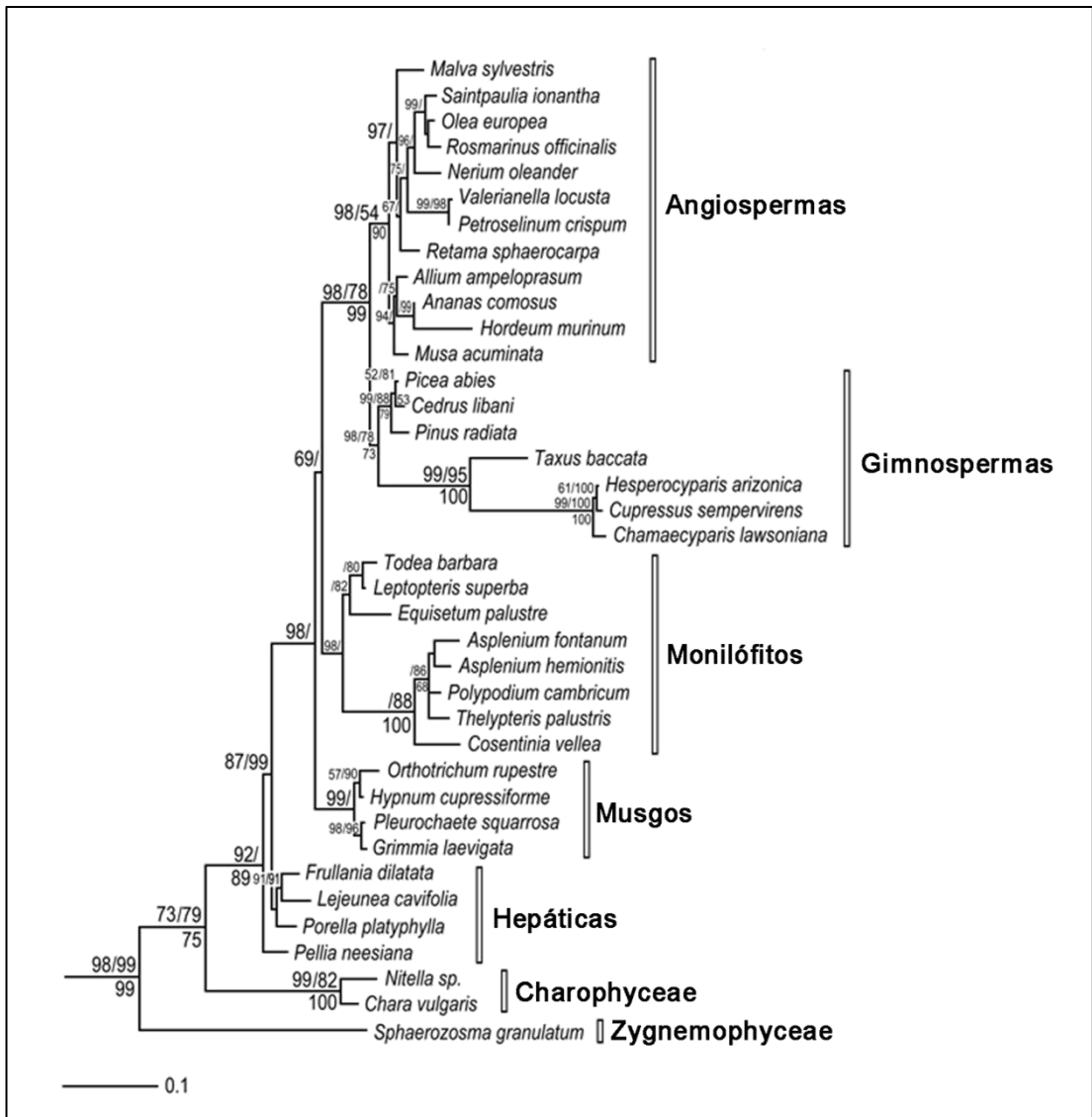


Figura 4.7 Porción del árbol filogenético correspondiente a organismos de la división Streptophyta.

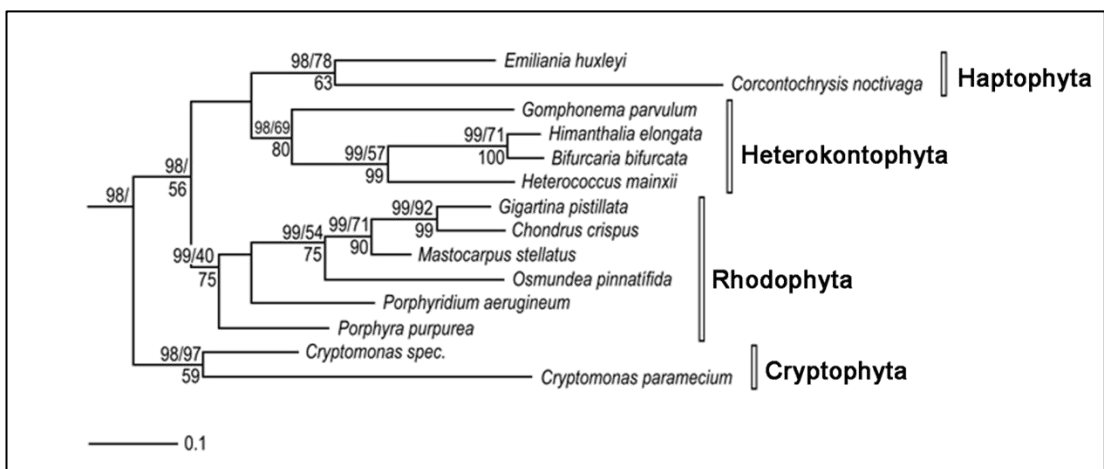


Figura 4.8 Porción de la reconstrucción filogenética correspondiente a los grupos Rhodophyta y Chromistas.

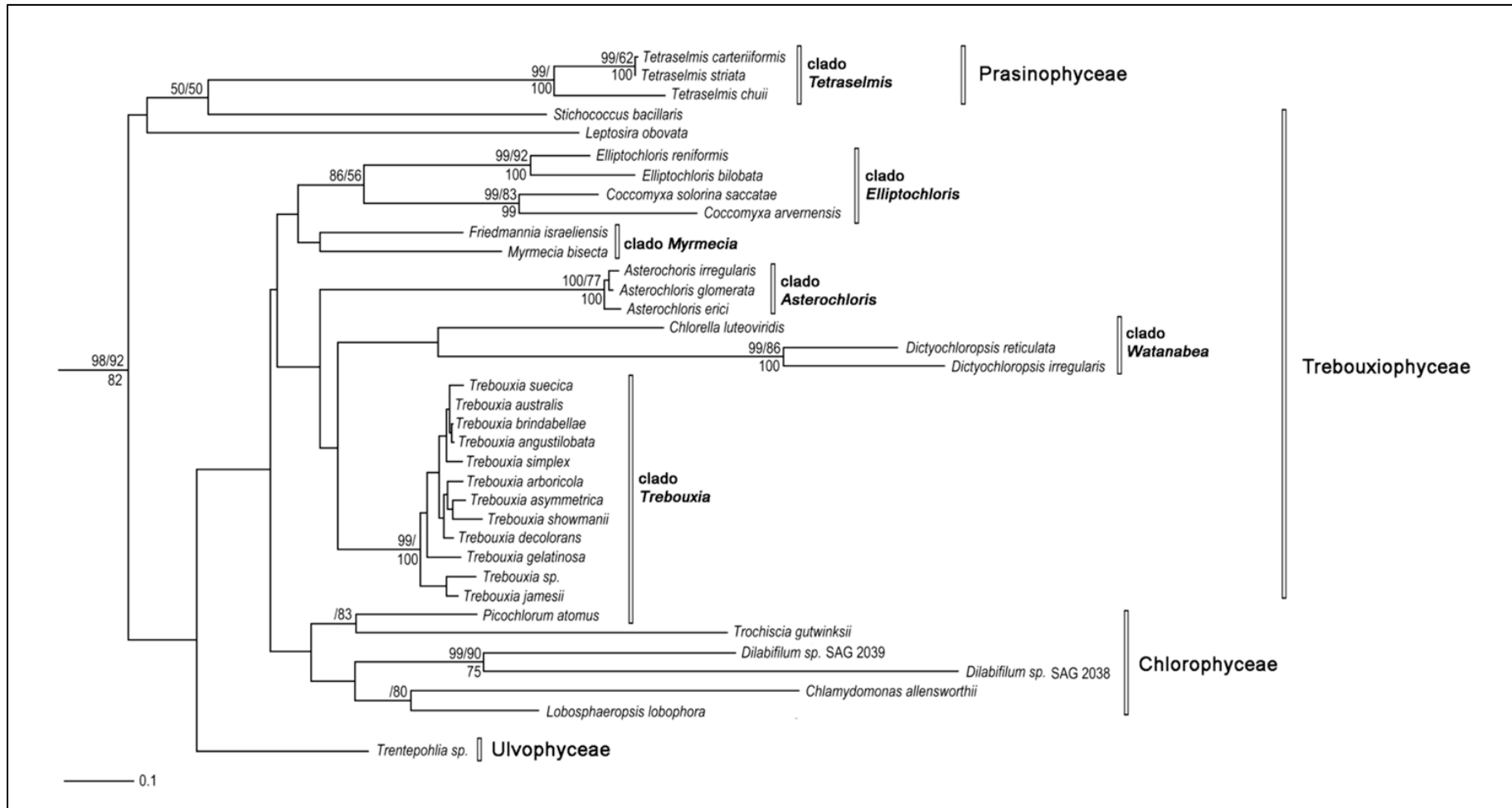


Figura 4.9 Porción del árbol filogenético correspondiente a organismos de la división Chlorophyta.



#### 4.2.3. Relaciones filogenéticas entre géneros de algas liquénicas

Debido a que las relaciones filogenéticas en el grupo de organismos de la división Chlorophyta no mostraron altos valores de soporte en los diferentes nodos obtenidos, se decidió hacer una selección de algas liquénicas, pues nuestro interés principal era profundizar en las relaciones filogenéticas dentro de este grupo de organismos. Para ello, se seleccionó la secuencia del 23S ADNr cloroplástico de un total de 36 especies, pertenecientes a los tres géneros más importantes de fotobiontes liquénicos: *Asterochloris*, *Coccomyxa* y *Trebouxia*.

Para construir el árbol filogenético (Figura 4.10), se seleccionó como grupo externo a las especies *Chara vulgaris* y *Nitella* sp., pertenecientes a la división Charophyceae, siguiendo una aproximación de máxima verosimilitud (ML) empleando el programa PhyML v3.0 (Guindon *et al.*, 2010). El modelo de sustitución de nucleótidos fue determinado mediante el programa jModelTest 0.1 (Posada, 2009), tras lo que se seleccionó el modelo K80. Para la representación se empleó el programa FigTree v1.3.1 (Rambaut, 2008). Los valores representados en el árbol (de izquierda a derecha) corresponden a las probabilidades inferidas mediante análisis de Máxima Parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML), establecidas mediante valores de bootstrap de 100 réplicas (Felsenstein, 1985). Los valores soporte son indicados sólo en los nodos con soporte superior a 50. La escala indica el número de sustituciones/sitio.

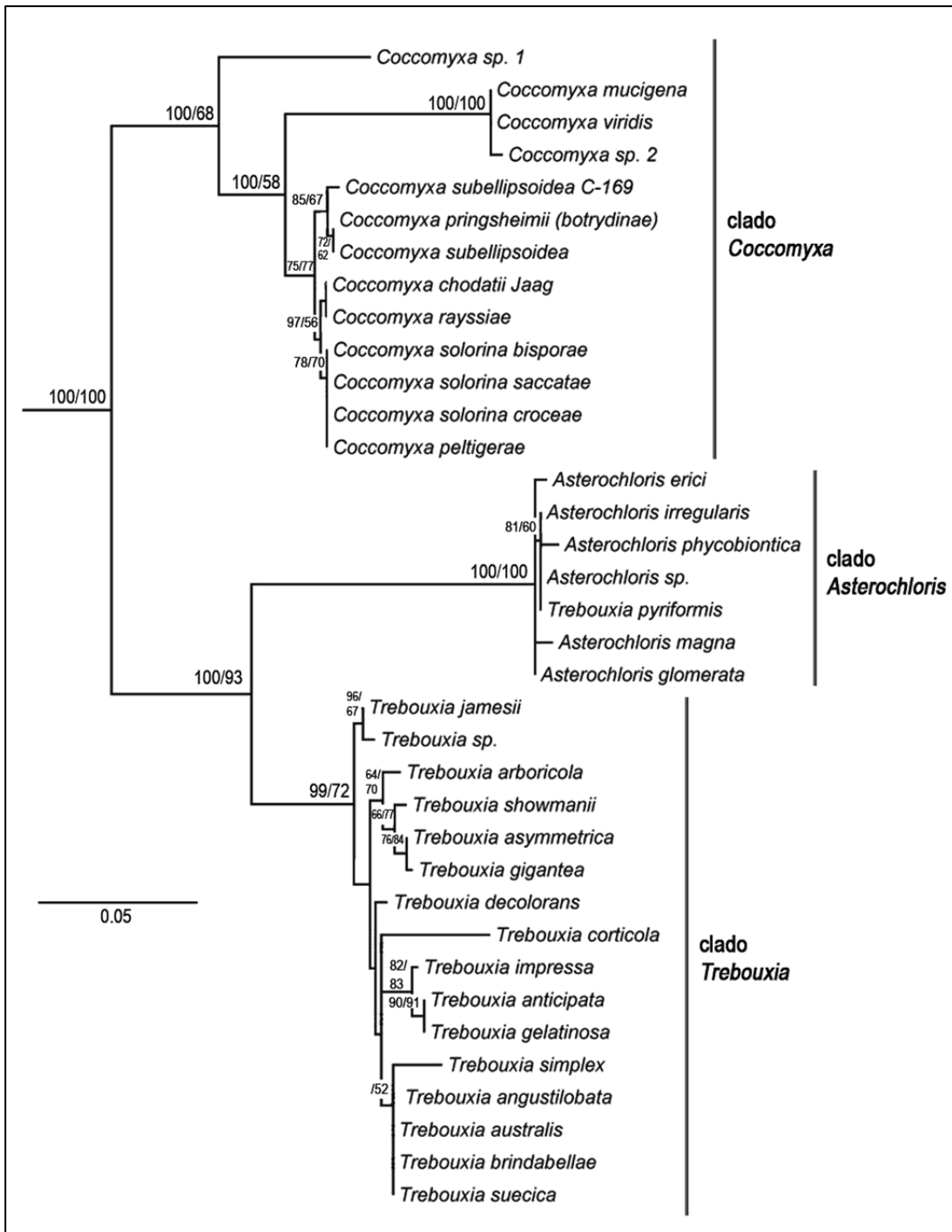


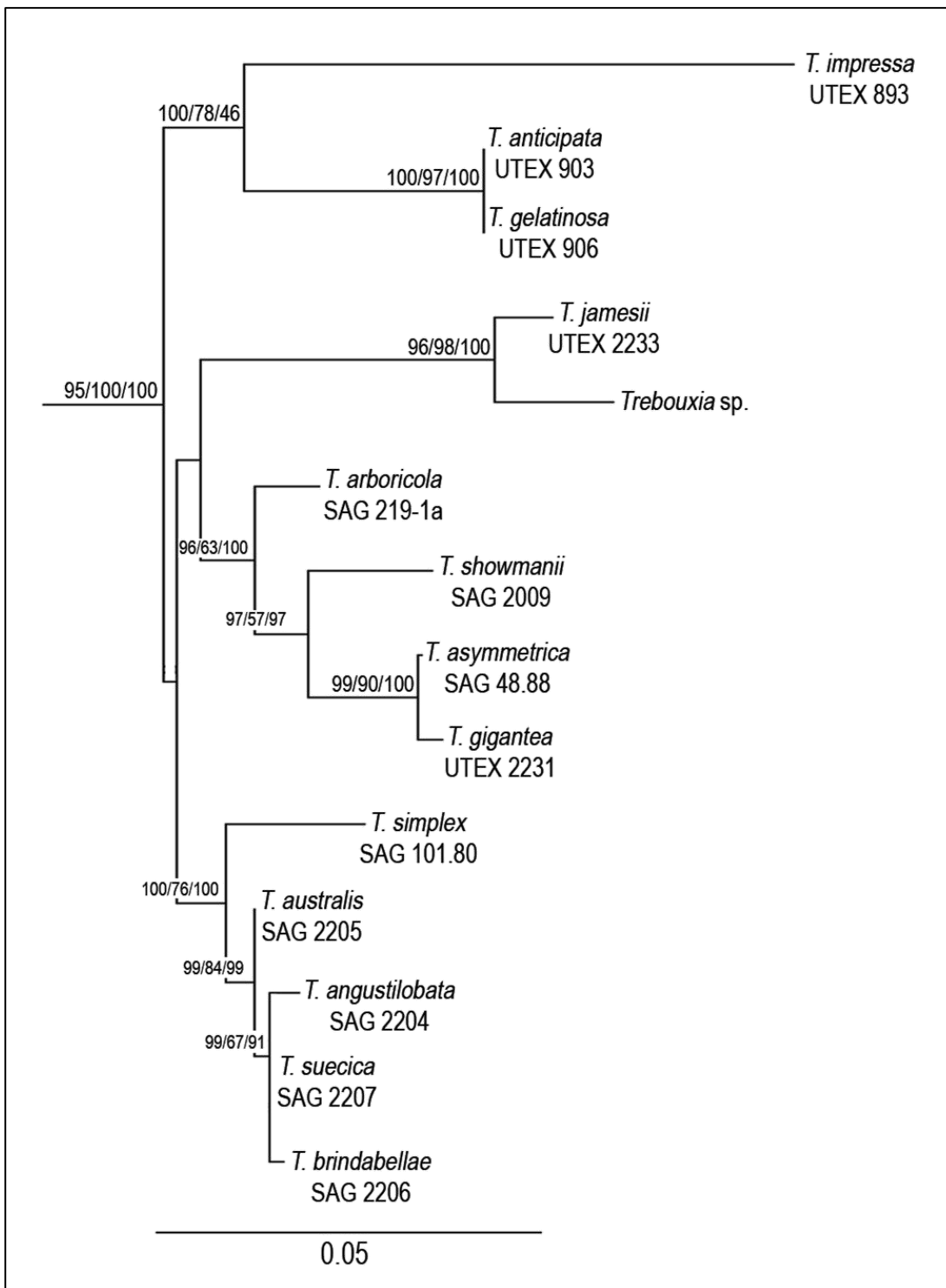
Figura 4.10 Árbol filogenético de los principales géneros de algas liquénicas.

En general, los valores soporte de este árbol fueron notablemente mejores que aquellos mostrados en la Figura 4.9, viéndose claramente la separación entre los tres géneros de algas liquénicas en tres clados bien definidos. Además, se puede observar que algunas especies que eran consideradas diferentes en los bancos de algas son agrupadas juntas con altos valores soporte, indicando que podrían ser realmente la

misma especie citada con nombres diferentes. Cabe señalar también la inclusión de la especie *Trebouxia pyriformis* en el clado *Asterochloris*, demostrando que pertenece a este género y no a *Trebouxia* como fue inicialmente clasificada.

Aunque la Figura 4.10 muestra con muy buena fiabilidad la separación de los tres clados de algas liquénicas, nos propusimos mejorar las filogenias por separado de *Trebouxia* y *Coccomyxa*, por ser estos géneros los componentes fotosintéticos de los líquenes *Ramalina farinacea* y *Lichenomphalia umbellifera*, cuyo estudio en profundidad será abordado en apartados posteriores de este trabajo.

Para ello, se realizaron dos árboles filogenéticos. Uno de ellos incluyó las especies del género *Trebouxia* (Figura 4.11) y el otro las del género *Coccomyxa* (Figura 4.12). En ambos árboles dos especies del género *Asterochloris* (*A. erici* y *A. glomerata*) fueron seleccionadas como grupo externo. La Figura 4.11 muestra el árbol correspondiente a las especies de *Trebouxia*. Los valores representados en los nodos corresponden (de izquierda a derecha) a las probabilidades inferidas mediante análisis de Máxima Parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) y análisis Bayesiano, establecidas mediante valores de bootstrap de 100 réplicas (Felsenstein, 1985). Este nuevo árbol volvió a poner de manifiesto la inclusión de *Trebouxia pyriformis* en *Asterochloris*, pues quedó incluida en el grupo externo junto con *A. erici* y *A. glomerata*. Además, para asegurarnos que la representación mostrada en la Figura 4.11 era veraz, realizamos un análisis con el método de Neighbor Joining (NJ), obteniéndose la misma topología de agrupación de taxones.



**Figura 4.11** Árbol filogenético correspondiente al género *Trebouxia*.

El árbol correspondiente a las especies de *Coccomyxa* queda representado en la Figura 4.12. Los valores representados (de izquierda a derecha) corresponden a las probabilidades inferidas mediante análisis de Máxima Parsimonia (MP), máxima verosimilitud (ML) y análisis Bayesiano, establecidas mediante valores de bootstrap de

100 réplicas (Felsenstein, 1985). Creemos que algunos taxones podrían en realidad pertenecer a la misma especie, algo que se observa notablemente para el grupo de *C. solorina* (*bisporae*, *croceae* y *saccatae*) y *C. peltigerae*. Al igual que para el árbol de *Trebouxia*, se realizó un análisis con el método de Neighbor Joining (NJ), el cual generó una topología de agrupación de taxones igual a la representada en la Figura 4.12.

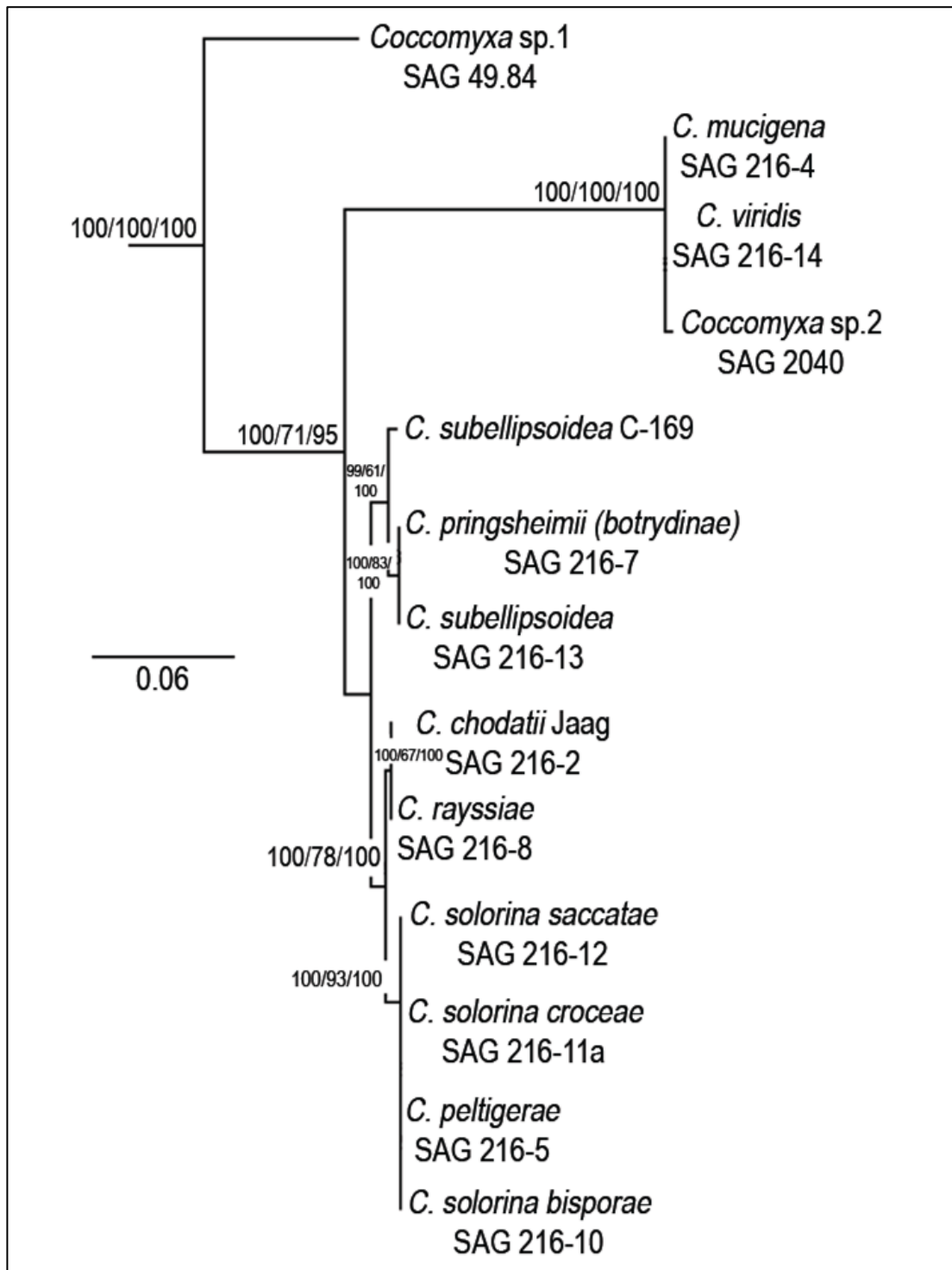


Figura 4.12 Árbol filogenético correspondiente al género *Coccomyxa*.

#### 4.3. BÚSQUEDA, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE INTRONES DE TIPO I EN EL GEN 23S ADN<sub>r</sub> DE FOTOBIONTES LIQUÉNICOS

Estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación en fotobiontes de los géneros *Trebouxia* y *Asterochloris* pusieron de manifiesto la utilidad de una región del gen 23S ADN<sub>r</sub> cloroplástico. La secuenciación de esta región, comprendida entre las posiciones 759-2596 (referido al gen ortólogo de *E. coli*), puede ser utilizada para diferenciar especies de fotobiontes liquénicos y algas relacionadas. La explicación de este hecho se debe a la presencia de intrones de tipo I insertados en diferentes posiciones del gen, lo que se traduce en diferentes longitudes de la misma región según el número que exista de estos elementos móviles. Así, los fotobiontes de los géneros *Trebouxia* y *Asterochloris* presentaron patrones de inserción de intrones y exones característicos, así como diferente longitud y secuencia de los mismos (del Campo *et al.*, 2010a).

El conocimiento de esta misma región del gen 23S ADN<sub>r</sub> en todas las especies de algas estudiadas en la presente Tesis Doctoral permitiría determinar la posible presencia de intrones de tipo I, su tamaño y distribución. Asimismo nos propusimos estudiar la presencia de *Homing* endonucleasas (HEs), que como se comentó en la Introducción, aparecen frecuentemente codificadas en este tipo de intrones.

Para abordar este estudio, se seleccionaron 21 especies de algas verdes, incluidas en siete géneros diferentes: *Asterochloris*, *Coccolobrya*, *Coccomyxa*, *Dictyochloropsis*, *Dilabifilum*, *Nannochloris* y *Trebouxia* (Tabla 4.3), en las que el gen 23S ADN<sub>r</sub> no había sido aún estudiado. Esta diversidad de organismos incluía sobre todo especies aisladas de líquenes y algunas especies de vida libre, con la intención de conocer si la presencia de estos elementos genéticos en dichas algas pudiera guardar relación con sus modos de vida (libre o en simbiosis).

La estrategia desarrollada se basó en el diseño de cebadores específicos (cuya lista se detalla en el Anexo 6) que se unieran eficazmente a la mayoría de los ADNs de las algas a estudiar. Para conseguirlo, se recurrió a las secuencias del gen 23S ADN<sub>r</sub> de otras algas verdes disponibles en GenBank. Después de alinear todas las secuencias disponibles, se seleccionó la región más conservada entre las diferentes algas. Para el diseño de cebadores se tuvieron en cuenta, además de la posible homología con la

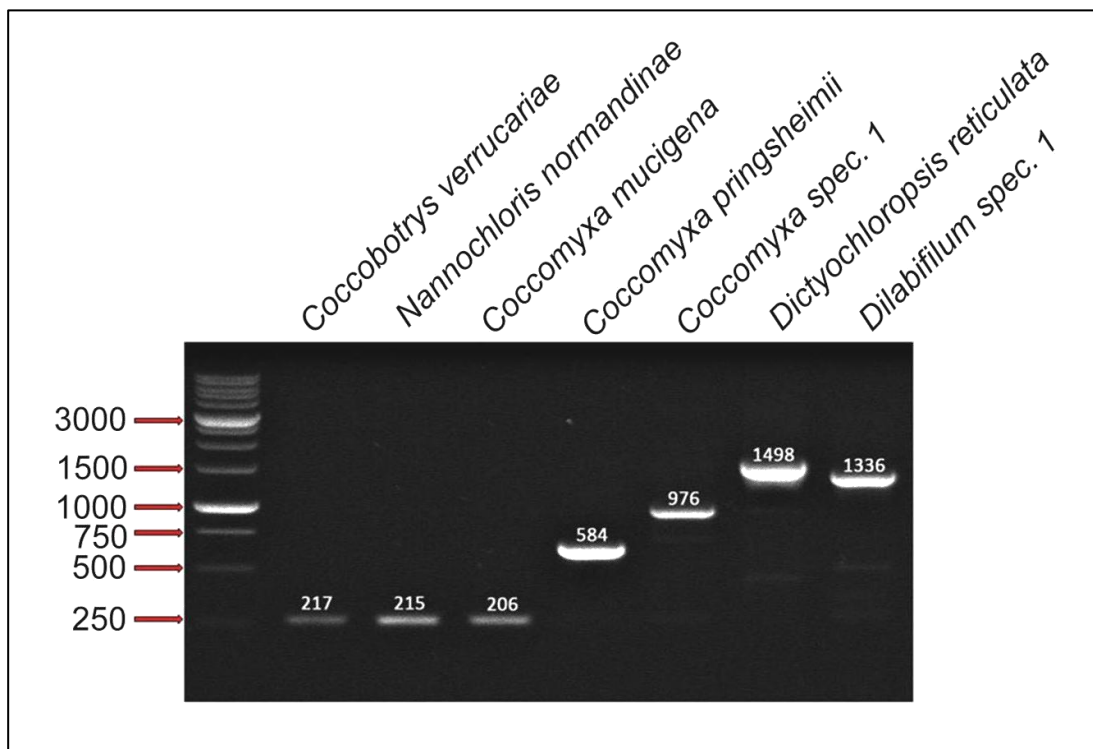
secuencia de ADN que se quería amplificar y secuenciar, otros criterios como los citados en Ye *et al.* (2012) y que fueron desarrollados en el apartado 4.2.

**Tabla 4.3** Algas utilizadas para el estudio del gen 23S ADNr. <sup>a</sup>*Dictyochloropsis reticulata* fue aislada del líquen *Lobaria pulmonaria*. Se incluyen algas de vida libre (vl).

Organismo	Cepa	Acceso GenBank
<i>Asterochloris magna</i>	UTEX 902	JQ921001
<i>Asterochloris phycobiontica</i>	SAG 26.81	JQ921002
<i>Coccolobos verrucariae</i>	SAG 16.97	JQ921003
<i>Coccomyxa chodatii</i> Jaag (vl)	SAG 216-2	JQ278715
<i>Coccomyxa mucigena</i>	SAG 216-4	JQ278712
<i>Coccomyxa pringsheimii</i> (botrydinae)	SAG 216-7	JQ278713
<i>Coccomyxa rayssiae</i> (vl)	SAG 216-8	JQ278716
<i>Coccomyxa</i> spec.1	SAG 49.84	JQ278714
<i>Coccomyxa</i> spec.2 (vl)	SAG 2040	JQ278717
<i>Coccomyxa</i> spec.3 (vl)	SAG 216-15	JQ278718
<i>Dictyochloropsis irregularis</i> (vl)	SAG 2036	JQ921010
<i>Dictyochloropsis reticulata</i> <sup>a</sup>	---	JQ921004
<i>Dictyochloropsis symbiontica</i>	SAG 27.81	JQ921011
<i>Dilabifilum</i> spec.1	SAG 2038	JQ921005
<i>Dilabifilum</i> spec.2	SAG 2039	JQ921006
<i>Nannochloris normandinae</i>	SAG 9.82	JQ921007
<i>Trebouxia anticipata</i>	UTEX 903	JQ921012
<i>Trebouxia corticola</i>	UTEX 909	JQ921013
<i>Trebouxia gigantea</i>	UTEX 2231	JQ921008
<i>Trebouxia impressa</i>	UTEX 893	JQ921009
<i>Trebouxia pyriformis</i>	UTEX 1712	JQ921014

Las primeras secuencias obtenidas de esta región en las diferentes algas sirvieron como patrón para diseñar cebadores con mayor fiabilidad, 100% homólogos respecto a las mismas. Para secuenciar, se utilizaron diversos moldes producto de diferentes amplificaciones con diferentes cebadores. En la Figura 4.13 se muestra un ejemplo de productos de amplificación por PCR con la pareja de cebadores 23S-ta5/23S-ta6 (Anexo 6) separados mediante electroforesis horizontal. Las diferencias de tamaño mostradas son debidas a la presencia de intrones (posiblemente de tipo I) en

la región comprendida entre los cebadores utilizados. Las secuencias obtenidas se introdujeron en GenBank con números de acceso disponibles en la Tabla 4.3.

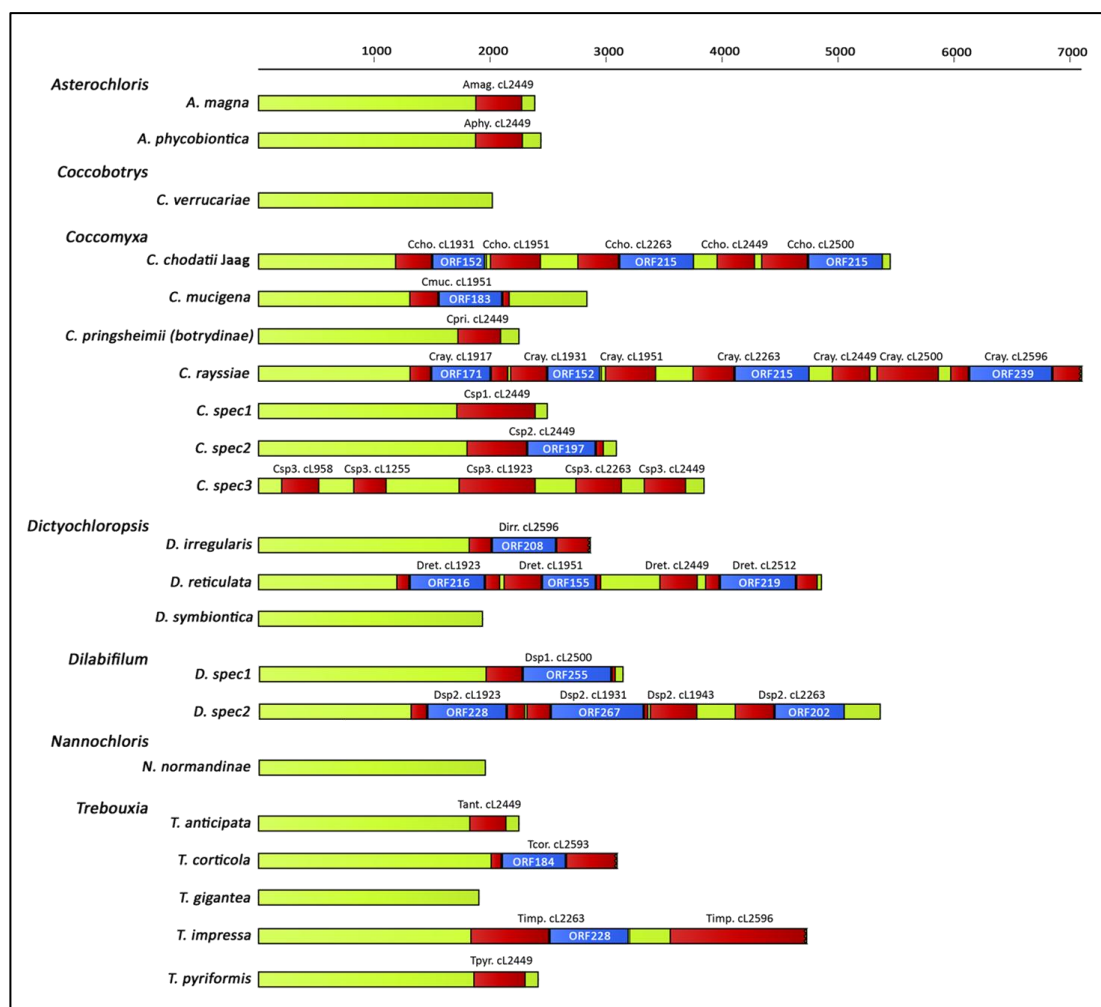


**Figura 4.13** Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de los productos amplificados del gen 23S ADNr de algunos especímenes de la tabla 4.3. Todas las reacciones de amplificación fueron realizadas por el mismo par de cebadores específicos: 23S-ta5/23S-ta6 (Anexo 6). Los tamaños en pares de bases de los marcadores de peso molecular se indican con flechas a la izquierda. Los tamaños de los diferentes productos de amplificación obtenidos se indican sobre cada banda, con variaciones desde los 200-1500 pb.

#### 4.3.1. Elaboración de mapas genéticos del gen 23S ADNr

Con las secuencias obtenidas de las diferentes algas mostradas en la Tabla 4.3 se elaboraron los mapas genéticos, haciendo uso de la aplicación informática CLC SequenceViewer 6.5.2 (<http://www.clcbio.com/products/clc-sequence-viewer/>). En la Figura 4.14 se muestra la relación de intrones encontrados en el gen 23S ADNr cloroplástico. Se determinó la presencia de un total de 38 intrones (posiblemente de tipo I) en la región del gen secuenciada (posiciones 759-2596 en el gen ortólogo de *E. coli* (Ohnishi *et al.*, 2000)).



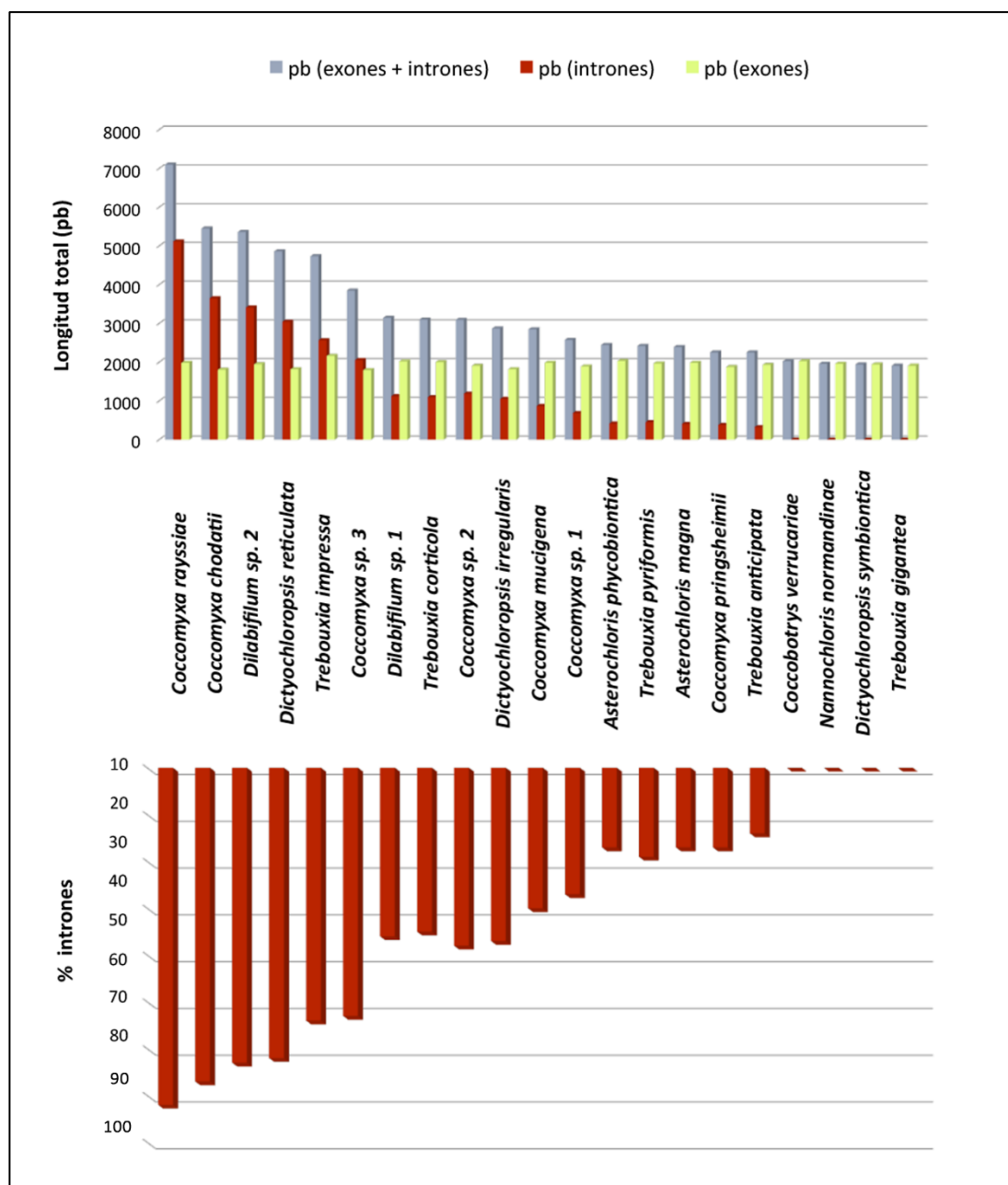


**Figura 4.14** Mapa genético de la región secuenciada del gen 23S ADNr (posiciones 759-2596 de *E. coli*). Las regiones verdes representan los exones. Los intrones son representados en regiones rojas, indicando el tipo y la especie en la parte superior. Los marcos de lectura abierta (ORF), cuando existen, aparecen señalados en azul dentro de cada intrón, indicando el número de aminoácidos de las proteínas hipotéticas. La escala superior representa la longitud de la región en pares de bases.

Los tamaños de los intrones fueron variables, siendo el máximo de 1381 nt y el mínimo de 322 nt, correspondientes al intrón cL2263 de *T. impressa* y cL2449 de *T. anticipata*, respectivamente. La nomenclatura de estos elementos se ajustó a las directrices de Johansen & Haugen (2001). El número y la distribución de los intrones a lo largo del gen fue variable entre las especies, pues se pueden observar siete intrones para *Coccomyxa rayssiae* en contraste con *C. verrucariae*, *D. symbiontica*, *N. normandinae* y *T. gigantea*, que no poseen ninguno. Según estos resultados, la especie *Coccomyxa rayssiae* representaría la región de gen más larga (7099 nt secuenciados) en contraste con los 1908 nt de *Trebouxia gigantea*, cuyo tamaño es el más pequeño

de los organismos estudiados. El género *Coccomyxa* es el que mayor número de intrones presenta, pues 21 de los 38 intrones secuenciados son incluidos en este género. Los géneros *Dictyochloropsis* y *Dilabifilum*, a pesar de contar con pocos representantes, tienen un número de intrones elevado (cuatro) en algunas de sus especies. La presencia/ ausencia y distribución de intrones en el gen 23S ADNr de estas algas no parece depender de si el organismo es de vida libre o fotobionte liquénico. De los cinco organismos de vida libre del estudio, cuatro pertenecen al género *Coccomyxa* y uno a *Dictyochloropsis* y, aunque todos ellos presentan intrones, no podemos establecer que estas características genéticas estén relacionadas con la ecología de estas algas.

La Figura 4.15 muestra los diagramas realizados a partir de los mapas genéticos de las especies. En ellos podemos observar las diferentes longitudes del gen y la relación con los tamaños de intrones y exones. Los mayores tamaños genéticos, relacionados con una mayor presencia de intrones, también están correlacionados con el porcentaje que ocupan estos en el gen. Así, de los 7099 nt secuenciados en *C. rayssiae*, solo 1985 nt pertenecen a exones, representando los intrones más del 70% de la longitud del gen. En las especies que presentan el intrón cL2449 el porcentaje de este sobre la longitud total del gen no suele superar el 20%, a excepción de *C. spec.2*, cuyo tamaño de intrón cL2449 es tres veces superior al de las otras especies que lo contienen. Existe otro grupo de especies que presentan solo un intrón en su interior pero de gran tamaño, correspondiendo a porcentajes entre 30-40%.



**Figura 4.15** Diagramas del gen 23S ADNr de las diferentes especies de algas verdes estudiadas. Se muestran las longitudes relativas de los intrones y exones en relación a la longitud total, así como el porcentaje del gen ocupado por intrones para cada especie.

#### 4.3.2. Caracterización de los intrones de tipo I encontrados en el gen 23S ADNr

Tras elaborar los mapas genéticos y diagramas mostrados en la Figuras 4.14 y 4.15, iniciamos la caracterización exhaustiva de los 38 intrones encontrados en el gen 23S ADNr. En primer lugar, se ordenaron los sitios de inserción y se nombró cada intrón siguiendo la nomenclatura de Johansen & Haugen (2001) (Tabla 4.4). Los 38

intrones están incluidos en 18 sitios de inserción distintos del gen 23S ADNr, algunos de ellos (cL1943 y cL2512) desconocidos hasta la fecha.

**Tabla 4.4** Intrones de tipo I encontrados en el gen 23S ADNr cloroplástico de diferentes especies de algas verdes. La nomenclatura empleada fue la propuesta por Johansen & Haugen (2001).

Organismo	Nombre intrón	Sitio inserción ADNr	Tamaño intrón (nt)
<b><i>Asterochloris</i></b>			
<i>A. magna</i>	Ama.cL2449	2449-2450	406
<i>A. phycobiontica</i>	Aph.cL2449	2449-2450	414
<b><i>Coccomyxa</i></b>			
<i>C. chodatii</i> Jaag	Cch.cL1931	1931-1932	797
	Cch.cL1951	1951-1952	441
	Cch.cL2263	2263-2264	1012
	Cch.cL2449	2449-2450	333
	Cch.cL2500	2500-2501	1064
<i>C. mucigena</i>	Cmu.cL1951	1951-1952	866
<i>C. pringsheimii</i> ( <i>botrydinae</i> )	Cpr.cL2449	2449-2450	378
<i>C. rayssiae</i>	Cra.cL1917	1917-1918	852
	Cra.cL1931	1931-1932	797
	Cra.cL1951	1951-1952	442
	Cra.cL2263	2263-2264	1013
	Cra.cL2449	2449-2450	333
	Cra.cL2500	2500-2501	539
	Cra.cL2596	2596-2597	1138
<i>C. spec.1</i>	Csp1.cL2449	2449-2450	686
<i>C. spec.2</i>	Csp2.cL2449	2449-2450	1185
<i>C. spec.3</i>	Csp3.cL958	958-959	330
	Csp3.cL1255	1255-1256	289
	Csp3.cL1923	1923-1924	666
	Csp3.cL2263	2263-2264	402
	Csp3.cL2449	2449-2450	366
<b><i>Dictyochloropsis</i></b>			
<i>D. irregularis</i>	Dir.cL2596	2596-2597	1053
<i>D. reticulata</i>	Dre.cL1923	1923-1924	896
	Dre.cL1951	1951-1952	842
	Dre.cL2449	2449-2450	332

	Dre.cL2512	2512-2513	971
<b><i>Dilabifilum</i></b>			
<i>D. spec.1</i>	Dsp1.cL2500	2500-2501	1122
<i>D. spec.2</i>	Dsp2.cL1923	1923-1924	990
	Dsp2.cL1931	1931-1932	1050
	Dsp2.cL1943	1943-1944	411
	Dsp2.cL2263	2263-2264	960
<b><i>Trebouxia</i></b>			
<i>T. anticipata</i>	Tan.cL2449	2449-2450	322
<i>T. corticola</i>	Tco.cL2593	2593-2594	1095
<i>T. impressa</i>	Tim.cL2263	2263-2264	1382
	Tim.cL2596	2596-2597	1186
<i>T. pyriformis</i>	Tpy.cL2449	2449-2450	451

En segundo lugar, determinamos que las características de todos los intrones analizados son propias de los de tipo I, como demuestra la presencia de las secuencias canónicas conservadas P, Q, R y S que definen los núcleos de los intrones de los subtipos IA e IB (Cech, 1988; Michel & Westhof, 1990). De los 38 intrones analizados, 22 pertenecen al subtipo IA y 16 al IB. A su vez, dentro del subtipo IA los intrones estudiados pertenecen a dos grupos diferentes: trece a IA1 y nueve a IA3 (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5** Elementos conservados en los intrones de tipo I encontrados en el gen 23S ADNr de diferentes especies de algas verdes. Las secuencias conservadas en los subgrupos de intrones IA e IB se determinaron de acuerdo con Michel & Westhof (1990).

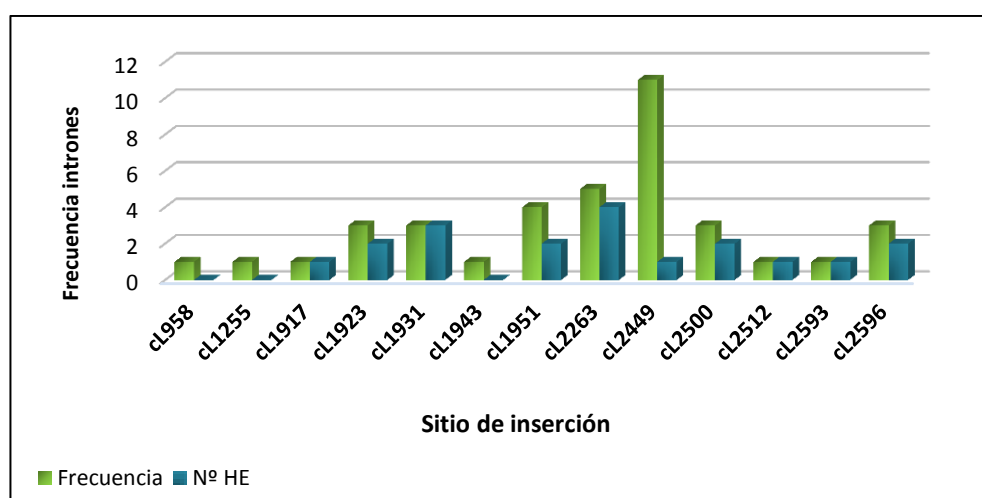
Subtipo	Nombre intrón	P4 (P)	P4' (Q)	P7 (R)	P7' (S)
<b>IA1</b>	Ama.cL2449	UGCAA	UUUGCAGCG	CGUUCAACGACUA	UAGUCU
	Aph.cL2449	UGCAA	UUUGCAGCG	CGUUCAACGACUA	UAGUCU
	Cch.cL2449	UGCAAG	UUUGCAGCG	CGUUCAACGACUA	UAGUCU
	Cpr.cL2449	UGCAAG	UUUGCAGCG	CGUUCAACGACUA	UAGUCU
	Cra.cL2449	UGCAAG	UUUGCAGCG	CGUUCAACGACUA	UAGUCU
	Csp1.cL2449	UGCAAG	UUUGCAGCG	CGUUCAACGACUA	UAGUCU
	Csp2.cL2449	UGCAAG	UUUGCAGCG	CGUUCAACGACUA	UAGUCU
	Csp3.cL958	UGCAAG	CUUGCAGCG	CGUUCAACGACUA	UAGUCU

Resultados

	Csp3.cL1255	UGUAAG	UUUGCAGCC	GGUUCAACGACUA	UAGUCU
	Csp3.cL2449	UGCAAG	GGUUAAGCG	UGUUCAACGACUA	UAGUCU
	Dre.cL2449	UGCAA	UUUGCAGCG	CGUUCAACGACUA	UAGUCU
	Tan.cL2449	UGCAAG	UUUGCAGCG	CGUUCAACGACUA	UAGUCU
	Tpy.cL2449	UGCAA	UUUGCAGCG	CGUUCAACGACUA	UAGUCU
<b>IA3</b>	Cch.cL1951	ACGGUG	UACCGCGGG	CCUGUAACGACUG	UAGUCU
	Cmu.cL1951	ACGGUG	UACCGUGGG	CCGUAACGACUGA	UAGUCU
	Cra.cL1951	ACGGUG	UACCGCGGG	CCUGUAACGACUG	UAGUCU
	Cra.cL2596	ACGGUG	UACCGUGGG	CCCGUAACGACUU	UAGUCU
	Dir.cL2596	ACGGUG	UACCGUGGG	CCCGUAACGACUU	UAGUCU
	Dre.cL1951	ACGGUG	UACCGUGGG	CCUGUAACGACUG	UAGUCU
	Dre.cL2512	ACGGUG	UACCGUGCG	CGUGUAACGACUG	UAGUCU
	Tco.cL2593	UCGGUG	UACCGAGGG	CCUGUAGAGACUU	UAGUCU
	Tim.cL2596	ACGGUG	UACCGUGGG	CCCGUAACGACUU	UAGUCU
	<b>IB4</b>	Cch.cL1931	CGCUAG	UCAGCAGGG	CCCUCAGAGACUA
Cch.cL2263		UGCUGG	UCAGCAGGG	CCCUCAACGACUA	UUGUCA
Cch.cL2500		UGCUGG	UCAGCAGGG	CCCUCAACGACUA	UAGUCU
Cra.cL1917		UGCUGG	UCAGCAGGA	UCCUCAGAGACUA	UAGUCC
Cra.cL1931		UGCUGG	UCAGCAGGG	CCCUCAGAGACUA	AGUCCA
Cra.cL2263		UGCUGG	UCAGCAGGG	CCCUCAACGACUA	UUGUCA
Cra.cL2500		UGCUGG	UCAGCAGGG	CCCUCAACGACUA	UAGUCU
Csp3.cL1923		UGCUGG	CAAGUAGGU	UCCUCAGAGACUA	UAGUCC
Csp3.cL2263		UGCUGG	UCAGCAGGG	CCCUCAACGACUA	UAGUCU
Dre.cL1923		UGCUGG	UCAGCAGGA	UCCUCAGAGACUA	UAGUCC
Dsp1.cL2500		UGCUGG	UCAGCAGGG	CCCUCAACGACCA	UAGUCU
Dsp2.cL1923		UCUAGG	CGAGCAGGU	GGAUGUUCGGCUA	GAGUCC
Dsp2.cL1931		UGCUGA	CUUUGAGUA	GCUCAAUGAUUA	GAGUCC
Dsp2.cL1943		UGCUGG	UCAGCAGGG	CCCUCAACGACUA	UAGUCU
Dsp2.cL2263		UGCUGG	UCAGCAGGG	CCCUCAACGACUA	UAGUCU
Tim.cL2263		UGCUGG	UCAGCAGGG	CCCUCAACGACUA	UAGUCU

Finalmente, analizamos la frecuencia de los intrones respecto de su sitio de inserción en el gen 23S ADNr, así como la presencia de *Homing* Endonucleasas (HE) en aquellos que las contienen (Figura 4.16). El sitio de inserción más frecuente es el cL2449, existiendo once especies que lo presentan. cL2263 y cL1951 están presentes en cinco y cuatro especies, respectivamente. El resto de sitios son menos frecuentes que los anteriormente descritos, contando con tres especies y en ocasiones tan sólo un organismo que los contiene.

En cuanto a las HEs, el sitio cL2449, a pesar de ser el más frecuente, sólo presenta un organismo con región codificante para una hipotética proteína. Intrones ubicados en sitios menos frecuentes presentan sin embargo HEs en todos los organismos que lo presentan, como el caso del cL1917, cL1931, cL2512 y cL2593.



**Figura 4.16** Frecuencia de intrones de tipo I respecto del sitio de inserción en el gen 23S ADNr. El eje de abscisas representa los diferentes sitios de inserción. Las columnas verdes representan la frecuencia de cada intrón. Las columnas azules indican el número de HEs presentes en cada sitio de inserción.

#### 4.4. HOMING ENDONUCLEASAS (HEs) CODIFICADAS EN INTRONES DE TIPO I DE ALGAS LIQUÉNICAS

La secuenciación de los 38 intrones encontrados en el gen 23S ADNr de las diferentes algas dio como resultado el hallazgo de 19 marcos de lectura abierta (*Open Reading Frames*, ORF) que codifican para putativas *Homing* Endonucleasas de la familia LAGLIDADG. Como se muestra en la Tabla 4.6, los géneros *Coccomyxa*, *Dictyochloropsis*, *Dilabifilum* y *Trebouxia* son los que presentan este tipo de enzimas, contenidas en intrones insertos en diez posiciones diferentes a lo largo del gen. Los tamaños de estas proteínas son variables, oscilando entre 152 y 267 aminoácidos (aa). Las de menor tamaño corresponden a I-Cchl e I-Crall, contenidas en intrones cL1931. Es también esta inserción la que contiene la HE de mayor tamaño, correspondiente a I-Dsp2III.

Todas las HEs encontradas pertenecen a la familia LAGLIDADG, ya que contienen al menos una copia de este motivo característico. A su vez la familia LAGLIDADG se subclasifica teniendo en cuenta el número de motivos LAGLIDADG: la familia 1 contiene un solo motivo mientras que la familia 2 contiene dos. Para llevar a cabo estos análisis utilizamos las aplicaciones bioinformáticas Pfam v21.10 (Finn *et al.*, 2006), Blast (Altschul *et al.*, 1997) y MOTIF Search (<http://www.genome.jp/tools/motif/>). Se identificaron nueve HEs de la familia 1 y diez de la familia 2. Cabe señalar que los motivos encontrados no presentan la secuencia original que da nombre a esta familia, pues en la mayoría de los casos se producen degeneraciones en las proteínas. Los nombres propuestos para las HEs han sido adaptados de los convenios de nomenclatura correspondientes a estas enzimas (Belfort & Roberts, 1997).



**Tabla 4.6** Homing endonucleasas encontradas en las diferentes algas estudiadas. Se indica el intrón donde se encuentran codificadas las enzimas, el tamaño en aminoácidos (aa) de las proteínas resultantes así como la familia LAGLIDADG a la que pertenecen. Los nombres propuestos se basan en la nomenclatura de Belfort & Roberts (1997). Los motivos LAGLIDADG aparecen señalados en rojo en cada proteína.

Nombre intrón	Nombre HE	Tamaño HE (aa)	Secuencia aa	Familia LAGLIDADG
<i>Coccomyxa</i>				
Cch.cL1931	I-CchI	152	MNLDPQ <b>WIVGFVDGEGCFF</b> VGINRQPAMKVGQVLPFVQVHVRDVQLLHALKARFGCGSVIRNHGDR WAYRARGQANLMNKILPFEKHKLKSRKRQEFESFRRVVLMIEEKKHLTINGLEEVRTIVGRMNNARPWDLQP NNPKIESSPG	1
Cch.cL2263	I-CchII	215	MPRQSTKVSITRQKQKEILL <b>GILLGDAHIEVS</b> PNGKSARLKIEQASKKRQDYVEHLHKVFSWSPGNIVAATDSNNI KFSTAFFTSILFYHSAFYGDESARKVPRWIEHS <b>FTARSLAYLIMDDG</b> GTKSKESKAIYINVYGLPRREQESLCGILVR KFGQLQAKVVKDRQYCRIFISGYSYEDLVALIDPYILPSLRYKIPPRTRGVSKSRDNNLDETT	2
Cch.cL2500	I-CchIII	215	MAQKLTLEQREVLV <b>GILLGDANLQTE</b> SNGRTRYRLRVQAEQNKYLFALYELFKPLVNTPPKLYTYPDKRTNNI SERWAFATTQHGCFRFYGKQFYVDGKKRVPLIEKW <b>LTPRSLAYWYMDG</b> GAQKWKGRSLGVVLCDFGFGSD EVYKLAAILTTKYNLKTSVQVKGNLRLYISTTSYSLKRLIYPHLLPSMLYKFPVQVATTPSDEGAQV	2
Cmu.cL1951	I-Cmul	183	MKKVYNQFIVRSNTLALSSSKYSMEEAKDFPS <b>WVSGFTDGEFCF</b> LISFNENGRFTCKLEVRPFSIGQAKYRSSY QSQTHILERINSYFKCGFIRKDRRDGMMKYEVRTLKDLCDIIPHFEKYPLLTQKVEDFNKFEVCLIMRSNHR NKEGLRKIVDIACDMNPSGKRKISKEDLLKIIS	1
Cra.cL1917	I-CraI	171	MRNKATHIDQVPSDKGHY <b>IAGFVDGEGSF</b> YVSARVRKDYPKWKFGFLHFVNSNNDLAVLQVCKRYLGCQVIR ESRPGFYTLEVQDRSVLKRFPFFRRYGFSLNKKRAEFRIFQEALIALDEGIRTKSQLEHFLQLRSKLNARFRQTRV VNTDEVVHKTFVFSRESSETIR	1
Cra.cL1931	I-CraII	152	MNLDPQ <b>WIVGFVDGEGCFF</b> VGINRQPAMKVGQVLPFVQVHVRDVQLLHALKARFGCGSVIRNHGDR WAYRARGQTNLMNKILPFEKHKLKSRKRQEFESFRRVVLMIEEKKHLTINGLEEVRTVVGRMNNARPWDLQ PNNPKIESSPG	1
Cra.cL2263	I-CraIII	215	MPRQSIKVSITRQKQKEILL <b>GILLGDAHIEVS</b> PNGKSARLKIEQASKKRQDYVEHLHKVFSWSPGNIVAATNSNNI KFSTAFFTSILFYHSAFYGDESARKVPRWIEHS <b>FTARSLAYLIMDDG</b> GTKSKESKAIYINVYGLPRREQESLCGILVR KFGQLQAKVVKDRQYCRIFISGYSYEDLVALIDPYILPSLRYKIPPRTRGVSKSRDNNLDETT	2

Resultados

Cra.cL2596	I-CraIV	239	MILPYNLPEIAFYLEVPIKPRFGSLSSDAHFATLTGSRKPVINPTPYQKSVAV <b>G</b> TILGDSYFTSRKYLQVEHSTQQA SYVEWKHSVFTNVAGKISDVSrvHPKTGVDSTSKRFYTNKSFQDLEPLFYKTEGGERRKVIPPgIGDL <b>LDPVSLA</b> <b>TWYMDDG</b> GKAQNTPKGAYINVSSSFSEPKRELLRDSVNTVFGLKTRLHKAGGNNQWNIYVPAESYDKFKEIVS PTVSQVPGMLYKIEG	2
Csp2.cL2449	I-Cspl	197	MLGDASLQTQSSGKSWRLKHQMSARSSDYAERLCSVFGKDWIPKEPHAIERTNSQMLGFQTLTSENLNQIAD LFMEKQENGRYQKVYKPLITKH <b>V</b> TDEALAYWF <b>MDDG</b> GKGDFTPNEGKQIHHTQGfTEKEVREMCKELNE KfGLNTWAKPNKGAHLIAISGDSYERF <b>L</b> VDPYLVDS <b>MRRKL</b> PSErKTKGRKS	2
<b>Dictyochloropsis</b>				
Dir.cL2596	I-DirI	208	MDKLTPTDYQRS <b>I</b> VVGLLL <b>G</b> DGYMYKDGRLQVEQSLAHQEYVVWLHNQLLNLTSGPIGQAERTHPKTEKKS SCRfYTKKIFADLESIFYTQfYTVGEGKRKKVVPKNLEQL <b>LNPIVLAIWFMD</b> DGGKSQSTVKAAYINATSFSP QEQKEAFLHVfQLNIKHKAGGNNQYNFYIPASYSLfYDIVSPIMRNVPSMTYKLSIYP	2
Dre.cL1923	I-Drel	216	MVIYCNpGekLPDSIIeQLGIANANRRKNDfLWYIRQLTDIFQIEEYNTVTEEEKL <b>FFGGFITGEGS</b> INVSAKKDN GAKFGIVIDPEFSITQHINGVLLFLAFRSFKTGLSRKSGSNATLVYRIDNRDSLNEKVIPfYEKYCSPFWSSAFQ DRLVTFKELLQLfQEKAhLNLSDfSEKVLVLWDKMRKQRTQINASfSSLEEAQTYAKNYRKLp	1
Dre.cL1951	I-Drell	155	MNLHIS <b>S</b> WITGFVD <b>GEGCF</b> SVSfSKREKVKTGIEVRPsfSVSQLAPSRKsLELINNAFGVGGIRYsKKDNCYKYEV RSSKDLRNvVIPHfHKYPLQTTKKNDFLkELKVLdLVKRnhHLNIDGMKSIIDIVfNDGNLPTNRSYTKEQLLKL LKS	1
Dre.cL2512	I-DrellI	219	MLTQEQDEIII <b>G</b> AMLGDASAEYNSACRIRFDHSIKQEDYVRWLAKKLEPYSGLVTSYGDpDKRTNKTYSKIRfY TKTNDIFTKYRNMFYTDpTRGPKDTPNNIKDLI <b>SKKLTLVWVYL</b> DDGSKRTYSNAYRLHVECFPSSVVNQLRC ALRTHYGIESKPHSHKNISTESVEKELIDPENEGfIIHIGSRyDNAKkLNAAIKDYVALEIPsMLfKfF	2
<b>Dilabifilum</b>				
Dsp1.cL2500	I-Dsp1I	255	MKEfILKMKEfRIQNEKPSLNFVDMfNSRVKSRGLRGAKLIAYKQNLALTEQqKEVII <b>GKLLGDASIRTS</b> QCnFC VKfEQKYTQIDYIIHLYEIfEPYVGTGPKMRVIQNTfHRDYGVSCWfRTYSHIDfKYENRFYQTDAGKRRKVV PQNIHQML <b>TPRALAYWFMD</b> DGSYIFTSASKGQKSGLCCCLNTQGfTYSEQVKVLIKALKQTFDLdVNRVKDRN YYRLVIQTQSENAfKQLIEPFILPSLQYKLKKN	2
Dsp2.cL1923	I-Dsp2I	228	MKINKKAIGSDfVYLNPGQSVSEfLVQLKINQDYSQTKKfLKYCRDIESLFLSPVTkKTTQCHf <b>FLAGFLEGA</b> <b>G</b> CCLNIGAKKNTTSRfKLYLDPEfNLtQHINGISNLYLAMCLfQTGRIRfKSGSLATfVYtIDNRLSLEQKVIPfYEN YVILYGCsAKKRLAVfKLLQLfKEKAHLdLDMVYEILPLWDQLRMQKSSNQTFKnlKQAQYIKQSIQKNDL	1

Dsp2.cL1931	I-Dsp2II	267	MKLTAE <b>WIVGFVDGDGHF</b> GISQTLNDRFSFIVSQDQRSVHVLYELKTFQCGSVHKAGKNMCEYKVSARKQ LIEIIPFFEQHALKTEKRKTFEYMAQNCLNSMESKRQLNINTVDDKLTLD <b>WLIGFIDAEGSF</b> VCSLVNNQFIAQ MIIGLDPKDSRILDKIDFLGYGVRYAKTGTVEVQLSAQKDKYHFINTYVLTGKSKDRLRTHKRIGARKWSKLILFL QTDQHKTQLGWNKAYKKYLNFKKALQTGFLVEDRVRPALEEAE	1
Dsp2.cL2263	I-Dsp2III	202	MKNNKIRLSVKQKEVVY <b>GTLLDGWLETA</b> TNGRTYRFGFKQKHSQKDYVHSIYHIFDNLGSPAIPNGTDIQF KTLTLPFRFYGHQFYGKNHVKKVPKLIHRW <b>LTPRALAYWYMDDG</b> YKHTSGCYLYTNGFEKADVQRLCIALQ NRFQFDCGIRTKSVNGQSQWFIYITSKSFKSFIVQPYIISSMRYKLYTRRIKNNK	2
<b>Trebouxia</b>				
Tco.cL2593	I-TcoI	184	MNKILNLSEEEKAY <b>IGGFLDGDG</b> SLNVQIVRRKRHIVRTKDIVKRRTGQRVYGYLTRFDYRFNFQIIISLTFQKR STHWFILWLHKKLQSGEIRKKVNGGSQYTIDGPQNVEKVLQVKPYLKIKRKQVILTLEILKNKSKSYDHNSFLKC CQLVDNIAALNDSKKRKINSAVVRSDLDFFA	1
Tim.cL2263	I-TimI	228	MEKKIKLSLLQKEVLF <b>GVILGDAHLETQ</b> NNRITYRVKFEQSIKHTAYIEHLYNIFKDYVKTTPQLKLVKYKTKEQTP DKTSGFVKGVEKGLICEKQTTNIRFTTSSNTFTFFGKQFYKEKKVIPKLIHRW <b>LTPRALAYWYMDDG</b> SMKSL QSKGVLLNTQSFSHAEVKLLCNVLTKKFNLCWPRRQKNNQYQIYISGKSYETLQNCIYDFIIPEMRYKFPLPRKT R	2

#### 4.4.1. Caracterización físico-química

Una vez conocida la secuencia de aminoácidos de las 19 HEs encontradas en los intrones del gen 23S ADN<sub>r</sub>, nos propusimos estimar algunas de las principales características físico-químicas de las mismas haciendo uso de la aplicación bioinformática ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005; <http://web.expasy.org/protparam/>). Esta herramienta analiza la secuencia de aminoácidos introducida, prediciendo una serie de parámetros sobre la misma. Estos parámetros incluyen el peso molecular, punto isoeléctrico teórico, composición de aminoácidos, índice alifático e índice de hidropaticidad GRAVY (Tabla 4.7).

Las HEs encontradas tienen tamaños comprendidos entre los 17-31 KDa y sus puntos isoeléctricos entre 8-10. El índice alifático, factor positivo para incrementar la termoestabilidad de las proteínas globulares, presenta tres grupos de valores: (i) alrededor de 60 (I-Cspl); (ii) 70-80 (I-Cmul, I-Cral, I-CralV, I-Drell, IDsp1-I y I-Dsp2III) y (iii) 80-95 (I-Cchl, I-CchII, I-CchIII, I-Crall, I-CrallI, I-DirI, I-Drel, I-Drell, I-Dsp2I, I-Dsp2II, I-Tcol y I-TimI). En general, todas las proteínas tienen un alto porcentaje relativo de aminoácidos cargados positivamente a pH neutro, lo cual es consistente con su unión al ADN, molécula cargada negativamente. Los valores del índice GRAVY obtenidos presentan valores negativos, indicando que las proteínas son hidrofílicas, lo que es consistente con la naturaleza de estas enzimas.

**Tabla 4.7** Propiedades físico-químicas de las HEs codificadas en el interior de intrones insertados en el gen 23S ADNr de las diferentes algas estudiadas.

Nombre intrón	Nombre HE	Tamaño HE (aá)	Pm	pl	aá (-)	aá (+)	Índice (GRAVY)	Índice alifático	Familia LAGLIDADG
Cra.cL1917	I-Cral	171	20.0	10.00	18	30	-0.435	79.71	1
Dre.cL1923	I-Drel	216	25.0	8.40	26	28	-0.356	85.32	1
Dsp2.cL1923	I-Dsp2I	228	26.5	9.72	17	36	-0.266	92.81	1
Cch.cL1931	I-Cchl	152	17.6	10.08	15	24	-0.400	84.54	1
Cra.cL1931	I-CralI	152	17.6	10.08	15	24	-0.418	83.22	1
Dsp2.cL1931	I-Dsp2II	267	31.0	9.37	30	41	-0.375	85.81	1
Cmu.cL1951	I-Cmul	183	21.4	9.42	22	33	-0.534	74.54	1
Dre.cL1951	I-Drell	155	17.7	9.75	15	26	-0.446	89.16	1
Cch.cL2263	I-CchlII	215	24.5	9.55	23	33	-0.418	87.07	2
Cra.cL2263	I-CralII	215	24.5	9.63	22	33	-0.394	88.88	2
Dsp2.cL2263	I-Dsp2III	202	23.9	9.88	11	33	-0.508	69.95	2
Tim.cL2263	I-TimI	228	27.1	9.86	18	41	-0.531	81.18	2
Csp2.cL2449	I-Cspl	197	22.6	8.95	27	31	-0.875	61.42	2
Cch.cL2500	I-CchlIII	215	24.6	9.55	18	29	-0.367	86.14	2
Dsp1.cL2500	I-Dsp1I	255	30.2	9.61	23	41	-0.493	78.35	2
Dre.cL2512	I-DrellII	219	25.4	8.91	28	33	-0.602	77.03	2
Tco.cL2593	I-Tcol	184	21.6	10.06	17	36	-0.487	95.27	1
Cra.cL2596	I-CraIV	239	26.7	9.27	23	29	-0.432	76.19	2
Dir.cL2596	I-DirI	208	24.0	8.94	19	23	-0.361	84.81	2

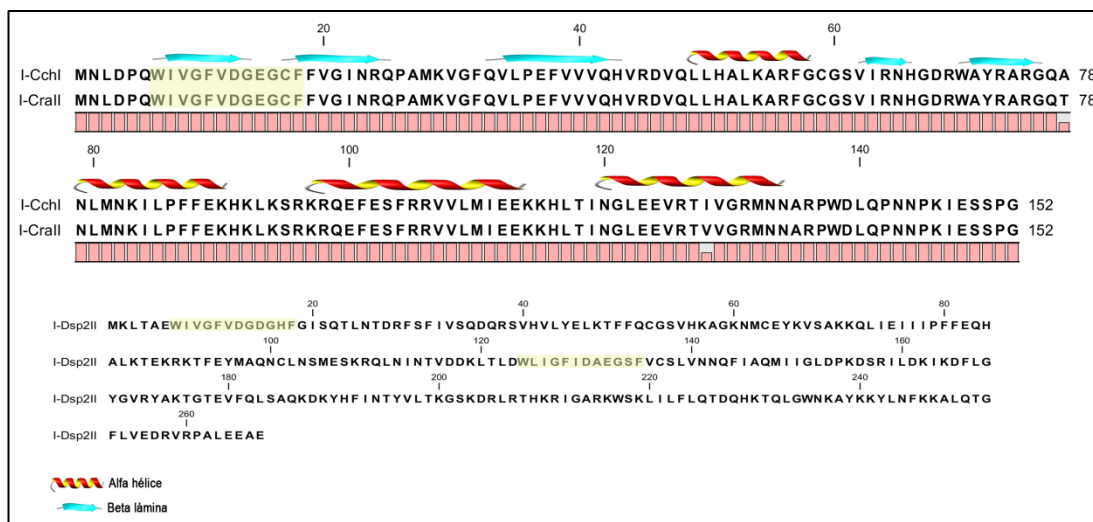
aá: aminoácidos; Pm: peso molecular; pl: punto isoeléctrico teórico; aá (-): número de aminoácidos cargados negativamente; aá (+): número de aminoácidos cargados positivamente. Las propiedades fueron predecidas mediante ProtParam (Gasteiger *et al.*, 2005).

#### 4.4.2. Estructuras secundarias hipotéticas

El uso de la herramienta bioinformática PROSECSC (<http://www.scfbio.iitd.res.in/software/proteomics/secstr/index.jsp>) permitió realizar una primera aproximación acerca de las estructuras secundarias que podrían presentar las HEs halladas en el estudio. El objetivo de esta aproximación fue conocer si alguna de las

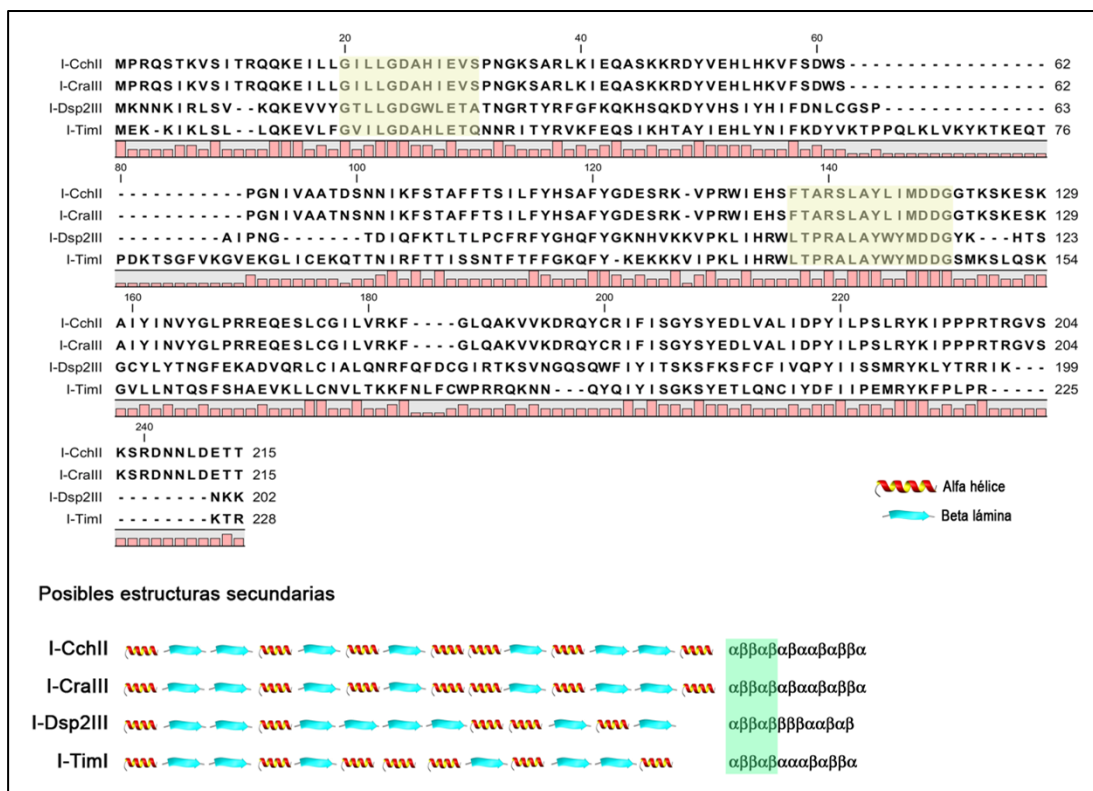
HEs presenta los dos pliegues característicos  $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ , que se han demostrado ser determinantes para que las enzimas sean activas (Arnould *et al.*, 2006). De esta manera, si encontráramos entre nuestras HEs estos dominios, podríamos señalarlas como interesantes para nuevos estudios sobre aplicabilidad biotecnológica. Puesto que las diferentes estructuras obtenidas no dejan de ser aproximaciones hipotéticas sobre estas proteínas, tan sólo se mostrarán las comparativas realizadas para los intrones cL1931 y cL2263, ya que son los dos tipos que más HEs presentan en este estudio (tres y cuatro, respectivamente), perteneciendo además a familias diferentes de LAGLIDADG.

Las HEs presentes en los intrones cL1931 pertenecen a la familia LAGLIDADG 1, presentando una copia de este motivo en su interior. La Figura 4.17 muestra el alineamiento de las HEs de las especies *Coccomyxa chodatii* (I-Cchl) y *Coccomyxa rayssiae* (I-Crall), ambas codificadas en intrones cL1931. Como puede observarse, ambas proteínas presentan una secuencia idéntica a excepción de un cambio de aminoácido en la posición 128. Los motivos LAGLIDADG quedan marcados sobre fondo amarillo. Las estructuras secundarias hipotéticas de ambas proteínas se muestran sobre la secuencia de aminoácidos, representándose mediante esquemas de hélices alfa y láminas beta. En la parte inferior de la figura se muestra la secuencia de aminoácidos de la HE hallada en el intrón cL1931 de la especie *Dilabifilum spec.2.* (I-Dsp2II). Aunque la proteína pertenece a la familia LAGLIDADG 1 se han identificado dos motivos LAGLIDADG en la secuencia, lo que será objeto de discusión en apartados posteriores. El primer motivo LAGLIDADG es muy similar al hallado en las HEs representadas en la parte superior, comenzando en el aminoácido 7 en las tres proteínas.



**Figura 4.17** Alineamiento de las secuencias de las HEs halladas en los intrones cL1931 y pertenecientes a la familia LAGLIDADG 1: I-Cchl, I-Crall y I-Dsp2II. Los dominios LAGLIDADG figuran resaltados en amarillo. Los residuos de aminoácidos con conformación hélice alfa o lámina beta se indican mediante el símbolo correspondiente. Las columnas rosas indican la conservación entre aminoácidos.

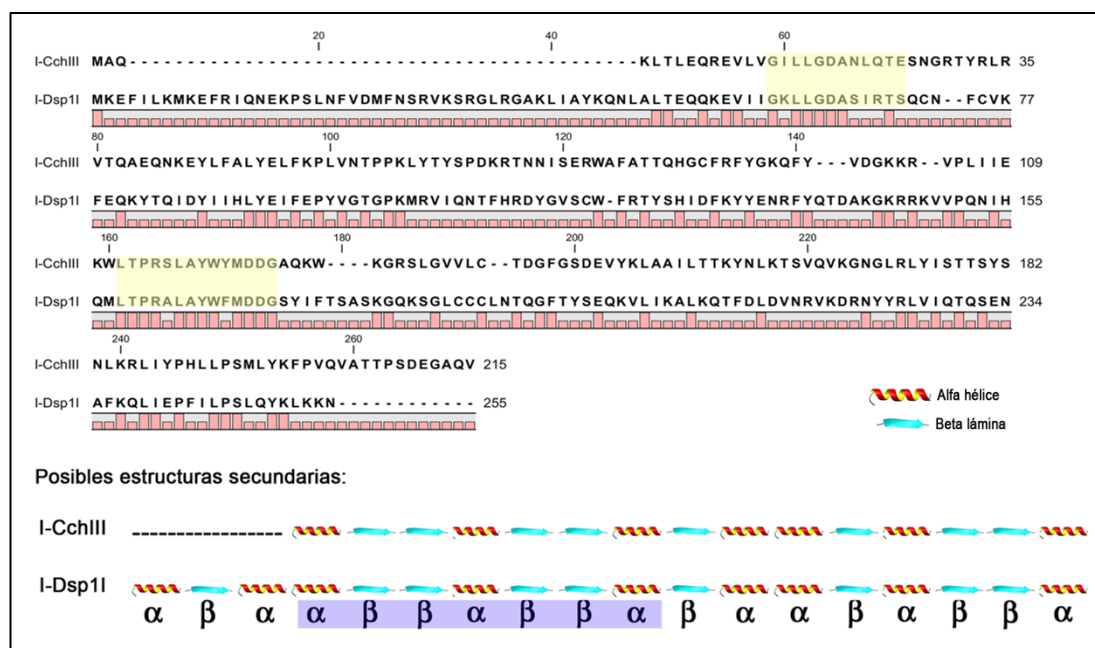
Las HEs presentes en los intrones cL2263 pertenecen a la familia LAGLIDADG 2, hallándose en su secuencia dos copias de este motivo. La Figura 4.18 muestra el alineamiento de las cuatro HEs halladas en el intrón cL2263, pertenecientes a las especies *Coccomyxa chodatii* (I-CchlII), *Coccomyxa rayssiae* (I-CrallII), *Dilabifilum spec.2* (I-Dsp2III) y *Trebouxia impressa* (I-TimI). Los dominios LAGLIDADG aparecen señalados en amarillo y se sitúan en las mismas posiciones en todas las proteínas. La representación hipotética de las estructuras secundarias de estas proteínas es diferente, solamente tienen en común el inicio con estructura  $\alpha\beta\beta\alpha\beta$  que se señala en verde. Al igual que para el caso de la inserción cL1931, las HEs halladas en *C. chodatii* (I-CchlII) y *C. rayssiae* (I-CrallII) son idénticas en longitud y secuencia, a excepción de dos aminoácidos situados en las posiciones 6 y 71.



**Figura 4.18** Alineamiento de las secuencias de las HEs halladas en los intrones cL2263 y pertenecientes a la familia LAGLIDADG 2: I-CchII, I-CraIII, I-Dsp2III y I-TimI. Los dominios LAGLIDADG figuran resaltados en amarillo. Los residuos de aminoácidos con conformación hélice alfa o lámina beta se indican mediante el símbolo correspondiente. Las columnas rosas indican la conservación entre aminoácidos.

Según puede observarse en las figuras representadas anteriormente, no se ha encontrado ninguna HE que presente los pliegues característicos  $\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$ , por lo que ampliamos el estudio de las estructuras secundarias al resto de enzimas encontradas en las diferentes especies. Únicamente se ha identificado una región que conserva dicha estructura en el intrón cL2500. Dos especies de algas contienen HEs para esta inserción: *Coccomyxa chodatii* (I-CchIII) y *Dilabifilum spec.1* (I-Dsp1I). La Figura 4.19 representa el alineamiento de estas dos enzimas, mostrándose en amarillo los dominios alineados LAGLIDADG. La secuencia de ambas proteínas, aun siendo distinta, genera las mismas estructuras secundarias hipotéticas (algo mayor en I-Dsp1I). Como se puede observar, ambas enzimas contendrían uno de los pliegues característicos  $\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$  (señalado en azul), faltando el otro pliegue determinante para la actividad de estas proteínas.

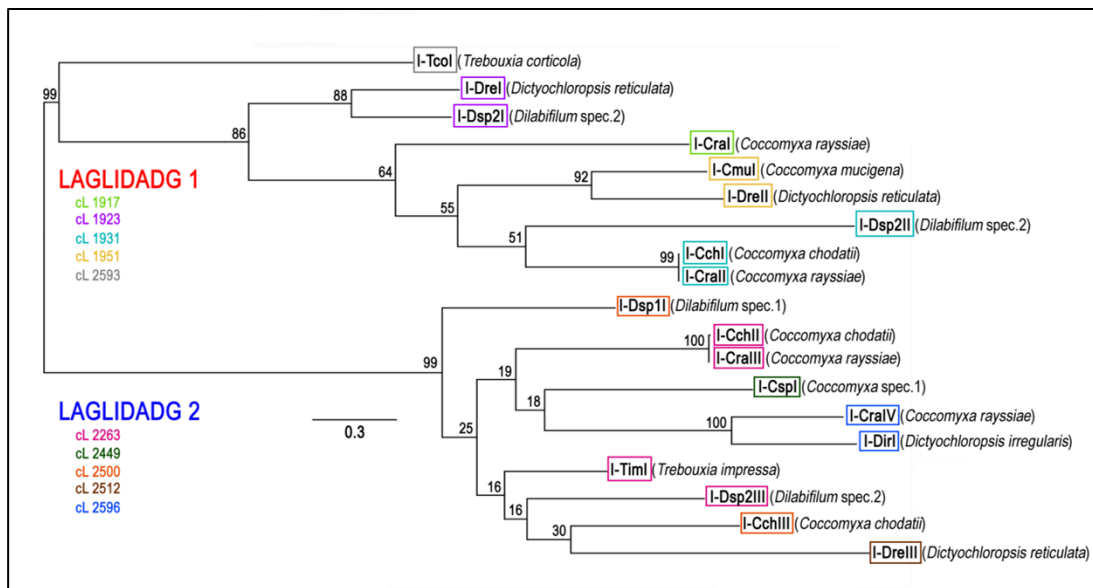




**Figura 4.19** Alineamiento de las secuencias de las HEs halladas en los intrones cL2500 y pertenecientes a la familia LAGLIDADG 2: I-CchIII y I-Dsp1I. Los dominios LAGLIDADG figuran resaltados en amarillo. Los residuos de aminoácidos con conformación hélice alfa o lámina beta se indican mediante el símbolo correspondiente. El pliegue característico  $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$  queda señalado en color azul. Las columnas rosas indican la conservación entre aminoácidos.

#### 4.4.3. Relaciones filogenéticas

Inicialmente, realizamos un análisis filogenético en el que sólo se incluyeron las secuencias de aminoácidos de las 19 HEs halladas en el estudio, con el objetivo de conocer cuán parecidas son estas proteínas en los diferentes géneros de microalgas estudiados. Se realizaron alineamientos de secuencias de aminoácidos de las mismas teniendo en cuenta las familias a las que pertenecían, agrupándose por un lado las LAGLIDADG 1 y por otro lado las LAGLIDADG 2. Los alineamientos fueron realizados utilizando el programa Muscle 2.6 (Edgar, 2004) implementado en el software SeaView v4 (Gouy *et al.*, 2010). Para realizar el árbol filogenético (Figura 4.20) se siguió un aproximación de máxima verosimilitud (ML) empleando el programa PhyML v3.0 (Guindon *et al.*, 2010). El modelo de sustitución de aminoácidos fue determinado mediante el programa Prottest v3.3 (Abascal *et al.*, 2005), tras lo que se seleccionó el modelo VT. Los valores representados corresponden a las probabilidades inferidas mediante máxima verosimilitud, con valores de bootstrap de 100 réplicas (Felsenstein, 1985). La escala indica el número de sustituciones/sitio.



**Figura 4.20** Relaciones filogenéticas de las 19 HEs halladas en el interior de intrones de tipo I del gen 23S ADNr. Las HEs aparecen señaladas en el color correspondiente a cada intrón que las contiene. Los números de los nodos indican los valores de bootstrap. La escala indica el número de sustituciones/sitio.

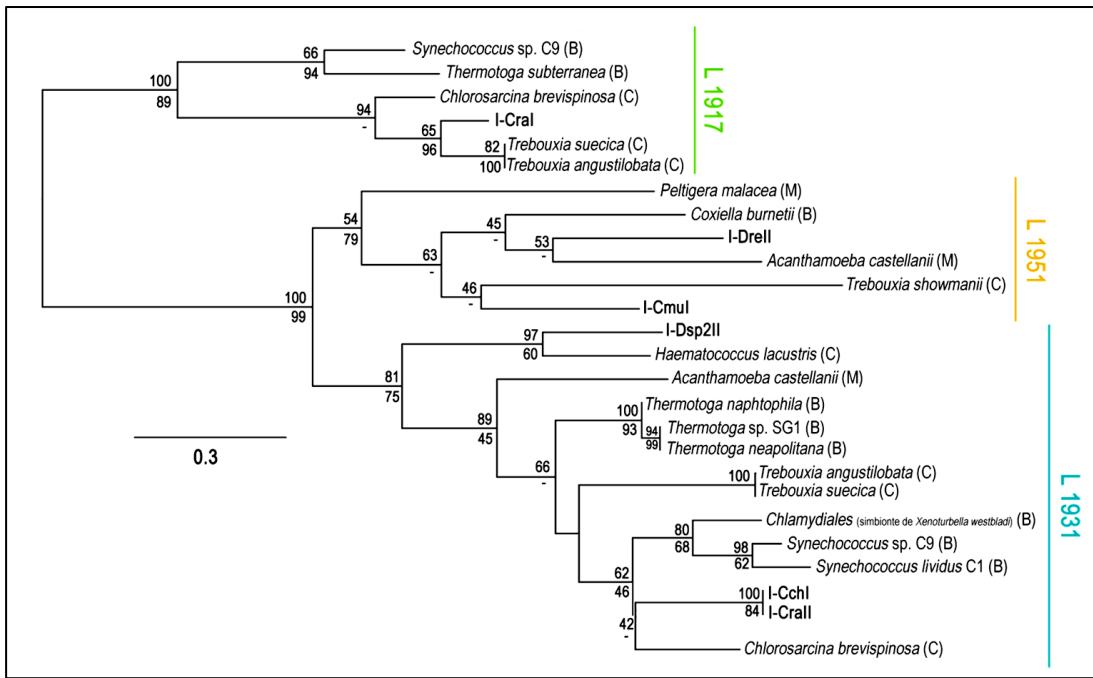
Tal y como se observa en la figura representada en la parte superior, las HEs quedan divididas en dos clados claramente diferenciados y con altos valores de soporte, correspondientes a las familias LAGLIDADG 1 y 2. Las relaciones filogenéticas de las HEs pertenecientes a la familia 1 presentan valores soporte aceptables y muy superiores a los de la familia 2, observándose que las ramificaciones obtenidas corresponden a los diferentes tipos de intrones que las contienen (cL1917, cL1923, cL1931, cL1951 y cL2593). Cabe destacar en esta familia la similitud entre HEs halladas en los intrones cL1923 y cL1951 y que corresponden a géneros distintos de algas (*Dictyochloropsis* y *Dilabifilum* para cL1923; *Coccomyxa* y *Dictyochloropsis* para cL1951). Para la familia 2, la filogenia no queda bien resuelta, mostrando valores soporte muy inferiores a 50. Sólo en el caso de los intrones cL2596 se observa una alta homología entre HEs pertenecientes a géneros diferentes (*Coccomyxa* y *Dictyochloropsis*). La relación filogenética de los intrones no muestra ramificaciones claras de los mismos, sino que aparecen dispersos a lo largo de los diferentes nodos. Se debe tener en cuenta que esta filogenia generada en la Figura 4.20 es resultado del alineamiento de las 19 HEs encontradas y que difícilmente pueden mejorarse los valores soporte de las ramas si no se incluyen más proteínas homólogas encontradas

en otros organismos. Aun así, los datos obtenidos son interesantes pues ponen de manifiesto como este tipo de enzimas presentan homología significativa aun estando contenidas en organismos pertenecientes a géneros distintos.

#### **4.4.3.1. Análisis filogenéticos de las HEs presentes en intrones L1917, L1931 y L1951**

Con el objeto de estudiar las relaciones filogenéticas entre las HEs secuenciadas experimentalmente en este trabajo con las de otros organismos, realizamos búsquedas en la base de datos del NCBI con la herramienta bioinformática BLAST (Altschul *et al.*, 1990). Por una parte, se estudiaron las HEs presentes en intrones insertos en las posiciones L1917, L1931 y L1951. Por otra parte, se estudiaron las HEs presentes en intrones insertos en las posiciones L2263 y L2512.

Las HEs encontradas homólogas a la HEs presentes en intrones insertos en las posiciones L1917, L1931 y L1951 de nuestro estudio, pertenecen a organismos filogenéticamente distantes, incluyendo procariotas, cloroplastos de algas verdes y la mitocondria del ameboide protista *Acanthamoeba castellanii*. Se seleccionaron 27 taxones y se alinearon 97 caracteres para construir el árbol filogenético de la Figura 4.21 utilizando los mismos programas citados en el apartado anterior. Se realizó una aproximación de máxima verosimilitud (ML) con el programa PhyML v3.0 (Guindon *et al.*, 2010). El modelo de sustitución de aminoácidos fue Blosum 62, determinado mediante el programa Prottest v3.3 (Abascal *et al.*, 2005). Los valores representados en el árbol (de arriba a abajo) corresponden a las probabilidades inferidas mediante análisis de máxima verosimilitud (establecida mediante valores de bootstrap de 100 réplicas (Felsenstein, 1985) y Máxima Parsimonia (MP) (Swofford, 2003). Se indican únicamente los valores de soporte superiores a 40. La escala indica el número de sustituciones/sitio. El índice de consistencia (IC) del árbol fue de 0.68.



**Figura 4.21** Relaciones filogenéticas de las HEs presentes en los intrones L1917, L1931 y L1951. B: intrón bacteriano; C: intrón cloroplástico; M: intrón mitocondrial.

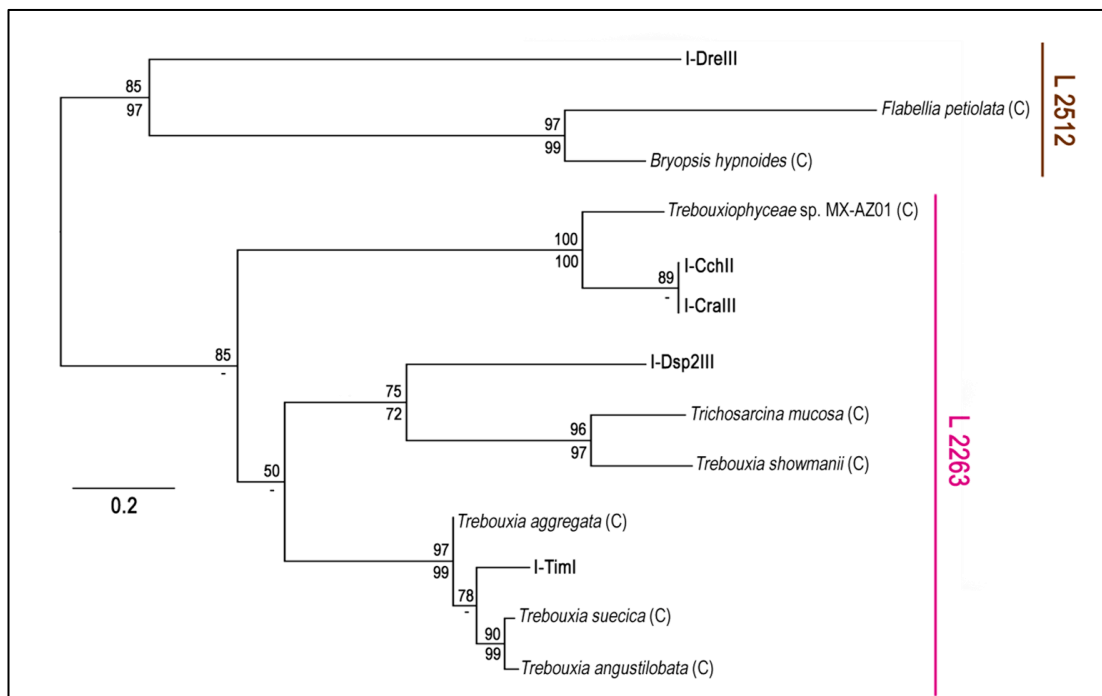
La filogenia inferida indica que las HEs presentes en los intrones cL1917, cL1931 y cL1951 son homólogas a otras HEs presentes en esas mismas posiciones pero pertenecientes a organismos filogenéticamente distantes como bacterias, mitocondria de *Acanthamoeba castellanii* y cloroplastos de otras algas verdes. Pueden distinguirse dos clados principales: uno de ellos engloba HEs de intrones L1917 y el otro HEs de intrones L1931 y L1951. La topología de este árbol presenta elevados valores de soporte y es consistente con la obtenida en la Figura 4.20.

Para las HEs de intrones L1917, la HE hallada en nuestro estudio pertenece a *C. rayssiae* (I-Cral) y es homóloga a HEs de algas verdes. Para las HEs de intrones L1931 los resultados son consistentes con los obtenidos en la Figura 4.20. Por un lado se agrupan las HEs de *C. chodatii* y *C. rayssiae*, que comparten homología con la HE del alga *Chlorosarcina brevispinosa*. Sin embargo la HE perteneciente a *Dilabifilum spec.2* (I-Dsp2II) no se encuentra filogenéticamente próxima a las halladas en el género *Coccomyxa*, pues se divide en otra rama junto con la especie *Haematococcus lacustris*. Las ramas de las HEs presentes en la posición L1951 no presentan valores de soporte tan altos como en las anteriores posiciones y las HEs de *C. mucigena* (I-Cmul) y *D.*

*reticulata* (I-Drell) quedan separadas en dos ramas diferentes, una más relacionada con el alga *Trebouxia showmanii* y otra con la ameba *A. castellanii*.

#### 4.4.3.2. Análisis filogenéticos de las HEs presentes en intrones L2263 y L2512

De un modo similar a las HEs de los intrones L1917, L1931 y L1951 se encontraron HEs homólogas a las de los intrones L2263 y L2512 pertenecientes a organismos de taxones no muy distantes a la división Chlorophyta. Se seleccionaron 13 taxones y se alinearon 145 caracteres construir el árbol filogenético de la Figura 4.22. Se utilizó una aproximación de máxima verosimilitud (ML) con el programa PhyML v3.0 (Guindon *et al.*, 2010). El modelo de sustitución de aminoácidos fue WAG, determinado mediante el programa Prottest v3.3 (Abascal *et al.*, 2005). Los valores representados en el árbol (de arriba a abajo) corresponden a las probabilidades inferidas mediante análisis de máxima verosimilitud (establecida mediante valores de bootstrap de 100 réplicas (Felsenstein, 1985)) y Máxima Parsimonia (MP) (Swofford, 2003). Solamente se muestran los valores de soporte superiores a 50. La escala indica el número de sustituciones/sitio. El índice de consistencia (IC) del árbol fue de 0.88.



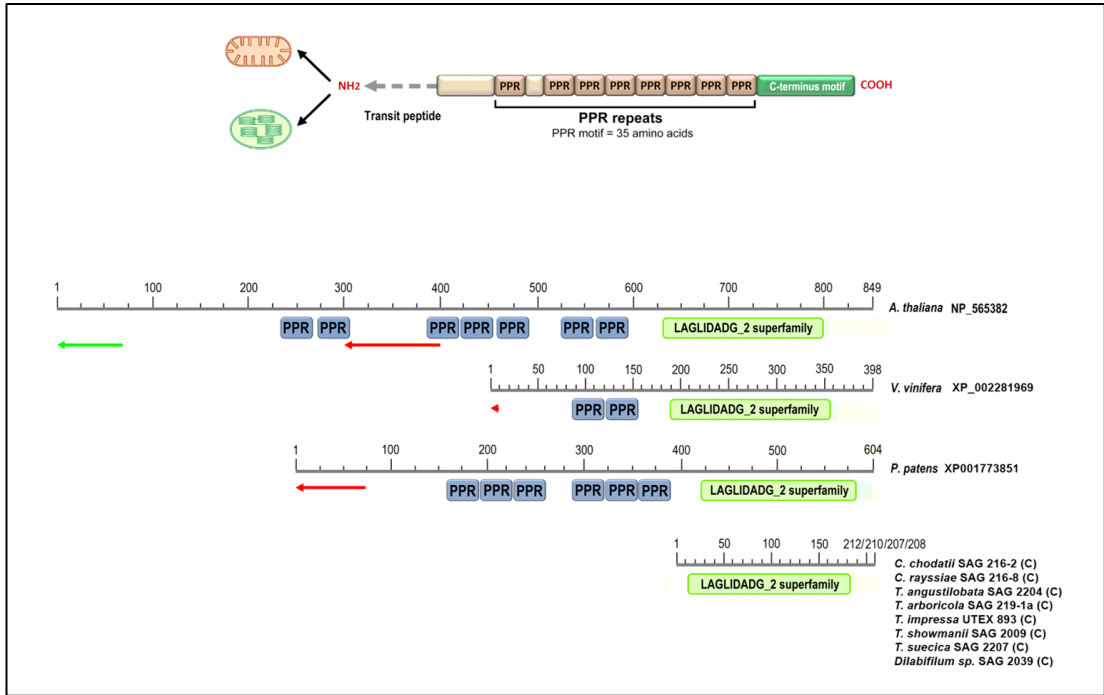
**Figura 4.22** Relaciones filogenéticas de las HEs presentes en los intrones L2263 y L2512 de algas verdes.

La filogenia mostrada en la Figura 4.22 muestra claramente la división de las HEs presentes en dos clados diferentes: uno de ellos incluye las HEs de los intrones L2263 y el otro las de los intrones L2512. Ambos tipos de HEs parecen mostrar homologías con las de las algas de la división Chlorophyta. En el caso de la inserción L2263, se producen subdivisiones de las HEs halladas en el estudio. Por un lado, encontramos un clado que engloba a las proteínas encontradas en las especies *C. rayssiae* (I-CraIII) y *C. chodatii* (I-CchII), que muestran clara similitud con la proteína de la especie de *Trebouxiophyceae* estudiada por Servín-Garcidueñas & Martínez-Romero (2012). Por el otro lado, encontramos a su vez dos clados, uno donde queda incluida la HE hallada en *Dilabifilum spec.2* (I-Dsp2III) y otro para la HE de *Trebouxia impressa* (I-TimI). A la vista de estos resultados se puede interpretar que puede haber más de un origen para las HEs presentes en los intrones L2263 y que quizás los resultados obtenidos en la filogenia de la Figura 4.20, a pesar de no estar respaldados con alto soporte, podrían ser veraces, pues también se pone de manifiesto la presencia de estas HEs en distintos clados.

#### **4.4.3.3. Algunas HEs son similares al extremo C-terminal de proteínas PPR de plantas**

Las PPR pertenecen a una familia de proteínas implicadas en funciones celulares vitales para las plantas, como la expresión génica de cloroplastos, estabilización del ARN, *splicing* y traducción de intrones (del Campo, 2009). Estructuralmente, se caracterizan por la presencia de un motivo degenerado PPR, consistente en unos 35 aa que se repiten en múltiples copias en tándem. La mayoría de estas proteínas son de codificación nuclear y son dirigidas a cloroplastos o mitocondrias gracias a un péptido de tránsito del extremo N-terminal.

Búsquedas de HEs similares a las encontradas en intrones cL2263 en la base de datos del NCBI con el programa BLAST, mostraron cierta homología con proteínas PPR de codificación nuclear de plantas. Estas proteínas estaban presentes tanto en plantas no vasculares como el musgo *Physcomitrella patens* como en plantas vasculares como *Arabidopsis thaliana*, *Cicer arietinum*, *Oryza sativa*, *Prunus persica*, *Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum* y *Vitis vinifera*. En la Figura 4.23 se muestra una representación esquemática de las proteínas de plantas donde se señala la presencia de ambos motivos.



**Figura 4.23** Representación esquemática de proteínas seleccionadas tanto PPR de plantas como HEs de algas liquénicas. Se muestran los motivos PPR y LAGLIDADG.

En la Figura 4.24 se muestra el alineamiento del entorno del dominio PPR (A) y LAGLIDADG (B) de las proteínas PPR de plantas y las HEs de algas.



**Figura 4.24** Alineamientos del entorno de los dominios PPR de las proteínas PPR de plantas (A). Alineamientos del entorno de los dominios LAGLIDADG tanto de proteínas PPR de plantas como de HEs de algas (B).

En las inmediaciones del segundo dominio LAGLIDADG, se encontró un dominio más amplio muy conservado “IPKLIHRWLSRSLAYWYMY”, presente tanto en el extremo C-terminal de las proteínas PPR de plantas como en ciertas HEs de cloroplastos de algas. Búsquedas de secuencias homólogas disponibles en el NCBI con la herramienta BLAST mostraron la conservación de este motivo en varias endonucleasas tanto de plantas como de algas.



Es conocido, que la mayoría de proteínas PPR de plantas vasculares son dirigidas bien hacia los cloroplastos o las mitocondrias. Para predecir la posible localización sub-celular de las HEs de plantas vasculares, homólogas a las de algas se llevó a cabo con el programa TargetP 1.1 (Emanuelsson *et al.* 2007) (Tabla 4.8). Varias de las proteínas PPR analizadas parecen contener un péptido de tránsito que indica su probable importación hacia los cloroplastos o las mitocondrias.

**Tabla 4.8** Predicción de la localización sub-celular de las proteínas PPR de plantas estudiadas.

ORGANISMO	LongPR	PTC	PTM	PTS	otros	Loc	IC	LongPT
<i>Arabidopsis thaliana</i> (NP565382)	849	0.744	0.020	0.005	0.296	C	3	68
<i>Arabidopsis thaliana</i> (NP565382)	547	0.007	0.870	0.054	0.289	M	3	99
<i>Cicer arietinum</i> (XP004499305)	793	0.684	0.141	0.007	0.019	C	3	76
<i>Physcomitrella patens</i> (XP001773851)	604	0.019	0.819	0.020	0.447	M	4	71
<i>Physcomitrella patens</i> (XP001752430)	714	0.036	0.703	0.036	0.448	M	4	106
<i>Prunus persica</i> (XP007201413)	781	0.881	0.109	0.001	0.059	C	2	73
<i>Solanum lycopersicum</i> (XP00425101)	816	0.972	0.060	0.003	0.025	C	1	13
<i>Solanum tuberosum</i> (XP006349130)	813	0.929	0.132	0.002	0.045	C	2	27
<i>Vitis vinifera</i> (XP002281969)	823	0.876	0.028	0.004	0.101	C	2	61
<i>Vitis vinifera</i> (AM467710)	398	0.013	0.706	0.061	0.231	M	3	10

Loc: predicción de la localización de la proteína dentro de la célula: C (cloroplasto, la secuencia contiene PTC, un péptido de tránsito cloroplástico); M (mitocondria, la secuencia contiene PTM, un péptido de tránsito mitocondrial); S (vía de secreción, la secuencia contiene PTS un péptido de tránsito para la vía de secreción); otras localizaciones (localización desconocida). IC: índice de confianza, desde 1 a 5, donde 1 indica la predicción más segura. LongPT es la longitud del péptido de tránsito.

#### 4.5. ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD DE FOTOBIONTES DE LÍQUENES RECOLECTADOS

El estudio de marcadores moleculares y caracterización de intrones realizado en apartados anteriores pone de manifiesto que el uso de estas herramientas constituye un elemento muy potente para diferenciar especies de fotobiontes liquénicos y algas relacionadas, pues cada organismo estudiado presenta un patrón característico tanto en cuanto a la secuencia de nucleótidos en ciertas regiones de su genoma, seleccionadas como marcadores, como a la presencia y distribución de intrones. A fin de comprobar la utilidad de los marcadores diseñados nos propusimos realizar estudios en fotobiontes liquénicos aislados de líquenes recolectados en campo. Para alcanzar este objetivo seleccionamos dos tipos diferentes de asociaciones liquénicas: *Ramalina farinacea* y *Lichenomphalia umbellifera*, en las que el micobionte es un ascomiceto y basidiomiceto, respectivamente.

La diversidad de contextos ecológicos en los que proliferan los líquenes en general debe implicar una gran plasticidad ecofisiológica que les permita soportar condiciones ambientales cambiantes y a menudo estresantes a las que debe enfrentarse. A esta plasticidad ecofisiológica del holobionte deben contribuir tanto el micobionte como el fotobionte. Para poder abordar el estudio *in vitro* de la fisiología de los fotobiontes de cualquier liquen resulta necesaria la caracterización molecular de los mismos así como su aislamiento y cultivo. En los párrafos siguientes se presentan los resultados de la caracterización molecular y estudio de la diversidad de fotobiontes en el contexto de la simbiosis liquénica en las especies *Ramalina farinacea* y *Lichenomphalia umbellifera*.

#### 4.5.1. Caracterización molecular y fisiológica de los fotobiontes del ascoliquen *Ramalina farinacea*

*Ramalina farinacea* (L.) Ach. es un ascoliquen fruticuloso perteneciente al orden Lecanorales, cuyo modo de reproducción es asexual, mediante propágulos vegetativos de tipo soredio (Figura 4.25). Esta especie es muy abundante en áreas del hemisferio norte sometidas a regímenes climáticos templados o mediterráneos (Barreno *et al.*, 2008) pudiéndose encontrar también en ambientes más restrictivos como los de alta montaña.



**Figura 4.25** Talo de *Ramalina farinacea*. © Dipartimento di Biologia, Università di Trieste picture by A. Moro Isola di Marettimo, TP, Sicilia, 2008.04.03.

Dada la ausencia de información sobre la naturaleza y diversidad genética de los fotobiontes en esta especie liquénica, decidimos recolectar 31 especímenes en diferentes poblaciones de la Península Ibérica, Islas Canarias y California, cuyos datos pueden encontrarse en el Anexo 3. Inicialmente, aislamos el ADN y realizamos

diferentes amplificaciones con cebadores que cubrieron la región del gen 23S ADNr comprendida entre las posiciones 759-2596 del ortólogo de *E. coli* (Anexo 6). Las amplificaciones por PCR de algunas regiones del gen en diferentes talos utilizando el mismo par de cebadores daban como resultado productos de tamaños diferentes. Después de secuenciar los fragmentos de ADN obtenidos, observamos que las diferencias de tamaño eran debidas a la presencia de intrones de tipo I. Dado que el gen 23S ADNr es de codificación cloroplástica, cada copia de este gen debía pertenecer forzosamente a organismos diferentes, y probablemente a especies diferentes. La idea de la posible existencia de dos especies diferentes de *Trebouxia* en talos de *R. farinacea* era consistente con la descripción de al menos dos morfotipos distintos mediante técnicas de microscopía (del Campo *et al.*, 2010b).

Para poder secuenciar la región 759-2596 del gen 23S ADNr de un modo similar a como se hizo con algas obtenidas de bancos (cuyos resultados se han presentado en puntos anteriores), era imprescindible separar los diferentes fotobiontes en cultivo axénico.

#### **4.5.1.1. Aislamiento de los fotobiontes de *Ramalina farinacea***

Para lograr aislar los fotobiontes de *R. farinacea* y poder cultivarlos axénicamente, se partió de talos recolectados en una población de Castellón (Anexo 3). Se almacenaron a -20°C para posteriormente ser procesados siguiendo el procedimiento de Gasulla *et al.* (2010). Aunque este método es sencillo en cuanto a tiempo de procesamiento y componentes, requiere de gran minuciosidad en el trabajo para minimizar al máximo las posibles contaminaciones que pudieran producirse durante los diversos pasos. Es por ello que decidimos realizar algunas modificaciones, desarrollando todas las etapas bajo campana de flujo laminar y añadiendo un paso inicial de lavado del liquen en 10% NaClO y 0,1% Tween-20, compuestos utilizados frecuentemente como desinfectantes en el comienzo de cualquier procedimiento de cultivo *in vitro* de plantas.

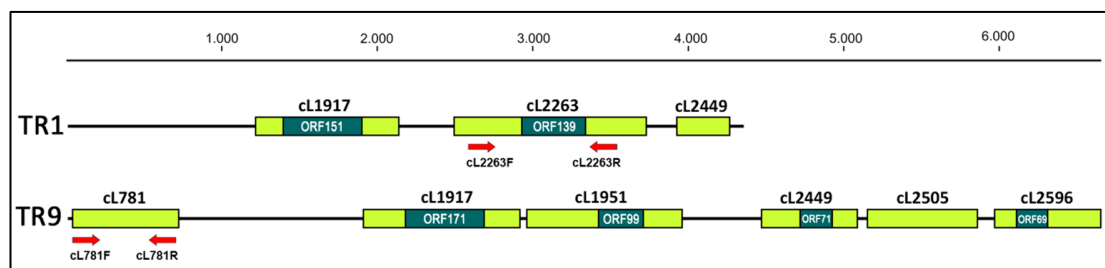
Una vez obtenido el precipitado que contenía las algas aisladas, se re-suspendió en 1 ml de agua ultrapura estéril y se realizaron diversas siembras del mismo en condiciones de cultivo con medio Bold 3N sin suplementar (Bold & Parker, 1962), para

minimizar las posibles contaminaciones de hongos y bacterias. Las siembras se hicieron por agotamiento, obteniéndose una serie de 20 aislados.

#### 4.5.1.2. Secuenciación del gen 23S ADNr de los fotobiontes aislados de *Ramalina farinacea*

Los 20 cultivos de fotobiontes aislados (como se ha descrito en el apartado anterior) fueron testados con el par de cebadores 23S-U1/23S-U2 (descritos en el apartado 4.2) con objeto de poder comparar las secuencias. Las reacciones de amplificación dieron un fragmento de un tamaño aproximado de 900 nt a partir del ADN de todas las muestras. La secuenciación de cada fragmento dio como resultado dos tipos de secuencias. El primer tipo se encontró en todos los cultivos excepto los números 9 y 12. En estos dos cultivos, las secuencias obtenidas pertenecían al segundo tipo. El análisis comparativo de las algas de los cultivos 1 y 9 con técnicas de microscopía electrónica mostró su correspondencia con los dos morfotipos previamente descritos para los fotobiontes de los talos de *R. farinacea* (del Campo *et al.*, 2010b). Estos dos tipos de fotobiontes fueron denominados TR1 y TR9.

La secuencia del producto de PCR obtenido con los cebadores 23S-U1/23S-U2 a partir de ADN extraído de TR1 resultó ser idéntica a la de *T. jamesii* UTEX 2233 (acceso EU352794). La secuencia obtenida a partir de ADN de TR9, si bien era muy similar a la de TR1 y *T. jamesii*, presentaba algunas diferencias. Se terminó secuenciando la región del gen del comprendida entre las posiciones 759-2596 del ortólogo de *E. coli* de un modo similar a como se hizo con algas obtenidas de bancos cuyos resultados se han presentado en apartados anteriores. Una vez secuenciado el gen completo elaboramos los mapas genéticos correspondientes a cada especie (Figura 4.26).

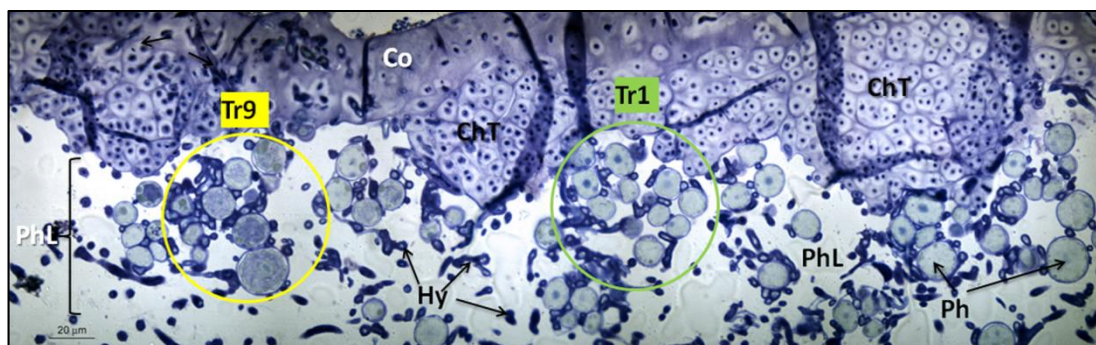


**Figura 4.26** Mapas genéticos de la región del 23S ADNr secuenciada en TR1 y TR9. Las líneas negras representan los exones. Los intrones son representados en rectángulos verdes. Los nombres de los intrones (de acuerdo con Johansen & Haugen, 2001) son indicados encima. Los marcos de lectura abierta, cuando existen, aparecen señalados en el interior de cada intrón indicando el número de aminoácidos de las proteínas hipotéticas. La posición de los cebadores es indicada en cada mapa mediante flechas rojas.

Como se observa en la Figura 4.26, los tamaños del gen 23S ADNr son muy diferentes en ambos fotobiontes (4352 nt en TR1 y 6655 nt en TR9). Esta diferencia se debe a la presencia de intrones de tipo I diferentes en número, distribución, longitud y secuencia. En TR1 se encontraron tres intrones: cL1917, cL2263 y cL2449. En los dos primeros se hallaron secuencias que codifican para posibles HEs. En TR9 se encontraron seis intrones cL781, cL1917, cL1951, cL2449, cL2505 y cL2596. De los seis intrones cuatro codificaban posibles HEs. Los tamaños de las HEs halladas en estos fotobiontes (69-171 aa) son sensiblemente inferiores a las encontradas en los mismos intrones en otras algas estudiadas (Tabla 4.6). Los intrones cL781 y cL2505 fueron descritos por primera vez en un organismo. Los mapas genéticos muestran diferencias suficientes como para considerar que TR1 y TR9 son especies diferentes de *Trebouxia*. Esta hipótesis es consistente con la descripción de dos morfotipos claramente diferenciables con microscopía tanto óptica como electrónica (del Campo *et al.*, 2010b).

#### **4.5.1.3. Evidencias moleculares de la coexistencia de TR1 y TR9 en los talos de *Ramalina farinacea***

Observaciones preliminares con microscopía óptica de secciones de talos de *R. farinacea* recolectados en la Sierra del Toro de Castellón (Anexo 3) indicaron la coexistencia de los dos morfotipos correspondientes a TR1 y TR9, en todos los especímenes analizados (Figura 4.27).

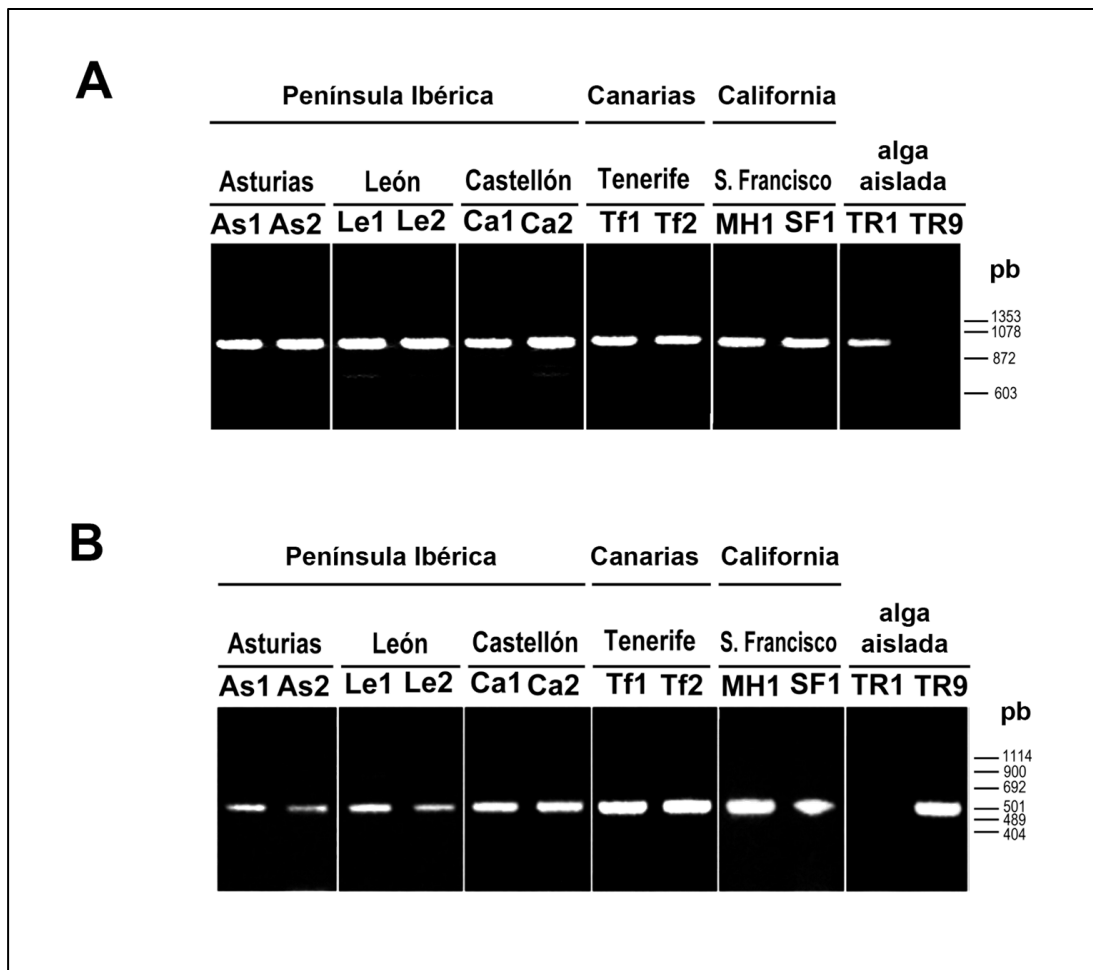


**Figura 4.27** Sección transversal de un talo de *Ramalina farinacea* teñida con azul de toluidina. ChT, tejido condroide; Co, córtex; Hy, hifas; Ph, fotobiontes; PhL, capa de fotobiontes.

Basándonos en las secuencias de la región del gen 23S ADNr comprendida entre las posiciones 759-2596 del ortólogo de *E. coli* de las microalgas TR1 y TR9 aisladas, procedimos a la caracterización molecular de los fotobiontes de *R. farinacea* en los 31 talos recolectados de diferentes localidades de la Península ibérica, Islas Canarias y California (Anexos 3 y 4).

La identificación del fotobionte presente en cada talo se llevó a cabo utilizando dos parejas de cebadores diferentes, cada una de ellas específica de cada microalga, cuyas posiciones se muestran en la Figura 4.26. La pareja cL2263-F/cL2263-R amplificaba ADN de TR1 mientras que la pareja cL781-F/cL781-R amplificaba solamente ADN de TR9 (Anexo 6).

La Figura 4.28 (A y B) muestra los productos de amplificación obtenidos a partir del ADN extraído de cada talo analizado, bien con la pareja de cebadores cL2263-F/cL2263-R o cL781-F/cL781-R (Posiciones indicadas en Figura 4.26; Anexo 6). Cabe destacar que ambas parejas de cebadores amplificaban el ADN de cada talo independientemente de la localidad de la que había sido recolectado. Este hecho confirmaba la coexistencia de los dos fotobiontes observada en algunos talos recolectados en Castellón mediante observaciones con microscopía óptica. La secuenciación de cada producto de amplificación confirmó la especificidad de las reacciones de PCR.

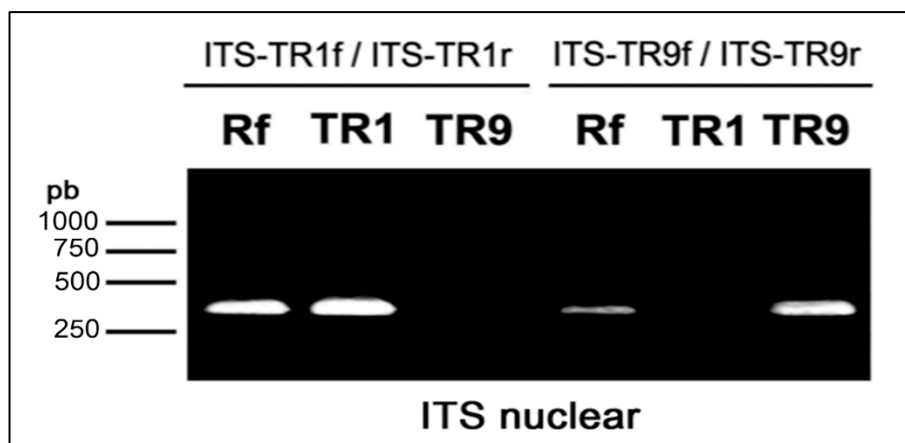


**Figura 4.28** Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de los productos de amplificación por PCR obtenidos con las parejas de cebadores cL781-F/cL781-R (A) y cL2263-F/cL2263-R (B) a partir de ADN de talos de *Ramalina farinacea* recolectados en diferentes localidades (As, Asturias; Le, León; Ca, Castellón; Tf, Tenerife; MH, Monte Hamilton; SF, San Francisco) así como de fotobiontes TR1 y TR9 aislados. Los tamaños de los marcadores de peso molecular (pb) se indican a la derecha.

Para confirmar los resultados obtenidos en base a secuencias del gen 23S ADNr, se utilizó un marcador adicional de codificación nuclear: los ITS del operón de ARNs ribosomales. Para ello se diseñaron otras dos parejas de cebadores: la pareja ITS-TR1f/ITS-TR1r, que solamente amplificaba ADN de TR1; y la pareja ITS-TR9f/ITS-TR9r, que solamente amplificaba ADN de TR9 (Anexo 6). Estas parejas se diseñaron en base a las secuencias obtenidas de TR1 y TR9 con los cebadores de Kroken & Taylor (2000), diseñados para algas del género *Trebouxia*. Las reacciones de amplificación por PCR se llevaron a cabo con ADN extraído de cada talo y de cada fotobionte (TR1 y TR9) aislado en cultivo como se ha descrito en apartados anteriores. La Figura 4.29 muestra la



electroforesis en un gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos con la pareja de cebadores ITS-TR1f/ITS-TR1r y ITS-TR9f/ITS-TR9r. El par ITS-TR1f/ITS-TR1r amplificó el ADN de los talos liquénicos y del fotobionte TR1, pero no de TR9. Por el contrario, el par ITS-TR9f/ITS-TR9r amplificó en los talos liquénicos y en el fotobionte TR9, pero no en TR1.



**Figura 4.29** Electroforesis en gel de agarosa (1,5%) de los productos de amplificación por PCR obtenidos con las parejas de cebadores ITS-TR1f/ITS-TR1r y ITS-TR9f/ITS-TR9r a partir de ADN extraído de talos de *Ramalina farinacea* recolectados en la Sierra del Toro (Castellón), TR1 y TR9. Los tamaños de los marcadores de peso molecular (pb) se muestran a la izquierda.

Todos los productos de PCR obtenidos fueron amplificados y secuenciados. Se obtuvieron un total de 93 secuencias de los ITSnr de los fotobiontes de los talos recolectados cuyos números de acceso se muestran en el Anexo 4. Del total de 93 secuencias obtenidas, 31 se obtuvieron con los cebadores de Kroken & Taylor generales para todas las algas del género *Trebouxia*, otras 31 se obtuvieron con los cebadores ITS-TR1f/ITS-TR1r específicos de fotobiontes TR1 y otras 31 con los cebadores ITS-TR9f/ITS-TR9r específicos de los fotobiontes TR9.

Las 31 secuencias obtenidas con los cebadores de Kroken & Taylor (2000), resultaron ser similares a las de TR9 en todas las muestras procedentes de las Islas Canarias (10 muestras) mientras que las procedentes del resto de localidades fueron similares a las de TR1 (21 muestras). La obtención de secuencias tanto de TR1 como de TR9 con los cebadores específicos para cada tipo de fotobionte (Anexo 6), demostró la coexistencia de ambos tipos de fotobiontes en todos los talos. De estos resultados dedujimos que en las Islas Canarias era posible que predominara TR9 mientras que en

el resto de localidades probablemente predominaría TR1. Esto explicaría por qué se obtiene una sola secuencia con los cebadores “generales para algas del género *Trebouxia*” de Kroken & Taylor y sin embargo dos secuencias diferentes (una similar a la de TR1 y otra similar a la de TR9) cuando se utilizan cebadores específicos.

Por otra parte, el análisis de las secuencias de los ITSnr obtenidas con los cebadores específicos de cada microalga permitió identificar un total de cinco haplotipos para TR1 (TR1a-TR1d) y dos para TR9 (TR9a y TR9b). Se encontraron seis combinaciones diferentes de cada par de haplotipos (uno de TR1 y el otro de TR9) por talo. Las combinaciones de ambos haplotipos por talo se muestran en la Tabla 4.9.

**Tabla 4.9** Distribución geográfica de las combinaciones de haplotipos de cada uno de los fotobiontes de *Ramalina farinacea* basadas en las secuencias de ITSnr.

Combinación haplotipo	Haplotipo ITSnr		Localizaciones geográficas		
	TR1	TR9	Península	California	Islas Canarias
			Ibérica		
I	1a	9b	11 <sup>(*)</sup>	--	--
II	1a	9a	8	--	3
III	1b	9a	--	--	1
IV	1c	9a	--	--	2
V	1d	9a	--	--	1
VI	1e	9a	--	--	3
VII	1b	9b	--	2	--

(\*) Los números indican los especímenes observados con una combinación haplotipos determinada en cada área geográfica. Los datos sobre las coordenadas geográficas altitud, piso bioclimático, datos de la recolección y forofitos están disponibles en el Anexo 3.

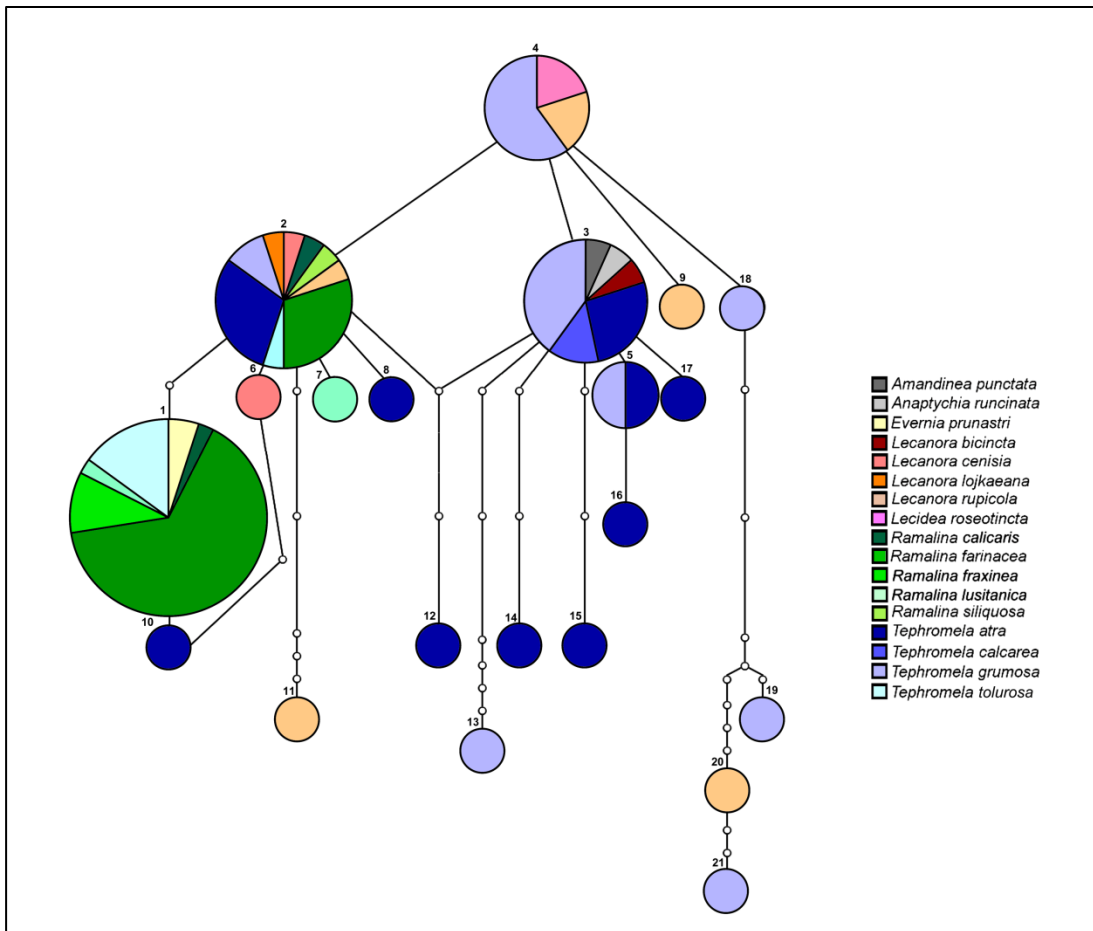
En los talos recolectados en las Islas Canarias se encontró únicamente el haplotipo TR9a combinado con cinco haplotipos de TR1 (TR1a-TR1e). En los talos recolectados en la Península Ibérica por el contrario se encontró un único haplotipo de TR1 (TR1a) combinado con los dos haplotipos de TR9 (TR9a y TR9b). De las siete combinaciones de haplotipos encontradas, la combinación II de la Tabla 4.9 se encontró tanto en la Península Ibérica como las Islas Canarias mientras que las

combinaciones restantes se encontraron o bien en la Península Ibérica (combinación I) o bien en las Islas Canarias (III-VI) o bien en California (VII). Todos estos resultados apoyan la hipótesis inicial que indica la coexistencia de dos especies diferentes de *Trebouxia*, correspondientes a TR1 y TR9 en el mismo talo liquénico en todas las poblaciones analizadas.

#### **4.5.1.4. Representación de los fotobiontes TR1 y TR9 en diferentes especies liquénicas en base a las secuencias de ITS nucleares depositadas en GenBank**

Tras definir los diferentes haplotipos de algas para cada talo recolectado, buscamos haplotipos similares en otros líquenes diferentes de *R. farinacea*. En un principio se analizaron los fotobiontes de otras especies del mismo género con los cebadores específicos de ITSnr de algas del género *Trebouxia* (Kroken & Taylor, 2000). El análisis de las secuencias obtenidas indicó la presencia de TR1, TR9 o ambas en al menos cinco especies diferentes: *R. calicaris*, *R. fastigiata*, *R. fraxinea*, *R. lusitanica*, y *R. siliquosa* (accesos disponibles en la Figura 3 de la Publicación 4). En todas estas especies se encontró TR1 como fotobionte excepto en *R. fastigiata*, en la que se encontró TR9.

Posteriormente, buscamos en GenBank secuencias de ITSnr similares tanto a las de TR1 como a las de TR9. Se encontró cerca de un centenar de secuencias similares a las de TR1 pero solamente dos similares a las de TR9. Estas dos secuencias similares a las de TR9 se encontraron en *Tephromela atra* (accesos EU551521 y EU551522). La genealogía de la Figura 4.30 construida con el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000) muestra la enorme diversidad de especies fúngicas que liquenizan con TR1.



**Figura 4.30** Genealogía de haplotipos de ITSnr de fotobiontes de tipo TR1 asociados con diferentes especies de hongos. La genealogía se construyó utilizando el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000), considerando una identidad de la secuencia de al menos el 95%. Cada círculo corresponde a un haplotipo, cuyo tamaño es proporcional al número de individuos que lo presentan. Los números encima de cada círculo identifican cada uno de los haplotipos encontrados. Cada intervalo de línea representa una mutación y cada pequeño círculo intermedio representa un cambio adicional.

Al menos 16 especies de hongos de ocho géneros diferentes liquenzan con fotobiontes de tipo TR1: *Amandinea* (*A. punctata*), *Anaptychia* (*A. runcinata*), *Evernia* (*E. prunastri*), *Lecanora* (*L. bicincta*, *L. cenisia*, *L. lojkaeana* y *L. rupicola*), *Lecidea* (*L. roseotincta*), *Ramalina* (*R. calicaris*, *R. farinacea*, *R. fraxinea*, *R. lusitanica* y *R. siliquosa*), *Schaereria* (*S. tenebrosa*) y *Tephromela* (*T. atra* y *T. grumosa*).

En la genealogía de la Figura 4.30 el nodo “madre” incluye tres especies liquénicas de géneros diferentes (*L. rupicola*, *L. roesotincta*, y *T. grumosa*). Tres linajes diferentes derivan de este nodo “madre”. El linaje 1 incluye 61 muestras de 12 especies diferentes de cuatro géneros (*Evernia*, *Lecanora*, *Ramalina*, y *Tephromela*). El

linaje L2 incluye 25 muestras de cinco especies diferentes de cuatro géneros (*Amandinea*, *Anaptychia*, *Lecanora* y *Tephromela*). El linaje 3 incluye tres muestras de *T. grumosa*.

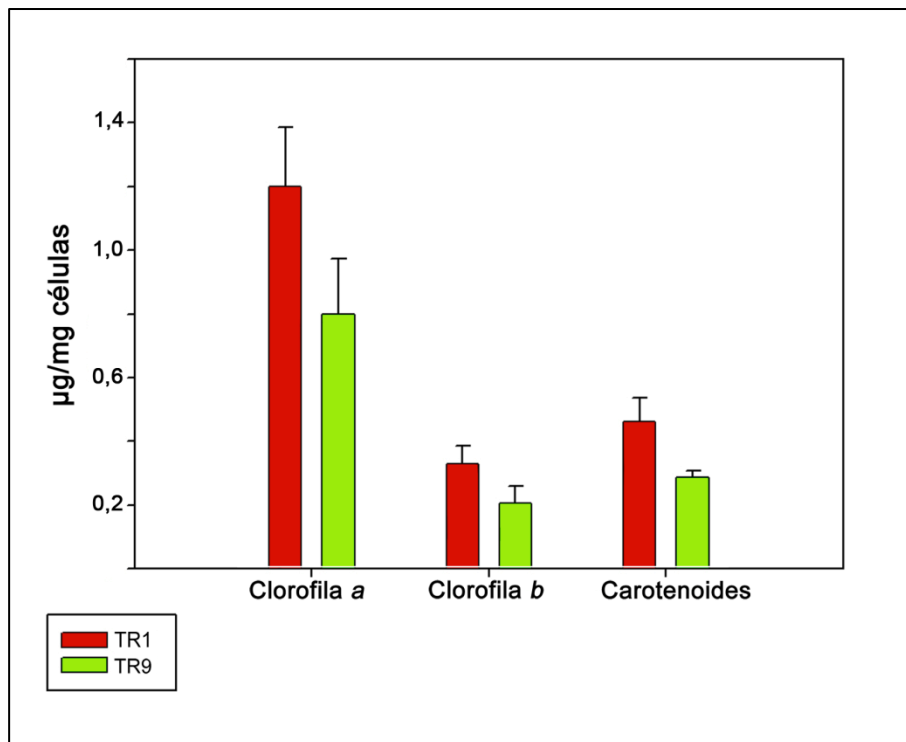
Con el objeto de estudiar las relaciones filogenéticas de los fotobiontes de tipo TR1 generamos un alineamiento de todas las secuencias disponibles en GenBank de ITSnr más las determinadas por nuestro grupo. Se alinearon 121 secuencias con el programa Bioedit 7.0 (Hall, 1999). 96 secuencias eran similares a las de TR1 y 20 a las de TR9. El alineamiento obtenido fue utilizado como base para realizar análisis filogenéticos de máxima verosimilitud (ML) utilizando varias secuencias de *T. decolorans* como grupo externo (accesos AJ969550, FJ705190, FJ705199, FJ705201, y FJ705206). La filogenia obtenida está representada en la Figura 3 de la Publicación 4. Como era previsible las secuencias similares a las de TR1 y a las de TR9 aparecían agrupadas en dos clados claramente diferenciados con valores de bootstrap de 88 y 100, respectivamente. La topología del árbol era consistente con la genealogía mostrada en la Figura 4.30.

#### **4.5.1.5. Caracterización fisiológica preliminar de TR1 y TR9**

Paralelamente a la caracterización molecular de TR1 y TR9, se iniciaron estudios enfocados a conocer el comportamiento fisiológico de cada fotobionte en condiciones estándar de cultivo. Esta caracterización inicial facilitará el desarrollo de estudios fisiológicos más complejos en los dos fotobiontes.

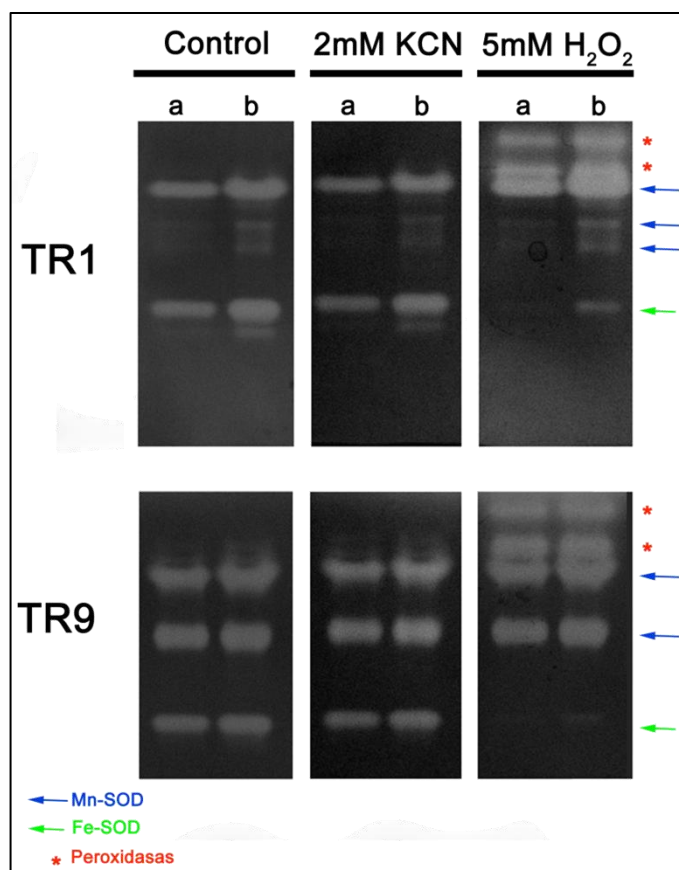
Se midieron una serie de parámetros relacionados con fotosíntesis y sistemas de protección contra estrés oxidativo en TR1 y TR9 crecidas en medio líquido a 15°C durante una semana. Estos parámetros fueron la medida de pigmentos fotosintéticos así como la determinación de actividades de enzimas antioxidantes Superóxido Dismutasa (SOD) y Glutathion Reductasa (GR).

Las medidas de pigmentos fotosintéticos se muestran en la Figura 4.31. Los valores ( $\mu\text{g}$ ) de cada pigmento por mg (PF) de células fueron mayores para TR1, sobre todo a nivel de clorofila *a* y carotenoides. Estos resultados indican diferencias significativas entre TR1 y TR9 a nivel de pigmentos, para las mismas condiciones de cultivo.



**Figura 4.31** Niveles basales de pigmentos fotosintéticos observados en TR1 y TR9 tras el cultivo durante una semana a 15°C. Los resultados representados muestran las medias de seis experimentos independientes así como los desvíos estándar asociados. Los datos fueron analizados estadísticamente por un ANOVA factorial, en la que el tipo de fotobionte se consideró un factor. Se obtuvieron diferencias significativas en los datos estudiados.

Las actividades antioxidantes SOD y GR fueron determinadas mediante la realización de zimogramas. Para poner de manifiesto la presencia de diferentes isoformas de SOD, se utilizaron los siguientes inhibidores enzimáticos: 2mM KCN y 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La Figura 4.32 muestra el patrón de isoformas de SOD para TR1 y TR9. Creemos que las isoenzimas presentes en estas algas son de tipo Mn-SOD y Fe-SOD, por orden de menor a mayor migración electroforética. Los tratamientos con 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pusieron de manifiesto unas bandas de actividad superiores que podrían corresponder a enzimas de tipo peroxidasa.

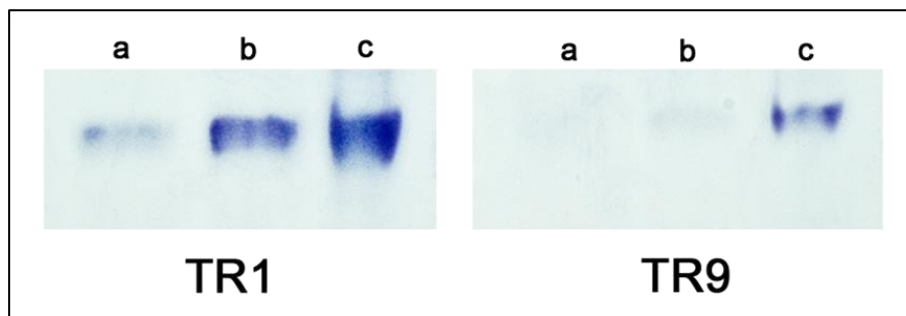


**Figura 4.32** Zimograma de SOD indicando las diferentes isoenzimas presentes en TR1 y TR9. Se cargaron 5 y 10  $\mu\text{g}$  (a y b) de proteínas para cada fotobionte, respectivamente. Las bandas superior e intermedia corresponderían a isoformas de tipo Mn-SOD mientras que la banda de mayor migración sería de tipo Fe-SOD, ya que se puede observar inhibida en el tratamiento con 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ . El tratamiento con 2mM KCN no altera el patrón isoenzimático aunque sí disminuyen la actividad de las bandas de ambos fotobiontes.

Se observaron diferencias en los patrones isoenzimáticos tanto en el control como en los tratamientos con inhibidores. Comparando los resultados para el control, parece que TR9 presenta mayor actividad SOD que TR1, sobre todo a nivel de Mn-SOD intermedia (que en TR1 equivale a dos bandas de intensidad leve sólo observables con 10  $\mu\text{g}$  de proteína). La actividad Fe-SOD parece ser algo mayor en TR1, algo que puede ser contrastado al observar el tratamiento con 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , donde la banda de esta isoenzima prácticamente desaparece para TR9 mientras que TR1 sigue presentando cierta actividad.

Por último, el zimograma de actividad GR mostró resultados interesantes que concuerdan además con los que se obtuvieron posteriormente en trabajos realizados con estas algas sometidas a condiciones de estrés por metales pesados (Alvarez *et al.*,

2012). En condiciones control, la actividad de esta enzima fue claramente superior en TR1 que en TR9, para las tres cantidades de proteínas cargadas (Figura 4.33).



**Figura 4.33** Zimograma de GR para los fotobiontes TR1 y TR9 en condiciones control. Se cargaron 2,5-5-10 µg (a, b y c) de proteínas para cada fotobionte, respectivamente. La intensidad de las bandas en TR1 es claramente superior que en TR9, donde apenas se observa actividad para 2,5 µg de proteínas.

Todos los resultados fisiológicos mostrados a lo largo del presente apartado (Figuras 4.31-4.33) indicarían que los fotobiontes TR1 y TR9 no sólo presentan diferencias morfológicas y moleculares sino también funcionales.

#### **4.5.2. Caracterización molecular del fotobionte del basidioliquen *Lichenomphalia umbellifera***

Los estudios realizados en el ascoliquen *Ramalina farinacea* han permitido conocer la composición de fotobiontes del género *Trebouxia* de las poblaciones recolectadas así como su patrón de asociación. En este apartado tratamos de llevar a cabo un estudio similar en un basidioliquen con el objeto de comparar ambos tipos de simbiosis liquénicas. Este grupo de organismos ha sido muy poco estudiado en la Península Ibérica tanto por micólogos como liquenólogos debido al pequeño tamaño de los basidiomas, corto periodo de fructificación y talos vegetativos simples (Figura 4.34). El género *Lichenomphalia* es el más conocido entre los basidiolíquenes (Oberwinkler, 2012). De las ocho especies que componen el género, *Lichenomphalia umbellifera* (Redhead, Lutzoni, Moncalvo & Vilgalys) es la especie que presenta una distribución más cosmopolita (Geml *et al.*, 2012), aunque en la Península Ibérica su localización suele ser en ambientes de alta montaña, sobre substratos ácidos como



turberas (Barrasa & Rico, 2001). Esta especie liquénica establece simbiosis con algas verdes del género *Coccomyxa* en lugar de *Trebouxia* (Zoller & Lutzoni, 2003).



**Figura 4.34** Talo de *Lichenomphalia umbellifera*.

#### **4.5.2.1. Aislamiento del fotobionte de *Lichenomphalia umbellifera***

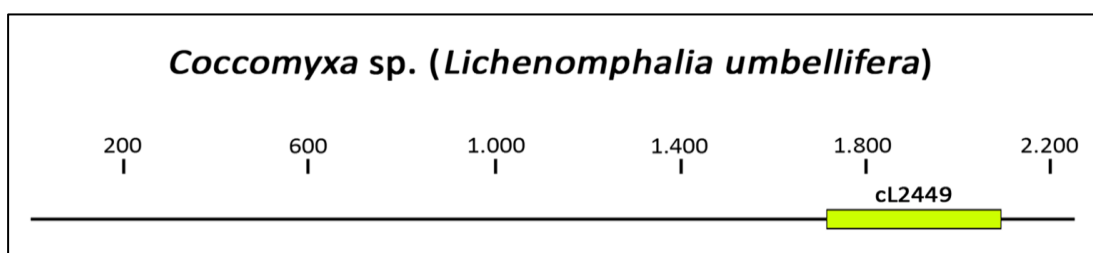
Como primer objetivo en este estudio nos propusimos aislar el fotobionte asociado a *Lichenomphalia umbellifera*. Para ello, se partió de cinco especímenes recolectados en las inmediaciones del Río Pelagallinas en la provincia de Guadalajara (Anexo 3). La recolección se llevó a cabo en el mes de julio, ya que los basidiomas fructifican entre primavera y otoño. El aislamiento del fotobionte se realizó mediante un protocolo propio desarrollado en nuestro laboratorio, en el que todas las etapas fueron realizadas en campana de flujo laminar. Se añadió un paso previo de lavado y desinfección de los basidiomas con 10% NaClO y 0,1% Tween-20, el cual había resultado muy efectivo en los aislamientos de fotobiontes de ascolíquenes. Posteriormente, los ejemplares se homogeneizaron en mortero estéril con 1 ml de agua ultrapura. El homogenado resultante se sembró por agotamiento en placas Petri que contenían medio Bold 3N (Bold & Parker, 1962) sin suplementar. De esta manera se intentaba minimizar el desarrollo de bacterias u hongos y de favorecer el del alga. Tras varias semanas de incubación en cámara de cultivo comenzaron a aparecer “puntos verdes” que fueron transferidos a tubos con medio Bold 3N sin suplementar.

Al igual que se hizo para los fotobiontes de *R. farinacea*, se testaron los diferentes tubos sembrados con los cebadores 23S-U1/23S-U2 (descritos en el apartado 4.2). Todas las secuencias obtenidas resultaron idénticas entre sí y similares

al gen 23S ADNr de *Coccomyxa prinsheimii* SAG 216-7 (acceso JQ278713), *Coccomyxa subellipsoidea* SAG 216-13 y *Coccomyxa* sp. (también llamada *subellipsoidea*) C-169 (acceso HQ693844). En base a estos resultados dedujimos que el fotobionte de *L. umbellifera* pertenecía al género *Coccomyxa*. Los fotobiontes aislados e identificados se cultivaron en medio Bold 3N suplementado con glucosa (20 g/l) y caseína (10 g/l) para favorecer su crecimiento, en las condiciones de cultivo descritas en Materiales y métodos. De aquí en adelante nos referiremos a este fotobionte aislado como *Coccomyxa* sp. (Lu).

#### 4.5.2.2. Secuenciación parcial del gen 23S ADNr de *Coccomyxa* sp. (Lu)

La caracterización molecular inicial de *Coccomyxa* sp. (Lu) aislada de *L. umbellifera* se llevó a cabo secuenciando la misma región del gen 23S ADNr comprendida entre las posiciones 759-2596, igual a como se hizo para las algas de la Figura 4.14 y los fotobiontes de *R. farinacea*. Se aisló el ADN del fotobionte, el cual se utilizó como sustrato de varias reacciones de amplificación por PCR con cebadores específicos que cubrieran la región objeto de estudio (Anexo 6). El ensamblaje de las secuencias obtenidas dio un tamaño de región de 2253 nt. Análisis bioinformáticos de esta secuencia permitieron la identificación de un intrón de tipo I en la posición cL2449, que no codificaba para HE. El mapa genético de la región secuenciada del gen 23S ADNr del fotobionte estudiado se muestra en la Figura 4.35.



**Figura 4.35** Mapa genético de la región 23S ADNr secuenciada en *Coccomyxa* sp. (Lu). La línea negra representa el exón. El intrón es representado en el rectángulo verde. El nombre del intrón (de acuerdo con Johansen & Haugen, 2001) es indicado encima. El tamaño de la región comprende 2253 nt.

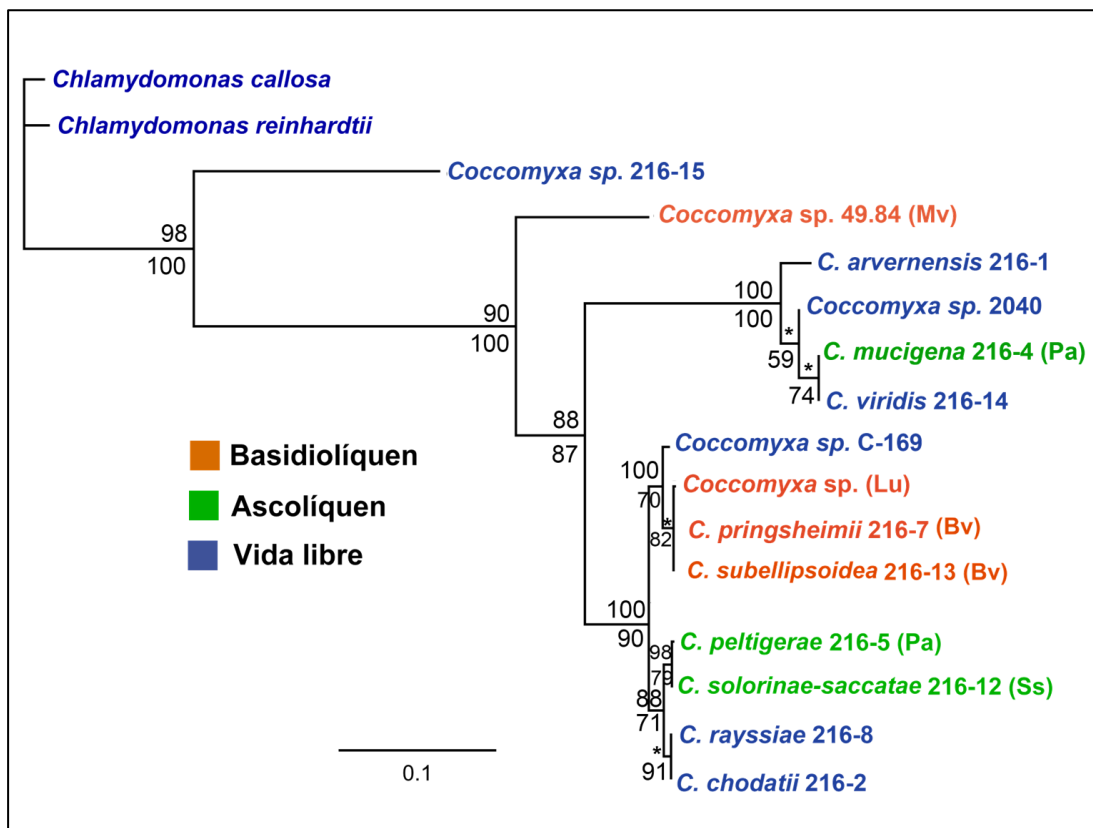
#### 4.5.2.3. Relaciones filogenéticas entre *Coccomyxa* sp. (Lu) con otras algas del género *Coccomyxa*

Para conocer las posibles relaciones filogenéticas de *Coccomyxa* sp. (Lu) aislada en este trabajo y otras especies del mismo género, alineamos las secuencias de ADN de la región comprendida entre los cebadores 23S-U1 y 23S-U2 de varias especies. Los alineamientos se llevaron a cabo con el programa Muscle 2.6 (Edgar, 2004) implementado en el software SeaView v4 (Gouy *et al.*, 2010). Con el alineamiento así obtenido se construyó la filogenia de la Figura 4.36.

El análisis de las secuencias obtenidas, previo a la construcción de la filogenia de la Figura 4.36, demostró varias identidades entre de ellas: (i) La secuencia de *C. pringsheimii* SAG 216-7 resultó ser idéntica a la de *C. subellipsoidea* SAG 216-13. Asimismo, ambas secuencias diferían en un solo nucleótido dudoso respecto a *Coccomyxa* sp. (Lu) aislada en este trabajo (los tres fotobiontes de *Lichenomphalia umbellifera*). (ii) La secuencia de *C. rayssiae* SAG 216-8 resultó idéntica a la de *C. chodatii* SAG 216-2 (ambas de vida libre). (iii) La secuencia *C. viridis* SAG 216-14 (de vida libre) resultó ser igual a la de *C. mucigena* SAG 216-4 (fotobionte de *Peltigera aptosa*). Sin embargo, existen algunas diferencias en el número y distribución de intrones de tipo I. Por ejemplo *C. rayssiae* SAG 216-8 y *C. chodatii* SAG 216-2 resultaron tener un número diferente de intrones (siete y cinco, respectivamente, Figura 4.14).

El árbol filogenético de la Figura 4.36 se construyó en base al alineamiento de las secuencias de 14 especies de *Coccomyxa* y dos especies de *Chlamydomonas* como grupo externo. El alineamiento constó de 787 caracteres de los que 246 resultaron variables. Se utilizó el criterio de máxima verosimilitud (ML) empleando el programa PhyML v3.0 (Guindon *et al.*, 2010) y de Máxima Parsimonia empleando el programa PAUP (Swofford, 2003). El modelo de sustitución de nucleótidos que se utilizó fue el GTR debido a que es el más completo al contemplar un mayor número de variables, tanto en sustituciones como en frecuencia de bases. Los valores numéricos representados debajo de la ramas corresponden a los valores de bootstrap (100 réplicas) (Felsenstein, 1985) y los situados encima corresponden a los valores de probabilidad posterior derivados del análisis de Máxima Parsimonia. La escala indica el

número de sustituciones/sitio. El árbol resultante tiene un índice de consistencia de 0.8364 y elevados valores de soporte en casi todas las ramas.

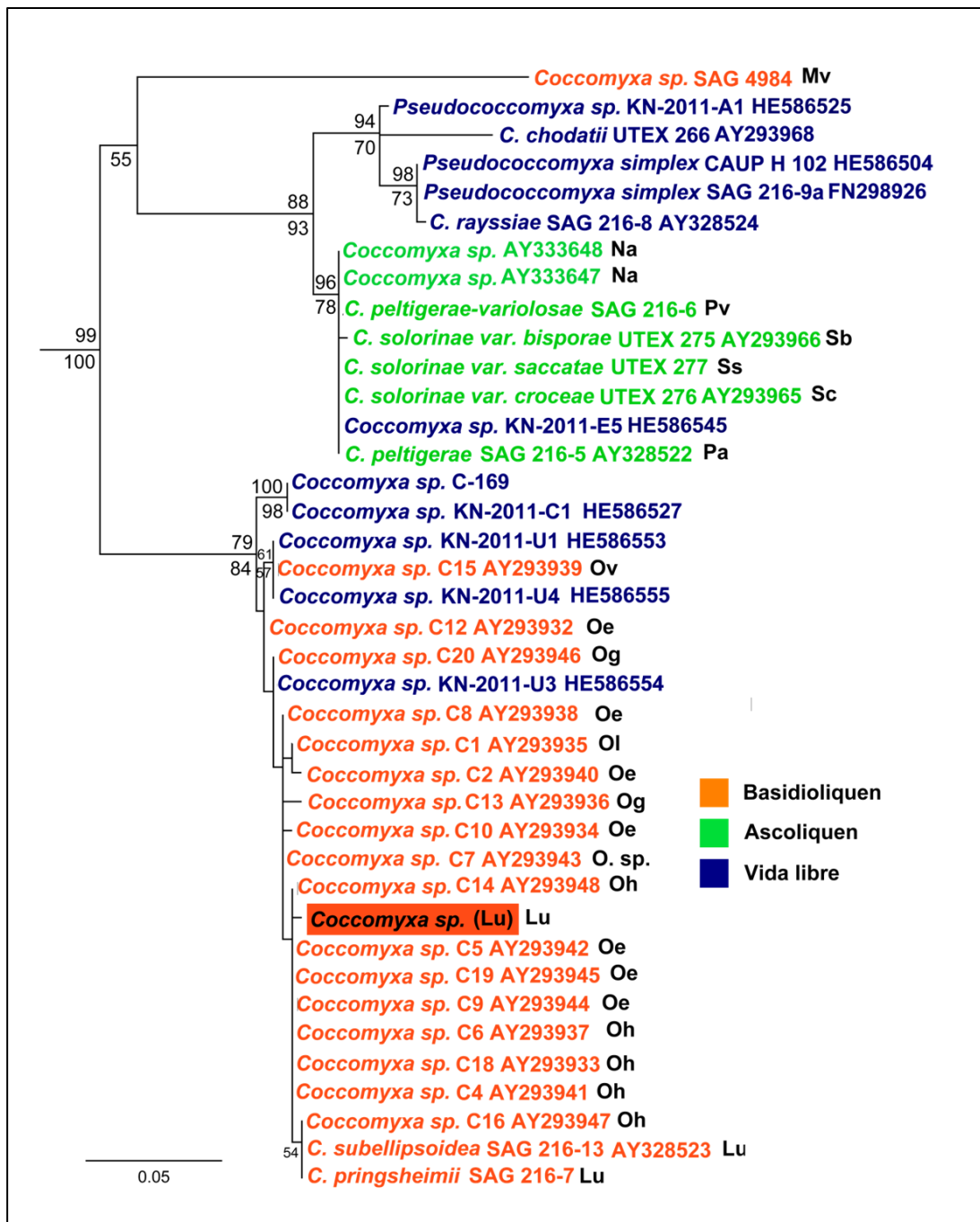


**Figura 4.36** Árbol filogenético basado en las secuencias de la región del gen 23S ADNr obtenidas con los cebadores 23S-U1/23S-U2 a partir de ADN de especies del género *Coccomyxa* pertenecientes a diferentes tipos de líquenes (ascolíquenes y basidiolíquenes) y de vida libre. Los números encima de las ramas indican probabilidades posteriores después de análisis Bayesiano y de máxima parsimonia. Los números debajo de las ramas indican valores de bootstrap después de análisis de máxima verosimilitud. Mv, *Multiclavula vernalis*; Lu, *Lichenomphalia umbellifera*; Bv, *Botrydina vulgaris* = *Lichenomphalia umbellifera*; Pa, *Peltigera aptosa*; Ss, *Solorina saccata*.

En la filogenia representada en la Figura 4.36 no se observa una diferenciación clara en clados según su modo de vida. El caso más patente es el de las especies *C. mucigena* y *C. viridis*, que resultaron tener secuencias idénticas a pesar de ser la primera fotobionte del ascomiceto *Peltigera aptosa* y la segunda de vida libre.

Esta observación se corrobora para el caso de un marcador de codificación nuclear que incluía las secuencias del ARNr 5S e ITS2. El árbol filogenético de la Figura 4.37 se construyó en base al alineamiento de las secuencias de 39 especies de *Coccomyxa* y las especies *Coelastrum astroideum* (acceso JX456464) y *Coccomyxa sp.*

SAG 216-15 como grupo externo. El alineamiento constó de 390 caracteres de los que 136 resultaron variables. Se utilizó el criterio de máxima verosimilitud (ML) empleando el programa PhyML v3.0 (Guindon *et al.*, 2010) y de Máxima Parsimonia utilizando el programa PAUP (Swofford, 2003). El modelo de sustitución de nucleótidos que se utilizó fue el GTR debido a que es el más completo al contemplar un mayor número de variables, tanto en sustituciones como en frecuencia de bases. Los valores numéricos representados debajo de la ramas corresponden a los valores de bootstrap (100 réplicas) (Felsenstein, 1985) y los situados encima corresponden a los valores de probabilidad posterior derivados del análisis de Máxima Parsimonia. La escala indica el número de sustituciones/sitio. El árbol resultante tiene un índice de consistencia de 0.8639 y elevados valores de soporte en casi todas las ramas, excepto para *Coccomyxa* sp. SAG 49.80 que o bien aparece junto a algas que liquenizan con hongos del orden Peltigerales o bien aparece como grupo externo a los dos clados principales. En la filogenia resultante se pueden apreciar dos clados separados: uno que incluye algas tanto de vida libre como fotobiontes de ascomicetos y otro que incluye tanto algas de vida libre como fotobiontes de basidiomicetos. El hecho de que *Coccomyxa* sp. SAG 49.80, que liqueniza con un basidiomiceto, aparezca bien como grupo externo a los dos clados o bien más próximo a los fotobiontes de ascomicetos, refuerza la hipótesis de que no hay diferenciación clara entre fotobiontes de ascomicetos por un lado y de basidiomicetos por otro. Lo cierto es que se han encontrado algas con secuencias idénticas del ITS2 tanto de vida libre como fotobiontes tanto de ascolíquenes como de basidiolíquenes (Figura 4.37).



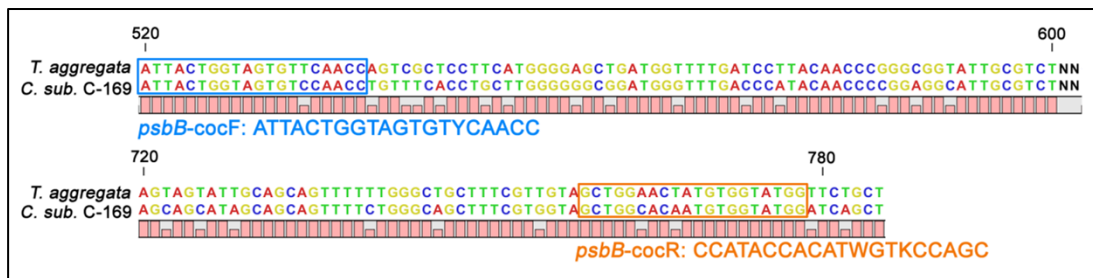
**Figura 4.37** Árbol filogenético basado en las secuencias nucleares del ARNr 5S e ITS2 de especies del género *Coccomyxa* pertenecientes a diferentes tipos de líquenes (ascolíquenes y basidiolíquenes) y de vida libre. Los números encima de las ramas indican probabilidades posteriores después de análisis Bayesiano y de máxima parsimonia. Los números debajo de las ramas indican valores de bootstrap después de análisis de máxima verosimilitud. Mv, *Multiclavula vernalis*; Lu, *Lichenomphalia umbellifera*; Na, *Nephroma arcticum*; Oe, *Omphalina ericetorum*, Og, *Omphalina grisella*; Oh, *Omphalina hudsoniana*; Ol, *Omphalina luteovitellina*; O.sp., *Omphalina* sp.; Ov, *Omphalina velutina*; Pa, *Peltigera aptosa*; Ss: *Solorina saccata*.

Por otra parte, *Coccomyxa* sp. SAG 216-15 aparece excesivamente alejada de las demás especies en la Figura 4.36, por lo que se seleccionó como grupo externo en la Figura 4.37. Ello sugiere la posible pertenencia de este alga a un género distinto del de *Coccomyxa*. Esta situación es similar a la de varias especies de *Trebouxia* que recientemente se han reclasificado como especies de *Asterochloris* (Skaloud & Peksá, 2010).

En ambos árboles filogenéticos (Figuras 4.36 y 4.37) *Coccomyxa* sp. (Lu) aparece próxima a *C. pringsheimii* SAG 216-7 y *C. subellipsoidea* SAG 216-13, ambas fotobiontes de *L. umbellifera*, así como a *Coccomyxa* sp C-169, de vida libre y de la que se han secuenciado recientemente los tres genomas completos (nuclear, cloroplastico y mitocondrial) (Smith *et al.*, 2011; Blanc *et al.*, 2012).

#### **4.5.2.4. Estudio de una Homing Endonucleasa en el gen *psbB* de *Coccomyxa* sp. (Lu)**

Como se ha indicado en el apartado anterior, la región secuenciada del gen 23S ADNr de *Coccomyxa* sp. (Lu) posee un único intrón en la posición L2449 que no codifica ninguna HE. Por este motivo, decidimos explorar otros genes cloroplásticos que pudieran contener intrones de tipo I con HEs de tipo LAGLIDADG, ya que constituye la familia más interesante para aplicaciones biomédicas. El gen *psbB* de algas verdes es otro gen de codificación plastidial en el que se ha demostrado la presencia de HEs de la familia LAGLIDADG. Concretamente las algas *Trebouxia aggregata* (EU123964) y *Coccomyxa* sp. o *subellipsoidea* C-169 (NC015084) contenían un intrón en el gen *psbB* que codifica HEs de tipo LAGLIDADG. Tomamos estas secuencias del gen *psbB* como punto de partida para el diseño de cebadores en la región flanqueante del intrón. Se alinearon los ADNc del gen *psbB* de ambas algas. En el alineamiento resultante se localizó el sitio de inserción del intrón (NN en la Figura 4.38). En base al alineamiento de ambas secuencias se seleccionaron dos regiones de secuencias muy similares para diseñar unos cebadores que pudieran amplificar en *Coccomyxa* sp. (Lu) (Figura 4.38). Se degeneraron algunas posiciones para facilitar aún más el apareamiento de las bases. Finalmente se diseñaron los cebadores *psbB-cocF* y *psbB-cocR* (Anexo 6) señalados en la Figura 4.38, los cuales fueron utilizados para amplificar el intrón junto a otros cebadores que se diseñaron en base a las nuevas secuencias que iban obteniéndose (*psbB-intF* y *psbB-intR*, Anexo 6).

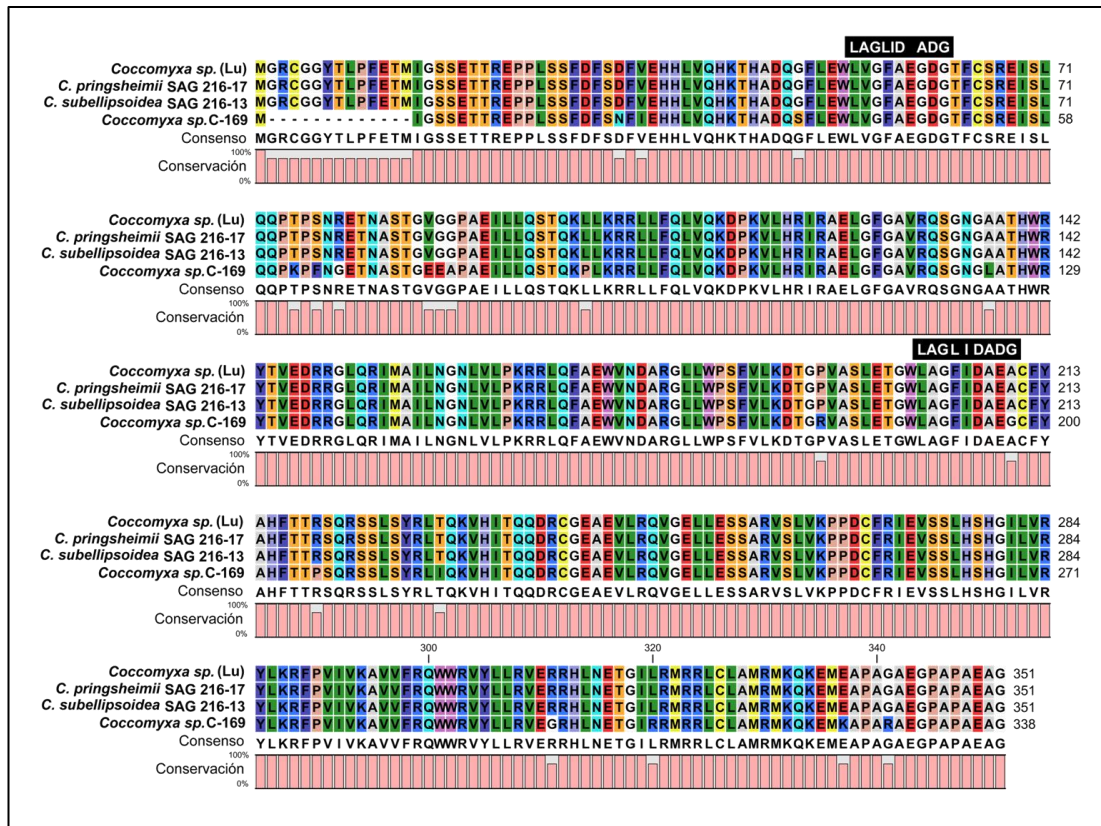


**Figura 4.38** Alineamiento de las dos regiones del gen *psbB* (520-602 y 720-785) que flanquean la zona del intrón en *T. aggregata* y *C. subellipsoidea* C-169. Las regiones se acotaron para facilitar la representación de la imagen. El intrón es marcado con las letras "NN". Se indican las secuencias de los dos cebadores diseñados.

Las condiciones de las reacciones de amplificación fueron las establecidas en Materiales y métodos, con una  $T^a$  de hibridación de 55°C y un tiempo de extensión de 2 minutos. Como resultado se obtuvo un amplificado de 1.500 nt, lo que llevó a pensar en la existencia de un intrón en *Coccomyxa* sp. (Lu), pues el tamaño esperado de amplificado si no existieran inserciones sería de aproximadamente 300 nt. Los resultados de secuenciación del fragmento confirmaron nuestra hipótesis, determinándose la presencia de un intrón de 1388 nt. Una vez determinada la secuencia completa del intrón presente en el gen *psbB* de *Coccomyxa* sp. (Lu), se comprobó que existía un marco de lectura abierta que codificaba para una putativa HE. La secuencia de 351 aa de esta HE resultó ser idéntica a la hallada en *C. pringsheimii* SAG 216-7 y *C. subellipsoidea* SAG 216-13 así como homóloga a la hallada en *Coccomyxa* sp. (C-169) (Figura 4.39). Este hecho confirmaba la posible pertenencia a una sola especie de *C. pringsheimii* SAG 216-7, *C. subellipsoidea* SAG 216-13 y *Coccomyxa* sp. (Lu), así como una gran similitud con *Coccomyxa* sp. o *subellipsoidea* C-169 caracterizada por Blanc y colaboradores (2012). La identidad entre las secuencias de *C. pringsheimii* SAG 216-7, *C. subellipsoidea* SAG 216-13 y *Coccomyxa* sp. (Lu) se ha observado para varios marcadores cloroplásticos y nucleares. La posible fusión de tres especies en una sola plantea la necesidad de una revisión de las especies descritas dentro de este género.

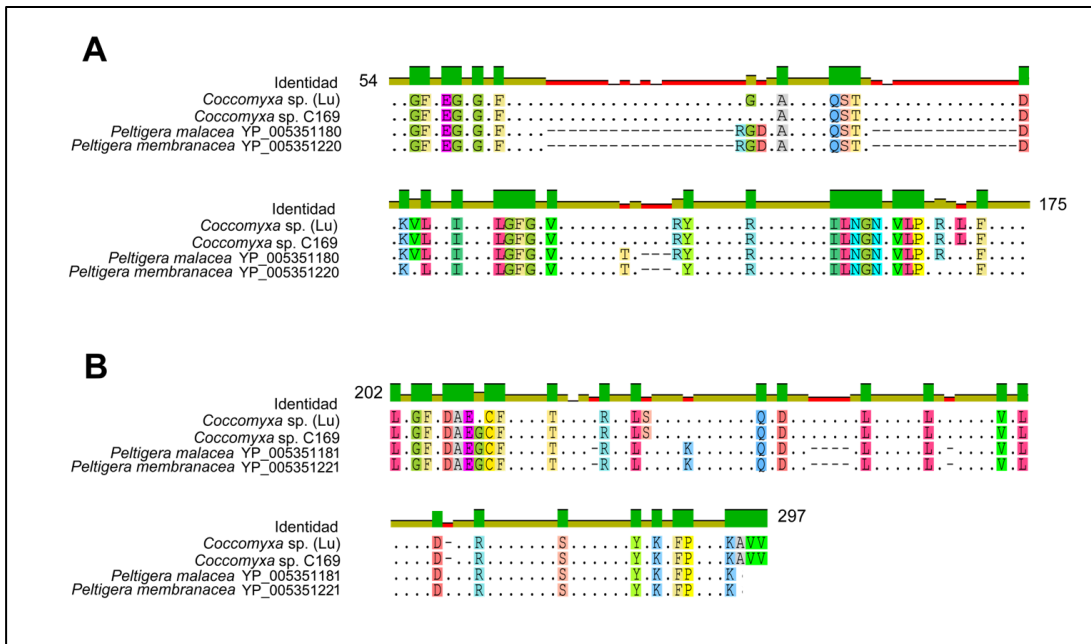
Haciendo uso de las aplicaciones bioinformáticas Pfam v21.10 (Finn *et al.*, 2006) y MOTIF Search (<http://www.genome.jp/tools/motif/>), clasificamos la HE hallada dentro de la familia LAGLIDADG 1, aunque fueron detectados dos dominios LAGLIDADG en la secuencia de aminoácidos (Figura 4.39).





**Figura 4.39** Alineamiento que muestra la homología entre las HEs halladas en *Coccomyxa* sp. (Lu), *C. pringsheimii* SAG 216-7, *C. subellipsoidea* SAG 216-13 y *Coccomyxa* sp. C-169.

Utilizando la herramienta Blastp se realizaron búsquedas de HEs similares a las representadas en la Figura 4.39. Como resultado, se encontró cierta homología entre las HEs halladas en el *psbB* y algunas HEs codificadas en intrones de tipo I en el gen *cox1* del genoma mitocondrial de hongos liquénicos del género *Peltigera* (Figura 4.40). Los líquenes de este género poseen algas del género *Coccomyxa* como fotobiontes, lo que sugiere posibles eventos de transferencia horizontal de material genético entre simbiontes.



**Figura 4.40** Alineamiento que muestra la homología entre las HEs halladas en *Coccomyxa* sp. (Lu) y *Coccomyxa* sp. C-169 con las de los líquenes *Peltigera malacea* y *Peltigera membranacea*.

Finalmente, con el objeto de hacer un uso futuro de la proteína purificada, se clonó la secuencia codificante de la HE de interés en un vector de clonación *pGEM*<sup>®</sup>-*T*, con el que transformaríamos células de *E. coli*. El procedimiento seguido hasta obtener clones que contuvieran la HE insertada en un vector bacteriano se describe en el apartado 3.3.6 de Materiales y métodos. El clon obtenido fue preservado en glicerol a -80°C con el objeto de sub-clonarlo en un vector de expresión bacteriano para expresar la proteína en cantidad suficiente como para purificarla. La purificación de la proteína permitirá el estudio de su actividad catalítica, especificidad y propiedades bioquímicas.

## ***5. DISCUSIÓN***

---



### 5.1. EVALUACIÓN DEL MÉTODO DE AISLAMIENTO DE ADN

La extracción de ADN genómico de calidad es un paso esencial en biología molecular, existiendo un amplio catálogo de métodos desarrollados a lo largo de los años por investigadores y casas comerciales. En general, estos métodos se adaptan al material de estudio, empleando distintos tipos de reactivos según las características que presenten los organismos de interés. Generalmente, la mayoría de métodos de extracción de ADN citados en el punto 3.2.2. de Materiales y métodos incluyen reactivos químicos costosos, y a menudo peligrosos, así como procedimientos complicados de larga duración. Además, los métodos de extracción comúnmente utilizados para algas y plantas incluyen un paso de disrupción mecánica de paredes celulares, empleando para ello Nitrógeno líquido y pulverización del material en morteros.

Las algas unicelulares en general, y en especial las liquénicas, presentan problemas específicos en el aislamiento de ADN, principalmente debidos a la resistencia mecánica que ofrecen sus paredes celulares, que en el caso de los géneros *Trebouxia* y *Coccomyxa* contienen esporopolenina (Honegger & Brunner, 1981; König & Peveling, 1984), un politerpeno que confiere gran dureza e impermeabilidad a la pared de estas algas. Esta particular constitución química de las paredes celulares reduce el rendimiento del proceso de extracción del ADN (Eland *et al.*, 2012). Por otra parte, en ocasiones los cultivos de algunas algas no crecen de manera rápida ni continuada y se hace difícil obtener gran cantidad de material de partida que asegure una buena extracción de ADN.

El Dimetilsulfóxido (DMSO) es un solvente ampliamente utilizado en la extracción de pigmentos fotosintéticos de hojas de plantas y algas (Nikolopoulos *et al.*, 2008), debido a su capacidad de penetración en el interior celular. Además, el tratamiento con DMSO es capaz de desestructurar las diferentes capas de la pared celular en algas verdes (König & Peveling, 1984). Basándonos en esas dos características del DMSO, propusimos un nuevo método de extracción de ADN para algas verdes utilizando este disolvente combinado con tratamiento por calor a 65°C. El procedimiento diseñado era de corta duración, tan solo 30 minutos, y necesitaba de

una mínima cantidad de material inicial ( $5 \times 10^6$  –  $20 \times 10^6$  células en cultivo y aproximadamente 15 mg para tejidos vegetales).

Entre las principales ventajas de este procedimiento de extracción se pueden citar por un lado su rapidez, ya que puede ser completado en 30 minutos, permitiendo procesar un gran número de muestras en un intervalo corto de tiempo; y por otro, la eliminación del paso de disrupción mecánica, minimizando así la posibilidad de contaminación. Asimismo, este procedimiento incluye reactivos más económicos y menos tóxicos que otros similares, ya que la manipulación del DMSO es menos peligrosa que otros reactivos habitualmente utilizados en biología molecular (ej: fenol,  $\beta$ -mercaptoetanol, proteinasa K). Además, el residuo de DMSO que pudiera quedar en las preparaciones de ADN no solo no inhibe la amplificación por PCR, sino que puede mejorar el rendimiento de la reacción (Winship, 1989; Cheng *et al.*, 1994).

## **5.2. UTILIDAD DEL MARCADOR *UNIVERSAL* PARA RESOLVER LAS RELACIONES FILOGENÉTICAS EN FOTOBIONTES LIQUÉNICOS Y ALGAS RELACIONADAS**

El nuevo par de cebadores 23S-U1/23S-U2 resultó ser eficaz para amplificar exitosamente una región del gen 23S ADNr cloroplástico, comprendida entre las posiciones 879-1837 del gen ortólogo de *E. coli*, en los diferentes grupos de organismos fotosintéticos seleccionados para el estudio (Anexos 1 y 2). Esta selección incluyó especies de Cyanobacteria, Streptophyta, Rhodophyta, Chromistas y Chlorophyta. De hecho, algunos de los organismos secuenciados eran desconocidos hasta la fecha para la base de datos GenBank, por lo que consideramos que este estudio ha contribuido a aumentar el número de secuencias genéticas útiles para realizar filogenias en grupos de organismos que contengan cloroplastos.

Los resultados obtenidos con el par de cebadores 23S-U1/23S-U2 proporcionan dos ventajas importantes respecto de los propuestos por Sherwood & Presting (2007) (Figura 4.2). Por un lado, suponen un incremento de la probabilidad de hibridación de dichos cebadores en el sitio correspondiente, debido a la baja frecuencia de aparición de intrones en la región que comprenden. Por otra parte, las secuencias de esta región del gen 23S ADNr presentan un nivel de variabilidad que permite la realización de análisis filogenéticos entre taxones más o menos cercanos, por ejemplo entre

especies, como hemos demostrado en los árboles filogenéticos realizados para los géneros *Trebouxia* y *Coccomyxa* (Figuras 4.11 y 4.12).

El árbol filogenético representado en la Figura 4.5 muestra una distribución de los diferentes grupos de organismos fotosintéticos totalmente consistente con las agrupaciones propuestas por otros autores utilizando otros marcadores cloroplásticos (Rodríguez-Ezpeleta *et al.*, 2005), así como las presentes en revisiones recientes de este tema (Green, 2011; Tirichine & Bowler, 2011).

Analicemos ahora las relaciones filogenéticas obtenidas con el marcador propuesto por nosotros en cada grupo de organismos. Comenzando con la base de la evolución cloroplástica, podemos observar que nuestra pareja de cebadores fueron capaces de amplificar las cianobacterias seleccionadas (Figura 4.6). Este hecho confirmaría el origen del gen 23S ADNr cloroplástico a partir de su gen homólogo cianobacteriano como resultado de un fenómeno de endosimbiosis (Archibald, 2009; Keeling, 2010).

Continuando con los organismos procedentes de endosimbiosis primaria, podemos observar la gran consistencia del árbol realizado para la división Streptophyta (Figura 4.7), que muestra una clara resolución de las diferentes ramas, incluidas tanto en el clado de plantas como en el de algas. Esta filogenia es consistente con otras publicadas con otros marcadores para este grupo (Qiu *et al.*, 2006; Davis *et al.*, 2014) y que ponen de manifiesto los eventos divergentes que han tenido lugar dentro de las plantas superiores. Esta similitud entre filogenias de otros autores y la propuesta por nosotros nos sirve a la vez como control para evaluar la validez de la región del gen 23S ADNr amplificada por nuestros cebadores para inferir relaciones filogenéticas.

La filogenia de algas rojas (división Rhodophyta, derivada de endosimbiosis primaria) y el grupo Chromistas, derivado de endosimbiosis secundaria, (Figura 4.8) es coincidente con las publicadas por otros autores (Yoon *et al.*, 2005; Hackett *et al.*, 2007; Chan & Bhattacharya, 2013), indicando un origen monofilético de los plastidios de Rhodophyta, Haptophyta y Heterokontophyta. Además, el árbol sitúa a los plastidios de Cryptophyta como los primeros en separarse en la evolución del grupo de Chromistas. Estos resultados son también consistentes con los expuestos por otros autores acerca de la relación entre Haptophyta y Heterokontophyta y su divergencia con el grupo Cryptophyta (Khan *et al.*, 2007).

Por último, respecto de la filogenia obtenida para la división Chlorophyta, procedente de endosimbiosis primaria (Figura 4.9), y como se mencionara en Resultados, el escaso soporte de algunas agrupaciones obtenidas dificulta interpretar cuál han sido sus secuencias de ramificación. Resultados similares han sido obtenidos en filogenias inferidas a partir del gen nuclear que codifica el ARN 18S, marcador clásicamente utilizado análisis filogenéticos de algas verdes (Pröschold & Leliaert, 2007; Darienko *et al.*, 2010). En el trabajo de Darienko y colaboradores (2010) se observan: (i) el clado *Elliptochloris*, que incluye especies de *Elliptochloris* y *Coccomyxa*; (ii) el clado *Watanabea*, que incluye dos especies de *Dictyochloropsis* (*D. irregularis* y *D. reticulata*) y *Chlorella luteoviridis*; (iii) el clado *Trebouxia*, que en nuestro trabajo contiene exclusivamente especies de este género. En el trabajo de Pröschold & Leliaert (2007) encontramos en común: (i) el clado *Tetraselmis* (Prasinophyceae IV), con tres especies del género y (ii) el clado *Myrmecia*, que en nuestro trabajo incluye las especies *M. bisecta* y *F. israelensis*, sinónima de *Myrmecia israelensis* según AlgaeBase. Las relaciones filogenéticas existentes entre los diferentes grupos de algas de esta división son complejas de resolver ya que las ramas internas que agrupan a los diferentes órdenes y clases son generalmente muy cortas respecto a la historia evolutiva del grupo (Pröschold & Leliaert, 2007). Esto puede atribuirse a distintos factores, como la existencia de homoplasias, secuencias de longitud insuficiente o diferentes tasas de variación en los organismos que componen el análisis. Dichos factores contribuirían a reducir en mayor o menor medida los valores de soporte para las filogenias realizadas en este grupo de algas verdes.

Para mejorar las reconstrucciones filogenéticas se deberían tener en cuenta, a modo de criterios, la longitud de la secuencia y el muestreo de los taxones. Aunque existen diferentes opiniones sobre este tema (Nabhan & Sarkar, 2012), el consenso que existe actualmente es que un incremento en el número de taxones se correlaciona con un ligero descenso en los valores de filogenia, mientras que un incremento en el tamaño de la secuencia o el número de genes a analizar tiene un efecto significativamente positivo en esos valores. Este hecho acentúa la necesidad de contar con marcadores moleculares adicionales, cuya combinación proporcionaría filogenias con mejor resolución (Pröschold & Leliaert, 2007). La realización de filogenias basadas en agrupaciones de genes así como en genomas totales será más común en el futuro y



se espera que resuelvan la mayoría de problemas encontrados en las filogenias basadas en un solo gen (Medlin *et al.*, 2007).

Con el objetivo de mejorar la filogenia de algas verdes mostrada en la Figura 4.9, seleccionamos taxones pertenecientes a tres de los géneros más importantes de algas liquénicas: *Asterochloris*, *Coccomyxa* y *Trebouxia*. Las secuencias obtenidas con el marcador cloroplástico propuesto permitieron obtener la separación de tres clados con alto soporte en el árbol filogenético representado en la Figura 4.10. Además, las agrupaciones de los diferentes taxones en cada clado guardan similitud con algunas de las obtenidas en filogenias de otros autores. En el caso del clado *Coccomyxa*, las agrupaciones compuestas por (i) *C. solorina bisporae*, *C. solorina saccatae*, *C. solorina croceae* y *C. peltigerae* y (ii) *C. chodatii* y *C. rayssiae* son similares a las obtenidas por Zoller y Lutzoni (2003) para el marcador ITSnr. Aunque las relaciones filogenéticas dentro del clado *Asterochloris* no queden bien resueltas, al menos podemos afirmar que todas las especies que contiene pertenecen a ese género, incluyendo *T. pyriformis*, que inicialmente fue clasificada en el género *Trebouxia*. De manera análoga Skaloud & Peksa (2010) incluyen numerosas especies que habían sido inicialmente clasificadas dentro del género *Trebouxia*, dentro del género *Asterochloris*. En el clado *Trebouxia* de la Figura 4.10, las relaciones filogenéticas entre taxones están mejor resueltas que en *Asterochloris*, resultando esperable debido al mayor número de especies que se incluyeron de este género para realizar la filogenia. Dichas relaciones son similares a las obtenidas por del Campo y colaboradores (2010a) en 15 especies del género *Trebouxia*. Se encuentran algunas agrupaciones idénticas como la de (i) *T. simplex*, *T. angustilobata*, *T. australis*, *T. brindabellae* y *T. suecica* y (ii) *T. jamesii* y *Trebouxia* sp. El resto de agrupaciones muestran variaciones, teniendo en cuenta que se han incluido más especies de *Trebouxia* que en el trabajo de del Campo y colaboradores (2010a).

La filogenia correspondiente al género *Trebouxia* (Figura 4.11) mostró una agrupación de taxones consistente con las de la Figura 4.10 y con las establecidas en del Campo *et al.* (2010).

La filogenia correspondiente al género *Coccomyxa* (Figura 4.12) presenta una agrupación de taxones coherente con las de la Figura 4.10 y con algunas de las mostradas por Zoller y Lutzoni (2003). Cabe destacar la especie *Coccomyxa* sp.1, que queda separada del resto de especies del árbol, llevándonos a pensar que quizás este

alga no pertenezca al género estudiado. Creemos también que algunos taxones podrían pertenecer a la misma especie, algo que se observa notablemente para el grupo de *C. solorina* (*bisporae*, *croceae* y *saccatae*) y *C. peltigerae*.

Probablemente la disponibilidad de un mayor número de marcadores moleculares de distintos compartimentos sub-celulares y la exploración de nuevos taxones podría contribuir a resolver la filogenia en la división Chlorophyta y en otros grupos de organismos menos estudiados. La secuenciación de genomas plastidiales y mitocondriales contribuirá a aumentar la información sobre la diversidad de organismos, pues se podrán generar nuevos marcadores moleculares para ser empleados en estudios filogenéticos.

Nosotros hemos contribuido con este estudio a incrementar el número de marcadores disponibles para ser aplicados en un amplio rango de organismos fotosintéticos, algunos de ellos con cloroplastos procedentes de endosimbiosis secundarias. Proponemos que la región amplificada del gen 23S ADNr con el par de cebadores 23S-U1/23S-U2 presenta una serie de ventajas:

- Su universalidad puede servir para identificar muestras ambientales, algo muy útil para determinar fotobiontes liquénicos de una forma rápida. De hecho, un artículo recientemente publicado por Abdelaziz *et al.* (2014) hace uso de nuestro marcador para caracterizar una nueva especie del género *Chlorella* aislada de agua dulce: *Chlorella* sp. PHC90, procedente de Quebec (Canadá).
- Su amplificación permite obtener secuencias de aproximadamente 800 nt, a partir de ADN extraído con métodos rápidos como el propuesto por nosotros en el apartado 4.1 de Resultados.
- El fragmento que amplifican carece de intrones, lo que facilita las reacciones de amplificación, secuenciación y el desarrollo de análisis filogenéticos.

Como se indicó en párrafos anteriores, la combinación de genes para realizar estudios filogenéticos es y seguirá siendo de gran utilidad para la resolución de filogenias conflictivas. El nuevo marcador propuesto por nosotros podría ser utilizado en combinación con otros para mejorar las reconstrucciones filogenéticas en un gran rango de organismos.

### 5.3. DIVERSIDAD DE INTRONES DE TIPO I EN EL GEN 23S ADNr DE FOTOBIONTES LIQUÉNICOS Y ALGAS RELACIONADAS

En trabajos anteriores de nuestro grupo de investigación se secuenció la región del gen 23S ADNr cloroplástico (posiciones 759-2596 de *E. coli*) de 15 especies de algas liquénicas del género *Trebouxia* (del Campo *et al.*, 2010a). En dichos estudios previos se encontraron 31 intrones de tipo I distribuidos de forma irregular entre las diferentes especies de *Trebouxia*, lo cual nos llevó a proponer la posible utilidad de estos elementos genéticos en la identificación de especies de dicho género.

En la presente Tesis Doctoral, se ha extendido el análisis de la misma región del gen 23S ADNr a otras 21 especies de microalgas verdes, incluidas en siete géneros diferentes: *Asterochloris*, *Coccolobrya*, *Coccomyxa*, *Dictyochloropsis*, *Dilabifilum*, *Nannochloris* y *Trebouxia*. Todas ellas son liquénicas, exceptuando cuatro especies del género *Coccomyxa* y una del género *Dictyochloropsis* (Tabla 4.3). Como resultado de estos trabajos, se han identificado y secuenciado 38 intrones de tipo I en 17 de las 21 especies estudiadas (Figura 4.14; Tabla 4.4) cuyo número y sitio de inserción varían entre las mismas (Figuras 4.14 y 4.15). Estos resultados, juntos con los obtenidos anteriormente por nuestro grupo de investigación (del Campo *et al.*, 2009; 2010a), nos llevan a proponer la utilización de esta región para ayudar a diferenciar especies de fotobiontes liquénicos y algas relacionadas.

Por otra parte, de todos los géneros estudiados en el presente trabajo de Tesis Doctoral, *Coccomyxa* es el que mayor proporción de intrones presenta, ya que las siete especies estudiadas del total de 21 microalgas (c.a. 33,3%) incluyen 20 de los 38 intrones secuenciados (c.a. 52,6%). En base a la comparación de la presencia o ausencia así como la distribución de intrones en el gen 23S ADNr en algas liquénicas y de vida libre pertenecientes al mismo género, no podemos establecer que estas características genéticas estén relacionadas con su modo de vida.

Las principales propiedades de los intrones estudiados en este trabajo son similares a los descritos previamente en el género *Trebouxia* (del Campo *et al.*, 2009; 2010a) y otras algas verdes no liquénicas (Turmel *et al.*, 1993; Lucas *et al.*, 2001; Pombert *et al.*, 2006). Las similitudes más destacables son: (i) Pertenencia a los mismos subgrupos de intrones de tipo I de acuerdo con sus motivos y estructuras secundarias

(IA1, IA3 y IB4) (Cech, 1988; Michel & Westhof, 1990) (Tabla 4.5); (ii) Inserción de la mayoría de los intrones en los mismos sitios previamente descritos (Figura 4.16); (iii) Presencia de marcos de lectura abierta (*Open Reading Frames*, ORFs) que codifican para *Homing* endonucleasas (HEs) de la familia LAGLIDADG (Figura 4.14).

Sin embargo, también se han observado diferencias interesantes en algunas características de los intrones encontrados en nuestro trabajo respecto a los previamente descritos por nuestro grupo y por otros investigadores. La principal diferencia fue la presencia de dos nuevos sitios de inserción desconocidos hasta la fecha en algas verdes: el cL1943 y el cL2512. El sitio de inserción cL1943, había sido descrito por Haugen & Bhattacharya (2004) en mitocondria de *Amoebidium parasiticum* (AF538042). Nosotros lo hemos encontrado en una especie del género *Dilabifilum* (*Dilabifilum* spec.2 SAG 2039) y para delimitarlo se recurrió a la comparación de la secuencia obtenida de esta especie con la de *Dilabifilum* spec.1 SAG 2038, cuyo 23S ADNr carece de este intrón. Búsquedas de secuencias homólogas a las de este intrón con la herramienta BLAST no proporcionaron homologías significativas con intrones de otras algas. Solamente se observó cierta similitud con los intrones presentes en *Chlamydomonas frankii* (L43352) (inserción cL2263) y *Floydiella terrestris* (GU196268) (inserción no determinada). Probablemente la secuenciación de la región 23S ADNr cloroplástica de un mayor número de especies de *Dilabifilum* aportaría más información para conocer si esta inserción cL1943 es característica de las especies de este género.

El sitio de inserción cL2512 fue hallado en el fotobionte *Dictyochloropsis reticulata*. Inicialmente se pensó que el intrón correspondía a la inserción cL2500 pero al alinear detalladamente secuencias que contenían ese intrón con la de *D. reticulata* se observó que la secuencia en el entorno del sitio de inserción estaba desplazada 12 nucleótidos. Al realizar búsquedas de secuencias homólogas a la de este intrón con la herramienta BLAST, no se encontraron homologías significativas con intrones secuenciados hasta la fecha. Este hecho da idea de lo novedoso y peculiar de la secuencia de este intrón. El descubrimiento de intrones de tipo I en nuevos sitios de inserción y que contienen ORFs codificantes de HEs (como es el caso del cL2512) lleva a suponer la posible existencia de meganucleasas en el gen 23S ADNr de algas verdes que reconozcan nuevas dianas todavía por descubrir, especialmente en géneros poco

estudiados como *Dilabifilum* del que solamente hay disponibles 19 secuencias en GenBank.

#### **5.4. DIVERSIDAD DE HOMING ENDONUCLEASAS CODIFICADAS EN INTRONES DE TIPO I EN EL GEN 23S ADN<sub>r</sub> DE FOTOBIONTES LIQUÉNICOS Y ALGAS RELACIONADAS**

De los 38 intrones de tipo I secuenciados en este trabajo, 19 contienen en su interior ORFs que codifican para putativas HES en las especies estudiadas de los géneros *Coccomyxa*, *Dictyochloropsis*, *Dilabifilum* y *Trebouxia*, pero no en las del género *Asterochloris*. Los resultados obtenidos indican que todas las HES encontradas son de la familia LAGLIDADG, habiendo una proporción bastante equitativa de HES de las familias LAGLIDADG 1 y LAGLIDADG 2 (Tabla 4.6). Este resultado es sorprendente ya que en la bibliografía se afirma que las HES de la familia LAGLIDADG 2 son más comunes y abundantes que las de la familia LAGLIDADG 1 (Chevalier & Stoddard, 2001; Lucas *et al.*, 2001).

La comparación de la longitud de la secuencia de aminoácidos de las HES halladas en el presente trabajo de Tesis Doctoral con las descritas en estudios previos (Lucas *et al.*, 2001; del Campo *et al.*, 2010a) muestra una mayor longitud media en las halladas en nuestro trabajo (entre 152 y 267 aa). Teniendo en cuenta el ciclo de *homing* descrito por Goddard & Burt (1999) es muy probable que las HES con mayor número de aa sean funcionales, mientras que las de menor número suelen ser secuencias más o menos degeneradas carentes de funcionalidad. De acuerdo con estos datos y con nuestros resultados, es probable que los géneros *Coccomyxa*, *Dictyochloropsis* y *Dilabifilum* puedan albergar mayor proporción de HES funcionales que los géneros *Trebouxia* y *Asterochloris*. Las HES de mayor tamaño suelen pertenecer a la familia LAGLIDADG 2 (Stoddard, 2014) comprendiendo generalmente más de 200 aa. Todas las HES de la familia LAGLIDADG 2 halladas en el desarrollo de esta Tesis tienen esta característica, a excepción de la presente en el intrón cL2449 de *Coccomyxa* sp.2 (Tabla 4.6). Sin embargo, las HES halladas pertenecientes a la familia LAGLIDADG 1 tienen generalmente menos de 200 aa, exceptuando las codificadas en los intrones cL1923 y cL1931 de especies de los géneros *Dictyochloropsis* y *Dilabifilum*. Estas HES presentaron una longitud inusual, de 216 y 228 aa en los intrones cL1923 de *D. reticulata*, *Dilabifilum* spec.2, respectivamente y de 267 aa en el intrón cL1931 de

*Dilabifilum* spec.2 (Tabla 4.6). Estos tamaños son más propios de HEs de la familia LAGLIDADG 2 (Stoddard, 2014). Se ha propuesto que las HEs de la familia LAGLIDADG 2 podrían haberse originado a partir de un evento de duplicación de las HEs de la familia LAGLIDADG 1 (Belfort & Roberts, 1997; Lucas *et al.*, 2001; Haugen & Bhattacharya, 2004).

A pesar de todas estas reglas generales, en la HE de 267 aá del intrón cL1931 de *Dilabifilum* spec.2 de la familia LAGLIDADG 1 se detectó la existencia de dos motivos LAGLIDADG separados entre sí por 105 residuos (Tabla 4.6). Es posible que la inusual longitud de esta HE (aproximadamente el doble que las HEs codificadas por otros intrones cL1931) y la presencia de dos motivos LAGLIDADG (característica propia de las HEs de la familia LAGLIDADG 2) en lugar de uno solo (propio de las HEs de la familia LAGLIDADG 1) sean la consecuencia de un fenómeno de duplicación de una HE preexistente en un momento de la evolución. Se ha encontrado un caso parecido en la HE codificada en el mismo intrón (cL1931) del alga *Haematococcus lacustris* (AAL77525). En este caso el tamaño de la proteína es de 252 aá (aproximadamente el doble que las HEs codificadas por otros intrones cL1931) (Lucas *et al.*, 2001). En definitiva, se trata de dos HEs que presentan características propias de la familia LAGLIDADG 2 a pesar de estar codificadas en el intrón cL1931, que salvo estas dos excepciones, incluye HEs de la familia LAGLIDADG 1. Otro hecho destacable es que I-Cchl y I-Crall codificadas en intrones cL1931 presentan una secuencia de aá prácticamente idéntica (Figura 4.17). Este hecho no es sorprendente si se observa el árbol filogenético de la Figura 4.12, donde puede apreciarse la extraordinaria proximidad de las dos especies.

El estudio teórico de las HEs halladas en las diferentes algas proporcionó datos de interés para conocer las propiedades físico-químicas de estas enzimas. En relación al tamaño, todas ellas son pequeñas proteínas de menos de 40 kDa (Tabla 4.7), una característica común en este tipo de moléculas, teniendo en cuenta las limitaciones de longitud de los intrones en los cuales residen (Chevalier & Stoddard, 2001). Los parámetros analizados indican que estas proteínas son basófilas, con un alto porcentaje relativo de aá cargados positivamente a pH neutro, lo que es consistente con su unión al ADN, molécula con carga negativa. Además, los valores negativos que presenta el índice de hidropaticidad (GRAVY) indican que estas proteínas son

hidrofílicas, algo consistente con la naturaleza de las enzimas de unión al ADN y con el medio acuoso en el que se encuentran (Moure *et al.*, 2002).

El análisis de las estructuras secundarias teóricas ha permitido predecir la disposición de alfa hélices y láminas beta en las HEs encontradas. Las características estructurales de algunas de las HEs halladas se muestran en las Figuras 4.17-4.19, donde aparecen diferentes alineamientos de algunas HEs clasificadas en función de los sitios de inserción (cL1931, cL2263 y cL2500). La estructura con dos pliegues característicos  $\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$  es determinante de la funcionalidad de estas enzimas debido a que la unión al ADN se produce mediante las láminas beta que constituyen cada dominio (Chevalier & Stoddard, 2001; Arnould *et al.*, 2006). Sin embargo, en el desarrollo de esta Tesis, no se ha encontrado ninguna HE que los conserve íntegramente. Solamente en I-CchIII y I-Dsp1I, ambas codificadas en intrones cL2500, se ha encontrado una de las regiones que conserva dicho dominio, faltando en principio el segundo dominio homólogo requerido para un correcto acoplamiento con el ADN diana (Figura 4.19). No obstante, para conocer si las proteínas encontradas son realmente HEs funcionales deberían expresarse en vectores adecuados y ser purificadas para realizar los ensayos enzimáticos que determinen su posible actividad catalítica (Arnould *et al.*, 2006; Jacoby *et al.*, 2012).

Estudios previos mostraron la similitud de los intrones de tipo I localizados en la misma región del gen 23S ADNr cloroplástico aquí estudiado de algas del género *Trebouxia* con los de otros organismos muy distantes desde un punto de vista filogenético (del Campo *et al.*, 2009). En dicho estudio, diversos análisis filogenéticos mostraron que: (i) los intrones presentes en las posiciones 1917, 1931 y 1951 están relacionados con intrones localizados en sitios de inserción homólogos en el ortólogo de bacterias y cianobacterias y que (ii) los intrones cL2449 están relacionados con intrones localizados en sitios de inserción homólogos en el ortólogo de mitocondrias de hongos. Estas observaciones llevaron a proponer una posible elevada frecuencia de transferencias horizontales de material genético entre organismos filogenéticamente distantes. Dado que las algas estudiadas están implicadas en simbiosis liquénicas, los talos liquénicos podrían ser buenos candidatos como escenarios de intercambio de material genético a lo largo de la evolución debido a la estrecha relación entre simbiosis intratalinos, su enorme longevidad y antigüedad. El presente trabajo de

Tesis Doctoral amplía y extiende dichos estudios iniciales, aportando información adicional respecto a posibles transferencias horizontales de material genético entre diferentes compartimentos sub-celulares y tipos de organismos.

En el caso de los intrones cL2249, hasta la fecha no se había encontrado ningún fotobionte liquénico cuyo gen 23S ADNr tuviera este intrón invadido por una HE. La posición 2449 en el gen que codifica el ARNr de la subunidad grande de mitocondrias de levaduras está ocupado por el elemento  $\omega$  (también referido como r1 y ScLSU.1), que es un intrón de tipo I que codifica una HE de la familia LAGLIDADG (Dujon, 2005). Este elemento presenta homología con intrones cL2449 aquí secuenciados como ya se había demostrado para algunas especies de *Asterochloris* y *Trebouxia* (del Campo *et al.*, 2009). Goddard & Burt (1999) demostraron la transferencia horizontal de secuencias de ADN mitocondrial entre especies de levaduras analizando las HEs del elemento  $\omega$  en 20 especímenes. En el desarrollo de esta Tesis encontramos este intrón en *Coccomyxa* sp.2 SAG 2040 donde codifica una HE de 197 aá (Csp2.cL2449 en Tabla 4.6). Comparando las secuencias de estos intrones pueden apreciarse diferentes estados de degeneración: desde un intrón de considerable longitud (1185 nt) en *Coccomyxa* sp.2 (Csp2.cL2449 en Tabla 4.6) que codifica una HE, hasta intrones de tamaño mucho más pequeño (aprox. de 300 nt) en otras especies de varios géneros como *C. chodatii*, *C. pringsheimii*, *C. sp.3*, *D. reticulata* y *T. anticipata* (Tabla 4.4) pasando por tamaños intermedios (aprox. 600 nt) en *Coccomyxa* sp.1 SAG 49.84 (Csp1.cL2449 en Tabla 4.4). Estos datos son consistentes con el ciclo de invasión, degeneración, desaparición y re-invasión de este tipo de elementos genéticos propuesto para el elemento  $\omega$  en levaduras (Goddard & Burt, 1999) y que fue representado en la Figura 1.4 de la Introducción. La distribución de este elemento entre las diferentes especies y géneros estudiados es independiente de las relaciones filogenéticas inferidas en base al gen 23S ADNr como ya se había observado en trabajos anteriores (del Campo *et al.*, 2009). Este hecho refuerza la hipótesis de la transferencia horizontal de este elemento entre especies de géneros diferentes de algas e incluso entre cloroplastos de fotobiontes y mitocondrias de micobiontes.



## 5.5. LAS HES DE FOTOBIONTES LIQUÉNICOS ESTÁN ESTRECHAMENTE RELACIONADAS CON HES DE BACTERIAS

Análisis filogenéticos basados en secuencias de *aa* de las HEs codificadas en los intrones cL1917, cL1931, y cL1951 muestran datos interesantes sobre la distribución de estas proteínas, muy similares en organismos filogenéticamente distantes (Figura 4.21). Por ejemplo, la agrupación de las proteínas insertadas en intrones cL1931 y cL1951 es consistente con la filogenia de Haugen & Bhattacharya (2004) y Haugen *et al.* (2007), que indican además un origen más antiguo para la inserción 1917. I-Cral, perteneciente a la inserción 1917, presenta homología con HEs halladas en cloroplastos de otras algas de la familia Trebouxiophyceae. Las HEs I-Drell y I-Cmul, a pesar de estar codificadas en intrones cL1951, parecen presentar historias evolutivas diferentes, aunque los valores soporte del clado que incluye las HEs codificadas en intrones cL1951 no permiten confirmar esta observación. En relación con los intrones cL1931 cabe destacar la proximidad filogenética de I-Cchl y I-Crall, observada en los alineamientos previos mostrados para estas dos enzimas (Figura 4.17). La HE I-Dsp2II se agrupa con el alga verde *H. lacustris* con la que comparte la presencia de dos motivos LAGLIDADG en lugar de uno pero no con I-Cchl y I-Crall. El resto de clados del árbol son consistentes con los obtenidos en análisis filogenéticos previos (del Campo *et al.*, 2009). Otra novedad remarcable del presente trabajo es la considerable homología encontrada entre las HEs de los intrones cL1951 y una HE de codificación mitocondrial de un hongo liquénico, *Peltigera malacea* (Figura 4.21). Esta es la primera vez que se encuentra homología entre una HE codificada en cloroplastos de algas liquénicas y un hongo liquénico. Es muy probable que esto se deba a la enorme escasez de datos genómicos de hongos liquénicos (datos que están comenzando a generarse) en comparación con otros hongos.

La Figura 4.22 muestra las relaciones filogenéticas de HEs codificadas en los intrones cL2263 y cL2512 de algas liquénicas con las de otras algas de vida libre. En esta filogenia pueden observarse la división del clado que agrupa a las HEs codificadas en intrones cL2263 en sub-clados: dos HEs (I-CchlII y I-CrallIII) se agrupan en uno de ellos junto a una HE de un alga verde de vida libre (Servin-Garcidueñas & Martínez-Romero,

2012); las otras dos se distribuyen en dos sub-clados separados, uno constituido solo por HEs de *Trebouxia* (I-TimI) y otro con HEs de *T. mucosa* y *T. showmanii* (I-Dsp2III).

En trabajos previos se había encontrado una alta conservación de la secuencia de áa del extremo Carboxilo terminal (C-t) de HEs codificadas en intrones cL2263 de algas verdes y la de la proteína PPR OTP51 de *A. thaliana* (de Longevialle *et al.*, 2008). La proteína OTP51 es imprescindible para el *splicing* de un intrón de tipo II del gen *ycf3* de cloroplastos. En esta Tesis mostramos el elevado grado de conservación de la secuencia de áa del extremo C-t de varias proteínas PPR de diversas plantas y de las HEs codificadas por intrones insertos en el gen 23S ADNr de diversas algas liquénicas (Figuras 4.23 y 4.24). Estas observaciones no se restringen a HEs codificadas en intrones cL2263 como indican de Longevialle *et al.* (2008) sino que se extienden a HEs codificadas en intrones cL2500 y cL2512 (Figura 4.24B).

Las proteínas PPR deben su nombre a un motivo PPR degenerado formado por una secuencia de 34 áa que aparece en múltiples copias dispuestas en tándem (Figura 4.24A). Estos motivos repetidos sirven para la unión de la proteína a moléculas de ARN (Saha *et al.*, 2007). Aparte de estos motivos PPR este tipo de proteínas posee motivos adicionales en el extremo C-t, entre ellos motivos LAGLIDADG. Se sabe que las proteínas PPR median procesos post-transcripcionales cruciales en la expresión del genoma de cloroplastos tales como edición de ARN, procesamiento de transcritos policistrónicos, eliminación de intrones e inicio de la traducción (Schmitz-Linneweber *et al.*, 2005; del Campo, 2009).

En los organismos vegetales la información genética se distribuye en tres compartimentos sub-celulares: núcleo, cloroplasto y mitocondria. Está bastante bien establecido que se han producido transferencias de material genético desde el cloroplasto y la mitocondria hacia el núcleo tras el proceso de endosimbiosis. Por tanto la mayoría de las proteínas presentes en los cloroplastos y las mitocondrias están codificadas en el núcleo, traducidas en el citoplasma e importadas hacia el orgánulo correspondiente. Es posible que HEs localizadas originariamente en los genomas organulares se transfirieran al núcleo al igual que otros muchos genes, evolucionando posteriormente hacia proteínas PPR pero conservando el motivo LAGLIDADG. De hecho descendientes de HEs de la familia LAGLIDADG se han encontrado como HEs

libres (Watabe *et al.*, 1981; 1983) y maturasas implicadas en la eliminación de intrones (Monteilhet *et al.*, 2000).

En definitiva, el hecho de que las filogenias construidas en base a secuencias de aá de HEs estudiadas incluyan agrupaciones de organismos filogenéticamente distantes, sugiere la transferencia horizontal de los intrones de tipo I entre algas verdes y bacterias o cianobacterias (Haugen *et al.*, 2007; del Campo *et al.*, 2009) así como entre hongos y algas (del Campo *et al.*, 2009). La conexión biológica entre estos organismos es evidente si consideramos la diversidad de la simbiosis líquénica. Los líquenes podrían constituir buenos escenarios en los que se favoreciera el intercambio de material genético entre los diversos simbiontes entre los que se incluyen hongos (tanto ascomicetos como basidiomicetos), algas verdes, cianobacterias y bacterias (Friedl *et al.*, 2000; del Campo *et al.*, 2009).

#### **5.6. *Ramalina farinacea* REPRESENTA UN NUEVO PATRÓN DE SIMBIOSIS LIQUÉNICA EN LA QUE COEXISTEN DOS ESPECIES DEL GÉNERO *Trebouxia***

La mayoría de estudios sobre la estructura de poblaciones y patrones de asociación simbiótica en líquenes habían descrito la presencia de una única especie de fotobionte por talo. Estos hallazgos estarían de acuerdo con el Principio de Gause (Gause, 1934), que declara que la presencia de dos especies relacionadas con requerimientos similares dentro del mismo nicho ecológico a menudo resulta en la exclusión competitiva y la prevalencia del competidor que pueda mantenerse a sí mismo con el nivel más bajo de recurso limitante. En el caso de los líquenes, cabría esperar que la coexistencia de más de un fotobionte por talo condujera a la extinción de uno de ellos. Sin embargo, cada vez existen más evidencias de la coexistencia de más de un genotipo de alga en talos líquénicos, como en las especies *Evernia mesomorpha* (Piercey-Normore, 2006) y *Protoparmeliopsis muralis* (Guzow-Krzeminska, 2006).

El estudio de diferentes poblaciones del líquen *Ramalina farinacea* aquí presentado ha puesto de manifiesto la coexistencia dentro del talo de dos especies diferentes de *Trebouxia* (TR1 y TR9). Esta es la primera referencia de este tipo de asociación, apoyada por resultados multidisciplinares que engloban análisis morfológicos, moleculares y fisiológicos.

Los análisis moleculares basados en la secuenciación de una región del gen 23S ADNr (Figura 4.26) y ITSnr (Figuras 4.28 y 4.29) resultaron consistentes con la diferenciación de ambos fotobiontes en base a su morfología (del Campo *et al.*, 2010b). Los resultados de los estudios fisiológicos fueron de nuevo significativamente diferentes entre TR1 y TR9. Se encontraron diferencias tanto a nivel de pigmentos (Figura 4.31) como en actividades enzimáticas (Figuras 4.32 y 4.33). De hecho, esta caracterización fisiológica preliminar de TR1 y TR9 en condiciones estándar o control sentó las bases para trabajos fisiológicos posteriores en los que se estudió el comportamiento de ambas algas frente a condiciones de estrés variables, como temperatura, irradiancia, metales pesados e Hidroperóxido de cumeno (Casano *et al.*, 2011; del Hoyo *et al.*, 2011; Alvarez *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en estos trabajos son muy interesantes para comprender, desde un punto de vista ecofisiológico, el significado de la coexistencia de estos dos fotobiontes en el mismo talo. Asimismo, la existencia de diferencias significativas entre estos dos tipos de microalgas (TR1 y TR9), las cuales no obstante presentan caracteres morfológicos y moleculares propios del género *Trebouxia*, nos llevó a proponer su pertenencia a dos especies diferentes de *Trebouxia*. TR1 podría ser en realidad *T. jamesii* por su gran semejanza con *T. jamesii* UTEX 2233 mientras que TR9 podría ser una nueva especie de *Trebouxia* no descrita hasta la fecha.

En este estudio no solamente se demuestra que *Ramalina farinacea* liqueniza con dos especies diferentes de *Trebouxia* sino que ambas microalgas coexisten en todos los talos de todas las poblaciones estudiadas. La demostración de la coexistencia de ambos fotobiontes se basó en una primera aproximación en el diseño de cebadores específicos para amplificar porciones del gen 23S ADNr. La amplificación con ambos pares de cebadores de todos los talos de *R. farinacea* confirmó la presencia de TR1 y TR9 en las diferentes poblaciones (Figura 4.28). Posteriormente, se recurrió a la secuenciación de los ITS nucleares de cada uno de los dos fotobiontes en cada talo recolectado con cebadores específicos para cada uno de ellos obteniéndose dos secuencias por cada talo (una correspondiente a TR1 y la otra correspondiente a TR9) cuyos números de acceso se encuentran el Anexo 4.

En un principio, cuando se amplificaron los distintos talos liquénicos de *Ramalina farinacea* con los ITSnr genéricos para algas del género *Trebouxia* (Kroken &

Taylor, 2000) se obtuvo una única secuencia que, al ser amplificada, correspondía a uno de los fotobiontes presentes en el talo. Así, del total de 31 muestras recolectadas del líquen, 21 correspondieron a secuencias de tipo TR1 y 10 a secuencias de tipo TR9 (Figura 3 de la Publicación 4). Como puede observarse en esta figura (ver Tabla 4.9 para la localización geográfica), los talos con ITSnr de tipo TR1 fueron recolectados en poblaciones de Península Ibérica y California mientras que los que presentan ITSnr de tipo TR9 fueron recolectados en las Islas Canarias. Estos resultados fueron interpretados como consecuencia de diferencias en la abundancia de las dos algas dentro de cada talo: TR1 sería más abundante en los talos de Península Ibérica y California mientras que TR9 sería más abundante en los talos Canarios. Estos resultados nos llevaron a definir el término *fotobionte predominante* como el alga cuya secuencia de ITSnr es obtenida mediante la amplificación con cebadores genéricos de *Trebouxia* (Kroken & Taylor, 2000) y el *fotobionte no predominante* como el alga cuya secuencia es obtenida sólo mediante la amplificación con el cebador específico de TR1 o TR9. Otra diferencia destacable de TR1 y TR9 es el diferente grado de presencia en otras especies de líquenes diferentes de *R. farinacea*. Mientras que TR1 estaba presente en una gran diversidad de especies de líquenes de diferentes géneros (Figura 4.30), TR9 aparecía en apenas dos especies de líquenes aparte de *Ramalina farinacea* (Figura 3 de la Publicación 4).

Los resultados globales obtenidos en el estudio de los fotobiontes de *Ramalina farinacea* llevan a pensar que este líquen representa un nuevo patrón de asociación simbiótica que es mantenido a través de la propagación simultánea o conjunta del micobionte y las dos mismas especies de *Trebouxia*. Esto sería consistente con la propagación exclusivamente asexual de *Ramalina farinacea* mediante la dispersión de propágulos (soredios). La diversidad de hábitats y características climáticas de las diferentes localizaciones muestreadas en las que se desarrolla *R. farinacea* refleja la plasticidad ecofisiológica de esta simbiosis. Es probable que esta plasticidad pueda lograrse modulando la abundancia relativa de cada uno de sus dos fotobiontes, los cuales parecen presentar comportamientos fisiológicos diferentes. Esta estrategia permitiría al líquen hacer frente a las condiciones cambiantes y a menudo estresantes del medio en el que se desarrolla. Además, este líquen constituye un sistema modelo de interés para ser estudiado dentro de la teoría de la evolución del hologenoma

(Rosenberg *et al.*, 2009), la cual enfatiza la cooperación y competición entre simbioses y sus hospedadores como elemento esencial en la adaptación y evolución de los organismos en respuesta a futuros cambios ambientales.

### **5.7 *Lichenomphalia umbellifera* PRESENTA UNA ÚNICA ESPECIE DE *Coccomyxa* CON CARACTERÍSTICAS SIMILARES A OTRAS ALGAS DEL GÉNERO**

Apenas existe información acerca de los modelos de asociación alga-hongo en el caso de los líquenes que poseen basidiomicetos como micobiontes. Por este motivo, en este último apartado nos propusimos estudiar los fotobiontes del basidioliquen *Lichenomphalia umbellifera* (L.) (Redhead, Lutzoni, Moncalvo & Vilgalys). El aislamiento en cultivo axénico del fotobionte asociado ha permitido su caracterización tanto molecular en este trabajo de Tesis Doctoral, como estudios fisiológicos posteriores.

La determinación de la secuencia de la región del gen 23S ADNr descrita en el apartado 4.2 de Resultados, ha permitido su clasificación dentro del género *Coccomyxa* así como estudiar su relación con otras especies del mismo género. El mapa genético de dicha región del gen 23S ADNr (Figura 4.35) resultó muy sencillo al poseer un único intrón de tipo I en comparación con los de otras especies de este género (Figura 4.14) en las que se encontraron hasta siete intrones (*C. rayssiae* SAG 216-8). Este patrón resultó ser muy similar al de *C. prinsheimii* SAG 216-7 y *C. subellipsoidea* SAG 216-13 (ambas fotobiontes de *L. umbellifera*), lo que llevó a pensar en la posibilidad de que estas microalgas consideradas hasta el momento como especies diferentes, pertenecieran en realidad a la misma especie.

El árbol filogenético construido en base al alineamiento de las secuencias de 14 especies de *Coccomyxa* y dos especies de *Chlamydomonas* como grupo externo (Figura 4.36) mostró la ausencia de diferenciación clara en clados según el modo de vida de las algas (de vida libre o fotobionte de ascoliquen o de basidioliquen). El caso más patente es el de *C. mucigena* y *C. viridis* que resultaron tener secuencias idénticas a pesar de ser fotobiontes del ascomiceto *Peltigera aptosa* y de vida libre, respectivamente. Esta observación se corroboró para el caso de un marcador de codificación nuclear que incluía las secuencias del ARNr 5S e ITS2 (Figura 4.37). Estos resultados contradicen las primeras observaciones de Zoller & Lutzoni (2003). Estos autores distinguían tres linajes diferentes: (i) uno que contenía especies pertenecientes a ascolíquenes del

orden Peltigerales; (ii) otro se incluían las especies de vida libre y (iii) un tercero en el que se incluían las especies pertenecientes a basidiolíquenes del género *Omphalina* (hoy conocido como *Lichenomphalia*). Como puede observarse en la Figura 4.36, al añadir más especímenes del género *Coccomyxa* a los del trabajo de Zoller & Lutzoni (2003), cuyas secuencias se han obtenido en el presente trabajo y de GenBank, se observó la ausencia de agrupamiento de especies según su modo de vida. Lo cierto es que se han encontrado algas con secuencias idénticas del ITS2 tanto de vida libre como fotobiontes tanto de ascolíquenes como de basidiolíquenes (Figura 4.37).

Asimismo, teniendo en cuenta las relaciones filogenéticas mostradas en las Figuras 4.36 y 4.37, *Coccomyxa* sp. (Lu) aislada en este trabajo a partir de un talo de *L. umbellifera* recolectada en la provincia de Guadalajara se encuentra muy próxima a las especies *C. pringsheimii* (SAG 216-7) y *C. subellipsoidea* (SAG 216-13). También aparece próxima a *Coccomyxa subellipsoidea* o sp. C-169 (de vida libre) de la que recientemente se ha secuenciado los tres genomas (nuclear, cloroplástico y mitocondrial) (Smith *et al.*, 2011; Blanc *et al.*, 2012). Asimismo, en la Figura 4.37 puede observarse la enorme similitud de secuencias del ITS2 entre el alga *Coccomyxa* sp. (Lu) y las de varios especímenes aislados de diversas especies del género *Lichenomphalia* recolectadas en Canadá, Islandia y Groenlandia (Zoller & Lutzoni, 2003). Ello corrobora la práctica ausencia de variabilidad genética entre los fotobiontes del género *Lichenomphalia* observada por Zoller & Lutzoni (2003) incluso en áreas geográficas tan diferentes como las anteriormente citadas. En base a los resultados obtenidos en este análisis preliminar del fotobionte de *L. umbellifera* recolectado en la provincia de Guadalajara y los de Zoller & Lutzoni (2003), sería razonable pensar en la existencia de una única especie de *Coccomyxa* asociada a diversas especies de basidiolíquenes del género *Lichenomphalia* geográficamente distantes y cuya variabilidad genética es muy reducida.

## 5.8. *Coccomyxa* sp. (Lu) REPRESENTA UN POSIBLE RECURSO GENÉTICO DE APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Continuando con el análisis molecular de *Coccomyxa* sp. (Lu) y el estudio de HEs codificadas en intrones de tipo I, realizamos el estudio del gen *psbB*. Este gen codifica la proteína D2 del fotosistema II y presenta intrones de tipo I codificantes de HEs de la familia LAGLIDADG en algunas algas verdes de la división Chlorophyta. El interés por las HEs de esta familia en particular se debe al hecho de que son las más utilizadas como herramienta en ingeniería genética (Stoddard, 2014). Actualmente la empresa *New England Biolabs®Inc* comercializa cuatro HEs de las cuales solamente una, I-Ceul, está codificada en un intrón de tipo I del gen 23S ADNr (cL1923) del alga verde *Chlamydomonas eugametos* (Gauthier *et al.*, 1991). A pesar del incremento en el número de HEs caracterizadas (132 en mayo de 2014, según Rebase), el rango de dianas específicas no es todavía suficiente para su utilización efectiva. Por este motivo, numerosos trabajos en el campo de la biotecnología se han orientado al diseño de nuevas HEs con modificaciones en la especificidad de las ya existentes, con el objetivo de multiplicar el número de dianas disponibles (Arnould *et al.*, 2006; Marcaida *et al.*, 2010; Pessach & Notarangelo, 2011).

A diferencia del gen 23S ADNr del que hay varias secuencias disponibles en algas verdes, el gen *psbB* apenas ha sido secuenciado (apenas hay una treintena de secuencias). El gen *psbB* no se encuentra en algunos genomas plastidiales de algas verdes lo que indica su transferencia al núcleo. Sin embargo, en la mayoría de las algas al igual que en plantas está codificado en el genoma de cloroplastos. De la treintena de secuencias del gen *psbB* de cloroplastos de algas verdes actualmente disponibles, solamente dos poseen intrones codificantes de HEs. Estas dos secuencias corresponden precisamente a algas de los géneros *Coccomyxa* (*Coccomyxa* sp. C-169, acceso NC015084) y *Trebouxia* (*Trebouxia agregata*, acceso EU123964).

En el caso de *Coccomyxa* sp. (Lu) aislada de *L. umbellifera* en el presente trabajo, el gen *psbB* posee un intrón que codifica una HE de la familia LAGLIDADG de 351 aá, similar a la de *Coccomyxa* sp. C-169 (Figura 4.39). El tamaño de esta proteína es más grande que en *T. aggregata* (294 aá) y *Coccomyxa* sp. C-169 (338 aá). Aunque esta HE fue clasificada dentro de la familia 1, se encontraron en ella dos dominos



LAGLIDADG. La misma situación puede observarse en *T. aggregata* y *Coccomyxa* sp. C-169. Es posible que, al igual que se postuló para la HE insertada en el cL1931 de *Dilabifilum* spec. 2, nos encontremos ante un evento de duplicación del motivo LAGLIDADG para la generación de una nueva endonucleasa de doble motivo (Belfort & Roberts, 1997; Lucas *et al.*, 2001; Haugen & Bhattacharya, 2004).

En el futuro, dado el potencial que han demostrado tener las algas liquénicas, nos proponemos continuar realizando estudios más profundos en nuevas especies. El hallazgo de un elevado número de HEs, algunas de ellas en intrones insertados en sitios no descritos hasta la fecha, contribuirá a ampliar el catálogo de HEs potencialmente funcionales y con capacidad de reconocer dianas nuevas. Con este tipo de estudios esperamos poner a disposición de la comunidad científica nuevas HEs con propiedades adecuadas para su uso en ingeniería genética.

En una línea de investigación complementaria y más orientada a la biotecnología, en este trabajo hemos comenzado clonando la porción codificante de la HE encontrada en el gen *psbB* de *Coccomyxa* sp. (Lu). El clon obtenido ha sido preservado en glicerol a -80°C con el objeto de sub-clonarlo en un vector de expresión bacteriano para expresar la proteína en cantidad suficiente como para purificarla. La purificación de la proteína permitirá el estudio de su actividad catalítica, especificidad y propiedades bioquímicas. Nos proponemos realizar este mismo tipo de experimentos con algunas de las HEs que posean propiedades interesantes en cuanto a especificidad de secuencia, actividad, etc.



## ***6. CONCLUSIONES***

---



A continuación se describen las principales conclusiones de la presente Tesis Doctoral:

1. El método rápido de aislamiento de ADN y el marcador molecular *universal* basado en el uso de una región del 23S ADNr cloroplástica, constituyen nuevas herramientas moleculares que contribuirán a actualizar la clasificación y estudiar la diversidad de fotobiontes liquénicos y microalgas en general.
2. Dicho marcador ha permitido identificar y diferenciar especies así como realizar reconstrucciones filogenéticas en todos los géneros de algas estudiados. Estas reconstrucciones han puesto de manifiesto deficiencias en la clasificación actual de los fotobiontes liquénicos y la necesidad de reclasificar varias especies, sobre todo del género *Coccomyxa*.
3. El número y distribución variable de intrones de tipo I en el gen 23S ADNr es independiente de las relaciones filogenéticas existentes entre los fotobiontes estudiados. Este hecho sugiere la posible transferencia horizontal de material genético, facilitada probablemente por el estrecho contacto que establecen los organismos en las simbiosis liquénicas.
4. El análisis de dichos intrones ha permitido la identificación de un elevado número de *Homing* endonucleasas de la familia LAGLIDADG, las cuales se subclasifican en LAGLIDADG 1 y 2, a partes casi iguales.
5. Las *Homing* endonucleasas insertas en el mismo intrón, son generalmente más largas en el género *Coccomyxa* que en *Trebouxia* y presentan unas características estructurales apropiadas para ser endonucleasas con actividad catalítica.
6. Precisamente, una *Homing* endonucleasa de 351 aminoácidos codificada en un intrón del gen *psbB* del fotobionte de *Lichenomphalia umbellifera*, ha sido clonada y preservada para emplearse en posteriores estudios moleculares y bioquímicos.
7. Los fotobiontes aislados a partir de poblaciones de *Ramalina farinacea* y *Lichenomphalia umbellifera*, han sido caracterizados molecularmente con las nuevas herramientas diseñadas.

8. Las evidencias obtenidas indican que *Ramalina farinacea* constituye un modelo de asociación simbiótica peculiar en el que coexisten dos productores primarios pertenecientes a dos especies diferentes de *Trebouxia* (provisionalmente: TR1 y TR9) en un mismo talo. Este modelo se verifica en todas las poblaciones analizadas (Península Ibérica, Islas Canarias y California).
9. Diversas poblaciones de *Lichenomphalia umbellifera* muestran una única especie de *Coccomyxa*, similar o idéntica a *C. pringsheimii* y *C. subellipsoidea*, y que a su vez se asocia con otras especies del género *Lichenomphalia*.
10. Los análisis filogenéticos basados en marcadores cloroplásticos y nucleares de especies del género *Coccomyxa*, indican la ausencia de correlación entre su modo de vida (libre, como fotobionte de ascoliquen o basidioliquen) y su agrupación en clados.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

---





- Abascal F, Zardoya R, Posada D. 2005.** ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**: 2104-2105.
- Abdelaziz AE, Ghosh D, Hallenbeck PC. 2014.** Characterization of growth and lipid production by *Chlorella* sp. PCH90, a microalga native to Quebec. *Bioresource technology* **156**: 20-28.
- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, et al. 2012.** The revised classification of eukaryotes. *The Journal of eukaryotic microbiology* **59**: 429-493.
- Ahmadjian V. 1973.** Methods of isolation and culturing lichen symbionts and thalli. *The Lichens*. V Ahmadjian, ME Hale, eds. Academic Press: New York, 653-660.
- Ahmadjian V. 1988.** The lichen alga *Trebouxia*: Does it occur free-living? *Plant Systematics & Evolution* **158**: 243-247.
- Ahmadjian V. 1993.** *The Lichen Symbiosis*. John Willey & Sons, Inc.: New York.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. 1997.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Álvarez R, del Hoyo A, Garcia-Breijo F, et al. 2012.** Different strategies to achieve Pb-tolerance by the two *Trebouxia* algae coexisting in the lichen *Ramalina farinacea*. *Journal of Plant Physiology* **169**: 1797-1806.
- Archibald JM. 2009.** The puzzle of plastid evolution. *Current biology* **19**: R81-88.
- Arnould S, Chames P, Perez C, et al. 2006.** Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induce recombination on novel DNA targets. *Journal of Molecular Biology* **355**: 443-458.
- Asada K. 1988.** Superoxide dismutase. *Metalloproteins*. S Otsuka, T Yamanaka, eds. Elsevier: Amsterdam, 331-341.
- Barrasa JM, Rico VJ. 2001.** Lichenized species of *Omphalina* (Tricholomataceae) in the Iberian Peninsula. *The Lichenologist* **33**: 371-386.
- Barreno E. 2004.** Hongos simbioses: Líquenes, micoficobiosis y micorrizas. *Botánica*. J Izco, ed. MacGraw-Hill Interamericana: Madrid, Spain, 309-340.
- Barreno E, Nimis PL, Martellos S. 2008.** Los macrolíquenes epífitos de España. Una guía interactiva. [http://dbiodbs.units.it/carso/chiavi\\_pub21?sc=310](http://dbiodbs.units.it/carso/chiavi_pub21?sc=310).
- Barzel A, Privman E, Peeri M, et al. 2011.** Native homing endonucleases can target conserved genes in humans and in animal models. *Nucleic Acids Research* **39**: 6646-6659.

**Baxter L, Brain R, Rodriguez-Gil JL, Hosmer A, Solomon K, Hanson M. 2014.** Response of the green alga *Oophila* sp., a salamander symbiont, to a PSII-inhibitor under laboratory conditions. *Environmental toxicology and chemistry*. doi: 10.1002/etc.2629.

**Belfort M, Roberts RJ. 1997.** Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nucleic Acids Research* **25**: 3379-3388.

**Belfort M. 2003.** Two for the price of one: a bifunctional intron-encoded DNA endonuclease-RNA maturase. *Genes & development* **17**: 2860-2863.

**Blanc G, Agarkova I, Grimwood J, et al. 2012.** The genome of the polar eukaryotic microalga *Coccomyxa subellipsoidea* reveals traits of cold adaptation. *Genome biology* **13**: R39.

**Blaxter ML. 2004.** The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **359**: 669-679.

**Bold HC, Parker BC. 1962.** Some supplementary attributes in the classification of *Chlorococcum* species. *Archives of Microbiology* **42**: 267-288.

**Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

**del Campo EM. 2009.** Post-Transcriptional Control of Chloroplast Gene Expression. *Gene Regulation and Systems Biology* **3**: 31-47.

**del Campo EM, Casano LM, Gasulla F, Barreno E. 2009.** Presence of multiple group I introns closely related to bacteria and fungi in plastid 23S rRNAs of lichen-forming *Trebouxia*. *International microbiology* **12**: 59-67.

**del Campo EM, Casano LM, Gasulla F, Barreno E. 2010a.** Suitability of chloroplast LSU rDNA and its diverse group I introns for species recognition and phylogenetic analyses of lichen-forming *Trebouxia* algae. *Molecular phylogenetics and evolution* **54**: 437-444.

**del Campo EM, Gimeno J, de Nova PG, et al. 2010b.** South European populations of *Ramalina farinacea* (L.) Ach. share different *Trebouxia* algae. *Bibliotheca Lichenologica* **105**: 247-256.

**Casano LM, del Campo EM, Garcia-Breijo FJ, et al. 2011.** Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus competition? *Environmental microbiology* **13**: 806-818.

**Castresana J. 2000.** Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular biology and evolution* **17**: 540-552.

- Cavalier-Smith T. 1993.** Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological reviews* **57**: 953-994.
- Cavalier-Smith T. 1998.** A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **73**: 203-266.
- CBOL Plant Working Group. 2009.** A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 12794-12797.
- Cech TR. 1988.** Conserved sequences and structures of group I introns: building an active site for RNA catalysis-a review. *Gene* **73**: 259-271.
- Cenis JL. 1992.** Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research* **20**: 2380.
- Chan CX, Bhattacharya D. 2013.** Analysis of horizontal genetic transfer in red algae in the post-genomics age. *Mobile genetic elements* **3**: e27669.
- Chapman MJ, Margulis L. 1998.** Morphogenesis by symbiogenesis. *International microbiology* **1**: 319-326.
- Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, et al. 2005.** Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* **360**: 1889-1895.
- Chase MW, Cowan RS, Hollingsworth PM, et al. 2007.** A proposal for standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon* **56**: 295-299.
- Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. 1994.** Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 5695-5699.
- Chevalier BS, Stoddard BL. 2001.** Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic Acids Research* **29**: 3757-3774.
- Chevalier B, Turmel M, Lemieux C, Monnat RJ, Jr, Stoddard BL. 2003.** Flexible DNA target site recognition by divergent homing endonuclease isoschizomers I-Crel and I-Msol. *Journal of Molecular Biology* **329**: 253-269.
- Christensen T. 1994.** Typification of the class name Chlorophyceae. *Taxon* **43**: 245-246.
- Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000.** TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology* **9**: 1657-1659.
- Cordero BF, Obraztsova I, Couso I, Leon R, Vargas MA, Rodriguez H. 2011.** Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyta) by

improvement of culture conditions and random mutagenesis. *Marine drugs* **9**: 1607-1624.

**Cowan RS, Fay MF. 2012.** Challenges in the DNA barcoding of plant material. *Methods in molecular biology* **862**: 23-33.

**Darienko T, Gustavs L, Mudimu O, et al. 2010.** *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *European Journal of Phycology* **45**: 79-95.

**Davis BJ. 1964.** Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **121**: 404-427.

**Davis CC, Xi Z, Mathews S. 2014.** Plastid phylogenomics and green plant phylogeny: almost full circle but not quite there. *BMC biology* **12**: 11-7007-12-11.

**De Clerck O, Guiry MD, Leliaert F, Samyn Y, Verbruggen H. 2013.** Algal taxonomy: a road to nowhere? *Journal of Phycology* **49**: 215-225.

**DePriest PT. 2004.** Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986-2001\*. *Annual Review of Microbiology* **58**: 273-301.

**Doyle JJ, Doyle JL. 1990.** Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13-15.

**Dujon B. 2005.** Homing Endonucleases and the Yeast Mitochondrial  $\omega$  locus. A Historical Perspective. *Nucleic Acids and Molecular Biology* **16**: 11-31.

**Edgar RC. 2004.** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* **32**: 1792-1797.

**Eland LE, Davenport R, Mota CR. 2012.** Evaluation of DNA extraction methods for freshwater eukaryotic microalgae. *Water research* **46**: 5355-5364.

**Enmanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2007.** Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols* **2**: 953-971.

**Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C. 1995.** Testing significance of incongruence. *Cladistics* **10**: 315-319.

**Felsenstein J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: An approach using the Bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.

**Finn RD, Mistry J, Schuster-Bockler B, et al. 2006.** Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Research* **34**: D247-251.

**Fridovich I. 1986.** Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* **58**: 61-97.

**Friedl T. 1995.** Inferring taxonomic positions and testing genus level assignments in coccoid green lichen algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA

sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae cl. nov.). *Journal of Phycology* **31**: 632-639.

**Friedl T, Besendahl A, Pfeiffer P, Bhattacharya D. 2000.** The distribution of group I introns in lichen algae suggests that lichenization facilitates intron lateral transfer. *Molecular phylogenetics and evolution* **14**: 342-352.

**Friedl T, Büdel B. 2008.** Photobionts. *Lichen Biology* TH Nash, ed. Cambridge University Press: New York, 9-26.

**Gärtner G. 1992.** Taxonomy of symbiotic eukaryotic algae. In: W Reisser, ed. *Algae and Symbioses: Plants, Animals, Fungi, Viruses, Interactions Explored*. Biopress Ltd.: Bristol, 325-338.

**Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. 2005.** Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*. John M. Walker (ed). Humana Press. 571-607.

**Gasulla F, Guéra A, Barreno E. 2010.** A simple and rapid method for isolating lichen photobionts. *Symbiosis* **51**: 175-179.

**Gause GF. 1934.** *The Struggle for Existence*. Williams & Wilkins Co.: Baltimore, USA.

**Gauthier A, Turmel M, Lemieux C. 1991.** A group I intron in the chloroplast large subunit rRNA gene of *Chlamydomonas eugametos* encodes a double-strand endonuclease that cleaves the homing site of this intron. *Current genetics* **19**: 43-47.

**Geml J, Kauff F, Brochmann C, et al. 2012.** Frequent circumarctic and rare transequatorial dispersals in the lichenised agaric genus *Lichenomphalia* (Hygrophoraceae, Basidiomycota). *Fungal biology* **116**: 388-400.

**Glez-Peña D, Gómez-Blanco D, Reboiro-Jato M, Fdez-Riverola F, Posada D. 2010.** ALTER: program-oriented conversion of DNA and protein alignments. *Nucleic Acids Research* **38**: W14-18.

**Goddard MR, Burt A. 1999.** Recurrent invasion and extinction of a selfish gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13880-13885.

**Gogarten JP, Hilario E. 2006.** Inteins, introns, and homing endonucleases: recent revelations about the life cycle of parasitic genetic elements. *BMC evolutionary biology* **6**: 94.

**Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010.** SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution* **27**: 221-224.

**Green BR. 2011.** Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *The Plant Journal* **66**: 34-44.

**Guindon S, Gascuel O. 2003.** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* **52**: 696-704.

**Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010.** New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**: 307-321.

**Guiry MD, Guiry GM. 2014.** AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.

**Guzow-Krzeminska B. 2006.** Photobiont flexibility in the lichen *Protoparmeliopsis muralis* as revealed by ITS rDNA analyses. *Lichenologist* **38**: 469-476.

**Hackett JD, Yoon HS, Li S, Reyes-Prieto A, Rummele SE, Bhattacharya D. 2007.** Phylogenomic analysis supports the monophyly of cryptophytes and haptophytes and the association of rhizaria with chromalveolates. *Molecular biology and evolution* **24**: 1702-1713.

**Hafez M, Hausner G. 2012.** Homing endonucleases: DNA scissors on a mission. *Genome* **55**: 553-569.

**Hajibabaei M. 2012.** The golden age of DNA metasytematics. *Trends in genetics* **28**: 535-537.

**Hall TA. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.

**Haugen P, Bhattacharya D. 2004.** The spread of LAGLIDADG homing endonuclease genes in rDNA. *Nucleic Acids Research* **32**: 2049-2057.

**Haugen P, Reeb V, Lutzoni F, Bhattacharya D. 2004.** The evolution of homing endonuclease genes and group I introns in nuclear rDNA. *Molecular biology and evolution* **21**: 129-140.

**Haugen P, Simon DM, Bhattacharya D. 2005.** The natural history of group I introns. *Trends in genetics* **21**: 111-119.

**Haugen P, Bhattacharya D, Palmer JD, Turner S, Lewis LA, Pryer KM. 2007.** Cyanobacterial ribosomal RNA genes with multiple, endonuclease-encoding group I introns. *BMC evolutionary biology* **7**: 159.

**Hausner G, Hafez M, Edgell DR. 2014.** Bacterial group I introns: mobile RNA catalyts. *Mobile DNA* **5**: 8.

**Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003.** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Biological sciences* **270**: 313-321.

- Heled J, Drummond AJ. 2010.** Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 570-580.
- Hildebrand M, Abbriano RM, Polle JE, et al. 2013.** Metabolic and cellular organization in evolutionarily diverse microalgae as related to biofuels production. *Current opinion in chemical biology* **17**: 506-514.
- Honegger R, Brunner U. 1981.** Sporopollenin in the cell walls of *Coccomyxa* and *Myrmecia* phycobionts of various lichens: an ultrastructural and chemical investigation. *Canadian Journal of Botany* **59**: 2713-2734.
- Honegger R. 1998.** The lichen symbiosis. What is so spectacular about it? *Lichenologist* **30**: 193-212.
- Honegger R. 2008.** Mycobionts. *Lichen Biology*. TH Nash, ed. Cambridge University Press: New York, 27-39.
- Hoshina R, Imamura N. 2008.** Multiple origins of the symbioses in *Paramecium bursaria*. *Protist* **159**: 53-63.
- del Hoyo A, Álvarez R, del Campo EM, Gasulla F, Barreno E, Casano LM. 2011.** Oxidative stress induces distinct physiological responses in the two *Trebouxia* phycobionts of the lichen *Ramalina farinacea*. *Annals of botany* **107**: 109-118.
- Jacoby K, Metzger M, Shen BW, et al. 2012.** Expanding LAGLIDADG endonuclease scaffold diversity by rapidly surveying evolutionary sequence space. *Nucleic Acids Research* **40**: 4954-4964.
- Johansen S, Haugen P. 2001.** A new nomenclature of group I introns in ribosomal DNA. *RNA* **7**: 935-936.
- Karatygin IV, Snigirevskaya NS, Vikulin SV. 2009.** The most ancient terrestrial lichen *Winfrenatia reticulata*: A new find and a new interpretation. *Paleontological Journal* **43**: 107-114.
- Keeling PJ. 2010.** The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **365**: 729-748.
- Khan H, Parks N, Kozera C, et al. 2007.** Plastid genome sequence of the cryptophyte alga *Rhodomonas salina* CCMP1319: lateral transfer of putative DNA replication machinery and a test of chromist plastid phylogeny. *Molecular biology and evolution* **24**: 1832-1842.
- König J, Peveling E. 1984.** Cell walls of the phycobionts *Trebouxia* and *Pseudotrebouxia*: Constituents and their location. *The Lichenologist* **16**: 129-144.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH. 2005.** Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8369-8374.

**Kress WJ, Erickson DL. 2012.** DNA barcodes: methods and protocols. *Methods in molecular biology* **858**: 3-8.

**Kroken S, Taylor WJ. 2000.** Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *The Bryologist* **103**: 645-660.

**Lascano HR, Antonicelli GE, Luna CM, Melchiorre MN, Racca RW, Gomez LD, Trippi VS, Casano LM. 2001.** Antioxidative system response of different wheat cultivars under drought: Field and in vitro studies. *Functional Plant Biology* **28**: 1095-1102.

**Leliaert F, Smith DR, Moreau H, et al. 2012.** Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**: 1-46.

**Li H, Pellenz S, Ulge U, Stoddard BL, Monnat RJ, Jr. 2009.** Generation of single-chain LAGLIDADG homing endonucleases from native homodimeric precursor proteins. *Nucleic Acids Research* **37**: 1650-1662.

**de Longevialle AF, Hendrickson L, Taylor NL, et al. 2008.** The pentatricopeptide repeat gene OTP51 with two LAGLIDADG motifs is required for the cis-splicing of plastid ycf3 intron 2 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **56**: 157-168.

**Lucas P, Otis C, Mercier JP, Turmel M, Lemieux C. 2001.** Rapid evolution of the DNA-binding site in LAGLIDADG homing endonucleases. *Nucleic Acids Research* **29**: 960-969.

**Marcaida MJ, Muñoz IG, Blanco FJ, Prieto J, Montoya G. 2010.** Homing endonucleases: from basics to therapeutic applications. *Cellular and molecular life sciences* **67**: 727-748.

**Margulis L, Barreno E. 2003.** Looking at lichens. *Bioscience* **53**: 776-778.

**Marin B, Melkonian M. 2010.** Molecular phylogeny and classification of the Mamiellophyceae class. nov. (Chlorophyta) based on sequence comparisons of the nuclear- and plastid-encoded rRNA operons. *Protist* **161**: 304-336.

**Mattox K, Stewart KD. 1984.** Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. *The systematics of green algae*. DEG Irvine, DM John, eds. Academic Press: London, 29-72.

**Medlin LK, Metfies K, John U, Olsen JL. 2007.** Algal molecular systematics: a review of the past and prospects for the future. *Unravelling the Algae: The Past, Present and Future of Algal Systematics* J Brodie, J Lewis, eds. CRC Press: New York, 341-353.

**Meyer E, Weis VM. 2012.** Study of cnidarian-algal symbiosis in the "omics" age. *The Biological bulletin* **223**: 44-65.



**Michel F, Westhof E. 1990.** Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *Journal of Molecular Biology* **216**: 585-610.

**Moestrup Ø. 1991.** Further studies of presumed primitive green algae, including the description of Pedinophyceae class. nov. and Resultor gen. nov. *Journal of Phycology* **27**: 119-133.

**Monteilhet C, Dziadkowiec D, Szczepanek T, Lazowska J. 2000.** Purification and characterization of the DNA cleavage and recognition site of I-ScaI mitochondrial group I intron encoded endonuclease produced in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* **28**: 1245-1251.

**Moure CM, Gimble FS, Quijcho FA. 2002.** Crystal structure of the intein homing endonuclease PI-SceI bound to its recognition sequence. *Nature structural biology* **9**: 764-770.

**Nabhan AR, Sarkar IN. 2012.** The impact of taxon sampling on phylogenetic inference: a review of two decades of controversy. *Briefings in bioinformatics* **13**: 122-134.

**Nash TH. 2008.** Introduction. *Lichen Biology*. TH Nash, ed. Cambridge University Press: New York, 1-8.

**Nikolopoulos D, Korgiopolou C, Mavropoulos K, Liakopoulos G, Karabourniotis G. 2008.** Leaf anatomy affects the extraction of photosynthetic pigments by DMSO. *Talanta* **76**: 1265-1268.

**Oberwinkler F. 2012.** Basidiolichens. *The Mycota, vol IX, Fungal associations*. B Hock, ed. Springer: New York, 341-362.

**Ohnishi M, Murata T, Nakayama K, et al. 2000.** Comparative analysis of the whole set of rRNA operons between an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Sakai strain and an *Escherichia coli* K-12 strain MG1655. *Systematic and applied microbiology* **23**: 315-324.

**Pauplin Y. 2000.** Direct calculation of a tree length using a distance matrix. *Journal of Molecular Evolution* **51**: 41-47.

**Pawlowski J, Audic S, Adl S, et al. 2012.** CBOL protist working group: barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS biology* **10**: e1001419.

**Pedersen N, Stephen JR, Angela EN, Stephen WA. 2006.** A novel molecular protocol for the rapid extraction of DNA from Bryophytes and the utility of direct amplification of DNA from a single dwarf male. *The Bryologist* **109**: 257-264.

**Pessach IM, Notarangelo LD. 2011.** Gene therapy for primary immunodeficiencies: looking ahead, toward gene correction. *The Journal of allergy and clinical immunology* **127**: 1344-1350.

**Piercey-Normore MD. 2006.** The lichen-forming ascomycete *Evernia mesomorpha* associates with multiple genotypes of *Trebouxia jamesii*. *The New phytologist* **169**: 331-344.

**Pombert JF, Lemieux C, Turmel M. 2006.** The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Oltmannsiellopsis viridis* reveals a distinctive quadripartite architecture in the chloroplast genome of early diverging ulvophytes. *BMC biology* **4**: 3.

**Posada D. 2009.** Selection of models of DNA evolution with jModelTest. *Methods in molecular biology* **537**: 93-112.

**Pröschold T, Leliaert F. 2007.** Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. *Unravelling the Algae: The Past, Present and Future*. J Brodie, J Lewis, eds. CRC Press: New York, 124-148.

**Qiu YL, Li L, Wang B, et al. 2006.** The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 15511-15516.

**Rambaut A. 2008.** FigTree v1.3.1: Tree figure drawing tool. Available: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

**Reynolds MM, Williams CG. 2004.** Extracting DNA from submerged pine wood. *Genome* **47**: 994-997.

**Richmond A. 2004.** *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science Ltd.

**Rochaix JD. 1995.** *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annual Review of Genetics* **29**: 209-230.

**Rodriguez-Ezpeleta N, Brinkmann H, Burey SC, et al. 2005.** Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Current biology* **15**: 1325-1330.

**Rosenberg E, Sharon G, Zilber-Rosenberg I. 2009.** The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environmental microbiology* **11**: 2959-2962.

**Saha D, Prasad AM, Srinivasan R. 2007.** Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**: 521-534.

**Saitou N, Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.

**Schindel DE, Miller SE. 2005.** DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature* **435**: 17.

**Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Barkan A. 2005.** RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *The Plant Cell* **17**: 2791-2804.

**Scott SA, Davey MP, Dennis JS, et al. 2010.** Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current opinion in biotechnology* **21**: 277-286.

**Seligman LM, Chisholm KM, Chevalier BS, et al. 2002.** Mutations altering the cleavage specificity of a homing endonuclease. *Nucleic Acids Research* **30**: 3870-3879.

**Servin-Garcidueñas LE, Martinez-Romero E. 2012.** Complete mitochondrial and plastid genomes of the green microalga Trebouxiophyceae sp. strain MX-AZ01 isolated from a highly acidic geothermal lake. *Eukaryotic cell* **11**: 1417-1418.

**Shen BW, Landthaler M, Shub DA, Stoddard BL. 2004.** DNA binding and cleavage by the HNH homing endonuclease I-Hmul. *Journal of Molecular Biology* **342**: 43-56.

**Sherwood A, Presting G. 2007.** Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology* **43**: 605-608.

**Skaloud P, Peksa O. 2010.** Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Molecular phylogenetics and evolution* **54**: 36-46.

**Skjanes K, Rebours C, Lindblad P. 2013.** Potential for green microalgae to produce hydrogen, pharmaceuticals and other high value products in a combined process. *Critical reviews in biotechnology* **33**: 172-215.

**Smith DR, Burki F, Yamada T, et al. 2011.** The GC-rich mitochondrial and plastid genomes of the green alga *Coccomyxa* give insight into the evolution of organelle DNA nucleotide landscape. *PLoS one* **6**: e23624.

**Starr MB. 1975.** A generalized scheme for classifying organismic associations. *Symposia of the Society for Experimental Biology* **29**: 1-20.

**Stoddard BL. 2006.** Homing endonuclease structure and function. *Quarterly Reviews of Biophysics* **38**: 49-95.

**Stoddard BL. 2011.** Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure* **19**: 7-15.

**Stoddard BL. 2014.** Homing endonucleases from mobile group I introns: discovery to genome engineering. *Mobile DNA* **5**: 7.

**Swofford, DL. 2003.** PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

**Takeuchi R, Lambert AR, Mak AN, et al. 2011.** Tapping natural reservoirs of homing endonucleases for targeted gene modification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 13077-13082.

**Taylor GK, Heiter DF, Pietrokovski S, Stoddard BL. 2011.** Activity, specificity and structure of I-Bth0305I: a representative of a new homing endonuclease family. *Nucleic Acids Research* **39**: 9705-9719.

**Tirichine L, Bowler C. 2011.** Decoding algal genomes: tracing back the history of photosynthetic life on Earth. *The Plant Journal* **66**: 45-57.

**Tremouillaux-Guiller J, Rohr T, Rohr R, Huss VA. 2002.** Discovery of an endophytic alga in *Ginkgo biloba*. *American Journal of Botany* **89**: 727-733.

**Turmel M, Gutell RR, Mercier JP, Otis C, Lemieux C. 1993.** Analysis of the chloroplast large subunit ribosomal RNA gene from 17 *Chlamydomonas* taxa. Three internal transcribed spacers and 12 group I intron insertion sites. *Journal of Molecular Biology* **232**: 446-467.

**de Vera JP, Rettberg P, Ott S. 2008.** Life at the limits: capacities of isolated and cultured lichen symbionts to resist extreme environmental stresses. *Origins of life and evolution of the biosphere* **38**: 457-468.

**Verbruggen H. 2014.** Morphological complexity, plasticity, and species diagnosability in the application of old species names in DNA-based taxonomies. *Journal of Phycology* **50**: 26-31.

**Walker DM, Castlebury LA, Rossman AY, White JF, Jr. 2012.** New molecular markers for fungal phylogenetics: two genes for species-level systematics in the Sordariomycetes (Ascomycota). *Molecular phylogenetics and evolution* **64**: 500-512.

**Wang TY, Wang L, Zhang JH, Dong WH. 2011.** A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genetics and molecular research* **10**: 519-525.

**Watabe H, Iino T, Kaneko T, Shibata T, Ando T. 1983.** A new class of site-specific endodeoxyribonucleases. Endo.Sce I isolated from a eukaryote, *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* **258**: 4663-4665.

**Watabe H, Shibata T, Ando T. 1981.** Site-specific endo-deoxyribonucleases in eukaryotes: endonucleases of yeasts, *Saccharomyces* and *Pichia*. *Journal of Biochemistry* **90**: 1623-1632.

**Wellburn AR. 1994.** The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology* **144**: 307-313.

- Winship PR. 1989.** An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Research* **17**: 1266.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. 2012.** Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics* **13**: 134-2105-13-134.
- Yoon HS, Hackett JD, Van Dolah FM, Nosenko T, Lidie KL, Bhattacharya D. 2005.** Tertiary endosymbiosis driven genome evolution in dinoflagellate algae. *Molecular biology and evolution* **22**: 1299-1308.
- You FM, Huo N, Gu YQ, et al. 2008.** BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC bioinformatics* **9**: 253-2105-9-253.
- Yuan X, Xiao S, Taylor TN. 2005.** Lichen-like symbiosis 600 million years ago. *Science* **308**: 1017-1020.
- Zhang W, Wang J, Wang J, Liu T. 2014.** Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresource technology* **158C**: 329-335.
- Zhao L, Pellenz S, Stoddard BL. 2009.** Activity and specificity of the bacterial PD-(D/E)XK homing endonuclease I-Ssp6803I. *Journal of Molecular Biology* **385**: 1498-1510.



***ANEXOS***

---





**ANEXO 1.** Listado de algas verdes (división Chlorophyta) y cianobacterias empleadas en este estudio. Los accesos GenBank corresponden al gen 23S ADNr cloroplástico.

<b>División CHLOROPHYTA</b>			
<b>Género/Especie</b>	<b>Orden</b>	<b>Cepa</b>	<b>Accesos GenBank</b>
<b>Clase Chlorophyceae</b>			
<i>Chlamydomonas allensworthii</i>	Chlamydomonadales	SAG-27.98	GQ921929
<i>Coccolobos verrucariae</i>	Chaetophorales	SAG 16.97	JQ921003
<i>Dilabifilum arthroproyreniae</i>	Chaetophorales	SAG 467-2	HM068616
<i>Dilabifilum spec.1</i>	Chaetophorales	SAG 2038	JQ921005
<i>Dilabifilum spec.2</i>	Chaetophorales	SAG 2039	JQ921006
<i>Trochiscia gutwinksi</i>	Chlorellales	SAG 102.80	GQ921931
<i>Trochiscia hystrix</i>	Chlorellales	SAG 103.80	GQ921932
<b>Clase Prasinophyceae</b>			
<i>Tetraselmis chuii</i>	Chlorodendrales	SAG 8-6	GQ921943
<b>Clase Trebouxiophyceae</b>			
<i>Asterochloris erici</i>	Trebouxiales	SAG 32.85	EU352795
<i>Asterochloris glomerata</i>	Trebouxiales	SAG 100.80	FJ687228
<i>Asterochloris irregularis</i>	Trebouxiales	SAG 33.85	EU725861
<i>Asterochloris magna</i>	Trebouxiales	UTEX 902	JQ921001
<i>Asterochloris phycobiontica</i>	Trebouxiales	SAG 26.81	JQ921002
<i>Asterochloris pyriformis</i>	Trebouxiales	UTEX 1712	JQ921014
<i>Chlorella lobophora</i>	Chlorellales	SAG 37.88	GQ921933
<i>Chlorella luteoviridis</i>	Chlorellales	SAG 211-2b	GQ921934
<i>Coccomyxa arvernensis</i>	Chlamydomonadales	SAG 216-1	GQ921935
<i>Coccomyxa chodatii Jaag</i>	Chlamydomonadales	SAG 216-2	JQ278715
<i>Coccomyxa mucigena</i>	Chlamydomonadales	SAG 216-4	JQ278712
<i>Coccomyxa peltigera variolosae</i>	Chlamydomonadales	SAG 216-6	---
<i>Coccomyxa peltigerae</i>	Chlamydomonadales	SAG 216-5	---
<i>Coccomyxa pringsheimii (botrydinae)</i>	Chlamydomonadales	SAG 216-7	JQ278713
<i>Coccomyxa rayssiae</i>	Chlamydomonadales	SAG 216-8	JQ278716

## Anexos

<i>Coccomyxa solorina bisporae</i>	Chlamydomonadales	SAG 216-10	---
<i>Coccomyxa solorina croceae</i>	Chlamydomonadales	SAG 216-11a	---
<i>Coccomyxa solorina saccatae</i>	Chlamydomonadales	SAG 216-12	GQ921936
<i>Coccomyxa</i> spec.1	Chlamydomonadales	SAG 49.84	JQ278714
<i>Coccomyxa</i> spec.2	Chlamydomonadales	SAG 2040	JQ278717
<i>Coccomyxa</i> spec.3	Chlamydomonadales	SAG 216-15	JQ278718
<i>Coccomyxa subellipsoidea</i>	Chlamydomonadales	SAG 216-13	---
<i>Coccomyxa viridis</i>	Chlamydomonadales	SAG 216-14	---
<i>Dictyochloropsis irregularis</i>	Trebouxiales	SAG 2036	JQ921010
<i>Dictyochloropsis reticulata</i>	Trebouxiales	Aislado de <i>Lobaria pulmonaria</i>	JQ921004
<i>Dictyochloropsis</i> spec.	Trebouxiales	SAG 244.80	---
<i>Dictyochloropsis symbiontica</i>	Trebouxiales	SAG 27.81	JQ921011
<i>Elliptochloris bilobata</i>	Prasiolales	SAG 245.80	GQ921938
<i>Elliptochloris reniformis</i>	Prasiolales	SAG 2200	GQ921939
<i>Friedmannia israeliensis</i>	Microthamniales	UTEX 1181	L42845
<i>Leptosira obovata</i>	Ctenocladales	SAG 445-1	GQ921940
<i>Myrmecia bisecta</i>	Trebouxiales	SAG 2043	GQ921941
<i>Nannochloris normandinae</i>	Chlorellales	SAG 9.82	JQ921007
<i>Picochlorum atomus</i>	Chlorellales	SAG 14.87	GU053572
<i>Pseudochlorella aquatica</i>	Prasiolales	SAG 2149	GQ921930
<i>Stichococcus bacillaris</i>	Prasiolales	SAG 335-3	GQ921942
<i>Trebouxia angustilobata</i>	Trebouxiales	SAG 2204	FJ694755
<i>Trebouxia anticipata</i>	Trebouxiales	UTEX 903	JQ921012
<i>Trebouxia arboricola</i>	Trebouxiales	SAG 219-1a	FJ804760
<i>Trebouxia asymmetrica</i>	Trebouxiales	SAG 48.88	EU725860
<i>Trebouxia australis</i>	Trebouxiales	SAG 2205	FJ804758
<i>Trebouxia brindabellae</i>	Trebouxiales	SAG 2206	FJ804757
<i>Trebouxia corticola</i>	Trebouxiales	UTEX 909	JQ921013
<i>Trebouxia decolorans</i>	Trebouxiales	UTEX B781	FJ804759
<i>Trebouxia gelatinosa</i>	Trebouxiales	UTEX 906	FJ687229
<i>Trebouxia gigantea</i>	Trebouxiales	UTEX 2231	JQ921008
<i>Trebouxia impressa</i>	Trebouxiales	UTEX 893	JQ921009

<i>Trebouxia jamesii</i>	Trebouxiales	UTEX 2233/ SAG 2103	EU352794
<i>Trebouxia showmanii</i>	Trebouxiales	SAG 2009	FJ694756
<i>Trebouxia simplex</i>	Trebouxiales	SAG 101.80	FJ804756
<i>Trebouxia suecica</i>	Trebouxiales	SAG 2207	FJ694757
<b>Clase Ulvophyceae</b>			
<i>Trentepohlia annulata</i>	Trentepohliales	SAG 20.94	GQ921944
<i>Trentepohlia</i> sp.	Trentepohliales	SAG 118.80	GU053574
<b>División CYANOBACTERIA</b>			
<b>Género/Especie</b>	<b>Orden</b>	<b>Cepa</b>	<b>Accesos GenBank</b>
<i>Anabaena cylindrica</i>	Nostocales	SAG 1403-2	GQ980021
<i>Anabaena torulosa</i>	Nostocales	SAG 26.79	GQ980022
<i>Calothrix desertica</i>	Nostocales	SAG 35.79	GQ980023
<i>Nostoc ellipsosporum</i>	Nostocales	SAG 1453-7	GQ980025
<i>Nostoc insulare</i>	Nostocales	SAG 54.79	GQ980026
<i>Chroococidiopsis cubana</i>	Pleurocapsales	SAG 39.79	GQ980024

**ANEXO 2.** Listado de macroalgas marinas y plantas empleadas en este estudio. Los accesos GenBank corresponden al gen 23S ADNr cloroplástico.

<b>División RHODOPHYTA</b>			
<b>Género/Especie</b>	<b>Orden</b>	<b>Cepa/Empresa</b>	<b>Accesos GenBank</b>
<b>Clase Bangiophyceae</b>			
<i>Porphyra purpurea</i>	Bangiiales	Porto Muiños®	U38804
<i>Porphyridium aerugineum</i>	Porphyridales	SAG 43.94	AM084277
<b>Clase Florideophyceae</b>			
<i>Chondrus crispus</i>	Gigartinales	Porto Muiños®	GQ980027
<i>Gigartina pistillata</i>	Gigartinales	Porto Muiños®	GQ980029
<i>Mastocarpus stellatus</i>	Gigartinales	Porto Muiños®	GQ980030
<i>Osmundea pinnatifida</i>	Ceramiales	Porto Muiños®	GQ980031
<b>División HETEROKONTOPHYTA</b>			
<b>Género/Especie</b>	<b>Orden</b>	<b>Cepa/Empresa</b>	<b>Accesos GenBank</b>
<b>Clase Bacillariophyceae</b>			
<i>Gomphonema parvulum</i>	Cymbellales	SAG 1032-1	GU053579
<b>Clase Phaeophyceae</b>			
<i>Himanthalia elongata</i>	Fucales	Porto Muiños®	GU053576
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	Fucales	Porto Muiños®	GU053577
<b>Clase Xanthophyceae</b>			
<i>Heterococcus brevicellularis</i>	Tribonematales	SAG 835-1	GQ168958
<i>Heterococcus mainxii</i>	Tribonematales	SAG 835-6	GU053575
<b>División CRYPTOPHYTA</b>			
<b>Género/Especie</b>	<b>Orden</b>	<b>Cepa</b>	<b>Accesos GenBank</b>
<i>Cryptomonas paramecium</i>	Cryptomonadales	SAG 977-2a	GU053580
<i>Cryptomonas</i> sp.	Cryptomonadales	SAG 979-8	GU053581
<b>División HAPTOPHYTA</b>			
<b>Género/Especie</b>	<b>Orden</b>	<b>Cepa</b>	<b>Accesos GenBank</b>
<i>Corcontochrysis noctivaga</i>	Pavlovaes	SAG 5.83	GU053582

<b>División STREPTOPHYTA</b>			
<b>Género/Especie</b>	<b>Familia</b>	<b>Cepa/Lugar recolección</b>	<b>Accesos GenBank</b>
<b>Clase Zygnemophyceae</b>			
<i>Sphaeroszma granulatum</i>	Desmidiaceae	SAG 39.83	GQ921928
<b>Hepáticas y musgos</b>			
<i>Porella platyphylla</i>	Porellaceae	Madrid	GQ916676
<i>Grimmia laevigata</i>	Grimmiaceae	Madrid	GQ916673
<i>Hypnum cupressiforme</i>	Hypnaceae	Madrid	GQ916674
<i>Orthotrichum rupestre</i>	Orthotrichaceae	Madrid	GQ916675
<i>Pleurochaete squarrosa</i>	Pottiaceae	Madrid	GQ916677
<b>Helechos</b>			
<i>Asplenium fontanum</i>	Aspleniaceae	Valencia	GQ916685
<i>Asplenium hemionitis</i>	Aspleniaceae	Valencia	GQ916686
<i>Cosentinia vellea</i>	Pteridaceae	Valencia	GQ916687
<i>Polypodium cambricum</i>	Polypodiaceae	Valencia	GQ916688
<i>Thelypteris palustris</i>	Thelypteridaceae	Valencia	GQ916690
<i>Equisetum palustre</i>	Equisetaceae	Valencia	GQ916689
<b>Gimnospermas</b>			
<i>Cedrus libani</i>	Pinaceae	Guadalajara	GQ916679
<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	Cupressaceae	Guadalajara	GQ916680
<i>Cupressus sempervirens</i>	Cupressaceae	Guadalajara	GQ916681
<i>Hesperocyparis arizonica</i>	Cupressaceae	Guadalajara	GQ916678
<i>Picea abies</i>	Pinaceae	Guadalajara	GQ916682
<i>Pinus radiata</i>	Pinaceae	Guadalajara	GQ916683
<i>Taxus baccata</i>	Taxaceae	Madrid	GQ916684
<b>Angiospermas</b>			
<i>Allium ampeloprasum</i>	Amaryllidaceae	Vivero	GQ916662
<i>Ananas comosus</i>	Bromeliaceae	Vivero	GQ916661
<i>Hordeum murinum</i>	Poaceae	Madrid	GQ916663
<i>Musa acuminata</i>	Musaceae	Madrid	GQ916665
<i>Malva sylvestris</i>	Malvaceae	Madrid	GQ916664
<i>Nerium oleander</i>	Apocynaceae	Guadalajara	GQ916666

## Anexos

---

<i>Olea europaea</i>	Oleaceae	Guadalajara	GQ916667
<i>Petroselinum crispum</i>	Apiaceae	Guadalajara	GQ916668
<i>Retama sphaerocarpa</i>	Fabaceae	Guadalajara	GQ916670
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Lamiaceae	Guadalajara	GQ916669
<i>Saintpaulia ionantha</i>	Gesneriaceae	Vivero	GQ916671
<i>Valerianella locusta</i>	Caprifoliaceae	Vivero	GQ916672

**ANEXO 3.** Localización de las diferentes recolecciones de *Ramalina farinacea* y *Lichenomphalia umbellifera* empleadas en este estudio.

	Localidad	Coordenadas geográficas	Altitud	Piso bioclimático	Datos de la recolección	Forofito	Nº talos recolectados
<b><i>Ramalina farinacea</i></b>							
<b>España</b>	Puerto de Ventana, AS-228 (Teverga, Asturias)	43º 4' 33" N 6º 1' 54" O	1200 m	Montano	Leg. Barreno & Temple 25/09/2000	<i>Fagus sylvatica</i>	2
	Villamayor, Puerto de Maravio, AS-311 (Teverga, Asturias)	43º 13' 1,73" N 6º 7' 59,66" O	650 m	Colino	Leg. Vázquez 20/03/2006	<i>Quercus pyrenaica</i>	3
	Proximidades de Modino, N-625 (León)	42º 45' 31,57" N 5º 8' 54,69" O	1300 m	Supramediterráneo	Leg. Barreno & Herrera-Campos 27/09/2007	<i>Quercus pyrenaica</i>	5
	Mas del Pastor, Sierra del Toro (Castellón)	39º 57' 32,34" N 0º 46' 35,51" O	1150 m	Mesomediterráneo	Leg. Barreno & Gasulla 27/11/2007	<i>Quercus rotundifolia</i>	5
	Villanueva de la Fuente, Valdepeñas de Alcaraz, CM-412 (Ciudad Real, Castilla la Mancha)	38º 40' 40,89" N 2º 39' 16,48" O	820 m	Mesomediterráneo	Leg. Gómez de Nova 18/04/2006	<i>Quercus rotundifolia</i>	4
	Pinar de la Guancha (Tenerife, Islas Canarias)	28º 20' 48" N 16º 39' 43" O	900 m	Supramediterráneo	Leg. Barreno & Santos 30/01/1997	<i>Pinus canariensis</i>	5
	Los Realejos, Parque de Corona Forestal (Tenerife, Islas Canarias)	28º 20' 51" N 16º 35' 27" O	1300 m	Supramediterráneo	Leg. Barreno & Santos 02/02/1997	<i>Pinus canariensis</i>	5

<b>Estados Unidos</b>	Joseph Grant Co. Park, Route 130 from San José to Mount Hamilton, Santa Clara Co. (CA, EE. UU.)	37° 19' 23" N 121° 40' 9" O	580 m	Mesomediterráneo	Leg. Barreno, Sánchez Mata, Sancho & Tretiach 24/07/2008	<i>Quercus kelloggii</i>	1
	Colina cercana a San Francisco Botanical Garden, San Francisco City and Co. (CA, EE. UU.)	37° 46' 00" N 122° 28' 08" O	230 m	Mesomediterráneo	Leg. Barreno & Clerc 11/07/2008	<i>Pinus sp.</i>	1
<b><i>Lichenomphalia umbellifera</i></b>							
<b>España</b>	Turberas del Pelagallinas, Parque Natural de la Sierra Norte de Guadalajara (Condemios de Arriba, Guadalajara)	41° 11' 34" N 03° 04' 40" O	1340 m	Supramediterráneo	Leg. Rubio Casas 05/07/2011	<i>Sphagnum sp.</i>	5



**ANEXO 4.** Localización de las recolecciones de los talos de *Ramalina farinacea* y accesos GenBank de los ITSnr de TR1 y TR9.

País	Provincia-Estado/Localidad	ITSnr de algas			
		Haplotipo Predominante		Haplotipo No predominante	
<b>España Península Ibérica</b>	Asturias/Puerto de Maravio	TR1	GU252192	TR9	JF414630
	Asturias/Puerto de Maravio	TR1	GU252196	TR9	JF414631
	Asturias/Puerto de Maravio	TR1	GU252195	TR9	JF414632
	Asturias/Puerto de Ventana	TR1	GU252203	TR9	JF414633
	Asturias/Puerto de Ventana	TR1	GU252204	TR9	JF414634
	León	TR1	GU252187	TR9	JF414651
	León	TR1	GU252188	TR9	JF414652
	León	TR1	GU252189	TR9	JF414653
	León	TR1	GU252190	TR9	JF414654
	León	TR1	GU252191	TR9	JF414655
	Castellón	TR1	GU252172	TR9	JF414641
	Castellón	TR1	GU252173	TR9	JF414642
	Castellón	TR1	GU252174	TR9	JF414643
	Castellón	TR1	GU252175	TR9	JF414644
	Castellón	TR1	GU252176	TR9	JF414645
	Ciudad Real	TR1	GU252177	TR9	JF414637
	Ciudad Real	TR1	GU252178	TR9	JF414638
	Ciudad Real	TR1	GU252180	TR9	JF414639
Ciudad Real	TR1	GU252181	TR9	JF414640	
<b>España Islas Canarias</b>	Tenerife/La Guancha	TR9	GU252182	TR1	JF414646
	Tenerife/La Guancha	TR9	GU252183	TR1	JF414647
	Tenerife/La Guancha	TR9	GU252184	TR1	JF414648
	Tenerife/La Guancha	TR9	GU252185	TR1	JF414649
	Tenerife/La Guancha	TR9	GU252186	TR1	JF414650
	Tenerife/Los Realejos	TR9	GU252197	TR1	JF414656
	Tenerife/Los Realejos	TR9	GU252198	TR1	JF414657
	Tenerife/Los Realejos	TR9	GU252199	TR1	JF414658
	Tenerife/Los Realejos	TR9	GU252200	TR1	JF414659
	Tenerife/Los Realejos	TR9	GU252201	TR1	JF414660
<b>Estados Unidos</b>	California	TR1	GU252205	TR9	JF414635
	California	TR1	GU252206	TR9	JF414636

**ANEXO 5.** Accesos GenBank de las diferentes secuencias de organismos utilizadas para realizar filogenias en el apartado 4.4.

<b>Algas verdes</b>	
<b>Género/Especie</b>	<b>Accesos GenBank</b>
<i>Bryopsis hypnoides</i>	GU136485
<i>Chlorosarcina brevispinosa</i>	L49150
<i>Flabellia petiolata</i>	FJ535847
<i>Haematococcus lacustris</i>	L49151
<i>Trebouxia aggregata</i>	L43542
<i>Trebouxia angustilobata</i>	FJ694755
<i>Trebouxia showmanii</i>	FJ694756
<i>Trebouxia suecica</i>	FJ694757
<i>Trebouxiophyceae</i> sp. MX-AZ01	NC018568
<i>Trichosarcina mucosa</i>	AY008341
<b>Bacterias</b>	
<i>Coxiella burnetii</i>	NC001637
<i>Chlamydiales</i> (simbionte de <i>Xenoturbella westbladi</i> )	EF177461
<i>Synechococcus lividus</i> C1	DQ421379
<i>Synechococcus</i> sp. C9	DQ421380
<i>Thermotoga naphthophila</i>	AJ872268
<i>Thermotoga neapolitana</i>	AJ556788
<i>Thermotoga</i> sp. SG1	AJ556792
<i>Thermotoga subterranea</i>	AJ556793
<b>Otros organismos</b>	
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	NC001637
<i>Peltigera malacea</i>	NC016955

**ANEXO 6.** Listado de los principales cebadores empleados a lo largo de la presente Tesis Doctoral.

Nombre	Secuencia	Autores <sup>a</sup>
<b>Región 23S ADN ribosomal<sup>4</sup></b>		
23S-ps1	5'-CAT GAC CAG GAT GAA GCT TG-3'	*
23S-ps2	5'-TAC TCA AGC CGA CAT TCT C-3'	*
cL781-F	5'-TCA TAA CGG TGA AAC CTA AGG C-3'	Casano <i>et al.</i> , 2011 (Publicación 3)
cL781-R	5'-GAG AAC GCC AAA CCA TAT ACC G-3'	
23S-U1	5'-GGG TAG AGC ACT GTT TCG G-3'	del Campo <i>et al.</i> , 2010 (Publicación 2)
23S-U2	5'-CCT TCT CCC GAA GTT ACG G-3'	
p23SrV_f1	5'-GGA CAG AAA GAC CCT ATG AA-3'	Sherwood & Presting, 2007
p23SrV_r1	5'-TCA GCC TGT TAT CCC TAG AG-3'	
23S-T1	5'-CCG AAA GGC GTA GTC GAT GG-3'	del Campo <i>et al.</i> , 2009
23S-T2	5'-CAG TAA AGC TTC ATA GGG TC-3'	
23S-T3	5'-GAA GGG AGC TTG ACT GCA AG-3'	
23S-T4	5'-CCG TCG ATG TGA ACT CTT GG-3'	
Turmel1	5'-ACA GGT CTC CGC AAA GTC GTA-3'	*
Turmel2	5'-TGA CCG AGT CTC TCT CCG AGA C-3'	*
23S-Tj1	5'-TGA ATC AGG ACG CTT GAC AG-3'	*
23S-Tj2	5'-CTT TGC ACA TCT CCG TTA CC-3'	*
23S-ta5	5'-ACG ACG TTC TGA ACC CAG CTC-3'	*
23S-ta13	5'-CGG ATA TGG ACC GAA CTG TC-3'	*
cL2263-F	5'-GTA ATA CTA CAT TGG TGC GGA C-3'	Casano <i>et al.</i> , 2011 (Publicación 3)
cL2263-R	5'-AGC ACA TCA CAG AGA AGC TG-3'	
23S-tr1rev	5'-GGT ACG TGA GCT GGG TTG AG-3'	*
Ex1931-51	5'-AGC GAA ATT CCT TGT CRG G-3'	*

<sup>4</sup> Cebadores diseñados en base a la secuencia de nucleótidos de la región 23S del ADNr de *Trebouxia aggregata* (GB L43542) (Pombert *et al.*, 2006) y a secuencias parciales obtenidas en laboratorio.

<b>Región ITS (fotobiontes)</b>		
ITS-1T	5'-GGA AGG ATC ATT GAA TCT ATC GT-3'	Kroken & Taylor, 2000
ITS-4T	5'-GGT TCG CTC GCC GCT ACT A-3'	
ITS-TR1f	5'-ACA CAC GTC AAG CAA TCA ACT C-3'	Casano <i>et al.</i> , 2011 (Publicación 3)
ITS-TR1r	5'-CTG ACC GGC AAC CCG AAG-3'	
ITS-TR9f	5'-AAC ATA CCT TAA GCA ATT AAT TC-3'	
ITS-TR9r	5'-TGA CCG GCT AGC ATT CAG-3'	
<b>Región <i>psbA</i></b>		
<i>psbA</i> -chl1	5'-TGG TTA TAC AAC GGT CC-3'	del Campo <i>et al.</i> , 2010 (Publicación 1)
<i>psbA</i> -chl2	5'-GGA AGT TGT GAG CGT TAC GC-3'	
<b>Región <i>psbB</i></b>		
<i>psbB</i> -cocF	5'-ATT ACT GGT AGT GTY CAA CC-3'	*
<i>psbB</i> -cocR	5'-CCA TAC CAC ATW GTK CCA GC-3'	*
<i>psbB</i> -intF	5'-GAC ATC TTG CAG TCC AAT GG-3'	*
<i>psbB</i> -intR	5'-CAT CGC TTT GCG ATG CAA G-3'	*

<sup>a</sup> Referencias de los cebadores que se encuentran publicados.

\* Cebadores no publicados.

## **PUBLICACIONES**

---

**Publicación 1.** A rapid and cost-efficient DMSO-based method for isolating DNA from cultured lichen phycobionts. *Taxon*, **59**: 1-4.

**Publicación 2.** A single primer pair gives a specific ortholog amplicon in a wide range of Cyanobacteria and plastid-bearing organisms: applicability in inventory of reference material from collections and phylogenetic analysis. *Mol Phylogenet Evol* **57**: 1323-1328.

**Publicación 3.** Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea* (L.) Ach. Coexistence vs. Competition? *Environmental Microbiology* **13**: 806–818.

**Publicación 4.** The genetic structure of the cosmopolitan three-partner lichen *Ramalina farinacea* (L.) Ach. evidences the concerted diversification of symbionts. *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 310-323.

**Publicación 5.** Newly identified LAGLIDADG homing endonucleases in the chloroplast LSU rDNA of *Coccomyxa* algae. *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges*. Ed. Mendez-Vilas, A. World Scientific. (ISBN: 10 981-4405-03-5):668-673.



## METHODS AND TECHNIQUES

## A rapid and cost-efficient DMSO-based method for isolating DNA from cultured lichen photobionts

Eva M. del Campo,<sup>1</sup> Alicia del Hoyo,<sup>1</sup> Leonardo M. Casano,<sup>1</sup> Fernando Martínez-Alberola<sup>2</sup> & Eva Barreno<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Biology, University of Alcalá, 28871-Alcalá de Henares (Madrid), Spain

<sup>2</sup> ICBIBE, Department of Botany, University of Valencia, Faculty of Biology, C/ Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot (Valencia), Spain

Author for correspondence: Eva M. del Campo, [eva.campo@uah.es](mailto:eva.campo@uah.es)

**Abstract** We have developed a simple and fast procedure for the purification of PCR-quality DNA from cultured lichen photobionts. This new one-step method uses the solvent dimethyl sulfoxide (DMSO) combined with heat treatment to chemically breakdown algal and plant tissues. The DMSO-DNA extracts may be directly precipitated and purified by standard techniques in a total time of approximately 30 min. Compared to other DNA extraction protocols, the DMSO-based method suppresses the need for liquid nitrogen, any extraction buffer, grinding, phenol, and long incubation or centrifugation steps, thereby eliminating many opportunities by which cross-contamination is most likely to occur. In addition, minimal amounts of starting material ( $5 \times 10^6$ – $20 \times 10^6$  cells from liquid or agarized cultures) produce sufficient DNA for 200 PCR reactions approximately, making this protocol a practical option for colony screening. This method works well in a wide range of cultured lichen photobionts and reduces the amount of labor-intensive steps and time consumed by other multi-step procedures, allowing for efficient processing of an increased number of samples.

**Keywords** algae; cyanobacteria; DMSO; DNA isolation; lichens, photobiont; plants

### ■ INTRODUCTION

Biodiversity studies and phylogenetic investigations have been facilitated by methods for identifying species based on short standardized DNA sequences, known as “DNA barcodes”. DNA barcoding will accelerate the pace of species discovery by allowing taxonomists to rapidly sort specimens, and by highlighting divergent taxa that may represent new species (Hebert & Gregory, 2005). The aid of DNA barcoding in species identification is more remarkable in certain groups of organisms whose identification can be very difficult. The algae as a group are a good example, due to their relatively simple morphology and anatomy, limited phenotypic plasticity, and alternation of heteromorphic generations. Among them, green algae belonging to Chlorophyta are morphologically simple single cells, packets of cells, or weak filaments, which represent a series of taxa spanning the classes Prasinophyceae, Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, and Ulvophyceae. To date, it is impossible to assess which morphological characters used for separation of species and genera are phylogenetically significant. Only recently, molecular methods based on DNA analysis have started to reveal the real phylogenetic diversity of green and non-green algae (Friedl, 1995; Huss & al., 2002; Krienitz & al., 2003, 2004; López-Bautista & al., 2006; Yoon & al., 2006; Khan & al., 2007).

Microscopic algae present special problems for DNA isolation, mainly due to the mechanical strength of their cell walls and their small size. An additional problem, which usually causes difficulty for phylogenetic analyses in many organisms, is the scarcity of starting material. For this reason, an increasing number of new micromethods for isolating DNA from diverse

biological sources have been developed. Most of them include several hazardous and expensive chemical products and time-consuming steps. DNA extraction techniques commonly used for microalgae and plants include mechanical disruption or by freezing in liquid nitrogen and grinding to powder in a mortar (Doyle & Doyle, 1990; Friedl, 1995; Fawley & Fawley, 2004; Reynolds & Williams, 2004). Dimethyl sulfoxide (DMSO) is a widely used solvent for the extraction of chlorophylls (Chls) from leaves of higher plants and algae (Nikolopoulos & al., 2008). It has been demonstrated that treatment with pectinase or DMSO leads to a loosening of the most internal layers of structure in green algae (König & Peveling, 1984). Herein, we propose a new method for isolating DNA from cultured microscopic algae based on DMSO extraction efficiency combined with a heat treatment, which is also applicable to several other plant species. This DNA extraction procedure requires only 30 minutes, and a minimal amount of starting material ( $5 \times 10^6$ – $20 \times 10^6$  cells from liquid or agarized cultures of algae or approximately 15 mg of plant tissue).

### ■ MATERIALS AND METHODS

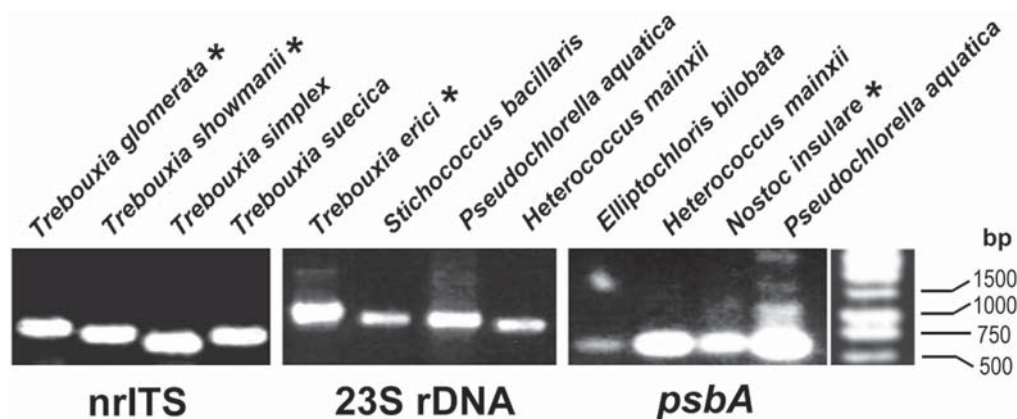
**DNA isolation procedure.** — The new DNA isolation method is suitable for algae grown in both liquid cultures and agarized media, as well as for several plants. For liquid cultures, 100–400  $\mu$ l ( $5 \times 10^6$ – $20 \times 10^6$  cells) were centrifuged in a 1.5 ml microfuge tube at 14,000 g for 1 min; the supernatant was discarded and pellets were resuspended by briefly pipetting with an equal volume (vol) of DMSO. For algae grown on agarized media and plant samples, 15 mg of fresh weight (corresponding

to approximately  $14 \times 10^6$  cells in the case of algae) were incubated with 400  $\mu$ l DMSO. In other cases, for evaluating individual algal clones grown on agarized media, colonies were picked with sterile micropipette tips and resuspended in 100  $\mu$ l DMSO by pipetting. Incubation with DMSO was performed at 65°C for 10 min and was followed by centrifugation at 10,000 g for 5 min. This procedure was sufficient to extract DNA suitable for PCR in all cases. The DMSO-extracted DNA was directly precipitated by two alternative methods which resulted in equally sufficient samples: (1) incubation with 1 vol of 4M ammonium acetate ( $\text{NH}_4\text{OAc}$ ) and 2 vol of isopropanol for 10 min at room temperature; (2) incubation with 1 vol of 3M sodium acetate pH 5.2 and 2 vol of 100% ethanol for 30 min at  $-80^\circ\text{C}$ . After centrifugation at 14,000 g for 10 min, at room temperature in (1) or at  $4^\circ\text{C}$  in (2), the resulting pellets were washed once or twice with 70% ethanol. After air-drying, the pellets were resuspended in 15–50  $\mu$ l of TE (pH 8.0) or ultra-pure water and were stored at  $4^\circ\text{C}$  until use in PCR.

**Tested organisms.** — The selected algal and plant species used in this protocol are listed in the Appendix. All tested algae except for *Trebouxia* sp. were obtained from the following culture collections: “Sammlung von Algenkulturen” at the University of Göttingen (Germany) and the Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin. *Trebouxia* sp. was cultured axenically after isolation in our laboratory from the lichen *R. farinacea* (del Campo & al., 2009). All organisms were cultured either in liquid or on agarized media except *Nostoc insulare* SAG 54.79, which was cultured only in liquid medium. All of them were grown in Bold 3N medium (Bold & Parker, 1962) either with glucose (20 g/l) and casein (10 g/l), or without them in a chamber at  $22^\circ\text{C}$  (except *Trebouxia* species which were grown at  $17^\circ\text{C}$ ) under 14 h/10 h light/dark cycle (lighting conditions:  $25 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ). Fresh tissues were used for DNA extraction from several plants from Spain, including *Porella platyphylla* (liverworts) from Cercedilla

(Madrid), *Equisetum palustre* (ferns) from the Henares river valley (Guadalajara), and various flowering plants from local nurseries.

**PCR amplification of nrITS and chloroplast-encoded psbA and LSU rDNA genes.** — To evaluate the DNA obtained with the new extraction method for suitability in downstream application(s), isolated DNAs were employed as templates for PCR amplifying several nuclear and chloroplast-encoded genes. The primer pair ITS-1T/ITS-4T, which amplified the internal transcribed spacer 1 (ITS1), the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacer 2 (ITS2) of the nuclear-encoded ribosomal RNA, was obtained from Kroken & Taylor (2000). The primer pairs psbAchl1/psbAchl2 and 23S-AL1/23S-AL2 were designed in our laboratory for amplifying two chloroplast-encoded genes: the *psbA* encoding for the D1 protein (psbAchl1: 5'-TGG TTA TAC AAC GGT GGT CC-3' and psbAchl2: 5'-GGA AGT TGT GAG CGT TAC GC-3') and the LSU rDNA (23S-AL1: 5'-GGG TAG AGC ACT GTT TCG G-3' and 23S-AL2 5'-CCT TCT CCC GAA GTT ACG G-3'). Amplification reactions were preformed in a total reaction volume of 25  $\mu$ l using Illustra Hot Start Mix RTG (GE Healthcare, New Jersey, U.S.A.). This system provides reagents for PCR reactions stable at room temperature. The only user-supplied reagents that need to be added are template DNA and specific primers, allowing for improved reproducibility while minimizing the potential for contaminations. Negative controls, without DNA template, were included in every round of PCR amplification to ensure against false-positive results caused by contaminants in the reagents. To control against apparatus-bias, PCR amplifications were performed in two different DNA Thermal Cyclers (Bio-Cycler TC-S, Boeco™, Hamburg, Germany; and SensoQuest Labcycler, Progen Scientific Ltd, South Yorkshire, U.K.). Cycling conditions were as follows:  $94^\circ\text{C}$  for 2 min; 40 cycles of  $94^\circ\text{C}$  for 30 s,  $50^\circ\text{C}$  for 60 s and  $72^\circ\text{C}$  for 1 min; followed by a final extension at  $72^\circ\text{C}$  for 7 min. Amplification products (8  $\mu$ l)



**Fig. 1.** Agarose gel (1.5% w/v) electrophoresis of PCR amplification products using DNA extracted from several algae and some plants (see Table 1) and specific primers for both nuclear and chloroplast genes. Molecular weight markers (1 kb DNA Ladder, Promega Co, Madison, Wisconsin, U.S.A.) are shown at the right. The primer pairs used in each set of the amplification reactions were as follows: ITS-1T/ITS-4T for amplifying the nuclear-encoded ribosomal RNA (Kroken & Taylor, 2000), 23S-AL1/23S-AL2 and psbAchl1/psbAchl2 for amplifying the chloroplast-encoded *psbA* and LSU rDNA genes, respectively, which were designed in our laboratory. Asterisks indicate the template DNAs extracted from liquid cultures, the rest correspond to algae cultured in agarized media.



were subjected to electrophoresis through 1.5% Seakem™ agarose gels (FMC Bioproducts, Pennsylvania, U.S.A.) and stained with Gel-Red™ Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, California, U.S.A.) (see Fig. 1).

To confirm the specificity of the PCR reactions, both strands of the resultant amplicons were sequenced using the BigDye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit II, and analyzed by automated Multicapillary Electrophoresis on an ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., California U.S.A.).

## ■ RESULTS AND DISCUSSION

The obtained sequences (Appendix) were of high quality, and corresponded to the reference sequence, as confirmed by database searches with the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> (Altschul & al., 1997). The results indicated successful and accurate amplification of all DNAs isolated by the new method. Figure 1 shows an agarose gel electrophoresis of several PCR amplification products from a selection of tested organisms. Additional loci were PCR amplified, including chloroplast-specific genes *rbcL*, *psaC* and *petB* (data not shown). DNA isolated with this method was stable for at least four months (storage at 4°C) and allowed amplifying up to 2000 bp.

The tested protocol has proven to be efficient and rapid for isolation of DNA with an average  $A_{260}/A_{280}$  ratio of 2.28, which is slightly higher than other assayed protocols (Table 1). The DNA yield was in the range of 5–35 ng per  $10^6$  cells. Spectrophotometric measurements were carried out with Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc, Wilmington, Massachusetts, U.S.A.). It should be noted that this procedure for DNA extraction has worked out with all the tested organisms comprising twenty-two green and non-green algae, two cyanobacteria and seven plants (Appendix). This procedure requires a minimal amount of starting material (only  $5 \times 10^6$ – $20 \times 10^6$  cells in the

case of algal cultures, and 15 mg in the case of plant tissues). It also works well with algal cultures in agarized media, making it suitable for analyzing algal colonies after their isolation from environmental sources. Other advantages of this procedure for DNA extraction, in comparison with similar methods, are: (1) its rapidity, taking about 30 min to be completed. It thus allows a high number of samples to be processed in relatively short time; (2) elimination of mechanical grinding (Table 1), thus preventing the possibility of contaminations. The obtained DNA is suitable for at least two hundred 25  $\mu$ l PCR amplifications with a variety of assayed primers targeting both nuclear- and organelle-encoded genes. Additionally, this procedure includes less hazardous and expensive chemicals than similar procedures. In spite of some personal protective equipment necessary for handling DMSO (eyeshields, gloves), it is less harmful than other chemical products frequently used in molecular biology (e.g., phenol,  $\beta$ -mercaptoethanol). Furthermore, residual DMSO in DNA preparations not only does not inhibit PCR amplification, but can improve the yield (Winship, 1989; Cheng & al., 1994).

The new DNA extraction method should be helpful for phycologists and lichenologists to examine photobiont isolates by molecular approaches in a faster and easier manner than with currently available techniques. Moreover, since it also works with land plants, it could be useful for all plant scientists who require a quick isolation method when only small amounts of material are available.

## ■ ACKNOWLEDGEMENT

This study was funded by the Spanish Ministry of Education and Science (CGL2006-12917-C02-01/02), the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2009-13429-C02-01/02) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO 174/2008 GVA).

## ■ LITERATURE CITED

**Table 1.** Comparison of different assayed protocols for DNA extraction to evaluate the new DNA extraction method.

	DMSO	Cenis, 1992	Doyle & Doyle, 1990
Protocol step			
Liquid nitrogen	–	–	+
Grinding	–	+	+
Extraction buffer	–	+	+
DMSO	+	–	–
$\beta$ -mercaptoethanol	–	–	+
Phenol-chlorophorm	–	–	+
Freezing	–	+	–
Efficiency (ng DNA/ $10^6$ cell)	5–35	5–96	11–14
Purity ( $A_{260}/A_{280}$ )	2.28	1.97	2.12
Time	30 min	35 min	60 min

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
- Bold, H.C. & Parker, B.C. 1962. Some supplementary attributes in the classification of *Chlorococcum* species. *Arch. Mikrobiol.* 42: 267–288.
- Cenis, J.L. 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* 20: 2380.
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W.M. & Higuchi, R. 1994. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 5695–5699.
- del Campo, E.M., Casano, L.M., Gasulla, F. & Barreno, E. 2009. Presence of multiple group I introns closely related to bacteria and fungi in plastid 23S rRNAs of lichen-forming *Trebouxia*. *Int. Microbiol.* 12: 59–67.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Fawley, M.W. & Fawley, K.P. 2004. A simple and rapid technique for the isolation of DNA from microalgae. *J. Phycol.* 40: 223–225.
- Friedl, T. 1995. Inferring taxonomic positions and testing genus level

- assignments in coccoid green lichen algae: A phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Myrmecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae cl. nov.). *J. Phycol.* 31: 632–639.
- Hebert, P.D.N. & Gregory, T.R.** 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy *Syst. Biol.* 54: 852–859.
- Huss, V. A., Ciniglia, C., Cennamo, P., Cozzolino, S., Pinto, G. & Pollio, A.** 2002. Phylogenetic relationships and taxonomic position of *Chlorella*-like isolates from low pH environments (pH < 3.0). *BMC Evol. Biol.* 2: 13.
- Khan, H., Parks, N., Kozera, C., Curtis, B.A., Parsons, B.J., Bowman, S. & Archibald, J.M.** 2007. Plastid genome sequence of the cryptophyte alga *Rhodomonas salina* CCMP1319: Lateral transfer of putative DNA replication machinery and a test of chromist plastid phylogeny. *Molec. Biol. Evol.* 24: 1832–1842.
- König, J. & Peveling, E.** 1984. Cell walls of the phycobionts *Trebouxia* and *Pseudotreboxia*: Constituents and their localization. *Lichenologist* 16: 129–144.
- Krienitz, L., Hegewald, E., Hepperle, D. & Wolf, M.** 2003. The systematics of coccoid green algae: 18S rRNA gene sequence data versus morphology. *Biologia* 58: 437–446.
- Krienitz, L., Hegewald, E.H., Hepperle, D., Huss, V.A.R., Rohrs, T. & Wolf, M.** 2004. Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia* 43: 529–542.
- Kroken, S. & Taylor, W.J.** 2000. Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *Bryologist* 103: 645–660.
- López-Bautista, J.M., Rindi, F. & Guiry, M.D.** 2006. Molecular systematics of the subaerial green algal order Trentepohliales: an assessment based on morphological and molecular data. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1709–1715.
- Nikolopoulos, D., Korgiopoulou, C., Mavropoulos, K., Liakopoulos, G. & Karabourniotis, G.** 2008. Leaf anatomy affects the extraction of photosynthetic pigments by DMSO. *Talanta* 76: 1265–1268.
- Reynolds, M.M. & Williams, C.G.** 2004. Extracting DNA from submerged pine wood. *Genome* 47: 994–997.
- Winship, P.R.** 1989. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res.* 17: 1266.
- Yoon, H.S., Müller, K.M., Sheath, R.G., Ott, F.D. & Bhattacharya, D.** 2006. Defining the major lineages of red algae (Rhodophyta). *J. Phycol.* 42: 482–492.

**Appendix.** Taxon; species; strain/locality; GenBank accession number.

**Chlorophyta – Chlorophyceae;** *Pseudochlorella aquatica*; SAG 2149; GQ168949. *Stichococcus bacillaris*; SAG 335-3; GQ168950. *Trochiscia gutwinskii*; SAG 102.80; GQ168953. *Trochiscia hystrix*; SAG 103.80; GQ168954. **Chlorophyta – Trebouxiophyceae;** *Elliptochloris bilobata*; SAG 245.80; GQ168945. *Elliptochloris reniformis*; SAG 2200; GQ168955. *Leptosira obovata*; SAG 445-1; GQ168956. *Myrmecia bisecta*; SAG 2043; GQ168957. *Nannochloris atomus*; SAG 14.87; GQ168947. *Trebouxia angustilobata*; SAG 2204; FJ626724. *Trebouxia arboricola*; SAG 219-1A; FJ626725. *Trebouxia asymmetrica*; SAG 48.88; AJ249565. *Trebouxia australis*; SAG 2205; FJ626726. *Trebouxia brindabellae*; SAG 2206; FJ626727. *Trebouxia decolorans*; UTEX B781; FJ626728. *Trebouxia erici*; SAG 32.85; FJ626729. *Trebouxia gelatinosa*; UTEX906; FJ626730. *Trebouxia glomerata*; SAG 100.80; FJ626731. *Trebouxia irregularis*; SAG 33.85; FJ626732. *Trebouxia jamesii*; UTEX 2233; FJ626733. *Trebouxia showmanii*; SAG 2009; FJ626734. *Trebouxia simplex*; SAG 101.80; FJ626735. *Trebouxia suecica*; SAG 2207; FJ626736. *Trebouxia sp.*; axenic culture of this alga after its isolation from the lichen *R. farinacea*, stored in the Department of Botany of the Universitat de Valencia (Valencia – Spain) and Department of Plant Biology of the Alcalá de Henares University (Madrid – Spain); FJ418565. **Chlorophyta – Prasinophyceae;** *Tetraselmis chui*; SAG 8-6; GQ921943. **Chlorophyta – Ulvophyceae;** *Trentepohlia annulata*; SAG 20.94; GQ168951. *Trentepohlia spec.*; SAG 118.80; GQ168952. **Streptophyta;** *Porella platiphylla*; Cercedilla (Madrid-Spain); GQ916676. *Equisetum palustre*; “Henares River Valley” (Guadalajara-Spain); GQ916689. *Malva sylvestris*; “Henares River Valley” (Guadalajara-Spain); GQ916664. *Petroselinum crispum*; nursery-garden; GQ916668. *Retama sphaerocarpa*; “Henares River Valley” (Guadalajara-Spain); GQ916670. *Saintpaulia ionantha*; nursery-garden; GQ916671. *Valerianella locusta*; nursery-garden; GQ916672. **Heterokontophyta – Xanthophyceae;** *Heterococcus brevicellularis*; SAG 835-1; GQ168958. *Heterococcus mainxii*; SAG 835-6; GQ168946. **Cyanobacteria;** *Nostoc insulare*; SAG 54.79; GQ168959. *Nostoc ellipsosporum*; SAG 1453-7; GQ168948.



## Short Communication

# A single primer pair gives a specific ortholog amplicon in a wide range of Cyanobacteria and plastid-bearing organisms: Applicability in inventory of reference material from collections and phylogenetic analysis

E.M. del Campo<sup>a,\*</sup>, A. del Hoyo<sup>a</sup>, C. Royo<sup>b</sup>, L.M. Casano<sup>a</sup>, R. Álvarez<sup>a</sup>, E. Barreno<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Department of Plant Biology, University of Alcalá, 28871-Alcalá de Henares (Madrid), Spain

<sup>b</sup> ICBI, Department of Botany, University of Valencia, Faculty of Biology, C/ Dr. Moliner 50, 46100-Burjassot (Valencia), Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 21 May 2010

Revised 13 September 2010

Accepted 17 September 2010

Available online 27 September 2010

## Keywords:

23S rRNA gene

Algal origin

Biodiversity

Chloroplast

Phylogeny

Plastid origin

## ABSTRACT

The scarcity of universally applied molecular markers for algae has resulted in the development of multiple, independent and not easily comparable systems. The goal of this work is to increase the number of available molecular markers and to generate easily comparable systems. Thereby, we have designed a primer pair capable of amplifying a broad range of organisms: Cyanobacteria, Chlorophyta, Chlorarachniophyta, Cryptophyta, Euglenida, Glaucophyta, Rhodophyta, Stramenopiles and Streptophyta including plants. This primer pair can amplify a portion of the 23S rRNA gene with sufficient variability to identify reference material from collections across a broad range of taxa and perform phylogenetic studies alongside other available markers.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Algae are generally referred to as a collection of unrelated organisms that possess plastids. Plastid-bearing organisms are phylogenetically diverse, and are scattered across four of the five major groups of eukaryotes (Keeling 2010; Lane and Archibald, 2008). Despite increased efforts and advances in the molecular characterization of algae, there are still no records for the number of algal taxa in GenBank (e.g. no species belonging to genus *Dilabifilum*). Recently, several investigations have demonstrated the polyphyly of traditionally defined algal genera like *Chlorella* (e.g. Neustupa et al., 2009), *Coccomyxa* (e.g. Rodríguez et al., 2008), *Trebouxia* (e.g. Skaloud and Peksa, 2010), *Trentepohlia* (e.g. Rindi et al., 2009). The continuous reexamination of many algae taxa, especially within the Chlorophyta, stresses the importance of finding more molecular markers and identifying a larger number of sequences from more diverse organisms belonging to this particular and not well-resolved group. In most groups of organisms, single-gene analyses did not provide sufficient resolution or sometimes gave conflicting results, which is often attributed to the limited number of nucleotides to be aligned or to differing rates of sequence evolution. Phylogenetic analyses based on gene combinations confidently resolved the conflicts between the single-gene

analyses, enhanced phylogenetic resolution, and were better supported by morphological information (Gontcharov et al., 2004). Some examples of successful gene combinations from different sub-cellular compartments were implemented among Streptophyta algae. Single-gene phylogenies using SSU rRNA gene congruently resolved the Zygnematophyceae as a monophyletic lineage but revealed some conflicting results at lower taxonomic levels (order, family, genus) (e.g. Gontcharov et al., 2003). However, further analyses of a combination of two genes both nuclear and plastid encoded, rendered higher resolution and more congruence with the morphological information than single-gene analyses (Gontcharov et al., 2004). A similar result was obtained among filamentous desmids after combining two different genes from both nucleus and mitochondria (Hall et al., 2008).

The goal of the present study is to increase the number of available molecular markers applicable to a broad range of photosynthetic organisms for phylogenetic reconstructions in combination with other markers.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Specimen acquisition

Specimens were obtained from the various sources listed in Tables S1–S4, and were selected considering the maximum taxonomic range possible. We used axenically cultured eukaryotic

\* Corresponding author. Fax: +34 91 8855066.

E-mail address: [eva.campo@uah.es](mailto:eva.campo@uah.es) (E.M. del Campo).

microalgae and cyanobacteria obtained from Sammlung von Algenkulturen at Universität Göttingen (Germany) (SAG) and The Culture Collection of Algae at the University of Texas (Austin, TX, USA) (UTEX), except for *Dictyochloropsis reticulata* and *Trebouxia* sp., which were isolated in our laboratories from the lichens *Lobaria pulmonaria* and *Ramalina farinacea* (L.) (del Campo et al., 2009, 2010a). Fresh marine macroalgae were supplied by Porto Muiños S.L. (La Coruña, Spain) and were collected from the Coast of La Coruña (Spain). Bryophytes were collected from Cercedilla (Madrid, Spain), ferns were collected from the living collection of the Botanical Garden of Valencia (Spain). The remaining plant specimens were collected from diverse nursery gardens, public parks and botanical gardens of central Spain.

## 2.2. DNA extraction

The DNA was extracted according to four different protocols depending on the type of starting material: (i) Reynolds and Williams (2004) for gymnosperms and macroalgae; (ii) Cenis (1992) for the majority of angiosperms and ferns; (iii) Pedersen et al. (2006) for bryophytes; and, (iv) del Campo et al. (2010b) for microalgae and several bryophytes and angiosperms.

## 2.3. Polymerase chain reaction

For primer design, we compared a wide range of taxa to cover positions 879–1837 in the *Escherichia coli* (*E. coli*) 23S rRNA (Ohnishi et al., 2000), which was previously tested for phylogenetic analyses within the *Trebouxia* genus (Del Campo et al., 2010a). We used the web application BatchPrimer3 for primer design (You et al., 2008).

We selected primers 23SU1: 5'-AGGGGTAAAGCACTGTTTCG-3' [in few cases with degenerated positions 8(R), 16(Y), 19(Y)] and 23SU2: 5'-CCTTCTCCCGAAGTTACG-3' for further testing, as it showed the highest similarity to a high number of taxa (particularly at the 3' end). Isolated DNAs were amplified by PCR with the specific primers described above, under the following cycling conditions: one cycle at 94 °C for 2 min; 40 cycles of 94 °C for 30 s, 55 °C for 60 s, and 72 °C for 2 min. These cycles were followed by a final extension step at 72 °C for 7 min.

## 2.4. Purification and sequencing of PCR products

Amplification products were subjected to electrophoresis through 1.5% agarose gels. The corresponding bands were excised from the gel, purified with a DNA purification kit (Illustra GFX™ PCR DNA and Gel Band purification kit, GE Healthcare, NJ, USA), then used for sequencing. Sequencing reactions were carried out by using the Big Dye™ Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit II (Applied Biosystems Co. Foster City, CA, USA) and separated by automated multicapillary electrophoresis, then further analysed on an ABI Prism 3730 Genetic Analyser (Applied Biosystems Co.).

## 2.5. Phylogenetic analyses

All the sequences were aligned using the default parameters implemented in Muscle 3.6 (Edgar, 2004) and then adjusted with BioEdit 7.0 (Hall, 1999). Phylogenetic analyses were based on chloroplast LSU rRNA gene sequences. The data set for constructing phylogenies included 99 taxa and gaps were treated as missing characters. Data sets were subjected to maximum-likelihood (ML) analyses with PHYML V2.4.3 (Guindon and Gascuel, 2003), maximum-parsimony (MP), and distance analyses using PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003), and examined with a Bayesian approach using MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). ModelTest 2.2.3 (Posada and Crandall, 1998) was run to identify the most

likely model of evolution. In the MP and ML analyses, a heuristic search was performed using random stepwise addition, and tree bisection–reconnection (TBR) and a branch-swapping algorithm to determine the best tree. For the ML analyses, the transition/transversion ratio was estimated from the minimum evolution tree. Distance analyses were done by using the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987). Trees were built from a general time-reversible distance matrix calculated using the minimum evolution criterion (Rzhetsky and Nei, 1992). For the minimum evolution method, a heuristic search procedure was used and site-to-site rate heterogeneity was modeled as a gamma distribution (Yang, 1994). Bootstrap probabilities (Felsenstein, 1985) were calculated to estimate the robustness of the clades from 100 replicates of the data. Phylogenetic Bayesian analyses (MrBayes 3.1.2; Huelsenbeck and Ronquist, 2001) were performed using the GTR model (Rodríguez et al., 1990). The Markov chain Monte Carlo method (MCMC) from a random starting tree was initiated in the Bayesian inference and run for  $10^7$  generations. Sampling was every 100th generation. Result files were downloaded and the results assessed at the desktop, using commands sump and sumt. After chain convergence analysis, we discarded all samples obtained during the first 25,000 generations as burnin. Posterior probabilities for each node were inferred from the resulting consensus tree.

## 3. Results and discussion

The availability of primers p23SrV\_f1 and p23SrV\_r1 (Presting, 2006; Sherwood and Presting, 2007) for amplifying a small portion flanking Domain V of the 23S plastid rRNA gene in eukaryotic algae and cyanobacteria prompted us to try these primers to amplify a variety of eukaryotic algal lineages and cyanobacteria. After this first approach, many tested algal species produced an amplification product of the expected size (approximately 410 nt). However, other species, particularly some species belonging to the *Trebouxia* genus, rendered longer products due to the existence of group I introns (at position cL2263 in *E. coli* 23S rRNA, Ohnishi et al., 2000). In addition, other species from *Asterochloris*, *Coccomyxa*, *Dictyochloropsis* and *Trebouxia* contained an intron (at position cL2449), disrupting the target sequence for the p23SrV\_f1, which prevented the amplification of the expected DNA fragment (del Campo et al., 2009, 2010a). Another problem for this p23SrV\_f1/p23SrV\_r1 primer pair was the low divergence among sequences of amplification products from several closely-related species. On the other hand, the group I intron inserted at position cL2449 is also present in the 23S rRNA gene of other green algae including Chlorophyta and Streptophyta, and seemed to be subjected to horizontal transmission among different organisms (del Campo et al., 2009).

After these findings, we searched for a more appropriate primer pair for our purposes through bioinformatics analyses with the aid of the web application BatchPrimer3 (You et al., 2008) using all available 23S rRNA gene sequences from GenBank. The newly designed primer pair (23SU1/23SU2) had been demonstrated to successfully amplify a portion of the chloroplast 23S rRNA gene occurring at positions 879–1837 in the *E. coli* 23S rRNA (Ohnishi et al., 2000). The newly designed primers (23SU1/23SU2) for the 23S rRNA gene allowed amplifying DNA extracted from all assayed specimens (a total of 88 listed in Tables S1–S4). They included cyanobacteria and plastid-bearing organisms scattered across four of the six major groups of eukaryotes (Archeplastida, Chromalveolata, Excavata, Rhizaria, Amoebozoa and Opisthokonta). These are Archeplastida, Chromalveolata, Excavata and Rhizaria (e.g. Keeling 2010; Lane and Archibald, 2008). The average size of the amplified products was around 800 nt, maximum in the case of Chlorophyta (e.g. approximately 800 nt

in *Asterochloris erici*, and 900 in *Trentepohlia* sp.) and a minimum in cyanobacteria (e.g. approximately 600 nt in *Calothrix desertica*). All of the obtained amplification products were purified and sequenced. After analysis, all of the sequences were deposited in the GenBank database. It should be noted that the present study includes several specimens for which we have reported a nucleotide sequence for the first time (e.g. specimens of *Dilabifilum* genus and the species *Coccomyxa arvenensis*, *Cryptomonas* sp. SAG 979-8, *Dictyochloropsis irregularis* and *Trochiscia gutwinksi*). Indeed, to date we have reported 81 new sequences of the 23S rRNA gene from a broad range of organisms. They include eukaryotes that possess primary plastids (33 from Chlorophyta, 31 from Streptophyta and 4 from Rhodophyta), eukaryotes that possess secondary plastids (2 from Cryptomonads, 1 from Haptophyta and 4 from Stramenopiles) and prokaryotes (6 from cyanobacteria). It is noteworthy the very limited number of nucleotide and protein sequences and complete genomes from the studied organisms available in GenBank (see Tables S1–S4).

After analyzing the sequence of the respective amplification products, we found enough variability for performing studies focused on the evolution of a broad range of organisms. The newly designed primer pair (23SU1–23SU2) amplifies a region with a relatively lower intron frequency and higher divergence among closely-related species. The lack of intron insertions was demonstrated in all of the sequences experimentally analysed in this study and in all the sequences present in GenBank, with only three exceptions [*Haematococcus lacustris*, *Dunaliella parva*, *Chlamydomonas* sp. (SAG 66.72); Accessions Nos. L49151, L43540, L43539, respectively], each of them with one group IA1 intron at a position corresponding to residues 1065–1066 in the *E. coli* 23S rRNA. These results provided two important advantages with respect to primers p23SrV\_f1 and p23SrV\_r1 (Presting, 2006; Sherwood and Presting, 2007): (i) an increase in the probability of primer targeting due to the lower occurrence of introns; and (ii) an improvement of the accuracy of phylogenetic analyses based on larger and more divergent sequences. Furthermore, after testing the homology of primers 23SU1 and 23SU2 against the sequences of the chloroplast 23S rRNA gene obtained from GenBank, we found that they could have potential use in a broader range of organisms than that experimentally tested in this study. The new marker works well at intermediate taxonomic levels like order, family, genus and even at deep levels (e.g. species within *Trebouxia* genus and possibly other algal genera). A higher number of data are needed to demonstrate that this marker works at shallow taxonomic levels.

Fig. 1 depicts an unrooted phylogenetic tree based on the sequenced portion of the chloroplast 23S rRNA gene after amplification with primers 23SU1 and 23SU2. The obtained phylogeny was reconstructed using a bootstrap (100 replications) maximum likelihood approach with tree optimization (PHYML V2.4.3; Guindon and Gascuel, 2003) with the HKY85 model of nucleotides substitution. The distribution of the main groups is consistent overall with the grouping of land plants, and red and green algae as published in previous work (e.g. Rodríguez-Ezpeleta et al., 2005). All the tested cyanobacteria species are grouped in the same clade with respect to the remaining taxa with high support values. Among eukaryotes, Archeplastida includes an organism with primary plastids, which are thought to be derived from a single primary endosymbiosis of a cyanobacterium. The monophyly of this supergroup has been recovered in recent phylogenetic analyses of large multi-gene data sets (e.g. Rodríguez-Ezpeleta et al., 2005; Yoon et al., 2005; Inagaki et al., 2009).

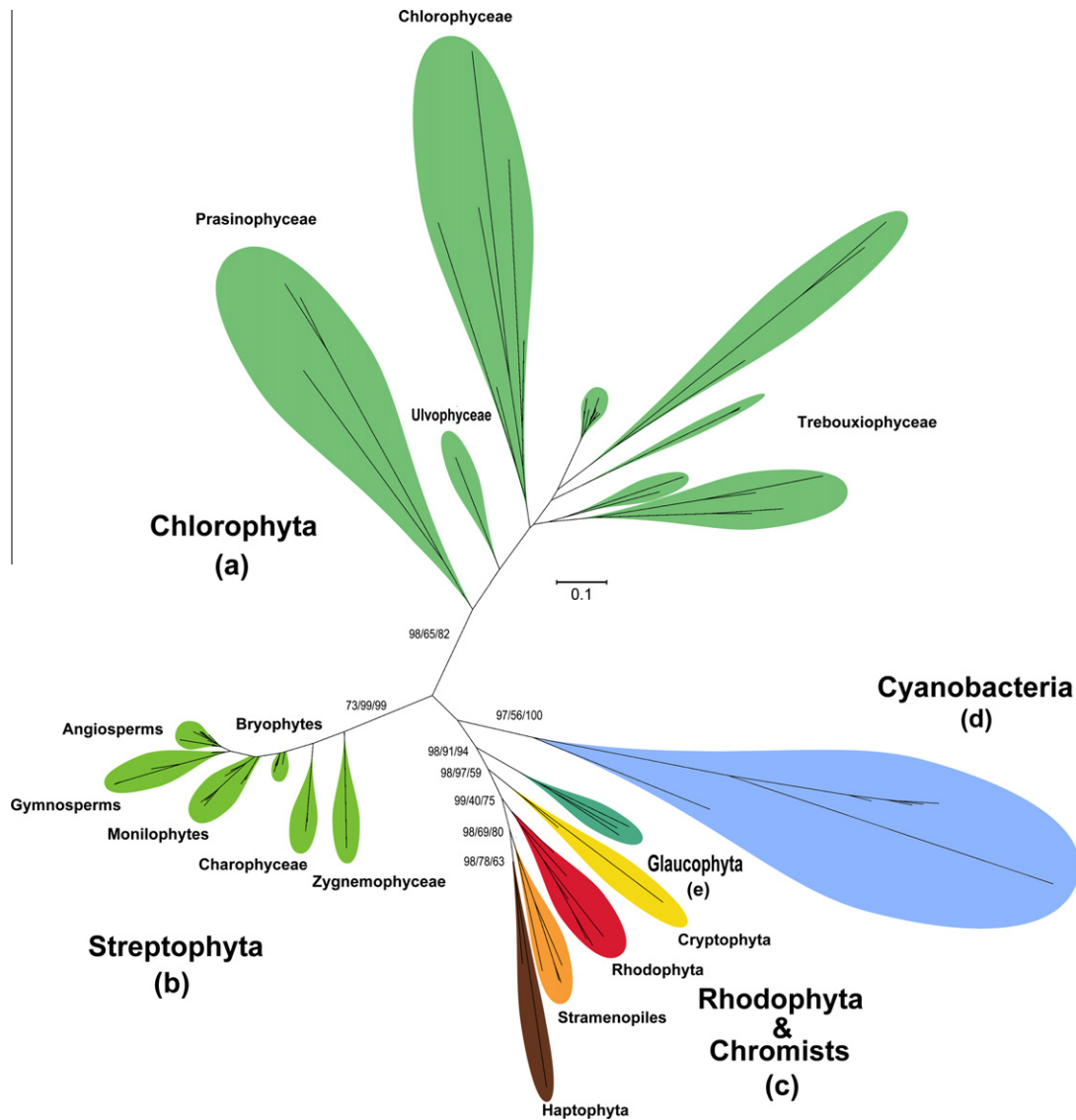
The phylogram depicted in Fig. 2a shows several monophyletic groups of algae within Chlorophyta but it has been unable to unravel their branching orders. Similar results were obtained in phylogenies inferred from 18S rRNA gene data (e.g. Darienko et al., 2010; Pröschold and Leliaert, 2007). Some of these clades correspond

with those previously described on the basis of the nuclear SSU rRNA gene. Some of them are similar to those of Darienko et al. (2010): the “*Elliptochloris*-clade” which includes specimens of *Elliptochloris* and *Coccomyxa*; the “*Watanabea*-clade” which includes two *Dictyochloropsis* species (*D. irregularis* and *D. reticulata*) and *Chlorella luteoviridis*; and the “*Trebouxia*-clade,” which exclusively includes *Trebouxia* species in our work. Others resemble those of Pröschold and Leliaert (2007): the *Tetraselmis*-clade (Prasinophyceae IV), which include several species of the genus *Tetraselmis* (*T. carteriiformis*, *T. chuii* and *T. striata*); the Myrmecea-clade, which include several species of the genus *Myrmecea* (*M. bisecta* and *F. israeliensis*, which is currently regarded as a taxonomic synonym of *Myrmecea israeliensis* according to Algaebase) (Pröschold and Leliaert, 2007).

It is noteworthy that the phylogram depicted in Fig. 2a constructed on the basis of the sequences of green algae belonging to Chlorophyta is not well resolved and many clades are not supported by high support values compared with the other depicted phylograms (Fig. 2b–d). These results are similar to those obtained with other previously assayed markers among different organisms belonging to Chlorophyta (e.g. Darienko et al., 2010). Phylogenetic relationships among the major groups of green algae, on the basis of the nuclear SSU rRNA gene sequences as a single marker, have been found particularly difficult to resolve because the internal branches grouping the different orders and classes are generally very short relative the subsequent evolutionary history of the group (Pröschold and Leliaert, 2007). These short internal, often weakly supported branches can be attributed to a number of factors including conflict between characters due to the homoplasy within a sequence, insufficient sequence length, rate variation across characters or taxa, the presence of taxa with unstable positions that may reduce support levels in the tree as a whole or as a historical signal of rapid evolutionary radiation (Pröschold and Leliaert, 2007). The factors most open to investigation in the challenge of green algal tree reconstruction are sequence length and taxon sampling. The general consensus today is that increasing taxon number correlates with a slight decrease in phylogenetic accuracy, while increasing sequence length or gene number has a significant positive effect on phylogenetic accuracy. This fact emphasizes the need for additional molecular markers whose combination will provide better-resolved phylogenies (Pröschold and Leliaert, 2007). The difficulty in unequivocally resolving the basal divergences within the green algae, even with a large number of concatenated genes, might be attributed to a real rapid, early radiation of the green algae, rather than to data availability. As indicated by Pröschold and Leliaert (2007), most green algae genera and species are polyphyletic and without strain designations and comparisons are at least difficult and often not possible. The same authors stated that starting with reference material from culture collections, the SSU and ITS rRNA gene and additional markers should be sequenced and phylogenetically analyses done using different molecular methods (e.g. Maximum Likelihood, Maximum Parsimony, Distance and Bayesian).

Fig. 2b shows a phylogram for Streptophytes, which is well resolved and the different clades including different taxa corresponding to either plants (angiosperms, gymnosperms, monilophytes, mosses and liverworts) or algae (Charophyceae and Zygnemophyceae) are well supported by high support values after ML, MP, distance (NJ) and Bayesian analyses. This phylogeny is consistent with previously published phylogenetic evidence of the deepest divergence events within land plants (Qiu et al., 2006). This well-established phylogeny has been used as a “control” for evaluating the validity of the proposed sequence to infer phylogenetic relationships.

Fig. 2c indicates a monophyletic origin for the plastids in Cryptophyta, Haptophyta, and Stramenopiles, and positions the



**Fig. 1.** Unrooted phylogeny based on the sequenced portion of the chloroplast 23S rRNA gene after amplification with primers 23SU1 and 23SU2. The tree was obtained with a ML approach using PhyML v3.0 (Guindon and Gascuel, 2003) and depicted using SplitsTree Software (Huson and Bryant, 2006). Values on the left slash-mark were inferred with Bayesian analysis, those at the right of the slash-mark with a MP method, and those below the branches indicate bootstrap values of 100 replicates after distance analysis (NJ). Support values were recorded only for the main taxa groups. The scale bar indicates substitutions/site. Several assayed specimens were not included in the phylogeny because of the excessive branch lengths.

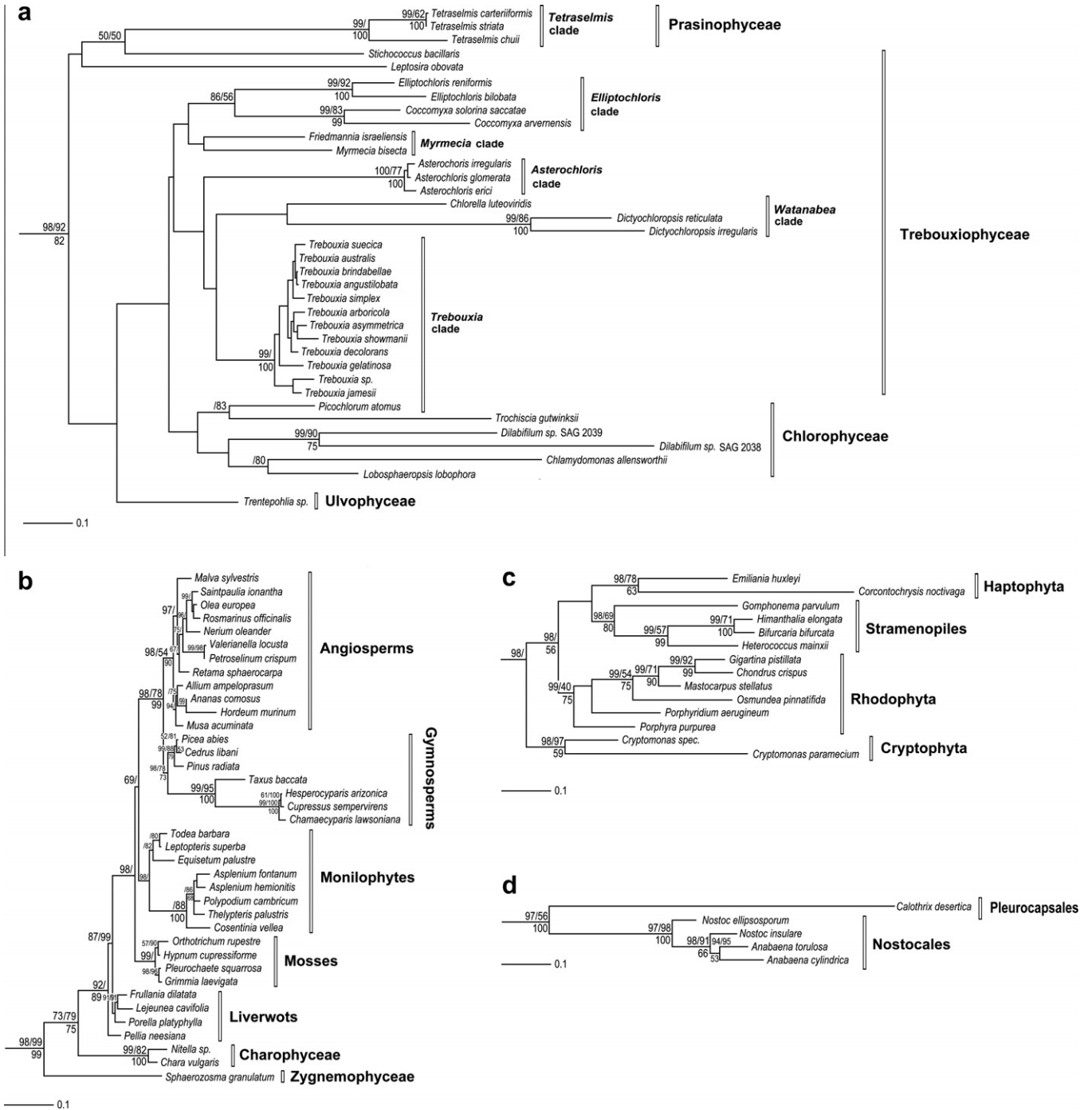
Cryptophyta plastids as the earliest divergence in the chromist group, in agreement with several previous published phylogenetic analyses (e.g. Yoon et al., 2005; Hackett et al., 2007). Our results are also consistent with the proposed independent origins of the plastids of the Cryptophyta and Stramenopiles from red algal sources (Oliveira and Bhattacharya, 2000).

Complex plastids bounded by more than two membranes (three or four) arose via separate secondary endosymbioses of either a green alga in some groups of organisms such as Euglenids and Chlorarachniophyta (Turmel et al., 2009) or a red alga in other groups such as the Cryptophyta, Haptophyta and Stramenopiles (chromalveolate hypothesis, reviewed in Vesteg et al., 2009). The Chromalveolata is a putative eukaryotic supergroup, which includes chromists (cryptophytes, haptophytes, stramenopiles) and alveolates (apicomplexas, ciliates and dinoflagellates). The chromalveolates are postulated to be monophyletic on the basis of plastid pigmentation in photosynthetic members, plastid gene and genome relationships, nuclear “host” phylogenies of some

chromalveolate lineage, unique gene duplication and replacements shared by these taxa and the evolutionary history of components of the plastid import and translocation systems (Hackett et al., 2007).

Fig. 2d shows a tree based on the sequences of the 23S rRNA gene from several cyanobacteria. The enslavement by a protozoan of a phagocytosed cyanobacterium is thought to have originated in chloroplasts probably only about 600 Myr ago (Cavalier-Smith, 2010). Consequently, the chloroplast 23S rRNA gene evolved from a cyanobacterial 23S rRNA gene. The sequence of the two primers designed in this work (23SU1/23SU2) match all cyanobacterial sequences included in the tree of Fig. 2d.

Phylogenetic relationships within the main groups of organisms depicted in Fig. 1 are well resolved and show high support values except for Chlorophyta algae. It is known that most of the genera in the Chlorophyta in general are polyphyletic (Pröschold and Leliaert, 2007). The availability of a higher number of markers from different sub-cellular compartments and their sequencing in new unexplored taxa can help to resolve the conflictive and not yet



**Fig. 2.** Detailed portions of the phylogram depicted in Fig. 1. The phylogram of Fig. 1 was rooted at the Cyanobacterium *Chroococcidiopsis cubana* belonging to Pleurocapsales and the resulting cladogram was divided into portions (a–d) corresponding to the main taxa groups. Values on the left slash-mark were inferred with Bayesian analysis, those at the right of the slash-mark with a MP method, and those below the branches indicate bootstrap values of 100 replicates after distance analysis (NJ). Support values were recorded only for those lineages that are supported by 50%. The scale bar indicates substitutions/site. (a) Part of the phylogram comprising organisms belonging to Chlorophyta. (b) Part of the phylogram comprising organisms belonging to Streptophyta. (c) Part of the phylogram comprising organisms belonging to Rhodophyta and Chromalveolates. (d) Part of the phylogram comprising organisms belonging to cyanobacteria.

revolved phylogeny of Chlorophyta algae and other less studied organism groups.

**4. Conclusion**

In this work we contributed to an increase in the number of available markers applicable to a wide range of organisms including some specimens bearing plastids derived from secondary endosymbioses. We propose the amplified portion of the 23S rRNA

gene with the primer pair “23SU1/23SU2” as a new molecular marker, which exhibits multiple advantages: (i) the universality of the designed primers can serve to identify environmental mixtures after cloning; (ii) the length of the obtained amplicons of approximately 800 nt allowed for amplification from low quality DNA extracted by rapid methods; (iii) an absence of introns which facilitates amplification reactions, sequencing and phylogenetic analyses; and, (iv) the covered nucleotide sequences are suitable to perform phylogenetic analyses. As indicated in previous

paragraphs, in most groups of organisms, single-gene analyses did not provide sufficient resolution or sometimes gave conflicting results whereas phylogenetic analyses based on gene combinations confidently resolved these conflicts and enhanced phylogenetic resolution by being better supported by morphological information. Here we provide a new molecular marker which can be used in combination with others to improve phylogenetic reconstructions in a broad range of organisms.

## Acknowledgments

We acknowledge to all the members of Porto Muiños Co. (A Coruña, Spain) their collaboration in this work by supplying all the assayed macroalgae and to the members of the Unidad de Biología Molecular (Universidad de Alcalá) for their technical assistance. This study was funded by the Spanish Ministry of Education and Science (CGL2006-12917-C02-01/02), the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2009-13429-C02-01/02) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO 174/2008 GVA).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ymp.2010.09.014](https://doi.org/10.1016/j.ymp.2010.09.014).

## References

- Cavalier-Smith, T., 2010. Deep phylogeny, ancestral groups and the four ages of life. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 111–132.
- Genis, J.L., 1992. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.* 20, 2380.
- Darienko, T., Gustavs, L., Mudimu, O., Menendez, C.R., Schumann, R., Karsten, U., Pröschold, T., 2010. *Chloroidium*, a common terrestrial coccoid alga previously assigned to *Chlorella* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Eur. J. Phycol.* 45, 79–95.
- Del Campo, E.M., Casano, L.M., Gasulla, F., Barreno, E., 2009. Presence of multiple group I introns closely related to bacteria and fungi in plastid 23S rRNAs of lichen-forming *Trebouxia*. *Int. Microbiol.* 12, 59–67.
- Del Campo, E.M., Casano, L.M., Gasulla, F., Barreno, E., 2010a. Suitability of chloroplast LSU rDNA and its diverse group I introns for species recognition and phylogenetic analyses of lichen-forming *Trebouxia* algae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 54, 437–444.
- Del Campo, E.M., del Hoyo, A., Casano, L.M., Martínez-Alberola, F., Barreno, E., 2010b. A rapid and cost-efficient DMSO-based method for isolating DNA from cultured algae related to lichen photobionts. *Taxon*.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783–791.
- Gontcharov, A.A., Marin, B., Melkonian, M., 2003. Molecular phylogeny of conjugating green algae (Zygnemophyceae, Streptophyta) inferred from SSU rDNA sequence comparisons. *J. Mol. Evol.* 56, 89–104.
- Gontcharov, A.A., Marin, B., Melkonian, M., 2004. Are combined analyses better than single gene phylogenies? A case study using *ssu rDNA* and *rbcL* sequence comparisons in the zygnematophyceae (Streptophyta). *Mol. Biol. Evol.* 21, 612–624.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- Hackett, J.D., Yoon, H.S., Li, S., Reyes-Prieto, A., Rümmele, S.E., Bhattacharya, D., 2007. Phylogenomic analysis supports the monophyly of cryptophytes and haptophytes and the association of rhizaria with chromalveolates. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1702–1713.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Series* 41, 95–98.
- Hall, J.D., Karol, K.G., McCourt, R.M., Delwiche, C.F., 2008. Phylogeny of the conjugating green algae based on chloroplast and mitochondrial nucleotide sequence data. *J. Phycol.* 44, 467–477.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754–755.
- Huson, D.H., Bryant, D., 2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol. Biol. Evol.* 23, 254–267.
- Inagaki, Y., Nakajima, Y., Sato, M., Sakaguchi, M., Hashimoto, T., 2009. Gene sampling can bias multi-gene phylogenetic inferences: the relationship between red algae and green plants as a case study. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1171–1178.
- Keeling, P.J., 2010. The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philos. Trans. R. Soc. B* 365, 729–748.
- Lane, C.E., Archibald, J.M., 2008. The eukaryotic tree of life: endosymbiosis takes its TOL. *Trends Ecol. Evol.* 23, 268–275.
- Neustupa, J., Němcová, Y., Eliáš, M., Škaloud, P., 2009. *Kalinella bambusicola* gen et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid *Chlorella*-like subaerial alga from Southeast Asia. *Phycol. Res.* 57, 159–169.
- Ohnishi, M., Murata, T., Nakayama, K., Kuhara, S., Hattori, M., Kurokawa, K., Yasunaga, T., Yokoyama, K., Makino, K., Shinagawa, H., et al., 2000. Comparative analysis of the whole set of rRNA operons between an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Sakai strain and an *Escherichia coli* K-12 strain MG1655. *Syst. Appl. Microbiol.* 23, 315–324.
- Oliveira, M.C., Bhattacharya, D., 2000. Phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the secondary endosymbiotic origin of algal plastids. *Am. J. Bot.* 87, 482–492.
- Pedersen, N., Russell, S.J., Newton, A.E., Ansell, S.W., 2006. A novel molecular protocol for the rapid extraction of DNA from bryophytes and the utility of direct amplification of DNA from a single dwarf male. *Bryologist* 109, 257–264.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Presting, G.G., 2006. Identification of conserved regions in the plastid genome: implications for DNA barcoding and biological function. *Can. J. Bot.* 84, 1434–1443.
- Pröschold, T., Leliaert, F., 2007. Systematics of the green algae: conflict of classic and modern approaches. In: Brodie, J., Lewis, J. (Eds.), *Unravelling the Algae: The Past, Present and Future*. CRC Press, New York, pp. 124–148.
- Qiu, Y.L., Li, L., Wang, B., Chen, Z., Knoop, V., Groth-Malonek, M., Dombrowska, O., Lee, J., Kent, L., Rest, J., et al., 2006. The deepest divergences in land plants inferred from phylogenomic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 15511–15516.
- Reynolds, M.M., Williams, C.G., 2004. Extracting DNA from submerged pine wood. *Genome* 47, 994–997.
- Rindi, F., Lam, D.W., Lopez-Bautista, J.M., 2009. Phylogenetic relationships and species circumscription in *Trentepohlia* and *Printzina* (Trentepohliales, Chlorophyta). *Mol. Phylogenet. Evol.*
- Rodríguez, F., Feist, S.W., Guillou, L., Harkestad, L.S., Bateman, K., Renault, T., Mortensen, S., 2008. Phylogenetic and morphological characterisation of the green algae infesting blue mussel *Mytilus edulis* in the North and South Atlantic oceans. *Dis. Aq. Org.* 81, 231–240.
- Rodríguez, F., Oliver, J.L., Marin, A., Medina, J.R., 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* 142, 485–501.
- Rodríguez-Ezpeleta, N., Brinkmann, H., Burey, S.C., Roure, B., Burger, G., Löffelhardt, W., Bohnert, H.J., Philippe, H., Franz Lang, B., 2005. Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr. Biol.* 15, 1325–1330.
- Rzhetsky, A., Nei, M., 1992. Statistical properties of the ordinary least-squares, generalized least-squares, and minimum-evolution methods of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* 35, 367–375.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Sherwood, A.R., Presting, G.G., 2007. Universal primers amplify a 23S rRNA gene plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *J. Phycol.* 43, 605–608.
- Škaloud, P., Peksa, O., 2010. Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Mol. Phylogenet. Evol.* 54, 36–46.
- Swofford, D.L., 2003. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Turmel, M., Gagnon, M.C., O'Kelly, C.J., Otis, C., Lemieux, C., 2009. The chloroplast genomes of the green algae *Pyramimonas*, *Monomastix*, and *Pycnococcus* shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Mol. Biol. Evol.* 26, 631–648.
- Vesteg, M., Vacula, R., Krajcovic, J., 2009. On the origin of chloroplasts, import mechanisms of chloroplast-targeted proteins, and loss of photosynthetic ability – review. *Folia Microbiol. (Praha)* 54, 303–321.
- Yang, Z., 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J. Mol. Evol.* 39, 306–314.
- Yoon, H.S., Hackett, J.D., Van Dolah, F.M., Nosenko, T., Lidie, K.L., Bhattacharya, D., 2005. Tertiary endosymbiosis driven genome evolution in dinoflagellate algae. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1299–1308.
- You, F.M., Huo, N., Gu, Y.Q., Luo, M.-C., Ma, Y., Hane, D., Lazo, G.R., Dvorak, J., Anderson, O.D., 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinform.* 9, 253.



# Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus Competition?

Leonardo M. Casano,<sup>1</sup> Eva M. del Campo,<sup>1\*</sup>  
Francisco J. García-Breijo,<sup>2,3</sup> José Reig-Armiñana,<sup>2</sup>  
Francisco Gasulla,<sup>2</sup> Alicia del Hoyo,<sup>1</sup>  
Alfredo Guéra<sup>1,2</sup> and Eva Barreno<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Biology, University of Alcalá,  
28871-Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

<sup>2</sup>Universitat de València, Botánica, ICBIBE -Jardí  
Botànic, Fac. C. Biològiques, C/ Dr Moliner 50.  
46100-Burjassot. Valencia; Spain.

<sup>3</sup>Dpto. Ecosistemas Agroforestales, Universidad  
Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n,  
46022-Valencia, Spain.

## Summary

*Ramalina farinacea* is an epiphytic fruticose lichen that is relatively abundant in areas with Mediterranean, subtropical or temperate climates. Little is known about photobiont diversity in different lichen populations. The present study examines the phycobiont composition of several geographically distant populations of *R. farinacea* from the Iberian Peninsula, Canary Islands and California as well as the physiological performance of isolated phycobionts. Based on anatomical observations and molecular analyses, the coexistence of two different taxa of *Trebouxia* (working names, TR1 and TR9) was determined within each thallus of *R. farinacea* in all of the analysed populations. Examination of the effects of temperature and light on growth and photosynthesis indicated a superior performance of TR9 under relatively high temperatures and irradiances while TR1 thrived at moderate temperature and irradiance. *Ramalina farinacea* thalli apparently represent a specific and selective form of symbiotic association involving the same two *Trebouxia* phycobionts. Strict preservation of this pattern of algal coexistence is likely favoured by the different and probably complementary ecophysiological responses of each

phycobiont, thus facilitating the proliferation of this lichen in a wide range of habitats and geographic areas.

## Introduction

Lichen thalli represent a relatively well-balanced symbiotic system that can be regarded as a self-contained miniature ecosystem (Honegger, 1991). Lichen symbiogenesis involves the close morphological and physiological integration of a fungus (mycobiont) and at least a population of green algae and/or cyanobacteria (photobionts), resulting in a unique entity or holobiont (Barreno, 2004). More recently, it was proposed that lichens are more complex symbiotic systems than thought previously including non-photosynthetic bacterial communities as multifunctional partners in the holobiont (Barreno *et al.*, 2008; Grube *et al.*, 2009). Lichen symbioses are cyclical processes comparable to other symbioses such as corals, mycorrhiza, etc. Lichenization is a successful symbiosis as evidenced by the fact that lichens are found in almost all terrestrial habitats and geographic areas. The green algae in the genera *Trebouxia* and *Asterochloris* occur in at least 35% of all lichens but are rarely found in a free-living state (Skaloud and Peksa, 2010). Gene sequence comparisons of the nuclear-encoded small subunit RNA (18S rRNA gene) and ultrastructural findings support the inclusion of *Trebouxia* in a distinct *Trebouxiophyceae* clade within *Chlorophyta* (Skaloud and Peksa, 2010). In addition, the diversity of *Trebouxia* and *Asterochloris* phycobionts has been extensively investigated on the basis of internal transcribed spacers (ITS) and actin sequence polymorphisms (DePriest, 2004; Doering and Piercey-Normore, 2009; Skaloud and Peksa, 2010). More recently, the use of plastid 23S rRNA gene has been proposed as a complementary tool for the identification and phylogenetic analysis of lichen algae (Del Campo *et al.*, 2010).

Patterns of fungal–algal association can be described in terms of selectivity and specificity (Yahr *et al.*, 2004). Selectivity is defined by the association frequency of compatible partners, and specificity by the taxonomic range of acceptable partners, which could be influenced by the environment (Rambold *et al.*, 1998; DePriest, 2004).

Received 16 July, 2010; accepted 20 October, 2010. \*For correspondence. E-mail eva.campo@uah.es; Tel. (+34) 91 8856432; Fax (+34) 91 8855066.

Based on Combes' filter model (Euzet and Combes, 1980), Yahr and colleagues (2006) proposed a pattern for mycobiont-photobiont interactions and the mechanisms that structure them. The latter may differ considerably depending on the lichen species. Several mycobionts associate with a single species, or even a single clade of photobiont (Beck *et al.*, 1998; Kroken and Taylor, 2000; Romeike *et al.*, 2002; Piercey-Normore, 2006). However, the same photobiont may associate with several different lichen fungi (O'Brien *et al.*, 2005). In addition, most of the studies on population structure have reported the presence of a single primary photobiont per thallus (e.g. Yahr *et al.*, 2004; Muggia *et al.*, 2008; Nelsen and Gargas, 2008). In other cases, multiple algal genotypes have been found in a single thallus (e.g. Guzow-Krzeminska, 2006; Ohmura *et al.*, 2006), which may confer advantages in the lichen's ability to respond to environmental changes or to occupy diverse microenvironments (Piercey-Normore, 2006). Further support for this argument is obtained by considering lichen thalli as microecosystems in which the fungus is the host and the photobiont(s) the primary producer(s). In nature, there are multiple examples demonstrating that positive interactions among potential competitors can sustain the stable coexistence of multiple species (Gross, 2008; Haruta *et al.*, 2009; Loarie *et al.*, 2009).

Here we present the results of an in-depth morphological, molecular, and physiological study of the phycobiont composition of the fruticose lichen *Ramalina farinacea* and its diversity. The growth pattern of fruticose species constitutes an important advantage in the separation of individuals prior to DNA extraction because growing thalli emerge from a single punctual holdfast. Microscopic

observations and molecular markers were used to investigate the diversity of phycobiont composition in lichen thalli obtained from geographically distant localities, as Iberian Peninsula, Canary Islands and California, characterized by diverse environmental conditions within the context of Mediterranean and temperate climates. These studies were carried out on phycobionts within the thallus as well as those isolated in axenic culture. Using chlorophyll (Chl) *a* fluorescence analyses, we identified several important photosynthetic traits in axenic cultures of phycobionts. Overall, the results provided evidence that there are two different taxa belonging to the genus *Trebouxia*. They differ in their morphologies as well as in physiology, and successfully coexist within the same lichen thallus.

## Results

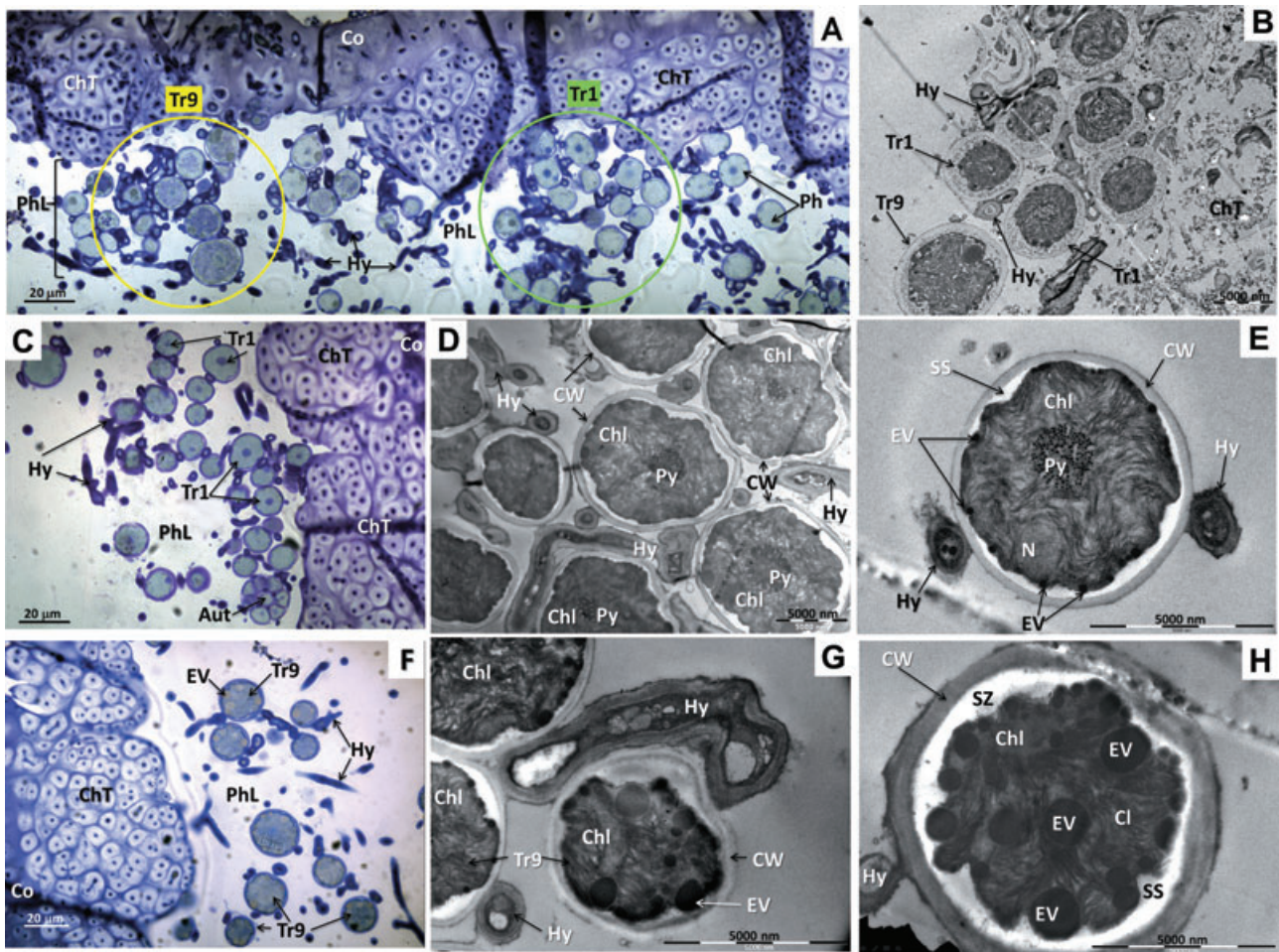
### *Morphological analysis of phycobionts from Ramalina farinacea*

In this study, LM and TEM were used to characterize the structure and ultrastructure of *R. farinacea* photobionts. Thalli from all the studied populations of *R. farinacea* always contained two types of *Trebouxia* phycobionts (working names: TR1 and TR9). These photobionts are structurally well characterized. The main morphological features of these algae, as observed in the thalli and in cell culture, are compared in Table 1 and Figs 1 and 2. TR1 and TR9 phycobionts were usually grouped by morphotype and located near the chondroid tissue, in close contact with the hyphae solely in the photobiont layer (Fig. 1A, B and F). Additionally, TEM demonstrated the joint occurrence of the two algae (Fig. 1B) although groups of a single photobiont type are more frequent.

**Table 1.** Main morphological features of the algae TR1 and TR9.

Morphological attributes		TR1	TR9	
Cell size	Cell diameter ( $\mu\text{m}$ )	9.76 $\pm$ 0.12*	15.26 $\pm$ 0.10*	
	Cell diameter ( $\mu\text{m}$ ) (in culture)	6.37 $\pm$ 0.11*	10.01 $\pm$ 0.10*	
Cell wall	Thickness (nm)	304.50 $\pm$ 6.10*	594.16 $\pm$ 5.37*	
	Thickness (nm) (in culture)	147.36 $\pm$ 3.58*	412.67 $\pm$ 6.49*	
	Thickness of cell wall layers (L) (nm)	L1.	50	70–90
		L2.	75–90	90–110
L3.		50–60	400–500	
L4.		160–200		
Pyrenoid	Pyrenoid matrix	+	–	
	Pyrenoglobules	+	–	
	Thylakoids invaginations	+	–	
Chloroplast	Shape	Lobated	Lobated	
	Stacked thylacoids	$\leq$ 3	Numerous	
Large electron dense vesicles	Number	Few ( $\leq$ 4)	Numerous ( $>$ 5)	
	Size ( $\mu\text{m}$ )	$<$ 0.6	$\geq$ 0.6–1.5 $\mu\text{m}$	
Aplanospores		+	+	
Zoospores (in culture)		+	+	

Unless otherwise stated, measurements were performed in thallus, from a random selection of *R. farinacea* specimens from Sierra El Toro, Castellón, Spain ( $n = 15$ ). The data are the means of 150 measurements  $\pm$  the standard error of the means (SEM). All measurements were performed by TEM, except those corresponding to cell diameter, which were by LM. Values with asterisks are significantly different at  $P < 0.01$  (comparisons made with independent Student's *t*-test). +: presence; -: absence.



**Fig. 1.** A, C and F. Location by LM of the two *Trebouxia* algae, TR1 and TR9, in transverse sections of a *Ramalina farinacea* thallus stained with toluidine blue.

B, D, E, G and H. Anatomy of TR1 and TR9 by TEM of ultrathin sections of a *R. farinacea* thallus.

B. Location of TR1 and TR9 in the photobiont layer.

C–E. TR1 phycobiont, filled with a chloroplast containing a large central pyrenoid.

F–H. TR9 phycobiont, with a lobated chloroplast filling the protoplast and containing numerous large electron-dense vesicles.

Abbreviations: Aut, autospores; Chl, chloroplast; ChT, chondroid tissue; Co, cortex; CT, cytoplasmic tufts; CW, cell wall; EV, electron-dense vesicles; Hy, hyphae; N, nucleus; PhL, photobiont layer; Py, pyrenoid; SS, secretion space.

**Fig. 2.** Ultrastructure of TR1 and TR9 phycobionts in culture by TEM micrographs of ultrathin sections.

A, B, C. TR1 phycobionts.

A. Cell with a central massive single lobated chloroplast and a central pyrenoid.

B. The chloroplast is loosely packed with thylakoidal membranes closely associated in stacks of three at the most. The outer lamellae of the thylakoid stack develop tubules penetrating the pyrenoid matrix as finger-like invaginations. Osmiophilic pyrenoglobules are associated with these tubules. Pyrenoid morphology corresponds to the *impressa*-type.

C. Cell wall and secretion space. The cell wall shows four layers. The outermost (1) is thin and electron-opaque; followed by an electron-transparent layer (2), an electron-opaque layer (3), and finally, towards the interior (4), a heavier layer made up from the materials contained in the secretion space. In this space, several secretion vesicles coming from the cytosol can be observed.

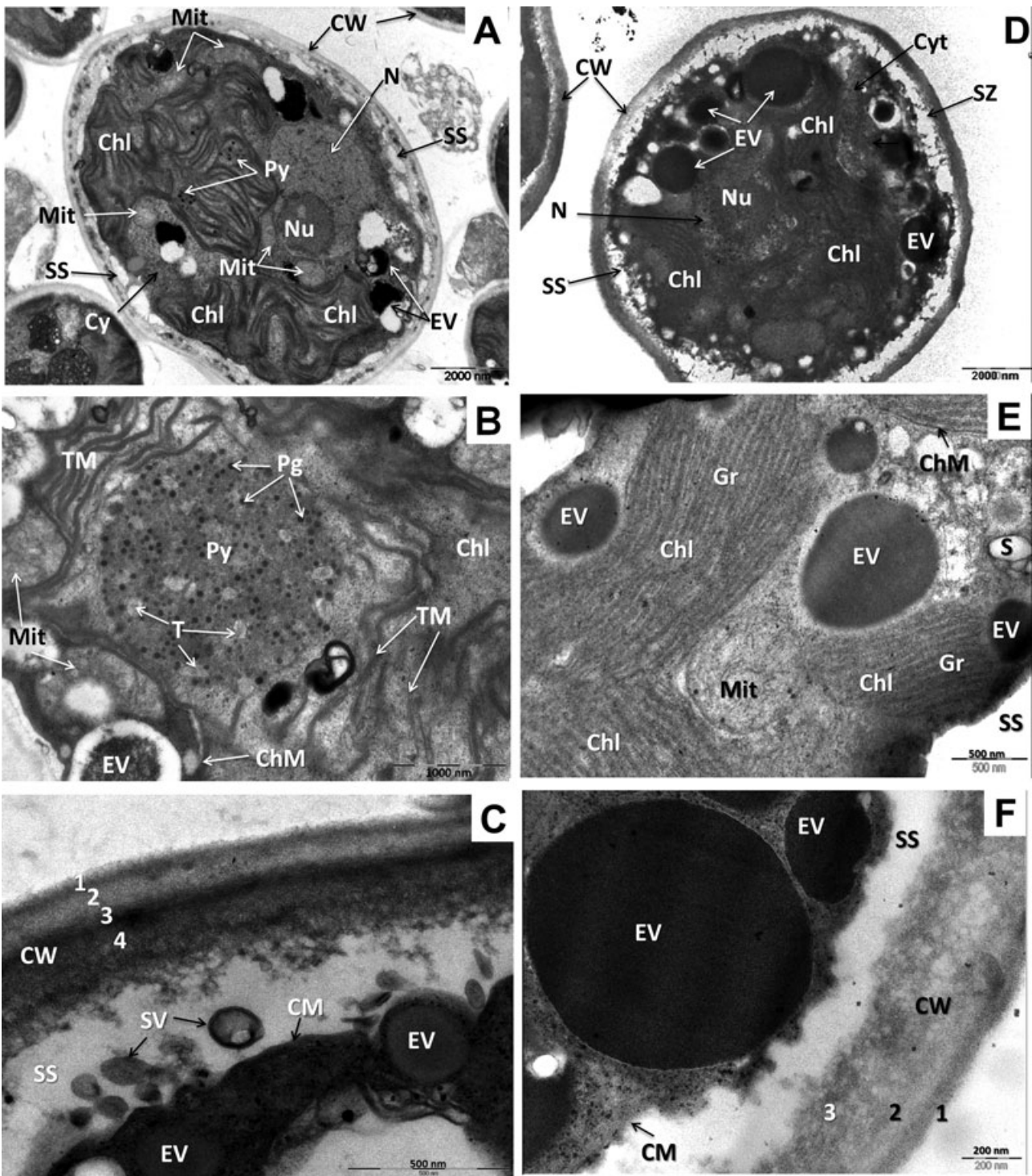
D, E, F. TR9 phycobionts.

D. Cell with a large lobated chloroplast containing numerous electron-dense vesicles.

E. Chloroplast in the peripheral zone. The outer thylakoids are grouped in stacks made up by numerous membranes, as in the grana of vascular plants. Several starch granules, a mitochondrion, and electron-dense vesicles are well stand out.

F. Cell wall and secretion space. The cell wall shows three layers. The outermost (1) is thin and dense while the intermediate layer (2) is clearer. The dense internal layer (3) is formed from the materials contained in the secretion space.

Abbreviations: Chl, chloroplast; ChM, chloroplast membrane; CM, cellular membrane; CW, cell wall; Cy, cytosol; EV, electron-dense vesicles; Gr, grana; Mit, mitochondria; N, nucleus; Nu, nucleolus; Pg, pyrenoglobules; Py, pyrenoid; S, starch; SS, secretion space; SV, secretion vesicles; T, tubules; TM, thylakoids membranes.



*LM and TEM anatomy of TR1 and TR9 phycobionts*

Photobiont identification was based on the following morphological features: (i) vegetative-cell size and cell-wall thickness; (ii) pyrenoid structure; (iii) electron-dense vesicles; and (iv) chloroplast shape and grana type. Two

different taxa of the genus *Trebouxia* were found to be consistently present in *R. farinacea* thalli. As seen using LM, TR1 and TR9 phycobiont cells differ in size both in thallus and in culture, being smaller in the later environment (Table 1). On TEM, the cell walls of TR1 algae varied in thickness (Table 1), and were made up of four layers

(Fig. 2C). The cell walls of TR9 were thicker than in TR1 (Table 1) and consisted of only three well-differentiated layers (Fig. 2F, Table 1). These structures in culture conditions were maintained but exhibiting thinner walls, probably due to the slower growth rate and lower nutrient availability. Both phycobionts had a central massive single star-shaped and lobed chloroplast. In TR1 cells, the lobes extending to the cellular margins were loosely packed. Thylakoids were often closely associated in stacks of three at the most (Figs 1E, 2A and B). A large central part of the chloroplast was occupied by the pyrenoid (Figs 1D and E, 2A and B); the outer lamellae of the thylakoid stacks included tubules that penetrated the pyrenoid matrix and were either long or short depending on the section (Fig. 2B); osmiophilic pyrenoglobules were associated with these finger-like straight and not branched invaginations, consistent with the *impressa*-type described by Friedl (1989). In TR9 cells, the chloroplast occupied most of the cell volume; the most peripheral thylakoids were grouped in stacks shaped by numerous membranes, similar to the grana in vascular plants (Figs 1H and 2E). Large spherical vesicles ( $\geq 0.6$ – $1.5 \mu\text{m}$ ) with an electron-dense content made up of lipids were seen throughout the cytoplasm and were especially abundant at the periphery and near the mitochondria (Fig. 2D). These vesicles were observed within the lichen thallus (Fig. 1G and H) and in culture (Fig. 2D–F). The pyrenoid matrix was usually absent or could not be clearly differentiated and pyrenoglobules were not observed. Only two *Asterochloris* species are known to share this feature (Friedl, 1989). Zoospores with distinct flagella have been recorded in both TR1 and TR9, but only in cultures (Table 1).

#### *Molecular analyses of phycobionts from R. farinacea confirm the coexistence of two different Trebouxia taxa*

In previous work, we sequenced a portion of the chloroplast-encoded 23S rRNA gene in several *Trebouxia* and *Asterochloris* algae, including a *Trebouxia* phycobiont isolated from a population of *Ramalina farinacea* collected in Sierra del Toro (Castellón, Spain) (Del Campo *et al.*, 2010). The obtained sequence spanned position 759–2596 in the homologous *Escherichia coli* 23S rRNA gene and revealed the presence of distinct and species-specific group I introns within the gene (Del Campo *et al.*, 2009; 2010). This first characterized *Trebouxia* photobiont corresponded to the present TR9 phycobionts. TR9 algae were initially named *Trebouxia* sp. (accession EU600236, Del Campo *et al.*, 2010). In this work, we sequenced the same portion of the 23S rRNA gene of the isolated TR1 phycobionts of *R. farinacea*, which was shown to be highly homologous to that of *Trebouxia jamesii* UTEX 2233 (accession EU352794,

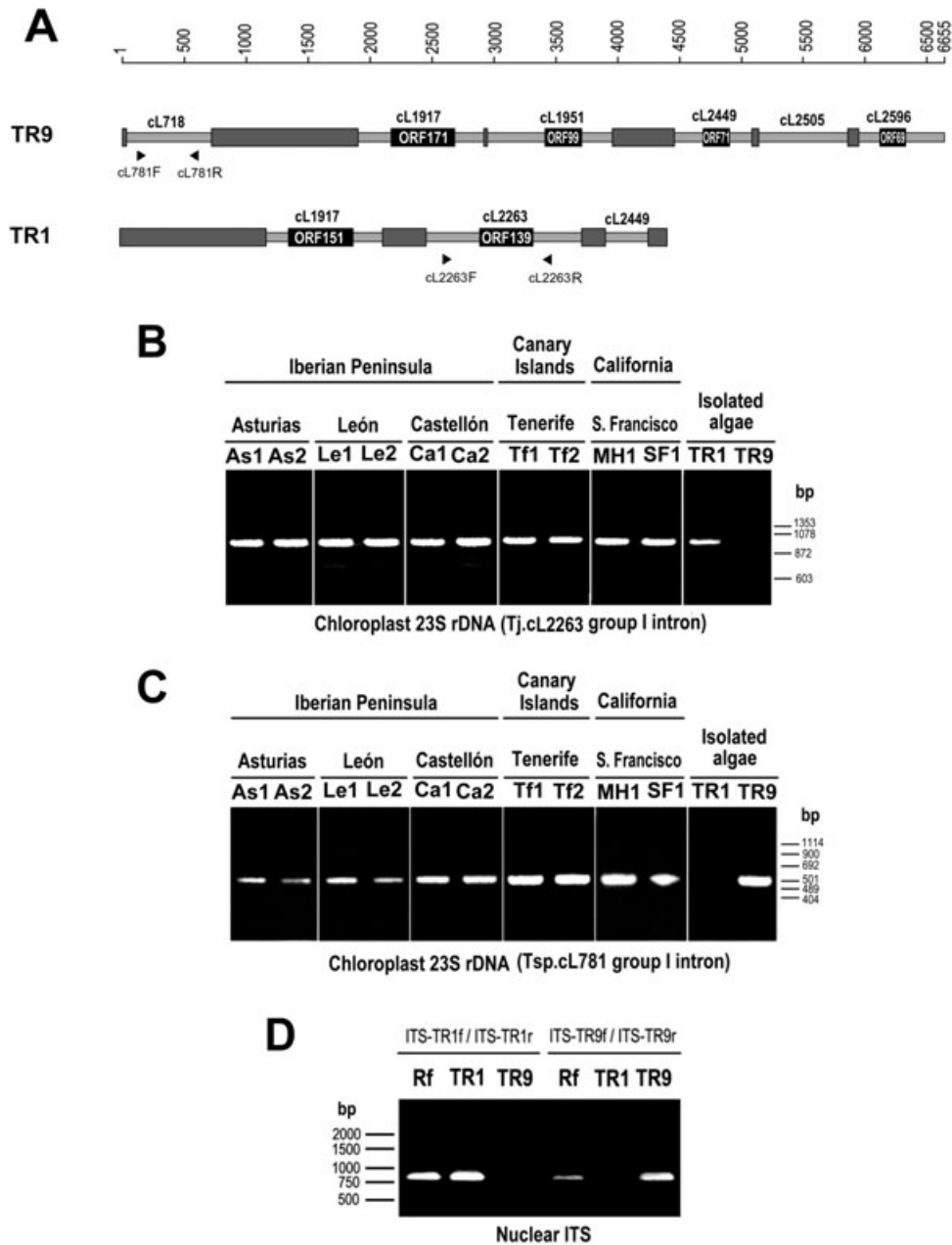
Del Campo *et al.*, 2010). The number, sequence, and distribution of introns within the same portion of 23S rRNA gene differed greatly between TR1 and TR9.

In the present study, the photobiont composition of 36 thalli of *R. farinacea* collected from different Mediterranean and temperate regions was analysed (Table S1). In accordance to the above-mentioned information and in order to determine the presence of TR1 and/or TR9 phycobionts in these thalli, two distinct group I introns were amplified, each present in one phycobiont but absent in the other (see *Experimental procedures*). Figure 3B and C shows the products of a representative amplification experiment performed with the DNA extracted from individual thalli and either the cL2263F/cL2263R or the cL781F/cL781R primer pair. Significantly, both primer pairs amplified all assayed samples. Sequencing of the amplified products confirmed the presence of TR1 and TR9 phycobionts in all studied lichen thalli independent of its native geographical localization.

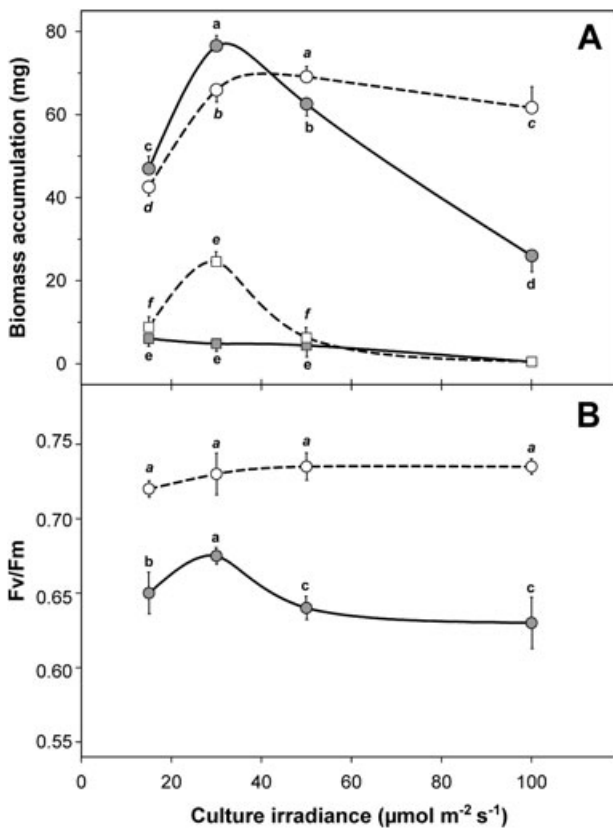
In addition, we designed two different primer pairs, ITS-TR1f/ITS-TR1r and ITS-TR9f/ITS-TR9r, homologous to the nrITS sequences of the isolated phycobionts TR1 and TR9 respectively. PCRs were carried out with DNA obtained from each lichen thallus (Rf) and the phycobionts TR1 and TR9 isolated in culture. Figure 3D depicts a gel electrophoresis of the reaction products, showing that the primer pair ITS-TR1f/ITS-TR1r amplified DNA from both the lichen thallus and the TR1 phycobiont but not from the TR9 phycobiont. By contrast, the primer pair ITS-TR9f/ITS-TR9r amplified DNA from both the lichen thallus and the TR9 phycobionts but not from the TR1 phycobionts. These findings support our initial hypothesis of the presence of two different coexisting *Trebouxia* species, corresponding to TR1 and TR9, within the same lichen thallus.

#### *Growth and photosynthetic behaviour of Ramalina farinacea photobionts*

Morphological and molecular results suggest a highly specific and selective pattern of association of the lichen-forming fungus *R. farinacea*, since the same two phycobionts, TR1 and TR9, were found in all lichen thalli studied. To search for physiological differences between the two *R. farinacea* phycobionts, the effects of temperature and light on the growth and photosynthetic traits of isolated and cultured TR1 and TR9 algae were studied. It should, however, be noted that while the physiological performance of algae in culture was assumed to be representative of that in symbiosis, further experiments with entire thalli (e.g. transplantation of thalli to higher or lower irradiances) are needed to confirm this assump-



**Fig. 3.** A. Genetic maps of the sequenced portion of plastid LSU rDNA in TR1 and TR9 phycobionts (position 755–2535 in *E. coli*). The dark-grey boxes represent exons. Introns are depicted as light-grey boxes between exons. Intron names (according to Johansen and Haugen, 2001) are indicated above each intron. Open reading frames (ORFs) encoding putative homing endonucleases are depicted as black boxes within introns. Primer positions are indicated below each map with arrows. B. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products (1.5% agarose) obtained with the cL781F/cL781R primer pair and DNA extracted either from lichen thalli collected at different geographic locations (As, Asturias; Le, León; Ca, Castellón; Tf, Tenerife; MH, Monte Hamilton; SF, San Francisco) or from isolated and axenically propagated TR1 and TR9 phycobionts. Molecular size markers are indicated on the right. C. PCR amplification products obtained with the cL2263F/cL2263R primer pair and DNA extracted either from lichen thalli collected in different geographic locations or from isolated TR1 and TR9 phycobionts. Molecular size markers are indicated on the right. D. PCR amplification products obtained with the ITS-TR1f/ITS-TR1r and ITS-TR9f/ITS-TR9r primer pairs and DNA extracted either from a lichen thallus (Rf) collected at Sierra El Toro (Castellón, Spain) or from isolated TR1 and TR9 phycobionts. Molecular size markers are indicated on the left.

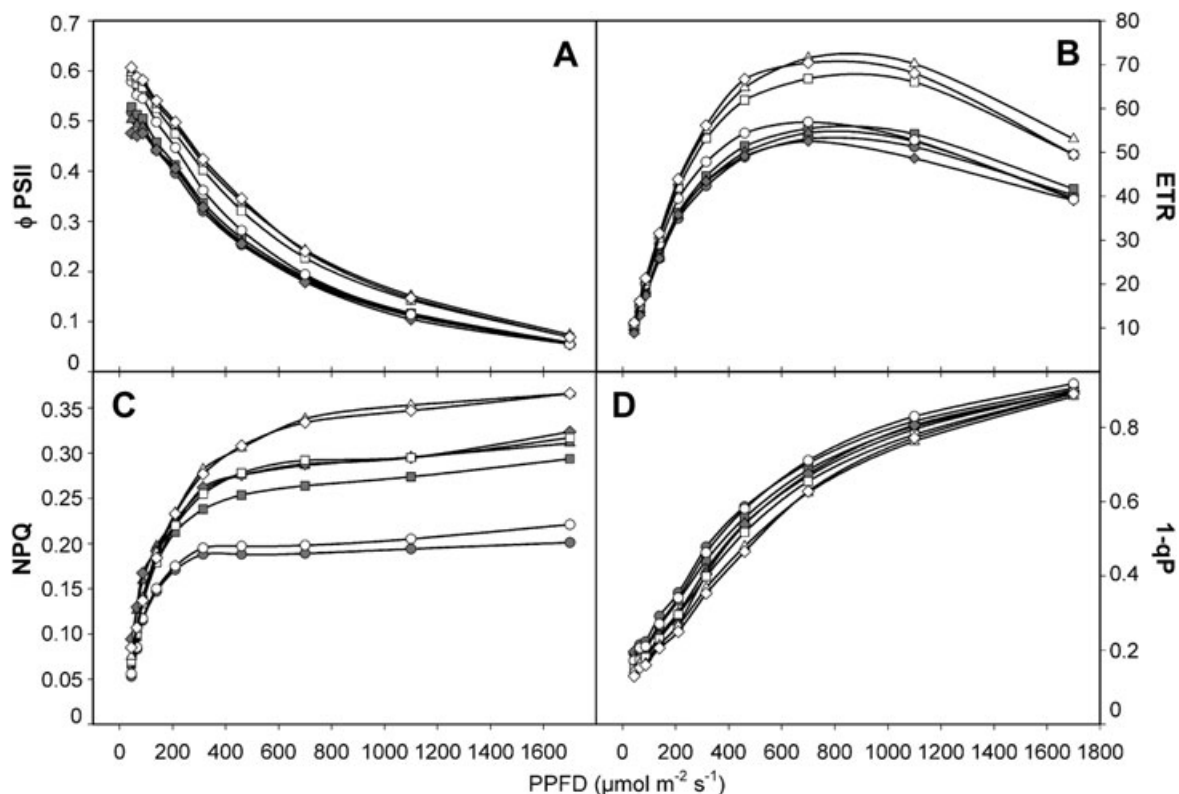


**Fig. 4.** Effects of temperature and irradiance during culture on growth and photosynthesis in isolated TR1 and TR9 phycobionts. **A.** TR9 and TR1 biomass accumulation after 30 days of culture at 17°C or 20°C and the indicated irradiances. Grey and white circles represent TR1 and TR9 phycobionts cultured at 17°C respectively. Grey and white squares represent TR1 and TR9 phycobionts cultured at 20°C respectively. Data are the mean values of five independent replicates ( $\pm$  or  $-$ SD). **B.** Maximum quantum yield of PSII ( $F_v/F_m$ ) of TR1 and TR9 phycobionts cultured at 17°C and four different light intensities during 30 days. Data are the mean values of five independent replicates ( $\pm$  SD). Grey and white circles represent TR1 and TR9 phycobionts respectively. Different normal and italic letters indicate significant differences among culture conditions for TR1 and TR9 phycobionts respectively (LSD test).

tion. Figure 4A shows the fresh weight reached by TR1 and TR9 after 30 days at 17°C or 20°C and 15–100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  of PAR. Both species grew better at the lower temperature; however, at 20°C the negative impact of the high temperature was less on TR9 than on TR1, whose growth was almost inhibited. This general trend was similarly influenced by light intensity. At 17°C, the maximum biomass of TR1 and TR9 was obtained at an irradiance of 30 and 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  respectively. While the highest irradiance (at 17°C) negatively affected the growth of both species, the biomass accumulation of TR1 decreased by *c.* 56% with respect to the maximum value but only by *c.* 6% in the case of TR9.

The effects of light on photosynthesis were studied through modulated fluorescence analyses. Since the low algal biomass at 20°C significantly increased the experimental error of fluorescence measurements, rendering non-reliable data, the experiments were carried out only in cultures growing at 17°C. The fluorescence parameter  $F_v/F_m$ , provides an estimate of the maximum quantum efficiency of PSII photochemistry, showing normal values of about 0.8 for healthy leaves of vascular plants, independently of tissue structure, cell number or total Chl content (Björkman and Demmig, 1987; Baker and Oxborough, 2004). Registered values of  $F_v/F_m$  for lichen thalli are lower, usually above 0.7, but there are also normal values as low as 0.67 for unstressed lichens with green phycobionts (Demmig-Adams *et al.*, 1990). Decrease of  $F_v/F_m$  could result from a decrease in the fraction of PSII centres that are capable of photochemistry and/or an increase of non-photochemical quenching (NPQ) (Baker and Oxborough, 2004).  $F_v/F_m$  was greater in TR9 than in TR1 at all culture irradiances (Fig. 4B). The  $F_v/F_m$  values in TR9 remained nearly constant. In contrast, TR1 was more sensitive to changes in culture irradiance, as a maximum value of  $F_v/F_m$  (0.678) recorded at 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  decreased to 0.642 at 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , indicating the appearance of a slight photoinhibition when TR1 was cultured out of a narrow light intensity range. As shown in Figure 5, there was a clear difference in the photosynthetic light response of TR1 and TR9 cultured at different light intensities. TR1 showed similar values of the relative quantum yield of electron transfer at PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ , a measure of the overall efficiency of PSII reaction centres in the light, Fig. 5A) and relative electron transport rate (ETR, Fig. 5B), independent of the light during culture. However, TR9 exhibited increasing  $\Phi_{\text{PSII}}$  and ETR values with increasing culture light intensity. Electron transport flow was saturated at approximately the same irradiance (*c.* 700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in both species and under all culture conditions. However, photosynthetic activity was higher in TR9 than in TR1.

Non-photochemical quenching, NPQ, is an estimation of the non-radiative dissipation of excitation energy and can thus be considered as photo-protective (Demmig-Adams and Adams III, 1996). Figure 5C shows the photosynthetic light response of NPQ in TR1 and TR9 cultured at different light intensities. The photosynthetic photon flux density (PPDF) response curves showed a correlation between NPQ and the culture light condition. The NPQ values increased with increasing light intensity up to 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , without further changes in either TR1 or TR9. Interestingly, the highest NPQ values were observed in strains of TR9 cultured at higher light intensities. In addition, we examined the parameter  $1-q_p$  (Fig. 5D), which is a measure of the reduction state of the first electron acceptor of PSII ( $Q_A$ ); high  $1-q_p$



**Fig. 5.** Effects of irradiance during culture on fluorescence parameters in isolated TR1 and TR9 phycobionts. PPFD response curves of the actual quantum yield of the PSII (A,  $\Phi_{PSII}$ ), relative electron transport rate (B, ETR), non-photochemical quenching (C, NPQ), and reduction state of the  $Q_A$  (D,  $1-q_P$ ) for TR1 (grey) and TR9 (white) algae cultured at 17°C and at 15  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (circles), 30  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (squares), 50  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (triangles) and 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (rhombuses). Data are the mean values of five independent replicates, with standard deviations (not shown) ranging from 0.5% to 3.2% of the corresponding mean values.

values are considered indicative of light stress (Weis and Berry, 1987). In both algae, lower values of  $1-q_P$  were observed at low and moderate PPFD. The lowest  $1-q_P$  values occurred in TR9 cultured at higher light intensities.

## Discussion

### *Two Trebouxia taxa are ever-present in lichen thalli of Ramalina farinacea*

To date, most of the studies on the population structure and patterns of symbiotic association in lichens have reported the presence of a single species of phycobiont per thallus. These findings are in agreement with the Gause's Principle (Gause, 1934), which postulates that the presence of closely related species with similar resource requirements within the same ecological niche often results in competitive exclusion(s) and the prevalence of the competitor that can maintain itself with the lowest level of the limiting resource. In the case of lichens, the thalli can be considered as self-contained miniature ecosystems (Honegger, 1991), with the algal layer as the

single primary producer. However, there is increasing evidence that in some lichens, including *Evernia mesomorpha* (Piercey-Normore, 2006) and *Prototrematiopsis muralis* (Guzow-Krzeminska, 2006), more than one algal genotype is present within the same thallus. The present study has demonstrated the coexistence within each lichen thallus of the same two *Trebouxia* algae (TR1 and TR9) analysed from geographically distant populations of the lichen *R. farinacea*. This is the first report of this type of symbiotic association in a lichen species supported by morphological, molecular, and physiological evidences. Unlike previous reports, in our study the simultaneous presence of TR1 and TR9 phycobionts was not restricted to a few analysed specimens but was instead found to occur in all lichen thalli, independent of their native geographic location. Moreover, the two coexisting algae clearly belonged to two different *Trebouxia* taxa, as determined by differences in key morphological traits (Table 1, Figs 1 and 2) and in a large portion of the plastid-encoded 23S rRNA gene (Fig. 3A). It should be pointed out that the rate of evolution of the chloroplast genome is slower than that of the nuclear genome and that there is a single sequence for each gene (even in the case of genes



repeated in different locations). Therefore, the detection of two different sequences of the same plastid-encoded gene in the same thallus clearly indicates the presence of two different taxa. On the other hand, when we analysed the algal nrITS associated with each lichen thallus employing the primer pair ITS1T-5'/ITS4T-3' (Kroken and Taylor, 2000), only one ITS sequence was found in all cases (data not shown). However, the use of two different primer pairs homologous to the ITS sequences of the isolated photobionts TR1 and TR9 allowed us to corroborate the presence of these *Trebouxia* species coexisting within the same lichen thallus (Fig. 3D). Therefore, care must be taken when 'general' primers are employed and only a single algal nrITS sequence is detected. It may be indicative of the predominant photobiont while others in minority are not adequately amplified.

*Environmental conditions and the physiological performance of each algal species may modulate coexistence within the thallus*

Studies on other better known symbiotic systems where the host is heterotrophic and constitutes the habitat for photoautotrophs, such as reef-building corals, initially considered a single algal endosymbiont species per host. However, it is now recognized that several large and genetically diverse algal groups often co-occur within a single host species or colony (Wegley *et al.*, 2007). Little and colleagues (2004) demonstrated dynamic variations of coral-algal associations according to environmentally related changes in the host's physiological needs. More recently, Jones and colleagues (2008) described dramatic alterations in the algal symbiont community of some coral species in response to environmental stress. Such polymorphic symbioses suggest that the identity of the algal partner(s) is as significant as that of the host in determining the physiology of the holobiont. In the case of lichen symbiosis, there is increasing experimental evidence that the association between phycobionts and mycobionts increases tolerance to stress conditions (e.g. Kranner *et al.*, 2005; Kosugi *et al.*, 2009). In our study, the observed physiological responses (growth and photosynthesis, Fig. 4) to temperature and light conditions indicated that TR9 performs better under relatively high temperature and irradiances whereas TR1 thrives under more temperate and shady conditions. These conclusions are supported by studies of biomass accumulation and photosynthetic traits, including the photochemical efficiency of PSII, the reduction state of  $Q_A$ , and the NPQ (Fig. 5). Non-photochemical quenching is an important process under stress conditions, transforming excess light energy that cannot be used in photosynthesis into heat. In vascular plants, it is associated with the xanthophyll cycle (Niyogi *et al.*, 2005). However, the role of this

cycle in lichen photobionts is thought to be limited, as alternative mechanisms of light dissipation are employed (Kopecky *et al.*, 2005; Gasulla *et al.*, 2009). In addition, recent results from our lab (Catalá *et al.*, 2010) support an important role for NO in the photo-protection of phycobionts in *R. farinacea*. The diversity of habitats and local climates characteristic of the geographic locations (Table S1) sampled in the present study, along with the variety of ecological contexts in which *R. farinacea* proliferates, reflects the ecophysiological plasticity of this symbiosis as a mechanism allowing the lichen to cope and thus to adapt to changing and often stressful environments. Moreover, a positive interaction between the two phycobionts cannot be ruled out. According to Gross (2008) and Angert and colleagues (2009), positive interactions among competitors may produce stable and species-rich communities. Therefore, we propose that the constant presence of both *Trebouxia* phycobionts in *R. farinacea* is favoured by the different and probably complementary physiological behaviour of each algal species, thus improving the ecological fitness of the holobiont.

*Vegetative reproduction of Ramalina farinacea seems to maintain a specific and selective association among symbionts*

In addition to environmental conditions, an important mechanism controlling symbiotic associations may be the symbiont's reproductive mode. Lichens can reproduce sexually and asexually. Specifically, mycobionts produce either sexual spores, requiring 'de novo' associations with photobionts in each generation, or vegetative propagules containing fungal tissues and photobiont cells (Zoller and Lutzoni, 2003; Yahr *et al.*, 2004; 2006). Lichens that depend on the cyclical establishment of fungal-photobiont associations to colonize varied wide-ranging habitats might require a relatively higher flexibility in the specificity and ecological selection of their photobionts. This flexibility would facilitate successful relichenizations by allowing for alternative partnerships in each habitat (Romeike *et al.*, 2002). Among the lichens that disperse through soredia or other vegetative propagules, mycobiont and photobionts are jointly propagated within the same reproductive structure (Nelsen and Gargas, 2008). This reproduction strategy should allow to a strict preservation of the relationship among symbionts, although maintenance of symbiotic associations seems to be an option rather than a strict consequence of joint symbiont dispersal in lichens (Wornik and Grube, 2009). *Ramalina farinacea* propagates through vegetative propagules (soredia), which is consistent with the overall pattern of coexistence of the same two algal *Trebouxia* species in all sampled thalli. Our future work will deal with the origin and maintenance

of genetic variability within *R. farinacea* phycobionts (and the possible relationship with mycobiont genotypes). We will try to discriminate between alternative hypotheses whether TR1 and TR9 are packed in each soredium or are gathered from the environment.

In conclusion, *R. farinacea* represents a novel pattern of lichen symbiosis that is maintained through joint propagation of the mycobiont and the same two *Trebouxia* phycobiont taxa. The preservation of this pattern seems to be favoured by the distinct and probably complementary ecophysiological responses of each phycobiont, which in turn permits the lichen to proliferate in very different habitats. In addition, these lichen provide an interesting model system to be studied within the context of hologenome theory of evolution (Rosenberg *et al.*, 2009), which emphasizes the cooperation and competition among symbionts and their hosts, and to monitor the responses of organisms to current and future environmental changes.

## Experimental procedures

### *Ramalina farinacea* sampling, photobiont isolation and culture

Specimens of *Ramalina farinacea* (L.) Ach. were collected from seven different locations in the Iberian Peninsula and Canary Islands and from two sites in California (USA), as detailed in Table S1. Samples were dried out in the shaded open air for 1 day and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until needed. For photobiont isolation, *R. farinacea* thalli were collected in the air-dried state on *Quercus rotundifolia* Lam. at Sierra El Toro (Castellón, Spain). Samples were frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the isolation experiment, 3 months after collection. TR1 and TR9 phycobionts were isolated in our laboratories according to Gasulla and colleagues (2010). Isolated phycobionts were cultured in liquid or semisolid Bold 3N medium (Bold and Parker, 1962) in a growth chamber at  $15^{\circ}\text{C}$ , under a 14 h/10 h light/dark cycle (light conditions:  $25\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ).

### Morphological analysis of 'in thallus' lichen photobionts and isolated algae

Pieces of rehydrated *R. farinacea* thalli [from Sierra El Toro (Castellón, Spain)] were used to examine by TEM the TR1 and TR9 algae inside thallus. They were fixed in 2% Karnovsky fixative for 2 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . The specimens were then washed three times with 0.01 M PBS, pH 7.4, for 15 min each and fixed with 2%  $\text{OsO}_4$  in 0.01 M PBS, pH 7.4, for 2 h at  $4^{\circ}\text{C}$ . Thereafter, specimens were washed in 0.01 M PBS, pH 7.4, for 15 min and then dehydrated at room temperature in a graded series of ethanol, starting at 50% and increasing to 70%, 95% and 100% for no less than 20–30 min for each step. The fixed and dehydrated samples were embedded in Spurr's resin according to manufacturer's instructions (<http://www.emsdiasum.com/microscopy/technical/datasheet/14300.aspx>). To analyse isolated algae, cultured

colonies were suspended in liquid Bold 3N medium then added to an equal volume of 2% glutaraldehyde in the same medium. After 1 h at  $4^{\circ}\text{C}$ , the samples were washed in 0.01 M PBS buffer, pH 7.4, and post-fixed with 1%  $\text{OsO}_4$  in 0.01 M PBS, pH 7.4 (2 h at  $4^{\circ}\text{C}$ ), then gently centrifuged, washed again, dehydrated through an ethanol series, and embedded in Spurr's resin as previously described for in thallus observations.

For light microscopy (LM) analyses, 1–2  $\mu\text{m}$  sections were cut from samples (*R. farinacea* thalli or isolated algae) embedded in Spurr's resin using a diamond knife (DIATOME Histo 45 $^{\circ}$ ) and an ultramicrotome (Ultratome Nova LKB Bromma). The sections were stained with 1% toluidine blue and observed with an Olympus Provis AX 70 microscope equipped with an Olympus Camedia C-2000 Z camera. For transmission electron microscopy (TEM), 90 nm sections were cut with a diamond knife (DIATOME Ultra 45 $^{\circ}$ ) using an ultramicrotome (Ultratome Nova LKB Bromma), mounted on copper grids of 100 mesh, and post-stained with 2% (w/v) aqueous uranyl acetate and 2% lead citrate. The prepared sections were observed with a JEOL JEM-1010 (80 kV) electron microscope, equipped with a MegaView III digital camera and 'AnalySIS' image acquisition software, at the SCSIE service of the University of Valencia.

### Nucleic acids extraction, purification and PCR amplification

Total DNA was extracted from each lichen thallus and from isolated *Trebouxia* phycobionts following the procedure of Cenís (1992). Isolated DNA was PCR-amplified with specific primers under the cycling conditions described in Del Campo and colleagues (2010). Amplification products were subjected to agarose electrophoresis and then purified and sequenced according to Del Campo and colleagues (2010). All oligonucleotides used in the PCRs and in the subsequent sequencing of the chloroplast 23S rDNA were designed based on the nucleotide sequence of the chloroplast 23S rRNA gene from *Trebouxia aggregata* (DDBJ/EMBL/GenBank Accession No. L43542; Pombert *et al.*, 2006) and on partial sequences obtained in our laboratory. The primers used for amplifying and sequencing of nrITS from isolated TR1 and TR9 were obtained from Kroken and Taylor (2000). The primers ITS-TR1f and ITS-TR1r, ITS-TR9f and ITS-TR9r, specific for each isolated photobionts, were designed based on the obtained global sequences of nrITS from isolated TR1 and TR9.

List of oligonucleotides:

cL2263R: 5'-GTAATACTACATTGGTGCGGAC-3'  
 cL2263F: 5'-AGCACATCACAGAGAAGCTG-3'  
 cL781F: 5'-TCATAACGGTGAAACCTAAGGC-3'  
 cL781R: 5'-CAGAACGCCAAACCATATACCG-3'  
 ITS-TR1f: 5'-ACACACGTCAAGCAATCAACTC-3'  
 ITS-TR1r: 5'-CTGACCGGCAACCCGAAG-3'  
 ITS-TR9f: 5'-AACATACCTTAAGCAATTAATTC-3'  
 ITS-TR9r: 5'-TGACCGGCTAGCATTAG-3'

The cL2263F/cL2263R primer pair (Fig. 3A) is included within the group IB4 intron Tj.cL2263 of the chloroplast-encoded 23S rRNA gene (Del Campo *et al.*, 2010). This intron is exclusive to TR1 phycobionts. The cL781F/cL781R

primer pair (Fig. 3a) is included within the group IA3 intron Tsp.cL781 of the chloroplast-encoded 23S rRNA gene (Del Campo *et al.*, 2010) and is exclusive to TR9 phycobionts.

#### Measurements of growth and chlorophyll *a* fluorescence

A 50  $\mu\text{l}$  aliquot of actively growing algae resuspended in liquid Bold 3N medium ( $1 \times 10^6$  cells  $\text{ml}^{-1}$ ) was inoculated on cellulose–acetate disks placed on agarized medium and then cultured for 30 days at 17°C and 20°C with an irradiance of 15, 30, 50 or 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  under a 14 h/10 h light/dark cycle. The influence of culture conditions on algal growth was measured as biomass accumulation at the end of the culture period.

Chlorophyll *a* fluorescence was measured at room temperature using a pulse modulation fluorometer (PAM-2000, Walz, Effeltrich, Germany). Isolated algae grown for 3 weeks on cellulose–acetate membranes placed on semisolid culture medium were layered on filter paper that was kept moist with distilled water in order to maintain the cells in a fully hydrated state. The membranes were placed in the dark for 30 min after which the minimal fluorescence yield ( $F_0$ ) was obtained by exciting the phycobionts with a weak measuring beam from a light-emitting diode. A saturating pulse (800 ms) of white light (at a photosynthetic photon fluence rate of 8000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  over a wavelength band of 400–700 nm), closing all reaction centres, was then applied to obtain maximal fluorescence ( $F_m$ ). Variable fluorescence in dark-adapted samples ( $F_v$ ) was calculated as  $F_m - F_0$ . The maximum quantum yield of photosystem II (PSII) was calculated as  $F_v/F_m$  (Schreiber *et al.*, 1986). Subsequently, a series of 30-s actinic light pulses (44, 65, 87, 139, 210, 315, 460, 700, 1100, 1700  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) and further saturated pulses of white light were applied to determine: (i) maximum fluorescence yield during actinic illumination ( $F_m'$ ); (ii) Chl *a* fluorescence yield during actinic illumination ( $F_s$ ); and (iii) the level of modulated fluorescence during a brief interruption (3 s) of actinic illumination in the presence of 6  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  far-red light ( $F_0'$ ). The non-photochemical dissipation of absorbed light energy (NPQ) was determined at each saturating pulse according to the equation  $\text{NPQ} = (F_m - F_m')/F_m'$  (Bilger and Björkman, 1991). The coefficient for photochemical quenching,  $q_p$ , was calculated as  $(F_m' - F_s)/(F_m' - F_0')$  (Schreiber *et al.*, 1986). The quantum efficiency of PSII photochemistry,  $\Phi_{\text{PSII}}$ , closely associated with the quantum yield of non-cyclic electron transport, was estimated from  $(F_m' - F_s)/F_m'$  (Genty *et al.*, 1989).

#### Acknowledgements

This study was funded by the Spanish Ministry of Education and Science (CGL2006-12917-C02-01/02), the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2009-13429-C02-01/02), the AECID (PCI\_A/024755/09) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO 174/2008 GVA). We are grateful to Dr J. Gimeno-Romeu (University of California, Davis, USA) and to Dr P.J.G. de Nova (IREC, Ciudad Real, Spain), who were the first to isolate DNA from *Ramalina farinacea* thalli in our group. Wendy Ran revised the manuscript in English.

#### References

- Angert, A.L., Huxman, T.E., Chesson, P., and Venable, D.L. (2009) Functional tradeoffs determine species coexistence via the storage effect. *Proc Nat Acad Sci USA* **106**: 11641–11645.
- Baker, N.R., and Oxborough, K. (2004) Chlorophyll fluorescence as a probe of photosynthetic productivity. In *Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis*. Papageorgiou, G.C. (ed.). Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 65–82.
- Barreno, E. (2004) Hongos simbioses: Líquenes, micoficobiosis y micorrizas. In *Botánica*. Izco, J. (ed.). Madrid, Spain: MacGraw-Hill Interamericana, pp. 309–340.
- Barreno, E., Herrera-Campos, M., García-Breijo, F., Gasulla, F., and Reig-Armiñana, J. (2008) Non photosynthetic bacteria associated to cortical structures on *Ramalina* and *Usnea* thalli from Mexico. [WWW document]. URL <http://192.104.39.110/archive/IAL6abstracts.pdf>. Asilomar, Pacific Grove, CA, USA: Abstracts IAL 6- ABLJ Joint Meeting, pp 5.
- Beck, A., Friedl, T., and Rambold, G. (1998) Selectivity of photobiont choice in a defined lichen community: inferences from cultural and molecular studies. *New Phytol* **139**: 709–720.
- Bilger, W., and Björkman, O. (1991) Temperature dependence of violaxanthin deepoxidation and non-photochemical fluorescence quenching in intact leaves of *Gossypium hirsutum* L. and *Malva parviflora* L. *Planta* **184**: 226–234.
- Björkman, O., and Demmig, B. (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta* **170**: 489–504.
- Bold, H.C., and Parker, B.C. (1962) Some supplementary attributes in the classification of *Chlorococcum* species. *Arch Mikrobiol* **42**: 267–288.
- Catalá, M., Gasulla, F., Pradas del Real, A., García-Breijo, F., Reig-Armiñana, J., and Barreno, E. (2010) Nitric oxide is involved in oxidative stress during rehydration of *Ramalina farinacea* (L.) Ach. in the presence of the oxidative air pollutant cumene hydroperoxide. In *Bibliotheca Lichenologica* **105**. Nash, T. (ed.). Stuttgart, Germany: E. Schweizerbart Science Publishers, pp. 87–92.
- Cenis, J.L. (1992) Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res* **20**: 2380.
- Del Campo, E.M., Casano, L.M., Gasulla, F., and Barreno, E. (2009) 23S rRNAs of lichen-forming trebouxia have multiple group I introns closely related to bacteria and fungi. *Int Microbiol* **12**: 59–67.
- Del Campo, E.M., Casano, L.M., Gasulla, F., and Barreno, E. (2010) Suitability of chloroplast LSU rDNA and its diverse group I introns for species recognition and phylogenetic analyses of lichen-forming *Trebouxia* algae. *Mol Phylogenet Evol* **54**: 437–444.
- Demmig-Adams, B., and Adams, W.W. III (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* **1**: 21–26.
- Demmig-Adams, B., Mágua, C., Adams, W.W. III, Meyer, A., Kilian, E., and Lange, O.L. (1990) Effect of high light on the efficiency of photochemical energy conversion in a variety

- of lichen species with green and blue-green phycobionts. *Planta* **180**: 400–409.
- DePriest, P.T. (2004) Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986–2001. *Annu Rev Microbiol* **58**: 273–301.
- Doering, M., and Piercey-Normore, M.D. (2009) Genetically divergent algae shape in epiphytic lichen community on jack pine in Manitoba. *Lichenologist* **41**: 69–80.
- Euzet, L., and Combes, C. (1980) Les problemes de l'especes chez les animaux parasites. In *Les problemes de l'especes dans le regne animal*. Bocquet, C., Générumont, J., and Lamotte, M. (eds). Paris, France: Société Zoologique de France, pp. 239–285.
- Friedl, T.H. (1989) Comparative ultrastructure of pyrenoids in *Trebouxia* (*Microthamniales*, *Chlorophyta*). *Plant Syst Evol* **164**: 145–159.
- Gasulla, F., de Nova, P.G., Esteban-Carrasco, A., Zapata, J.M., Barreno, E., and Guera, A. (2009) Dehydration rate and time of desiccation affect recovery of the lichen alga [corrected] *Trebouxia erici*: Alternative and classical protective mechanisms. *Planta* **231**: 195–208.
- Gasulla, F., Guéra, A., and Barreno, E. (2010) A simple micromethod for isolating lichen photobionts. *Symbiosis* **51**: 175–179.
- Gause, G.F. (1934) *The Struggle For Existence*. Baltimore, USA: Williams & Wilkins Co.
- Genty, B., Briantais, J.M., and Baker, N.R. (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* **990**: 87–92.
- Gross, K. (2008) Positive interactions among competitors can produce species-rich communities. *Ecol Lett* **11**: 929–936.
- Grube, M., Cardinale, M., Vieira de Castro, J., Müller, H., and Berg, G. (2009) Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbiosis. *Int Soc Microb Ecol J* **3**: 1105–1115.
- Guzow-Krzeminska, B. (2006) Photobiont flexibility in the lichen *Protopermallopsis muralis* as revealed by ITS rDNA analyses. *Lichenologist* **38**: 469–476.
- Haruta, S., Kato, S., Yamamoto, K., and Igarashi, Y. (2009) Intertwined interspecies relationships: approaches to untangle the microbial network. *Environ Microbiol* **11**: 2963–2969.
- Honegger, R. (1991) Fungal evolution: symbiosis and morphogenesis. In *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation*. Margulis, L., and Fester, R. (eds). Cambridge, MA, USA: The MIT Press, pp. 319–340.
- Johansen, S., and Haugen, P. (2001) A new nomenclature of group I introns in ribosomal DNA. *RNA* **7**: 935–936.
- Jones, A.M., Berkelmans, R., van Oppen, M.J., Mieog, J.C., and Sinclair, W. (2008) A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. *Proc Biol Sci* **275**: 1359–1365.
- Kopecky, J., Azarkovich, M., Pfundel, E.E., Shuvalov, V.A., and Heber, U. (2005) Thermal dissipation of light energy is regulated differently and by different mechanisms in lichens and higher plants. *Plant Biol* **7**: 156–167.
- Kosugi, M., Arita, M., Shizuma, R., Moriyama, Y., Kashino, Y., Koike, H., and Satoh, K. (2009) Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their symbionts. *Plant Cell Physiol* **50**: 879–888.
- Kranner, I., Cram, W.J., Zorn, M., Wornik, S., Yoshimura, I., Stabentheiner, E., and Pfeifhofer, H.W. (2005) Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *Proc Nat Acad Sci USA* **102**: 3141–3146.
- Kroken, S., and Taylor, J.W. (2000) Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *Bryologist* **103**: 645–660.
- Little, A.F., van Oppen, M.J., and Willis, B.L. (2004) Flexibility in algal endosymbioses shapes growth in reef corals. *Science* **304**: 1492–1494.
- Loarie, S.R., Duffy, P.B., Hamilton, H., Asner, G.P., Field, C.B., and Ackerly, D.D. (2009) The velocity of climate change. *Nature* **462**: 1052–1055.
- Muggia, L., Grube, M., and Tretiach, M. (2008) Genetic diversity and photobiont associations in selected taxa of the *Tephromela atra* group (*Lecanorales*, lichenised *Ascomycota*). *Mycol Prog* **7**: 147–160.
- Nelsen, M.P., and Gargas, A. (2008) Dissociation and horizontal transmission of codispersing lichen symbionts in the genus *Lepraria* (*Lecanorales*: *Stereocaulaceae*). *New Phytol* **177**: 264–275.
- Niyogi, K.K., Li, X.P., Rosenberg, V., and Jung, H.S. (2005) Is PsbS the site of non-photochemical quenching in photosynthesis? *J Exp Bot* **56**: 375–382.
- O'Brien, H., Miadlikowska, J., and Lutzoni, F. (2005) Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera*. *Eur J Phycol* **40**: 363–378.
- Ohmura, Y., Kawachi, M., Kasai, F., and Watanabe, M. (2006) Genetic combinations of symbionts in a vegetatively reproducing lichen, *Parmotrema tinctorum*, based on ITS rDNA sequences. *Bryologist* **109**: 43–59.
- Piercey-Normore, M.D. (2006) The lichen-forming ascomycete *Evernia mesomorpha* associates with multiple genotypes of *Trebouxia jamesii*. *New Phytol* **169**: 331–344.
- Pombert, J.F., Lemieux, C., and Turmel, M. (2006) The complete chloroplast DNA sequence of the green alga *Oltmannsiellopsis viridis* reveals a distinctive quadripartite architecture in the chloroplast genome of early diverging Ulvophytes. *BMC Biol* **4**: 3.
- Rambold, G., Friedl, T., and Beck, A. (1998) Photobionts in lichens: Possible indicators of phylogenetic relationships? *Bryologist* **101**: 392–397.
- Romeike, J., Friedl, T., Helms, G., and Ott, S. (2002) Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (lichenized ascomycetes) along a transect of the antarctic peninsula. *Mol Biol Evol* **19**: 1209–1217.
- Rosenberg, E., Sharon, G., and Zilber-Rosenberg, I. (2009) The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. *Environ Microbiol* **11**: 2959–2962.
- Schreiber, U., Schliwa, U., and Bilger, W. (1986) Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth Res* **10**: 51–62.
- Skaloud, P., and Peksa, O. (2010) Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive

- diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*). *Mol Phylogenet Evol* **54**: 36–46.
- Wegley, L., Edwards, R., Rodriguez-Brito, B., Liu, H., and Rohwer, F. (2007) Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environ Microbiol* **9**: 2707–2719.
- Weis, E., and Berry, J.A. (1987) Quantum efficiency of photosystem II in relation to 'energy'-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* **894**: 198–208.
- Wornik, S., and Grube, M. (2009) Joint dispersal does not imply maintenance of partnerships in lichen symbioses. *Microb Ecol* **59**: 150–157.
- Yahr, R., Vilgalys, R., and Depriest, P.T. (2004) Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia* lichens. *Mol Ecol* **13**: 3367–3378.
- Yahr, R., Vilgalys, R., and DePriest, P.T. (2006) Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (*Cladoniaceae*) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New Phytol* **171**: 847–860.
- Zoller, S., and Lutzoni, F. (2003) Slow algae, fast fungi: Exceptionally high nucleotide substitution rate differences between lichenized fungi *Omphalina* and their symbiotic green algae *Coccomyxa*. *Mol Phylogenet Evol* **29**: 629–640.

### Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** Location for collections of *Ramalina farinacea* samples used in this study.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

# The genetic structure of the cosmopolitan three-partner lichen *Ramalina farinacea* evidences the concerted diversification of symbionts

Eva M. del Campo<sup>1</sup>, Santiago Catalá<sup>2</sup>, Jacinta Gimeno<sup>2</sup>, Alicia del Hoyo<sup>1</sup>, Fernando Martínez-Alberola<sup>2</sup>, Leonardo M. Casano<sup>1</sup>, Martin Grube<sup>3</sup> & Eva Barreno<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Biology, University of Alcalá, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Department of Botany, Faculty of Biology, ICBIIE, University of Valencia, Valencia, Spain; and <sup>3</sup>Institut für Pflanzenwissenschaften, Karl-Franzens-Universität Graz, Graz, Austria

**Correspondence:** Eva M. del Campo, Department of Plant Biology, University of Alcalá, 28871-Alcalá de Henares, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 885 6432; fax: +34 91 885 5066; e-mail: eva.campo@uah.es

Received 5 April 2012; revised 14 August 2012; accepted 14 August 2012.

DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01474.x

Editor: Ian C. Anderson

## Keywords

ITS; lichen symbiosis; phycobiont coexistence; *Ramalina*; *rpb2*; *Trebouxia*.

## Abstract

The epiphytic lichen *Ramalina farinacea* is distributed throughout the northern hemisphere in which the same two algal *Trebouxia* species (provisionally named TR1 and TR9) coexist in every thallus. *Ramalina farinacea* symbionts were characterized based on the two fungal nuclear loci (nrITS and *rpb2*) along with the primary and secondary structures of nrITS from each *Trebouxia* species in the Iberian Peninsula and Canary Islands. The results indicated a noticeable genetic differentiation between mycobionts from these two geographic areas and also suggested concerted changes in the three partners of a lichen symbiosis toward two clearly distinguishable ‘holobiont’ lineages. Modeling of ITS2 RNA secondary structures suggested their temperature sensitivity in TR1 but not in TR9, which was consistent with the observed superior physiological performance of TR9 phycobionts under relatively high temperatures. Both TR1 and TR9 phycobionts have been also found in a variety of taxonomically distinct lichens with a preferably Mediterranean distribution, being TR1 much more widespread than TR9. Our observations support a model in which ecological diversification and speciation of lichen symbionts in different habitats could include a transient phase consisting of associations with more than one photobiont in individual thalli. Such diversification is likely to be promoted by different physiological backgrounds.

## Introduction

Symbiotic life styles constitute an important evolutionary force that is driven by different patterns of associations (Paracer & Ahmadjian, 2000). Variations in symbiotic partnerships depend on multiple factors, including specificity, selectivity, and the mode of symbiont transmission within a selective environment. Specificity refers to the possible taxonomic range of acceptable partners, whereas selectivity denotes the frequency of association between compatible partners (Yahr *et al.*, 2004). Here, we report an interesting variation in the symbiont patterns of lichens that might contribute to their evolutionary and ecological success. Lichens represent major radiations of ascomycetes in a symbiotic stage, characterized by a unique symbiogenetic phenotype of specific biological organization in the thallus (Chapman & Margulis, 1998; Margulis & Barreno, 2003; Barreno, 2004).

The associations of lichens involve at least two very different organisms: a heterotrophic fungus (mycobiont) and a photosynthetic (photobiont) cyanobacterium (cyanobionts) or unicellular green algae (phycobionts). Lichenization allows the mycobiont and photobiont(s) to thrive in habitats that would otherwise be unavailable to either one on its own (Kranner & Lutzoni, 1999). Thus, lichens are found in the most extreme environments, including deserts and high mountains. The important functional interactions between photobionts and mycobionts, and possibly with other symbionts such as bacteria (Grube & Berg, 2009), suggest that these partners evolved simultaneously. This assumption is easily understandable for lichens in which there is a vertical transmission of the photobiont. In such cases, the photobiont is dispersed within vegetative propagules comprising both symbiotic partners. Alternatively, the new photobiont can be incorporated within a fungal-germinating spore or

vegetative structure, resulting in its horizontal transmission (Zoller & Lutzoni, 2003; Yahr *et al.*, 2004, 2006; Nelsen & Gargas, 2008). Vertical transmission of photobionts has been hypothesized for asexual and nearly asexual lichen-forming fungal species (Cassie & Piercey-Normore, 2008), and horizontal transmission for sexual lichen-forming fungal species (Honegger, 1991; Werth & Sork, 2010).

Lichens with vertically transmitted photobionts would be expected to show genetic structures that tightly match those of their symbiotic partners. However, in some cases, joint dispersal does not imply the maintenance of association patterns, as suggested by Wornik & Grube (2010). For example, changes in a symbiotic organism's reproductive mode may be governed by trade-offs in the fitness of the symbiosis, as proposed by Buschbom & Mueller (2006). Thus, when the relationship between mycobiont and photobiont is optimal in a given environment, the preponderant reproductive mode would be asexual for species with mixed asexual and sexual propagation systems. When changes in the environment make the established symbiosis suboptimal, thus decreasing global fitness, sexual reproduction would be preferred as it provides access to new partners and produces variability through genetic recombination. Successful relichenizations therefore depend upon the mycobiont's ability to form alternative partnerships within a given habitat (Romeike *et al.*, 2002). According to this view, moderate habitats favor the proliferation of a higher diversity of algal genotypes, while more restrictive habitats reduce the available pool of algae owing to the greater selection pressure (Doering & Piercey-Normore, 2009). The ability of lichens to establish new fungus-photobiont associations has enabled them to colonize varied and wide-ranging habitats, assuming that the specificity and ecological selection of the photobionts is supported by a high degree of flexibility. (Grube, 2010).

Very little is known about the mechanisms shaping the associations of lichen symbioses or the relative contributions of phylogenetic history and environmental variation. This is partly owing to poor knowledge of symbiont composition and diversity, as few tools are available for distinguishing and classifying lichen symbionts. However, the refinement of molecular methods has facilitated the detection of potentially novel species of phycobionts and mycobionts, which can then be confirmed on the basis of subtle differences in macromorphological or ultrastructural characters, discovered on their re-evaluation (Casano *et al.*, 2011). This approach to previously hidden species has been successfully applied to lichen mycobionts (Crespo & Pérez-Ortega, 2009) and has brought numerous 'cryptic species' to light. The concept of 'cryptic species' is particularly relevant for algal partners within lichen thalli, given the lack in the lichenized stage of diagnostic

characters that could be used to identify distinct photobionts by optical microscopy.

Internal transcribed spacers from the nuclear ribosomal cistron 18S-5.8S-26S rRNA gene (nrITS) have been extensively exploited as a molecular tool to study partner selectivity in lichens (Grube & Muggia, 2010) and to carry out phylogenetic reconstructions of mycobionts (Kelly *et al.*, 2011; Schmull *et al.*, 2011) and photobionts (Piercey-Normore, 2006; Nelsen & Gargas, 2008; Skaloud & Peksa, 2010). Moreover, studies based on nrITS have not been limited to their primary sequences but have been extended to ITS secondary structures, which show strong conservation in both lichen fungi and phycobionts (Beiggi & Piercey-Normore, 2007). In fact, the RNA secondary structure of ITS2 is the most conserved among eukaryotes. It includes canonical domains forming the helices of a 'four-fingered hand' among several conserved features (Mai & Coleman, 1997). Among the four helices, helix II is the most conserved, and almost always shows at least one pyrimidine-pyrimidine mismatch; helix III is usually the longest and often includes a YGGY motif; and helix IV contains a CAGG sequence at its base (Schultz *et al.*, 2005). The maturation of large subunit rRNA includes a series of cleavages that result in the removal of the internal transcribed spacer (ITS2) and thus separates mature 5.8S from 25/28S rRNAs. Several investigations have demonstrated that the formation of a higher-order secondary structure within the assembling pre-ribosomal particle is a prerequisite for accurate and efficient pre-rRNA processing (Cote *et al.*, 2002), and in sum, for functional ribosomes.

Patterns of lichen symbiotic associations within an ecological and a historical framework are highly diverse. They range from a mycobiont species that cultivates the alga species as a monoculture within its thallus (Piercey-Normore & Deduke, 2011) to a fungal species that associates with more than one algal lineage [e.g. *Lecanora* (Blaha *et al.*, 2006) and *Tephromela* (Muggia *et al.*, 2008, 2010)]. In some cases, different algal genotypes coexist within the same thallus [e.g. *Rinodina* (Helms *et al.*, 2001) and *Evernia* (Piercey-Normore, 2006)].

The lichen *Ramalina farinacea* constitutes a particular case in which a fungal species specifically associates with two different *Trebouxia* phycobionts (provisionally named TR1 and TR9) coexisting within each lichen thallus (del Campo *et al.*, 2010; Casano *et al.*, 2011). The two phycobionts differ in their physiological responses to different environmental conditions (Casano *et al.*, 2011), including oxidative stress (del Hoyo *et al.*, 2011). According to Krog & Osthagen (1980), *R. farinacea* originated in the Macaronesian-Mediterranean region and thereafter gradually increased its area to include most of the temperate and boreal regions of the northern hemisphere, with the

Canary Islands as its probable southernmost limit in the Atlantic region.

The primary aim of the present study was to investigate a peculiar symbiotic association found in *R. farinacea* and the possible co-diversification events resulting from a long-term continuous symbiotic association in populations from the Iberian Peninsula and the Canary Islands. We therefore examined the genetic variability of the TR1 and TR9 phycobionts within *R. farinacea* in relation to mycobiont genotypes and geographic location. The symbiont composition and genetic diversity of each sample was evaluated based on the primary and secondary RNA structures of the nrITS from each phycobiont (TR1 and TR9), along with the sequence of fungal nrITS and *rpb2* genes. The obtained algal nrITS sequences corresponding to the TR1 and TR9 algae from *R. farinacea* and other *Ramalina* species were then used to search sequence databases to determine the presence of these phycobionts in other lichen taxa.

## Materials and methods

### Taxon sampling

For this study, 31 thalli from nine populations (Table 1) of *R. farinacea* were analyzed. Four populations were from the Iberian Peninsula: Asturias, Puerto de Maravio (As1–2 samples) and Puerto de Ventana (As3–5 samples); León (Le1–5 samples); Castellón (CS1–5 samples) and Ciudad Real (CR1–5 samples). Two populations were from the Canary Islands (Tenerife): Pinar de la Guancha (Gu1–5 samples) and Los Realejos (Re1–5 samples). Two populations were from California: Mount Hamilton, Santa Clara Co. (CA1 sample) and San Francisco Botanical Garden (CA2 sample). Additional details on the geographic coordinates, altitude, bioclimatic belt and phorophytes are provided in Casano *et al.* (2011). All of the studied materials were deposited in the Herbarium of the Department of Botany, Universitat de Valencia (Valencia, Spain), stored at a temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### DNA isolation, amplification, and sequencing

All thalli were surface washed by immersion for 10 min in aqueous sodium hypochlorite (final concentration 3% w/v) and then with sterile distilled water prior to DNA isolation. Total DNA was isolated from each collected lichen thallus following the procedure of Cenis (1992), which was developed to rapidly extract fungal DNA for PCR amplification. The algal nrITS were PCR-amplified using the primers of Kroken & Taylor (2000) and Casano *et al.* (2011). Fungal nrITS were amplified using the primers ITS1F (Gardes & Bruns, 1993) and ITS4 (White

*et al.*, 1990). A portion of the fungal *rpb2* gene, encoding DNA-directed RNA polymerase II polypeptide 2, was amplified with the primer pair RpolRfF: 5'-TGG TTT GTC CAG CAG AGA CC-3' and RpolRfR 5'-TCT CAA GAT CTT CCG GAG TC-3'.

Amplification reactions were carried out in a total reaction volume of 50  $\mu\text{L}$  and using Illustra Hot Start Mix RTG (GE Healthcare, NJ). Negative controls, without DNA template, were included in every round of PCR amplifications to eliminate false-positive results caused by contaminants in the reagents. Cycling conditions were as follows: one cycle at  $94^{\circ}\text{C}$  for 2 min and 40 cycles of  $94^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  for 30 s and  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min and a final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 7 min. Amplification products were subjected to electrophoresis through 1.5% agarose gels. The corresponding bands were excised from the gel, purified with a DNA gel extraction kit (Qiaex II; Qiagen GmbH, Hiden, Germany) and directly used for sequence analysis. Purified amplicons were sequenced using the Big Dye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequence Ready Reaction kit II (Applied Biosystems Co. Foster City, CA), separated by automated multicapillary electrophoresis, and further analyzed on an ABI Prism 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Co.).

### Alignments, phylogenetic analyses, RNA secondary structure constructions, database searches, and genetic differentiation estimates

All the sequences determined in this study were aligned using the default parameters implemented in Muscle 3.6 (Edgar, 2004), by using SEAVIEW v4 (Gouy *et al.*, 2010), and then adjusted with BIOEDIT 7.0 (Hall, 1999). Data sets were subjected to maximum-parsimony (MP), maximum-likelihood (ML) using PAUP 4.0b10 (Swofford, 2003), and examined with a Bayesian approach by using BEAST (Heled & Drummond, 2010). Trees were displayed with FIGTREE v1.3.1. (Rambaut, 2008). The model for nucleotide substitution was chosen according to the best score obtained in tests performed with JMODELTEST 0.1 (Posada, 2009). In the MP and ML analyses, a heuristic search was carried out using random stepwise addition, tree bisection-reconnection (TBR), and a branch-swapping algorithm to determine the best tree. For the ML analyses, the transition/transversion ratio was estimated from the minimum evolution tree as implemented in PAUP. Tree length (TL) was used for selecting a true tree that corresponded with the minimum evolution criterion (Pauplin, 2000). For Bayesian analyses, the Markov chain Monte Carlo method from a random starting tree was initiated in the Bayesian inference and run for  $10^8$  generations. Sampling was every 100th generation. After chain convergence analysis, all samples obtained during the first 50 000 generations were discarded as



**Table 1.** Locations of the collections of *Ramalina farinacea* samples and algae from data banks used in this study and their GenBank accession numbers

ID isolation	Country/State-Province/Locality	Fungal nrITS	Fungal <i>rpb2</i>	Algal nrITS			
				Predominant phycobiont		Non-predominant phycobiont	
				Type	Accession	Type	Accession
As1	Spain/Asturias/Puerto de Maravio	JF414683	JF414695	TR1	GU252192	TR9	JF414630
As2	Spain/Asturias/Puerto de Maravio	JF414684	JF414696	TR1	GU252196	TR9	JF414631
As3	Spain/Asturias/Puerto de Maravio	JF414685	JF414697	TR1	GU252195	TR9	JF414632
As4	Spain/Asturias/Puerto de Ventana	JF414691	JF414698	TR1	GU252203	TR9	JF414633
As5	Spain/Asturias/Puerto de Ventana	JF414692	JF414699	TR1	GU252204	TR9	JF414634
Le1	Spain/León	JF414678	JF414716	TR1	GU252187	TR9	JF414651
Le2	Spain/León	JF414679	JF414717	TR1	GU252188	TR9	JF414652
Le3	Spain/León	JF414680	JF414718	TR1	GU252189	TR9	JF414653
Le4	Spain/León	JF414681	JF414719	TR1	GU252190	TR9	JF414654
Le5	Spain/León	JF414682	JF414720	TR1	GU252191	TR9	JF414655
CS1	Spain/Castellón	JF414664	JF414706	TR1	GU252172	TR9	JF414641
CS2	Spain/Castellón	JF414665	JF414707	TR1	GU252173	TR9	JF414642
CS3	Spain/Castellón	JF414666	JF414708	TR1	GU252174	TR9	JF414643
CS4	Spain/Castellón	JF414667	JF414709	TR1	GU252175	TR9	JF414644
CS5	Spain/Castellón	JF414668	JF414710	TR1	GU252176	TR9	JF414645
CR1	Spain/Ciudad Real	JF414669	JF414702	TR1	GU252177	TR9	JF414637
CR2	Spain/Ciudad Real	JF414670	JF414703	TR1	GU252178	TR9	JF414638
CR4	Spain/Ciudad Real	JF414671	JF414704	TR1	GU252180	TR9	JF414639
CR5	Spain/Ciudad Real	JF414672	JF414705	TR1	GU252181	TR9	JF414640
Gu1	Spain/Canary Islands/La Guancha (Tenerife)	JF414673	JF414711	TR9	GU252182	TR1	JF414646
Gu2	Spain/Canary Islands/La Guancha (Tenerife)	JF414674	JF414712	TR9	GU252183	TR1	JF414647
Gu3	Spain/Canary Islands/La Guancha (Tenerife)	JF414675	JF414713	TR9	GU252184	TR1	JF414648
Gu4	Spain/Canary Islands/La Guancha (Tenerife)	JF414676	JF414714	TR9	GU252185	TR1	JF414649
Gu5	Spain/Canary Islands/La Guancha (Tenerife)	JF414677	JF414715	TR9	GU252186	TR1	JF414650
Re1	Spain/Canary Islands/Los Realejos (Tenerife)	JF414686	JF414721	TR9	GU252197	TR1	JF414656
Re2	Spain/Canary Islands/Los Realejos (Tenerife)	JF414687	JF414722	TR9	GU252198	TR1	JF414657
Re3	Spain/Canary Islands/Los Realejos (Tenerife)	JF414688	JF414723	TR9	GU252199	TR1	JF414658
Re4	Spain/Canary Islands/Los Realejos (Tenerife)	JF414689	JF414724	TR9	GU252200	TR1	JF414659
Re5	Spain/Canary Islands/Los Realejos (Tenerife)	JF414690	JF414725	TR9	GU252201	TR1	JF414660
CA1	USA/California/Joseph Grant Co. Park, Santa Clara	JF414693	JF414700	TR1	GU252205	TR9	JF414635
CA2	USA/California/Botanical Garden, San Francisco City	JF414694	JF414701	TR1	GU252206	TR9	JF414636

burnin. Posterior probabilities for each node were inferred from the resulting consensus tree. Bootstrap probabilities (Felsenstein, 1985) were calculated to estimate the robustness of the clades from 1000 replicates of the data. Statistical parsimony networks were reconstructed using TCS 1.18 (Clement *et al.*, 2000). This program takes into account certain population-level phenomena, such as recombination and the possible persistence of ancestral haplotypes in the population, which are not addressed by traditional methods (MP, NJ, and ML). The inclusion of haplotype networks allows the natural incorporation of the frequently non-bifurcating genealogical information associated with population-level divergences. Database searches were performed by using BLAST (Altschul *et al.*, 1997). RNA secondary structures of algal nrITS sequences were constructed with c software (Matzura & Wennborg, 1996) and modeled at different temperatures (−10, 15, and 37 °C).

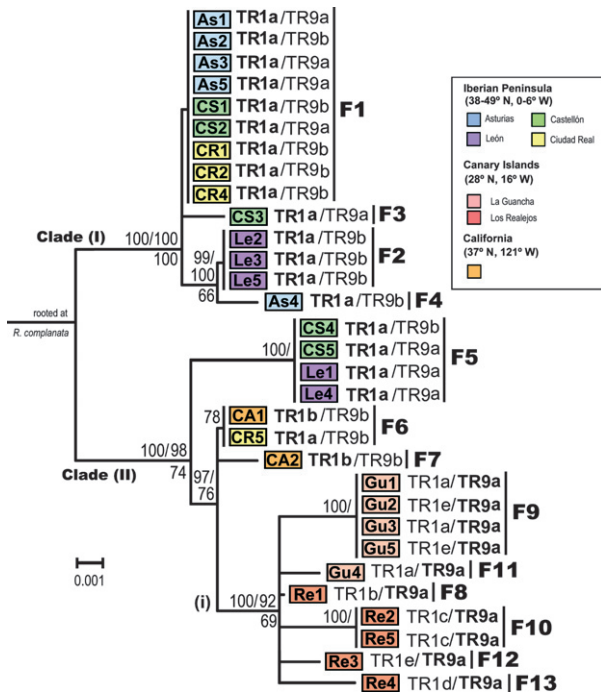
Temperatures were selected after evaluating their effects of temperature during culture on growth and photosynthesis in isolated TR1 and TR9 phycobionts [partial results are published in Casano *et al.* (2011)]. To estimate genetic differentiation between populations, the DNASP software was used (Librado & Rozas, 2009). This program is able to compute several measures of DNA sequence variation within and between populations.  $F_{ST}$  measures the effect of population subdivision, which is the reduction in heterozygosity in a subpopulation owing to genetic drift.  $F_{ST}$  values range from zero, indicating panmixis or the absence of genetic divergence, to one, indicating complete isolation or extreme subdivision. Generally,  $F_{ST}$  values up to 0.05 imply negligible genetic differentiation, whereas with values > 0.25 very great genetic differentiation within the population analyzed can be expected. Snn is a measure of how often the nearest neighbors of sequences are found in the

same locality. If a population is strongly structured, then the nearest neighbor of a sequence can be expected in the same locality. Thus, the value of  $S_{nn}$  will be close to one when the populations at the two localities are highly differentiated. The  $S_{nn}$  statistic is more powerful than other statistics such as those of Hudson *et al.* (1992) in cases with small sample sizes (10 or 15), especially in the presence of recombination and low to moderate levels of variation.

## Results

### Genetic variability of each of the two coexisting phycobionts within *R. farinacea* in relation to mycobiont genotypes

The genetic diversity of the fungal partners in *R. farinacea* lichens was analyzed based on the nrITS and the *rpb2* gene, as described earlier (see Table 1 for information about specimens and GenBank accessions). Phylogenetic reconstructions were performed on 62 new sequences using 31 individuals of *R. farinacea*: 38 sequences from the Iberian Peninsula, 20 from the Canary Islands, and 4 from California. Initial estimations of fungal haplotype diversity (Hd) based on a combination of the two different molecular markers, by implementing the TCS 1.21 program, rendered a single genealogy, thus suggesting that all tested thalli belonged to the same species (data not shown). The obtained haplotype network revealed a clearly differentiated clade including fungal haplotypes of lichens collected in the Canary Islands. The clustering of fungal haplotypes from the Canary Islands was confirmed in phylogenetic reconstructions based on the same molecular markers (Fig. 1). The analysis of the two combined markers included 837 characters: 59 were variable and 11 were parsimony informative. Sequences from *Ramalina complanata* were used as an out-group (accession numbers: FJ356152 for nrITS and DQ883762 for *rpb2*) because of the relative proximity of this species to *R. farinacea* and the availability in GenBank of sequences for the two markers used to construct the phylogeny shown in Fig. 1. MP analyses yielded a tree length (TL) of 62, a consistency index (CI), excluding uninformative characters, of 0.9677, and a retention index (RI) of 0.9512. In the tree depicted in Fig. 1, two main clades are distinguished. Clade I contains several samples from the Iberian Peninsula (Asturias, León, Castellón, and Ciudad Real) and is well supported (bootstrap values of 1000 replicates). Clade II consists of samples from all populations (Iberian Peninsula, Canary Islands, and California) and is supported by a bootstrap value of 74. Samples from León, Castellón, and Ciudad Real had fungal haplotypes distributed throughout the tree of Fig. 1. Samples from Asturias had fungal haplotypes exclusively included in clade I. Samples from the Canary Islands and California



**Fig. 1.** Phylogram based on the analysis of fungal nrITS and *rpb2* gene sequences in specimens of *Ramalina farinacea*, with *Ramalina complanata* as out-group (accession numbers FJ356152 and DQ883762 for nrITS and *rpb2*, respectively). Vertical bars on the right indicate different fungal haplotypes of F1–F13. Algal haplotypes are indicated at the right of each sample: TR1 haplotypes based on nrITS sequences (TR1a–TR1e) and TR9 haplotypes based on nrITS sequences (TR9a–TR9b) are indicated at the left and the right of the slash-marks, respectively. The predominant phycobiont associated with each fungal haplotype is noted in bold letters. Subclade (i) includes mycobionts from the Canary Islands. The tree was obtained using a Bayesian approach with BEAST. Values at the left and right of the slash-mark on the tree branches correspond to posterior probabilities inferred with Bayesian and MP methods, respectively. Below the branches are the bootstrap values recorded only for those lineages supported by 50% of all (1000) replicates. Subpopulations within the studied populations (the Iberian Peninsula, the Canary Islands and California) and their coordinates are shown in the inset.

had fungal haplotypes exclusively included in clade II. Additional genetic differentiation estimates, obtained with DNASP v5, rendered values of 1.000 and 0.623 for the  $S_{nn}$  and  $F_{ST}$  statistics (all were  $P \leq 0.0001$ ) carried out for the nrITS, and 0.927 and 0.678 for the  $S_{nn}$  and  $F_{ST}$  statistics (all were  $P \leq 0.0001$ ) for the *rpb2* gene. These values suggested a high degree of divergence between fungal genotypes from the Iberian Peninsula and the Canary Islands.

Similar genetic differentiation estimates were obtained when DNASP v5 was applied to each separate phycobiont, with values of 0.672 and 0.222 for the  $S_{nn}$  and  $F_{ST}$  statistics (all them with  $0.001 < P < 0.01$ ) for the TR1 phycobionts and 0.655 and 0.500 for the  $S_{nn}$  and  $F_{ST}$  statistics (all  $0.001 < P < 0.01$ ) for the TR9 phycobionts. These results

**Table 2.** Geographic distribution of haplotype combinations of *Ramalina farinacea* phycobionts based on algal nrITS sequences

Haplotype combination	nrITS haplotype of		Geographic locations		
	TR1	TR9	Iberian Peninsula	California	Canary Islands
I	TR1a	TR9b	11*	–	–
II	TR1a	TR9a	8	–	3
III	TR1b	TR9a	–	–	1
IV	TR1c	TR9a	–	–	2
V	TR1d	TR9a	–	–	1
VI	TR1e	TR9a	–	–	3
VII	TR1b	TR9b	–	2	–

\*Numbers indicate the observed specimens with a given algal haplotype combination in each studied geographic area. Information on the geographic localities, coordinates, altitude, bioclimatic belt, collection data, and phorophyte are available in Casano *et al.* (2011).

suggested a high degree of divergence between algal genotypes from the Iberian Peninsula and the Canary Islands, as previously reported for mycobionts.

In relation to the genetic diversity of phycobionts, the values of Hd, estimated with the DNASP v5 software, were as follows: absence of polymorphism for TR1 and 0.526 for TR9 phycobionts in the Iberian Peninsula; 0.644 for TR1 and without polymorphism for TR9 phycobionts in the Canary Islands. Regarding the genetic diversity of phycobionts with respect to mycobionts, Fig. 1 shows that the mycobionts from the Canary Islands form a sub-clade (i) within clade II, which is associated with only a single TR9 haplotype (TR9a) but with five algal TR1 haplotypes (TR1a–TR1e). Conversely, all samples from the Iberian Peninsula contained a single TR1 haplotype (TR1a) and two different TR9 haplotypes (TR9a–TR9b). If algal haplotype combinations (TR1 plus TR9) within each lichen thallus are considered, then seven different combinations are obtained (I–VII, Table 2). Among these, only combination II was present in the Iberian Peninsula and the Canary Islands, whereas the remaining combinations were only found either in the Iberian Peninsula (combination I), the Canary Islands (III–VI), or California (VII).

### Searching for *Trebouxia* TR1 and *T. TR9* phycobionts beyond *R. farinacea*

After defining the different algal haplotypes for each sampled thallus of *R. farinacea*, we searched for haplotypes similar to those of either TR1 or TR9 in other lichen taxa. Our search initially focused on other members of the *Ramalina* genus analyzed using the same generic primers for algal nrITS as used for *R. farinacea*. Sequence analyses identified at least five species different from *R. farinacea* but with either TR1 or TR9 *Trebouxia* algae as the phycobiont: *R. calicaris*,

*R. fastigiata*, *R. fraxinea*, *R. lusitanica*, and *R. siliquosa* (see Fig. 3 for accessions). In all of these species, TR1 was the phycobiont, except *R. fastigiata*, in which TR9 was the phycobiont. Next, we searched for nrITS haplotypes similar to those reported for TR1 and TR9 algae in the NCBI nucleotide database. While approximately 100 sequences very similar to the TR1 haplotypes were found, only two were similar to the TR9 haplotypes in *Tephromela atra* (accessions EU551521 and EU551522), apart from the sequences of *R. farinacea* and *R. fastigiata* as obtained by our group.

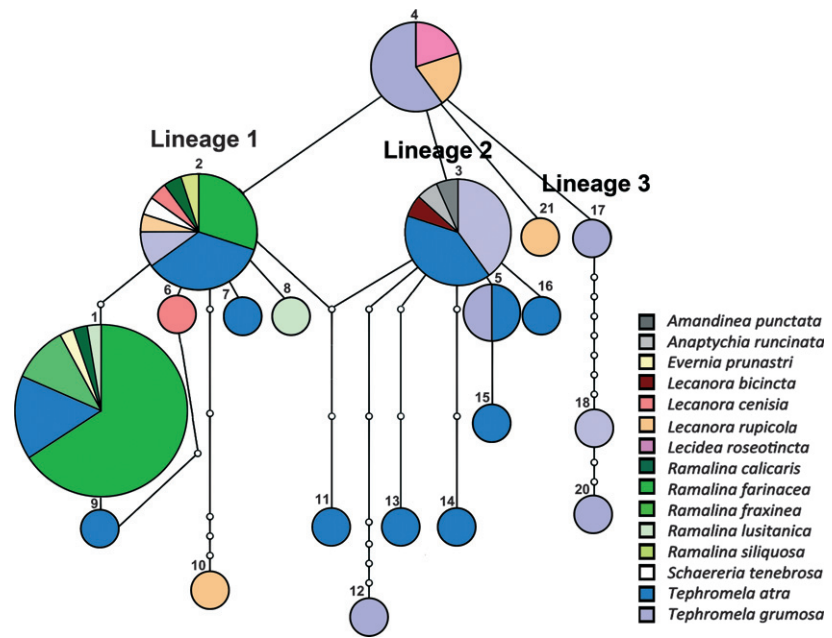
To estimate the Hd for TR1 in relation to the taxa of its fungal partner, the genealogy shown in Fig. 2 was constructed with the TCS 1.21 program. As shown in Fig. 2, nrITS haplotypes similar to TR1 were present in a large diversity of lichens from eight different genera accounting for a total of 16 species: *Lecanora* (*L. bicincta*, *L. cenisia*, *L. lojkaeana* and *L. rupicola*), *Ramalina* (*R. calicaris*, *R. farinacea*, *R. fraxinea*, *R. lusitanica* and *R. siliquosa*), *Tephromela* (*T. atra* and *T. grumosa*), *Amandinea* (*A. punctata*), *Anaptychia* (*A. runcinata*), *Evernia* (*E. prunastri*), *Schaereria* (*S. tenebrosa*), and *Lecidea* (*L. roseotincta*). In the genealogy of TR1 haplotypes, a parent node included three different lichen species from different genera (*L. rupicola*, *L. roesotincta*, and *T. grumosa*) from which three main clades could be derived. Lineage L1 included 61 samples from 12 different species from four genera (*Evernia*, *Lecanora*, *Ramalina*, and *Tephromela*). Lineage L2 included 25 samples from five species from four different genera (*Amandinea*, *Anaptychia*, *Lecanora* and *Tephromela*). Lastly, lineage L3 included three samples from the species *T. grumosa*.

To study the relationships among TR1-like phycobionts, 433 characters were aligned with BIOEDIT 7.0, using several sequences of *Trebouxia decolorans* as out-group (accessions: AJ969550, FJ705190, FJ705199, FJ705201, and FJ705206). MP analyses of the algal nrITS sequences resulted in a total of 65 variable characters, of which 42 were parsimony informative. MP analyses resulted in a TL of 95, a CI of 0.7895 and a RI of 0.9736. The phylogram depicted in Fig. 3 included 121 algal nrITS sequences similar to either TR1 (96 sequences) or TR9 (20 sequences) haplotypes and five corresponded with four *T. decolorans* and one *Trebouxia* sp. as an out-group. As expected, TR1 and TR9 haplotypes appeared in two separate clades. Clade I comprised TR1 haplotypes and clade II, TR9 haplotypes, with high bootstrap values of 88 and 100, respectively. The tree topology was consistent with the genealogy depicted in Fig. 2.

### Algal nrITS2 RNA secondary structures of *Trebouxia* TR1 and *T. TR9* phycobionts

To further characterize algal diversity of the two *Trebouxia* phycobionts, which coexist in *R. farinacea* and are also present in other lichen species, we analyzed the RNA

**Fig. 2.** Parsimony network of algal TR1 haplotypes based on nrITS sequences associated with different fungi. The network was built using the *tcs* 1.21 program according to the 95% parsimony interval. Each circle corresponds to a particular haplotype. The sizes of the circles are proportional to the number of individuals bearing this particular haplotype. Numerals above circles correspond to algal haplotypes (ITSA) of Fig. 3. Each bar in the network represents a single mutation step and each small empty circle an additional change. Sequences with uncertainty at any nucleotide position have been excluded.



secondary structures of the nrITS2 region. This region comprises the intergenic sequence between 5.8S rDNA and 26S rDNA within the algal nrITS in all specimens noted in Fig. 3. Using the *RNA*DRAW program, we obtained two structural variants of ITS2, ITS2-A, and ITS2-B, when modeled at 15 °C. As shown in Fig. 4, TR1 and TR9 shared these two variants of the ITS2 RNA secondary structure, in which four distinct domains or helices form a ‘four-fingered hand’, as described in the Introduction. The main difference between ITS2-A and ITS2-B was the presence of an additional helix (IIa) in the ITS2-A structure, resulting in a shortening of helix III.

The secondary structures of both ITS2-A and ITS2-B RNA changed differentially in TR1 and TR9 when the temperature was shifted to higher or lower values (Fig. 4). When the temperature was lowered from 15 to –10 °C, the same two RNA secondary structures, ITS2-A and ITS2-B were obtained in TR1 and TR9 (Fig. 4a and b). However, with an increase in temperature from 15 to 37 °C, a third RNA secondary structure, ITS2-C (Fig. 4b), appeared in TR1, whereas TR9 maintained the ITS2-A structure.

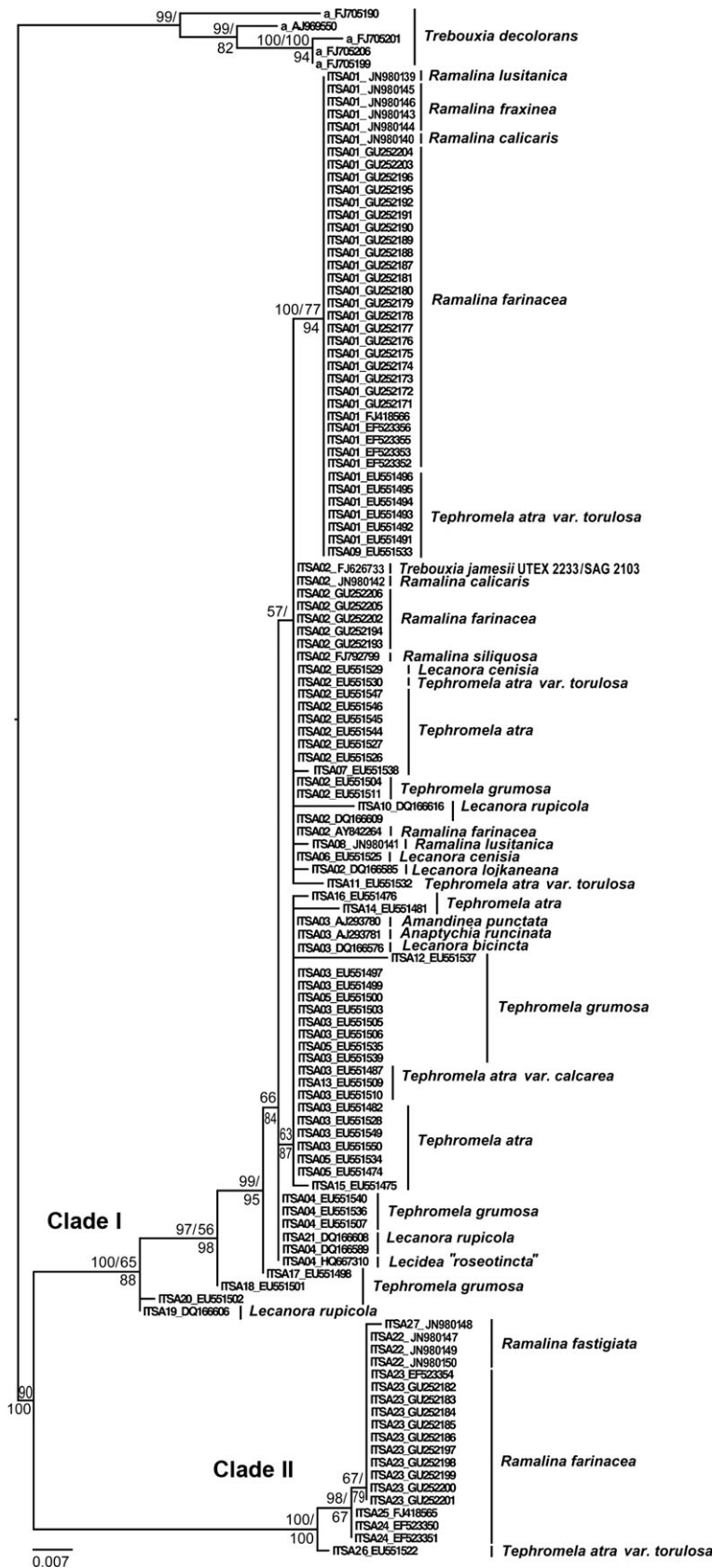
## Discussion

### **Mycobionts and phycobionts from *R. farinacea* are differentially distributed and genetically differentiated between the Iberian Peninsula and the Canary Islands**

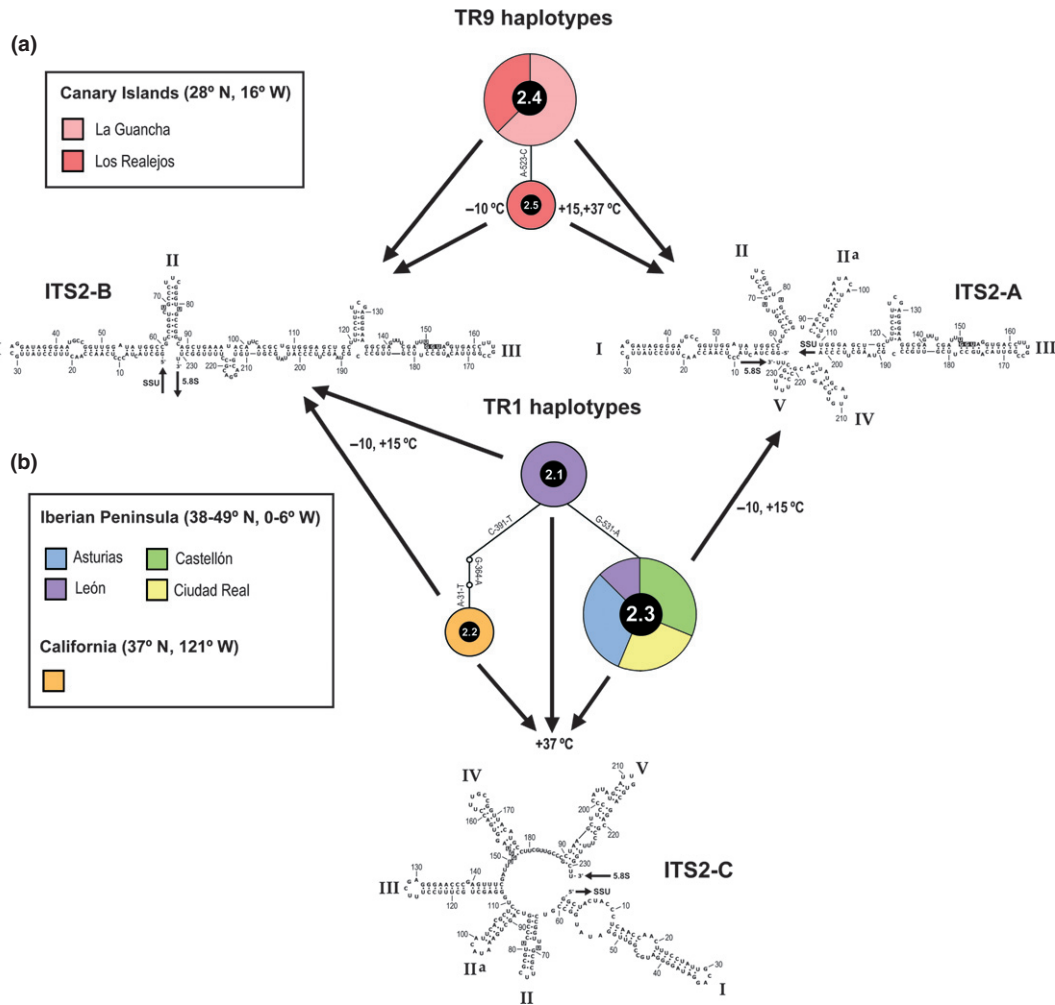
One of the most remarkable finding of our study is the clear genetic differentiation of mycobionts from *R. farinacea* between the Iberian Peninsula and the Canary Islands.

This differentiation was determined by three different and complementary approaches based on the combination of two nuclear-encoded molecular markers (nrITS and the *rpb2* gene). First, a clearly differentiated clade including all samples from the Canary Islands was identified in the haplotype network (data not shown). Second, the clustering of fungal specimens from the Canary Islands within a monophyletic sub-clade (i) was confirmed in the phylogenetic reconstructions shown in Fig. 1. Third, estimates based on  $F_{ST}$  and  $S_{nn}$  values obtained using the *DNASP* v5 program corroborated our initial finding of a high degree of genetic divergence between fungal genotypes from the Iberian Peninsula and Canary Islands.

Studies on symbiosis have generally concentrated on a single primary symbiont and its host. Consequently, the focus of studies of heritable changes in development has been on the host genome and, occasionally on the genome of a specific primary symbiont (often in the context of co-evolution studies). Nowadays, the hologenome theory of evolution considers the holobiont with its hologenome, acting in consortium, as a unit of selection in evolution (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2011). The holobiont has been defined as the host organism together with all of its symbiotic microbiota (Gilbert *et al.*, 2010). Consideration of the hologenome brings forth certain modes of variation in the holobiont, which are unique to this entity. One such variation is ‘microbial amplification’, in which there is an increase in one group of symbionts relative to others, which can occur when conditions change. An increase in the abundance of a particular microbe is actually equivalent to gene amplification (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2011). In our study, when ‘universal primers’ for *Trebouxia* algae



**Fig. 3.** Phylogram based on the analysis of algal nrITS from TR1 and TR9-like phycobionts associated with different lichen taxa, using several sequences of *Trebouxia decolorans* as out-group (accession numbers: AJ969550, FJ705190, FJ705199, FJ705201 and FJ705206). Vertical bars on the right indicate different lichen species containing a phycobiont whose nrITS sequence is very similar to that of either TR1 or TR9 phycobionts from *Ramalina farinacea*. The tree was obtained using a Bayesian approach with BEAST. Values at the left and right of the slash-mark correspond to posterior probabilities inferred with Bayesian and MP methods, respectively. Below the branches are the bootstrap values recorded only for those lineages supported by 50% of all (100) replicates. The scale bar indicates substitutions/site. Each sample is named according to the number of algal haplotype (ITSA) followed by their GenBank accession number.



**Fig. 4.** Haplotype genealogies and RNA secondary structures of *Ramalina farinacea* phycobionts constructed on the basis of nrITS2 RNA sequences. (a) Haplotype genealogy and RNA secondary structures of ITS2 RNA from samples collected in the Canary Islands. (b) Haplotype genealogy and RNA secondary structures of ITS2 RNA from samples collected in the Iberian Peninsula and California. Haplotype genealogies were built using the *tcs* 1.21 program. The depicted RNA secondary structures were constructed on the basis of the sequences of TR1 phycobionts with the *RNA DRAW* program. The ITS2-A and ITS2-B RNA secondary structures based on the sequences of TR9 phycobionts (not shown) were identical to those of TR1 phycobionts at each given temperature. Subpopulations within the studied populations (the Iberian Peninsula, the Canary Islands, and California) and their coordinates are shown in the insets.

were used, a single algal nrITS sequence per thallus, which clearly corresponded to either TR1 or TR9 phycobionts, was consistently obtained, and never a mixed nrITS sequence. We interpret these results as reflecting the occurrence of ‘microbial amplification’, with an increase in either TR1 or TR9 as suggested in previous studies (Casano *et al.*, 2011). Accordingly, in this study we define the ‘predominant phycobiont’ to be the alga whose nrITS sequence is obtained after amplification with ‘universal or generic primers’ (Kroken & Taylor, 2000) for *Trebouxia* algae and the ‘non-predominant phycobiont’ to be the alga whose nrITS sequence is obtained only after amplifying with primers specific for either TR1 or TR9 (Casano *et al.*, 2011).

After analyzing all the obtained algal nrITS sequences of the predominant and non-predominant phycobionts, we found that the differentiation of *R. farinacea* lichens between the Iberian Peninsula and the Canary Islands was also reflected in their TR1 and TR9 phycobionts. TR1 was the predominant phycobiont in all samples from the Iberian Peninsula and California, whereas TR9 was the predominant phycobiont in all samples from the Canary Islands, as previously reported (Casano *et al.*, 2011).

Additionally, the predominant TR9 phycobiont in the Canary Islands was found to be linked with a series of fungal haplotypes that represent a clearly distinguishable sub-clade (i), shown in Fig. 1. If this finding implies an incipient specialization of *R. farinacea* fungal partners

(enclosed in sub-clade i) in different geographic areas, then this is an important contribution to our understanding of lichen evolution. The differential specialization of symbionts is accompanied by a higher genetic diversity of both the mycobiont and the non-predominant phycobionts in the Canary Islands (Hd = 0.822 and Hd = 0.644, respectively) than in the Iberian Peninsula (Hd = 0.432 and Hd = 0.526). The higher diversity and the apparent specialization of Canary Islands populations may be explained by the island immaturity-speciation pulse model of island evolution, which posits that the opportunities for speciation have a broadly predictable relationship to the life cycle of oceanic islands (Whittaker *et al.*, 2007). Opportunity drives the speciation rate and is greatest at a relatively early stage in the life cycle of an island, when the intrinsic carrying capacity exceeds species richness by the greatest margin. Tenerife is one of the youngest islands within the Canarian Archipelago, which is generally thought to have emerged initially as two or possibly three separate islands, the oldest dating back to c. 11 Ma. These proto-islands fused into the single present-day island only within the last 3.3 Myr (Fernández-Palacios *et al.*, 2011). Moreover, during their life span, volcanic oceanic islands are often subject to a series of catastrophic events. Thus, in terms of their geological dynamics, the Canary Islands are clearly different from other island groups (Whittaker *et al.*, 2007).

### **ITS2 RNA temperature-dependent secondary structure variations provide new physiological clues regarding the persistence of TR1 and TR9 phycobionts within *R. farinacea***

The thermal variations of the ITS2 RNA secondary structure provided new physiological clues regarding the persistence of TR1 and TR9 phycobionts within *R. farinacea*. The RNA secondary structure of ITS2 is highly conserved among eukaryotes showing canonical domains forming a 'four-fingered hand' and several conserved features (Mai & Coleman, 1997). Maturation of the large subunit rRNA includes a series of cleavages that result in the removal of ITS2, separating mature 5.8S and 25/28S rRNAs. Several investigations have demonstrated that the formation of a higher-order secondary structure within the assembling pre-ribosomal particle is a prerequisite for accurate and efficient pre-rRNA processing (Cote *et al.*, 2002). It has long been known that temperature-related alterations in rRNA processing greatly inhibit the production of large ribosomal subunits in the cytoplasm (Toniolo *et al.*, 1973). To find a possible link between the different nrITS sequences of TR1 and TR9 phycobionts and distinct physiological traits, models of the RNA secondary structures of the ITS2s from all the TR1 and TR9 haplotype

variants at different temperatures were created. This approach yielded important physiological insight into the persistence of TR1 and TR9 phycobionts within *R. farinacea* thalli. As reported in the Results, the RNA secondary structure of this key intergenic region seems to be highly thermally stable in TR9 phycobionts but thermally labile in TR1 phycobionts. In this study, two variants of the ITS2 RNA secondary structures were noted to occur at -10 and 15 °C in TR1 and TR9 phycobionts (Fig. 4). These two structures, ITS2-A and ITS2-B, may be comparable with the two alternative secondary structures previously proposed for ITS2 (Yeh & Lee, 1990; Joseph *et al.*, 1999). Elements of both structural models are important in efficient rRNA processing (Cote *et al.*, 2002). However, when the same structures were modeled at 37 °C, we obtained a third variant in the TR1 phycobionts (ITS2-C) but not in the TR9 phycobionts. This ITS2-C RNA structure lacked the elemental features necessary for the effective removal of ITS2 after transcription. These structural models are hypothetical, and biochemical experimentation is necessary to support their configurations. Nevertheless, it may be that the predicted thermal dependence of the ITS2 RNA secondary structure and its probable consequences on nuclear ribosomal cistron processing contribute to explain the superior physiological performance of TR9 phycobionts under relatively high temperatures, in contrast to TR1, which thrives at relatively low-moderate temperatures (Casano *et al.*, 2011). It is therefore possible that the *R. farinacea* fungus utilizes the two algae to broaden its physiological behavior in response to changing environmental conditions.

Together, these results can be interpreted as an incipient specialization of mycobionts along with a bias in phycobiont predominance (TR1 in the Iberian Peninsula and TR9 in the Canary Islands). This specialization is probably imposed by gross ecological traits related to latitude (see inset of Fig. 1) and/or the continentality/insularity of geographic locations. The latitude of the two Californian localities was similar to that of the localities from the Iberian Peninsula (see inset of Fig. 1) and likewise subject to a Mediterranean climate. Interestingly, fungal haplotypes from California (F6 and F7) were included within clade II but outside sub-clade (ii) in Fig. 1. These two samples had TR1 as predominant phycobiont (as in all samples from the Iberian Peninsula) but the TR1b haplotype (as several samples from the Canary Islands). The adjacent positions of the Californian and Canarian samples (F6) in Fig. 1 and their phycobiont composition may suggest an intermediate diversification status of holobionts. However, a higher number of samples from California must be analyzed to confirm this assumption.

Changes in fungal genomes seem to be encompassed with changes in each algal genome, resulting in concerted

changes in the three genomes. Such changes may illustrate a transient phase toward specialization by the fungal and algal partners in the different habitats and seems to be facilitated by the association with more than one phycobiont in each thallus.

### **The coexistence of two or perhaps more physiologically different *Trebouxia* taxa within the same lichen thallus might be more common than previously thought**

It has been shown that *Ramalina* species from different climates prefer distinct lineages of *Trebouxia* algae (Cordeiro *et al.*, 2005). In *Tephromela atra* and *T. grumosa*, a number of lichen thalli were shown to have TR1 as the phycobiont (named *Trebouxia* spec. 2 in Muggia *et al.*, 2008, 2010) while in only two samples of *T. atra* was TR9 the phycobiont. Interestingly, these two samples were collected from Ischia, a volcanic island lying at the northern end of the Gulf of Naples, in Italy. Preliminary studies in our laboratory with specimens of *R. fastigiata* (Catalá S, unpublished results) and *T. atra* (del Campo *et al.*, unpublished results) from different localities of the Iberian Peninsula, using the same molecular markers as in *R. farinacea*, revealed the coexistence of TR1 and TR9 in all the analyzed samples. Therefore, the TR1/TR9 binomial may be more frequent than previously thought suggesting its successful colonization of at least Mediterranean and Macaronesian regions.

*Lecanora rupicola* also has TR1 its phycobiont referred to as *Trebouxia* spec. 2 in Blaha *et al.* (2006). Recently, an association between *Lecidea roseotincta* and two different *Trebouxia* species was reported (Schmull *et al.*, 2011). One of the *Trebouxia* species has been named *T. roseotinctae* (accession HQ667310) but seems to be TR1, based on its nrITS sequences. In addition, at least six different *Trebouxia* phycobionts have been detected, including one that seems to be TR1, in *R. fraxinea* (Catalá *et al.*, unpublished results). Interestingly, more than two of these algae occupied (by TEM) the same thallus. These considerations along with the results of this study suggest that the coexistence of at least two physiologically different *Trebouxia* strains or species within the same lichen thallus is a not uncommon occurrence.

### **TR1 phycobionts are widespread among lichens, with a preferably Mediterranean distribution**

Our search results produced approximately 100 nrITS sequences very similar to those from *Trebouxia* phycobionts in a large variety of lichen taxa within *Lecanorales* but in distinct families, such as *Lecanoraceae*

(Schmull *et al.*, 2011) *Parmeliaceae* (*Evernia prunastri*, this work), *Physciaceae* (Helms *et al.*, 2001), *Ramalinaceae* (several *Ramalina* species in this work), and *Tephromelataceae* (Muggia *et al.*, 2008, 2010). As shown in Fig. 2, the majority of Hd in TR1 phycobionts descended from a single haplotype (ITSA-4). This ancestral haplotype, although not highly represented, seems to be widely distributed both phylogenetically and geographically. Phylogenetically, it is shared by three lichen species belonging to three distinct genera (*Lecidea*, *Lecanora*, and *Tephromela*) but it is absent in *Ramalina*. Geographically, it has been found within median–high latitudes, ranging from 38 to 43° in Spain and Italy to higher than 54° in Denmark and Norway. The observation of multiple pathways, including three distinct lineages and interconnections resulting in a network linking haplotypes, is consistent with recombination. In this network, haplotypes of intermediate ancestry, such as ITSA-1, ITSA-2, and ITSA-3, are associated with a number of fungi. Further down in the genealogy, a radiation of new haplotypes is observed, especially in *Tephromela atra*. It is noteworthy that the genealogy includes a similar number of samples from *R. farinacea* and *T. atra*, which belong to the same order (*Lecanorales*) and suborder (*Lecanorineae*) but to different families, that is, *Ramalinaceae* and *Lecanoraceae*, respectively. The distribution of these two lichen species is rather cosmopolitan, as they have been studied in samples collected in similar geographic areas in the Mediterranean regions of Italy and Spain. As shown in Fig. 2, in *R. farinacea* there are only two different haplotypes (ITSA-1 and 2), both rather ancestral and constrained to lineage 1. This contrast with the higher number of different haplotypes in *T. atra*, most of which belong to lineage 2 (e.g. haplotypes ITSA-7, 9, 11–16). This difference might reflect the different modes of reproduction of *T. atra* and *R. farinacea*, sexual and asexual, respectively. However, the presence of diverse and in some cases shared (e.g. ITSA-3 and 5) haplotypes in *T. grumosa*, which is closely related to *T. atra*, suggests an alternative explanation since *T. grumosa* reproduces asexually.

Most of the sequences shown in Figs 2 and 3 were from lichens collected in Mediterranean regions, with TR1 being more widespread than TR9. In the case of TR1, the same algal genotypes are found in association with taxonomically different fungi whose habitats have a preferred Mediterranean distribution (e.g. ITSA-1, ITSA-2, and ITSA-3 in Fig. 3). These observations, along with the physiological differences determined in the two phycobionts (Casano *et al.*, 2011; del Hoyo *et al.*, 2011), are consistent with an eco-physiological adaptation to Mediterranean conditions. Associations of phycobionts enclosed in particular algal clades with taxonomically different but ecologically similar lichens also have been



observed in *Asterochloris* algae (Peksa & Skaloud, 2011). These associations include two distinct genera (*Lepraria* and *Setereocaulon*) belonging to a single family (*Stereocaulaceae*). In the present work, the same phycobionts were found to be shared in several distinct genera from five distinct families (*Lecanoraceae*, *Parmeliaceae*, *Physciaceae*, *Ramalinaceae*, and *Tephromelataceae*).

Experimental evidence indicates that the lichen association between photobionts and mycobionts increases tolerance to stress conditions (Kranner *et al.*, 2005; Kosugi *et al.*, 2009; Catalá *et al.*, 2010). By changing the composition (qualitatively and quantitatively) of their algal partners, lichenized fungi may expand their ability to adapt to a broad range of ecological conditions. Sun & Friedmann (2005) noted that the ratio of consumer (fungi) vs. producer (algae) can be adjusted depending on the climatic conditions. According to their 'community adaptation hypothesis', the temperature of the habitat correlates with a higher proportion of producers to account for the respiration of both partners. Apart from this mode of adaptation, there is some evidence that widely distributed lichens can adjust their algal partner according to their presence in different habitats, following the concept of 'habitat-adapted symbiosis' (Rodríguez *et al.*, 2008). For example, *L. rupicola* has different photobiont species in alpine vs. Mediterranean habitats (Blaha *et al.*, 2006), and a similar situation was shown to occur in *Lecidea fuscoatra* (unpublished results). Our results suggest a third possibility of adaptation, in which physiologically distinct strains of the same or sister species are present in the same thallus. Whether two or perhaps more *Trebouxia* species coexist in the same lichen thallus in other lichen taxa remains the subject of further studies using approaches similar to those applied in *R. farinacea*. Additional physiological studies are also necessary to confirm our hypothesis that the coexistence of physiologically complementary photobionts within the same lichen thallus increases tolerance to changing and often stressful environments. Another question that remains to be answered is whether the proportion of these strains varies according to the ecological conditions.

Finally, it will be of interest to determine whether the ecological diversification and speciation of lichen symbionts in the different habitats includes a transient phase, consisting of associations between more than one phycobiont in individual thalli. Alternatively, the coexistence of multiple phycobionts may be crucial for increasing eco-physiological fitness under changing environments and therefore might be the rule in lichens living on a wide variety of substrata and in diverse habitats. These considerations along with the results of this study suggest that the coexistence of at least two physiologically different *Trebouxia* strains or species within the same lichen thallus

is a not uncommon occurrence, even though the relative abundance of strains may vary substantially in different species or ecological settings.

## Acknowledgements

This study was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2009-13429-C02-01/02), the AECID (PCI\_A\_I024755/09), and the Generalitat Valenciana (PROMETEO 174/2008 GVA).

## References

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Barreno E (2004) Hongos simbiotes: Líquenes, Micoficobiosis y Micorrizas. *Botánica* (Izco J, ed.), pp. 309–340. MacGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- Beiggi S & Piercey-Normore MD (2007) Evolution of ITS ribosomal RNA secondary structures in fungal and algal symbionts of selected species of *Cladonia* sect. *Cladonia* (Cladoniaceae, Ascomycotina). *J Mol Evol* **64**: 528–542.
- Blaha J, Baloch E & Grube M (2006) High photobiont diversity associated with the euryoecious lichen-forming ascomycete *Lecanora rupicola* (Lecanoraceae, Ascomycota). *Biol J Linn Soc* **88**: 283–293.
- Buschbom J & Mueller GM (2006) Testing "species pair" hypotheses: evolutionary processes in the lichen-forming species complex *Porpidia flavocorescens* and *Porpidia melinodes*. *Mol Biol Evol* **23**: 574–586.
- Casano LM, del Campo EM, Garcia-Breijo FJ, Reig-Armiñana J, Gasulla F, Del Hoyo A, Guera A & Barreno E (2011) Two *Trebouxia* algae with different physiological performances are ever-present in lichen thalli of *Ramalina farinacea*. Coexistence versus competition? *Environ Microbiol* **13**: 806–818.
- Cassie DM & Piercey-Normore MD (2008) Dispersal in a sterile lichen-forming fungus, *Thamnia subuliformis* (Ascomycotina: Icmadophilaceae). *Botany* **86**: 751–762.
- Catalá M, Gasulla F, Pradas del Real AE, Garcia-Breijo F, Reig-Armiñana J & Barreno E (2010) Fungal-associated NO is involved in the regulation of oxidative stress during rehydration in lichen symbiosis. *BMC Microbiol* **10**: 297.
- Cenis JL (1992) Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res* **20**: 2380.
- Chapman MJ & Margulis L (1998) Morphogenesis by symbiogenesis. *Int Microbiol* **1**: 319–326.
- Clement M, Posada D & Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* **9**: 1657–1659.
- Cordeiro LMC, Reis RA, Cruz LM, Stocker-Wögöter E, Grube M & Iacomini M (2005) Molecular studies of photobionts of selected lichens from the coastal vegetation of Brazil. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 381–390.

- Cote CA, Greer CL & Peculis BA (2002) Dynamic conformational model for the role of ITS2 in pre-rRNA processing in yeast. *RNA* **8**: 786–797.
- Crespo A & Pérez-Ortega S (2009) Cryptic species and species pairs in lichens: a discussion on the relationship between molecular phylogenies and morphological characters. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **66S1**: 71–81.
- del Campo EM, Gimeno J, De Nova JPG, Casano LM, Gasulla F, García-Breijo F, Reig-Armiñana J & Barreno E (2010) South European populations of *Ramalina farinacea* (L.) Ach. share different *Trebouxia* algae. *Together and Separate: The Lives of the Lichen Symbionts* (Nash TH, ed.), pp. 1–2. J. Cramer in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- del Hoyo A, Álvarez R, del Campo EM, Gasulla F, Barreno E & Casano LM (2011) Oxidative stress induces distinct physiological responses in the two *Trebouxia* phycobionts of the lichen *Ramalina farinacea*. *Ann Bot* **107**: 109–118.
- Doering M & Piercey-Normore MD (2009) Genetically divergent algae shape an epiphytic lichen community on Jack Pine in Manitoba. *Lichenologist* **41**: 69–80.
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* **32**: 1792–1797.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.
- Fernández-Palacios JM, de Nascimento L, Rüdiger O, García-del-Rey E, Arévalo JR & Whittaker RJ (2011) A reconstruction of Palaeo-Macaronesia, with particular reference to the long-term biogeography of the Atlantic island laurel forests. *J Biogeogr* **38**: 226–246.
- Gardes M & Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* **2**: 113–118.
- Gilbert SF, McDonald E, Boyle N, Buttino N, Gyi L, Mai M, Prakash N & Robinson J (2010) Symbiosis as a source of selectable epigenetic variation: taking the heat for the big guy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**: 671–678.
- Gouy M, Guindon S & Gascuel O (2010) SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* **27**: 221–224.
- Grube M (2010) Die Hard: *Lichens. Symbioses and Stress* (Seckbach J & Grube M, eds), pp. 509–523. SpringerLink, Dordrecht-Heidelberg.
- Grube M & Berg G (2009) Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biol Rev* **23**: 72–85.
- Grube M & Muggia L (2010) Identifying algal symbionts in lichen symbioses. *Tools for Identifying Biodiversity: Progress and Problems* (Nimis PL & Vignes Lebbe R, eds), pp. 295–299. Edizioni Università di Trieste, Trieste.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**: 95–98.
- Heled J & Drummond AJ (2010) Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Mol Biol Evol* **27**: 570–580.
- Helms G, Friedl T, Rambold G & Mayrhofer H (2001) Identification of photobionts from the lichen family *Physciaceae* using algal-specific ITS or rDNA sequencing. *Lichenologist* **33**: 73–86.
- Honegger R (1991) Fungal evolution: symbiosis and morphogenesis. *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation* (Margulis L & Fester R, eds), pp. 319–340. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts.
- Hudson RR, Boos DD & Kaplan NL (1992) A statistical test for detecting geographic subdivision. *Mol Biol Evol* **9**: 138–151.
- Joseph N, Krauskopf E, Vera MI & Michot B (1999) Ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Res* **27**: 4533–4540.
- Kelly LJ, Hollingsworth PM, Coppins BJ, Ellis CJ, Harrold P, Tosh J & Yahr R (2011) DNA barcoding of lichenized fungi demonstrates high identification success in a floristic context. *New Phytol* **191**: 288–300.
- Kosugi M, Arita M, Shizuma R, Moriyama Y, Kashino Y, Koike H & Satoh K (2009) Responses to desiccation stress in lichens are different from those in their photobionts. *Plant Cell Physiol* **50**: 879–888.
- Kranner I & Lutzoni F (1999) Evolutionary consequences of transition to a lichen symbiotic state and physiological adaptation to oxidative damage associated with poikilohydry. *Plant Responses to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization* (Lerner HR, ed.), pp. 591–628. M. Dekker, New York.
- Kranner I, Cram WJ, Zorn M, Wornik S, Yoshimura I, Stabentheiner E & Pfeifhofer HW (2005) Antioxidants and photoprotection in a lichen as compared with its isolated symbiotic partners. *P Natl Acad Sci USA* **102**: 3141–3146.
- Krog H & Osthagen H (1980) The genus *Ramalina* in the Canary Islands. *Norw J Bot* **27**: 255–296.
- Kroken S & Taylor JW (2000) Phylogenetic species, reproductive mode, and specificity of the green alga *Trebouxia* forming lichens with the fungal genus *Letharia*. *Bryologist* **103**: 645–660.
- Librado P & Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**: 1451–1452.
- Mai JC & Coleman AW (1997) The internal transcribed spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. *J Mol Evol* **44**: 258–271.
- Margulis L & Barreno E (2003) Looking at lichens. *Bioscience* **53**: 776–778.
- Matzura O & Wennborg A (1996) RNAdraw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows. *Bioinformatics* **12**: 247–249.
- Muggia L, Grube M & Tretiach M (2008) Genetic diversity and photobiont associations in selected taxa of the *Tephromela atra* group (Lecanorales, lichenised Ascomycota). *Mycol Prog* **7**: 147–160.
- Muggia L, Zellnig G, Rabensteiner J & Grube M (2010) Morphological and phylogenetic study of algal partners

- associated with the lichen-forming fungus *Tephromela atra* from the Mediterranean region. *Symbiosis* **51**: 149–160.
- Nelsen MP & Gargas A (2008) Dissociation and horizontal transmission of codispersing lichen symbionts in the genus *Lepraria* (Lecanorales: Stereocaulaceae). *New Phytol* **177**: 264–275.
- Paracer S & Ahmadian V (2000) *Symbiosis: An Introduction to Biological Associations*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Pauplin Y (2000) Direct calculation of a tree length using a distance matrix. *J Mol Evol* **51**: 41–47.
- Peksa O & Skaloud P (2011) Do photobionts influence the ecology of lichens? A case study of environmental preferences in symbiotic green alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae). *Mol Ecol* **20**: 3936–3948.
- Piercey-Normore MD (2006) The lichen-forming ascomycete *Evernia mesomorpha* associates with multiple genotypes of *Trebouxia jamesii*. *New Phytol* **169**: 331–344.
- Piercey-Normore MD & Deduke C (2011) Fungal farmers or algal escorts: lichen adaptation from the algal perspective. *Mol Ecol* **20**: 3708–3710.
- Posada D (2009) Selection of models of DNA evolution with jModelTest. *Methods Mol Biol* **537**: 93–112.
- Rambaut A (2008) *FigTree: Tree Figure Drawing Tool Version 1.3.1 2006–2009*, Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/>.
- Rodriguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim YO & Redman RS (2008) Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *ISME J* **2**: 404–416.
- Romeike J, Friedl T, Helms G & Ott S (2002) Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (Lichenized Ascomycetes) along a transect of the Antarctic peninsula. *Mol Biol Evol* **19**: 1209–1217.
- Rosenberg E & Zilber-Rosenberg I (2011) Symbiosis and development: the hologenome concept. *Birth Defects Res C* **93**: 56–66.
- Schmull M, Miadlikowska J, Pelzer M, *et al.* (2011) Phylogenetic affiliations of members of the heterogeneous lichen-forming fungi of the genus *Lecidea* sensu Zahlbruckner (Lecanoromycetes, Ascomycota). *Mycologia* **103**: 983–1003.
- Schultz J, Maisel S, Gerlach D, Muller T & Wolf M (2005) A common core of secondary structure of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) throughout the Eukaryota. *RNA* **11**: 361–364.
- Skaloud P & Peksa O (2010) Evolutionary inferences based on ITS rDNA and actin sequences reveal extensive diversity of the common lichen alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Mol Phylogenet Evol* **54**: 36–46.
- Sun HJ & Friedmann EI (2005) Communities adjust their temperature optima by shifting producer-to-consumer ratio, shown in lichens as models: II. Experimental verification. *Microb Ecol* **49**: 528–535.
- Swofford DL (2003) *PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other Methods), Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Toniolo D, Meiss HK & Basilico C (1973) A temperature-sensitive mutation affecting 28S ribosomal RNA production in mammalian cells. *P Natl Acad Sci USA* **70**: 1273–1277.
- Werth S & Sork VL (2010) Identity and genetic structure of the photobiont of the epiphytic lichen *Ramalina menziesii* on three oak species in southern California. *Am J Bot* **97**: 821–830.
- White TJ, Bruns T, Lee S & Taylor JW (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ, eds), pp. 315–322. Academic Press, Inc, New York.
- Whittaker RJ, Ladle RJ, Araújo MB, Fernández-Palacios JM, Delgado JD & Arévalo JR (2007) The island immaturity – alternative to the “diversity begets diversity” model. *Ecography* **30**: 321–327.
- Wornik S & Grube M (2010) Joint dispersal does not imply maintenance of partnerships in lichen symbioses. *Microb Ecol* **59**: 150–157.
- Yahr R, Vilgalys R & DePriest PT (2004) Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia* lichens. *Mol Ecol* **13**: 3367–3378.
- Yahr R, Vilgalys R & DePriest PT (2006) Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (Cladoniaceae) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New Phytol* **171**: 847–860.
- Yeh LC & Lee JC (1990) Structural analysis of the internal transcribed spacer 2 of the precursor ribosomal RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **211**: 699–712.
- Zoller S & Lutzoni F (2003) Slow algae, fast fungi: exceptionally high nucleotide substitution rate differences between lichenized fungi *Omphalina* and their symbiotic green algae *Coccomyxa*. *Mol Phylogenet Evol* **29**: 629–640.

# Newly identified LAGLIDADG homing endonucleases in the chloroplast LSU rDNA of *Coccomyxa* algae

R. Álvarez<sup>1</sup>, A. del Hoyo<sup>1</sup>, L.M. Casano<sup>1</sup>, E. Barreno<sup>2</sup> and E.M. del Campo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Biology, University of Alcalá, 28871, Alcalá de Henares (Madrid), Spain

<sup>2</sup> ICBIBE, Department of Botany, University of Valencia, Faculty of Biology, C/ Dr. Moliner 50. 46100, Burjassot (Valencia), Spain

Homing endonucleases (HEs) are enzymes that invade specific insertion sites by generating double-strand breaks on the targeted gene. The insertion process results in HE duplication into recipient alleles of host genes lacking such a sequence. This enzymatic activity involves site-specific recombination events that can be exploited for the correction of DNA sequences in biotechnological and medical applications. The chloroplast-encoded large-subunit ribosomal RNA gene of lichen-forming algae belonging to the *Trebouxia* genus has diverse group I introns, which encode for LAGLIDADG-HEs. To search for new HEs, we explored the presence of group I introns in the same gene in both lichen-forming and free-living algae belonging to the *Coccomyxa* genus. Preliminary results indicated the presence of a relatively high number of group I introns in the analyzed specimens. Most of these introns showed ORFs encoding putative LAGLIDADG homing endonucleases. A number of these HEs seemed to be homodimers since they had a single LAGLIDADG motif, whereas others seemed to be monomers since they had two of these motifs. Group I introns in *Coccomyxa* algae were similar to those previously found in *Trebouxia* algae, but HEs had generally more amino acids residues. These findings reveal that lichen-forming algae are potential sources of new endonucleases that can be engineered to modify specific targets of interest.

**Keywords:** *Coccomyxa*; homing endonuclease; group I intron; lichen; LAGLIDADG; chloroplast; LSU rDNA

## 1. Introduction

Homing endonucleases (HEs) are encoded within homing endonuclease genes (HEGs), which are mobile DNA elements that propagate by catalyzing a double-strand break into alleles lacking the sequence. This process is termed homing [1]. Homing endonucleases, can be divided into five families based on sequence and structure motifs: LAGLIDADG, GIY-YIG, HNH, His-Cys box and PD-(D/E)XK [2, 3]. The LAGLIDADG family of homing endonucleases includes the highest number of these enzymes and is the most extensively studied and exploited for gene targeting applications. The name of this family derives from a consensus sequence known as the LAGLIDADG motif that is the only conserved sequence. The members of this family are primarily encoded within archaea and in the chloroplast and mitochondrial genomes of algae and fungi [4, 5]. LAGLIDADG proteins are generally encoded within introns or inteins although freestanding members also exist. LAGLIDADG endonucleases exist both as monomers and homodimers having single and two LAGLIDADG domains, respectively. Monomeric HEs have two LAGLIDADG domains in a tandem repeat connected by a variable peptide linker and can recognize fully asymmetric DNA target sites [6]. It has been estimated that LAGLIDADG proteins specifically recognize a DNA sequence ranging from 14 to 40 base pairs in length whose individual halves contact to the two corresponding protein domains or subunits. Generally, LAGLIDADG proteins display high fidelity at many of the base pair positions in their target sites [7]. However, they tolerate some individual base variations at their homing site, ensuring their mobility despite sequence drift of their target site [8]. The crystal structures of both homodimeric and monomeric members of the LAGLIDADG protein family reveal a similar curvature of their DNA substrate and a well conservation of protein canonical folds [8]. The extended  $\beta$ -sheet topology for protein-DNA interactions provides certain flexibility by allowing for low fidelity at some positions in the interface, but maintain an overall high level of specificity due to the length of the DNA substrate [7]. The members of this family are primarily encoded within archaea and in the chloroplast and mitochondrial genomes of algae and fungi being identified in a wide variety of organisms [4, 5]. However, there are very few studies focusing on these kinds of enzymes in lichen-forming phycobionts except for some *Trebouxia* algae [9, 10] that are obligate symbionts of most lichens and are rarely found free-living. In this study we investigated the occurrence of group I introns within the chloroplast LSU rDNA in *Coccomyxa* algae, which are known in both ascolichens and basidiolichens or free-living. Our interest was focused on a search for new HEs with new properties and for possible different distribution patterns of introns and HEs within them in relation to phylogenetic relationships and lifestyle of *Coccomyxa* and *Trebouxia* algae.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Biological material

The *Coccomyxa* algae used in this work were cultured in axenic conditions after their acquisition from Sammlung von Algenkulturen at Universitat Gottingen (Germany) (see Fig. 1 for strains). Organisms were cultured in Bold 3N medium [11] in a growth chamber in white light ( $25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) at  $15^\circ\text{C}$ , under 14 h/10 h light/dark cycles.

### 2.2. Nucleic acid extraction and purification and PCR amplification

Total DNA was isolated from each *Trebouxia* algae following the procedure of Cenis (1992) [12]. DNA was amplified by PCR with specific primers under the following cycling conditions: one cycle at  $94^\circ\text{C}$  for 2 min; 30 cycles of  $94^\circ\text{C}$  for 30 s,  $55^\circ\text{C}$  for 30 s and extension at  $72^\circ\text{C}$  for 2 min. These cycles were followed by a final extension step at  $72^\circ\text{C}$  for 7 min. Amplification products were subjected to electrophoresis through 1.5% agarose gels, purified with a DNA gel extraction kit (Qiaex II; Qiagen GmbH, Hilden Germany) and directly sequenced by using the Big Dye™ Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit II (Applied Biosystems Co. Foster City, CA, USA). The obtained reaction products were separated by automated multicapillary electrophoresis and further analyzed on an ABI Prism 3730 Genetic Analyser (Applied Biosystems Co.).

### 2.3. Phylogenetic analyses

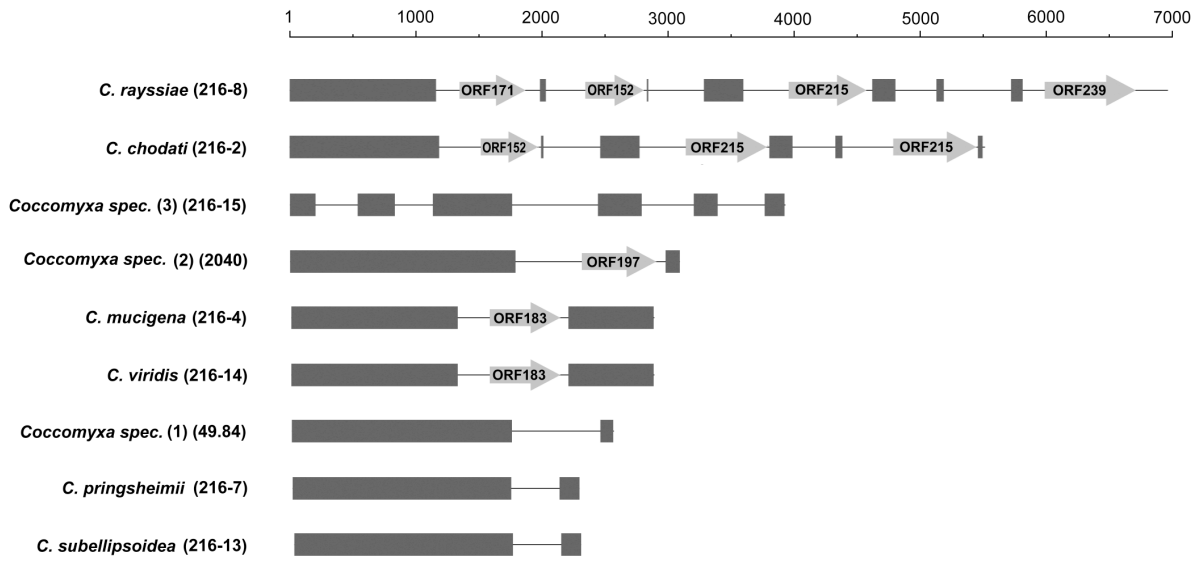
Sequences were aligned with Muscle 3.6 [13] as implemented by SeaView v4 [14] and then adjusted with BioEdit 7.0 [15]. For constructing “host” phylogenies of *Coccomyxa* based on LSU rDNA sequences, a total of 1014 nucleotide sites were included resulting in a total of 349/229 variable/parsimony-informative sequence positions. The data set for constructing phylogenies of HEs included 68 taxa and 189 characters resulting in a total of 180/161 variable/parsimony-informative sequence positions. All data sets were subjected to maximum-likelihood (ML), maximum-parsimony (MP) and distance analyses using Seaview v4 [14] and PAUP 4.0b10 [16], obtaining similar topologies. Likelihood settings corresponded to the SYM model for phylogenies based on the chloroplast LSU rDNA and Bolsum62 for phylogenies based on HEs as derived from JModeltest [17] and Prottest [18], respectively. MP analyses were also performed via quartet puzzling analysis obtaining values of 0.79 and 0.52 for the Consistency Index (CI) for phylogenies derived from nucleotide sequences of the LSU rDNA or amino acid sequences of HEs, respectively. Distance analyses were done by using the neighbour-joining method [19]. Bootstrap probabilities [20] were calculated to estimate the robustness of the clades from 100 replicates of the data.

## 3. Results and Discussion

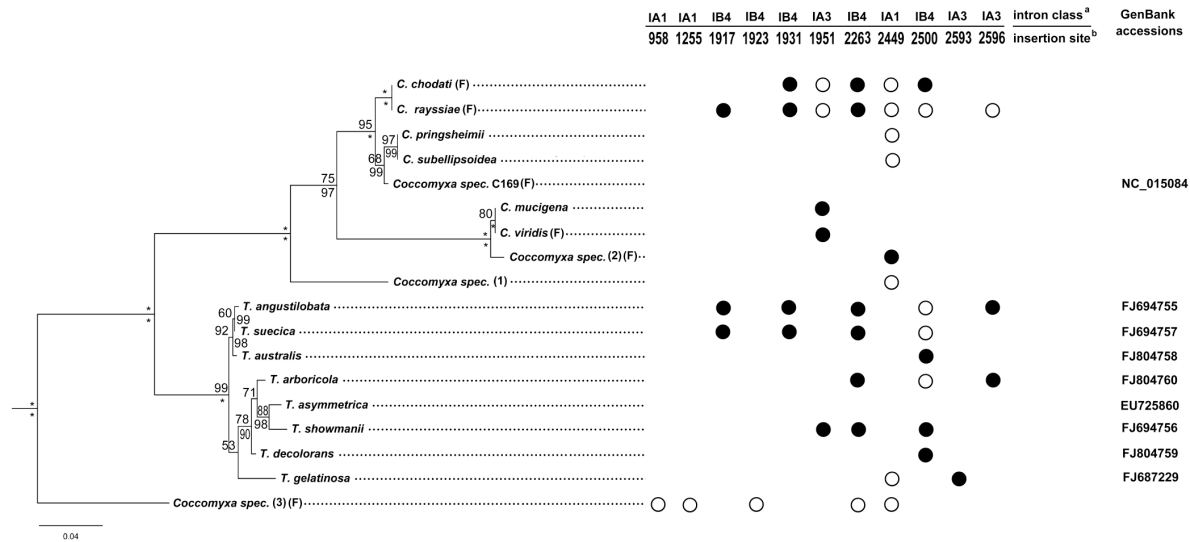
### 3.1. Diversity of group I introns within the LSU rDNA of *Coccomyxa* algae

In this study, we amplified a region of the gene spanning from position 765 to 2596 in *Escherichia coli* LSU rDNA in nine *Coccomyxa* species (Fig. 1). The lengths of the obtained sequences were very variable ranging from c.a. 2.0 Knt in *C. pringsheimii* and *C. subellipsoidea* to c.a. 7.0 Knt in *C. rayissiae* as consequence of the presence of a total of twenty-one different group I introns. All them, depicted in Fig. 1, seemed to belong to group I (Fig. 2) since they had base-paired stems P3, P4, P5, P6, P7 and P8 along with canonical conserved sequences P, Q, R and S, which are typical of group I subgroups IA and IB [21]. Only three of these introns found in *Coccomyxa* sp. (3) inserted at positions 958, 1255 and 1923 were not reported for any lichen-forming algae but they have been found in some *Chlamydomonas* species [22].

To study intron distribution in relation to host evolution based on the LSU rDNA, we constructed the phylogeny shown in Fig. 2. The depicted tree shows two separate main clades supported by high bootstrap values (100): Clade 1 including all *Trebouxia* species and clade 2 including all *Coccomyxa* species except *Coccomyxa* sp. (3), which was not included in any of the two main clades. It is noteworthy that there was not a phylogenetic differentiation between lichen-forming and free-living *Coccomyxa* algae. Similarly, the presence/absence and distribution of group I introns within the chloroplast LSU rDNA of *Coccomyxa* phycobionts did not depend on whether the host is a free-living or lichen-forming algae.



**Fig. 1** Genetic map of the sequenced portion of plastid LSU rDNA. Dark grey boxes represent exons. Introns are depicted as grey thin lanes. Open Reading Frames (ORFs) are depicted as light grey arrows within introns. Strain numbers from “Sammlung von Algenkulturen at Universität Gottingen (Germany) (SAG)” are indicated in parentheses at the right of each organism name.



**Fig. 2** Phylogram based on chloroplast LSU rDNA sequence analysis (without introns). Values above branches indicate bootstrap values (100 replicates). Asterisks indicate bootstrap values of 100. Values under branches correspond to posterior probabilities inferred with a MP method. The scale bar indicates the inferred number of substitutions per site. Introns are mapped onto the host phylogeny either as empty circles, those without ORFs, or as filled circles, those encoding putative HEs. The sequences of *Trebouxia* species were already published [10] as well as of *Coccomyxa sp. C-169* [33]. This phylogeny included two species of the *Chlamydomonas* genus (Chlorophyceae) as outgroup (*C. reinhardtii*, accession NC\_005353 and *C. gelatinosa*, accession Z15151). Organism names followed by (F) are free-living. Intron classification was carried out according to [21].

### 3.2. LAGLIDADG-Homing endonucleases encoded within group I introns in the LSU rDNA of *Coccomyxa* algae

After sequencing of a total of twenty-one group I introns, we searched for open reading frames (ORFs) encoding putative homing endonucleases. Results indicated that nine of the studied introns could encode for HEs (Figs. 1 and 2): introns inserted at positions 1917, 1931, 1951, 2263, 2500 and 2596. All of these putative proteins showed at least one LAGLIDADG motif characteristic of the HEs involved in intron mobility, which were identified by using Pfam v21.10 [23] and Blast [24]. In the *Coccomyxa* algae of the present study several putative HEs had two LAGLIDADG motifs (I-CchII, I-CchIII, I-CraIII, I-CraIV and I-CspI) and more than 200 amino acids except I-CspI with 197 amino acids. HEs encoded within introns inserted at position 1931, I-CchI and I-CraII from *C. chodati* and *C. rayissiae* respectively, were shorter with 152 amino acids. These HES were of identical length and very similar to I-CpaI, which is a HE encoded within an intron inserted at the same position in *Chlamydomonas pallidostigmatica* [25, 26]. I-CmuI from *C. mucingena*, which is encoded by an intron inserted at position 1951, is unusually larger with a length of 183 amino acids in comparison to other known HEs encoded by introns inserted at the same site [10, 26]. Table 1 summarizes properties of HEs calculated by using the Using ProtParam [27]. The entire studied HEs were small basic proteins with molecular weights ranging from c.a. 18 to 27 kDa and their isoelectric point was around 9-10. The aliphatic index, which increases the thermostability of globular proteins, had three different groups of values: around 60 (I-CspI), 75 (I-CmuI and I-CraIV) and 80-85 (I-CraI, I-CchI, I-CraII, I-CchII, I-CraIII and I-CchIII). These proteins had a high relative percentage of positively charged amino acids at neutral pH, which is consistent with their binding to the negatively charged DNA.

Table 1. Predicted features of HEs encoded within group I introns in the plastid LSU rDNA of *Coccomyxa* species.

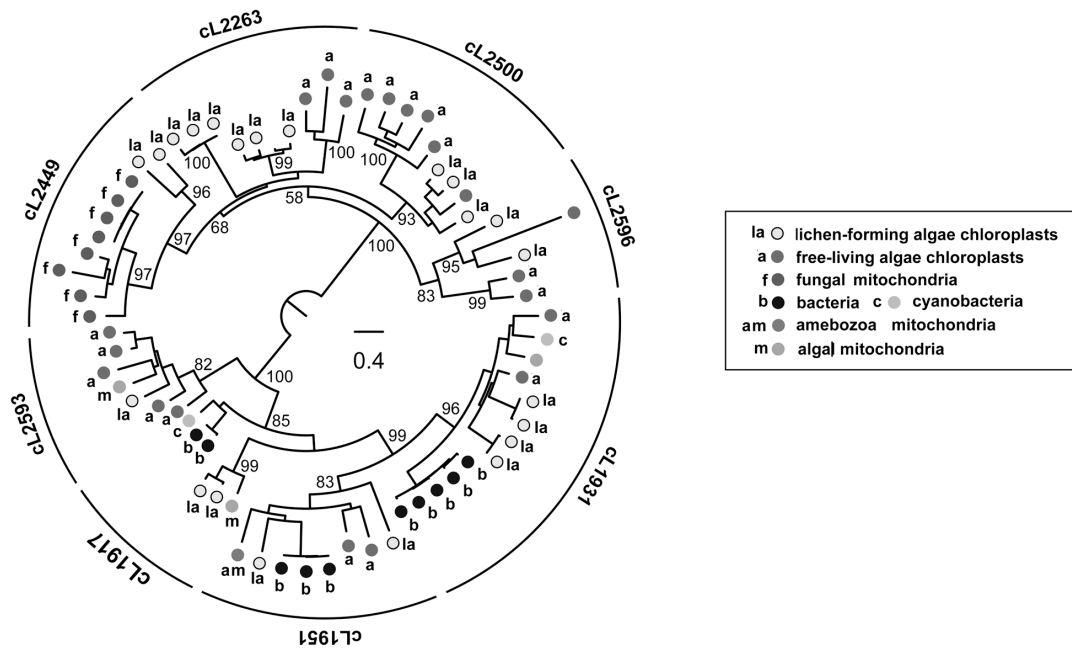
Intron name	HE name <sup>a</sup>	HE size (aa) <sup>b</sup>	Mw <sup>c</sup>	pI <sup>d</sup>	aa(-) <sup>d</sup>	aa(+) <sup>e</sup>	Hidropathicity (GRAVY)	Aliphatic Index	LAGLIDADG family
Cra.cL1917	I-CraI	171	20.0	10.00	18	30	-0.435	79.71	1
Cch.cL1931	I-CchI	152	17.6	10.08	15	24	-0.400	84.54	1
Cra.cL1931	I-CraII	152	17.6	10.08	15	24	-0.418	83.22	1
Cmu.cL1951	I-CmuI	183	21.4	9.42	22	33	-0.534	74.54	1
Cch.CL2263	I-CchII	215	24.5	9.55	23	33	-0.418	87.07	2
Cra.cL2263	I-CraIII	215	24.5	9.63	22	33	-0.394	88.88	2
Csp2.cL2449	I-CspI	197	22.6	8.95	27	31	-0.875	61.42	2
Cch.cL2500	I-CchIII	215	24.6	9.55	18	29	-0.367	86.14	2
Cra.cL2596	I-CraIV	239	26.7	9.27	23	29	-0.432	76.19	2

<sup>a</sup>Nomenclature of Homing Endonucleases according to [34]. <sup>b</sup>aa: amino acids. <sup>c</sup>Mw: molecular weight; <sup>d</sup>pI: theoretical isoelectric point. <sup>e</sup>aa(-): number of negatively charged amino acids; <sup>e</sup>aa(+): number of positively charged amino acids. Properties are predicted according to [27].

### 3.3. LAGLIDADG-Homing endonucleases encoded within group I introns in the LSU rDNA from *Coccomyxa* algae are related to phylogenetically distant organisms

To study the phylogenetic relationships among HEs from *Coccomyxa* algae with those from other organisms, we performed BLAST searches against CNBI protein databases and selected the most similar sequences. The tree of Fig. 3 shows two separate main clades supported by high bootstrap values (100). These two clades included HEs either with a single (clade 1) or two LAGLIDADG (clade 2). The HEs included in both clades were from diverse sources: chloroplasts of both lichen-forming and free-living green algae; mitochondria from green algae, fungi and amoebas; prokaryotes such as bacteria including cyanobacteria. These findings are consistent with the hypothesis of horizontal transmissions of these genetic elements among green algae and bacteria [9, 28, 29] and among fungi and algae [9]. The biological connections among these organisms are evident if we consider the diversity of lichen symbioses. Approximately 18.800 species of fungi are involved in lichen associations, which include green algae and/or cyanobacteria as photobionts [30]. The presence of non-photosynthetic bacteria has also been detected in lichen thalli e.g. [31, 32].

Results of this study reinforce our initial hypothesis of the symbiogenetic thalli of some lichens as a possible scenario for horizontal transfer of genetic material among distantly related organisms [9] and shows *Coccomyxa* algae as potential source of new LAGLIDADG homing endonucleases.



**Fig. 3** Phylogram based on proteins encoded by ORFs found within introns. The analysis of HE encoded within the introns inserted at positions 1917, 1931, 1951, 2263, 2449, 2500 2593 and 2596 included 60 taxa and 189 aligned amino acid positions. Lines around the tree denote groups that share insertion positions in the LSU rDNA. Numerals indicate bootstrap values (100 replicates). The scale bar indicates the inferred number of substitutions per site.

**Acknowledgements** This study was funded by Comunidad de Madrid - Universidad de Alcalá (CCG10-UAH/GEN-5904), the Spanish Ministry of Science and Innovation (CGL2009-13429-C02-01/02) and the Generalitat Valenciana (PROMETEO 174/2008 GVA).

## References

- [1] Chevalier B, Stoddard BL. Homing endonucleases: structural and functional insight into the catalysts of intron/intein mobility. *Nucleic acids research*. 2001;29:3757-3774.
- [2] Orłowski J, Boniecki M, Bujnicki JM. I-Ssp68031: the first homing endonuclease from the PD-(D/E)XK superfamily exhibits an unusual mode of DNA recognition. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2007;23:527-530.
- [3] Zhao L, Bonocora RP, Shub DA, Stoddard BL. The restriction fold turns to the dark side: a bacterial homing endonuclease with a PD-(D/E)-XK motif. *The EMBO journal*. 2007;26:2432-2442.
- [4] Dalgaard JZ, Klar AJ, Moser MJ, Holley WR, Chatterjee A, Mian IS. Statistical modeling and analysis of the LAGLIDADG family of site-specific endonucleases and identification of an intein that encodes a site-specific endonuclease of the HNH family. *Nucleic acids research*. 1997;25:4626-4638.
- [5] Sethuraman J, Majer A, Friedrich NC, Edgell DR, Hausner G. Genes within genes: multiple LAGLIDADG homing endonucleases target the ribosomal protein S3 gene encoded within an rnl group I intron of *Ophiostoma* and related taxa. *Molecular biology and evolution*. 2009;26:2299-2315.
- [6] Stoddard BL. Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Structure (London, England : 1993)*. 2011;19:7-15.
- [7] Scalley-Kim M, McConnell-Smith A, Stoddard BL. Coevolution of a homing endonuclease and its host target sequence. *Journal of Molecular Biology*. 2007;372:1305-1319.
- [8] Chevalier B, Turmel M, Lemieux C, Monnat RJ, Stoddard BL. Flexible DNA target site recognition by divergent homing endonuclease isoschizomers I-CreI and I-MsoI. *Journal of Molecular Biology*. 2003;329:253-269.
- [9] Del Campo EM, Casano LM, Gasulla F, Barreno E. 23S rRNAs of lichen-forming *Trebouxia* have multiple group I introns closely related to bacteria and fungi. 2009;12:59-67.



- [10] Del Campo EM, Casano LM, Gasulla F, Barreno E. Suitability of chloroplast LSU rDNA and its diverse group I introns for species recognition and phylogenetic analyses of lichen-forming Trebouxia algae. *Molecular phylogenetics and evolution*. 2010;54:437-444.
- [11] Bold HCParker BC. Some supplementary attributes in the classification of Chlorococcum species. *Archiv fur Mikrobiologie*. 1962;42:267-288.
- [12] Ceniz JL. Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic acids research*. 1992;20:2380.
- [13] Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*. 2004;32:1792-1797.
- [14] Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution*. 2010;27:221-224.
- [15] Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. 1999;41:95-98.
- [16] Swofford DL. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 2003;
- [17] Posada D. Selection of models of DNA evolution with jModelTest. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. 2009;537:93-112.
- [18] Abascal F, Zardoya R, Posada D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2005;21:2104-2105.
- [19] Saitou NNei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*. 1987;4:406-425.
- [20] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. 1985;39:783-791.
- [21] Michel FWesthof E. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *Journal of Molecular Biology*. 1990;216:585-610.
- [22] Spiegel PC, Chevalier B, Sussman D, Turmel M, Lemieux C, Stoddard BL. The structure of I-CeuI homing endonuclease: Evolving asymmetric DNA recognition from a symmetric protein scaffold. *Structure (London, England : 1993)*. 2006;14:869-880.
- [23] Finn RD, Mistry J, Schuster-Bockler B, Griffiths-Jones S, Hollich V, Lassmann T, Moxon S, Marshall M, Khanna A, Durbin R, Eddy SR, Sonnhammer EL, Bateman A. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic acids research*. 2006;34:D247-51.
- [24] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*. 1997;25:3389-3402.
- [25] Turmel M, Otis C, Cote V, Lemieux C. Evolutionarily conserved and functionally important residues in the I-CeuI homing endonuclease. *Nucleic acids research*. 1997;25:2610-2619.
- [26] Lucas P, Otis C, Mercier JP, Turmel M, Lemieux C. Rapid evolution of the DNA-binding site in LAGLIDADG homing endonucleases. *Nucleic acids research*. 2001;29:960-969.
- [27] Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM, eds. *The proteomics protocols handbook*. Totowa, N.J.: Humana Press;2005:571-607.
- [28] Haugen P, Bhattacharya D, Palmer JD, Turner S, Lewis LA, Pryer KM. Cyanobacterial ribosomal RNA genes with multiple, endonuclease-encoding group I introns. *BMC evolutionary biology*. 2007;7:159.
- [29] Nesbo CLDoolittle WF. Active self-splicing group I introns in 23S rRNA genes of hyperthermophilic bacteria, derived from introns in eukaryotic organelles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:10806-10811.
- [30] Feuerer THawksworth DL. Biodiversity of lichens, including a world-wide analysis of checklist data based on Takhtajan's floristic regions. *Biodiversity and Conservation*. 2007;16:85-98.
- [31] Souza-Egipsy V, Wierzchos J, Garcia-Ramos JV, Ascaso C. Chemical and ultrastructural features of the lichenvolcanic/sedimentary rock interface in a semiarid region (Almeria, Spain). 2002;34:155-167.
- [32] Bates ST, Cropsey GW, Caporaso JG, Knight R, Fierer N. Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011;77:1309-1314.
- [33] Smith DR, Burki F, Yamada T, Grimwood J, Grigoriev IV, Van Etten JL, Keeling PJ. The GC-Rich Mitochondrial and Plastid Genomes of the Green Alga *Coccomyxa* Give Insight into the Evolution of Organelle DNA Nucleotide Landscape. *PLoS one*. 2011;6:e23624.
- [34] Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, Degtyarev SK, Dryden DT, Dybvig K, Firman K, Gromova ES, Gumpert RI, Halford SE, Hattman S, Heitman J, Hornby DP, Janulaitis A, Jeltsch A, Josephsen J, Kiss A, Klaenhammer TR, Kobayashi I, Kong H, Kruger DH, Lacks S, Marinus MG, Miyahara M, Morgan RD, Murray NE, Nagaraja V, Piekarczyk A, Pingoud A, Raleigh E, Rao DN, Reich N, Repin VE, Selker EU, Shaw PC, Stein DC, Stoddard BL, Szybalski W, Trautner TA, Van Etten JL, Vitor JM, Wilson GG, Xu SY. A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic acids research*. 2003;31:1805-1812.