Número VI

REVBIGO

Revista da Facultade de Bioloxía da Universidade de Vigo

Homenaxe a
Luís Freire

Actos de graduación
2013 e 2014

Actividades de
San Alberte

Traballos
Científico- Académicos

- 2014 -

REVBIGO

Revista da Facultade de Bioloxía da Universidade de Vigo
2014

Volume VI

HOMENAXE A LUÍS FREIRE

Universidade de Vigo
Facultade de Bioloxía

Esta publicación foi financiada con fondos procedentes da Facultade de Bioloxía da Universidade de Vigo.

REVBIGO

CONSELLO EDITORIAL

Mª Luisa Castro Cerceda	Profesora Titular da Área de Botánica. Dpto. de Bioloxía Vexetal e CC. do Solo.
Emilio Gil Martín	Profesor Titular da Área de Bioquímica. Dpto. de Bioquímica, Xenética e Inmunoloxía.
Fuencisla Mariño Callejo	Profesora Titular da Área de Zooloxía. Dpto. de Bioloxía Animal e Ecoloxía.
Manuel Megías Pacheco	Profesor Titular da Área de Bioloxía Celular. Dpto. de Bioloxía Funcional e CC. da Saúde.
Pilar Molist García	Profesora Titular da Área de Bioloxía Celular. Dpto. de Bioloxía Funcional e CC. da Saúde.
Manuel Ángel Pombal Diego	Profesor Titular da Área de Bioloxía Celular. Dpto. de Bioloxía Funcional e CC. da Saúde.
Jonatan Reboredo Durán	Graduado en Bioloxía

COLABORADORES

Aida García Molares	Profesora Titular da Área de Botánica. Dpto. de Bioloxía Vexetal e CC. do Solo.
África González Fernández	Catedrática da Área de Inmunoloxía. Dpto. de Bioquímica, Xenética e Inmunoloxía.
Almudena Fernández Briera	Catedrática da Área de Bioquímica. Dpto. de Bioquímica, Xenética e Inmunoloxía.
Carmen Sieiro Vázquez	Catedrática da Área de microbioloxía. Dpto. de Bioloxía Funcional e CC. da Saúde.
Carlos A. Canchaya Sánchez	Profesor Titular da Área de Xenética. Dpto. de Bioquímica, Xenética e Inmunoloxía.
David Posada González	Catedrático da Área de Xenética. Dpto. de Bioquímica, Xenética e Inmunoloxía.

Elena Benito Rueda	Profesora Titular da Área de Edafoloxía. Dpto. de Bioloxía Vexetale CC. do Solo.
Jesús M. Míguez Miramontes	Profesor Titular da Área de Fisioloxíar. Dpto. de Bioloxía Funcional e CC. da Saúde.
Josefina Garrido González	Profesora Titular da Área de Zooloxía. Dpto. de Bioloxía Animal e Ecoloxía.
Mercedes Gallardo Medina	Profesora Titular da Área de Fisioloxía Vexetal. Dpto. de Bioloxía Vexetale CC. do Solo.
Paloma Morán Martínez	Catedrática da Área de Xenética. Dpto. de Bioquímica, Xenética e Inmunoloxía.
Pedro Pablo Gallego Veiga	Profesor Titular da Área de Fisioloxía Vexetal. Dpto. de Bioloxía Vexetale CC. do Solo.

Enmaquetado:

Jonatan Reboredo Durán

Edita: Decanato da Facultade de Bioloxía

Jesús M. Míguez Miramontes	Decano
Mercedes Gallardo Medina	Vicedecana
Vicenta Martínez Zorzano	Vicedecana
Fuencisla Mariño Callejo	Vicedecana
Aida García Molares	Secretaria

ISSN:

Dep. Legal: **VG 647-2006**

Contidos

Novos tempos, novos retos 1

Homenaxe a Luís Freire 3

Acto de Graduación da Promoción 2009/2013
- Foto 6
- Discursos 6

Actividades de San Alberte 2013
- Conferencia Francisco Ayala 10
- Conferencia sobre Macromicología 11
- Exposición Macromicológica Otoño 13
- Concurso de Fotografía 14

Acto de Graduación da Promoción 2010/2014
- Foto 16
- Discurso 16

Cineforum Bioloxía 22

Delegación de Alumnos 23

Traballos Académicos
- Hipermutación somática: Una Visión Global. Alberto Bugallo 25
- Diseño de un museo virtual de zoología. Álvaro Castro 34
- Evolution of exonic and intronic regions in primates. Andrés A. Lanzós 43
- Interacción suelo- planta en cultivos de interés comercial. Laura Fernández 52
- Presencia de Melatonina en Alimentos de Origen Vegetal. Antía Verde 62
- Detección de NCAM y PSA como posibles biomarcadores de cáncer colorrectal. Jónatan Reboredo 72
- Actividad antimicrobiana de las Bacterias del Género *Pseudoalteromonas*. Fernando Mesías 82
- Puesta a punto de marcadores celulares para el estudio morfológico del bulbo olfativo humano. Elsa Núñez 88
- Identificación del sexo de trucha común migradora utilizando marcadores genéticos. Noemi González 97
- Aproveitamento micolóxico sostible nos montes comunais do Concello de Mos (Pontevedra). Jéssica Mª Urgal 105
- Cultivo de Caracoles cónidos (*Conus spp.*) Orientado a la explotación de las propiedades analgésicas de su veneno. Andrea Dieguez 114
- Plantas carnívoras: Populares, pero grandes desconocidas. Paula Estévez 119
- Artesanía con oro vegetal: "Carpim Dourado". Ana González 128
- Algas parásitas de metazoos. Rodrigo Rodríguez 134

NOVOS TEMPOS, NOVOS RETOS

Para un responsable dunha institución universitaria dedicada ao ensino da bioloxía, debe haber poucas tarefas tan xubilosas como a de oficiar o prólogo dunha revista que ten como un dos seus principais obxectivos servir para a publicación dos traballos académico-científicos elaborados polas alumnas e alumnos que se están formando na propia institución. Neste caso, trátase de poñer en marcha o número VI de REVBIGO, a revista académico-científica editada pola Facultade de Bioloxía da Universidade de Vigo. O nacemento da revista tivo lugar no ano 2006 auspiciada por unha experiencia piloto de adaptación ao Espazo Europeo de Educación Superior, na que participou o centro. Sen dúbida foi una iniciativa que acadou un notable éxito dando lugar nesa primera etapa a cinco volumes de edición anual (anos 2006 a 2010). A súa solvencia viuse ratificada tamén coas numerosas achegas realizadas polas alumnas e alumnos dos diferentes cursos da xa extinguida Licenciatura en Bioloxía.

Malia que manter esta iniciativa no tempo estivo na mente de moitos, as circunstancias académicas que aconteceron nos seguintes anos e os esforzos feitos no centro para adaptar as novas titulacions aos principios do Espazo Europeo de Educación Superior, relegaron ese obxectivo a un segundo plano, postergándose a reedición a ventos máis favorables. Con todo, mantense o dito de que "os ventos son mais favorables si se sabe a onde se quere ir". Tendo na mente que REVBIGO debe seguir sendo unha aposta decidida da nosa Facultade, un reflexo do noso xeito de traballar e de formar aos estudantes de bioloxía, iníciase agora unha segunda etapa da revista, máis elaborada si cabe e ó carón das novas tecnoloxías que permitirán incluír un número maior de traballos. A máis diso fará cobertura doutra información que poidese resultar de interese para os membros da comunidade universitaria, á vez que continuará a ser unha fiestra cara ao resto da sociedade. Así, con esta formulación innovadora, a revista tratará, con máis empeño ainda que outrora, de complementar os traballos dos estudantes con

anotacións sobre acontecementos extraacadémicos que teñen lugar ao longo do ano na Facultade, as conferencias, os actos de graduación, as exposicións, etc., además de rememorar a personaxes relevantes da ciencia. O formato electrónico que usará a revista nesta etapa, sen dúbida, facilitará a súa edición e contribuirá fortemente a mellorar a súa difusión a través da páxina web e das redes sociais, o cal é un valor engadido digno de ter en conta.

Renace así pois unha revista renovada en estrutura e contidos, pero que mantén o mesmo obxectivo co que partiu anos atrás: facer dela unha bandeira da nosa facultade, que deixe pegada da senda pola que nos movemos nestes tempos e sirva de referencia para os vindeiros. Pero xa a carón desta segunda etapa, o reto que nos ten de mover non debe ser só chegar ata aquí, senón acadar o que é ainda máis difícil, que a iniciativa perdure no tempo. Son consciente de que con esta idea traballa o seu equipo editorial, integrado por profesores e alumnos do noso centro que merecen todo o recoñecemento, non só pola sua excelente faceta de organización editorial e revisión dos traballos que publica a revista, senón tamén pola súa dedicación e a ilusión que poñen para sacar adiante esta proposta colectiva. A todos eles e en nome da Facultade, á que me honra representar, quero agradecerlles o labor que realizan e animalos a perseverar nese eido para o que contan co apoio do equipo decanal e, en xeral, da Facultade.

Quero imaxinarme o que significa para un alumno ter a oportunidade de ver publicado nunha revista o seu primeiro traballo logo de oír en tantas ocasións nas aulas e laboratorios, a

importancia de dar difusión aos resultados científicos a través da súa publicación. Tamén para aqueles que desenvolven traballos sobre a base de revisións bibliográficas debe supoñer un reto o poder condensar, nunhas sempre limitadas verbas, uns feitos que en moitos casos serviron para o avance do coñecemento científico. O mundo no que se desenvolve a bioloxía na actualidade esixe que a formación das mozas e mozos sexa integral, que non só parta da acumulación do coñecemento senón que tamén alcance a complexidade que supón a procura de información, de expoñer razoamentos críticos, de expresarse e presentar as ideas e de mostrar os resultados de forma axeitada. Teño claro que eses obxectivos non xorden só das aulas e laboratorios, senón que tamén precisan de adestramento con ferramentas diversas que transcenden as de índole académica e que, ben manexadas, poden aportar beneficios perdurables en termos de competencias persoais e profesionais.

Así, pois, encaro o final deste prólogo facendo un chamamento ás alumnas e alumnos da nosa Facultade para que se adentren na revista, que valoren os seus contidos e a oportunidade que supón o poder publicar nela ese primeiro traballo de base científica. Todo un reto que merece unha forte aposta. A miña ledicia será ver eses novos traballos publicados en REVBIGO e poder facer partícipes deles a todos os membros da comunidade universitaria en xeral e, en particular, os que formamos a Facultade de Bioloxía.

Benvida, pois, esta nova etapa e longa vida a REVBIGO

Jesús M. Míguez Miramontes

Decano da Facultade de Bioloxía

LUÍS FREIRE, UN RENACENTISTA NO SÉCULO XX

Naceu na Coruña o 8 de abril de 1914. Con só 11 anos traballou como dependente nun comercio de bixutería e, ao pouco tempo, como "mozo dos recados" do Dr. Enrique Flórez del Cueto, quen o convenceu e axudou para que estudara o Bacharelato, o que fixo por libre.

Os 4 anos do Bacharelato Elemental aprobounos en dous, compaxinando esta actividade co traballo e clases de alfabetización a obreiros no local de Xerminal (CNT). A continuación, realizou nun ano os dous cursos de Practicante (ATS) e, ao ano seguinte, decidiu acabar o Bacharelato Superior, tamén 2 anos en un.

Como lle gustaba estudar insectos e arañas, no ano 1935, foi invitado a participar, como axudante en entomoloxía e practicante, na Expedición ao Amazonas, dirixida polo capitán Francisco Iglesias, que foi suspendida "sine die" ante os acontecementos político-sociais do momento.

A situación familiar e a Guerra Civil non lle permitiron continuar estudos universitarios. O seu irmán máis vello foi "paseado" e toda a familia acosada pola Falanxe, o que marcou para sempre a súa filosofía de vida (vivir o presente) e as tendencias políticas (anarquismo) e relixiosas (ateo).

Luís Freire exerceu a profesión de forma autónoma na Coruña, como practicante e dando clases particulares de todas as materias posibles, desde latín e grego a trigonometría esférica. Casou en 1938 e tivo 4 fillos, que lle deron 8 netos.

No ano 1970, faleceu a súa muller. A falta da compañeira e cos fillos independizados, decide con 57 anos cursar estudos universitarios en Santiago. Opta pola licenciatura en Ciencias Biolóxicas.

Foi un magnífico estudante, responsable e traballador como correspondía á súa idade, intelixencia e coñecementos. Aprobou os 5 cursos en 4 anos. Tamén en 1975, obtivo o Grado de Licenciatura coa tese "Macromycetes do monte Pedroso (Santiago)". E, defendeu a de Doutoramento en 1981, co traballo "Macromycetes da Selva Negra (Santiago)". Toda

Orla de licenciatura en Ciencias Biolóxicas (1975)

a actividade estudantil e investigadora foi acompañada por reunións nas que participaban intelectuais, humanistas e científicos, da cidade de Santiago, xa que se manexaba perfectamente co latín e o grego clásicos a maior parte dos compañeiros de conversa estaban relacionados coa etnografía, lingüística, historia e antropoloxía.

A principios de 1978 foi contratado como Profesor Agregado de Botánica (PNN) da Facultade de Bioloxía na Universidade de Santiago. Durante esta etapa como profesor, invertendo o horario e distribución prevista nos calendarios oficiais, dedicaba 4 horas prácticas e 2 horas teóricas/semana a cada unha das materias que impartía (Ampliación de Criptogamia e de Fanerogamia). Xeneroso co seu tempo e o seu saber!

Cualificaba mediante un exame práctico e un herbario con máis de 150 especies. Non facía

exames teóricos, xa que acostumaba a dicir que a imprenta fora inventada no século XV e os libros tiñan índice, polo que non era necesario memorizar todos os conceptos, só era importante entendelos e saber aplicalos. ... E aínda non aparecera «Boloña»! Un adiantado ao seu tempo.

Foi nomeado director da Residencia Universitaria Burgo das Nacións (1980-1985), na que se hospedaba desde 1975. E, a partir de 1981 comezou a convivir coa súa discípula Marisa Castro, coa que compartiu traballo e afeccións ata o seu pasamento. Foron os anos máis prolíficos na investigación micolóxica e botánica, xa que con ela formou o primeiro equipo de investigación micolóxica no Departamento de Botánica da Facultade de Farmacia.

No 1982, presentou con Marisa o primeiro libro de divulgación micolóxica, escrito en galego, con algo máis de 50 especies, comestibles e tóxicas, 54 receitas de cociña e novas ideas sobre clasificación, etnomicoloxía ou toxicoloxía de cogomelos. Pese a ser a primeira obra de divulgación, Luís Freire xa publicara algún artigo científico xunto co director de tese, entre eles unha especie nova: *Psathyrella ascariensis*.

Ao non ter vínculo laboral coa Facultade de Farmacia, e debido á popularidade alcanzada nos medios sociais coa publicación da "Guía de cogomelos", tivo certas discrepancias co catedrático de Botánica, polo que, a finais de 1982, foi "invitado", xunto cos outros cinco membros do seu grupo de traballo, a abandonar as dependencias que ocupaba nesa Facultade. Sen embargo, xunto coa compañeira mantivo vivas as actividades relacionadas coa botánica e a micoloxía, reforzando a relación con investigadores destacados como Francisco de Diego Calonge, Gabriel Moreno, Gastón Guzmán, Juan Seoane Camba, Santiago Castroviejo, Enrique Valdés-Bermejo, Antonio Rigueiro, Javier Silva-Pando ou Xosé Ramón García, entre outros. En 1989, publicou a primeira guía de árbores autóctonas e ornamentais de Galicia con Marisa Castro e Antonio Prunell.

Impartiu clases prácticas de Botánica

Primeiro microscopio utilizado por Luís Freire para a observación de algas

(particulares), dirixidas a alumnos das facultades de Farmacia e Bioloxía, e numerosas, máis de 200, conferencias divulgativas sobre cogomelos e plantas silvestres por todo o norte peninsular (España e Portugal).

Tamén participou como profesor nos cursos de Ecoloxía Marina e Terrestre, organizados polo Instituto de Investigaciones Científicas e Ecológicas no Albergue Xuvenil de Gandarío. En 1994 INICE concedeulle a insignia de ouro.

A entrañable relación que estableceu co director dese Albergue, Luís Felipe Mouriño, e con algúns dos colaboradores habituais do "entorno afectivo de Gandarío", levouno, en 1997, a depositar nel a súa colección de cunchas. A micoteca, que compartía con Marisa Castro, xa fora entregada en 1989 á sección de Micoloxía e Fitopatoloxía do Centro Forestal de Lourizán (SIAM), dirixida naquel momento por Francisco F. de Ana Magán.

O doutor Luís Freire ao final da súa vida tiña dirixido 10 Teses de Licenciatura sobre ecoloxía, plantas e fungos do territorio galego e 2 Teses de Doutoramento referidas a macromicetos

(cogomelos); describira 3 novas especies de fungos: *Psathyrella ascarioides* (1977), *Amanita porrinensis* (1987) e *Gyroporus ammophilus* (1989, 1995) e participara como coautor en 19 libros de divulgación, máis de 40 artigos científicos e divulgativos e 41 relatorios en congresos científicos. Tamén foi un estudoso e experto coñecedor da obra de Frei Martín Sarmiento, chegando a recompilar algo máis de 1.000 nomes galegos de plantas, coa súa correspondencia científica (traballo inédito).

A súa capacidade de comunicación oral e escrita, así como os amplos e variados coñecementos, fixo del un extraordinario divulgador científico. Participou con Ramón Núñez Centella na defensa do Palacete de Santa Margarida para transformalo en planetario e Casa das Ciencias e posteriormente foi socio fundador da Asociación de Amigos desta institución (AACC), que no seu 80 aniversario lle concedeu a insignia de ouro.

Tamén participou activamente no movemento ecoloxista/naturalista galego, xa que foi socio fundador da Sociedade Galega de Historia Natural (Presidente desde 1980 a 1986), do Grupo Micolóxico Galego (Presidente desde 1993 ata 1997) e do Grupo Botánico Galego, entre outros.

Honrou o seu nome sendo Libre, Único, Intelixente e Sabio. Foi sempre un home sinxelo, humilde, comprometido, íntegro e consecuente. A partir de 1990, a vida deste ilustre naturalista e investigador transcorreu entre A Coruña, Santiago e Vigo, cidade na que vivía a súa compañeira, profesora na UVIGO, coa que seguiu colaborando en tarefas de investigación e codirección de Teses ata a súa morte.

Luís Freire faleceu, rodeado por discípulos e amigos, en Vigo o 13 de decembro de 1997 e foi soterrado no cemiterio de S. Amaro (A Coruña).

Nas cidades de Santiago e A Coruña foille dedicada unha rúa. Dúas especies de cogomelos levan o seu nome: *Agaricus freire*i J.B. Blanco-Dios e *Cystoderma freirei* A. Justo e M.L. Castro e, proximamente tamén unha planta surafricana axudará a inmortalizalo, *Felicia freireana* S. Ortiz. Intentou satisfacer as súas inquedanzas culturais asistindo a cantas reunións lle permitía o traballo. Compartiu coa "flor e nata" dos intelectuais da Coruña afeccións e coñecementos, tan diversas unhas como diferentes os outros.

Como se indica máis arriba, o interese de Luís Freire polo estudo do mundo natural data da primeira xuventude. Sen embargo, foi ao final da década dos 40, tutelado polo seu profesor D. Fermín Bescansa, cando se introduciu no estudo microscópico das algas mariñas e dos cogomelos. Aínda hoxe son útiles as innumerables anotacións das especies recollidas e identificadas naquelas datas.

Desde moi novo Luís Freire coidou da mesma maneira a mente e a forma física. Todos os que o coñecemos sabemos da súa debilidade polos encrucillados e as sopas de letras, e dos baños de domingo, verán e inverno, na praia de Santa Cristina (Oleiros), despois de ir correndo desde a súa casa en Antonio Lens ata a praia e viceversa, costume que durou ata finais de 1996.

Marisa Castro

ACTO DE GRADUACIÓN 7 de junio de 2013

Iª PROMOCIÓN DO GRADO EN BIOLOXÍA

Discurso de Fuencisla Mariño
Madrina de la promoción

En primer lugar, me gustaría felicitaros por vuestro fin de grado, y como no, daros las GRACIAS de todo corazón por dejarme participar directamente, como "madrina de promoción", de este momento tan importante para vosotros y para vuestras familias.

Dentro de unas horas, recordaré este mal rato que voy a pasar como uno de los más agradables de mi carrera docente y uno de los que ha supuesto mayor satisfacción a nivel personal.

Además, como docente me siento muy orgullosa de formar parte, junto con todos vosotros, de la 1ª Promoción de Grado de Biología de la Universidad de Vigo.

Como científicos que somos, habíamos hecho ensayos previos en años anteriores de las conocidas "experiencias piloto" de la Facultad de Biología, pero no sabíamos muy bien cómo desarrollar este "experimento" conocido popularmente como "adaptación a Bolonia".

Hace 4 lejanos años, decidimos planificar con la mejor voluntad dicho "experimento", y vosotros fuisteis, como ya sabéis (os lo repetimos hasta la extenuación!) NUESTROS CONEJILLOS DE INDIAS: 64 alumnos recién ingresados, expuestos durante 4 años a materias multiárea, multiprofesores, multitrabajos, multipresentaciones, multiseminarios, multisalidas, multietc.

En algunas (bueno bastantes ocasiones) os hemos dicho que los biólogos ni encogen ni destiñen y puedo añadir QUE NO SE AMEDRENTAN.

Por ello, desde el principio nos dimos cuenta de que estabais dispuestos a todo con tal de aprender y prepararos lo mejor posible y así lo habéis confirmado a lo largo de estos 4 años.

Desde el primer día demostrasteis que erais un grupo unido y en muy poco tiempo formasteis una piña y sobre todo trabajasteis juntos, lo que os ha permitido comprobar que "la unión hace la fuerza".

Habéis aguantado estoicamente todos nuestros errores y habéis aceptado, casi siempre de buen grado, nuestra inexperiencia en este nuevo sistema, lo cual agradecemos. Porque, en este maremagnun, aunque no lo creáis, nosotros también fuimos conejillos de indias.

Creo poder decir, sin temor a equivocarme, que vosotros habéis aprendido de nosotros, pero nosotros también hemos aprendido de vosotros, GRACIAS POR ELLO y en muchas ocasiones nos habéis abierto los ojos, nos habéis hecho más tolerantes y al igual que vosotros –unos más, otros menos- los docentes hemos intentado trabajar en equipo para poder resolver mejor vuestras/nuestras inquietudes, temores, inseguridades, dudas y todo aquello que nos ha preocupado a todos.

Si no lo hemos conseguido al 100%, en nombre propio y, me atrevo a decir, que en el de mis compañeros, os pedimos disculpas y, una vez más, comprensión.Cabe desear que los alumnos de promociones venideras agradezcan vuestro papel como hermanos mayores. Les habéis allanado el camino en muchos aspectos.

Personalmente, he compartido con vosotros las Técnicas de Campo y la coordinación de curso en 1º, la Zoología I, en 2º, y, con algunos, Contaminación en 4º, el Trabajo Fin de Grado y el Plan de Acción Tutorial. A estas alturas, puedo decir que os conozco bien, ya que he observado y disfrutado vuestra evolución durante estos años.

Sabéis que ésta ha sido vuestra casa durante 4 años y sabéis que lo seguirá siendo todo el tiempo que queráis. Algunos os quedaréis unos años más para continuar los estudios de máster y doctorado, otros nos dejareis; pero en cualquier caso este seguirá siendo vuestro hogar y siempre podréis volver cuando lo necesitéis.

Supongo que mi despacho estará en el mismo lugar hasta que me jubile y me gustaría reiteraros que podéis contar conmigo y con el resto de los profesores siempre que lo necesitéis; aunque ya sabéis que nunca contesto correos en fin de semana, ni en vacaciones o festivos, aunque por vosotros podría hacer una excepción.

Si bien hoy es un día feliz para vosotros y para vuestras familias porque habéis finalizado un ciclo, quisiera recordaros que esto no ha sido más que el comienzo de vuestra carrera profesional. Como habéis oído, me imagino que infinidad de veces, es una carrera de fondo y sin fin, porque necesitareis seguir aprendiendo y formándoos durante toda vuestra vida profesional.

Como dijo Einstein: nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber. El que no posee el don de maravillarse ni de entusiasmarse más le valdría estar muerto, porque sus ojos están cerrados.

Creo poder afirmar, sin temor a equivocarme, que vuestra promoción ha pasado por la Universidad, pero sobre todo la Universidad ha pasado por ella: adaptación a nuevas metodologías docentes, a nuevas leyes, recortes, crisis, etc.; por eso os deseo que todas estas experiencias os ayuden a lograr los mayores éxitos profesionales y humanos. Si conseguís levantaros los lunes contentos deseando llegar al trabajo querrá decir que lo estáis haciendo como biólogos, en aquello que os gusta.

Y ya para finalizar citando un proverbio hindú "Con mis maestros he aprendido mucho; con mis colegas, más; con mis alumnos todavía más".

Abi, Alba, Almudena, Álvaro, Ana, Andrés, Antonio, Brais, Daniel Estévez, Daniel Pereira, Daniel Sabucedo, David, Fátima, Fernando, Irene, Iria, Lucía, Javier, Jessica, Jonatan Fernández, Jonatan Reboredo, Jonatan Rodríguez, Karin, Manuel, Margarita, María, Marta, Natalia, Noa, Noemí, Pablo Fernández, Pablo García, Rubén

Pérez, Rubén Simón, Santiago, Seila, Sergio, Yamina, y a los que no han venido hoy, os echaré de menos.

Muchas felicidades a todos, también a vuestras familias, que han estado a vuestro lado en esta primera etapa, y que, puedo aseguraros, van a seguir estándolo siempre que los necesitéis.

Muchas gracias.

Fuencisla Mariño

Discurso de Antonio Peteira

Alumno de la promoción

Antes de comenzar, muchas gracias a todos y, sobre todo, muchas gracias a mis compañeros, por concederme la oportunidad de dar el discurso de Graduación en nombre de todos, en un día tan importante como hoy, día 7 de junio en el que ponemos fin a una etapa, un ciclo que comenzó hace algo menos de 4 años. Recuerdo perfectamente aquel septiembre de 2009.

Las caras de nerviosismo, inquietud, miradas curiosas y despiertas, ilusionadas... Éramos un grupo de estudiantes que, de un modo u otro, habíamos decidido introducirnos en un mundo que hasta aquel momento era completamente ajeno a nosotros. Habíamos decidido dedicarnos, durante al menos cuatro años de nuestra vida, a algo de lo que tan solo conocíamos algunas pinceladas. Y con esas pinceladas fue como comenzamos a darle forma a nuestra obra.

Durante este tiempo hemos aprendido mucho. La Biología habrá dejado una huella más o menos profunda y duradera, en función de lo que nosotros mismos hayamos permitido, y en función de lo que nosotros decidamos a partir de ahora. De hecho, podemos dar explicación a muchos de los fenómenos que hoy en día ocurren a nuestro alrededor.

Nos hemos formado y hemos adquirido una mentalidad crítica, que nos hace cuestionarnos cosas a las que antes no daríamos importancia. Hemos pasado de ser personajes inocentes a ser personas con criterio y decisión.

Estoy seguro de que todos, en mayor o menor medida, estamos de acuerdo con esto; pero no solo nos hemos formado académicamente, sino que también nos hemos formado en el ámbito personal. ¡Qué también es función de la Universidad!

Cuatro años… Cuatro años es tiempo suficiente para que hayamos sentido emociones y sobresaltos, para que hayamos experimentado el éxito y el fracaso, la alegría y la impresión combinada de forma inusual junto a la tristeza y la apatía. Hemos podido reír, hemos podido llorar, sentirnos orgullosos y llegar a decepcionarnos en algunos puntos de esta larga carrera de fondo. Esta mezcla de sensaciones es un claro reflejo de lo que ahora mismo sentimos todos nosotros. Sin duda, alegría.

Hemos conseguido alcanzar nuestra meta y por ello tenemos que estar orgullosos de nosotros mismos ¡Lo hemos conseguido! Pero… y que me decís de ese leve sentimiento que por un momento se cuela en nuestra cabeza haciendo que nos planteemos todo lo que hemos vivido, las grandes amistades que hemos hecho: prácticamente somos como una familia.

Esa rutina de la que antes renegábamos ahora la echaremos de menos porque no todo volverá a ser como antes. Todos hemos dejado nuestra marca: una nota increíble, una respuesta a un profesor asombrosa, una presentación magnífica. Pero sin duda, la marca más importante, es la que hemos dejado los unos en los otros, esa huella es más difícil de borrar.

Con esto solo trato de darle importancia a la

vivencia que sin duda hemos tenido la oportunidad de sentir en nuestras pieles. Oportunidad que hemos disfrutado gracias al esfuerzo, el apoyo, la confianza y el cariño de nuestros familiares; el ánimo, el abrazo, la sonrisa y el aliento de nuestros amigos y parejas. También nuestros profesores: las riñas, las correcciones, el conocimiento que nos han aportado… Lo que hoy en día somos intelectualmente se lo debemos a ellos y por eso también tenemos que estarles agradecidos.

Toda esta inversión no serviría de nada si ahora no tuviésemos la misma ilusión que se podía respirar al principio. Ahora más que nunca debemos de tener la fuerza y el carácter suficiente para continuar el camino que hemos empezado. No sirven excusas.

Tenemos la formación personal y académica. Tenemos apoyo y, en el fondo, nos tenemos a nosotros mismos. Solo nosotros seremos capaces de conseguir aquello que nos propongamos. No sirve la crisis, la desilusión, el dinero, no hay excusas a nuestro trabajo. Nosotros somos nuestra propia fuerza. Las cosas están difíciles ahí fuera, pero no abandonemos nuestros sueños e ilusiones, el mundo nos necesita a todos y a cada uno de nosotros!

Ya que he tenido el placer de despedirme de vosotros desde aquí, solo puedo daros las gracias por estos cuatro años irrepetibles y desearos la mejor de las suertes a partir de este mismo momento. Y recordad: "*Solo a los osados sonríe la fortuna*".

Antonio Peteira Martínez

ACTIVIDADES SAN ALBERTE 2013

Conferencia de Francisco Ayala

Evolución, Creación y Diseño Inteligente

Francisco J. Ayala, nacido en Madrid, ha vivido en Estados Unidos desde 1961, es ciudadano de España y de Estados Unidos. Biólogo, exfraile dominico y uno de los más prestigiosos especialistas en Evolución, representante del neodarwinismo, y Catedrático de Biología y de Filosofía en la Universidad de California, Irvine. En reconocimiento a su labor, es el único profesor con el título de "University Professor" del campus de Irvine, título de mayor prestigio de toda la Universidad de California. Desde 1985 está casado con la Dra. Hana Lostakova y tiene 2 hijos.

El 12 de junio de 2002 el Presidente George W. Bush le otorgó en la Casa Blanca la Medalla Nacional de Ciencia de los Estados Unidos. Tan sólo otro español, el premio Nobel D. Severo Ochoa ha logrado tal distinción en el campo de la Biología. En 2010 recibió el Premio Templeton, el de mayor dotación económica en el mundo, otorgado por Su Alteza Real, Príncipe Philip, en Buckingham Palace, por descubrimientos científicos que han contribuido de manera extraordinaria al progreso y bienestar de la humanidad, entre otros premiados figuran la Madre Teresa de Calcuta, el obispo Desmond Tutu, el Dalai Lama o varios premios Nobel. Su generosidad es tal que la dotación económica del premio, que supera a la del propio premio Nobel, la donó íntegramente a su universidad. Es doctor Honoris Causa por una veintena de universidades de 10 países, entre las que se encuentra Vigo, promovida por la Facultad de Biología.

Su trabajo de investigación es amplísimo, siendo autor de más de 1.000 artículos y más de 40 libros, entre los que cuentan, en español, ***Grandes cuestiones. Evolución*** (2012), ***¿Soy un Mono?*** (2011), ***Darwin y el Diseño Inteligente*** (2007), ***La evolución de un evolucionista*** (2006), ***La piedra que se volvió palabra*** (2006), ***Senderos de la evolución humana*** (2001), ***La teoría de la evolución*** (1994), ***La naturaleza inacabada*** (1994), ***Genética moderna*** (1984), ***Estudios sobre filosofía de la biología*** (1983), ***La Evolución en acción*** (1983), ***Origen y evolución del hombre*** (1980), ***Evolución*** (1980) y ***Evolución Molecular*** (1980). Se ha centrado en biología evolutiva, y es conocido fundamentalmente por sus estudios sobre el reloj molecular, sobre el agente del mal de Changas (*Trypanosoma cruzi*), y la evolución

del *Plasmodium*. Así mismo, ha indagado sobre otros temas como filosofía, bioética y la relación ciencia-religión. Como miembro de la Académica de Ciencias de EEUU, de la Americana de Artes y Ciencias, y de la Sociedad Americana de Filosofía, pero sobretodo de la Asociación Americana para el Avance de la Ciencia (AAAS), de la cual ha sido su presidente, lucha en los tribunales contra la imposición de la doctrina creacionista, que niega la evolución, en las aulas de diversos estados americanos. Hasta ahora siempre han ganado.

En su conferencia **"Evolución, Creación y Diseño Inteligente"**, el Prof. Ayala comentó, de forma muy didáctica, el proceso de selección natural explicando el diseño de los organismos y su casi infinita diversidad, como resultado de la acumulación gradual de mutaciones, que surgen al azar, bajo el control adaptativo de su reproducción diferencial. Mutación y selección dan cuenta conjuntamente del proceso maravilloso que, comenzando con organismos microscópicos, ha dado lugar a las organismos tan bellos y distintos como las orquídeas, las garzas o los humanos. Pero el diseño de los organismos no es "inteligente", como podría esperarse de un ingeniero, sino imperfecto y, aun peor, los organismos son frecuentemente defectuosos, disfuncionales y con comportamientos absurdamente extraños, entre los que abunda la crueldad y aún más el sadismo. Estas deficiencias se deben a que la evolución es un proceso en el que azar y determinismo, casualidad y necesidad, están intrincados en el meollo de la vida.

Iria Blanco y Pedro Pablo Gallego

Conferencia

Etnomicoloxía e importancia dos cogomelos na xénese das culturas

Marisa Castro é Doutora en Bioloxía e Profesora Titular da Universidade de Vigo. Desde 1979 dedícase á investigación e divulgación micolóxica, especialmente dirixida a Galicia. Entre as aportacións científicas destacan a descrición de varios taxons novos para á ciencia dos xéneros *Amanita, Gyroporus, Cystoderma, Pluteus, Psilocybe* e *Tricholoma*, entre as de divulgación, as guías de cogomelos, algas e árbores autóctonos e ornamentais de Galicia.

O día de San Alberte de 2013 Marisa Castro, co entusiasmo que a caracteriza deunos unha conferencia sobre "Etnomicoloxía e a importancia dos cogomelos na xénese das culturas". Etimoloxicamente sabía o que era, pero xamais pensara nesa relación tan estreita que une ao ser humano cos fungos xa sexa para alimentarse ou para vivir outra realidade.

As primeiras evidencias desta relación encóntranse nas pinturas rupestres, figuras humanas xeralmente danzando e co corpo cuberto de fungos aparecen dende Africa ata Europa. Tamén en América do Sur aparecen as primeiras representacións de fungos en épocas precolombinas, así como en América do Norte onde o xénero "*Amanita*" está moi estendido e tamén representado.

Representacións en pinturas e esculturas mostran o uso dos fungos pola maior parte das civilizacións, exipcios, persas, gregos, e romanos demostraron ter un coñecemento exhaustivo dos cogomelos e os seus usos.

Non cabe dúbida de que a micoloxía ten importancia no desenvolvemento da vida humana e as culturas dende moitos puntos de vista, económico, de consumo, como

medicamento e mesmo decorativo. Non obstante o maior impacto social encóntrase no contexto dos fungos psicoactivos é dicir portadores de substancias tóxicas como a psilocibina, muscarina ou ácido ibotécnico. Neste sentido, as especies máis representadas e coñecidas son sen dúbida a *Amanita muscaria* e diversos *Psilocybe* que foron usados en rituais máxicos por bruxas e feiticeiros debido aos seus efectos alucinóxenos. E sen ir máis lonxe, Marisa con acerto pregúntase que contería a apócema que Panoramix prepara coidadosamente na súa marmita para dotar aos galos dunha forza sobrenatural que poida combater aos romanos. Ou as "galletiñas" que tomaba Alicia para aumentar ou diminuír de tamaño.

A min polo menos esta visión da etnomicoloxía cambioume. Polo menos dende que me decatei que o meu pintor favorito, O Bosco, é un micólogo excepcional, nos debuxa na súa táboa os praceres do mundo, unha variedade de plantas e froitos tóxicos así como fungos tipo *Boletus*, *Amanita muscaria* ou *Russula*, que se identifican perfectamente no Xardín das Delicias. E nin contarvos a que armou Archimboldo sobre a mesma época pintando cogomelos para imitar orellas, labios ou ollos.

Non obstante a etnomicoloxía, a pesar de existir dende tempos inmemoriais, non se desenvolve ata o século XX cando o matrimonio Wasson (el americano e ela rusa) se deron conta do diferente uso e coñecemento que se tiña dos fungos nas distintas culturas. Eles acuñaron o termo micófilo e micófobo, é dicir, os factores culturais nos que se desenvolve un pobo, afectan ao seu grao de conexión cos fungos. En España tradicionalmente os cataláns e vascos son micófilos e os galegos e asturianos micófobos.

Na antigüidade, Galicia era unha sociedade micófoba, é dicir, que rechazaba (e prohibía) o uso dos cogomelos a pesar de que no sur da provincia de Pontevedra o consumo era algo normal. Non hai referencias históricas da orixe desta prohibición, aínda que os datos recollidos polo micólogo Luís Freire ao longo da súa vida apuntan a que, a Igrexa Católica puido ter certa influencia nesta mala imaxe, ao relacionar as súas propiedades de estímulos alucinóxenos e a súa posibilidade de abrir novos mundos, co maligno e demoníaco.

Non obstante dende hai 25 anos a cultura micolóxica estase a poñer de moda grazas á gran cantidade de persoas interesadas neste tema, así como polo xurdimento de asociacións micolóxicas. Isto fai que o coñecemento dos fungos en canto ao seu uso e consumo se estea a desenvolver rapidamente. Segundo Marisa "parece que a micofobia en Galicia xa se superou".

Sinto decepcionarte Marisa, a min estame a custar créelo e ti sabes que teño as miñas boas razóns.

Pilar Molist

Exposición Macromicolóxica Outono

2013 na Facultade de Bioloxía

Durante a segunda semana de novembro de 2013 instalouse na entrada principal do Edificio de Ciencias unha exposición macromicolóxica, é dicir, de cogomelos con exemplares frescos.

O obxectivo da exposición foi eminentemente pedagóxico. Non importaba tanto o número de especies representadas como que figuraran aquelas que son máis interesantes tanto desde o punto de vista comercial e gastronómico como tóxico. Podemos dicir que o lema era "coñece para evitar intoxicarte", porque é bo recordar que "todos os cogomelos son comestibles, aínda que algúns só unha vez".

Tamén se fixo especial fincapé na diversidade de corpos frutíferos que poden verse no noso territorio, procurando expoñer cogomelos en forma de paraugas, de arbusto, de abanico, ... duros como cortiza, carnosos, xelatinosos, ... No mundo dos cogomelos existen infinitas formas e cores que moitas veces pasan totalmente inadvertidos e desde a visión dun biólogo é importante recordar ás persoas que "só se consigue conservar aquilo que se coñece desde diversos puntos de vista".

As especies foron recollidas tanto en Galicia como no norte de Portugal, por parte dalgúns alumnos matriculados na materia Botánica I: algas e fungos e do profesorado da área de Botánica. Posteriormente, foron identificadas co seu nome científico e popular, indicando na mesma etiqueta se tiñan algún interese para o ser humano: comestible, tóxica, medicinal, ...

Todo isto acompañouse dalgúns carteis explicativos referidos ás normas de recollida, á importancia ecolóxica e aos tratamentos en caso de intoxicación.

Foi un éxito! O elevado número de visitantes -procedentes de todo o Campus, e non só como cabía esperar das facultades de Bioloxía, Ciencias do Mar e Químicas, así como da cidade de Vigo- animaron durante toda a semana a entrada principal do Edificio de Ciencias.

Marisa Castro

Concurso de fotografía

Fotos premiadas

Primer premio

Segundo premio

Como xa ven sendo tradición, dentro das actividades que a Facultade de Bioloxía desenvolve co gallo da celebración do noso patrón, San Alberte, organizouse unha nova edición do concurso de fotografía biolóxica. Este concurso está patrocinado polo Servizo de Extensión Universitaria e alcanzou, no 2013, a décima edición; porén, pódese dicir que se trata dun concurso consolidado na Universidade de Vigo, concurso que está aberto á participación de todos os membros da nosa institución.

Cumpre sinalar que cada participante pode presentar un máximo de 3 fotografías que deben ter un tamaño mínimo de 10 x 15 cm e máximo de 20 x 30 cm. Así mesmo, estas deben presentarse montadas sobre cartolina, cun marco de polo menos 2 cm onde figure o título da obra. Finalmente, na edición do ano pasado houbo 31

participantes que presentaron un total de 83 fotografías.

O xurado responsable de elixir as obras ganadoras estivo formado por un membro do equipo decanal, un profesor, un representante do PAS e dous alumnos da Facultade de Bioloxía.

Na edición do 2013 concedéronse tres premios e un accésit. O primeiro premio correspondeu á obra titulada “Timón, timón”, da autoría de D. Noé Ferreira Rodríguez, alumno de Doutoramento da Facultade de Bioloxía, e consistiu nunha cámara de vídeo. O segundo premio, un libro electrónico (e-book), foi para o alumno de 4º do Grao de Bioloxía D. Héctor Castro Ramón, pola súa obra “Intenso”. A obra titulada "Gigantes del pasado" da autoría de D. Alejandro Patiño García, alumno de Ciencias do Mar, obtivo un bolígrafo dixital como terceiro premio. Finalmente, o accésit que consistiu nun lote de libros da autoría de Francisco J. Ayala, foi para Dna. María Miranda Noya, alumna de 2º do Grao de Bioloxía pola súa obra "O que esconden os cantís de Cíes".

Tercer premio

Accesit

Os premios aos ganadores da décima edición do concurso de fotografía biolóxica foron entregados o xoves 21 de novembro de 2013 ás 13:30 h no salón de actos do Edificio de Ciencias Experimentais, logo de rematar a conferencia impartida polo Dr. Francisco J. Ayala. Todas as fotos presentadas a concurso estiveron expostas no propio salón de actos do centro dende o 20 de novembro ata o 5 de decembro.

Manuel Ángel Pombal

ACTO DE GRADUACIÓN 19 de junio de 2014

IIª PROMOCIÓN DO GRADO EN BIOLOGÍA

Discurso de Marisa Castro
Madriña da promoción

En primeiro lugar quérovos agradecer a vós, Alumnos da II Promoción do Grao de Bioloxía, que me teñades proposto como "madriña" para este acto de graduación. Podo afirmar, que desde que exerzo como profesora na Universidade de Vigo, hai case un cuarto de século, este é un dos 2 días máis importantes da miña vida académica.

Un foi no que exercín tamén de "madriña" no Doutoramento Honoris Causa de Lynn Margulis; o outro, podo dicir sen falsa sinceridade, que é hoxe. E a verdade, non podería indicar cal dos dous sinto como máis importante. Sinceramente, grazas.

En segundo lugar, quero felicitarvos, porque o Grao para vós chega ao seu fin (e para algúns non é sen tempo). Tamén por iso, vos votaremos de menos.

Ao mesmo tempo, manifesto uns parabéns moi especiais para os vosos familiares e amigos. Para aqueles que nos momentos agradables se congratularon con vós; pero que nos malos momentos tamén estiveron aí para axudarvos. E - como a paciencia ten dereito a premio - están aquí gozando deste día.

Hoxe é un día alegre, un día especial; pero non debeis esquecer que na vosa vida este día é simplemente unha encrucillada. Acaba unha primeira etapa de aprendizaxe; pero non é o fin da aprendizaxe.

Por isto, tamén aproveito para pedir aos vosos pais que ata agora axudaron tan xenerosamente, que continúen a ter paciencia nestes tempos de restricións e dificultades que corren: escasean

bolsas, proxectos, postos de traballo, en fin escasea case de todo.

Lembrade que o que aprendestes debe acompañarvos toda a vida como unha mochila na que se van acumulando coñecementos e experiencias. As experiencias que algún día vos permitirán alcanzar á nube dos vosos soños. O presente, non é máis o que queda entre unha e outra, por iso é necesario non despistarse e continuar a engrosala para poder chegar onde vos propoñades.

É importante que vos tracedes unha meta. Soñar é humano, pero tamén é necesario para continuar esta carreira de fondo que é a vida. Como dixo o físico e poeta portugués, António Gedeão, "cando unha persoa soña / o mundo pula e avanza / como bola colorida / nas mans dunha crianza". É importante, é necesario, que debuxedes a vosa nube, senón nunca saberedes como fabricar a escada para alcanzala.

Dígovos isto por experiencia propia. Alá no ano 82, cando vós aínda non nacerades, fun convidada a abandonar a universidade de Santiago por discrepancias co xefe de departamento (eran outros tempos e as cousas resolvíanse de maneira diferente). Saín con dignidade e propúxenme volver á universidade pola porta grande.

Para alcanzar a miña nube, dedíqueime á divulgación (aí comezaron a publicarse as miñas primeiras guías) e traballei para concellos, asociacións, escolas, etc., onde puiden. Iso si, tiñao moi claro, sempre como Bióloga. Deste xeito conseguín acabar a tese de doutoramento, publicar algúns artigos e retornar á universidade no ano 90.

E aquí continúo, gozando co mellor desta casa, os alumnos.

Digo o mellor desta casa, porque, aínda que ás veces o esquezamos, grazas a vós nós profesores estamos contratados. E, porque vós nos permitides desempeñar a nosa vocación, estades aquí porque queredes aprender, e nos queremos ensinar. Pero sobre todo, sodes o mellor desta casa, porque sodes novos, críticos e inquietos, tedes unha inmensa vitalidade e moitas ganas de comerse o mundo.

Como algunha vez lle oín dicir ao meu mestre, Luís Freire: "Onde hai, pódese reconducir, o malo é onde non hai". Así que, pais non se preocupen polo que ás veces pode parecer falta de responsabilidade ou despreocupación. A madurez sempre chega, aínda que nós pais nos pareza que tarda moito. Pero, se aos 20 anos non teñen ganas de comerse o mundo, cando a van ter?

Cos tempos que corren, fálase continuamente de crise, de falta de traballo, de profesión mal pagada, ... Pero aínda non hai tantos anos, que tiñamos que aclarar ás persoas o que era ser biólogo. Explicar por qué un biólogo podía e debía facer avaliacións de impacto ambiental, planos de ordenación do territorio ou de aproveitamento sostible como facían os enxeñeiros forestais. Por qué podía facer análises clínicas, traballar en técnicas de reprodución asistida, axudar en hospitais ou traballar na industria alimentaria ou farmacéutica como facían médicos e veterinarios, ... Naquela época ser biólogo non se consideraba unha profesión.

Como vedes, meus queridos graduados, "non todos os tempos pasados foron mellores". Hoxe, aínda que nos quede moito camiño por andar, afortunadamente xa non é así. Dicir biólogo ten significado social e laboral. Claro que iso tamén nos da máis responsabilidade. É importante ser conscientes de que debemos ser bos profesionais, serios e responsables.

Por este motivo, a partir desta graduación, necesitaredes especializarvos en algo. Non vaia ser que "aprendiz de moito sexa mestre de nada". Un máster pode ser importante para mellorar os coñecementos naquelo que vos gusta. Para un biólogo non só existe a universidade e os centros de investigación estatal. Hai máis opcións, valorádeas todas.

E, de calquera maneira, fagades o que fagades se queredes atopar traballo, non vos esquezades de conservar a capacidade de ser "todo terreos", é dicir, estar dispostos a traballar en calquera campo da bioloxía que vos propoñan e non dicir nunca: «iso non me gusta» ou «non o sei facer». Se un o sabe facer, perfecto, e senón, é un magnífico momento para aprender: porque o importante non é facer aquilo do que se gusta, senón gustar do que se fai. A vida da tantas voltas. Voltando a mín, eu ia ser veterinaria e, xa

vedes, acabei sendo unha feliz botánica/ micóloga.

Só quero recordarvos, que cando necesitedes unha axudiña, non vos esquezades que o meu despacho sigue estando nesta facultade e nel, dentro das súas modestas posibilidades, unha ex-profesora/ amiga disposta a axudarvos naquelo que necesitedes. Vale? Unha vez máis, graciñas por convidarme a estar aquí e permitirme compartir con vós este momento tan especial. Parabéns a todos. A uns e a outros. Grazas.

Marisa Castro

Discurso de Juanjo Pasantes
Padriño da promoción

Quero empezar por dárvo-los meus parabéns por ter chegado ata aquí e tamén agradecerlle o seu traballo tanto ás vosas familias como a tódolos profesores que vos acompañaron no camiño.

Como xa vos comentei hai seis meses, agradézovos que pensarades en min para este acto pero creo que é un erro, porque alguén externo á universidade podería tervos aportado cousas máis interesantes que as reflexións que se me ocorre compartir con vós.

A primeira desas reflexión vai sobre unha pregunta que se fai algunha xente, para qué sirve unha educación universitaria?, sobre todo en bioloxía que é o camiño más dereitiño pra ir ó paro, non si?

Pois non tanto, a última "Enquisa de Poboación Activa", publicada en maio, confirma que a taxa de paro en persoas con estudos superiores é moi inferior á existente en persoas con menos estudos ou sen eles. Ademais, as menores taxas de paro corresponden a matemáticos e estatísticos e, sorpresa, biólogos y bioquímicos.

É dicir, o ter estudado bioloxía dávos mellores perspectivas na busca de traballo.

En calquera caso, eu considero que a función da educación superior, ademais de formar bos profesionais, biólogos, é a de contribuír a formar mellores persoas, persoas críticas, capaces de separar o grao da palla, que co seu traballo, e as súas protestas, contribúan a facer a sociedade máis xusta e equitativa.

Pensaredes que todo iso é moi bonito pero que o problema é o voso escaso grao de formación.

Estaredes fartos de ouvir, e quizás algúns xa o tedes interiorizado, que no que se refire á educación calquera tempo pasado foi mellor. De feito este tema xa era "trending topic" entre os romanos hai 20 séculos. Eu estou en desacordo e convencido de que calquera tempo pasado foi simplemente distinto.

Creo que tedes recibido unha sólida base na que cimentar os futuros coñecementos que acumuledes e estou tamén convencido de que vos proporcionamos as ferramentas idóneas para manexalos.

Quere isto decir que a vosa formación é perfecta? En absoluto, temos cometido continuos erros e omisións, e ímolos seguir cometendoos. É probable que insistiramos moito nalgúns aspectos, como a biodiversidade (por iso tivestes materias con case que máis profesores que alumnos) e moi pouco noutros, pero estou seguro de que sodes perfectamente capaces de vos manexares en bioloxía por vós mesmos (si é que vos deixamos intentalo), proba diso é ter superado o Traballo de Fin de Grao, incluída a lista de referencias (coma, punto, punto, abreviado, punto, paréntese....)

Outro aspecto que quero tocar é a importancia da sorte (lembrade a deriva xenética) na vida.

É algo fácil de esquecer. A ninguén nos gusta

pensar que os nosos éxitos, resultado de moito traballo, sexan en parte unha cuestión de sorte. Pero é así.

Lembrade que de momento tedes tido sorte, sorte de nacer aquí hai 20 anos e non hai 100. Sorte de ter nacido aquí e non noutro país moito máis desigual. Sorte de que as vosas familias teñan considerado importante, e puidesen permitirse, ás veces con moito sacrificio, investiren na vosa educación universitaria.

Tendo en conta a dureza (e beleza) da vida que vos agarda, é importante telo en conta, porque moitas veces fracasaredes sen merecelo, por non ter sorte, e outras veces teredes éxito tendo traballado o mesmo, só por estar no sitio adecuado no momento apropiado. Sede conscientes diso e non vos deixedes caer nin lle deades máis importancia da que ten. Simplemente volvede a intentalo, de modo que si a sorte pasa cerca vos encontre intentándoo.

O último aspecto no que quero incidir está recollido nas leis pero non tanto na vida real, trátase da igualdade entre mulleres e homes. Pode parecervos unha pesadez ou incluso unha ridiculez, pero unha cousa é a teoría e outra a aplicación dela. Sigue existindo un certo grado de desigualdade, que en moitos casos se manifesta de maneira moi sutil e adopta aspecto de dilema moral. Non teño unha fórmula máxica para solucionar o problema pero considero que unha boa forma de detectar o sexismo subconsciente é que vós, antes de empezar a darlle voltas a un deses aparentes dilemas morais, vos preguntedes se ese mesmo dilema sería tal para os vosos compañeiros varóns.

Dado que aínda non fixen alusión á crise, quero acabar cunha frase de Jorge Wasenberg, se non fose polas crises inda seríamos todos bacterias... e non, non é un biólogo, é físico.

Unha vez máis, parabéns e que a sorte vos encontre traballando.

Juanjo Pasantes

Discurso de Brea B. Carrillo Rodríguez e Gabriel Pérez Torrón

Alumnos da promoción

Chegou o momento da nosa carreira que máis agardábamos, por fin ímonos licenci… ¡Ai non, perdón! Graduar. Aquí remata o noso tempo xuntos na facultade... Ben, a verdade é que non; entre os que temos algunha materia pendente, e os que deixaron o TFG para máis adiante, aínda hai tempo de sobra para despedirse (Brea).

Gabi: Pero ben, isto é un acto oficial e ten que ser emotivo como tal, aínda que nestas datas non somos os únicos que nos graduamos, seica un tal "Felipe uve palito vaíse estrear no chollo firmándonos os títulos"...

B: Ata aquí foi o "abstract", agora pasamos ao apartado de materiais e métodos.

G: Nestes 4 anos do Grao todos pasamos bos momentos, caracterizados polo bo ambiente e a organización, salvo cando tiñamos que por data para algún exame, aí non había paz que valese … que se teño cita médica, que se aí está moi preto dun parcial, que si está moi lonxe… Toda a clase entraba nunha guerra, na que cada bando xuráballe fidelidade a unha casiña do calendario. Pero ben! Quitando iso todos nos amamos... Ou non?

B: Cabe destacar que sempre houbo certas de escisións clasistas entre nós e algunha incluso entre os profesores, polas cales podemos distinguir diferentes grupos de persoas con diferentes filosofías!!

G: En primeiro lugar están os que comen no comedor e os que comen na cafetería, caracterizada pola tarifa plana de 5.000€, aínda

que aquí tamén están os traidores, entre os que me inclúo, que sixilosamente van arriba a ver que hai de comida, e se non convence, regresan nas sombras.

B: Tamén podemos distinguir entre os que quedan a estudar no CUVI e os que prefiren baixar. Isto é un acontecemento realmente incrible e que caracteriza a vida do futuro biólogo!! Cando todo o mundo di "quedo arriba porque así concéntrome mellor" en realidade quere dicir "quedo arriba para estar de risas cos outros que tamén quedan" Iso si, cos apuntes diante.

G: Pero hai moitas máis cousas que nos unen, e que deben ter protagonismo neste momento tan emotivo. Comezaremos falando de algo que penso que nos quedou a todos presente ao longo desta carreira... A micropipeta ten dous topes!!

Estivémolas a empregar nas prácticas dende 1º, e aínda así en 4º atópaste con profesores que che repetirán como debe ser a súa correcta manipulación. A pesar de todo, ningún de nós se librou da maldición da burbulla de aire. Siiii, esa burbulliña que queda na punta e te pon nervioso. Botas fora a alícuota, apertando ata o segundo tope, e voltas a coller… E a burbulla seguirá aí… É como a burbulla inmobiliaria.

B: E falando das prácticas hai outro sentimento que nos é común a todos… Atopa-la postura nos taburetes do laboratorio! Comezas sentándote coa espalda recta, pero mentres avanza a práctica vaste encorvando, encorvando ata que practicamente tocas coa nariz na poyata (aclaración para os convidados, a poyata non e o que pensades, é a mesa do laboratorio).

G: Si, moito tempo pasamos no laboratorio! Nel aprendimos a manter a asepsia... Eses duros momentos no laboratorio de microbioloxía, nos que os chisqueiros Bunsen, que nunca acendían á primeira, e que depois facían que aquel laboratorio parecese as mesmísimas fraguas de Mordor!!! Pero por precaución... aínda que aqueceras, nin se che ocorrera quita-la bata!!! Aiii, qué recordos!!

Se o de bioloxia non da choio, podemos probar nunha empresa de limpeza, porque coa lexía desinfectamos que da gusto.

B: Todos aprendimos a diseccionar un mexilón… Quen diría que ten tantas cousas... (hepatopáncreas, manto,…) cando o comemos engurrichado parecendo unha gominola… E, todos fomos seducidos polo cheiro do formol.

G: Perdimos a paciencia coas claves dicotómicas, eses libros satánicos para identificar especies atendendo ás súas características, pero que chegado o momento empregas para buscar desesperado unha foto que se pareza á planta ou á seta que queres identificar… Por desgraza, normalmente a opción correcta é a que non se parece nin de lonxe.

B: Pero incluso máis emocionante que o laboratorio foron as prácticas de campo. Sería o noso equivalente ás excursións do colexio. Embarrámonos na Lagoa de Bioloxía, collimos miñocas, e algunha que outra vez tivemos que realizar medicións sobre a vexetacion da zona, entre toxos máis altos que nós mesmos... Poderían ser *Ulex galli*, *Ulex minor* ou *Ulex europaeus*, pero todos picaban…

G: Pero a carreira non son só as prácticas!!! Tamén son as clases teóricas (cando se vai a elas, claro)… Vimos uns powerpoins moi interactivos, con todo tipo de cores e tipografias, e algúns máis psicodélicos que a película dos Beatles!!! Todos aprendimos o que é unha "praia Barrera-Lagoon"... (se alguén aínda ten pendente xeoloxía dame a mín que caerá en xullo).

B: Algunhas das clases marcáronnos profundamente, como parasitoloxía... Podíamos ter visto completa a saga de Alien, ou mesmo a de SAW, pero nunca estivemos preparados para as clases teóricas de parasitoloxía... Tremátodos que penetran no hospedador humano polo nocello..., tenias máis longas que o temario de inmunoloxía… Esas clases nas que tentabas escoitar as minucias do ciclo vital do parásito en cuestión, mentres os teus compañeiros berraban de terror ambientando a aula… E das prácticas, mellor non falamos..., porque aínda temos que come-los pinchos.

G: E como esquecernos desa ferramenta dixital... Faitic. Como se di Faitíc, fáitic, feitic, tema? Esa plataforma que sempre funcionaba á perfección excepto cando máis a precisabas…

Igual que o *correo.uvigo*... Non penso que houbera excusa mais usada durante a carreira

que “yo te envié el trabajo, pero el *correo.uvigo* me lo devolvió”.

B: Non podemos quedarnos sen falar do que máis nos uniu coa carreira... e co campus... O Vitrasa!! Todos tivemos que baixar algunha vez no bus máis extremo de todos, ¡O 8! Caracterizado por ser capaz de supera-la velocidade da luz, por estradas que máis ben poderíanse considerar camiños de cabras… Aaaai!!... Esas carreiras polo pasillo ao ver baixar o bus ao lonxe... Ou esas cabezadiñas dentro del subindo pro CUVI...

G: Que recordos... Temos que ir rematando, pero quería acabar contando unha anécdota que me pasou a mín.

O pai dun amigo perguntoume: E ti qué estudias? Eu, estudio Bioloxía.

Con parsimonia quitou as gafas: O qué? Bioloxía, respondín. Quedouse mirando para mín e dixo: É iso... que ven sendo? Na miña inxenuidade intententei explicarlle que era a ciencia que estuda a vida. Ao que respondeu: A vida non se estuda rapaz, a vida vívese...

Interesante reflexión... Penso que o home tiña razón... A vida non é só unha disciplina que se estuda, realmente é un estilo de vida... Por iso os alumnos queremos dar as grazas aos nosos familiares e aos profesores por facernos vivir ese estilo de vida. Vivamos nós!

Brea B. Carrillo e Gabriel Pérez

ACTIVIDADES CULTURALES

"CINEFORUM DE BIOLOXÍA"

De todos es conocido el valor comunicativo que ofrece el cine, ya que da la posibilidad de trasmitir al público gran cantidad de información, de forma rápida y eficaz. Además, analizar una película implica comprender su contenido, captar el mensaje que trata de difundir y evaluar cómo ha sido tratado, así como las técnicas de filmación.

La utilización del cine con fines formativos es antigua. Ha sido empleado con éxito en varias disciplinas del ámbito científico como la biología, la medicina o la farmacia, entre otras.

"Cineforum de Biología" inició su andadura en la Facultad de Biología, durante el curso 2011-2012, como actividad extraacadémica financiada por el Vicerrectorado de Extensión Universitaria. La asistencia y participación se valora con 1 crédito de Libre Elección en el caso de los alumnos de las licenciaturas (en extinción) y con 15 h ECTS para los alumnos de Grado.

Está dirigido a todos los miembros de la comunidad universitaria y su principal objetivo es completar la formación de los alumnos universitarios, procedentes de diferentes facultades y ámbitos, proporcionando la adquisición de una serie de competencias transversales que no se obtienen de forma habitual, ni fácil, en las materias que componen los respectivos planes de estudio. Concretamente se trata de que el alumno adquiera una mayor concienciación ambiental y social y un mayor respeto por la diversidad biológica y cultural.

Hasta el momento se han celebrado 4 ediciones y en cada una de ellas se han proyectado 4 películas o documentales. La selección de las proyecciones se hace en base a tres criterios: calidad de la proyección, duración de la misma y temática, con el fin de fomentar el debate posterior. Entre los títulos proyectados destacan Oro negro, The cove, A ciegas, Tierra prometida, Bebés, Un fueguito,….

Cada una de las sesiones cinematográficas se desarrolla en cuatro etapas. La primera consiste en hacer una breve introducción estableciendo el marco conceptual de la película. Una vez finalizada la proyección, se abre un debate sobre la temática abordada, que es dirigido por las organizadoras de la actividad y en ocasiones cuenta, además, con la colaboración de especialistas en el tema. Tras el debate, los asistentes deben cumplimentar un cuestionario, donde se les pregunta por sus conocimientos previos sobre el tema en cuestión, su opinión sobre ciertas actividades o situaciones que puedan plantearse en relación a cualquiera de los aspectos debatidos, así como una valoración crítica tanto de la película proyectada como del debate posterior.

El análisis de las respuestas obtenidas hasta el momento revela una alta satisfacción, por parte del alumnado, tanto con la actividad como con las películas elegidas. Asimismo, ha permitido recabar sugerencias sobre otros temas y/o problemas que podrían ser tratados en futuras ediciones.

M. Jesús Iglesias Briones
Rosa Álvarez Otero
Encarna de Miguel Villegas

ACTIVIDADES

DELEGACIÓN DE ALUMNOS DE BIOLOXÍA

A Delegación de Alumnos de Bioloxía, Lynn Margulis, no curso 2013-14 realizou diferentes actividades para que os alumnos da Facultade de Bioloxía da Universidade de Vigo puidesen participar nelas. A primeira foi a reforma do acuario situado na entrada da Facultade de Ciencias Experimentais, en colaboración cos alumnos da Facultade de Ciencias do Mar.

Fotografía tomada durante unha das charlas sobre Paleontoloxía e Fitopatoloxía, encadradas dentro das actividades realizadas pola Delegación de Alumnos

O traballo estendeuse dende o mes de outubro ata finais do mes de abril.

No mes de maio impartíronse charlas relativas ó «I Sondeo Ibérico de Teixugueiras». Neste curso realizouse unha sesión de introdución ás labores de sondeo de teixugueiras, explicando a base teórica do proceso, seguida dunha saída de campo polo Campus Lagoas-Marcosende na que se pretendía ensinar aos alumnos os principais bioindicadores que se empregan neste traballo.

Probablemente unha das actividades de máis relevancia foi a posta en marcha do proxecto piloto «DivulGATE: a falar apréndese falando», no que se pretendía que os alumnos expuxesen os seus propios traballos realizados nalgunha materia ou temas de interese para eles, co fin de mellorar as súas capacidades para falar en público.

Nesta actividade desenvolvéronse un total de 5 charlas de temática variada que incluíron: Paleo-Fitopatoloxía, relación edáfica e vexetación nos solos de minas, plantas carnívoras e novas técnicas en palinoloxía. Na de Paleo-Fitopatoloxía, Pablo Estévez Gallardo presentou un antigo traballo do Grao, na que explicou como mediante o emprego de técnicas Paleontolóxicas e Fitopatolóxicas se podía chegar a recoñecer certas marcas presentes nos fósiles indicadoras de enfermidades, parásitos,...

Outras dúas charlas encadrábanse nunha mesma temática, as plantas carnívoras. A primeira parte foi presentada por Paula Estevez Caride, nela realizou unha aproximación ás principais características diagnóstico das plantas carnívoras fronte ao resto das plantas; ás relacións que establecen cos animais e microorganismos do seu ambiente e aos xéneros e familias máis relevantes deste grupo de plantas. A segunda parte foi presentada por Andrés Cordeiro Baqueiro, falando dos aspectos fisiolóxicos que diferencian as especies vexetais carnívoras e aos mecanismos que permiten a captura das súas presas.

Pablo Estévez Gallardo presentou unha segunda charla sobre as novas técnicas en Palinoloxía. Explicou algunhas das novas técnicas empregadas para a identificación de diversas estruturas do polen e algúns dos seus posibles caracteres taxonómicos, formaba parte do seu traballo fin de Grao.

Por último, Brea Bernardo Carrillo Rodríguez, falou sobre a relación solo-planta nas minas, para elo comentou os efectos dos contaminantes sobre

tres plantas. Comparounos nun solo emendado e noutro control, sen emendar. Isto permitiu deducir algunhas conclusións sobre o efecto de certos contaminantes sobre as plantas.

No vindeiro curso 2014-2015 intentaranse realizar novas actividades que poidan ser de interese para o alumnado da Facultade, como a elaboración dun terrario con especies autóctonas, a continuación do I Sondeo Ibérico de Teixugueiras, a coordinación de programas de voluntariado nas zonas verdes do Campus e a realización dunha semana de divulgación do 6 o 10 de abril, co proxecto «DivulGATE: a falar apréndese falando», que serán debidamente publicitadas no mes de marzo.

Andrés Cordeiro Baqueiro
Paula Estévez Caride

HIPERMUTACIÓN SOMATICA: UNA VISIÓN GLOBAL

Alberto Bugallo Bordetas
e- mail: escobuga@gmail.com

Trabajo Fin de Grado
Tutora:
- África González- Fernández
Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

En esta revisión bibliográfica se presenta a la hipermutación somática, un mecanismo que permite a los linfocitos B añadir mutaciones a los genes de la inmunoglobulina, generando variabilidad. Junto a una selección al estilo darwiniano, en el cual los linfocitos B compiten según la facilidad de su anticuerpo por reconocer al antígeno, los linfocitos acaban produciendo inmunoglobulinas de mayor afinidad por el antígeno. Esta selección junto a la hipermutación, son la base del desarrollo de la inmunidad frente a los patógenos.

Palabras clave: *hipermutación somática, linfocito B, AID, centro germinal, inmunoglobulina, anticuerpo, antígeno, selección clonal*

INTRODUCCIÓN

Desde hace mucho tiempo, se sabe que muchas enfermedades no afectan con la misma gravedad a una persona que ya la ha padecido una vez que a alguien que la sufre por primera vez, es decir, desarrollan inmunidad.

Por el siglo XVIII, Jenner desarrolló la vacuna, la cual permitía que un individuo desarrollase inmunidad frente a la viruela, sin exponerse al virus *per se*, sino a una variedad más benigna, la viruela bovina (Lombard, Pastoret & Moulin, 2007). Más adelante, esta técnica acabo siendo adaptada a patógenos gracias a las investigaciones de L. Pasteur, pues se observó que los patógenos atenuados también generaban inmunidad (Ganesh & Neuberger, 2011).

La gran duda era como se generaba la inmunidad. Según se desarrollaba el estudio de la inmunología, se descubrieron los anticuerpos, glicoproteínas presentes en el plasma sanguíneo producidas por los linfocitos B y las células plasmáticas, que permitían al organismo reconocer de forma específica ciertas sustancias (antígenos) y, de esta forma, descubrir a los patógenos. Los anticuerpos demostraron ser moléculas de una diversidad sin precedentes, la cual les permitía detectar un amplio espectro de moléculas. Pero, si los anticuerpos son los responsables de la inmunidad y ya están presentes cuando tiene lugar la infección, ¿cómo es posible que estos les resultase más sencillo reconocer al patógeno en nuevas infecciones?

Parte de la pregunta se resolvió con la teoría de la selección clonal de Burnet (Burnet, 1957). Según su teoría, los linfocitos B serían seleccionados según la afinidad del anticuerpo que producen, por los antígenos el patógeno. Esta teoría, que se asemejaba a la selección natural de Darwin, precisaba de la existencia de un mecanismo que generase, aleatoriamente, diversidad en los anticuerpos (Neuberger, 2008). Ese mecanismo, es nada más ni nada menos, que la Hipermutación Somatica (SHM, Somatic HyperMutation).

El objetivo de este artículo de revisión, es presentar y describir la hipermutación somática a través de sus principales modelos, ofreciendo una visión global del mecanismo.

Sobre los anticuerpos y su diversidad

Los anticuerpos, conocidos también como inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas muy diversas. Son

sintetizadas por los linfocitos B, funcionando como parte del receptor de membrana de estas células (BRC, B Cell Receptor), y por las células plasmáticas, las cuales los secretan.

Las Ig se componen de cuatro cadenas: dos pesadas y dos ligeras. Las cadenas pesadas son iguales entre sí, al igual que las ligeras (Regueiro, 2011) (figura 1). En mamíferos, existen cinco tipos diferentes de cadenas pesadas y dos de ligera, pero son las cadenas pesadas las que permiten distinguir los diferentes isotipos de Ig, proporcionándoles características y funciones particulares.

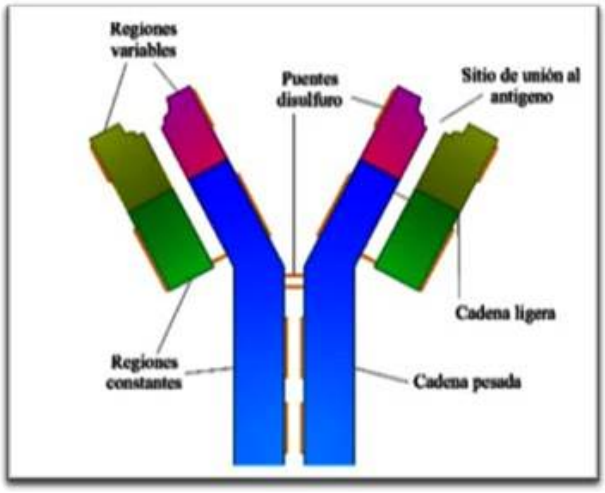


Figura1. Esquema general de un anticuerpo

Las cadenas, se dividen en varias regiones, las constantes y la variable. Es en esta zona variable, donde se acumulan las principales diferencias entre anticuerpos y es la responsable de la afinidad del anticuerpo por su antígeno, además de ser donde se une a él. En las regiones variables se encuentran, a su vez, las tres regiones que determinan la complementariedad por el anticuerpo, los CDR (*Complementarity Determining Region*). Entre estas regiones se encuentran las FR (*Frame Regions*). En los CDR se acumulan la mayoría de las mutaciones y cambios (González-Fernández *et al.,* 1994; Insel & Varade, 1994, Takahashi *et al.,* 1998). Por el otro lado, las FR se mantienen bien conservadas con pocos cambios o ninguno (Insel & Varade, 1994).

A diferencia del resto de proteínas, la diversidad de los anticuerpos no se puede explicar con la diversidad intrínseca del genoma. De hecho, la diversidad de anticuerpos supera con creces la del genoma (Noia & Neuberger, 2007).

Existen tres mecanismos que generan variabilidad: la recombinación V(D)J, la conversión génica y la hipermutación somática. De los tres, solo la SHM genera nueva diversidad, pues los otros dos, en realidad, aprovechan la diversidad del genoma para producir nuevos anticuerpos. Para ello, realizan combinaciones usando los componentes ya presentes en el genoma.

Dinámica celular de la SHM

La SHM sucede durante el estadio de centroblasto de los linfocitos B, en los centros germinales (CG) (MacLennan, 1991; Neuberger & Milstein, 1995; Takahashi *et al.,* 1998), observándose que el incremento de la afinidad por el antígeno (maduración de la afinidad), tiene lugar durante el la reacción de los CG.

Los CG se forman en los órganos linfoides secundarios, únicamente durante una respuesta T-dependiente, es decir, mediada por linfocitos T helper (MacLennan, 1991; Neuberger & Milstein, 1995; Rajewsky, 1996; Oprea & Perelson, 1997). Los CGs aparecen sobre el 6º y 7º día después de la exposición al patógeno y desaparecerían sobre el 32º día (Takahashi *et al.,* 1996).

Los CG conforman una red de linfocitos B (Figura 2), que también incluyen células dendríticas foliculares (FDC) y linfocitos T (MacLennan, 1991; Rajewsky, 1996; Regueiro, 2011). En los CG se distinguen dos zonas: una clara y otra oscura. En la zona oscura se concentran linfocitos B en proliferación, los centroblastos y no expresan BCR, mientras que los de la clara se encuentran en reposo y se conocen como centrocitos. La SHM tiene lugar en la zona oscura, mientras que la selección tiene lugar en la clara, pues solo los centrocitos expresan BCR (MacLennan,

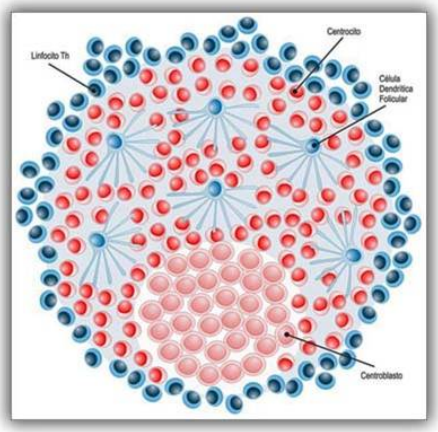


Figura 2. Esquema de un centro germinal y las células que lo componen. Tomado de Regueiro (2011)

1991; Rajewsky, 1996).

Las células pueden pasar de una zona a otra, diferenciándose en centrocitos o centroblastos según el caso. El paso de una zona a otra es bastante limitado (Figge *et al.,* 2008). Este paso es bastante aleatorio, pero hay una preferencia al paso oscura→clara. Se sospecha que esta preferencia está determinada por quimiocinas. Además, entre los centrocitos seleccionados, son los que reciben el aprobado los que suelen hacer el regreso a la zona oscura, permitiéndoles llevar a cabo nuevas rondas de SHM e incrementar todavía más la afinidad por el antígeno.

Selección clonal

La selección clonal es un proceso que hace competir entre ellos a los centrocitos de un mismo CG por reconocer al antígeno. Esta selección está determinada por la búsqueda de la afinidad por el antígeno y, explica que ciertos patrones acaben prevaleciendo en los anticuerpos (Alzari *et al.,* 1990), pues son los más afines. Además, no todos los linfocitos B empiezan con las mismas posibilidades la competición, pues ciertas recombinaciones V(D)J serán más afines por el antígeno desde el principio (Takahashi *et al.,* 1998).

Los centrocitos tendrán que detectar el antígeno que se encuentra en la superficie de las FDC mediante sus BCR, que posee su anticuerpo particular (Rajewsky, 1996). De esta forma se activan, para luego recibir una señal de los linfocitos T. Sin esta señal, la célula muere por apoptosis, pues el antígeno detectado sería uno propio, no el del patógeno. Por el contrario, los centrocitos seleccionados positivamente, pueden salir del CG y diferenciarse en linfocitos B de memoria o en células plasmáticas, o volver a la zona oscura y revertir a centroblasto, o proliferar en la zona clara (Oprea & Perelson, 1997; Figge *et al.,* 2006).

Como el número de FDCs, sólo supone el 10% de la población total de células en el CG, el número de sitios disponibles para los centrocitos es muy limitado. Que haya tan pocos sitios parece favorecer la competitividad, lo que se traduce en mutantes con mayor afinidad. De hecho, aparecen mutantes de mayor afinidad cuanto menor sea la cantidad de antígeno disponible en el organismo, pues así se reduce el número de sitios que los FDCs pueden expresar para la activación de los centrocitos (Oprea & Perelson, 1997; González-Fernández & Milstein, 1998).

Aunque la afinidad promedio se incrementa, esta no tiene porqué ser de forma muy significativa. Esto podría deberse a que el patrón de mayor afinidad precisaría muchas mutaciones o mutaciones poco probables. Aquí juega un papel importante la recombinación V(D)J, pues puede acercar o alejar a los anticuerpos del patrón adecuado, necesitando más o menos tiempo para que el patrón aparezca.

Además de la selección en los CG, parece existir otra selección más, fuera de los CGs. Esto se debe a que la maduración de la afinidad en cada CG, es independiente de los demás CGs (Takahashi *et al.,* 1998). Por lo tanto, muchos CGs podrían no haber generado mutantes de alta afinidad, y haría falta una selección para eliminar los mutantes de menor afinidad.

Características de la SHM

La tasa de mutación aproximada de la SHM ronda sobre los 10^{-3} cambios de base por generación (French *et al.,* 1989; Insel & Varade, 1994; Neuberger & Milstein, 1995; Yélamos *et al.,* 1995). Este valor es muy alto comparado con los 2,5 $x10^{-8}$ normales en humanos (Nachman & Crowell, 2000).

Las mutaciones que el mecanismo genera son sobre todo sustituciones (Yélamos *et al.,* 1995), con una clara preferencia por las transiciones sobre las transversiones, que son cerca de la mitad, en vez del tercio que se esperaría con total aleatoriedad (González-Fernández *et al.,* 1994; Insel & Varade, 1994; Neuberger & Milstein, 1995; Yelanos *et al.,* 1995; González-Fernández & Milstein, 1998). Además, las mutaciones en los pares A:T tienen lugar sobre todo en la cadena que se transcribe (Roa *et al.,* 2010).

La hipermutación afecta, casi en exclusiva, a la región variable de los loci de la Ig, y sobre todo a los CDR. Concretamente en los primeros 1,5-2 kb corriente abajo del promotor. Ahora bien, otros loci pueden

verse afectados por la SHM, como el BCL-6, así como otros genes si se intercambian por la región V (Rada *et al.,* 1994; Yélamos *et al.,* 1995; Tumas-Brundage & Manser, 1997; Neuberger *et al.,* 1998; Shen *et al.,* 1998).

Las mutaciones tienden a concentrarse en posiciones concretas, denominadas puntos calientes o hot spots y suelen evitar otras, conocidas como puntos fríos (Alzari *et al.,* 1990; González-Fernández *et al.,* 1994; Insel & Varade, 1994; Neuberger & Milstein, 1995; Jolly et al; 1996; Neuberger *et al.,* 1998; Takahashi *et al.,* 1998). Los puntos calientes suelen aparecer en los CDR, mientras que los fríos en los FR. Esto se explica con las diferentes funciones de cada región: los CDRs detectan el antígeno, mientras que los FR mantienen la estructura, para que los CDRs estén en la disposición correcta.

Los puntos calientes y fríos se determinan por patrones de nucleótidos, y no por su posición en el locus (Yaari *et al.,* 2013); como por ejemplo WRCY para los calientes (siendo W a A o T, R una purina y Y una pirimidina). Prueba de ello es que los puntos calientes y fríos aparecen incluso si esa secuencia no se expresa (González-Fernández *et al.,* 1994; Rada *et al.,* 1994), o si el gen es sustituido por otro (Yélamos *et al.,* 1995; Tumas-Brundage & Manser, 1997). Ahora bien, es posible que otras estructuras sean necesarias para que dichos puntos se aparezcan, como secuencias palindrómicas, que faciliten a la maquinaria de la SHM el acceso (Neuberger & Milstein, 1995; Neuberger *et al.,* 1998; Noia & Neuberger, 2007, Yaari *et al.,* 2013). La preferencia por ciertos puntos sobre otros se explica por las afinidades particulares de las enzimas de la maquinaria (Noia & Neuberger, 2007).

Elementos reguladores de la SHM

Ciertos elementos presentes en los loci recombinados de la Ig, permiten que el mecanismo de la SHM reconozca a estos loci y evite a los demás (Weber *et al.,* 1991).

Uno de estos elementos es el propio promotor de la transcripción de los loci (Betz *et al.,* 1994; Tumas-Brundage & Manser, 1997). Este indica a la maquinaria la posición y dirección de la SHM, pero esta función no es exclusiva y podría desempeñarla otro promotor distinto. Ahora bien, podría ser que fuesen regiones cercanas al promotor las que realmente hagan ese trabajo (Rada *et al.,* 1994)

Otros elementos, más importantes, son los enhancers E3', Ei y la región MAR (Matrix Attachment Region) (Meyer & Neuberger, 1989; Betz *et al.,* 1994; Goyenechea *et al.,* 1997). Los enhancers son fundamentales para la correcta transcripción de los genes de la Ig, estableciendo una relación entre la maquinaria de la SHM y la transcripción. MAR, por otro lado, mantiene al genoma en una disposición concreta al permitir que la cadena se adhiera a elementos de la matriz. Por lo tanto, la función de este último es la de asegurar que los genes de la Ig estén accesibles para la maquinaria de la SHM.

Inicio de la SHM: AID

La SHM se inicia con la acción de una enzima concreta, AID (Activation-Induced Deaminase), que pertenece a la superfamilia APOBEC y cuya actividad consiste en desaminar las bases de citosina del ADN, convirtiéndolas en uracilo (Petersen-Mahrt et al, 2002; Neuberger, 2008; Häsler *et al.,* 2012). Esto genera una lesión doble en el ADN: por un lado, se está usando una base no canónica y, por el otro, U:G no es un par valido.

Como AID es mutagénico por sí mismo (Petersen-Mahrt *et al.,* 2002), este se encuentra altamente regulado. Hay evidencia de que su expresión está controlada mediante microARN y que solo se expresa en los linfocitos B durante etapas concretas de su desarrollo o como posible mecanismo de defensa ante retrovirus (Crouch *et al.,* 2007; Teng *et al.,* 2008). Por si eso no fuese suficiente, es posible que AID quede retenido en el citoplasma al asociarse a proteínas que se adhieren al citoesqueleto (Figura 3), las cuales parecen jugar un papel importante en su importación al núcleo (Noia & Neuberger, 2007; Häsler *et al.,* 2012). La enzima se exporta con facilidad del núcleo, además de que se puede degradar con facilidad dentro del mismo.

AID actúa a través de la ARN-exosoma, la cual se encarga de degradar ARN. En el modelo propuesto por Basu et al. (2011), durante la transcripción, la ARN polimerasa II podría retroceder, lo cual dejaría expuesto el extremo 3' del ARN que se estaba sintetizado. Al ser una cadena de ARN incompleta, el exosoma intentaría degradarlo y en ese momento, AID sería reclutado. El retroceso de la ARN polimerasa II sería consecuencia de estructuras que se generan durante la transcripción de los loci de la Ig, pues estos loci las favorecen.

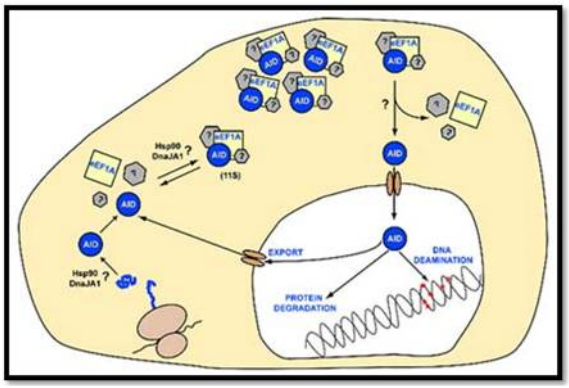


Figura 3. Modelo del ciclo de AID. Tomado de Häsler et al., 2012

Las dos fases de la SHM

Aunque AID es capaz de generar mutaciones por sí mismo en el ADN, los cambios C→U no suelen perdurar pues, en realidad, son los precursores de las mutaciones, mediante un mecanismo que recuerda al de la reparación del genoma (Noia & Neuberger, 2007; Saribasak & Gearhart, 2012). Por lo tanto, son polimerasas propensas al error las que acaban introduciendo las mutaciones.

Las mutaciones se añaden en dos fases (Figura 4), apareciendo una u otra en función de como se resuelva la lesión G:U. A pesar de que en cada fase intervienen enzimas diferentes, estas se complementan (Rada *et al.,* 1998; Neuberger & Rada, 2007). Las dos fases solo pueden tener lugar en células en proliferación (como los centroblastos). Eso se debe a que necesitan una PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) monoubiquitinada para reclutar las polimerasas implicadas en el mecanismo: la polimerasa η en la fase A:T y la polimerasa REV1 en la fase G:C (Arakawa *et al.,* 2006; Saribasak & Gearhart, 2012).

Mutaciones en pares G:C

Cuando la lesión G:U es reconocida por la enzima UNG (Uracil-DNA glycosylase), tiene lugar las mutaciones en los pares G:C. La UNG elimina las bases de uracilo, dejando un sitio abásico, es decir, dejando el esqueleto de desoxirribosa (Neuberger & Rada, 2007). Luego, el sitio abásico se elimina mediante la APE1, dejando una rotura en la hebra de ADN (Saribasak & Gearhart, 2012). Esta rotura permite reclutar a las TLS polimerasas (*TransLesion Synthesis polymerases*) que añaden las mutaciones (Noia & Neubrger, 2007). De estas, la Rev1 la más importante. Ahora bien, estas enzimas sólo son capaces de añadir un nuevo nucleótido para sustituir el sitio abásico.

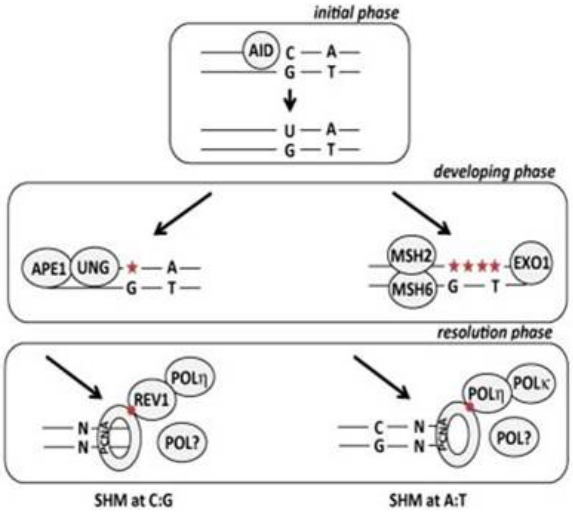


Figura 4. Esquema del mecanismo de las dos fases de la SHM. Tomado y modificado de Sariabasak & Gearhart (2012)

Para añadir mutaciones en el resto de la cadena desde ese punto, hacen falta otras polimerasas. La polimerasa ζ es la principal candidata, pues ésta trabaja preferentemente en sitios abásicos, colaborando con la REV1 en un complejo o en solitario (Daly *et al.,* 2012). Se sospecha que la polimerasa ζ también podría colaborar con las polimerasas responsables de la fase A:T.

Mutaciones en pares A:T

Cuando la lesión G:U es reconocida por el dímero Msh2/Msh6 (*MutSα*), tienen lugar las mutaciones en los pares A:T. Entonces, se recluta a la exonucleasa Exo1, que abre la hebra de ADN al eliminar un segmento. A continuación, se recluta a la polimerasa η, que según reconstruye la cadena, introduciría las

mutaciones en los pares A:T (Noia & Neuberger, 2007; Sariabasak & Gearhart, 2012). Se piensa que esta polimerasa replica fielmente cuando se trata de pares G:C. Otras polimerasas, como la polimerasa κ, podrían apoyar o sustituir a la polimerasa η (Delbos *et al.,* 2006; Sariabasak & Gearhart, 2012).

A diferencia de la otra fase, esta fase produce mutaciones mayormente en la cadena que se transcribe, pues el MutSα tiene preferencia por esta cadena (Roa *et al.,* 2010).

Relación entre las fases y el ciclo celular

Ambas fases comienzan con la misma lesión para empezar a introducir mutaciones. Se podría pensar que las fases compiten entre ellas, pero no es el caso. Una fase tiene lugar u otra en función de en qué momento del ciclo celular se reconoce la lesión G:U, según el modelo de Li et al. (2013) (Figura 5). Las mutaciones en los pares G:C sucederían en la fase G1, mientras que las de los pares A:T sucederían en el fase S. Si la lesión G:U se produce durante la fase S, entonces es tratada por MutSα. Si la lesión tiene lugar durante la fase G1, ésta es tratada por UNG, dejando el sitio abásico. Si la lesión pasa desapercibida, esta genera una transición durante la replicación. Si la lesión es reconocida antes de la fase S, ésta será reparada fidelignamente por escisión de base (BER, *Base Excision Repair*). Si el sitio abásico se reconoce durante la fase S, será tratada por las TLS polimerasas y tendrá lugar una mutación de pares G:C normal.

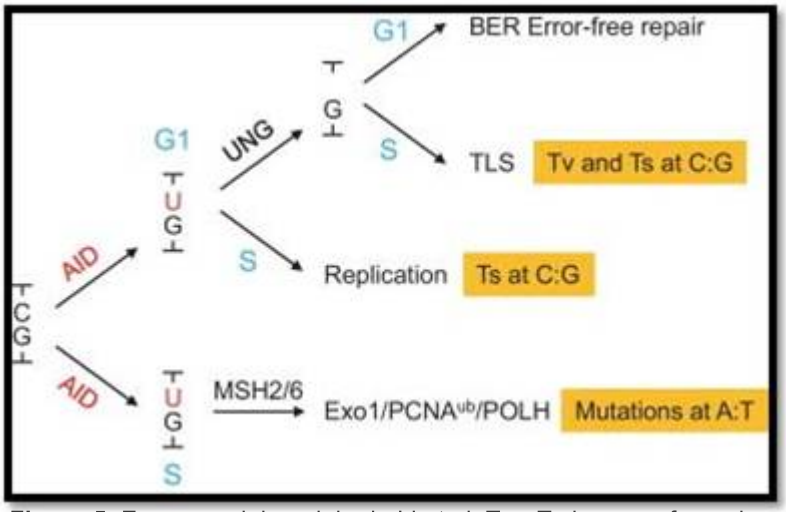


Figura 5. Esquema del modelo de Li et al. Ts y Tv hacen referencia a Transiciones y Transversiones, respectivamente. Tomado de Li *et al*. (2013).

Este modelo, explica en buena medida la preferencia de la SHM por las transiciones sobre las transversiones, debido a que la mayor parte de la acción de AID tiene lugar durante la fase G1, sería de esperar que algunas lesiones U:G no fuesen reconocidas por UNG a tiempo y terminasen como transiciones tras la replicación.

CONCLUSIONES

Se ha avanzado mucho en el estudio de la SHM, ya desde que se publicaron las primeras pruebas concluyentes de su existencia en 1970 con el trabajo de Weigert et al. Pero como cualquier otro mecanismo que se estudie en biología, no existe una idea totalmente exacta de los pequeños detalles y son muchas las dudas que el proceso genera en la comunidad científica. Por ejemplo, aún no se conoce exactamente como selecciona AID a los genes sobre los que actúa. Esto se puede observar en el propio artículo, donde se observa que ciertas cosas de las que se habla, en particular del mecanismo, son conjeturas, hipótesis o modelos que, aunque perfectamente plausibles, no tienen demasiada evidencia empírica. Pero seguramente, muchas de estas dudas se solucionen en los próximos años.

Luego, SHM es, sin lugar a dudas, un proceso de gran interés para la biología. Esto se debe no solo por su papel fundamental en las defensas de la mayoría de vertebrados, sino que también por ser un proceso fisiológico sin precedentes, pues permite a los organismos alterar su genoma para obtener una ventaja frente a su entorno, dándole un gran interés desde el punto de vista de la evolución. Esto se debe a que los genes de la Ig se "sacrifican" altruistamente al someterse a la SHM para que el organismo pueda seguir a delante. Esto se entiende así, porque los genes existen únicamente como un patrón en una cadena de nucleótidos. Por lo tanto, un cambio en dicho patrón, supone que el gen recibe un "daño". Obviamente, el resto de genes no siguen este comportamiento, lo cual hace distingue a los genes de la Ig del resto y convirtiéndolos en los únicos genes "altruistas".

BIBLIOGRAFÍA

Alzari, P. M., Spinelli, S., Mariuzza, R. A., Boulot. G., Poljak. R. J., Jarvis. J. M., Milstein. C. (1990). Three-dimensional Structure Determination of an Anti-2-phenyloxazolone Antibody: The Role of Somatic Mutation and Heavy/light Chain Pairing in the Maturation of an Immune Response. The EMBO Journal. 9: 3807-3814.

Arakawa, H., Moldovan G.-L., Saribasak, H., Saribasak, N.S., Jentsch, S., Buerstedde, J.-M. (2006). A Role for PCNA Ubiquitination in Immunoglobulin Hypermutation. PLoS Biology. 4: E366.

Basu, U., Meng, F.-L., Keim, C., Grinstein, V., Pefanis, E., Eccleston, J., Zhang, T., Myers, D., Wasserman, C. R., Wesemann, D. R., Januszyk, K., Gregory, R. I., Deng, H., Lima, C. D., Alt, F. W.. (2011). The RNA Exosome Targets the AID Cytidine Deaminase to Both Strands of Transcribed Duplex DNA Substrates. Cell. 144: 353-363.

Betz, A. G., Milstein, C., González-Fernández, A., Pannell, R., Larson, T., Neuberger, M. S. (1994). Elements Regulating Somatic Hypermutation of an Immunoglobulin κ Gene: Critical Role for the Intron Enhancer/matrix Attachment Region. Cell. 77:239-248.

Burnet, F. M. (1957). A Modification of Jerne's Theory of Antibody Production Using the Concept of Clonal Selection. Australian Journal of Science 20:67–69.

Crouch, E. E., Li, Z., Takizawa, M., Fichtner-Feigl, S., Gourzi, P., Montano, C., Feigenbaum, L., Wilson, P., Janz, S., Papavasiliou, F. N., Casellas, R. (2007). Regulation of AID Expression in the Immune Response. Journal of Experimental Medicine. 204:1145-1156.

Daly, J., Bebenek K., Watt, D. L., Richter K., Jiang, C., Zhao, M.-L., Ray, M., McGregor, W. G., Kunkel, T. A., Diaz, M. (2012). Altered Ig Hypermutation Pattern and Frequency in Complementary Mouse Models of DNA Polymerase ζ Activity. The Journal of Immunology. 188:5528-5537.

Delbos, F., Aoufouchi, S., Faili. A., Weill, J.-C., Reynaud, C.-A. (2006). DNA Polymerase Eta Is the Sole Contributor of A/T Modifications during Immunoglobulin Gene Hypermutation in the Mouse. The Journal of Experimental Medicine. 204:17-23.

Domínguez, O., Ruíz, J. F., de Lera, T. L., García-Díaz, M., González, M. A., Kirchhoff, T., Martínez, C., Bernad, A., Blanco, L. (2000). DNA Polymerase Mu (Pol Micro), Homologous to TdT, Could Act as a DNA Mutator in Eukaryotic Cells. The EMBO Journal. 19:1731-1742.

Figge, M. T., Garin. A., Gunzer. M., Kosco-Vilbois. M., Toellner. K.-M., Meyer-Hermann, M. (2008). Deriving a Germinal Center Lymphocyte Migration Model from Two-photon Data. Journal of Experimental Medicine. 205:3019-3029.

French, D., Laskov, R., Scharff, M. (1989). The Role of Somatic Hypermutation in the Generation of Antibody Diversity. Science. 244:1152-1157.

Ganesh, K., Neuberger, M. S. (2011). The Relationship between Hypothesis and Experiment in Unveiling the Mechanisms of Antibody Gene Diversification." The FASEB Journal. 25:1123-1132.

González-Fernández, A., Gupta, S. K., Pannell, R., Neuberger, M. S., Milstein C. (1994). Somatic Mutation of Immunoglobulin Lambda Chains: A Segment of the Major Intron Hypermutates as Much as the Complementarity-determining Regions. PNAS 91:12614-12618.

González-Fernández, A., Milstein, C. (1998). Low Antigen Dose Favours Selection of Somatic Mutants with Hallmarks of Antibody Affinity Maturation. Immunology. 93:149-153.

Goyenechea, B., Klix, N., Yélamos, J., Williams, G. T., Riddell, A., Neuberger, M. S., Milstein, C. (1997). Cells Strongly Expressing Igκ Transgenes Show Clonal Recruitment of Hypermutation: A Role for Both MAR and the Enhancers. The EMBO Journal 16:3987-3994.

Häsler, J., Rada, C., Neuberger, M. S. (2012). The Cytoplasmic AID Complex. Seminars in Immunology. 24: 273-280.

Insel, R. A., Varade. W. S. (1994). Bias in Somatic Hypermutation of Human V Genes. International Immunology. 6:1437-1443.

Jolly, C. J., Wagner, S. D., Rada, C., Klix, N., Milstein, C., Neuberger M. S. (1996). The Targeting of Somatic Hypermutation. Seminars in Immunology. 8.3: 159-168.

Li, S., Zhao, Y., Wang, J.-Y. (2013). Analysis of Ig Gene Hypermutation in Ung−/−Polh−/− Mice Suggests That UNG and A:T Mutagenesis Pathway Target Different U:G Lesions. Molecular Immunology. 53:214-217.

Lombard, M., Pastoret. P.-P., Moulin, A.-M. (2007). A Brief History of Vaccines and Vaccination. Rev Sci Tech. 26:29-48.

MacLennan, I. (1991). The Centre of Hypermutation. Nature. 354:352-353.

Meyer, K. B., Neuberger, M. S. (1989). The Immunoglobulin Kappa Locus Contains a Second, Stronger B-cell-specific Enhancer Which Is Located Downstream of the Constant Region. The EMBO Journal. 8:1959-1964.

Nachman, M. W., Crowell, S. L. (2000). Estimate of the Mutation Rate per Nucleotide in Humans. Genetics. 156:297-304.

Neuberger, M. S., Rada, C. (2007). Somatic Hypermutation: Activation-induced Deaminase for C/G Followed by Polymerase for A/T. Journal of Experimental Medicine. 204:7-10.

Neuberger, M. S., and Milstein C. (1995). Somatic Hypermutation. Current Opinion in Immunology 7:248-524.

Neuberger, M. S. (2008). Antibody Diversification by Somatic Mutation: From Burnet Onwards. Immunology and Cell Biology. 86:124-132.

Neuberger, M. S., Ehrenstein, M. K., Klix, N., Jolly, C. J., Yelamos, J., Rada, C., Milstein C. (1998). Monitoring and Interpreting the Intrinsic Features of Somatic Hypermutation. Immunological Reviews. 162:107-116.

Noia, J., Di, M., Neuberger, M. S. (2007). Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. Annual Review of Biochemistry. 76.1: 1-22.

Oprea, M., Perelson, A. S. (1997). Somatic Mutation Leads to Efficient Affinity Maturation When Centrocytes Recycle Back to Centroblasts. The Journal of Immunology. 158:5155-5162.

Petersen-Mahrt, S. K., Harris, R. S., Neuberger, M. S. (2002). AID Mutates E. Coli Suggesting a DNA Deamination Mechanism for Antibody Diversification. Nature. 418:99-104.

Rada, C., González-Fernández, A., Jarvis, J. M., Milstein, C. (1994). The 5′ Boundary of Somatic Hypermutation in a Vχ Gene Is in the Leader Intron. European Journal of Immunology. 24:1453-1457.

Rada, C., Ehrenstein, M. R., Neuberger, M. S., Milstein, C. (1998). Hot Spot Focusing of Somatic Hypermutation in MSH2-Deficient Mice Suggests Two Stages of Mutational Targeting. Immunity. 9: 135-141.

Rajewsky, K. (1996). Clonal Selection and Learning in the Antibody System. Nature. 381:751-758.

Regueiro, J. R. (2011). Inmunología: Biología y Patología del Sistema Inmunitario. Madrid: Médica Panamericana.

Roa, S, Li, Z., Peled, J. U., Zhao, C., Edelmann, W., Scharff, M. D. (2010). MSH2/MSH6 Complex Promotes Error-Free Repair of AID-Induced DU:G Mispairs as Well as Error-Prone Hypermutation of A:T Sites. PLoS ONE. 5:E11182.

Saribasak, H., Gearhart, P. J. (2012). Does DNA Repair Occur during Somatic Hypermutation?. Seminars in Immunology 24:287-292.

Shen, H M., Peters, A., Baron, B., Zhu, X., Storb, U. (1998). Mutation of BCL-6 Gene in Normal B Cells by the Process of Somatic Hypermutation of Ig Genes. Science. 280: 1750-1752.

Takahashi, Y., Dutta, P. R., Cerasoli, D. M., Kelsoe, G. (1998). In Situ Studies of the Primary Immune Response to (4-Hydroxy-3-Nitrophenyl)Acetyl. V.Affinity Maturation Develops in Two Stages of Clonal Selection. Journal of Experimental Medicine. 187:885-895.

Teng, G., Hakimpour, P., Landgraf, P., Rice, A., Tuschl, T., Casellas, R., Papavasiliou, F. N. (2008). MicroRNA-155 Is a Negative Regulator of Activation-Induced Cytidine Deaminase. Immunity 28:621-629.

Tumas-Brundage, K., Manser, T. (1997). The Transcriptional Promoter Regulates Hypermutation of the Antibody Heavy Chain Locus. Journal of Experimental Medicine. 185:239-250.

Wagner, S. D., Milstein, C., Neuberger, M. S. (1995). Codon Bias Targets Mutation. Nature. 376:732.

Weber, J. S., Berry, J., Manser, T., Claflin, J. L. (1991). Position of the Rearranged V Kappa and Its 5' Flanking Sequences Determines the Location of Somatic Mutations in the J Kappa Locus. Journal of Immunology. 146:3652-3655.

Weigert, M. G., Cesari, I. M., Yonkovich, S. J., Cohn, M. (1970). Variability in the Lambda Light Chain Sequences of Mouse Antibody. Nature 228:1045-1047.

Yaari, G., Vander Heiden, J. A., Uduman, M., Gadala-Maria, D., Gupta, N., Stern, J. N. H., O'Connor, K. C., Hafler, D. A., Laserson, U., Vigneault, F., Kleinstein, S. H. (2013). Models of Somatic Hypermutation Targeting and Substitution Based on Synonymous Mutations from High-Throughput Immunoglobulin Sequencing Data. Frontiers in Immunology. 4: Publicación Electronica.

Yélamos, J., Klix, N., Goyenechea, B., Lozano, F., Chui, Y. L., González Fernández, A., Pannell, R., Neuberger, M. S., Milstein, C. (1995). Targeting of Non-Ig Sequences in Place of the V Segment by Somatic Hyper Mutation. Nature. 376:225-229.

Zhao, Y., Gregory, M. T., Biertumpfel, C., Hua, Y.-J., Hanaoka, F., Yang, W. (2013). Mechanism of Somatic Hypermutation at the WA Motif by Human DNA Polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences 110: 8146-8151

DISEÑO DE UN MUSEO VIRTUAL DE ZOOLOGÍA

Álvaro Castro Fernández
e-mail: alvaro15castro@hotmail.com

Trabajo Fin de Grado
Tutoras :
- Mª Fuencisla Mariño
- Josefina Garrido
Departamento de Ecología y Biología Animal
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

El objetivo del trabajo fue diseñar un Museo Virtual de Zoología de las diferentes especies que hay almacenadas en el área de Zoología del departamento Ecología y Biología Animal de la Facultad de Biología de la Universidad de Vigo. Para ello se utilizó toda la información posible para poder enseñar de forma completa las características más distintivas de algunas de estas especies. El museo se diseñó utilizando herramientas informáticas.

INTRODUCCIÓN

La palabra museo proviene del latín “museum”, que significa “lugar donde habitan las musas”. Los museos en principio no eran conocidos como lo son hoy en día, ya que en la época del emperador griego Ptolomeo, eran lo que hoy conocemos como Universidad. Pero, acabó siendo un lugar de almacén de objetos de valor, como los Templos de Juno o Delfos.

Con la expansión del cristianismo desde la Edad Media, los objetos recogidos en las catedrales, debido a su gran valor artístico, las convirtieron en los almacenes de arte de aquella época.

Posteriormente en el siglo XVI en Italia, la burguesía comienza a comprar piezas de arte para demostrar prestigio social, pero no solo en Italia, también en Francia. Con la Revolución Francesa, estas piezas de arte almacenadas por los burgueses pasaron a ser públicas, y se almacenaron en museos como el museo del Louvre.

En el siglo XIX, con la aparición de los museos públicos, nace la Museología, que se encarga de la organización, conservación y presentación de los objetos en los museos. Actualmente se encuentran museos por todo el mundo, como el Louvre en Francia, el Prado en España, el Británico en Londres, entre otros.

Una vez finalizada la II Guerra Mundial se creó el ICOM (Comité Internacional de Museos) en 1946 y surgió la revista “Museum” su órgano de difusión (García Serrano, 2000).

Según la definición del Consejo internacional de Museos (ICOM) se define como museo: “una arquitectura sin modelo único y que varía de acuerdo a las necesidades y especificidades de cada colección en la que existen salas para exposiciones permanentes y temporales, reservas técnicas climatizadas, laboratorios de restauración, salas de administración, auditorios, áreas de investigación, vestíbulo con lugares para venta de catálogos y similares espacios para que el espectador circule y se siente”.

Entre las diferentes funciones de los museos se encuentran las siguientes:

- Conservar información
- Difundir la información.
- Socializar.
- Enseñar y democratizar la experiencia artística.
- Entretener.
- Crear turismo.
- El hecho de haber estado allí.

Dentro de todas estas funciones, podemos considerar la más importante la función de enseñar, es decir, la función didáctica del propio museo, dirigida al público general o especializado.

A su vez, en el ámbito de los museos, podemos encontrar diferentes clasificaciones:

1. Por especialidad:
   - Interior
   - Exterior
   - Virtual

2. En función del contenido:
   - Generalistas
   - Especializados

Viendo estos tipos de museos, vamos a centrarnos en los museos virtuales. Los museos virtuales son definidos como canales de información que se encuentran en forma digital, ya sea en un cd rom o a través de internet. En estos museos virtuales podemos encontrar recursos que han sido digitalizados y por tanto pueden ser difundidos a todo el público, por lo que el museo virtual pretende ser una versión digital de lo que sería un museo físico (Guidi *et al.*, 2010).

Estos lugares nos ofrecen una información sin necesidad de moverse de casa, por falta de recursos para acceder al museo físico (Santibáñez, 2005).

Según Vargas (2006), los museos virtuales son producto de dos circunstancias:

- El desarrollo de tecnologías digitales.
- El deseo de concebir nuevos espacios de difusión y formación.

La idea de museo virtual nace de la mano de dos franceses en el siglo pasado Marcel Duchamp y André Malraux. El primero tuvo la idea de realizar un museo transportable y el impuso la idea de museo imaginario. El museo virtual es transportable, en el sentido itinerante, e imaginario en tanto corpóreo. Éste combina la característica de movilidad, dada por el acceso remoto que tenemos a los contenidos de la red digital, con la inmaterialidad, por su virtualidad física. Si bien los museos siempre han estado relacionados con un espacio arquitectónico, hoy en día, a esa idea podemos sumarle los museos virtuales.

Con los museos virtuales volvemos al ámbito de la didáctica, que debe seguir una serie de principios:

- Comunicación: la información audiovisual es una herramienta llena de posibilidades para comunicación.
- Actividad: propiciar que la persona incorpore conocimientos y sea artífice de los mismos.
- Socialización: facilitar el intercambio de información.
- Globalización: la incorporación de la herramienta virtual hace que los museos tengan un carácter más global.
- Creatividad: la capacidad de comunicación de los museos virtuales y la motivación que estos despiertan son esenciales para que una persona creativa pueda manifestarse.
- Intuición: la palabra se complementa con imágenes y sonidos, lo que lo hace más intuitivo.
- Apertura: permite acceder a la información a personas que no pueden de otra manera.

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el diseño de un museo virtual de Zoología. Este museo se realizó aprovechando las colecciones de animales, disecados y en medio líquido conservante que existen en el laboratorio de Zoología del departamento de Ecología y Biología Animal de la Facultad de Biología de la Universidad de Vigo. De este modo los alumnos y personas interesadas lo podrán usar y aprender a diferenciar e identificar especies animales. Este es el objetivo principal del trabajo, que a su vez, tiene una serie de objetivos parciales:

1. Diseñar una página web que permita consultar las especies animales presentes en la Facultad de Biología.
2. Proporcionar a los alumnos de la Universidad o al público en general una herramienta online con las especies más características de nuestra zona, además de otras especies menos conocidas, de otros lugares del mundo.
3. Catalogar algunas de las especies presentes en la Facultad, para poder incluirlas en el museo, las cuales tendrán información sobre ellas, ya sea por fotos, videos, dibujos o información sobre las características de estas especies.

MATERIAL Y MÉTODOS

Una vez establecidos los objetivos, explicaremos como realizar nuestro museo virtual. Para poder explicar mejor y más detalladamente el procedimiento, dividiremos la metodología en tres fases:

1. Recopilación de información: consistió en recopilar la información necesaria sobre cada una de las especies. Esta información debe incluir todo lo necesario para poder conocer la especie, además, debe ser una información asequible a todo tipo de personas que visiten la página.
2. Diseño de la página web: consistió en realizar el espacio virtual donde ubicaremos toda la información recopilada en la fase anterior. Para ello manejamos un programa de creación de páginas web (*Macromedia Dreamweaver*).
3. Acoplar la información recopilada en la página web: introducir toda la información recopilada en nuestro diseño de página web.

Recopilación de información

Se recopiló información sobre las especies a exponer en el museo. Para ello realizamos búsquedas bibliográficas, sacamos fotografías, realizamos esquemas y algún vídeo. No en todas las especies se puede mostrar toda la información, pero si información básica.

Para realizar el museo, se eligieron una serie de especies dentro de los siguientes filos: Poríferos, Cnidarios, Moluscos, Equinodermos, Artrópodos, Anélidos y Cordados.

Para la búsqueda de información, usamos bibliografía especializada, como guías de campo (Campbell, 1983), manuales especializados sobre un grupo o grupos en concreto (Bouché, 1972; Bellmann, 1994; Omedes *et al.*, 1997; Mijón Pedreira, 1998; Parapar *et al.*, 2013), manuales prácticos (Castells y Mayo, 1993; Peterson *et al.*, 1995; Hayward & Ryland, 1996; Arnol & Burton, 1997, Chinery, 2001; Barrientos, 2004), etc. Toda la información se recogió en una tabla, que incluye la taxonomía, características, hábitat, distribución y por último la bibliografía utilizada.

- Taxonomía: fue comprobada en páginas web (online) especializadas en taxonomía como ITIS (*Integrated Taxonomic Information System*) o WORMS (*World Register of Marine Species*),

verificando los nombres válidos de los taxones correspondientes a las categorías de filo, clase, orden, familia, género y especie.

- Características: hemos expuesto las características morfológicas y anatómicas de las especies, además de otras características diferenciales de cada una de ellas.
- Hábitat: hemos colocado información sobre el hábitat más común donde encontraremos a esa especie.
- Distribución: hicimos referencia a su distribución en Europa, en concreto a su distribución cercana a la Península Ibérica en los casos que sean pertinentes, ya que hay algunas especies que se encuentran en otros lugares del planeta.
- Bibliografía: toda la que hemos utilizado para realizar la tabla con la información.

El siguiente paso, una vez recopilada la información, fue realizar las fotografías a nivel macroscópico y microscópico. Para las de nivel microscópico usamos un microscopio de la marca Swift, junto con el programa Motic Images Plus 2.0; por otra parte, para realizar las fotografías a nivel macroscópico, hemos utilizado una lupa modelo UF-80DX, junto con el programa informático UF80 USB Viewer.

Además de fotografías, también se incluyeron esquemas de las partes más importantes de cada una de las especies y vídeos.

Diseño de la web

Para el diseño, hemos utilizado el programa Macromedia Dreamweaver. El diseño constó de tres pasos: el diseño de la página de inicio, la página principal de cada especie, y por último una página para exponer los esquemas e imágenes.

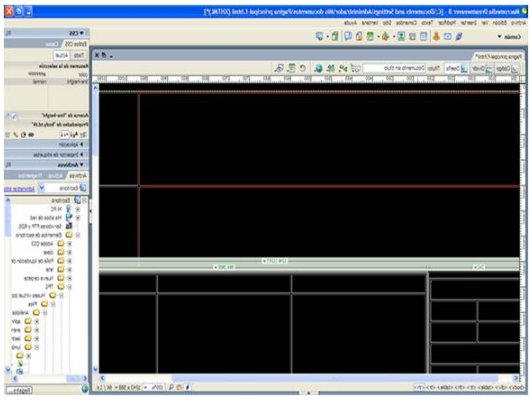


Figura 1. Diseño de la página principal

Para la página principal diseñamos un lugar sencillo e intuitivo para navegar. Para ello utilizamos tablas, en las cuales se fueron introduciendo los diferentes elementos de la página (Figura 1).

Para la página principal de cada especie, se utilizó el mismo método, pero con una tabla extra en la que se expuso toda la información de las especies (Figura 2).

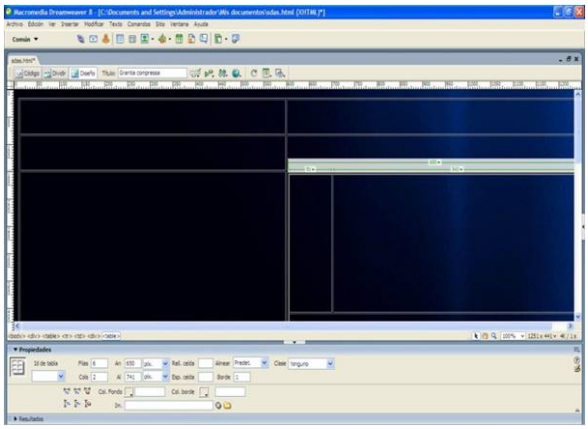


Figura 2. Diseño de la página principal de cada especie.

Para introducir los diferentes elementos, utilizamos marcadores de posición, que son elementos que permiten modificar el tamaño de nuestras fotografías rápidamente, ya que nos indica los píxeles que debe tener la fotografía para insertarla. Las fotografías se modificaron con el programa informático Adobe Photoshop.

Por último, para introducir los vídeos, simplemente se insertó el código del vídeo en la parte codificada de la página.

Acoplamiento de la información:

Este paso consistió simplemente en enlazar todas las páginas con su elemento correspondiente, mediante hipervínculos (Figura 3). Para ello realizamos hipervínculos en cada nombre de filo y especie a su página correspondiente. Además, introducimos todas las fotografías con los ya citados marcadores de posición.

Figura 3. Hipervínculos.

Se hizo lo mismo con la página principal de cada especie, enlazando con hipervínculos todas con la página principal, y a su vez, con las páginas correspondientes a fotografías y esquemas (Figura 4). Además, se introdujeron todos los datos correspondientes a las especies en la tabla.

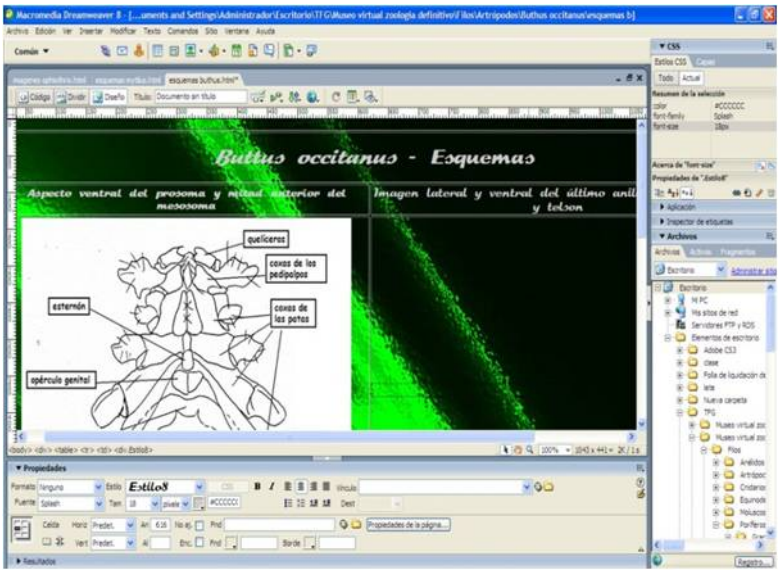


Figura 4. Introducción de información.

RESULTADOS

Entre las especies almacenadas en las colecciones de la Universidad, se encuentran especies recogidas en las salidas de campo con alumnos o de expediciones tales como BenArt, realizada a la Antártida, MAURIT, realizada a Mauritania, Plataforma Gallega o expediciones realizadas a Guinea Bissau, entre otras.

De las especies presentes, aproximadamente 80 pertenecen a Anélidos, 120 pertenecen a Artrópodos, 60 son Cnidarios, 50 son Cordados, 60 son Equinodermos, 230 son Moluscos y 30 son Poríferos: Para este trabajo se seleccionaron 29 especies. (Tabla1)

Tabla 1. Listado de especies

Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Especie
Porifera	Calcarea	Leucosonelida	Grantiidae	*Grantia*	*Grantia compressa*
Porifera	Demospongiae	Poecilosclerida	Myxillidae	*Myxilla*	*Myxilla rosacea*
Porifera	Demospongiae	Dictyoceratida	Spongiidae	*Spongia*	*Spongia officinalis*
Cnidaria	Hydrozoa	Leptothecata	Campanulariidae	*Obelia*	*Obelia geniculata*
Cnidaria	Anthozoa	Alcyonacea	Gorgoniidae	*Leptogorgia*	*Leptogorgia sarmentosa*
Cnidaria	Anthozoa	Alcyonacea	Alcyoniidae	*Alcyonium*	*Alcyonium glomeratum*
Mollusca	Bivalvia	Veneroida	Cardiidae	*Cerastoderma*	*Cerastoderma edule*
Mollusca	Cephalopoda	Nautilida	Nautilidae	*Nautilus*	*Nautilus pompilius*
Mollusca	Gastropoda	Stylommatophora	Helicidae	*Helix*	*Helix aspersa*
Mollusca	Bivalvia	Pectinoida	Pectinidae	*Pecten*	*Pecten maximus*
Mollusca	Bivalvia	Mytiloida	Mytilidae	*Mytilus*	*Mytilus galloprovincialis*
Echinodermata	Asteroidea	Forcipulatida	Asteriidae	*Marthasterias*	*Marthasterias glacialis*
Echinodermata	Ophiuroidea	Ophiurida	Ophiotrichidae	*Ophiothrix*	*Ophiothrix fragilis*
Echinodermata	Echinoidea	Camarodonta	Parechinidae	*Paracentrotus*	*Paracentrotus lividus*
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Cancridae	*Cancer*	*Cancer pagurus*
Arthropoda	Malacostraca	Decapoda	Nephropidae	*Nephrops*	*Nephrops norvegicus*
Arthropoda	Arachnida	Scorpiones	Buthidae	*Buthus*	*Buthus occitanus*
Arthropoda	Insecta	Lepidoptera	Papilionidae	*Papilio*	*Papilio machaon*
Arthropoda	Chilopoda	Lithobiomorpha	Lithobiidae	*Lithobius*	*Lithobius forficatus*
Arthropoda	Arachnida	Araneae	Araneidae	*Argiope*	*Argiope bruennichi*
Annelida	Clitellata	Haplotaxida	Lumbricidae	*Lumbricus*	*Lumbricus friendi*
Annelida	Polychaeta	Capitellida	Arenicolidae	*Arenicola*	*Arenicola marina*
Annelida	Polychaeta	Phyllodocida	Aphroditidae	*Aphrodita*	*Aphrodita aculeata*
Annelida	Polychaeta	Phyllodocida	Aphroditidae	*Laetmonice*	*Laetmonice producta*
Chordata	Ascidiacea	Phlebobranchia	Ascidiidae	*Phallusia*	*Phallusia mammillata*
Chordata	Actinopterygii	Gadiformes	Lotidae	*Gaidropsarus*	*Gaidropsarus mediterraneus*
Chordata	Sauropsida	Squamata	Colubridae	*Coronella*	*Coronella girondica*
Chordata	Aves	Accipitriformes	Accipitridae	*Hieraetus*	*Hieraetus pennatus*
Chordata	Mammalia	Rodentia	Sciuridae	*Sciurus*	*Sciurus vulgaris*

En la figura 5 se muestra el aspecto de la página principal donde se puede ver un diseño intuitivo y de fácil manejo.

Figura 5. Página principal

En cuanto a las páginas de cada especie, a modo de ejemplo, en las figuras 6 se indica el resultado final de la especie *Buthus occitanus.*

Figura 6. Página principal de cada especie.

Para visualizar las imágenes, simplemente se pincha en más imágenes y podemos observar todas las imágenes recopiladas (Figura 7). Lo mismo ocurre con los esquemas.

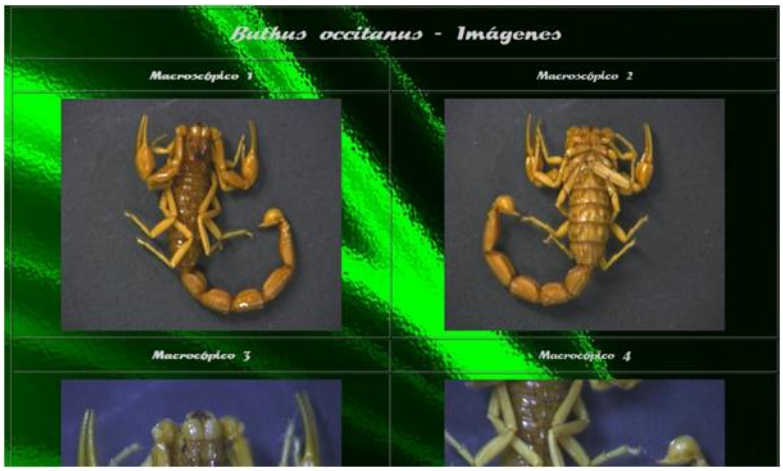


Figura 7. Imágenes recopiladas.

DISCUSIÓN

Para empezar se comparó este museo con el Museo Virtual de la Universidad de Navarra (Figura 8), cuyo link es: *http://www.unav.es/unzyec/mzna/3-08.htm*

Figura 8. Museo virtual de la Universidad de Navarra.

Como puede verse, la página principal es sencilla y divide las colecciones por plantas. Además, introduce imágenes previas de las colecciones antes de entrar en las especies en concreto. El número de especies que se muestran en este museo es muy amplia, por lo que la información sobre ellas es muy escueta, lo que difiere con el nuestro, donde la información sobre las especies es más amplia, también condicionada por el menor número de especies que contiene.

Por otra parte, también lo comparamos con el museo virtual de la Universidad de Granada (Figura 9), cuyo link es: *http://www.ugr.es/~zoologia/proyfrd/proyecto.html*

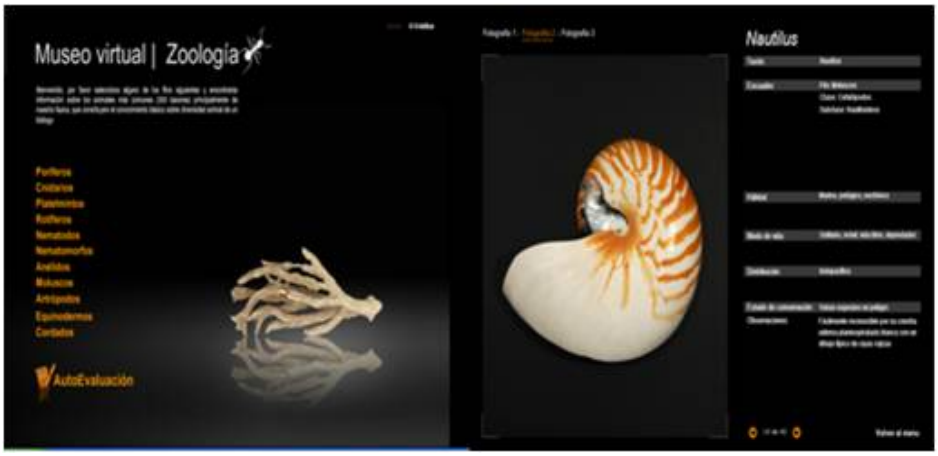


Figura 9. Museo virtual de la Universidad de Granada.

Es un diseño más parecido al nuestro y ha sido el que más ha influido en el diseño de éste. En la portada se puede ver una fotografía ejemplo de cada filo que contiene. Éste aspecto y el diseño básico de las páginas donde se muestran especies ha sido el elegido para comenzar a diseñar nuestro museo. Pero hay muchas diferencias, ya que en el nuestro tenemos esquemas y videos ilustrativos, además de un mayor número de fotos por especie.

En cuanto a nuestro museo en sí, podemos ver que su diseño es bastante intuitivo, cosa que queríamos desde el principio, ya que las personas que lo visiten deben de guiarse fácilmente por todas sus páginas. Además, el diseño con los colores vivos de fondo y muchas fotografías, hacen que la experiencia sea mucho más agradable.

Presupuesto

Tabla 2. Presupuesto

Personal	Sueldo·(€)	Nº·de·personas	Duración
Diseñador·web	900	1	6·meses
Taxónomo	1000	3	1·año
Fotógrafo	600	1	3·meses
Inversión·total		43.200·€	

CONCLUSIONES

El museo virtual es una gran herramienta para difundir información vía internet ya que con el desarrollo de las tecnologías, las personas cada vez la utilizan con más frecuencia para buscar todo tipo de información.

El museo virtual servirá para poder adquirir conocimientos que de otra manera quizá no sean posibles de adquirir, ya que el componente didáctico que se encuentra en él es muy grande y es una manera de que las personas que no pueden acceder a estos conocimientos fácilmente puedan adquirirlos.

Por tanto, el museo virtual debe ser una herramienta que se tendrá que ir incorporando a los sistemas de enseñanza modernos, sobre todo cuando la información a difundir necesita ser complementada con imágenes o vídeos. Todo esto cada vez se irá potenciando con el paso de los años, ya que con el desarrollo de nuevas tecnologías, hoy en día, se avanza a pasos agigantados.

BIBLIOGRAFÍA

Arnold E., Burton J. (1997). Guía de campo de los reptiles y anfibios de España y de Europa. Barcelona. Omega.

Barrientos J.A. (2004). Bases para un curso práctico de entomología. Madrid. Asociación Española de Entomología.

Bellmann H. (1994). Guías de Naturaleza Blume. Arácnidos, Crustáceos y Miriápodos. Barcelona. Blume.

Bouché M.B. (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systématique. Annls. Zool. Ecol. anim. (num. hors-série) 72 (2): 671 pp.Paris. Institut National de la Recherche Agronomique.

Campbell A.C. (1983). Guía de campo de la flora y fauna de las costas de España y Europa. Barcelona. Omega.

Castells A., Mayo M. (1993). Guía de los mamíferos en libertad de España y Portugal. Madrid. Ediciones Pirámide.

Chinery M. (2001). Guía de los insectos de Europa. Barcelona. Omega.

García Serrano F. (2000). La formación histórica del concepto de museo In El museo imaginado: Museo virtual y base de datos de la pintura española fuera de España: 39-62. Madrid. Gráficas Roma.

Guidi G., Trocchianesi R., Pils G., Morlando G., Seassaro A. (2010). A Virtual Museum for Design. New Forms of Interactive Fruition. INDACO. Politecnico di Milano.

Hayward P.J., Ryland J.S. (1996). Handbook of Marine Fauna of North-West Europe. Oxford University Press.

ITIS (online). Integrated Taxonomic Information System In www.itis.gov/

Mijón Pedreira O. (1998). Antozoos de la ría de Vigo. Tesis de Licenciatura de la Universidad de Vigo.

Omedes A., Senar J.C., Uribe F. (1997). Animales de nuestras ciudades. Guía ilustrada de la fauna urbana de la Península Ibérica y Baleares. Barcelona. Planeta.

Parapar J., Moreira J., Gambi M.C., Caramelo C. (2013). Morphology and biology of Laetmonice producta Grube (Polychaeta: Aphroditidae) in the Bellingshausen Sea and Antartic Peninsula (Southern Ocean, Antartica), Italian J. Zool., DOI: 10.1080/11250003.2012.758783.

Peterson R., Mountfort G., Hollom P.A.D. 1995. Guía de campo de las aves de España y de Europa. Barcelona. Omega.

Santibáñez J. (2005). Los museos virtuales como recurso de enseñanza-aprendizaje. Comunicar 27: 155-162.

Vargas L. (2006). Museos virtuales: nuevos balcones digitales. Reencuentro. 46: 0188-168X.

WoRMS (online). World Register of Marine Species In www.marinespecies.org/index.php

EVOLUTION OF EXONIC AND INTRONIC REGIONS IN PRIMATES

Andrés Arturo Lanzós Camaioni
e- mail: andreslanzos@gmail.com

Final Degree Project
Tutors:
- Carlos Canchaya
- David Posada
Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

SUMMARY

Technological advances in the past few decades have created multiple possibilities for comparative genomics. One of these is the phylogenetic study of whole genomes or phylogenomics. This thesis focuses on the evolutionary comparison between exons and introns of the X chromosome in primates. The results suggest that in the case of the X chromosome, introns are better suited for the study of the evolutionary history of the primates.

INTRODUCTION

Key advances in genomic technologies have resulted in a massive accumulation of biological information in recent years. This accumulation of data has prompted the raise of bioinformatics, which is the enforcement of the computational technology to the analysis and management of biological data. Among the many areas of application of bioinformatics, we can found the comparative study of the genetic material of multiple species. In this case, some of the resources and tools available are databases like Ensembl (Flicek *et al.,* 2012; *http://www.ensembl.org/index.html*) or those at the NCBI (*http://www.ncbi.nlm.nih.gov/*), programming languages such as Perl or Python, sequence alignment algorithms like BLAST (Altschul *et al.,* 1990) or EPO (Paten *et al.,* 2008a,b) and a lot of statistical models developed by researchers around the world and accessible throughout the world wide web. Indeed, genomics has largely benefited from bioinformatics during the last decade. For this reason, researchers have been able to work on genes sequences, protein domains, protein structures, chromosomes, transcripts and whole genomes (Teufel *et al.,* 2006; Margulies *et al.,* 2007).

The availability of multiple genome sequences allows to address many fundamental evolutionary questions on a genomic scale. One of these is the molecular evolution of exonic and intronic gene regions in eukaryotes. Also known as exons and introns, the second are the regions eliminated during the maturation of eukaryotic RNA in the process of RNA splicing (Figure 1).

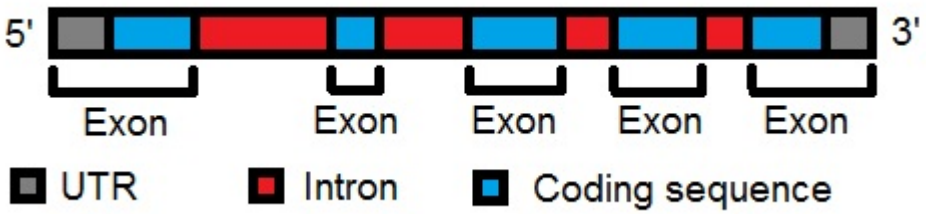


Figure 1. General scheme of eukaryotic pre-ARN with exons and introns.

Different researchers have showed that the structure and the evolution of exons and introns follow patterns that can be characterized (Rogozin *et al.,* 2005; Zhu *et al.,* 2009; Koralewski *et al.,* 2011). For example, the evolutionary rate of introns is bigger than exons (Gelfman et al, 2012), because exons contain coding sequences that are strongly conserved through evolution.

However, one of the questions that has not been addressed yet is whether exons and introns show similar nucleotide substitution patterns. Related to this, the phylogenetic utility of exons and introns, as far

as I know, have never been explicitly addressed. Here, I tried to delve into these two questions through the comparison of exons and introns of six species of primates: human (*Homo sapiens sapiens*), gorilla (*Gorilla gorilla*), chimpanzee (*Pan troglodytes*), orangutan (*Pongo abelii*), macaque (*Macaca mulatta*) and marmoset (*Callithrix jacchus*).

Objectives

The general aim of this thesis is the comparison of the molecular evolution of the exonic and intronic regions in primates. The particular objectives are:

1) To establish the average differences between exons and introns regarding genomic features like alignment length, GC content and nucleotide diversity.

2) To characterize nucleotide substitution patterns in exonic and intronic regions using a statistical model selection framework.

3) To compare the different phylogenetic hypothesis generated from exons and introns.

METHODS

Data Mining

The *Enredo, Pecan* and *Ortheus pipeline* (EPO; Paten *et al.,* 2008a,b) was used in order to gather genomic data from the six primate species of interest. *Enredo* produces collinear segments from genomes handling both rearrangements, deletions and duplications and *Pecan* is a global aligner used for these segments (Paten *et al.,* 2008a). Finally, *Ortheus* provides genome-wide ancestral sequence reconstructions (Paten *et al.,* 2008b). The EPO sequence alignments are available at the Ensembl Compara database of the European Bioinformatic Institute and the Wellcome Trust Sanger Institute (*http://www.ensembl.org/info/docs/api/compara/index.html*).

The '6-primates-EPO' (human, chimpanzee, gorilla, orangutan, macaque and marmoset) genomic alignments were programmatically accessed through the *Compara* API. Due to the enormous size of these data, the analysis was restricted to the chromosome X. For this, a Perl script was specifically designed to extract all the genomic blocks from the chromosome X of the EPO-6 data set. Note that these blocks can contain 2-6 species, as not all genomic blocks occur in all primates. In addition, different filters were applied to select only the common regions between the exons and introns within these blocks:

- Blocks with one or more sequences without annotated genes were eliminated.
- Blocks with more than one sequence per species (due to duplication) were eliminated.
- Aligned genic regions not present in all the species in the block were eliminated. Genes from different species do not always coincide exactly, so only the overlapping gene regions were selected (Figure 2).
- Within the overlapping genic regions, exons and introns were identified.
- Exonic regions common to the all species were again selected and saved to a SQLite database. The same procedure was applied to the intronic regions (Figure 3).

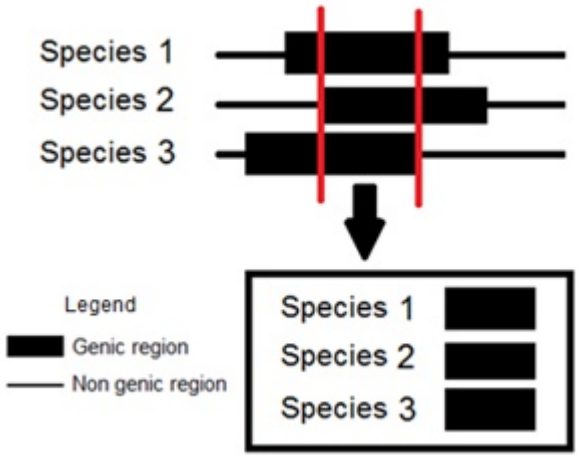


Figure 2. Selection of common regions for genes. Only the genic region common to the all sequences in the genomic align block were selected.

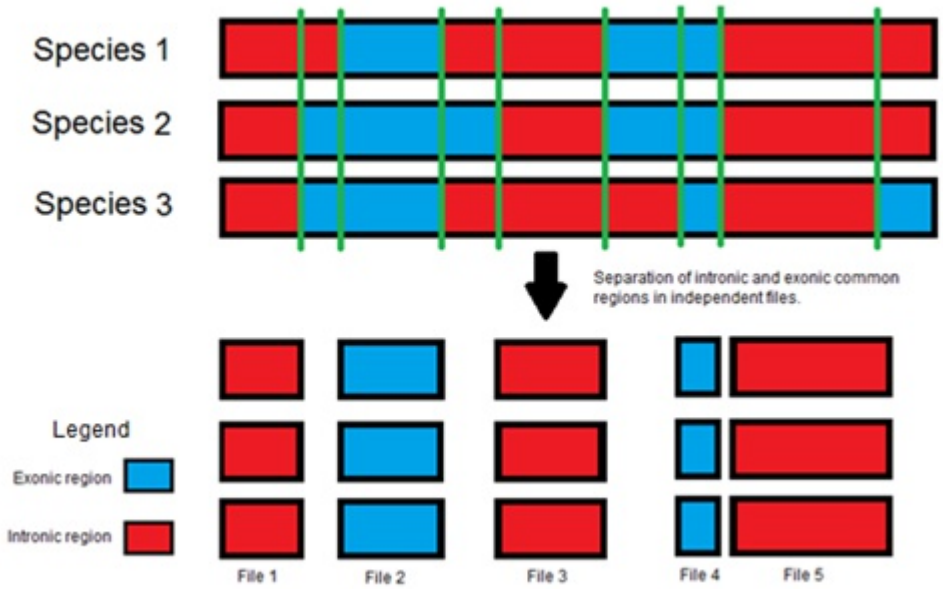


Figure 3. Selection of common regions for exons and introns.

Statistical analysis with R

The statistical comparison of exonic and intronic features was performed with the R statistical environment (R Development Core Team, 2013). Exonic and intronic alignments were exported from the SQLite database as FASTA files, and imported into R using the *seqinr* package (Charif, 2013). For each alignment, the nucleotide diversity, GC content and length were measured using *ape* (Paradis, 2013a). The nucleotide diversity is the average number of nucleotide differences per site between two randomly chosen DNA sequences (Nei *et al.,* 1979). Differences between exons and introns were assessed using linear regression and t-tests.

Model selection

Nucleotide substitution models are used to explain the probabilities of change among the different nucleotides according to the equilibrium nucleotide frequencies. The best-fit nucleotide substitution model (Posada *et al.,* 2001) was estimated for every alignment using the R packages *phangorn* (Schliep, 2013) and *pegas* (Paradis *et al.,* 2013b), according to the Bayesian Information Criterion (BIC; Schwarz, 1978). The best-fit models was selected among a set of 6 potential candidates with increasing complexity (Table 1).

Table 1. Substitution models examined

Substitution models	Number of parameters	Base frequencies	Transition rates
JC	1	A=C=G=T	AC=AG=AT=CG=CG=CT=GT
F81	4	A≠C≠G≠T	AC=AG=AT=CG=CG=CT=GT
K80	2	A=C=G=T	(AG=CT) ≠ (AC=AT=CG=GT)
HKY	6	A≠C≠G≠T	(AG=CT) ≠ (AC=AT=CG=GT)
SYM	6	A=C=G=T	AC≠AG≠AT≠CG≠CG≠CT≠GT
GTR	9	A≠C≠G≠T	AC≠AG≠AT≠CG≠CG≠CT≠GT

Phylogenetic analysis

Finally, maximum likelihood phylogenetic trees were estimated for every alignment, and their phylogenetic distance (number of different nodes) to the *'known'* primate tree (Figure 5) was calculated using the R package *phangorn*.

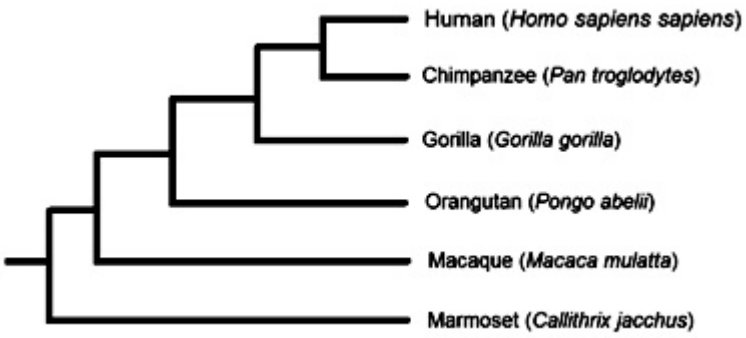


Figure 4. Putatively 'known' primate tree used in this thesis.

Training

In order to be able to handle the methodology just described, before anything I had to acquire computational skills that are routine in so-called "dry" computational biology and bioinformatic laboratories. This entitled:

- Shell environment: how to use the Linux operative system and its shell and how to connect to a remote computational node.

- Programming: I learned different aspects of the programming language Perl to be able to efficiently handle and analyze genomic data. I examined several online tutorials (http://es.tldp.org/Tutoriales/PERL/tutoperl-print.pdf) and books (Tidall, 2001, 2003).

- Data mining: to extract the genomic information from the Ensembl database, I also learned the specific application programming interface (API) of Ensemble. Generally speaking, an API specifies how some software components should interact with each other. The Ensembl API is a library that includes specifications for routines, data structures, object classes, and variables.

- Databases: In order to keep organized all the genomic information I learned how to create and use a SQLite database.

- Statistical analysis: I learned how to use R (R Development Core Team, 2013) to carry out automated statistical tests. I used different tutorials and online books (R Development Core Team, 2000; Paradis, 2003; Gentleman, 2008; Krijnen, 2009; Martinez, 2009).

RESULTS

A total of 1265 genomic blocks were downloaded from Ensembl. After filtering and dividing them into segments, the final number of alignments obtained were 7354, of which 2868 corresponded to exons and 4486 to introns. The average number of species present in the exon and intron alignments was very similar (5.76 and 5.78, respectively).

Genomic features

The average nucleotide diversity and alignment length was significantly lower (t-test p-value < 0.001) (Table 2 and Figure 6) for exons than for introns. On the contrary, the GC content for exons was significantly bigger than for introns (t-test p-value < 0.001) (Table 2 and Figure 7).

Table 2. Summary of genomic features for exons and introns.

	Min		Max		Median		Mean	
	Exon	Intron	Exon	Intron	Exon	Intron	Exon	Intron
Nucleotide Diversity	0.0012	0.0012	0.2203	0.3059	0.0191	0.0490	0.0241	0.0499
Alignment length	103	103	3161	223700	159	1678	265	6462
GC content	0.256	0.178	0.823	0.853	0.489	0.407	0.496	0.428

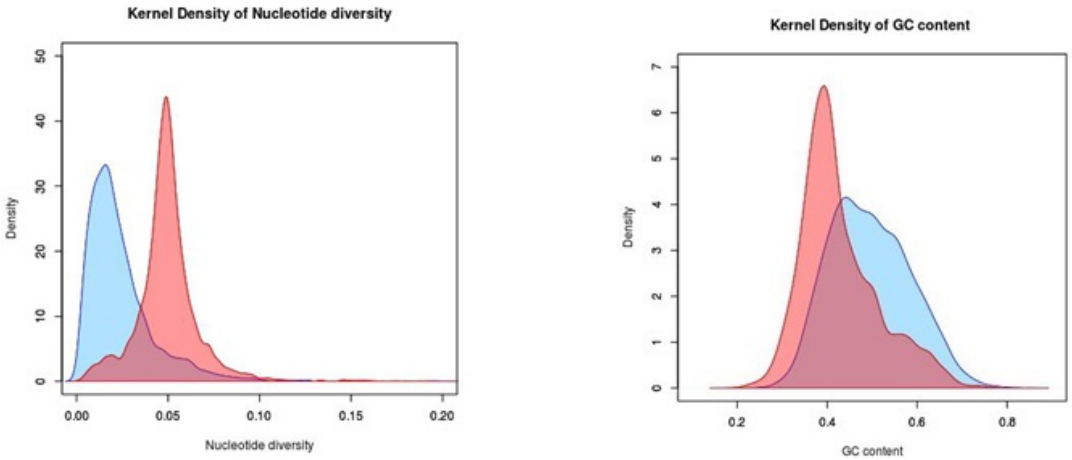


Figure 5. Density distribution of the nucleotide diversity (a) and GC concent (b) of exons (blue) and introns (red).

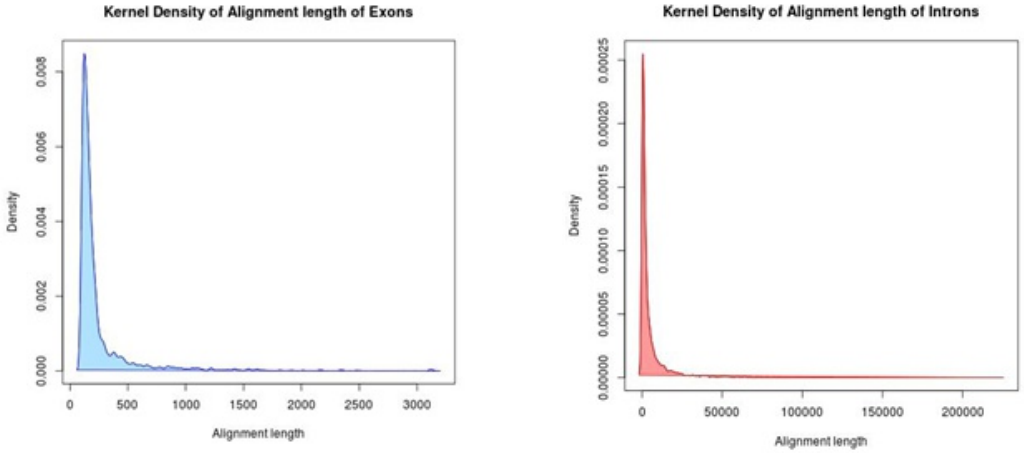


Figure 6. Density distribution of the alignment length of exons and introns. In this case they were plotted separately because both distributions have very different scales.

Best-fit substitution models

In general, best-fit substitution models for exons were simpler (included less parameters) than for introns (Figure 7). The most frequent models for exons were K80 and JC. And the most frequent models for introns were HKY and GTR.

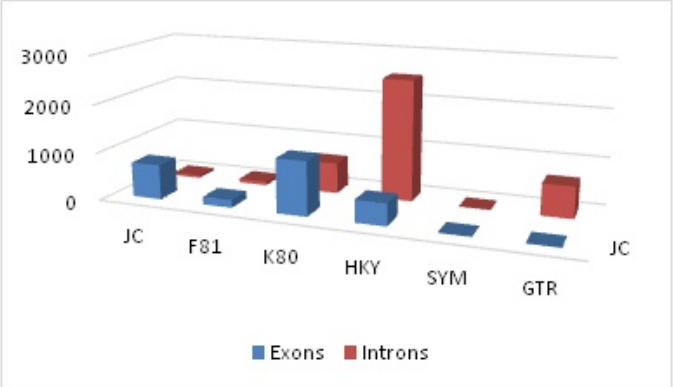


Figure 7. Distribution of best-fit nucleotide substitution models in exons and introns.

Phylogenetic trees

Remarkably, the phylogenetic distances between the estimated trees and the putative primate phylogeny were significantly higher (t-test p-value < 0.001) for exons than for introns (average distance of 2.99 and 0.76, respectively). In fact, intron trees were often identical to the 'known' primate tree (i.e., a phylogenetic distance of 0 in Figure 8).

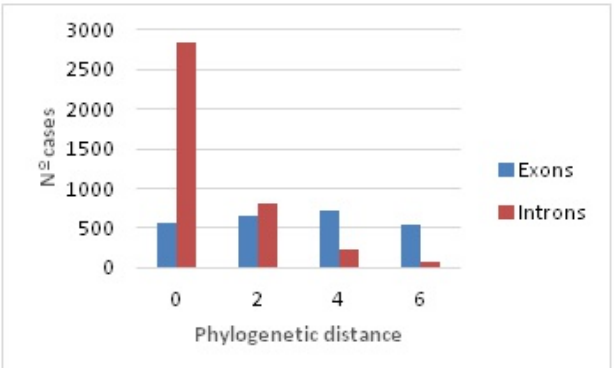


Figure 8. Distribution of the phylogenetic distances in exons and introns.

As the number of species grew, the phylogenetic distance got bigger too, as expected. Moreover, exonic trees were usually less resolved (Figures 9 and 10).

Figure 9. Example of poorly resolved exonic tree. Notice the lack of differentiation between human and chimpanzee.

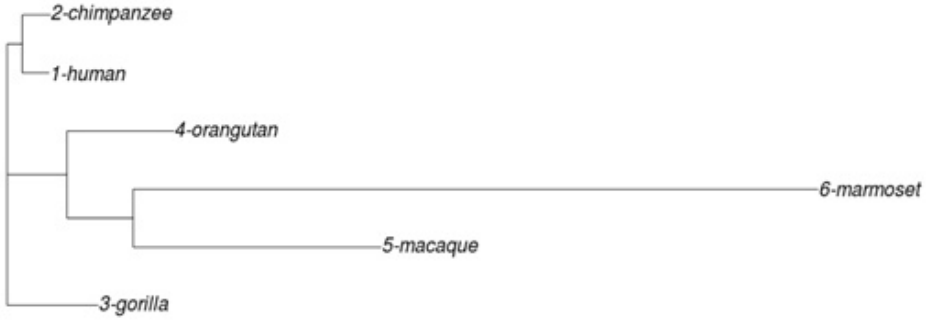


Figure 10. Example of a well resolved intronic tree with phylogenetic distance of 0 to the known primate tree.

Correlation among estimated parameters

Despite the lower Adjusted R-squares, all the relationship were found as significant among any pair of genomic parameters measure, number of species or phylogenetic distance (Table 3).

Table 3. Linear regressions.

Parameter·X	Parameter·Y	Adjusted·R-squared		P-value	
		Exons	Introns	Exons	Introns
Nº·Species	Phylogenetic·distance	0.1262	0.0115	<0.001	<0.001
Nucleotide·diversity	GC·content	0.0094	0.0267	<0.001	<0.001
Nucleotide·diversity	Alignment·length	0.0041	0.0010	<0.001	0.019
GC·content	Alignment·length	0.0014	0.0219	0.027	<0.001

DISCUSSION

The function of the exons as coding sequences explains why they are more conserved in all the primate species and why its nucleotide diversity is half the nucleotide diversity of introns. In this case, purifying selection is stronger in exons than introns and exonic regions were smaller than introns (265 vs 6462 bp), as previous studies have showed (Hawkins, 1998; Sakharkar *et al.,* 2004). Finally, the difference found regarding the larger GC content in exons than introns also agrees with previous studies which suggest that this difference is in fact important to the definition of introns and exons during splicing (Amit *et al.,* 2012). Best-fit substitution models were simpler for exons than for introns, which again is the expected result given the smaller nucleotide diversity of the former. Indeed, if the number of changes is different in exons and introns, then the models needed to explain their evolution should be simpler.

In principle, we might expect that phylogenetic trees derived from exons should be more reliable than those estimated from introns, and in fact, many phylogenetic studies rely only on exonic regions. However, in this case I observed the opposite, as the intronic trees were closer to the putative primate tree. One explanation for this result is that the low nucleotide diversity and the short alignment length of exons limits their phylogenetic informativeness. This is congruent with exonic trees tending to have smaller branch lengths resulting in less resolved trees (Figure 10). Previous studies found correlations between parameters as GC content and alignment length (Gazave *et al.,* 2007; Zhu *et al.,* 2009), here I found that all linear correlation between any of the estimated parameters is significant, despite the low Adjusted R-squared values.

A final consideration is that it would be convenient to extend this study to the whole genome, apart from the X chromosome. It is assumed that X chromosome is the most conserved chromosome in mammals (Murphy *et al.,* 1999), so the study of other chromosomes could offer a different view. It is possible that exons from more variable chromosomes are better suited than the X chromosome exons for phylogenetic analysis.

CONCLUSIONS

1. The estimated genic features showed differences between exons and introns. The average nucleotide diversity and alignment length was significantly lower for exons than for introns. On the contrary, the GC content for exons was significantly bigger than for introns.

2. Best-fit substitution models for exons were simpler than for introns. The most frequent model for exons was K80, while for introns it was HKY. Both models imply that separate evolutionary rates for transitions and transversions should be taken into account.

3. The phylogenetic distances between the estimated trees and the putative primate phylogeny were significantly higher for exons than for introns.

4. The results suggest that in the case of the X chromosome, introns are better suited for the study of primate's evolutionary history than exons.

5. It would be convenient to extend this analysis to whole genomes, in order to obtain more general results.

LITERATURE CITED

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215:403-410.

Amit, M., Donyo, M., Hollander, D., Goren, A., Kim, E., Gelfman, S., Lev-Maor, G., Burstein, D., Schwartz, S., Potoslosky, B., Pupko, T., Ast, G. (2012). Differential GC content between exons and introns establishes distinct strageties of splice-site recognition. Cell Rep. 1(5):543-556.

Charif, D., Lobry, J.R., Necsulea, A., Palmeira, L., Penel, S., Perriere, G. (2013). Package "seqinr". Retrieved on June, 2013 from http://cran.r-project.org/web/packages/seqinr/seqinr.pdf

Flicek, P., Amode, M.R., Barrell, D., Beal, K., Brent, S., Carvalho-Silva, D., Clapham, P., Coates, G., Fairley, S., Fitzgerald, S., Gil, L., Gordon, L., Hendrix, M., Hourlier, T., Johnson, N., Kähäri, A., Keefe, D., Keenan, S., Kinsella, R., Komorowska, M., Koscielny, G., Kulesha, E., Larsson, P., Longden, I., McLaren, W., Muffato, M., Overduin, B., Pignatelli, M., Pritchard, B., Singh Riat, H., Ritchie, G.R.S., Ruffier, M., Schuster, M., Sobral, D., Tang, Y.A., Taylor, K., Trevanion, S., Vandrovcova, J., White, S., Wilson, M., Wilder, S.P., Aken, B.L., Birney, E., Cunningham, F., Dunham, I., Durbin, R., Fernández-Suárez, X.M., Harrow, J., Herrero, J., Hubbard, T.J.P., Parker, A., Proctor G., Spudich, G., Vogel, J., Yates, A., Zadissa, A., Searle, S.M.J. (2012). Ensembl 2012. Nucl. Acids Res. 40(D1): D84-D90.

Gazave, E., Marqués-Bonet, T., Fernando, O., Charlesworth, B., Navarro, A. (2007). Patterns and rates of intrón divergence between humans and chimpanzees. Genome Biol. 8:R21

Gelfman, S., Burstein, D., Penn, O., Savchenko, A., Amit, M., Schwartz, S., Pupko, T., Ast, G. (2012). Changes in exon-intron structure during vertebrate evolution affect the splicing pattern of exons. Genome Res. 22:35-50.

Gentleman, R. (2008). R Programming for Bioinformatics. USA: Chapman & Hall.

Hawkins, J.D. (1988). A survey on intron and exon lengths. Nucleic Acids Res. 16(21):9893-9908.

Koralewski, T.E., Krutovsky, K.V. (2011). Evolution of Exon-Intron Structure and Alternative Splicing. PLoS ONE. 6(3): e18055.

Krijnen, W.P. (2009). Applied Statistics for Bioinformatics using R. Retrieved on May, 2013 from http://cran.r-project.org/doc/contrib/Krijnen-IntroBioInfStatistics.pdf

Margulies, E.H., Cooper, G.M., Asimenos, G., Thomas, D.J., Dewey, C.N., Siepel, A., Birney, E., Keefe, D., Schwartz, A.S., Hou, M., Taylor, J., Nikolaev, S., Montoya-Burgos, J.I., Löytynoja, A., Whelan, S., Pardi, F., Massingham, T., Brown, J.B., Bickel, P.,

Holmes, I., Mullikin, J.C., Ureta-Vidal, A., Paten, B., Stone, E.A., Rosenbloom, K.R., Kent, W.J., Bouffard, G.G., Guan, X., Hansen, N.F., Idol, J.R., Maduro, V.V., Maskeri, B., McDowell, J.C., Park, M., Thomas, P.J., Young, A.C., Blakesley, R.W., Muzny, D.M., Sodergren, E., Wheeler, D.A., Worley, K.C., Jiang, H., Weinstock, G.M., Gibbs, R.A., Graves, T., Fulton, R., Mardis, E.R., Wilson, R.K., Clamp, M., Cuff, J., Gnerre, S., Jaffe, D.B., Chang, J.L., Lindblad-Toh, K., Lander, E.S., Hinrichs, A., Trumbower, H., Clawson, H., Zweig, A., Kuhn, R.M., Barber, G., Harte, R., Karolchik, D., Field, M.A., Moore, R.A., Matthewson, C.A., Schein, J.E., Marra, M.A., Antonarakis, S.E., Batzoglou, S., Goldman, N., Hardison, R., Haussler, D., Miller, W., Pachter, L., Green, E.D., Sidow, A. (2007). Analyses of deep mammalian sequence alignments and constraint predictions for 1% of the human genome. Genome Res. 17:760-774.

Martínez, M. (2009). R for Biologists. Retrieved on May, 2013 from http://cran.r-project.org/doc/contrib/Martinez-RforBiologistv1.1.pdf.

Murphy, W.J., Sun, S., Chen, Z-Q., Pecon-Slattery, J., O'Brien, S.J. (1999). Extensive Conservation of Sex Chromosome Organization Between Cat and Human Revealed by Parallel Radiation Hybrid Mapping. Genome Res. 9(12):1223-1230.

Nei, M., Li, W-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci.. 76(10):5269-5273.

Paradis, E. (2003). R para Principiantes. Retrieved on May, 2013 from http://cran.r-project.org/doc/contrib/rdebuts_es.pdf

Paradis, E. (2013). Package "pegas". Retrieved on June, 2013 from http://cran.r-project.org/web/packages/pegas/pegas.pdf

Paradis, E., Bolker, B., Claude, J., Sien Cuon, H., Desper, R., Durand, B., Dutheil, J., Gascuel, O., Heibl, C., Lawson, D., Lefort, V., Legendre, P., Lemon, J., Noel, Y., Nylander, J., Opgen-Rhein, R., Popescu, A.A., Shliep, K., Strimmer, K., de Vienne, D. (2013). Retrieved on June, 2013 from http://cran.r-project.org/web/packages/ape/ape.pdf

Paten, B., Herrero, J., Beal, K., Fitzgerald, S., Birney, E. (2008a). Enredo and Pecan: Genome-wide mammalian consistency-based multiple alignment with paralogs. Genome Res. 18:1814-1828.

Paten, B., Herrero, J., Fitzgerald, S., Beal, K., Flicek, P., Holmes, I., Birney, E. (2008b). Genome-wide nucleotide-level mammalian ancestor reconstruction. Genome Res. 18:1829-1843.

Posada, D., Crandall, K.A. (2001). Selecting the Best-Fit Model of Nucleotide Substitution. Syst. Biol. 50(4):580-601.

R Development Core Team. (2000). Introducción a R. Retrieved on May, 2013 from http://cran.r-project.org/doc/contrib/R-intro-1.1.0-espanol.1.pdf.

R Development Core Team. (2013). R: A Language and Environment for Statistical Computing. http://www.r-project.org./

Rogozin, I.B., Sverdlov, A.V., Babenko, V.N., Koonin, E.V. (2005). Analysis of evolution of exon-intron structure of eukaryotic genes. Brief. Bioinform. 6(2):118-134.

Sakharkar, M.K., Chow, V.T., Kangueane, P. (2004). Distributions of exons and introns in the human genome. In Silico Bio-. 4(4):387-393.

Schliep, K.P. (2013). Package "phangorn". Retrieved on June, 2013 from http://cran.r-project.org/web/packages/phangorn/phangorn.pdf

Schwarz, G.E. (1978). Estimating the dimension of a model. Annals of Statistics. 6(2):461-464.

Teufel, A., Krupp, M., Weinmann, A., Galle, P. R. (2006). Current bioinformatics tools in genomic biomedical research (Review). Int. J. Mol. Med. 17:967-973.

Tidall, J. (2001). Beginning Perl for Bioinformatics. USA: O'Reilly.

Tidall, J. (2003). Mastering Perl for Bioinformatics. USA: O'Reilly.

Zhu, L., Zhang, Y., Zhang, W., Yang, S., Chen, J-Q., Tian, D. (2009). Patterns of exon-intron architecture variation of genes in eukaryotic genomes. BMC Genomics. 10:47.

INTERACCIÓN SUELO-PLANTA EN CULTIVOS DE INTERÉS COMERCIAL

Laura Fernández Basalo.
e- mail: laurafernandezb@alumnos.uvigo.es

Trabajo Fin de Grado
Tutores:
- Elena Benito Rueda
- Pedro Pablo Gallego Veiga
Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

En este estudio se llevó a cabo un trabajo experimental para conocer el estado actual de fertilidad y calidad de suelos dedicados a cultivos de interés comercial en Galicia, como son el kiwi y la vid. Para ello se determinaron propiedades físicas, químicas y biológicas en suelos de varias fincas. Se comparó la influencia de dos manejos (convencional y ecológico) en un mismo cultivo (kiwi), y la adecuación de los dos cultivos a su medio físico. Los resultados demuestran la mejor calidad del suelo bajo manejo ecológico frente al convencional y que el clima del área de estudio es adecuado para el desarrollo de los cultivos estudiados.

INTRODUCCIÓN

La capacidad productiva de un agrosistema viene definida por las características propias de los suelos, el clima y por la correcta adecuación de las técnicas de cultivo a las condiciones medioambientales (Urbano, 2001).

La orientación del manejo de la fertilidad de los agrosistemas ha cambiado a lo largo de los años. La idea de agricultura convencional que tiene como fin principal el maximizar la producción y las ganancias, se basa en el laboreo intensivo, empleo de fertilizantes inorgánicos, monocultivos y control químico de plagas (Martínez- Núñez, 2009). La preocupación en las últimas décadas por el medio ambiente y la salud humana ha derivado en el desarrollo de sistemas agrícolas sostenibles que se preocupan por preservar la biodiversidad y la calidad del suelo, limitando el empleo de productos inorgánicos, tanto fertilizantes como fitosanitarios, y reemplazándolos por sustitutos orgánicos, como por ejemplo el compost (De la Rosa, 2008).

El suelo es un recurso no renovable a escala humana y es clave para el desarrollo de las plantas, ya que les suministra cuatro necesidades básicas: anclaje, agua, nutrientes y oxígeno, por lo que la mejora y conservación de la calidad del suelo es un aspecto clave en el manejo sostenible del mismo. La calidad del suelo puede definirse como *"la capacidad del suelo para funcionar como un sistema vivo, dentro de los límites del ecosistema, y que a su vez sea capaz de mantener la productividad biológica, la calidad ambiental y promover la salud de plantas, animales y seres humanos"* (Doran & Parkin, 1994). Este concepto tiene dos componentes: uno intrínseco asociado a las características del suelo que son más fijas y permanentes y otro dinámico, conocido como salud del suelo, que depende de las características del suelo más fácilmente modificables. La calidad dinámica, que es la que se suele evaluar, se centra en el estudio de los primeros 20-30 cm del suelo en relación al tipo de manejo, y se mide empleando varios indicadores físicos, químicos y biológicos (Imaz & Virto, 2010).

El objetivo general del trabajo es conocer el estado actual de fertilidad y calidad de los suelos dedicados a dos cultivos de gran interés comercial en Galicia como son el kiwi y la vid. Como objetivos específicos se plantearon:

a) Analizar la adecuación de los dos cultivos al medio físico en el que se desarrollan.

b) Comparar la fertilidad los suelos de ambos cultivos bajo un sistema de manejo convencional.

c) Determinar en plantaciones de kiwi el efecto de dos sistemas de manejo (convencional y ecológico) sobre la fertilidad y calidad del suelo.

Los requerimientos edafoclimáticos de los cultivos de kiwi y vid son los siguientes:

La vid (*Vitis vinífera* L.) es un arbusto de gran adaptación climática, aunque las mejores condiciones se dan en climas templados, con alta luminosidad y bajas precipitaciones.

Presenta adaptación a cualquier clase textural de suelo, siendo los suelos profundos y bien drenados los mejor adaptados. El pH óptimo se encuentra entre 5,6 y 7 (Porta *et al.,*2003).

El kiwi (*Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang et A. R. Fergunson) es una planta trepadora adaptada a climas de elevada humedad y buena luminosidad aunque no directa. Los mejores suelos son los franco-arenosos con elevados contenidos en materia orgánica, siendo su pH óptimo el comprendido entre 6 y 7 (Martínez- Núñez, 2009).

MATERIAL Y MÉTODOS

Descripción de las fincas experimentales

Este trabajo se ha realizado en tres fincas comerciales localizadas en el municipio de Tomiño (Pontevedra). Dos de las fincas están localizadas en la parroquia de Figueiró (41º58'20''N, 8º46'34''W) y se dedican al cultivo de kiwi y vid bajo un manejo convencional. Se encuentran dispuestas de manera contigua sobre pendiente, la de vid está orientada al Sur y la de kiwi orientada al Norte, asociándose a las distintas condiciones de luminosidad que necesitan. Los abonos minerales se aplican mediante fertirrigación, y se encalan para corregir el pH una vez cada tres años.

La finca de kiwi ecológico, que está situada en la parroquia de Goián (41º57'23''N, 8º46'52''W), tiene un sistema de regadío por micro-aspersión, siendo abonada con fosfatos naturales blandos, cloruro y fosfato de potasio y un compost que se produce en la propia finca. También se realiza un encalado cada tres años.

Muestreo de suelos y métodos analíticos

Las muestras de suelo se recogieron en tres sectores de cada una de las fincas, se secaron al aire y se tamizaron a través de un tamiz de 10 mm para la determinación de la distribución de agregados. Los demás análisis se realizaron sobre la fracción de suelo menor de 2 mm.

Se determinaron las siguientes propiedades físicas: análisis granulométrico para la obtención de la distribución de las partículas minerales del suelo en función de su tamaño (Guitián & Carballas, 1976) y a partir de la misma obtener la clase textural del suelo. La distribución de agregados por tamaños se realizó a través de una columna de tamices de 10, 5, 2 1, 0.25 y 0.05 mm para así obtener un diámetro medio ponderado (DMP). Se determinó la estabilidad de los macroagregados por el método de tamización en húmedo (Kemper & Rosenau, 1986). Las constantes de humedad del suelo (capacidad de campo, punto de marchitez permanente y agua útil) se determinaron con el extractor de membrana de Richards (Klute, 1986), cuyo método consiste en aplicar diferentes presiones a muestras de suelo previamente humedecidas por capilaridad y determinar el contenido en humedad de las mismas por desecación a 105ºC durante 24 horas. La densidad aparente se obtuvo recogiendo cilindros de 100 cm3de suelo en el campo (sin alterar su estructura) y determinando la masa de suelo por secado en estufa a 110 ºC hasta peso constante. Con estos datos y los de densidad real se calculó el porcentaje de porosidad total (Guitián & Carballas, 1976). Para la distribución de poros por tamaños se utilizaron las curvas de retención de agua, siguiendo la clasificación propuesta por De Leenheer (1967).

Las propiedades biológicas determinadas fueron: contenido en carbono (C) y nitrógeno (N) total de los suelos para lo cual se empleó un analizador LECO. El carbono asociado a la biomasa microbiana ($C_{biomasa}$) se determinó usando el método de fumigación-extracción con cloroformo (Vance *et al.,* 1987).

Las propiedades químicas determinadas fueron: pH tanto en agua (pH actual) como KCl (pH potencial), siguiendo el método de Guitián y Carballas (1976). Extracción de las bases de cambio por analizador ICP-

OES siguiendo el método Peech *et al.,* (1947) y determinación de Al de cambio por extracción con KCl 1M y posterior valoración con NaOH 0,01M y así con la suma de las bases y el aluminio obtener la capacidad de intercambio catiónico efectiva de los suelos. La determinación del fósforo asimilable se realizó con el método Olsen (1965) por obtención de color del complejo fosfomolíbdico empleando ácido ascórbico como reductor.

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo mediante el programa SPSS (versión 19) para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización climática y balance hídrico del área de estudio.

Para la caracterización climática del área de estudio se usaron los datos medios de precipitación y temperatura registrados durante los últimos 11 años en la estación meteorológica más próxima: As Eiras: 41º 94'N, 8º79', O Rosal (Pontevedra).

El climograma (Figura 1) nos permite concluir que el área de estudio se corresponde con un clima oceánico, con temperaturas suaves a lo largo de todo el año y precipitaciones abundantes, pero irregularmente distribuidas a lo largo del año, muy abundantes en los meses de otoño e invierno y escasas durante el periodo estival. El climograma también nos permite observar que únicamente el mes de julio se corresponde con un mes seco ya que el valor de la precipitación está por debajo de dos veces el valor de temperatura.

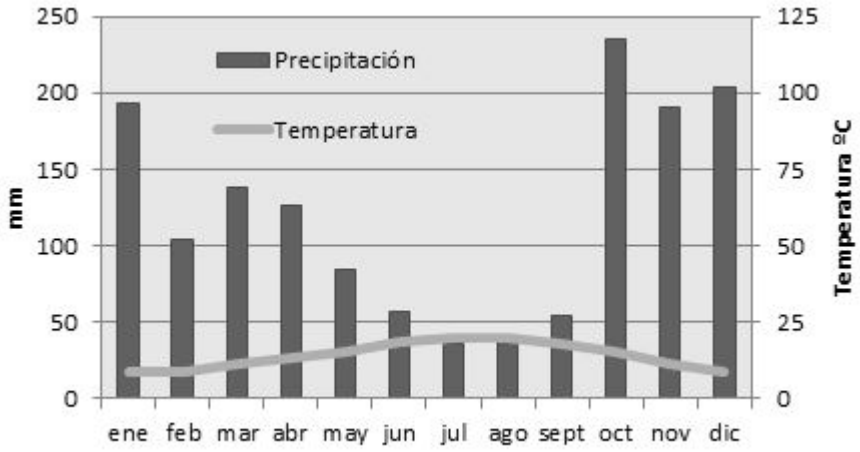


Figura 1. Climograma de la estación meteorológica Eiras-O Rosal (Pontevedra) con valores medios mensuales (periodo 2003-2013).

Por otro lado, el análisis del balance hídrico (Figura 2), que nos permite conocer la disponibilidad de agua en el suelo a lo largo del año, nos indica que la zona 1 (donde la P>ETR) es un periodo de exceso hídrico y abarca desde mediados de octubre a mediados de mayo. A partir de aquí entramos en un periodo de déficit hídrico: en una primera fase (zona 2, donde ETR>P y ETP>ETR), los cultivos todavía dispondrían de agua ya que harían uso de la reserva de agua del suelo (desde mediados de mayo a mediados de julio), mientras que durante el periodo 3 de sequía absoluta que abarca desde mediados de julio hasta finales de septiembre (80 días), las plantas ya no dispondrían de agua para su desarrollo. Este sería el periodo en el que sería necesario el riego para asegurar la disponibilidad hídrica de los cultivos.

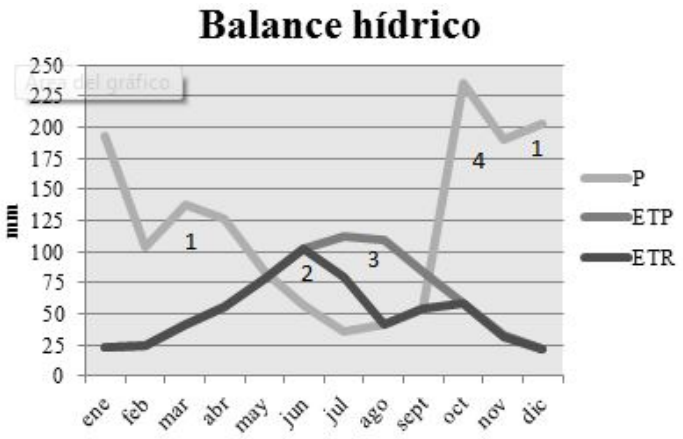


Figura 2. Balance hídrico de los suelos del área de estudio. Valores mensuales medios (periodo 2003-2013). Los números indican los cuatro periodos hídricos diferenciados a lo largo del año. P: precipitación; ETP: evapotranspiración potencial; ETR: evapotranspiración real.

Fertilidad y calidad física

Desde el punto de vista físico, el suelo debe de ser un medio que facilite el desarrollo y el crecimiento de las plantas. Debe poseer por tanto una buena aireación, una capacidad de retención hídrica adecuada y un régimen de circulación de agua que posibilite un buen drenaje, pero sin llegar a provocar un lavado excesivo (Saña Vilaseca *et al.,* 1996). Las dos propiedades físicas más determinantes son la textura y la estructura y a partir de ellas se determinan el resto.

En las tres fincas estudiadas, los suelos presentan una textura franco-arenosa (Tablas 1 y 2), con predominio de la fracción arena y una proporción muy baja de arcilla, solo se aprecian diferencias significativas en el porcentaje mayor de arcilla en vid convencional (V_{CONV}) frente a kiwi convencional (K_{CONV}).

Tabla 1. Fracciones granulométricas en las fincas de kiwi ecológico (K_{ECO}) y kiwi convencional (K_{CONV}) (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

	% Arena (2-0,05 mm)	% Limo (0,05-0,002 mm)	% Arcilla (< 0,002 mm)	Clase textural
K_{ECO}	72,85±7,76 a	17,48±6,41 a	9,67±1,61 a	Franco-arenosa
K_{CONV}	79,69±4,40 a	13,84±3,12 a	6,47±1,36 a	Franco-arenosa

Tabla 2. Fracciones granulométricas en las fincas de kiwi y vid convencional (K_{CONV},V_{CONV}) (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

	% Arena (2-0,05 mm)	% Limo (0,05-0,002 mm)	% Arcilla (< 0,002 mm)	Clase textural
K_{CONV}	79,69±4,40 a	13,84±3,12 a	6,47±1,36 a	Franco-arenosa
V_{CONV}	70,93±5,66 a	12,37±1,13 a	12,89±2,16 b	Franco-arenosa

Aunque los suelos presentan una misma textura, pueden tener propiedades físicas diferentes, y esto es debido a la distinta ordenación de sus partículas minerales y orgánicas, lo que se corresponde con la estructura del suelo. La agregación es muy débil en todos los casos debido a esa falta de fracción arcilla en los suelos, como se puede apreciar con el bajo valor de diámetro medio ponderado que presentan (Tablas 3 y 4). En cuanto a la estabilidad de estos agregados, son muy estables, asociado a los elevados contenidos en materia orgánica de las fincas, lo que favorece la formación de estructuras ‘‘migajosas’’, resistentes a la acción del laboreo y el agua (Benito & Díaz-Fierros, 1989).

Tabla 3. Diámetro medio ponderado (DMP) y % de agregados estables (AE) en las fincas de kiwi ecológico (K_{ECO}) y convencional (K_{CONV}) (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

	DMP (mm)	% AE
K_{ECO}	1,57±0,30 a	97,69±0,31 a
K_{CONV}	0,76±0,18 b	97,35±0,59 a

Tabla 4. Diámetro medio ponderado (DMP) y % de agregados estables (AE) en las fincas de kiwi y vid convencional (K_{CONV} y V_{CONV}) (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

	DMP (mm)	% AE
K_{CONV}	0,76±0,18 a	97,35±0,59 a
V_{CONV}	0,77±0,10 a	98,25±0,56 a

No se apreciaron diferencias significativas en la distribución de agregados por tamaños entre las fincas K_{CONV} y V_{CONV} (Figura 3). La mejor agregación se ha observado en la finca K_{ECO}, con un porcentaje de macroagregados significativamente más alto si se compara con la finca de K_{CONV} (75% frente a 57%) lo que se justificaría por el mayor aporte de materia orgánica al suelo con el sistema orgánico (Brown & Tworkoski, 2004).

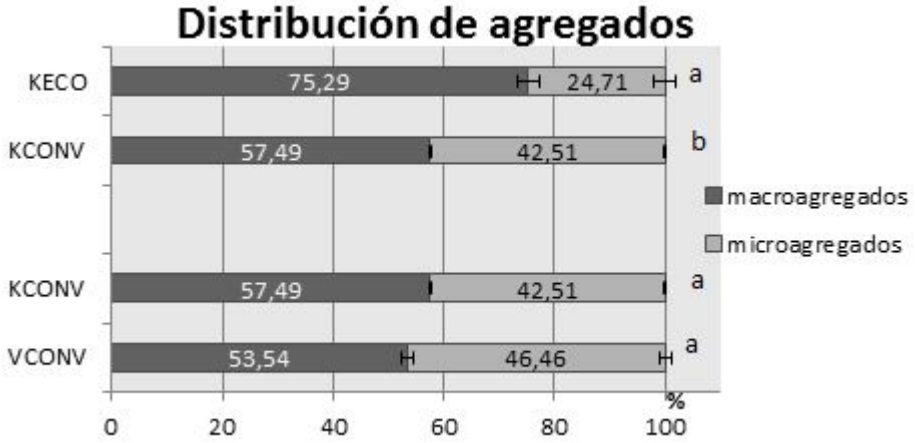


Figura 3. Porcentajes de macro y microagregados en cada una de las fincas estudiadas con su desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre manejos (K_{ECO} y K_{CONV}) o entre cultivos (K_{CONV} y V_{CONV}) (p<0,05).

Las otras propiedades físicas derivadas son la densidad aparente, la cual es baja en las tres fincas, en concordancia con la mayoría de los suelos gallegos (Varela *et al.,* 1993); esta baja densidad aparente condiciona una elevada porosidad, la cual es más elevada en la finca de K_{CONV} que en K_{ECO} (Tabla 5), pero esta última presenta una distribución más equilibrada de los poros (Figura 4), es decir de los macroporos (60%), que son los responsables de la aireación y drenaje y de los microporos (40%) que retienen el agua necesaria para el desarrollo vegetal.

Tabla 5. Valores de densidad real, densidad aparente y porosidad total en las fincas de kiwi con manejo ecológico y convencional (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

	Densidad real (g cm^{-3})	Densidad aparente (g cm^{-3})	Porosidad %
K_{ECO}	2,56±0,02 a	1,16±0,06 a	54,61±2,13 a
K_{CONV}	2,54±0,04 a	0,94±0,05 b	63,14±1,97 b

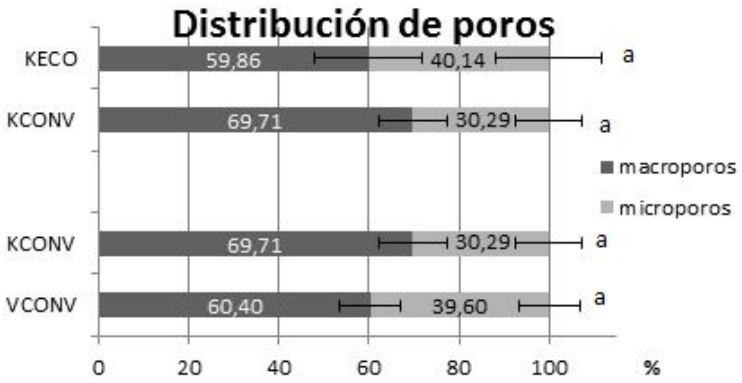


Figura 4. Distribución de los poros por tamaños en cada una de las fincas estudiadas con su desviación estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de manejos (K_{ECO} y K_{CONV}) o cultivos (K_{CONV} y V_{CONV}) ($p<0,05$).

Por otra parte, en relación con su granulometría gruesa, los suelos de las tres fincas presentan una baja capacidad de retención de agua (Tablas 6 y 7), y no se aprecian diferencias significativas entre ellas. Esta baja capacidad de retención de agua (< 40%) no supondrá una limitación importante en el suministro de agua a las plantas en la mayor parte del año, dadas las elevadas precipitaciones existentes en la zona, pero debería considerarse como el limitante físico más importante en estos suelos entre junio y septiembre, cuando el balance hídrico es negativo, siendo la planificación del sistema de regadío importante durante el periodo estival.

Tabla 6. Capacidad de campo, punto de marchitez y agua útil en las fincas con diferente manejo (K_{ECO} y K_{CONV}) (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p< 0,05$).

	CC % (v/v)	PMP % (v/v)	AU % (v/v)
KECO	38,51±9,05 a	14,05±2,94 a	24,46±6,30 a
KCONV	36,68±7,07 a	11,35±2,87 a	25,83±4,86 a

Tabla 7. Capacidad de campo, punto de marchitez y agua útil en las fincas con diferentes cultivos (K_{CONV} y V_{CONV}) (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p< 0,05$).

	CC % (v/v)	PMP % (v/v)	AU % (v/v)
KCONV	36,68±7,07 a	11,35±2,87 a	25,83±4,86 a
VCONV	46,13±4,42 a	16,00±2,39 a	30,13±2,04 a

Fertilidad y calidad biológica

La fertilidad biológica se caracteriza por la magnitud y el estado de la reserva orgánica del suelo, así como por la abundancia y actividad de la biomasa edáfica.

Los suelos de las tres fincas presentan elevados contenidos en materia orgánica, siendo la finca de V_{CONV} la que presenta el mayor contenido en carbono y, en contra de lo que se podría esperar, es la finca de K_{ECO} la que presenta el contenido más bajo (Tablas 8 y 9). Estas diferencias pueden explicarse por el uso anterior de las fincas y el tipo de manejo aplicado a cada una de ellas. Las diferencias entre K_{ECO} y K_{CONV} se explicarían por el mayor tiempo en que la finca K_{ECO} lleva dedicada a uso agrícola frente a un uso anterior forestal en la finca K_{CONV} y por el hecho de que en ésta los restos de las podas que se

realizan a lo largo del ciclo de cultivo se dejan en la superficie del suelo, mientras que en la finca K_{ECO} se retiran del suelo y se utilizan para la obtención del compost (Martínez- Núñez, 2009; Fernández Lago, 2011). Entre V_{CONV} y K_{CONV}, el mayor contenido en carbono en V_{CONV} se asociaría con el enraizamiento más profundo de la vid y por el recubrimiento herbáceo que se mantiene en la finca entre las hileras durante todo el ciclo del cultivo.

Tabla 8. Contenidos en C, N, Cbiomasa, relación C/N y relación Cbiomasa/C en las fincas de kiwi ecológico (K_{ECO}) y kiwi convencional (K_{CONV}) (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

	C (g kg^{-1})	N (g kg^{-1})	C/N	Cbiomasa (g kg^{-1})	Cbiomasa/C (%)
K_{ECO}	36,54 ± 07,67 a	3,23 ± 0,85 a	11 ± 0,56 a	0,28 ± 0,06 a	0,80 ± 0,28 a
K_{CONV}	43,47 ± 14,49 a	2,73 ± 1,05 a	16 ± 3,85 b	0,20 ± 0,03 b	0,49 ± 0,19 b

Tabla 9.Contenidos en C, N, Cbiomasa, relación C/N y relación Cbiomasa/C en las fincas de manejo convencional (K_{CONV} y V_{CONV}) (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

	C (g kg^{-1})	N (g kg^{-1})	C/N	Cbiomasa (g kg^{-1})	Cbiomasa/C (%)
K_{CONV}	43,47 ± 14,49 a	2,73 ± 1,05 a	16 ± 3,85 a	0,20 ± 0,03 a	0,49 ± 0,19 a
V_{CONV}	66,98 ± 10,75 a	3,97 ± 1,03 a	17 ± 2,30 a	0,19 ± 0,07 a	0,29 ± 0,13 a

Sin embargo, más importante que la cantidad, es la velocidad con la que evoluciona la materia orgánica y el equilibrio húmico al que tiende el agrosistema, lo que puede deducirse conociendo la relación C/N de los suelos, la cual se considera óptima en valores en torno a 10-12 (Porta *et al.,* 2003). En la tabla 8 puede verse que la relación C/N es óptima en la finca K_{ECO} por lo que es la que presenta una materia orgánica mejor humificada y en consecuencia, también una estructura del suelo mucho más desarrollada.

Por otra parte, al comparar el carbono de la biomasa microbiana, se observa que es significativamente mayor en la finca K_{ECO} que en K_{CONV}, no observándose diferencias significativas entre K_{CONV} y V_{CONV} (Tablas 8 y 9). El monocultivo extensivo, el laboreo convencional y el uso de pesticidas son considerados factores claves que reducen la biodiversidad del suelo (Paoletti, 1999).

Fertilidad y calidad química

La fertilidad química del suelo es adecuada cuando todos los nutrientes esenciales para las plantas se encuentran en él en forma asimilable y en los niveles óptimos, para que no produzcan problemas de déficit o de toxicidad. Entre los parámetros edáficos que informan sobre diferentes aspectos de la fertilidad química de los suelos hay que destacar, además de la textura, el pH y la capacidad de intercambio catiónico.

Los suelos de las tres fincas tienen un pH ácido. Esta acidez se corrige con técnicas de encalado para aproximar el pH a la neutralidad y facilitar la disponibilidad de nutrientes. En la tabla 11 puede verse como la finca V_{CONV} es la que presenta el pH agua más bajo, situándose por debajo del recomendado para el cultivo de la vid (5,6- 7,0). En las fincas dedicadas a kiwi, K_{ECO} se encuentra dentro del rango óptimo, (6-6,5) mientras que K_{CONV} presenta un pH por debajo del óptimo (Tablas 10 y 11). La diferencia entre el pH actual y potencial establece mayor riesgo de acidificación en los suelos bajo manejo convencional frente al ecológico. La razón podría explicarse por la técnica de fertirrigación que se aplica en estas fincas, ya que puede provocar el desplazamiento de los cationes básicos del complejo de cambio a la solución del suelo y su posterior lavado. También está reconocido que la aplicación intensiva de fertilizantes inorgánicos nitrogenados acidifica los suelos (Carey *et al.,* 2009; Otero *et al.,* 2010).

Tabla 10. pH en agua y en KCl en las fincas de kiwi con diferente manejo (K_{ECO} y K_{CONV}) (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

	pH agua	pH KCl	pH agua - pH KCl
K_{ECO}	6,07 ± 0,22 a	5,80 ± 0,14 a	0,27
K_{CONV}	5,64 ± 0,33 a	5,18 ± 0,44 b	0,46

Tabla 11. pH en agua y en KCl en las fincas con diferentes cultivos (K_{CONV} y V_{CONV}) (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

	pH agua	pH KCl	pH agua - pH KCl
K_{CONV}	5,64 ± 0,33 a	5,18 ± 0,44 a	0,46
V_{CONV}	5,03 ± 0,81 b	4,79 ± 0,26 b	0,24

Todas las fincas presentan valores bajos de capacidad de intercambio catiónico, debido fundamentalmente a su baja proporción de arcilla. Sin embargo, nuevamente la finca K_{ECO} presenta una CIC más elevada (15,77 cmol kg^{-1}) que las fincas con manejo convencional (11,79 y 11,58 cmol kg^{-1} respectivamente en K_{CONV} y V_{CONV}), lo que podría explicarse por la mejor calidad de su materia orgánica, con una mayor capacidad para retener nutrientes. El Ca^{2+} es el catión mayoritario en el complejo de cambio (Tablas 12 y 13). En todas las fincas está dentro de valores adecuados (Urbano, 2001), no habiendo diferencias significativas entre ellas; el Mg^{2+} tiene valores altos (Urbano, 2001) sin diferencias entre tratamientos; el K^+ presenta valores muy bajos en V_{CONV} y medios en K_{ECO} y K_{CONV}, con diferencias significativas entre V_{CONV} y K_{CONV} y por último el Na^+ presenta valores muy bajos en todas las fincas, especialmente en V_{CONV} (Urbano, 2001).

Tabla 12. Cationes de cambio en los suelos de K_{ECO} y K_{CONV} (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

	Ca^{2+} (cmol kg^{-1})	Mg^{2+} (cmol kg^{-1})	K^+ (cmol kg^{-1})	Na^+ (cmol kg^{-1})
K_{ECO}	12,91 ± 3,87 a	2,26 ± 0,52 a	0,40 ± 0,17 a	0,12 ± 0,01 a
K_{CONV}	7,97 ± 4,14 a	3,14 ± 2,28 a	0,32 ± 0,27 a	0,11 ± 0,02 a

Tabla 13. Cationes de cambio en los suelos con diferentes cultivos (K_{CONV} y V_{CONV}) (media ± desviación estándar). Letras diferentes dentro de una misma columna indican diferencias significativas (p< 0,05).

	Ca^{2+} (cmol kg^{-1})	Mg^{2+} (cmol kg^{-1})	K^+ (cmol kg^{-1})	Na^+ (cmol kg^{-1})
K_{CONV}	7,97 ± 4,14 a	3,14 ± 2,28 a	0,32 ± 0,27 a	0,11 ± 0,02 a
V_{CONV}	9,80 ± 2,63 a	1,25 ± 0,15 a	0,05 ± 0,04 b	0,09 ± 0,01 b

Los cationes intercambiables deben mantenerse dentro de unos límites en el complejo de cambio: el Ca^{2+} entre el 60 y 80% de la CIC, el Mg^{2+} entre el 10 y 20%, el K^+ entre el 2 y 6% y el Na^+ entre el 0 y 3% (Eckert, 1987). La disponibilidad de nutrientes puede considerarse óptima en la finca K_{ECO}, siendo la relación de cationes la más adecuada (81% de Ca^{2+}, 14% de Mg^{2+}, 3% de K^+ y 0,8% de Na^+), mientras que en la finca K_{CONV} hay un exceso de Mg^{2+} (27%) y en V_{CONV} un exceso de Ca^{2+} (85%) y escasez de K^+ (0,4%).

Además, para una adecuada nutrición vegetal, los diferentes cationes deben encontrarse en determinadas relaciones entre ellos (Eckert, 1987). Los resultados de la tabla 14 muestran unas relaciones Ca/Mg adecuadas en K_{ECO}, mientras que confirman que en K_{CONV} hay un exceso de Mg que puede afectar a la absorción del Ca y en V_{CONV} un exceso de Ca que puede interferir la absorción de Mg. La relación K/Mg indica que hay déficit de K en las fincas convencionales afectando a la absorción de Mg, mostrando nuevamente la finca K_{ECO} una relación adecuada.

Tabla14. Relaciones Ca/Mg y K/Mg en las fincas estudiadas (media ± desviación estándar).

	Ca/Mg	K/Mg
K_{ECO}	5,65±0,37	0,17±0,06
K_{CONV}	2,83±0,60	0,09±0,08
V_{CONV}	7,78±1,43	0,04±0,03

Por último, El P asimilable presenta valores altos en todas las fincas (Figura 5), resultado de la fertilización aplicada, siendo K_{CONV} la que presenta valores más altos asociados a una fertilización más intensa. El encalado aplicado en las fincas favorece una mayor disponibilidad del P en el suelo, ya que bajo condiciones de acidez, el P puede precipitar en forma de fosfatos y dejar de estar accesible para las plantas (Bastida *et al*., 2008).

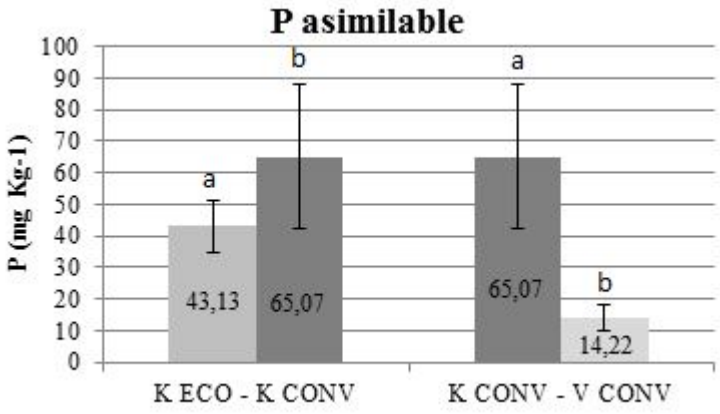


Figura 5. Contenido en Fósforo asimilable en las fincas de Kiwi ecológico (K_{ECO}), kiwi convencional (K_{CONV}) y vid convencional (V_{CONV}) con sus desviaciones estándar. Letras diferentes indican diferencias significativas entre manejos o entre cultivos ($p< 0,05$).

CONCLUSIONES

- El clima del área de estudio puede considerarse adecuado para el desarrollo de los cultivos de kiwi y vid. La principal limitación es la baja disponibilidad hídrica durante el periodo estival, por lo que se considera necesaria una buena planificación del regadío durante este periodo, sobre todo en el caso del cultivo de kiwi.
- Los suelos de las tres fincas se caracterizan por presentar una textura franco-arenosa, una elevada porosidad, y una agregación débil, pero con agregados muy estables, gracias a sus elevados contenidos en materia orgánica. Son suelos ácidos y con una baja CIC, propiedades que se mejoran con la técnica habitual de encalado, favoreciendo la disponibilidad de los diferentes nutrientes.
- La finca K_{ECO} obtiene los mejores resultados de fertilidad y calidad del suelo, con un mayor contenido en macroagregados que las otras dos fincas, una materia orgánica mejor humificada y una mayor actividad biológica. También presenta una relación adecuada entre los diferentes nutrientes, sin carencias ni déficits, confirmando las mayores ventajas del manejo ecológico frente al convencional. Las fincas convencionales presentan una peor fertilidad química, con déficits y desequilibrios de ciertos nutrientes.

BIBLIOGRAFÍA

Bastida, F., Zsolnay, A., Hernández, T., García, C. (2008). Past, present and future of soil quality índices: A biological perspective. Geoderma, 147: 159-171.

Benito, E., Díaz-Fierros, F. (1989). Estudio de los principales factores que intervienen en la estabilidad estructural de los suelos de Galicia. An. Edafol. Agrobiol. 48: 229-253.

Brown, M.W., Tworkoski, T. (2004). Pest management benefits of compost mulch in apple orchards. Agr. Ecosyst. Environ. 103: 465-472.

Carey, P., Benge, J., Haynes, R. (2009). Comparison of soil quality and nutrient budgets between organic and conventional kiwifruit orchards. Agr. Ecosyst. Environ, 132: 7-15.

de la Rosa, D. (2008). Evaluación agro-ecológica de suelos para un desarrollo rural sostenible. Madrid: Mundi-Prensa.

de Leenheer, L. (1967). Pédologie. Gand. 17: 123-152.

Doran, J.W., Parkin, T.B. (1994). Defining and assesing soil quality. En: Doran, J.W., Coleman, D.C., Bezdicek, D.F., Stewart, B.A. (Eds). Defining soil quality for a sustainable environment. Soil Science Society of America special publication 35:. 3-23.

Eckert, D.J. (1987). Soil test interpretation. Basic cation saturation ratios and sufficiency levels. Soil testing: sampling, correlation, calibration and interpretation, SSSA Special publ. 6 (cap. 6): 53-63.

Fernández Lago, M.C. (2011). Papel das miñocas na dinámica da materia orgánica e nos ciclos de nutrientes en solos de cultivo de kiwi producidos baixo tres sistemas de manexo agrícolas. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

Guitián, F., Carballas, T. (1976). Técnicas de análisis de suelos. Santiago de Compostela, Ed. Pico Sacro.

Imaz, M.J., Virto, I. (2010). Indicadores de calidad del suelo. En: Usón, A., Boixadera, J. y Martín, A. (eds.). Tecnología de suelos: estudio de casos. Prensa universitaria de Zaragoza, pp.141-155.

Kemper, W.D., Rosenau, R.C. (1986). Aggregate stability and size distribution. En: A. Klute et al. (eds.). Methods of Soil Analysis. Part 1. Physical and mineralogical methods. American Society of Agronomy, Madison, W.I., pp. 425-442.

Klute, A. (1986). Methods of Soil Analysis, part 1. Physical and mineralogical properties. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA.

Martínez Núñez, L. (2009). Caracterización del cultivo de kiwi bajo tres sistemas de cultivo (convencional, integrado y ecológico). Tesis de licenciatura, Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

Olsen, S.R., Dean, L.A. (1965). Phosphorus. En: Black, C.A. (Ed.). Methods of Soil Analysis, part 2. Chemical and Microbiological properties. American Society of Agronomy. Madison, WI, pp. 1035-1049.

Otero, V., Barreal, M.E., Martínez-Núñez L, Gallego P.P. (2010). Nutritional status of kiwifruit using organic versus conventional farming systems. Acta Hortic. 868: 155-160.

Paoletti, MG. (1999). The role of earthworms for assessmend of sustainability and as bioindicators. Agr. Ecosyst. Environ. 74: 137-155.

Peech, M., Alexander, L.T., Dean, L. , Reed, J.F. (1947). Methods of soil analysis for soil fertility investigations. U.S. Dep. Agric. Cir. 757: 25

Porta, J., López Acevedo, M., Roquero, C. (2003). Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Madrid: Mundi-Prensa.

Saña Vilaseca, J., Moré Ramos, JC., Cohí, A. (1996). La Gestión de la Fertilidad de los Suelos. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Urbano Terrón, P. (2001). Tratado de fitotecnia general. Madrid: Mundi-Prensa.

Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. Soil Biol. Biochem. 19: 703-707

Varela, C., Vázquez, C., González-Sangregorio, M.V., Leirós, M.C., Gil-Sotres, F. (1993). Chemical and physical properties of opencast lignite minesoils. Soil Sci. 156: 193-204.

PRESENCIA DE MELATONINA EN ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Antia Verde Rodríguez
e- mail: averde@alumnos.uvigo.es

Trabajo Fin de Grado
Tutores:
- Mercedes Gallardo Medina*[1]
- Jesús M. Miguez Miramontes*[2]
Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo[1]
Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud[2]
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

El presente estudio forma parte de un trabajo de una investigación cuyo objetivo es caracterizar la presencia de melatonina en vegetales y en alimentos de origen vegetal. Esta molécula tiene un carácter hormonal reconocido en animales, pero su presencia en vegetales conlleva interés debido, entre otros, a su potencial antioxidante. Los datos aportados en este estudio demuestran que existe una cantidad relevante de melatonina en legumbres y frutos secos y que su consumo puede ofrecer importantes beneficios al organismo.

INTRODUCCIÓN

Importancia fisiológica de los vegetales de la dieta

Hoy en día existe un gran consenso de que la ingesta de frutas y vegetales es muy importante para mantener una buena salud. Son alimentos vegetales aquellos que proceden de partes comestibles de algunas plantas, y básicamente se pueden dividir en dos grupos:

a) hortalizas y frutas;

b) cereales, verduras y semillas.

Las hortalizas y frutas proporcionan a la dieta elevadas cantidades de proteínas, carbohidratos y vitaminas (especialmente de los grupos A, C y E), así como minerales de gran relevancia tales como calcio y hierro. Los cereales, las verduras y las leguminosas son fuente importante de proteína vegetal y contribuyen a la formación y mantenimiento de los tejidos del organismo. Los cereales son ricos en glúcidos y suponen un gran aporte de vitaminas del grupo B. Las leguminosas, por su parte, son una de las fuentes de proteína más valiosas y complementan muy bien a las proteínas de origen animal. Además, proporcionan la mayoría de las vitaminas del grupo B (especialmente B1 y niacina), así como minerales y fibra.

Al margen de su aporte nutricional, los vegetales presentes en la dieta son importantes por el aporte de antioxidantes al organismo. Los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de retardar o prevenir la oxidación de otras moléculas cuando son expuestas a un agente oxidante. El proceso de oxidación implica la transferencia de electrones de una sustancia al agente oxidante, lo que puede llevar a producir radicales libres, que son elementos capaces de existir de forma independiente y que contienen uno o más electrones libres o no apareados. La mayoría de los radicales libres son inestables y químicamente muy reactivos por lo que comienzan reacciones en cadena que pueden llegar a dañar los componentes celulares, incluido el ADN (Apel & Hirt, 2004).

La presencia de antioxidantes permite contrarrestar tanto la formación de radicales libres como los efectos derivados de los mismos. En la actualidad se conocen cientos de tipos de antioxidantes, aunque no todos actúan de la misma forma ni con la misma capacidad. Los antioxidantes pueden ser exógenos o endógenos; los endógenos son producidos por el mismo organismo como un mecanismo de defensa intrínseco, e incluyen las enzimas y coenzimas súper oxido dismutasas, catalasas, peroxidasas, GSH y el ácido úrico. Los antioxidantes exógenos están formados por elementos de la dieta de origen natural o que

son añadidos como complemento alimenticio. Las verduras y frutas contienen más antioxidantes que cualquier otro elemento natural de la dieta, sobre todo por su aporte de vitaminas (A, C y E) con potentes propiedades antioxidantes. Su aporte mineral también contribuye a la capacidad de lucha contra la formación de radicales libres con elementos como el selenio o el zinc, que son importantes para el funcionamiento de los enzimas antioxidativos. Otro grupo importante de antioxidantes de origen vegetal son los polifenoles, que incluyen las antocianinas, las flavonas y el resveratrol. Por último, se incluye el amplio grupo de los carotenoides que tienen como elementos más destacados el licopeno y el β-caroteno (Wootton-Beard & Ryan, 2011).

En los últimos años se han descubierto en algunos alimentos otros antioxidantes no nutrientes, como es el caso de la melatonina. Esta molécula puede cruzar fácilmente las membranas celulares y la barrera hematoencefálica y posee poderosas propiedades antioxidantes (Reiter *et al.,* 1996). A diferencia de otros antioxidantes, la melatonina no experimenta un ciclo redox, es decir, no experimenta la reducción y la oxidación repetidas veces, sino que cuando es oxidada forma varios productos finales estables una vez ha reaccionado con radicales libres.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, se puede concluir que la forma más natural de suplir los antioxidantes para proteger al organismo del efecto oxidativo producido por los radicales libres, es el consumo de alimentos ricos en vitaminas, carotenoides y otras sustancias que tienen función antioxidante, incluyendo la melatonina.

La melatonina: una hormona animal presente en vegetales

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una neurohormona descubierta hace más de 50 años en la glándula pineal de los mamíferos, en la cual está presente en elevadas concentraciones (Lerner *et al.,* 1958). Inicialmente se creyó que esta estructura endocrina era la única en la que tenía lugar la síntesis de melatonina y desde la que se liberaba a la circulación sanguínea. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que también está presente en otros tejidos tales como la retina, los ovarios, el tracto digestivo y las células del sistema inmune, entre otros (Huether, 1993), sugiriéndose que en varias de esas localizaciones podría tener lugar la síntesis de la hormona aunque con niveles muy inferiores a los presentes en la glándula pineal. Además, se ha demostrado que la producción de melatonina no es algo exclusivo de los mamíferos, ya que ocurre en todos los órdenes de vertebrados, así como en muchas especies de invertebrados (Hardeland, 1999).

Síntesis de melatonina y papel fisiológico

El mecanismo bioquímico implicado en la síntesis de melatonina comienza con la hidroxilación del aminoácido L-triptófano mediante la enzima L-triptófano hidroxilasa, formándose 5-hidroxitriptófano, el cual se transforma por la acción de la enzima aminoácido aromático descarboxilasa en serotonina, principal precursor de la melatonina. En los órganos productores de melatonina, la serotonina es acetilada por la arilalquilamina N-acetiltransferasa formándose entonces N-acetilserotonina que será metilada de forma inmediata dando lugar a la melatonina (Reiter, 1991).

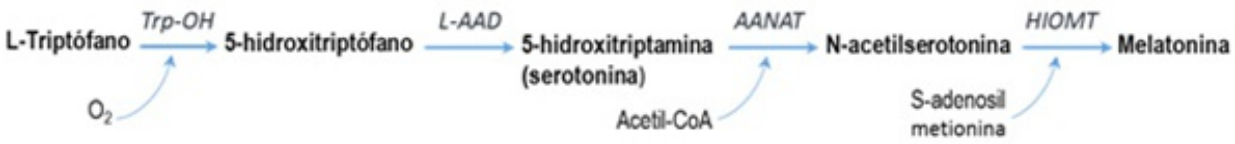


Figura1. Esquema de la ruta de la síntesis de melatonina en vertebrados. Trp-OH: Triptófano hidroxilasa; L-AAD: L-aminoácido decarboxilasa; AANAT: arilalquil amino N-acetiltransferasa; HIOMT: hidroxiindol-O-metiltransferasa

De entre las características fisiológicas de la melatonina destaca la ritmicidad diaria de sus niveles, dado que tanto a nivel de la glándula pineal como en el plasma sanguíneo, se detectan elevadas concentraciones de melatonina durante la noche y muy bajas durante el día (Reiter, 1991). Esto llevó a que muchos estudios se orientasen a investigar el posible papel regulador de esta molécula en los procesos rítmicos del organismo, tales como la reproducción en especies estacionales, la regulación de la síntesis de hormonas hipofisarias o la regulación del comportamiento, entre otros. Ya desde un primer momento se apostó por una función hormonal para la melatonina, y de hecho ésta fue totalmente demostrada al descubrirse la existencia de varios tipos de receptores para esta hormona, que median sus efectos fisiológicos a distintos niveles del organismo (Pévet, 2003).

Aunque el papel de la melatonina en el sistema circadiano es el más estudiado, se sabe que esta molécula también ejerce acciones protectoras en el organismo. La melatonina parece actuar como un agente estimulador de la respuesta inmune (Carrillo-Vico et al., 2004) y además posee una potente capacidad antioxidante, la cual puede ejercerse de dos formas:

a) Directa: la melatonina provoca un aumento de la actividad de compuestos antioxidantes, tales como el glutatión, mientras que a nivel mitocondrial incrementa la eficiencia de la cadena de transporte electrónico, lo que produce una reducción de la formación de radicales libres.

b) Indirecta: la melatonina reduce la formación de radicales libres mediante la estimulación de enzimas antioxidantes y disminuye la actividad de enzimas pro-oxidativos (Rodríguez et al., 2004)

Presencia de melatonina en plantas y en la dieta vegetal.

Aunque tradicionalmente se asoció la melatonina con el mundo animal, ya en la década de 1990 aparecieron referencias a la presencia de melatonina en organismos fotoautótrofos unicelulares. Progresivamente se ensayaron diversas metodologías de extracción y detección que permitieron demostrar la existencia de la melatonina en una gran variedad de organismos vegetales, tales como, bacterias y algas fotosintéticas, levaduras, hongos y plantas superiores (Hardeland, 1999; Reiter *et al.,* 2007). Todo ello lleva a afirmar que la presencia de melatonina en plantas es universal, dada la amplitud de especies vegetales en que ha sido detectada. Asimismo, está presente en diferentes tejidos de todas las plantas estudiadas, incluyendo hojas, tallos, raíces, frutos y semillas. Los niveles de melatonina difieren mucho entre especies y variedades de la misma planta, incluso para una misma planta entre sus diferentes órganos (raíz, tallo, semillas, etc.) abarcando desde picogramos (pg) a microgramos (µg) por gramo de tejido (Van Tassel, *et al.,* 2001; Paredes *et al.,* 2009).

La presencia de melatonina en productos de origen vegetal ha llevado a hipotetizar que su ingesta puede conllevar un aumento de la concentración de la hormona en sangre, con un efecto potencialmente beneficioso para el organismo debido a su capacidad antioxidante y a su efecto regulador sobre el sistema circadiano (García-Parrilla *et al.,* 2009). Estudios recientes han demostrado que una amplia variedad de productos de la dieta mediterránea poseen cantidades elevadas de melatonina y que ésta podría ser uno de los constituyentes que contribuyese a los beneficios de esta dieta en términos de salud. En este sentido se ha detectado la presencia de melatonina en cereales (avena, maíz, etc.), frutas (tomate, naranja, fresa, plátano, cereza, uva, etc.), aceite de oliva, legumbres, vino y carnes blancas, entre otros (Paredes *et al.,* 2009; Iriti *et al.,* 2010; van Tassel *et al.,* 2001). Para algunos de estos alimentos también se ha demostrado tanto en estudios con humanos como en roedores, que su ingesta produce un incremento de los niveles de melatonina en sangre (Reiter *et al.,* 2005; Sae-Teaw *et al.,* 2012). No obstante, las concentraciones de melatonina detectadas en estos productos vegetales varían mucho, por lo que es necesario profundizar tanto en la variedad de productos a estudiar como en los propios procedimientos analíticos que pudieran condicionar los niveles detectados de esta molécula (García-Parrilla *et al.,* 2009).

El presente estudio se enmarca en una investigación que trata de ampliar el conocimiento sobre la presencia de melatonina en muchos de los vegetales y frutas que ingerimos, incluyendo las diferentes

variedades comerciales que existen de los mismos y que están disponibles para el consumidor. En concreto, el trabajo presente tuvo por objetivo detectar y cuantificar los niveles de melatonina en dos tipos de alimentos vegetales de consumo habitual: las legumbres y los frutos secos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal

En el trabajo experimental se utilizó material vegetal de dos tipos: por un lado, distintos frutos secos, tales como nuez (*Juglans regia* L.), almendra (*Prunus dulcis*), pistacho (*Pistacea vera* L.), calabaza (*Curcubita sp.*), avellana (*Corylus avellana*), cacahuete (*Arachis hypogaea*) y anacardo *(Anacardium occidentale*), todos ellos obtenidos de fuentes comerciales. En el caso de la nuez, se incluyeron ejemplares de tres variedades de nuez: *Pizarro* (España), *Franquette* (Francia), *Hartley* (California, Estados Unidos). Además, se incluyó una variedad de nuez de procedencia autóctona (A Estrada, Galicia) y otra de procedencia iraní. Una vez en el laboratorio, los frutos se mantuvieron a 20-25ºC y permanecieron aislados de la luz directa.

Por otro lado, se usaron diversos tipos de semillas de la familia de las leguminosas (Fam. Fabaceae) habituales en nuestra dieta, como es el caso de la lenteja *(Lens culinaris* Medik), el guisante (*Pisum sativum* L.), la alubia blanca (*Phaseolus vulgaris* L.), el garbanzo (*Cicer arietinum* L.; variedad denominada *Pedrosillano*), la soja verde (*Vigna radiata* L.) y las variedades de judía negra y blanca (*Phaseolus vulgaris* L.; variedades *Tolosana* y *Cocco Blanc enana*, respectivamente). Todas ellas se obtuvieron de fuentes comerciales o directamente del recolector, como fue el caso de la alubia blanca o el garbanzo pedrosillano que fueron adquiridos directamente a productores tras su cosecha en el campo. El almacenaje de dichas semillas se realizó a temperatura de 4ºC y en oscuridad.

Procesamiento y extracción de muestras

Frutos secos

El material de los frutos secos es complejo para el análisis debido a su gran contenido oleoso, lo que dificultó el procesamiento inicial. En el caso de la nuez, se procedió a la rotura del endocarpio y a la extracción de la semilla, lo cual no fue necesario en el resto de los frutos secos (almendra, avellana, piñón, etc.). En todos ellos se pesó un gramo del material vegetal que se trituró en mortero con 7 mL de una disolución de hexano:metanol:agua (3:3:1 v:v), hasta obtener la completa disgregación del tejido. Los homogenados se pasaron a tubos y se mezclaron durante 10 min mediante un agitador orbital, tras lo que se centrifugaron a 4400 rpm durante 30 min, a 20ºC. Tras ello se eliminó por aspiración la fase de hexano y se tomó un volumen de 1 mL del sobrenadante o fase hidroalcohólica (metanol/agua). Esta fase se secó en un sistema de speed-vac (Eppendorf Concentrator plus) a 30ºC, durante aproximadamente 2 horas y 30 min, tras lo cual se procedió a resuspender las muestras en 300 µL de tampón fosfato 0.1 M pH 6.4.

La extracción final de la melatonina se llevó a cabo mediante cloroformo, solvente usado de forma rutinaria para dicho proceso (Muñoz et al., 2009). A cada tubo de muestra se le añadió 1 mL de cloroformo, se agitó durante 2 min y se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 min. Tras ello, se eliminó la fase acuosa mediante aspiración y a la fase clorofórmica restante se le añadieron 250 µL NaOH 0.1 N, se agitó durante 1 min y se centrifugó en las mismas condiciones descritas anteriormente. Se eliminó de nuevo la fase acuosa y el solvente orgánico se secó durante 30 min en el speed-vac a 30ºC. Una vez que las muestras estuvieron completamente secas, se resuspendieron en 100 µL de una solución de metanol:agua al 50% (v:v), se agitaron durante 1 min y se filtraron a través de filtros de 0.20 µm de tamaño de poro. Un volumen de 10 µl de cada muestra se utilizó para el análisis en HPLC.

Legumbres

Para la extracción de la melatonina contenida en las semillas de leguminosa se procedió al pesado de

2.5 gramos de cada una de ellas y a continuación a su trituración en molinillo eléctrico. Tras ello se depositaron en un mortero junto con 7.5 mL de acetonitrilo al 5% acidificado con ácido fórmico (pH 2.5), procediéndose a su homogenización hasta formar una mezcla que se trasladó a tubos de centrífuga. Estos se centrifugaron a 4400 rpm durante 25 minutos, a una temperatura de 4ºC, lo que permitió obtener un sobrenadante del que se tomaron alícuotas de 1 mL que fueron almacenadas a -80ºC. En el día del análisis, se procedió a mezclar el sobrenadante (1 ml) con cloroformo (4 mL) en tubos de centrífuga herméticos y se continuó la extracción de modo similar a lo indicado para los frutos secos. Finalmente las muestras se secaron en speed vac y se resuspendieron mediante agitación en 100 µL de acetonitrilo 5% acidificado con ácido fórmico. Una alícuota de 20 µL de cada muestra se usó para el análisis en HPLC.

Análisis de melatonina mediante HPLC con detección de fluorescencia.

Se utilizó una técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección de fluorescencia. El equipo cromatográfico estuvo formado por un módulo HPLC Hewlett-Packard serie 1100 equipado con bomba cuaternaria (módulo HP G1311A) conectada a un sistema de desgasificación (módulo HP G1322A) y a una válvula de inyección de muestra (HP C13228A; 20 µL), todo ello acoplado a un detector de fluorescencia (módulo HP G131A) en el que se fijaron las longitudes de onda necesarias para la detección de melatonina (280 nm de excitación y 340 nm de emisión). La separación de la melatonina se realizó mediante una columna de fase inversa de la marca Phenomenex (Kinetex C18, 7.5 cm ancho x 2.6 µm de diámetro, 100 Å de diámetro de poro) y bajo la influencia de un gradiente de fase móvil formada por la mezcla de dos soluciones: A: acetonitrilo:agua (60:40 v:v) y ácido fórmico 0.1%; B: agua con ácido fórmico 0.1%. Durante el análisis ambas soluciones se mezclaron de forma programada, de tal manera que se comenzó el análisis (0 min) con una proporción de 15% de A y 85% de B, alcanzando en el minuto 15 del análisis, la proporción de 60% de A y 40% de B. Desde el minuto 15 al minuto 20, la proporción de la mezcla se programó de forma que se retornó a los porcentajes iniciales. Todo el análisis se realizó a temperatura ambiente y con un flujo de 1 mL/min. Finalmente, la señal generada por el detector fue adquirida gracias al sistema informático HP1100 ChemStation que también facilitó la integración de los picos cromatográficos.

RESULTADOS

Aspectos metodológicos

En el estudio se realizaron distintas pruebas para la puesta a punto de los métodos de extracción de melatonina y de la metodología de HPLC. En el caso de la preparación de la muestra, los métodos de procesado y extracción que se han descrito anteriormente dieron buenos resultados en términos de linealidad de respuesta ante diferentes concentraciones de melatonina presentes en las muestras y reproducibilidad entre los días de análisis. En el caso de los frutos secos, el rendimiento del proceso de extracción con la mezcla hexano:metanol:agua fue de aproximadamente el 60%, mientras que para las legumbres (extracción directa en cloroformo) el porcentaje de recuperación ascendió al 91%. Por otro lado, en la Figura 2 se muestra un ejemplo de cromatograma obtenido a partir de la inyección de un patrón de melatonina (A) y de un extracto de garbanzo, en los que se puede apreciar la buena resolución de la técnica empleada y la no existencia de interferencias en el tiempo de retención de melatonina (aprox. a 8.6 min).

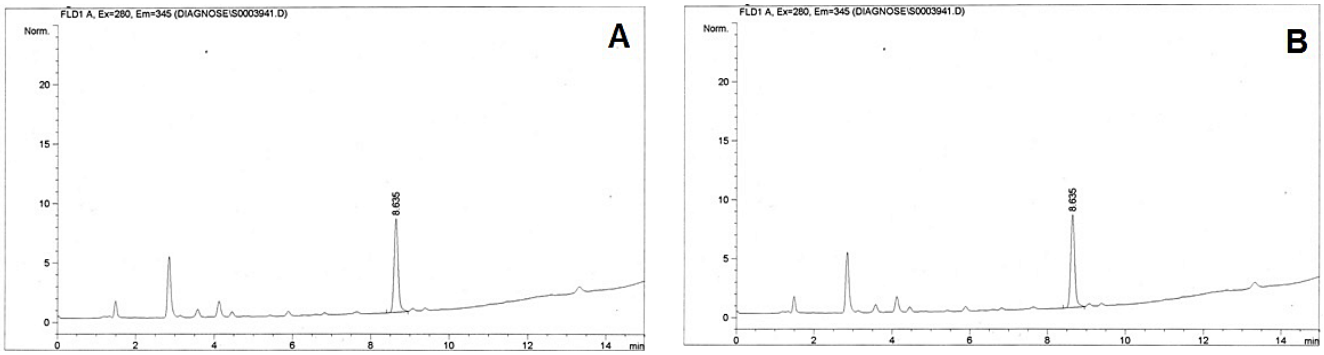


Figura 2. Cromatogramas obtenidos mediante la técnica de HPLC en gradiente. (A) patrón de melatonina (200 pg); (B) extracto de muestra de garbanzo.

Niveles de melatonina en frutos secos

Los niveles de melatonina medidos en las diferentes variedades de nuez se muestran en la Tabla 1. Tal y como se puede observar, existe una fuerte variación en los niveles de melatonina, siendo la nuez California la que presentó los máximos valores (alrededor de 3.6 ng/g de tejido), seguida de la variedad autóctona gallega (alrededor de 2.5 ng/g tejido). Las demás variedades analizadas mostraron niveles por debajo de 1.5 ng/g de tejido.

Tabla 1. Niveles de melatonina en nueces de diferentes variedades comerciales o procedencias. Los datos representan la media ± EEM de 3-6 muestras

Nuez (variedad o procedencia)	Melatonina (pg/g peso seco)
Nuez, variedad *California*	3669 ± 1404
Nuez, variedad *Pizarro*	1086 ± 164
Nuez variedad *Francia*	1402 ± 193
Nuez, procedencia autóctona	2531 ± 897
Nuez de procedencia iraní	419 ± 12

Con respecto a los demás frutos secos que se usaron en el estudio (Tabla 2) se observaron niveles de melatonina que fueron en general inferiores a los de la nuez y oscilaron en un rango de 1400 pg/g (castaña) a 200 pg/g de tejido (anacardo). En orden decreciente, el contenido de melatonina en los diferentes tipos de frutos secos se situó así: castaña >almendra>pistacho > piñón > cacahuete> avellana> calabaza > anacardo.

Tabla 2. Niveles de melatonina medidos en diferentes tipos de frutos secos. Los datos representan la media ± EEM. Entre paréntesis se indica el número de muestras analizadas.

Fruto seco	Melatonina (pg/g peso seco)	Fruto seco	Melatonina (pg/g peso seco)
Avellana	369 ± 186 (n=7)	Castaña	1417 ± 334 (n=4)
Pistacho	990 ± 385 (n=7)	Piñón	747 ± 112 (n=3)
Almendra	1064 ± 356 (n=7)	Calabaza	533 ± 162 (n=7)
Cacahuete	589 ± 339 (n=6)	Anacardo	208 ± 59 (n=6)

Niveles de melatonina en legumbres

En la Figura 3 se presentan los valores de melatonina obtenidos en distintas semillas secas de un grupo variado de leguminosas. Como podemos observar los niveles oscilaron en un amplio rango, desde los 600 pg/g en el caso del garbanzo, hasta los 80 pg/g obtenidos para la variedad de judía negra. El resto de semillas mostraron niveles de melatonina intermedios de aproximadamente 200 pg por gramo de peso seco.

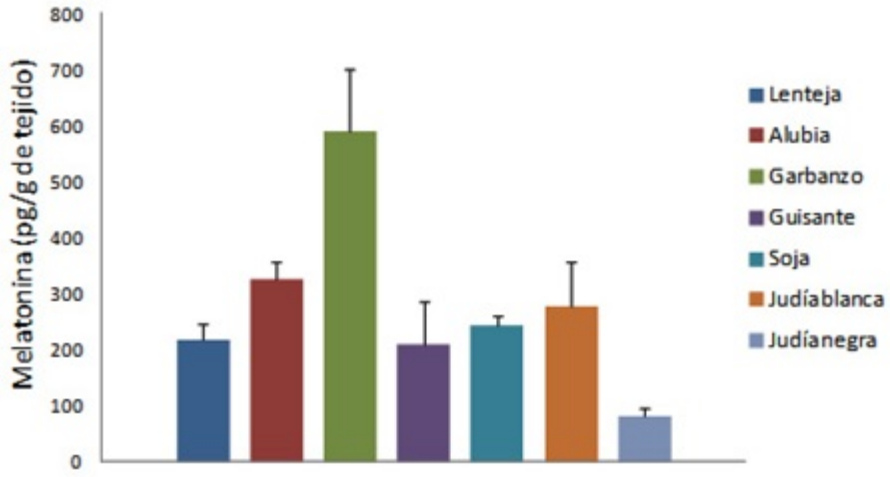


Figura 3. Contenido de melatonina en las distintas semillas de leguminosas estudiadas. Las barras representan la media ± SEM de 6 muestras en todos los casos, excepto en garbando donde el número de réplicas fue de 12.

DISCUSIÓN

La presencia de melatonina en plantas ha sido objeto de numerosos estudios en una amplia variedad de especies y en diferentes partes de la planta (Manchester et al., 2000; Kolar & Machackova, 2005; Reiter *et al.,* 2007). Para su cuantificación se han empleado diferentes técnicas, tales como radioinmunoensayo, enzimoinmunoensayo y cromatografía de alta resolución (líquidos y gases). En este estudio se procedió a la adaptación de las técnicas de medida de melatonina mediante HPLC aplicadas previamente en animales (Muñoz *et al.,* 2009), lo que ha permitido establecer un método de gran sensibilidad y buena linealidad en la respuesta a un amplio rango de concentraciones de melatonina, lo que permite su aplicación a diferentes tipos de muestras. Dada la complejidad del tejido analizado, se hizo necesario un procesamiento de las muestras con solventes orgánicos que, por un lado tengan capacidad de recuperar la melatonina de la muestra y, por otro lado, contribuyan a su aislamiento. En el caso de los frutos secos (especialmente en la nuez) el solvente que presentó los mejores resultados fue la mezcla de hexano:metanol:agua seguido por una extracción en cloroformo, mientras que para las legumbres, se usó directamente el cloroformo para la extracción de la melatonina. En general se obtuvieron cromatogramas limpios y el rendimiento del proceso de extracción fue elevado (alrededor del 60% para frutos secos, 90% para legumbres) lo que añadió precisión al análisis de muestras.

Los niveles de melatonina detectados en la nuez presentaron una fuerte variabilidad entre muestras, aunque los valores medios fueron similares a los descritos por otros autores (Reiter *et al.,* 2005). Asimismo, hemos constatado que existe una gran variabilidad según la variedad de nuez estudiada. Entre las nueces más comunes a nivel comercial, la de la variedad *Hartley* (California) fue la que presentó mayores niveles de melatonina, seguido por una variedad no catalogada de nuez autóctona. Estas diferencias entre tipos de nuez pueden ser debidas a la propia constitución del vegetal, aunque también es posible que influyan el momento anual de recolección, el tiempo pasado desde la cosecha o las condiciones de conservación. También hemos determinado la presencia de melatonina en otros frutos secos, tales como la avellana, el piñón, la castaña, el cacahuete, etc., todos ellos conteniendo menores concentraciones de melatonina que la nuez.

Con respecto a las semillas de leguminosas (lenteja, alubia, garbanzo, guisante, soja verde, judía negra y judía blanca), todas mostraron presencia de melatonina, situándose los niveles entre 80 pg y 600 pg/g de peso seco. Las semillas de garbanzo (variedad *pedrosillano*) fueron las que mostraron valores más elevados mientras que la judía negra presentó los más bajos.

La melatonina es una molécula con alto poder antioxidante (Paredes *et al.,* 2009) lo que ha llevado a muchos autores a especular con la importancia que puede tener el aporte de melatonina debido al consumo de productos vegetales, especialmente de aquellos presentes en la dieta mediterránea rica en verduras y frutas, y ampliamente reconocida por sus propiedades saludables. Los estudios relativos a la importancia que puede tener la dieta vegetal rica en melatonina para los niveles de melatonina presentes en el organismo humano son todavía muy escasos (Sae-Teaw *et al.,* 2012) y a nivel experimental, se ha descrito que el aporte de frutos secos en la dieta administrada a roedores provocó un aumento de los niveles circulantes de melatonina, en relación con animales alimentados con dieta estándar, paralelamente a un aumento de la capacidad antioxidante en el plasma sanguíneo (Reiter *et al.,* 2005; Sae-Teaw *et al.,* 2012). A tenor de los datos del presente estudio, y teniendo en cuenta que los vegetales y frutos secos pueden estar presentes en grandes cantidades en una dieta humana normal, se concluye que el contenido en melatonina tanto en frutos secos como en las legumbres de la dieta puede ser relevante como fuente exógena de antioxidantes para el organismo, con los correspondientes efectos beneficiosos para la salud.

BIBLIOGRAFÍA

Apel, K., Hirt, H. (2003) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 373-399.

Carrillo-Vico, A., Calvo, J.R., Abreu, P., Lardone, P.J., García-Maurino, S., Reiter, R.J., Guerrero, J.M. (2004). Evidence of melatonin synthesis by human lymphocites and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. FASEB J. 18: 537-539.

García-Parrilla, M.C., Cantos, E., Troncoso, A.M. (2009). Analysis of melatonin in foods. J. Food Comp. Anal. 22: 177-183.

Hardeland, R. (1999). Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans. Reprod. Nutr. Dev. 39:399-408.

Huether, G. (1993) The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. Experientia 15: 665-670.

Iriti, M., Varoni, E.M., Vitalini, S. (2010). Melatonin in traditional mediterranean diets. J. Pineal Res. 49:101-105.

Kolar, J., Machackova, I. (2005). Melatonin in higher plants: occurrence and possible functions. J. Pineal Res. 39: 333-341.

Lerner, A.B., Case, J.D., Takahashi, Y., Lee, T.H., Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J. Am. Chem. Soc. 80: 2587

Manchester, L.C., Tan, D.X., Reiter, R.J., Park, W., Monis, K., Qi, W. (2000). High levels of melatonin in the seeds of edible plants: possible function in germ tissue protection. Life Sci. 67: 3023-3029.

Muñoz, J.L.P., Ceinos, R.M., Soengas, J.L., Míguez, J.M. (2009). A simple and sensitive method for determination of melatonin in plasma, bile and intestinal tissues by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. B 977: 2173-2177.

Paredes, S.D., Korkmaz, A., Manchester, L.C., Tan, D.X., Reiter, R.J. (2009). Phytomelatonin: a review. J. Exp. Bot. 60: 57-69.

Pévet, P. (2003). Melatonin: from seasonal to circadian signal. J. Neuroendocrinol. 15: 422-426.

Reiter, R.J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocr. Rev. 12: 151-180.

Reiter, RJ. (1996). Functional aspects of the pineal hormone melatonin in combating cell and tissue damage induced by free radicals. Eur. J. Endocrinol. 134: 412-420.

Reiter, R.J., Tan, D.X. (2002). Melatonin: an antioxidant in edible plants. Ann. N Y. Acad. Sci. 957: 341-344.

Reiter, R.J, Manchester, L.C., Tan, D.X. (2005). Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. Nutrition 21: 920-924.

Reiter, R.J., Tan, D.X., Manchester, L.C., Simopoulos, A.P., Maldonado, M.D., Flores, L.I, Terron, M.P. (2007). Melatonin in edible plants (phytomelatonin): Identification, concentrations, bioavailability and proposed functions. World Rev. Nutr. Diet. 97: 211-230.

Rodríguez, C., Mayo, J.C., Sainz, R.M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., Reiter, R.J. (2004). Regulation of antioxidants enzymes: a significant role for melatonin. J. Pineal Res. 36: 1-9.

Sae-Teaw, M., Jonhs, J., Johns, N.P., Subongkot, S. (2012). Serum melatonin levels and antioxidant capacities after consumption of pineapple, orange, or banana by healthy male volunteers. J. Pineal Res. 55: 58-64.

Van Tassel, D.L., Roberts, N., Lewy, A., O'Neill, S.D. (2001). Melatonin in plant organs. J Pineal Res. 31:8–15.

Wootton-Beard, P.C., Ryan, L. (2011) Improving public health?: The role of antioxidante-rich fruit and vegetable beverages. Food Res. Int. 44: 3135-3148.

DETECCIÓN DE NCAM Y PSA COMO POSIBLE BIOMARCADOR DE CÁNCER COLORRECTAL

Jonatan Reboredo- Durán & Fátima Núñez Baz
e- mail: jonreboredo@uvigo.es, fanunez@alumnos.uvigo.es

Trabajo Fin de Grado
Tutores:
- Emilio Gil Martín
- Almudena Fernández Briera
Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

El conocimiento de la bioquímica celular y, en concreto, los avances de la bioquímica estructural y funcional de las proteínas que permiten la unión y adhesión entre las células (*Cell Adhesion Molecules* o CAM) ,como es el caso de la Molécula de Adhesión de las Células Neurales (NCAM), ha permitido dilucidar el importante papel desempeñado por esta proteína (y otras CAM) en el cáncer colorrectal (CCR). En este orden de cosas, la especifidad y versatilidad de técnicas clásicas de la biología celular (inmunohistoquímica), unidas a la potencia de otras más recientes surgidas del espectacular desarrollo de la biología molecular (*western blot*, proteómica), constituyen un conjunto de herramientas de enorme utilidad para conocer en detalle la estructura y función de la NCAM, así como para explorar la posible utilidad de esta proteína como biomarcador tumoral del CCR.

Palabras clave: *NCAM, PSA, inmunoblot, cáncer de colon.*

INTRODUCCIÓN

Las células que componen los tejidos mantienen su estructura gracias a la interacción de las Moléculas de Adhesión Celular (CAM). Gracias a la acción de estas proteínas se establece una extensa red de contactos intercelulares, que apuntalan y sustentan los tejidos (Wilson, 1907).

Un miembro destacado de este grupo es la Molécula de Adhesión de las Células Neurales (conocida como NCAM o CD56), aislada y caracterizada por Brackenbury y Thiery en dos estudios independientes (Thiery *et al.,*1977; Rutishayser *et al.,*1978). La NCAM interviene en una gran variedad de eventos celulares, como ponen de manifiesto múltiples trabajos publicados en los últimos años (Berezin, 2010). Por sus características estructurales la NCAM pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), la familia proteica de mayor amplitud en el genoma humano.

Estructura y expresión del gen codificante para la NCAM

La proteína NCAM es codificada por un único gen, que se encuentra en la banda q23 del cromosoma 11 en el genoma humano (Nguyen *et al.,*1986). Este gen sufre un proceso de splicing del que surgen varias isoformas con características diferentes (Barton *et al.,*1990), que se identifican por sus respectivas masas moleculares aparentes; 120 kDa, 140 kDa y 180 kDa. La organización de los exones del gen para la NCAM está muy relacionada con la estructura por dominios de la molécula (Owens *et al.,*1987). Así, el gen, con una longitud de 314 kb, consiste en 25 exones, de los cuales 19 son los más importantes para generar la estructura de las 3 isoformas principales anteriormente citadas; 15 de ellos (del 0 al 14) codifican la expresión del dominio extracelular, que es idéntico en todas las isoformas. La expresión del exón 15, por su parte, da lugar a la formación de un péptido de 725 aminoácidos exclusivo de la isoforma de 120 kDa del que depende su anclaje a la membrana, ya que esta isoforma tiene la peculiaridad de presentarse unida a la membrana a través de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Para la formación de las isoformas de mayor peso molecular es necesaria la transcripción alternativa de los exones 16-19, que codifican para la parte intracelular de la NCAM. De este modo, el exón 16 codifica para la porción de

transmembrana de la proteína y el exón 17 para la cola citoplasmática, ambos expresados en las isoformas de 180 kDa y de 140 kDa. La expresión del exón 18 (genera 950 aa) es exclusivo de la isoforma de 180 kDa y produce una cola citoplasmática que interacciona con el citoesqueleto. El exón 19, sin embargo, codifica para el extremo N-terminal de ambas isoformas de la proteína.

Modificaciones post-traduccionales de la NCAM

Esta proteína habitualmente sufre procesos de glicosilación, esto es, la unión mediante enlaces covalentes de glúcidos (Figura 1A). Las enzimas encargadas de catalizar este tipo de uniones son las glicosiltransferasas (GT) (Rademacher *et al.,*1988). Las glicoproteínas son, por lo tanto, heteroproteínas con una fracción proteica y una fracción glucídica, entre las cuales se distinguen dos tipos dependiendo de la clase de unión entre péptido y glúcido: N-glicoproteínas si la unión se produce a través de un enlace N-glicosídico con el grupo amida de la cadena lateral de un residuo de asparagina y O-glicoproteínas si la unión se establece con el grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de serina o de treonina.

Durante su biosíntesis la molécula de NCAM sufre también otros tipos de modificaciones postraduccionales como sulfatación, fosforilación y palmitoilación (Figura 1A). Sin embargo, de todas las modificaciones que experimenta esta proteína la más peculiar es la polisialilación, esto es, la adicción de un homopolímero líneal de residuos de ácido N-acetilneuramínico unidos por enlaces alpha–(2,8), llamado ácido polisiálico (PSA).

La molécula de PSA es un polisacárido no ramificado con características hidrofílicas y una alta densidad de carga negativa, así como de grupos neutros, todo lo cual le confiere una alta capacidad de retención de agua. Como consecuencia de ello aumenta significativamente el radio hidrodinámico de la proteína y al mismo tiempo se reduce su potencial de establecimiento de uniones intercelulares a causa de impedimento estérico y repulsión electrostática (Figura 1C).

Las enzimas poliasiltransferasas encargadas de este proceso de polisialilación de la NCAM son las glicosiltransferasas ST8Sia II (STX) y ST8Sia IV (PST) (Nakayama *et al.,*1998). Estudiando sus requerimientos y modo de acción se ha llegado a la conclusión de que el grado de polisialilación del PSA es regulado según el ambiente celular y las condiciones del tejido.

La NCAM contiene seis secuencias consenso (N1-N6) susceptibles de sufrir N-glicosilación. La polisialilación está confinada a los dominios Ig 3, Ig 4 e Ig 5 de la proteína (Figura 1A), mientras que Ig 1, Ig 2, FN III1 y FN III2 no son glicosilados, a excepción de un enlace O-glicosídico en la región MSD1 (situado entre las repeticiones FN) (Von der Ohe *et al.,* 2002).

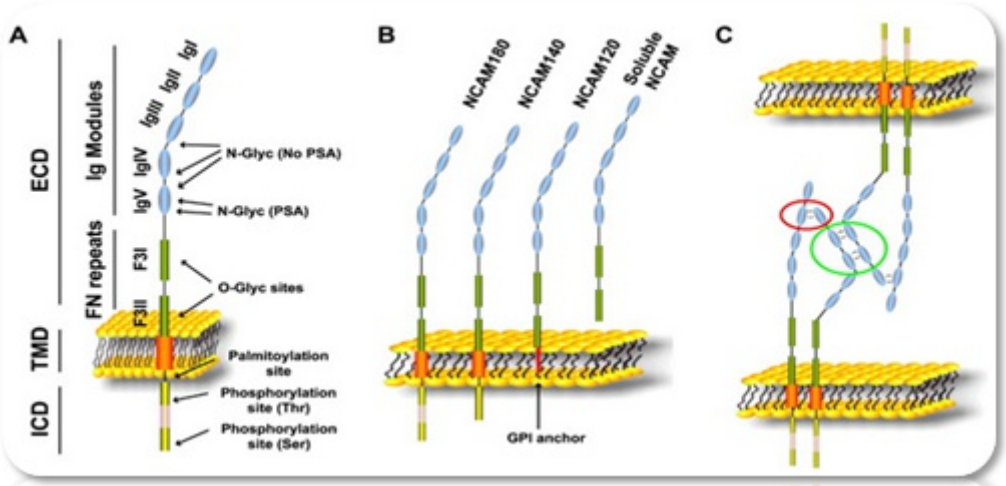


Figura 1. Representación estructural de la NCAM (Gascon *et al.*, 2007). A) Estructura por dominios de la NCAM (izquierda) y modificaciones post-traduccionales (derecha) que se encuentran en el núcleo de la proteína NCAM. B) Estructura molecular de las principales isoformas de la NCAM incluyendo los diferentes tipos de unión a la membrana celular de cada una. C) Unión homofílica de dos células (trans) por mediación de la NCAM. ECD: extracellular domain; TMD: transmembrane domain; ICD: intracellular domain.

Relación de la NCAM y de su estado de polisialilación con el cáncer colorrectal

El CCR es la segunda neoplasia con mayor tasa de mortalidad entre la población europea, tanto en hombres como en mujeres (por detrás de pulmón y mama, respectivamente). La tasa de morbimortalidad se ve mermada si su detección ocurre en estadios tempranos de la enfermedad (Ferlay *et al.,* 2013).

Los cambios en las propiedades adhesivas célula-célula y de adhesión a la matriz extracelular están implicados en la progresión tumoral. Numerosos estudios en este sentido corroboran que las alteraciones en los niveles y función de las moléculas de adhesión o de las proteínas que median entre las células y la matriz extracelular, están asociadas con la invasión cancerígena y la metástasis (Cavallaro, 2004). Así, por ejemplo, a lo largo de los últimos años se han acumulado evidencias que confirman fehacientemente la relación entre el alto contenido de PSA en NCAM y el potencial maligno de ciertos tipos de células tumorales (Rutishauser, 2008; Seifert *et al.,* 2012). No obstante lo anterior, hasta la fecha no existen muchos estudios sobre la relación de NCAM y PSA con el CCR, así como tampoco sobre la identificación de las diferentes isoformas de NCAM que se expresan en el tejido colorrectal.

El patrón de expresión de la NCAM en CCR parecía adaptarse al de un supresor tumoral, ya que el desarrollo del carcinoma de colon parece estar acompañado de una disminución de la expresión de la NCAM de 180 kDa en las células tumorales, lo que, además, se ha podido correlacionar con un aumento de la agresividad clínica de la enfermedad debido a la pérdida de adhesividad entre las células tumorales.

En concreto, se ha encontrado que la isoforma de 180 kDa está presente en el tejido sano y que se encuentra ausente en carcinomas de colon clínicamente agresivos (Roesler *et al.,* 1997; Huerta *et al.,* 2001). De acuerdo con lo anterior, los pacientes que expresan la isoforma de NCAM de 180 kDa presentarían una buena progresión como consecuencia de la preservación del potencial adhesivo de las células mediado por esta proteína. La caída de expresión, *down-regulation*, de la NCAM en el tejido tumoral de CCR se debe a un mecanismo de *splicing* alternativo que trunca la secuencia de ARNm de la NCAM entre los exones 12 y 13 (Huerta *et al.,* 2001). Debido a este proceso la molécula sufre un corte selectivo entre las dos repeticiones Fn III y pierde el ectodominio. Este fenómeno conduce a la liberación de un fragmento soluble de la NCAM, cuyo potencial como marcador de algunas formas agresivas del CCR espera aún ser estudiado en profundidad. Pese a los pocos estudios realizados sobre el papel de la NCAM en el CCR, no faltan resultados contradictorios entre los trabajos de diferentes autores. Es el caso, por ejemplo, de un estudio con pacientes afectados por CCR en el que no se pudo demostrar la relación de la regulación a la baja de la isoforma de 180 kDa de la NCAM con un aumento de la malignidad (Tascilar *et al.,* 2007).

Estudios posteriores sobre la expresión conjunta de PSA y NCAM en biopsias de pacientes afectados de CCR han encontrado que en una mayoría de casos aparece una correlación positiva entre la expresión de la proteína y su grado de polisialilación tanto en el tejido sano como tumoral, así como que en este último una regulación al alza o *up-regulation* de ambas (Fernández-Briera *et al.,* 2010). Estos primeros resultados acercan el comportamiento de la PSA-NCAM en el CCR al reportado en otras neoplasias (pulmón, tiroides, etc), en las que la sobreexpresión de la proteína y el aumento de su grado de polisialilación contribuyen favorablemente a la dispersión de las células tumorales (y, por tanto, a la malignidad del proceso canceroso) al debilitar los contactos intercelulares.

Objetivos

La disponibilidad clínica de biomarcadores que permitan un diagnóstico precoz del CCR reviste una gran importancia debido a que la alta mortalidad de esta enfermedad es consecuencia de su detección habitual en estadios de desarrollo tumoral avanzados.

Es un hecho sabido que en la biología del cáncer determinadas proteínas desempeñan funciones de una gran relevancia en el control de la bioquímica celular y, por lo tanto, en el origen y progresión de la neoplasia. En este ámbito, la oncología molecular ha puesto de manifiesto a lo largo de los últimos años la especial importancia de las CAM, ya que controlan el establecimiento de uniones entre las células y además participan en procesos de señalización química entre las células y su microentorno.

Dentro de la familia de las CAM, el área de glicobiología del grupo de investigación BB1 de la Universidad de Vigo mantiene abierta una línea de trabajo sobre la PSA-NCAM. Como fruto del trabajo realizado hasta la fecha se han obtenido interesantes resultados sobre la expresión inmunohistoquímica de la forma polisialilada de la proteína en el CCR (Fernández-Briera *et al.,* 2010), que apuntan la existencia de una *up-regulation* tanto de la expresión de la proteína como de su grado de polisialilación. De confirmarse estos datos por los estudios en marcha, el CCR añadiría a su repertorio de estrategias de propagación (hasta ahora circunscritas al de un supresor tumoral, que experimenta una pérdida de expresión en el tejido tumoral) el debilitamiento de la adhesividad intercelular provocado por la hipersialilación de la NCAM, tal como está establecido que ocurre en algunos tipos de cáncer pulmonar o de tiroides.

En consideración de cuanto se ha expuesto hasta aquí, con el fin de confirmar la relevancia de la NCAM en el CCR se ha emprendido un estudio con los siguientes objetivos:

- Análisis de la expresión de la PSA-NCAM en especímenes de tejido sano y tumoral de pacientes operados de CCR mediante ensayos de inmunoblot acoplados a detección por quimioluminiscencia.
- Puesta a punto de un protocolo para la separación de las isoformas de PSA-NCAM mediante un proceso bidimensional 2D-PAGE, para una posterior detección mediante espectrometría de masas (MS).

MATERIAL Y MÉTODOS

Los especímenes empleados fueron resecciones quirúrgicas de tejido colorrectal tumoral y sano (situado al menos a 10 cm del foco tumoral y sin signos microscópicos de malignidad), procedentes de pacientes con diagnóstico de cáncer colorrectal. Los especímenes fueron suministrados por los Servicios de Cirugía y Anatomía Patológica del Complejo Hospitalario Universitario de Ourense (CHUO). Una vez obtenidos en quirófano, los especímenes fueron inmediatamente congelados a -80ºC hasta su empleo. Se cumplieron todas las estipulaciones éticas a que obliga la legislación vigente, contándose con el consentimiento informado de los pacientes y un procedimiento protocolizado de manejo de los historiales clínicos que ha preservado en todo momento el anonimato de éstos.

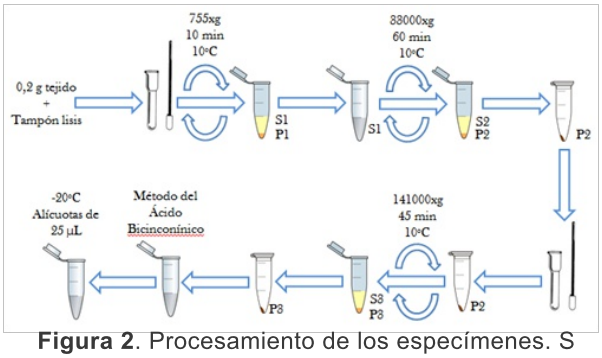


Figura 2. Procesamiento de los especímenes. S (sobrenadante); P (precipitado).

El procedimiento de obtención de la muestra (Figura 2) partió de fracciones de entre 0,2-0,3 g del tejido biopsiado (sano y tumor). Este material de partida se troceó y homogeneizó a 4ºC en presencia de un tampón de lisis compuesto por Tris-HCl 0,01 M (pH 7,4), sacarosa 0,25 M y antiproteasas.

El homogeneizado inicial se centrifugó a 755xg (2500 rpm) durante 10 min a 10ºC en una centrífuga de alta velocidad Centrikon T-124. El sobrenadante obtenido fue resuspendido en tampón Tris-HCl 0,01 M a pH 7,4 para, a continuación, someterse a una ultracentrifugación a 33000xg durante 1 h a 10ºC. El sobrenadante así obtenido (fracción citosólica) se descartó, mientras que el precipitado (fracción de membranas totales) se resuspendió cuidadosamente en el tampón anterior y se volvió a homogeneizar. A continuación se realizó una segunda ultracentrifugación a 14100xg, durante 45 min a 10ºC. Se descartó nuevamente el sobrenadante y se obtuvo la muestra para los ensayos mediante la resuspensión del precipitado en 200 µL de Tris-HCl 0,01 M (pH 7,4). La cuantificación de proteínas totales se realizó mediante el método del ácido bicinconínico (Smith et al.,1985). Las preparaciones obtenidas se almacenaron en alícuotas de 25 µL a -20 ºC hasta su empleo.

Electroforesis monodimensional en condiciones desnaturalizantes: SDS-PAGE

La primera fase del proceso de separación bidimensional se fundamentó en las diferencias en pI de las proteínas de la muestra mediante una aplicación de isoelectroenfoque (IEF). El proceso se realizó con tiras de *ReadyStrip* (Bio-Rad) de un rango de pH 4-7, 3-10 o pH 4,7-5,9 según muestras. Las tiras de IEF se cargaron con 80 µg de preparación de membranas totales y c.s.p. hasta completar 150 mL con un buffer de lisis compuesto por urea 7 M, tiourea 2 M y CHAPS al 4% (v/v) (*Electrophoresis Purity Reagent*; Bio-Rad). Además, se añadieron los anfólitos transportadores de microrrango de pH (*Bio-Lyte* 4/7 o Bio-Lytes 4,7/5,9 Ampholyte; Bio-Rad) y 1,15 mg de DTT (Bio-Rad), 1,5 µL de *Bio-Lytes* y 1 µg de azul de bromofenol al 2% (p/v).

El IEF se realizó en un *Protean IEF Cell* (Bio-Rad). La tira de IEF se rehidrató pasivamente durante 5 min. El programa de rehidratación activa duró 19 h en varias etapas: fase inicial de 250 V durante 15 min, rampa de voltaje lineal desde 250 V hasta 4.000 V, enfoque final de 20.000 V/h. El proceso terminó tras una etapa de mantenimiento durante 60 min a 500 V para evitar la deriva de las proteínas.

Con antelación a la segunda fase de separación se realizó un proceso de equilibrado en una solución de Tris-HCl 50 mM, urea 6 mM, glicerol al 30% (p/v) y SDS al 2% (p/v), pH 8,8. Esta misma solución base se utilizó para realizar dos lavados de 10 min, añadiendo DTT al 0,01% (p/v). Seguidamente, en la misma solución anteriormente descrita se añadió iodoacetamida al 0,025% (p/v) con 1 µL de azul de bromofenol al 0,2% (v/v), con la que se realizaron dos lavados de 10 min.

Para la realización de la segunda dimensión se colocó la tira de IEF sobre un gel de poliacrilamida al 7,5%, reservando un pocillo en la esquina para los marcadores preteñidos de amplio rango de masa molecular (*SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder*, Fermentas). Para el sellado de la unión entre la tira y el gel se usó agarosa con un bajo punto de fusión al 0,5% (p/v) en tampón de electroforesis.

Una vez soldados ambos geles se procedió a la separación electroforética, la segunda fase del proceso 2D-PAGE que opera una separación en base a las diferencias en masas moleculares de las proteínas. Para ello se preparó un sistema de electroforesis monodimensional en condiciones desnaturalizantes sobre una matriz de poliacrilamida [30% acrilamida/Bis Solution 37,5:1 (2,6% C), Bio-Rad] discontinua formada por acrilamida al 4% en Tris-HCl 1,5M (pH 8,8) en el gel concentrador y al 7,5% en Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) en el gel separador. La electroforesis se llevó a cabo con el equipo Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad) a 150 V durante el tránsito de las muestras por el gel concentrador y a 180 V durante el resto del tiempo de desarrollo (el tiempo necesario para que el frente del trazador azul de bromofenol alcance el borde inferior del gel). El tampón de carga estuvo compuesto por Tris-HCl 50 mM (p/v), pH 6,8, SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0,1% (p/v), glicerol 10% (p/v) y β-mercaptoetanol 5% (v/v) y el tampón de electrodo por Tris-HCl 25 mM, glicina 0,19 y SDS 0,1% (w/v), Ph 6,8. Previamente a la electroforesis las muestras fueron desnaturalizadas hirviéndolas durante 5 min.

Para conocer la masa molecular aparente de las proteínas de la muestra usamos un conjunto de estándares preteñidos (*SpectraTM Multicolor Broad Range Protein Ladder*; Fermentas) formado por un conjunto de proteínas con masas moleculares conocidas.

Una vez concluida la SDS-PAGE se tiñó el gel con nitrato de plata o bien se electrotransfirió a una membrana de PVDF para la realización del inmunoblot.

Inmunoblot

El gel destinado al inmunoblot se mantuvo durante 30 min en tampón de transferencia [Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 10% (v/v)] en agitación. A la vez, se activó la membrana de PVDF con metanol al 100% (v/v) durante 20 s y se equilibró en tampón de transferencia. Para la transferencia se utilizó el equipo Mini TransBlot (Bio-Rad) y un amperaje constante de 350 mA durante 65 min. Tras la transferencia, se procedió a un lavado con H_2Od.

***Inmunoblot* con revelado quimioluminiscente de NCAM y PSA**

El inmunoblot se llevó a cabo con unas concentraciones de los anticuerpos primarios (Ac 1º) anti-NCAM y anti-PSA, y de sus correspondientes secundarios previamente determinadas en nuestro laboratorio. El bloqueo de la membrana se llevó a cabo en una solución de leche desnatada en polvo al 5% (p/v) y TWEEN-20 al 0,1% (p/v), en PBS 1X, durante 4 h, en condiciones de agitación y a temperatura ambiente. Finalizado el bloqueo para la identificación de NCAM, la membrana se incubó con el Ac 1º monoclonal de rata IgG2a anti-CD56 de ratón, a una dilución 1/750 en solución de bloqueo durante 13-14 h (*overnight*) en agitación y a 4ºC. Una vez terminada la incubación se eliminaron los restos del Ac 1º no unido a la membrana. Para ello, se realizaron 5 lavados de 5 min cada uno con la solución de bloqueo anterior, en agitación y a temperatura ambiente. Posteriormente se incubó la membrana durante 90 min con el Ac 2º, policlonal de cabra anti-IgG-FC de rata conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) a una dilución 1/5000, a temperatura ambiente y en agitación. Transcurrido este tiempo, se realizaron 6 lavados de 5 min cada uno, con la solución de bloqueo anteriormente descrita para eliminar el anticuerpo secundario no unido. A continuación se realizó un lavado de 5 min con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en PBS 1X, y 3 lavados de 4 min cada uno con PBS 1X (figura 3).

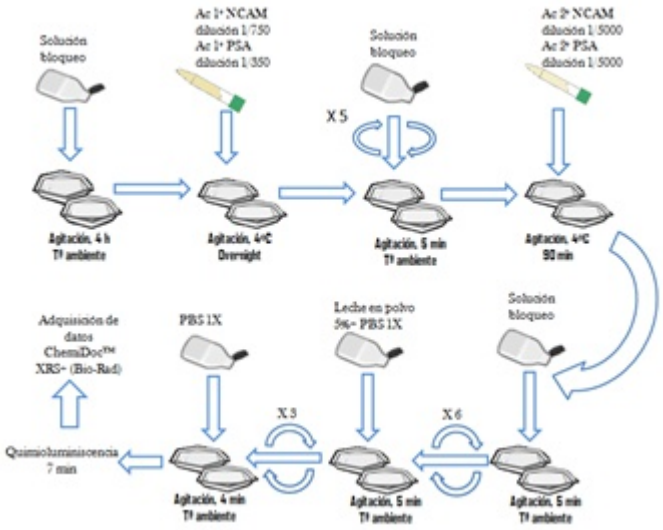


Figura 3. Proceso de realización del inmunoblot para detectar PSA y NCAM.

Para el revelado de la membrana se utilizó el sustrato de quimioluminiscencia *"ECL" ClarityTM Western ECL Sustrate* (Bio-Rad), durante 7 min a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Tras este tiempo, se tomaron imágenes de la membrana en el equipo *ChemidocTM XRS+* (Bio-Rad,) mediante el software ImageLab para su documentación y posterior análisis.

Un protocolo similar al descrito se siguió para la inmunodetección de PSA, pero con las siguientes modificaciones: el Ac 1º empleado fue el monoclonal anti-CD56 de ratón/humano purificado de rata a la dilución 1/350, y un anti-IgM-mu de rata purificada de cabra conjugado con peroxidasa de rábano con dilución 1/5000 como Ac secundario. El revelado para el PSA también fue por quimioluminiscencia.

La toma de imágenes de las membranas de inmunoblot y de los geles teñidos con plata se realizó con el equipo de Análisis de Imagen ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) y el software ImageLab o *CuantityOne*® para las imágenes de 2D-PAGE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis por 1D –PAGE de la expresión de NCAM en el tejido sano y tumoral de CCR

Tras el establecimiento de las condiciones idóneas para la realización del inmunoblot se procedió al análisis de la expresión de la proteína NCAM en especímenes de tejido sano y tumoral de pacientes con CCR. Los resultados obtenidos en todos los pacientes estudiados fueron similares, tal como se aprecia en el resultado tipo mostrado en la figura 4. En la imagen se observa la presencia de una única banda, bien definida, situada un poco por encima del marcador de masa molecular de 135 kDa. Esta banda aparece en todos los pacientes analizados, tanto en el tejido sano como en el tejido tumoral. Sin embargo, en ninguna ocasión se ha observado en el control negativo, en el cual se carga la misma muestra que en tumor y fue procesado igual que las otras bandas a excepción de que no se añadió el Ac 1º anti-NCAM.

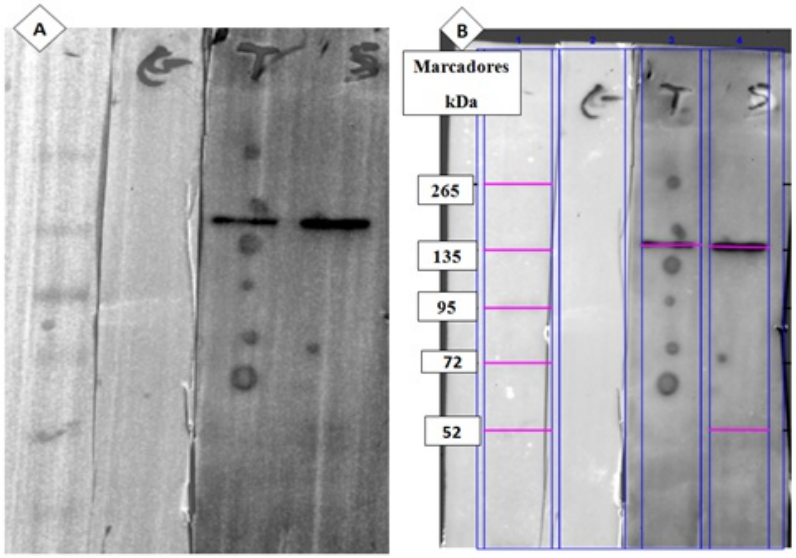


Figura 4. Imagen tipo de una electroforesis desnaturalizante monodimensional que ha sido transferida a membrana de PVDF y sobre la cual se ha realizado un inmunoblot para NCAM. En el primer carril se encuentran los marcadores de masa molecular. C-: control negativo.

Al contrario que en otros tejidos, en el tejido colorrectal adulto humano hasta el momento se acepta que la isoforma de NCAM que se expresa es la de 180 kDa (Roesler *et al.,* 1997; Huerta el al., 2001), la cual ha sido incluso estudiada como un posible factor pronóstico para esta neoplasia en otros tejidos (Tascilar *et al.,*2007). Sin embargo, los resultados obtenidos por nosotros sugieren que también se expresa la isoforma de 140 kDa (Figura 4). Es necesario mencionar que el anticuerpo anti-NCAM utilizado solamente detecta las dos isoformas de mayor peso molecular (140 kDa y 180 kDa), por lo que no podemos descartar que también se exprese la isoforma de 120 kDa. Este resultado aporta información suplementaria sobre la expresión de esta proteína en el tejido colorrectal, ya que hasta el momento los trabajos realizados indicaban la presencia en epitelio sano y tumoral del colon la isoforma de 180 kDa (Roesler *et al.,*1997; Huerta *et al.,* 2001). Estos autores se basaron para llegar a dicha conclusión en las evidencias obtenidas por western blot de 5 líneas celulares (Huerta *et al.,* 2001) y en el análisis por RT-PCR de muestras de pacientes con CCR (Roesler *et al.,* 1997). Este último trabajo consiguió observar la expresión del exón 18 propio de la isoforma de mayor masa molecular. Nuestros resultados, por tanto, sin negar la posible existencia de la isoforma de 180 kDa en cantidades subdetectables, muestran sin ambages la presencia asimismo de la isoforma de 140 kDa de la NCAM. Al mismo tiempo comprobamos que, en caso de existir polisialilación en la NCAM, esta será muy baja, por dos razones. La primera de ellas es que, como se observa en la figura 4A, la banda de señal que se detecta corresponde a una banda y no a un rastro ancho y uniforme (smear) correspondiente a un rango más o menos amplio de masa molecular resultado de los grados variables de polisialilación de las diferentes moléculas de NCAM. La segunda razón es que la banda observada se corresponde a un peso molecular muy próximo a 140 kDa, lo que indica que la polisialilación de la isoforma predominante no es muy significativa.

Análisis por 2D-PAGE de la expresión de NCAM en tejido sano y tumoral de CCR

Una vez determinada la presencia de NCAM en el tejido colorrectal, procedimos a su estudio por 2D-PAGE para separar y analizar el conjunto de isoformas de esta molécula presentes en el tejido colorrectal de los pacientes con CCR.

El proceso de separación de la muestra opera durante la primera fase de IEF según las diferencias en punto isoeléctrico (pI) de las proteínas de la muestra, mientras que la SDS-PAGE posterior lo hace en base a las diferencias en masa molecular. La figura 5 muestra el resultado obtenido a partir de un espécimen de tejido tumoral de un paciente de CCR. La carga de proteína en el inmunoblot fue de 80 µg. El procesamiento de la imagen realizado con el programa *CuantityOne*® permite apreciar las características de la molécula NCAM; el peso molecular que se obtiene con la referencia de los marcadores de peso moléculas (Figura 5A) y también hacer una estima del pI de la molécula.

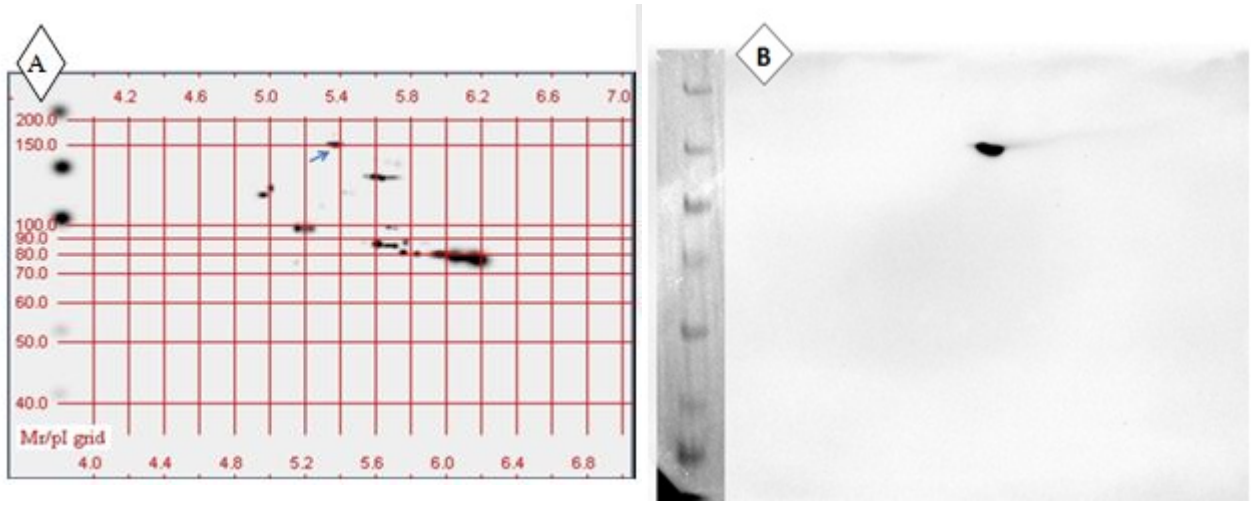


Figura 5. Separación mediante 2D-PAGE de un espécimen de tejido tumoral de CCR. (A). Mapa de masa molecular (Y) y pI (X) realizado sobre la imagen gaussiana del gel 2D-PAGE una vez superpuesto a la membrana de PVDF. La flecha indica el spot que el programa asocia con la NCAM. (B) Inmunoblot para NCAM en membrana de PVDF y revelado por quimioluminiscencia.

El estudio mediante 2D–PAGE (Figura 5) nos ha permitido observar la variabilidad de isoformas de la NCAM en los especímenes de tejido colorrectal analizados y determinar el rango de pI de estas, que ha resultado similar al descrito en un estudio anterior (Vawter et al.,1998).

Detección de NCAM y PSA en un espécimen de tejido tumoral de CCR

En las condiciones descritas se procedió al análisis para la expresión de NCAM y PSA en un espécimen de tejido tumoral de un paciente operado de CCR. El análisis para NCAM no dio lugar a señal positiva en el inmunoblot, pero sí se detectó señal en el inmunoblot de PSA, con una masa molecular de 63,1 kDa y pI 5,19, 5,22 y 5,25 (Figura 6).

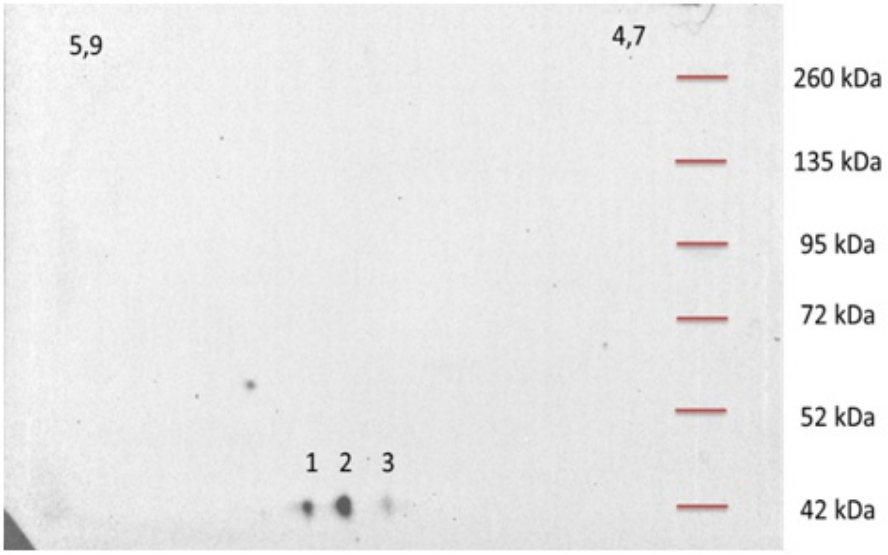


Figura 6. Inmunoblot de PSA, en el que se observan 3 spots bien definidos de ~40,7 kDa y pI 5,35, 5,26 y 5,2. Espécimen de tejido tumoral de CCR, 100 µg de carga proteica.

La señal de peso molecular detectada para el PSA, demasiado baja para tratarse de PSA-NCAM, podría ser resultado por el contrario de la rotura de la cadena de PSA de la NCAM, de cuya labilidad se tienen evidencias previas (Schauer, 1982). Así, el PSA unido a NCAM puede resultar fácilmente degradado durante la SDS-PAGE, por ejemplo al hervir a pH neutro la proteína nativa (Hoffman et al., 1982; Key y Akeson, 1990) o incluso durante la congelación por periodos prolongados (citado por Manzi et al.,1994 de una observación no publicada de Higa y Varki). Por otro lado, resultados (no publicados) de nuestro laboratorio han acreditado altos índices de polisialilación en esta proteína en el tejido colorrectal de pacientes con CCR, compatibles con la masa molecular de estos spots y con el grado de elongación que se le supone al PSA en vertebrados (Rothbard et al.,1982; Angata & Fukuda, 2003). Otra posibilidad interesante, que no debe ser descartada, es que estos spots correspondan a alguna de las polisialiltransferasas responsables de la polisialilación del PSA, PST (Eckhardt *et al.,*1995; Angata *et al.,*1997) y SXT (Livingston y Paulson, 1993; Angata *et al.,*1997), ya que ambas poseen capacidad de autopolisialilación (Close & Colley, 1998) y sus masas moleculares rondan el valor de los spots del inmunoblot de PSA (Simon *et al.,* 2013). Tanto una como otra posibilidad captaron nuestro interés por tratarse de observaciones no referidas hasta la fecha en humamos y se consideró por ello que merecían indagarse de reproducirse en experimentos posteriores.

El conjunto de los 5 casos analizados no ha permitido detectar diferencias de expresión de la NCAM entre el tejido sano y tumoral de los pacientes con CCR. Sin embargo, se trata de muy pocos casos, por lo que los resultados no son suficientemente significativos y se necesita aumentar su número para establecer una generalización apoyada estadísticamente.

Este trabajo, por tanto, ha servido especialmente para poner a punto el método de detección de la PSA-NCAM y de separación de sus diferentes isoformas.

CONCLUSIONES

En la introducción del tema se ha comentado la importancia de la proteína NCAM y de su grado de polisialilación, así como los antecedentes disponibles sobre su expresión en el tejido colorrectal y su aparente relación con el CCR. Por ello, nos marcamos como objetivo de este trabajo la puesta en marcha de un protocolo que nos permitiera la identificación de las diferentes isoformas de la NCAM en dicho tejido, teniendo en mente que hasta la fecha no existen estudios específicos sobre este aspecto y que los avances en el conocimiento de su microheterogeneidad y perfil de expresión en el tejido sano y tumoral de estos pacientes debe ayudar a mejorar el conocimiento de la biología funcional dr la NCAM y a establecer de modo definitivo su potencial como biomarcador del CCR. Tras la realización del trabajo propuesto, los resultados obtenidos nos permiten enunciar las siguientes conclusiones:

- Se ha conseguido un protocolo para la separación y detección de las diferentes isoformas de la NCAM en especímenes de tejido colorrectal procedente de pacientes operados de CCR, que ha demostrado resultados positivos en inmunoblot para NCAM y PSA.

- En tejido colorrectal humano se ha observado la expresión de una isoforma de NCAM diferente a la que hasta el momento se había documentado en CCR.

BIBLIOGRAFÍA

Angata, K., Fukuda, M. (2003). Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neuralcell adhesion molecule. Biochimie 85:195-206.

Angata, K., Nakayama, J., Fredette, B., Chong, K., Ranscht, B., Fukuda, M. (1997). Human STXpolysialyltransferase forms the embryonic form of the neural cell adhesion molecule: tissue-specific expression, neurite outgrowth, and chromosomal localization in comparison with another polysialyltransferase, PST. J. Biol. Chem. 272: 7182-7190.

Barton, C.H., Mann, D.A., Walsh, F.S. (1990). Characterization of the human N-CAM promoter. Biochem. J. 268: 161-168.

Berezin. V. (2010) Structure and function of the Neural cell adhesion molecule NCAM. Adv. Exper. Med. and Bio. ISBN 978-1-4419-1170-4.

Cavallaro, U. Christofiri, G. (2004). Cell adhesion and signaling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. Nat. Rev. Cancer 4: 118-132.

Close, B. E., Colley, K. J. (1998). In vivo autopolysialylation and localization of the polysialyltransferases PST and STX. J. Biol. Chem. 273: 34586-34593.

Eckhardt, M., Muhlenhoff, M., Bethe, A., Koopman, J., Frosch, M., Gerardy-Schahn, R. (1995). Molecular characterization of eukaryotic polysialyltransferase-1. Nature 373:715-718.

Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, JWW., Comber, H., Forman, D., Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. Eur. J. Cancer 49:1374-1403.

Fernández-Briera, A., García-Parceiro, I., Cuevas, E., Gil-Martín, E. (2010). Effect of Human Colorectal Carcinogenesis on the Neural Cell Adhesion Molecule Expression and Polysialylation. Oncology 78: 196-204.

Gascon, E., Vutskits, L., Kiss, J.Z. (2007). Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. Brain. Res. Rev. 56: 101-118.

Hoffman, S., Sorkin, B. C., White, P. C., Brackenbury, R., Mailhammer, R., Rutishauser, U., Cunningham, BA.,Edelman, GM. (1982). Chemical characterization of a neural cell adhesion molecule purified from embryonic brain membranes. J. Biol. Chem. 257: 7720-7729.

Huerta, S., Srivatsan, E.S., Venkatesan, N. Peters, J., Moatamed, F., Renner, S., Livingston, E. H. (2001). Alternative mRNA splicing in colon cancer causes loss of expression of neural cell adhesion molecule. Surgery 130: 834-843.

Key, B., Akeson, R. A. (1990). Olffactory neurons express a unique glycosylated form of the neural cell adhesion moleculae (N-CAM). J. Cell. Biol. 110: 1729-1743.

Livingston, B. D., Paulson, JC. (1993). Polymerase chain reaction cloning of a developmentally regulated member of the sialyltransferase gene family. J. Biol. Chem. 268: 11504-11507.

Manzi, A. E., Higa, H. H., Diaz, S., Varki, A. (1994). Intramolecular self-cleavage of polysialic acid. J. Biol.Chem. 269: 23617-23624.

Nakayama, J., Angata, K., Ong, E., Katsuyama, T., Fukuda, M. (1998). Polysialic acid, a unique glycan that is developmentally regulated by two polysialyltransferases, PST and STX, in the central nervous system: from biosynthesis to function. Pathol. Int. 48: 665-677

Nguyen, C., Mattei, M.G., Mattei, J.F., Santoni, M.J., Goridis, C., Jordan, B.R. (1986). Localization of the human NCAM gene to band q23 of chromosome 11: the third gene coding for a cell interaction molecule mapped to the distal portion of the long arm of chromosome 11. J. Cell. Biol. 102: 711-715

Owens, G.C., Edelman, G.M, Cunningham, B.A. (1987) Organization of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) gene: alternative exon usage as the basis for different membrane associated domains. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 294-298.

Rademacher, T.W., Parekh, R.B., Dwek, R.A. (1988). Glycobiology. Annu. Rev. Biochem. 57: 785-838.

Roesler, J., Srivatsan, E., Moatamed, F., Peters, J., Livingston, E.H. (1997). Tumor suppressor activity of neural cell adhesion molecule in colon carcinoma. Am. J. Surg. 174: 251-257.

Rothbard, J. B., Brackenbury, R., Cunningham, B.A., Edelman, G. M. (1982). Differences in the carbohydrate structures of neural cell-adhesion molecules from adult and embryonic chicken brains. J. Biol. Chem. 257: 11064-11069.

Rutishauser, U. (2008). Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. Nature Rev. Neurosci. 9: 26-35.

Rutishauser, U., Brackenbury, R., Edelman, G.M. (1978). Cell-adhesion molecule from neural tissues of the chick embryo. Birth Defects Orig. Artic. Ser. 14: 305-316.

Schauer, R. (1982). Sialic acids: chemistry, metabolism and function. J. Cell Biol. Monographs, Vol 10. Springer-Verlag.

Seifert, A., Glanz, D., Glaubitz, N., Horstkorte, R., Bork, K. (2012). Polysialylation of the neural cell adhesion molecule: interfering with polysialylation and migration in neuroblastoma cells. Arch. Biochem. Biophys. 524: 56-63.

Simon, P, Baümer, S., Busch, O., Röhrich, R., Kaese, M., Richterich, P., Wehrend, A., Müller, K., Gerardy-Schahn, R., MÜhlenhoff, M., Geyer, H., Geyer, R., Middendorff, R., Galuska, S. P. (2013) Polysialic acid is present in mammalian semen as a post-translational modification of the neural cell adhesion molecule NCAM and the polysialyltransferase ST8SiaII. J. Biol. Chem.288: 18825-18833.

Smith, P. K, Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, FH., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. K., Olson, B. J., Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. Analit. Biochem. 150: 76-85.

Tascilar, O., Karadeniz, G., Ozel, I., Ugur, A., Hamdi, B., Irkorucu, O., Karakaya, K., Gül, M., Bülent, H., Comert, M. (2007). Neural cell adhesion molecule-180 expression as a prognostic criterion in colorectal carcinoma: Feasible or not? World J. Gastroenterol. 13(41): 5476-5480.

Thiery, J.P., Brackenbury, R., Rutishauser, U., Edelman, G.M. (1977). Adhesion among neural cell of the chick embryo. J. Biol. Chem.. 252: 6841-6845.

Vawter, M., Hemperly, J.J., Hyde, T., Bachus, S. E., Vanderputtern, D., Howard, A., Cannon-Spoor H.E., McCoy, M., Webster, M.J., Kleinman, J., Freed, W. J. (1998). VASE-Containing N-CAM Isoforms are increased in the hippocampus in bipolar disorder but not Schizophrenia. Exp. Neurol. 154: 1-11.

Von der Ohe, M., Wheeler, S.F., Wuhrer, M., Harvey, D., Liedtke, S., Mühlenhoff, M., Gerardy-Schahn, R., Geyer, H., Dwek, R., Geyer, R., Wing, D., Schachner, M. (2002). Localization and characterization of polysialic acid containing N-linked glycans from bovine NCAM. Glycobiology 12: 47-63.

Wilson, H.V. (1907). On some phenomena of coalescence and regulation in sponges. J. Exp. Zool. 5: 245-258.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS BACTERIAS DEL GÉNERO PSEUDOALTEROMONAS

Fernando Mesías Recamán.
e- mail: fernando_bio_91@hotmail.com

Trabajo Fin de Grado
Tutora:
- Carmen Siero Vázquez
Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

En este trabajo se revisa la capacidad de las bacterias del medio marino para sintetizar nuevos productos bioactivos. En particular, se estudia la facultad de las especies del género *Pseudoalteromonas* para producir nuevos compuestos antimicrobianos, haciendo especial hincapié en la actividad antifúngica de la especie *P. tunicata*. Dicha actividad se relaciona con la producción de enzimas quitinolíticas cuyas características y posibles aplicaciones se incluyen en la última parte del trabajo.

Palabras clave: *Pseudoalteromonas, productos bioactivos, quitinasas, actividad antifúngica*

INTRODUCCIÓN

Búsqueda de nuevos compuestos bioactivos.

Actualmente, existe la necesidad de encontrar nuevos principios activos que nos ayuden a solucionar muchas de las enfermedades que hoy se consideran incurables (León *et al.,* 2010). Para lograr este objetivo se está explorando el medio marino, ya que es conocido por albergar una enorme diversidad de comunidades microbianas (Ballestriero *et al.,* 2010) que se consideran fuente de numerosos metabolitos bioactivos, pero que todavía no han sido estudiados en su totalidad. Esta enorme diversidad de microorganismos productores de sustancias bioactivas comprende a bacterias, hongos, fitoplancton, algas mayores y algunos invertebrados (León *et al.,* 2010).

Otro problema que se podría solucionar encontrando nuevos compuestos bioactivos es el que comprende a bacterias resistentes a antibióticos. Hasta la actualidad, estas bacterias podían ser eliminadas de nuestro organismo utilizando los antibióticos actualmente conocidos, pero a causa de su uso indiscriminado, algunos microorganismos se han vuelto resistentes, por lo que surge la necesidad de encontrar nuevos medicamentos que las eliminen. Debido a la aparición de enfermedades emergentes o reemergentes que necesitan un tratamiento, también se hace patente la necesidad de encontrar nuevos compuestos bioactivos (León *et al.,* 2010). Las personas inmunocomprometidas pueden ser víctimas de patógenos oportunistas, ya que son más sensibles frente a infecciones, por lo que también necesitan un tratamiento eficaz (León *et al.,* 2010).

Los posibles nuevos compuestos podrían ser utilizados además como parte de complementos nutricionales, en cosméticos, como biocatalizadores, en la industria química o en agroquímica (León *et al.,* 2010).

Los microorganismos marinos, muchos de ellos todavía desconocidos (Rappe & Giovannoni 2003) son buscados en el agua de mar, en los sedimentos y como epibiontes de hospedadores eucariotas tales como peces, algas pluricelulares e invertebrados marinos como esponjas, tunicados, moluscos, cnidarios, crustáceos y protocordados (Holmström & Kjelleberg 1999; León et al. 2010).

Muchas de estas bacterias marinas son especies del género *Vibrio*, *Pseudomonas, Flavobacterium, Bacillus, Micrococcus, Cytophaga,* (León et al. 2010) y/o *Pseudoalteromonas* (Holmström *et al.,* 2002), además de hongos como *Penicillium* (Gómez-Guiñán *et al.,* 2003).

Las especies del género *Pseudoalteromonas* son especialmente interesantes, ya que muchos estudios indican la producción de compuestos extracelulares bioactivos (Holmström & Kjelleberg, 1999) capaces de producir sustancias antibacterianas, antiincrustantes, antifúngicas y/o algicidas con diversas aplicaciones (León *et al.,* 2010).

Bacterias del género *Pseudoalteromonas* como productoras de compuestos bioactivos.

Las bacterias marinas del género *Pseudoalteromonas* son de gran interés porque producen una gran cantidad de compuestos que les ayudan en la competencia por nutrientes y en la colonización de superficies, siendo así una característica poco usual y preponderante de estas bacterias (Holmström & Kjelleberg, 1999).

Las actuales especies de *Pseudoalteromonas* estaban incluidas dentro del género *Alteromonas*, pero dicha clasificación fue revisada tomando como base el trabajo de Gauthier *et al.,* 1995, de manera que *Alteromonas* se dividió en dos géneros: *Alteromonas* y el nuevo género *Pseudoalteromonas*.

Son bacterias únicamente marinas que se han aislado en muchos lugares del mundo, encontrándose por lo tanto ampliamente distribuidas en este medio (Skovhus *et al.,* 2004). Sus principales hospedadores son eucariotas como mejillones (Ivanova *et al.,* 1998), vieiras (Coton, 2013), peces globo, tunicados (Holmström *et al.,* 1999), esponjas (Ivanova *et al.,* 1998) y gran cantidad de algas marinas (Akagama-Matsushita *et al.,* 1992; Yoshikawa *et al.,* 1997). Su amplia distribución por las aguas de todo el mundo induce a pensar que presentan numerosas y diferentes adaptaciones muy eficientes. Tanto es así, que para competir por los nutrientes, por el espacio y como defensa contra sus depredadores poseen actividad bacteriolítica, antifúngica, antiincustante y algicida (Holmström and Kjelleberg, 1999). Todos los compuestos responsables de estas actividades son posiblemente sintetizados para desplazar a los demás microorganismos que forman parte del biofilm, que es la estructura en la que viven mayoritariamente las bacterias marinas (Mai-Prochnow *et al.,* 2004).

Las reacciones mutualistas también existen en este género, en donde *Pseudoalteromonas* produce sustancias para el beneficio de los organismos a los que coloniza. Muchos de estos organismos son algas como *Ulva lactuca* o *Enteromorpha intestinalis* o cordados como *Ciona tunicata*, que por sí mismos no producen ninguna sustancia antiincrustante, pero gracias a la acción de estas y otras bacterias epibiontes que habitan en su superficie sí adquieren esta propiedad (Holmström *et al.,* 2002).

Pseudoalteromonas presenta alrededor de treinta especies diferentes que tienen como características distintivas principales el ser bacterias encontradas en asociación con eucariotas marinos y el ser productoras de gran cantidad de metabolitos con diversas funciones, las cuales se muestran en la siguiente tabla (Tabla 1) (Holmström & Kjelleberg, 1999).

Tabla 1. Actividades de interés aplicado de diferentes especies del género *Pseudoalteromonas*

Actividad	Bacterias
Antibacteriana	*P. tunicata* *P. luteoviolacea* *P. rubra*
Agarolítica	*P. agarolyticus* *P. atlantica* *P. antartica*
Algicida	*Pseudoalteromonas sp.*
Antiincrustante	*P. tunicata*
Antifúngica	*P. tunicata*

El genoma de distintas cepas de *Pseudoalteromonas* ya ha sido total o parcialmente secuenciado (Holmström & Kjelleberg, 1999), aunque son todavía pocos los genes de esta bacteria que se han estudiado.

De entre todas las bacterias de este género, *P. tunicata* es una de las especies con mayor potencial antimicrobiano (Holmström et al., 2002) y es por ello que es objeto de numerosos estudios.

Pseudoalteromonas tunicata

Pseudoalteromonas tunicata es una de las especies que produce más metabolitos secundarios/compuestos bioactivos y, por tanto, posiblemente la que más propiedades antimicrobianas presenta.

P. tunicata, como las demás *Pseudoalteromonas*, es una bacteria marina gram negativa, flagelada, heterotrófica y no fermentativas (Holmström & Kjelleberg, 1999). Ha sido aislada en las costas de Suecia cuyo hábitat era la superficie de un tunicado que vivía a 10 m de profundidad (Holmström & Kjelleberg, 1999). Además de vivir como epibionte de tunicados, también lo es de muchos otros organismos superiores (Skovhus *et al.,* 2004).

Figura 1. Cultivo en placa en medio agar marino de una cepa de P. tunicata

Esta bacteria se caracteriza por producir un pigmento de color marrón verdoso (Figura 1) que le confiere un color característico a sus colonias, aunque ocasionalmente es susceptible de sufrir mutaciones que son detectadas por el color blanco de las mismas.

Las mutaciones responsables de este cambio de color parecen estar relacionadas con la actividad antifúngica de esta bacteria (Egan *et al.,* 2002).

En *P. tunicata* se habían caracterizado ya algunas moléculas efectivas frente a algas, larvas, bacterias y en menor medida frente a hongos (Holmström *et al.,* 2002). Sin embargo, más recientemente (Sivasubramanian *et al.,* 2011) se ha demostrado que diversas especies del género *Pseudoalteromonas* inhiben el crecimiento de diferentes hongos. Este efecto se pudo observar en un experimento de antagonismo microbiano en donde se enfrentó una cepa de la especie P. tunicata con el hongo *Aspergillus niger*. En la Figura 2 se aprecia claramente como *P. tunicata* inhibe el desarrollo del hongo objeto de estudio (A) si lo comparamos con la placa control (B) en la que este se desarrolla en ausencia de la bacteria.

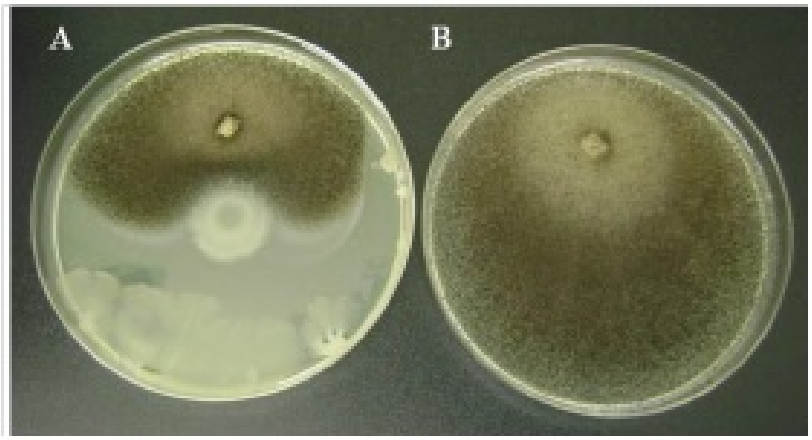


Figura 2. Ensayo de antagonismo microbiano entre *A. niger* y *P. tunicata*. (A): Inhibición de *A. niger* por *P. tunicata*. (B): Control mostrando el crecimiento de A. niger en ausencia de la bacteria.

La inhibición observada sobre el crecimiento de los hongos puede deberse, en gran medida, a la producción de diversas enzimas quitinolíticas por parte de *P. tunicata*. De hecho, el análisis de su genoma, ha puesto de manifiesto la presencia de varias secuencias que podrían codificar distintas quitinasas.

Aplicaciones de las enzimas quitinolíticas: quitinasas como antifúngicos

Las quitinasas (EC 3.2.1.14) son enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glucosídicos β-1,4 del polisacárido quitina, dando lugar a oligómeros y/o monómeros estructurales de β-1,4 N-acetil-D-glucosamina. Están presentes en gran variedad de organismos, tales como bacterias, hongos, plantas, insectos, mamíferos y virus (Shirai, 2006).

El sustrato sobre el que actúan es la quitina (Figura 3) que es un polisacárido formado por monómeros de N-acetil-D-glucosamina unidos por enlaces glucosídicos β-1,4 de carácter covalente y ampliamente distribuida en la naturaleza, siendo el segundo biopolímero más abundante después de la celulosa.

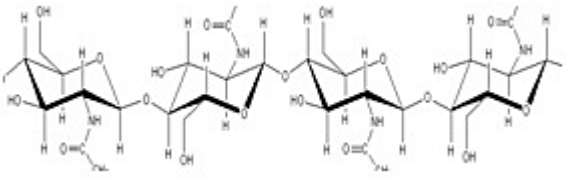


Figura 3. Estructura molecular del biopolímero de quitina

Está presente en el exoesqueleto de artrópodos, en nematodos, anélidos, en los caparazones de crustáceos, braquiópodos y en la pared celular de muchos hongos como ascomicetos, basidiomicetos, ficomicetos e imperfectos. También está presente en algas clorofíceas, diatomeas y algunos tunicados (Shirai, 2006).

Clasificación de las quitinasas

Las quitinasas se incluyen dentro de dos familias de glicosilhidrolasas: familia 18 y familia 19, clasificación realizada por Henrissat y Bairoch (Henrissat & Bairoch, 1993). Las quitinasas de la familia 18 poseen un dominio común formado por ocho α-hélices y ocho láminas plegadas β. Su amplia distribución comprende a bacterias, hongos, virus, mamíferos, insectos y plantas (Shirai, 2006). Su modo de acción se caracteriza por romper los enlaces glucosídicos β-1,4 (Shirai, 2006), hidrolizando concretamente los enlaces GlcNAc-GlcNAc y GlcNAc-GlcN (Watanabe *et al.,* 1999). Son sensibles a la alosamidina, sustancia análoga de la quitina y potencialmente inhibidora de estas quitinasas (Shirai, 2006).

Las quitinasas de la familia 19 son menos comunes, encontrándose en plantas, en algunas cepas del género *Streptomyces* (Shirai, 2006), *Vibrio, Aeromonas* (Kojima *et al.,* 2005) y en *Pseudoalteromonas*, entre otras especies. Estas enzimas se parecen a lisozimas y a quitosanasas, en donde su dominio catalítico presenta ocho α-hélices (Shirai, 2006). Hidrolizan los enlaces GlcNAc-GlcNAc y GlcN-GlcNAc (Watanabe *et al.,* 1999) y no son sensibles a la alosamidina (Shirai, 2006).

Las quitinasas también son clasificadas en función del lugar en el que ejercen su acción hidrolítica dentro de la cadena polisacárida de quitina, pudiendo ser endoquitinasas y exoquitinasas. Las endoquitinasas (EC 3.2.1.14) cortan la quitina en zonas interiores del polisacárido, generando oligómeros de N-acetilglucosamina de bajo peso molecular (Shirai 2006). Las exoquitinasas, se pueden dividir a su vez en quitobiosidasas (EC 3.2.1.29) que liberan diacetilquitobiosa del extremo no reductor de la cadena de quitina, y en β-(1,4) N acetilglucosaminidasas (EC 3.2.1.30) que liberan productos oligoméricos de N-acetilglucosamina (Dahiya *et al.,* 2006). Algunas quitinasas también poseen actividad lisozima (EC 3.2.1.17) (Shirai, 2006) de forma que son capaces de romper la pared de peptidoglucano de las bacterias.

Funciones de las quitinasas en la naturaleza

En la naturaleza las quitinasas tienen funciones variadas. Los microorganismos del medio marino las utilizan para obtener alimento a partir de la quitina del zooplancton y de los exoesqueletos de animales, porque el medio marino es deficiente en fosfato y limitado en carbono y nitrógeno, por lo que necesitaron desarrollar algún mecanismo para obtener alimento. Debido a esta necesidad, los microorganismos degradan la quitina con una eficacia mucho mayor que animales y plantas. Además, son utilizadas para inhibir el desarrollo de hongos y de microorganismos en los biofilms, lo que les atribuye gran ventaja a los microorganismos que las poseen. Otras funciones que las quitinasas tienen en la naturaleza son estar implicadas en el crecimiento de hifas, como mecanismos de defensa frente a patógenos o al estrés

abiótico, además de que son utilizadas como mecanismo de parasitación de otros organismos. En muchas plantas las quitinasas inhiben el desarrollo de hongos y actúan en las semillas, estambres, flores y tubérculos, en donde son sintetizadas para defenderse contra el ataque de fitopatógenos. En los insectos, cuyo exoesqueleto es de quitina, las quitinasas son de gran utilidad para la ecdisis (Shirai, 2006).

Aplicaciones de las quitinasas

Una vez conocida la utilidad de las quitinasas en los seres vivos se observó que estas enzimas tienen gran cantidad de aplicaciones (Duo-Chuan, 2006), destacando entre ellas la capacidad de degradar la pared celular de los hongos, ya que está compuesta por quitina (Felse *et al.,* 1999). Esta característica es muy importante para impedir el desarrollo de hongos patógenos productores de graves problemas de salud, para los cuales no siempre hay medicamentos eficaces. Dentro de esta línea también podría ser importante su uso en agricultura, para fabricar biopesticidas e impedir el desarrollo de hongos fitopatógenos que provocan enfermedades a plantas, a veces incurables. Otra de sus aplicaciones es impedir la propagación de enfermedades cuyos vectores son insectos, porque las quitinasas actúan sobre el exoesqueleto de sus huevos, impidiendo su desarrollo (Holmes *et al.,* 1965).

La rotura de la quitina por estas enzimas genera gran variedad de quitooligosacáridos bioactivos con aplicación en medicina, farmacia, cosmética y en la industria química (Dahiya *et al.,* 2006). También se utilizan para la bioconversión de quitina en SPC útil para la industria alimentaria, para el tratamiento de enfermedades en acuicultura, para el aislamiento de protoplastos fúngicos importantes en investigación, (Dahiya *et al.,* 2006) para tecnologías de antiincrustación, para impedir el desarrollo de blooms fitoplanctónicos que generen toxicidad (Holmström & Kjelleberg, 1999) y para reforzar las defensas de las plantas (Shirai, 2006).

BIBLIOGRAFÍA

Akagawa-Akagawa-Matsushita, M., Matsuo. M., Koga, Y., Yamasato, K. (1992). Alteromonas atlántica sp. nov. and Alteromonas caraageenovora sp. nov., bacteria that compose algal polysaccharides. Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 621-627.

Ballestriero, F., Thomas, T., Burke, C., Egan, S., Kjelleberg, S. (2010). Identification of Compounds with Bioactivity against the Nematode Caenorhabditis elegans by Screen Base don the Functional Genomics of de Marine Bacterium Pseudoalteromonas tunicata D2. Appl Environ Microbiol. 17: 5710-5717.

Coton, M., Joffraud, J.J., Mekhtiche, L., Lerio, F., Coton, E. de (2013). Biodiversity and dynamics of the bacterial community of packaged king scallop (Pecten maximus) meat during cold storage. Food Microbiol. 35(2): 99-107

Dahiya, N., Tewari, R., Hoondal, G.S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytis enzymes: a review. Appl Microbiol Biotechnol. 71: 773-82.

Duo-Chuan, L. (2006). Review of fungal chitinases. Mycopathol 161: 345-360.

Felse, P.A., Panda, T. (1999). Regulation and cloning of microbial chitinase genes. Appl Microbiol Biotechnol. 51: 141-151.

Gauthier, G., Gauthier, M. Christen, R. (1995). Phylogenetic analysis of the genera Alteromonas, Shewanella and Moritella using genes coding for small-subunit rRNA sequences and división of the genus Alteromonas into two genera, Alteromonas (emended) and Pseudoalteromonas gen. Nov., and proposal of twelve new species combinations. Int. J. Syst-Bacteriol. 45: 755-761.

Gómez-Guiñán, Y., Hidalgo, J., Jiménez, M., Salcedo, J. (2003). Obtención de extractos orgánicos con actividad antimicrobiana a partir de Penicillium sp. (Moniliales) aislado de la esponja Ircinia felix (porífera: Demospongiae). Rev Biol Trop. 51: 141-147.

Holmes, P.K., Dundas, I.E., Halvorson, H.O. (1965). J. Bacteriol. 90: 1159-1160.

Holmström, C., Kjelleberg, S. (1999). Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracelular agents. Microbiol Ecol. 30: 285-293.

Holmström, C., Egan, S., Franks, A., McCloy, S., Kjelleberg, S. (2002). Antifouling activities expressed by marine surface associated Pseudoalteromonas species. Microbiol Ecol. 41: 47-58.

Henrissat, B.I., Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases base don amino acid secuence similarities. Biochem J. 293: 781-788.

Ivanova, E., Kiprianova, E., Mikhailov, V., Levanova, G., Garagulya, A., Gorschkova, N., Vysotskii, M., Nicolau, D., Yumoto, N., Taguchi, T. Yoshikawa, S. (1998). Phenotypic diversity of Pseudoalteromonas citrea from different marine hábitats and emendation of the description. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 247-256.

Kojima, M., Yoshikawa, T., Ueda, M., Nonomura, T., Matsuda, Y., Toyoda, H., Miyatake, K., Arai, M., Fukamizo, T. (2005). Family 19 Chitinase from Aeromonas sp. No.10S-24: Role of Chitin-Binding Domain in the Enzymatic Activity. J. Biochem. 137: 235-242.

León, J., Liza, L., Soto, Isela., Torres, M., Orosco, A. (2010) Bacterias productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 27: 215-221.

Mai-Prochnow, A., Evans, F., Dalisay-Saludes, D., Stelzer, S., Egan, S., James, S., Webb, J.S., Kjelleberg, S. (2004). Biofilm Development and Cell Death in the Marine Bacterium Pseudoalteromonas tunicata. Appl and Environ Microbiol. 70: 3232-3238.

Rappe, M., Giovannoni, S. (2003). The uncultured microbial majority. (2003). The uncultured microbial majority. Annu Rev Microbiol. 57: 369-394.

Sivasubramanian, K., Ravichandran, S., Vijayapriya, M. (2011). Antagonistic activity of marine bacteria Pseudoalteromonas tunicata against microbial pathogens. Afric J. Microbiol. 5: 562-567.

Shirai, K. (2006). Fungal chitinases. In: Gerardo, R., Torres, I. (Eds). Advances in Agricultural and Food Biotechnology. Kerala: Research Signpost, pp. 289-304.

Skovhus, T., Ramsing, N., Holmström, C., Kjelleberg, S., Dahllöf, I. (2004). Real-time quantitative PCR for assessment of abundance of Pseudoalteromonas species in marine samples. Appl Environ Microbiol. 70: 2373-2382.

Watanabe, T., Kanai, R., Kawase, T., Tanabe, T., Mitsutomi, M., Sakuda, S., Miyashita, K. (1999). Family 19 chitinases of Streptomyces species: characterization and distribution. Microbiol. 145: 3353-3363.

Yoshikawa, K., Takadera, T., Adachi., Nishijima, M., Sano, H. (1997). Koromicin, a novel antibiotic specifically active against marine Gram-negative bacteria, produced by a marine bacterium. J Antibiot. 50: 949-953.

PUESTA A PUNTO DE MARCADORES CELULARES PARA EL ESTUDIO MORFOLÓGICO DEL BULBO OLFATIVO HUMANO

Elsa Núñez Rodríguez
e- mail: elsnunez@hotmail.com

Trabajo Fin de Grado
Tutor
Manuel Megías Pacheco
Departamento de Biología
Funcional y ciencias de la Vida
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

En este estudio se llevó a cabo la puesta a punto de marcadores celulares (lectinas e inmunoglobulinas), herramientas que permitieron identificar las distintas partes del bulbo olfativo humano. Para ello, se realizaron pruebas de concentración y tiempo de revelado hasta conseguir las condiciones óptimas de empleo de cada uno de ellos.

A continuación, se hizo un estudio completo de las distintas partes o zonas que fueron marcadas con cada uno de ellos, clasificando los marcadores en grupos, en función de las zonas de marcaje y de la información aportada.

El objetivo es que estos marcadores puedan ser empleados en un estudio posterior en el que se tratará de establecer si existen diferencias morfológicas entre bulbos controles y bulbos de individuos que presenten un historial de enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson, para intentar determinar si estas diferencias son la base de alteraciones patológicas.

Palabras clave: *bulbo olfativo, enfermedades neurodegenerativas, Alzheimer, Parkinson, lectinas, inmunoglobulinas*

INTRODUCCIÓN

El sistema olfativo tiene como función principal captar los estímulos químicos, convertirlos en señales eléctricas y químicas, y enviarlos a distintas áreas encefálicas para integrar la información olorosa con el resto de la información nerviosa.

La ruta que sigue la información olorosa está constituida por tres etapas que se identifican con tres estructuras nerviosas. La primera es el epitelio olfativo, donde los receptores reconocen las moléculas químicas olorosas y transducen ese reconocimiento en impulso eléctrico. La segunda etapa es el bulbo donde se procesa la información del epitelio olfativo y se envía a una tercera etapa, las diferentes áreas encefálicas (áreas olfativas secundarias), entre las que destacan la amígdala, el tálamo, el hipotálamo y la corteza perirrinal.

En enfermedades neurodegenerativas se produce una afectación de distintas áreas cerebrales, produciéndose un deterioro cognitivo y funcional progresivo, asociado con alteraciones claras de las estructuras nerviosas como el bulbo olfativo (Ruan *et al.,* 2012). Citando un ejemplo más concreto, en el Alzheimer una de las alteraciones estructurales más conocidas es la aparición de placas seniles de manera no uniforme en las distintas regiones del cerebro (Dickson *et al.,* 1988).

En la mayor parte de las enfermedades neurodegenerativas, los trastornos olfativos se consideran síntomas precoces, frecuentes y no claramente relacionados con los signos motores de la enfermedad, que empeoran a medida que esta va progresando. Desde hace varias décadas, y en especial desde hace unos años, ha aumentado el interés en valorar las alteraciones del olfato como indicadores precoces de estas enfermedades neurodegenerativas (Miranda & Pérez, 2006).

Las deficiencias en la olfacción se pueden clasificar en dos tipos: las hiposmias, en las que hay una disfunción parcial del umbral olfativo y la pérdida olfativa no es completa, y las anosmias, en las que se

produce una ausencia completa de dicha capacidad. La edad es el principal factor que influye en el déficit del sistema olfativo, aunque pueden aparecer otras causas asociadas.

En relación con las enfermedades neurodegenerativas, hay evidencias clínicas de hiposmia o anosmia en el proceso de olfacción de algunos pacientes con enfermedades como el Parkinson y el Alzheimer. Los síntomas del déficit olfatorio son previos a la manifestación de los deterioros motores o de pérdida de memoria que ocurren respectivamente en dichas enfermedades, llegando a aparecer incluso décadas antes del manifiesto completo de las alteraciones físicas o cognitivas (Miranda y Pérez, 2006).

En general el trastorno olfativo es frecuente, precoz y grave, por lo que una de las ideas más en auge en la actualidad es considerar dicho trastorno como marcador de pronóstico y evolución de esas enfermedades neurodegenerativas (Ropper & Brown, 2007). Tanta importancia se le da al déficit olfativo como marcador precoz que incluso algunos autores plantean la biopsia de bulbo olfativo como prueba diagnóstico (Santos *et al.,* 2010).

Descripción del bulbo olfativo

El bulbo olfativo, una estructura par, es un componente del prosencéfalo que se localiza sobre la placa cribiforme del hueso etmoides. Anatómicamente se divide en varias capas definidas por la organización de sus neuronas y fibras. Los axones de las células receptoras del epitelio olfativo forman el nervio olfativo, y terminan en la capa glomerular del bulbo olfativo formando los glomérulos olfativos (Soriano *et al.,* 2007). Cada glomérulo olfativo lleva la información de cada receptor.

En la capa glomerular los axones del nervio olfativo hacen sinapsis con las dendritas de dos tipos de células: las células mitrales y las células bipenachadas. Las células mitrales sitúan sus cuerpos celulares en la capa de células mitrales. Entre la capa glomerular y la de las células mitrales se extienden las dendritas apicales de las propias células mitrales, en un espacio denominado capa plexiforme externa. Inmediatamente debajo, más profundas en el bulbo, se encuentran las capas plexiforme interna y capa granular. Estas dos capas están formadas por un gran número de interneuronas que agrupan sus cuerpos celulares en la capa granular y sus dendritas en la capa plexiforme interna. Los axones de las células mitrales abandonan el bulbo formando el tracto olfativo, el cual se divide en distintas ramas que inervan las áreas olfativas secundarias (Figura 1).

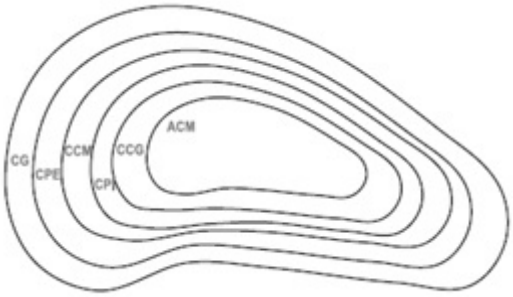


Figura 1. Esquema en el que se representa la organización del bulbo olfativo, así como diferentes estructuras características. Abreviaturas: capa glomerular (GC), capa plexiforme externa (CPE), capa de células mitrales (CCM), capa plexiforme interna (CPI), capa de células granulares (CCG) y zona de axones de las células mitrales (ACM).

Marcadores. Lectinas e inmunoglobulinas

En el estudio de estructuras nerviosas se pueden emplear tinciones generales pero aporta más información el empleo de herramientas que permitan poner de manifiesto comportamientos o elementos característicos. Entre las herramientas más usadas para ese fin en el sistema nervioso están los anticuerpos o inmunogloulinas que detectan proteínas (glicoproteínas de membrana), o las lectinas, proteínas ubicuas que detectan glicoconjugados, y que de acuerdo con el monosacarido con el que presentan mayor afinidad fueron clasificadas en 5 grupos por Sharon (Ambrosi *et al.,* 2005). En la actualidad, estos marcadores son un foco de investigación muy importante (Ambrosi *et al.,* 2005), sobre todo en aquellas investigaciones relacionadas con el reconocimiento celular.

Los estudios con estos marcadores y cerebros humanos no son muy abundantes, y menos en aquellos en los que se estudian enfermedades neurodegenerativas. Se puede destacar el llevado a cabo por Nishi y sus colaboradores (Nishi *et al.,* 2003), en el que emplearon las lectinas para estudiar la localización de glicoconjugados en el cerebro de pacientes mayores que presentaban Alzheimer o Síndrome de Down. Por otro lado, un estudio más reciente mostró que la disfunción olfativa está asociada a un trastorno mental,

sobre todo en la producción de nuevas neuronas en el bulbo olfativo humano y en cambios en su morfología (Bedard & Parent, 2004).

El objetivo general del trabajo es poner a punto una serie de marcadores celulares, que se usaran como herramientas en un estudio posterior para realizar una comparación entre bulbos controles y bulbos de pacientes con historial de enfermedades neurodegenerativas.

Para poder testar la utilidad de los diferentes marcadores que se van a estudiar se proponen los siguientes objetivos:

a) Estudiar el tipo de marcaje que ponen de manifiesto los diferentes marcadores.

b) Diferenciar y seleccionar los marcadores interesantes para futuros estudios comparativos entre bulbos olfativos controles y bulbos problema.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó sobre bulbos olfativos humanos procedentes de autopsias de individuos sin historial de patologías neurológicas, hombres y mujeres de entre 76 y 77 años. Los bulbos fueron obtenidos en el Hospital Meixoeiro a través del Biobanco del CHUVI y recogidos entre diciembre de 2013 y enero de 2014. El proceso experimental se ha llevado a cabo de acuerdo con el convenio de cesión de muestras y permiso ético por parte del grupo de investigación donde se ha realizado este estudio. Además, durante la manipulación de las muestras se siguieron las normas de trabajo con muestras procedentes de humanos, recogidas en el Real Decreto 1301.

Fijación e inclusión de los tejidos

El objetivo de la fijación es preservar las características morfológicas y moleculares lo más parecidas posibles a las que poseía el tejido en estado vivo. Los bulbos (derecho e izquierdo) fueron extraídos durante una autopsia, y sumergidos inmediatamente en líquido de Bouin durante 24 h a 4 ºC.

Tras la fijación se procedió a la inclusión, proceso en el que se sustituye la solución acuosa de las células y tejidos por el medio de inclusión. Se empleó la parafina mediante una deshidratación con alcoholes (etanol) de gradación creciente (desde 50º hasta el de 100º). Posteriormente se transfirió a xileno, sustancia intermedia miscible tanto en alcohol de 100º como en parafina, controlando el tiempo para evitar un endurecimiento excesivo de los tejidos.

A continuación el tejido se sumergió en tres baños sucesivos de parafina líquida (60 ºC), controlando el tiempo en función del tamaño de la pieza y del líquido intermediario que hayamos empleado. En nuestro caso consistió en un primer baño de 2 horas, un segundo de 16 h y un último paso de 1 hora. Por último, la muestra se colocó en un molde donde se añadió parafina líquida, que al solidificar a temperatura ambiente formó un bloque con el tejido incluido.

Corte y montaje

Se realizaron cortes de 8 µm de grosor, que se depositaron en unas gotas de agua sobre portaobjetos recubiertos con gelatina colocados sobre una plancha a 37º, para que los cortes se estiraran y se pegaran al portaobjetos al secarse el agua.

Se hicieron cuatro series de cortes de los bulbos olfativos procesados, de manera independiente. El objetivo fue poder estudiar distintos marcadores en secciones contiguas de tejido y destacar posibles diferencias entre ellos.

Tratamiento con lectinas o inmunoglobulinas de las muestras

Las lectinas son unas proteínas que tienen dominios o secuencias de aminoácidos que son capaces de reconocer y unirse a unos hidratos de carbono específicos. Para poder observar el lugar de unión específica de la lectina y su glúcido se une una molécula de biotina y un complejo enzimático, para obtener una señal visible al microscopio óptico.

En el caso de las inmunoglobulinas, para poder detectar una señal visible al microscopio óptico tenemos que conjugar un marcador (la biotina) a la inmunoglobulina. Se une a una inmunoglobulina secundaria, y posteriormente se añade un complejo enzimático.

El procesamiento de las secciones para la detección de glúcidos mediante lectinas o para inmunoglobulinas fue similar, aunque con algunas diferencias.

Las secciones o cortes de bulbo olfativo colocados sobre portaobjetos se desparafinaron con xileno y se hidrataron en una gradación decreciente de etanol de 100º a 80º, y agua destilada. Posteriormente los cortes se pasaron a tampón fosfato salino, 0.1 M y pH 7.4 (PBS).

Como en ambos procedimientos se empleó la enzima peroxidasa como marcador, es necesario inactivar la peroxidasa del propio tejido (evitar falsos positivos). Para ello se incuban los cortes en una mezcla de peróxido de hidrógeno, metanol y PBS (2:2:6). Posteriormente se lavaron las secciones en PBS. Para evitar falsos positivos debidos a la unión inespecífica de las lectinas o de las inmunoglobulinas al tejido se llevó a cabo una incubación en solución de bloqueo. Para ello los cortes se incubaron en albúmina de suero bovino (BSA) al 1 % en PBS.

A continuación se incubaron las secciones en lectina o inmunoglobulina. La concentración de marcador dependió de la prueba que se estaba realizando. Para ello se utilizó un método de incubación tipo sándwich. Se añadieron 150-200 µl de solución y se colocaron en una cámara húmeda para evitar la evaporación durante 18 a 24 h a temperatura ambiente.

Posteriormente la solución con las lectinas y las inmunoglobulinas se eliminó con lavados en PBS. Las secciones destinadas a inmunocitoquímica se incubaron durante 1 h en una inmunoglobulina secundaria anti-Ig-G de conejo conjugado con biotina (Vector Laboratories) diluido 1/100.

Todas las secciones se incubaron en el complejo avidina biotina peroxidasa (ABC; Vector Laboratories) diluido 1/200 en PBS. La avidina de este complejo reconoce a la biotina y se une fuertemente a ella, permitiendo su posterior observación.

El revelado de la peroxidasa del complejo ABC se llevó a cabo mediante el empleo de la 3-3' diaminobencidina (DAB; Sigma) y peróxido de hidrógeno. Se produce una reacción de óxido-reducción en la que la DAB se reduce y adquiere una coloración marrón visible al microscopio óptico. El tiempo de revelado fue controlado mediante observación al microscopio óptico en función de la prueba que se estuviese llevando a cabo (entre 1 y 5 min en todos los casos) y se detuvo con varios lavados de PBS. Tras el proceso de revelado algunas secciones se tiñeron con hematoxilina de Mayer durante 1 a 2 min para obtener una tinción de contraste de los núcleos de todas las células. A continuación las secciones se deshidrataron en una gradación creciente de etanol (80º a 100º), se aclararon en xileno y por último se montaron con DPex (Gurr).

Las secciones procesadas se estudiaron con un microscopio Olympus (BX51) y se fotografiaron con una cámara digital (DP71) adaptada a dicho microscopio.

En algunas pruebas realizadas el marcaje final obtenido no fue satisfactorio, bien por un exceso de marcaje o por una señal débil. Así, en pruebas sucesivas se siguió el protocolo anterior pero variando la concentración inicial de lectina o inmunoglobulina, o bien el tiempo de revelado.

RESULTADOS

Empleando diversos marcadores, lectinas e inmunoglobulinas, se pusieron de manifiesto distintas estructuras presentes en el bulbo olfativo de humanos. El tipo celular y las fibras marcadas, así como el nivel de marcaje en cada compartimento dependieron del marcador usado.

Se emplearon dos inmunoglobulinas y nueve lectinas. De estas últimas, salvo la GSL-1, todas revelaron la presencia de fibras, células y capilares en los distintos compartimentos bulbares, unas con un marcaje más nítido y otras con marcajes más generales.

Para distintos marcadores se hicieron pruebas de concentración y tiempos de revelado para obtener la mejor relación señal-ruido. La descripción de las estructuras positivas para cada lectina o inmunoglobulina

está basada en aquellas concentraciones y tiempos de revelado óptimos.

Los distintos marcadores se agruparon en cuatro categorías según las estructuras que pusieron de manifiesto y la intensidad del marcaje de las mismas. El principal criterio de clasificación vino determinado por la intensidad y variedad de estructuras observadas en la capa glomerular, aunque los distintos marcadores también presentaron diferencias sobre el marcaje en otros niveles y estructuras.

A continuación se describe de forma detallada el resultado obtenido en los grupos.

Grupo I. UEA-I

La UEA-I se caracteriza por llevar a cabo un excelente marcaje de los glomérulos y las fibras nerviosas de la capa glomerular (Figura 2.A). En este caso, la concentración óptima de marcaje se corresponde con 10 µg/ml y a un tiempo de revelado de 5 min. Se observaron claramente los glomérulos olfativos (abundantes en la parte más externa del bulbo) y numerosas fibras positivas entre ellos. También se detectaron fibras positivas más débiles en la capa de células granulares y células marcadas de pequeño diámetro de manera dispersa en todas las capas del bulbo. Aparecen algunos vasos sanguíneos de distinto calibre.

Grupo II. Con A, WGA, PNA, Anti-Calretinina

Este grupo de marcadores se caracterizó por marcar algunos glomérulos olfativos en la capa glomerular y por marcar de forma excelente las fibras nerviosas (Figura 2.B). Las condiciones de marcaje son muy similares para todas las lectinas (concentración de 5 µg/ml y tiempo de revelado de 1-2 min, salvo en el caso de la PNA, que necesitó un tiempo de revelado de 5 min) y de una concentración 1/500 con un tiempo de revelado de 5 min para la anti-calretinina.

Estos marcadores permitieron una visualización clara de toda la periferia bulbar. En la capa glomerular se pudieron localizar glomérulos olfativos (dispersos y poco numerosos). Por otro lado, las fibras nerviosas se pudieron observar de forma nítida, sobre todo en la capa glomerular. Cabe destacar que, dentro de este grupo, la calretinina es el marcador que permitió una diferenciación más nítida de esas fibras.

Se diferenciaron también fibras nerviosas positivas, con un marcaje más débil, en la capa de células granulares y células positivas dispuestas en los diferentes compartimentos bulbares.

Grupo III. SNA, DBA, RCA-I

El marcaje con las lectinas de este grupo se caracterizó por no poner de manifiesto los glomérulos olfativos y por revelar de manera clara las fibras nerviosas de la capa glomerular (Figura 2.C). La descripción del marcaje de estas lectinas se correspondió con un tiempo de revelado de 1 a 2 minutos, mientras que hubo variaciones en la concentración (5 µg/ml con DBA y 10 µg/ml para la SNA y RCA).

Se pudieron diferenciar fácilmente las fibras nerviosas de la capa glomerular. También marcaron de manera más débil fibras y prolongaciones celulares nerviosas con elevada densidad en el bulbo, pero sobre todo en la capa de células granulares.

Se observaron cuerpos celulares positivos de pequeño diámetro, distribuidos por todos los niveles rostrocaudales del bulbo olfativo. Cabe destacar que la SNA y la RCA-I marcaron vasos sanguíneos de distintos calibres, mientras que no se observó ninguno positivo para la DBA.

Grupo IV. SBA y Anti-G0

Estos dos marcadores se caracterizan por marcar de forma débil las fibras nerviosas presentes en la capa glomerular del bulbo olfativo (Figura 2.D). En este caso, la detección del marcaje para la SBA se corresponde con una concentración de 10 µg/ml y un tiempo de revelado de 1-2 minutos y para el anti-G0, una concentración de 1/500 y un tiempo de revelado similar.

En la capa glomerular, se pudo observar la distribución de las fibras nerviosas de forma débil y

dispersa, pero en ningún caso se observaron glomérulos. Se pudieron distinguir fibras positivas con una intensidad de marcaje muy similar en la capa de células granulares y cuerpos celulares positivos de diámetro medio, en todos los capas del bulbo olfativo. Ni la lectina SBA ni el anti-G0 permitieron marcaron vasos sanguíneos.

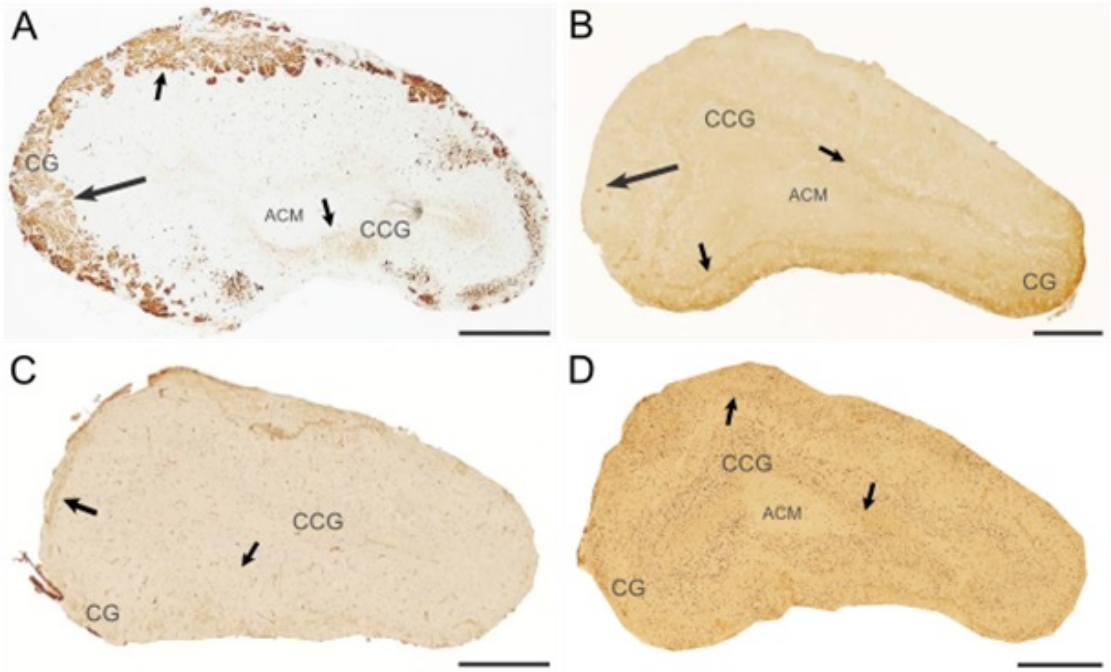


Figura 2. Imágenes de cortes transversales de 8 µm de grosor del bulbo olfativo humano teñidos con los distintos marcadores. (A) Sección procesada con una concentración de 10 µg/ml de UEA y un revelado corto de 1-2 min. (B) Sección procesada con una concentración de 10 µg/ml de PNA y un revelado corto de 1-2 min. (C) Sección tratada con una concentración de 10 µg/ml de RCA y un tiempo de revelado DE 1-2 min. (D) Sección tratada con una concentración de 10 µg/ml de SBA y un tiempo de revelado DE 1-2 min. Abreviaturas: capa glomerular (CG), capa de células granulares (CCG), zona de axones de las células mitrales (ACM). Las flechas grandes representan a los glomérulos olfativos y las flechas pequeñas representan las fibras nerviosas (en la capa glomerular y la capa de células granulares). Barras de escala: A, B, C, D: 1 mm.

DISCUSIÓN

Cuestiones metodológicas

El propósito de este proyecto era poner a punto una serie de marcadores en el bulbo olfativo de humanos y seleccionar aquellos que nos aportasen una mayor cantidad de información. Para ello, en primer lugar se aplicaron una batería de lectinas y dos inmunoglobulinas a las secciones. En aquellos casos en los que los resultados no fueron óptimos se modificaron las condiciones experimentales (concentración y tiempo de revelado) para conseguir la mayor señal con el mínimo ruido posible.

Hay que tener en cuenta otros aspectos a la hora de interpretar los resultados: algunas lectinas pueden reconocer a dos enlaces glucídicos, no pudiendo, en ocasiones, diferenciar cuál de ellos es el que da positivo (Con A, DBA, RCA) (Plendl & Sinowatz, 1998; Salazar *et al.,* 2001). El estudio en humanos de bulbos olfativos, y tejido nervioso en general, presenta limitaciones ya que es obligatorio un estudio postmorten (Santos *et al.,* 2010). El sistema nervioso sufre una rápida degeneración ante la falta de oxígeno (Bédard & Parent, 2004) por lo que el periodo postmorten, entre la muerte y la fijación de la muestra, es un periodo crítico para la preservación de las características moleculares y estructurales del tejido. Por ello es necesario estudiar numerosas muestras y conocer perfectamente las condiciones experimentales para poder obtener conclusiones generales. Por último, hay que destacar que la comparación de los resultados en humanos son difícilmente extrapolables a otras especies, y viceversa, ya que el marcaje de las lectinas varía enormemente según la especie considerada (Salazar & Sánchez, 1998).

Distribución de estructuras positivas

El bulbo olfativo puede dividirse en distintos compartimentos (Bédard & Parent, 2004), cada una de los cuales contiene estructuras propias como los glomérulos olfativos, fibras nerviosas, neuronas, glía y vasos sanguíneos.

Las lectinas e inmunoglobulinas empleadas en este estudio pusieron de manifiesto las diferentes estructuras y zonas del bulbo. Se clasificaron en cuatro grupos en base al tipo de marcaje obtenido (estructuras marcadas e intensidad de dicho marcaje), sobre todo en la capa glomerular donde las diferencias entre marcadores fueron más claras. El grupo I de lectinas, donde solo tenemos la UEA-I, permitió identificar tanto los glomérulos como las fibras presentes en la capa glomerular de forma más intensa. Un marcaje patente se relaciona con una cantidad elevada de carbohidratos presentes. Sin embargo, la WGA, PNA y anti-calretinina, pertenecientes al grupo II, pusieron de manifiesto principalmente las fibras, pero escasamente los glomérulos en dicha capa. Los otros dos grupos, III y IV, no marcaron glomérulos. Esto indica que los glomérulos tienen una diferente composición de glicoconjugados en comparación con el resto de fibras de la capa glomerular. Por ello mediante el uso de lectinas determinadas se podrá estudiar por separado ambos elementos, glomérulos y fibras, para estudios comparativos entre bulbos controles y patológicos.

Todos marcadores utilizados revelaron fibras positivas en las capas más profundas del bulbo olfativo, sobre todo en la capa de células granulares. Estas fibras son identificadas como los axones de las células mitrales, células que reciben en sus dendritas las aferencias olfativas primarias. Por tanto, se puede deducir que alteraciones en el patrón de dichas fibras indicarían alteraciones patológicas. Tal y como se describió en el apartado de resultados el marcaje de fibras nerviosas en la capa granular fue de mayor intensidad en los grupos I y II y menor en el III y el IV. Las otras capas centrales del bulbo olfativo, conocidas como capas plexiformes interna y externa, las cuales contienen fundamentalmente las dendritas de las células mitrales, presentan un marcaje más débil que las otras capas.

Se ha demostrado que en el bulbo olfativo se pueden diferenciar cuatro tipos celulares: periglomerulares, mitrales, bipenachadas y granulares, con diferente distribución según la capa bulbar (Soriano *et al.,* 2007). En la capa glomerular se encuentran los somas de las células periglomerulares. Las lectinas del grupo III marcan numerosas células periglomerulares, mientras que estas células son negativas para las lectinas e inmunoglobulinas de los otros grupos. Los somas de las células mitrales y bipenachadas fueron negativas en todos los casos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, es probable que los axones de las células mitrales sean positivos para los marcadores de los grupos I y II. Por último las células granulares fueron positivas para todos los grupos pero destacan la UEA-I, grupo I, y la PNA del grupo de II. Por último, en esta capa de células granulares y en la capa de axones mitrales también aparecen otros tipos de neuronas más grandes de manera dispersa (Nieuwenhuys *et al.,* 2008), que en nuestro se marcaron con la lectina del grupo II, PNA. Por tanto, también en este caso es posible estudiar poblaciones celulares concretas utilizando una u otra lectina o inmunoglubilina.

Por último, la red de vasos sanguíneos se marcó con algunas lectinas, como la UEA-I, grupo I, y con la DBA y RCA-I del grupo III, las cuales pusieron de manifiesto vasos sanguíneos de diferente diámetro. Aparentemente todos los vasos sanguíneos fueron positivos, concretamente destacó la capa endotelial. Estas lectinas pueden ser de gran utilidad para detectar alteraciones en el riego vascular.

Otros estudios del bulbo olfativo humano

Los trabajos donde se utilizan las lectinas como herramientas para estudiar el bulbo olfativo de humanos son escasos. Por ejemplo, en estudios concretos (Nagao *et al.,* 1993) se utilizó la lectina UEA-I con la que se obtuvo un marcaje similar al de este trabajo, sobre todo con fibras y glomérulos marcados en las capa glomerular. Por otro lado, numerosos estudios intentan correlacionar las alteraciones del olfato, en especial el bulbo olfativo, con las enfermedades neurodegenerativas, aunque pocos de ellos utilizan lectinas. Por ejemplo, en relación con las enfermedades neurodegenerativas, (Dickson *et al.,*

1988) empleó la RCA-I como marcador, revelando que en bulbos olfativos de individuos con Alzheimer presentaban mayor densidad de vasos sanguíneos en torno a las placas seniles.

En cuanto a las inmunoglobulinas, algunos autores (Bédard & Parent, 2004) determinaron que un número significativo de las células granulares contienen la calretinina, una proteína de unión a calcio, y la parvoalbumina, otra proteína de unión a calcio asociada a GABA. En nuestro caso la calretinina marcó pocas células granulares y sobre todo marcó fibras positivas en la capa glomerular. Las diferencias pueden ser debidas al tipo de inmunoglobulina usada o las condiciones experiementales.

Seleccionando aquellos marcadores que delimiten de forma nítida compartimentos o subcompartimentos en el bulbo olfativo, se podrán detectar variaciones en la morfología de dichas regiones cuando estén en un proceso general de envejecimiento o durante el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, lo cual ayudará a interpretar el proceso degenerativo o de envejecimiento y sus efectos en la olfacción.

CONCLUSIONES

Las lectinas son unos buenos marcadores para la detección selectiva de estructuras nerviosas en el bulbo olfativo de humanos. También es el caso de algunas inmunoglobulinas, como la anti-calretinina y la anti-G0. De esa forma, se pueden diferenciar distintas zonas con distintos marcadores, y escoger aquellos que generen un marcaje más nítido y diferencial en cada una de ellas. Esto es particularmente útil en tejidos postmorten puesto que reconocen estructuras moleculares resistentes a la degradación, y pueden ser buenas herramientas para estudiar patologías en humanos.

BIBLIOGRAFÍA

Ambrosi, M., Cameron, NR., Davis, BG. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycocode. Org. Biomol. Chem. 3: 1593-1608

Bédard, A., Parent, A. (2004). Evidence of newly generated neurons in the human olfactory bulb. Dev. Brain Res. 151:159-168

Coronas, G., Medina, I., Aguilar, A., Portillo, W., González, I., Paredes, R., Díaz, S. (2011). Conducta olfativa en un modelo murino de Alzheimer. Rev. Dig. Univ. 12:3-9

Dickson, DW., Farlo, J., Davies, P., Crystal, H., Fuld, P., Yen, S. (1988). Alzheimer's Disease. A double labeling immunohistochemical study of senile plaques. Am. J. Pathol. 132: 86-101

Hoyles, K., Sharma, J. (2013). Olfactory loss as a supporting feature in the diagnosis of Parkinson's disease: a pragmatic approach. J. Neurol. 260:2951-2958

Lejarreta, S., Turró, O., Vilanova, J.C., Freixenet, J., Martí, Robert., López, S. (2012). El sistema olfatorio, el envejecimiento y la enfermedad del Alzheimer. Rev. Alzheimer. 51:37-43

Miranda, M., Pérez, C. (2006). ¿Por qué evaluar el olfato? y ¿Cómo evaluarlo? Implicancias en el diagnóstico de la Enfermedad de Parkinson: Aplicación de un práctico test en población adulta y sana y con síntomas parkinsonianos. Rev. Med. Clin. Condes. 17:120-123

Molist, P., Pombal, MA., Megías, M. Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología, Universidad de Vigo (2014). Atlas de histología vegetal y animal. Recuperado el 3 de junio de 2014 de http://webs.uvigo.es/mmegias/inicio.html.

Navarrete, E., Próspero, O., Hudson, R., Guevara, R. (2000). Enfermedades neurodegenerativas que cursan con demencia. Gác. Med. Mex. 136: 189-200

Nagao, M., Oka, N., Kamo, H., Akiguchi, I., Kimura, J. (1993). Ulex europaeus I and Glicine max bind to the human olfactory bulb. Neurosci Lett. 164: 221-224

Nieuwenhuys, R., Voogd, J., Van Huijzen, C. (2008). El sistema nervioso central humano. Tomo II. Madrid, España: Panamericana.

Nishi, K., Tanegashima, A., Yamamoto, Y., Ushiyama, I., Ikemoto, K., Ymasaki, S., Nishimura, A., Rand, S., Brinkmann, B. (2003). Utilization of lectin-histocheistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmorten diagnosis in forensic neuropathology. Legal Medicine. 5: 117-131

Plendl, J., Sinowatz, F. (1998). Glycobiology of the olfactory system. Acta Anat. 161: 234-253

Ropper, AH., Brown, RH. (2007). Trastornos del olfato y el gusto. En: Ropper, AH., Brown, RH. (Eds.). Principios de Neurología. México: McGraw-Hill Interamericana, pp.195-202.

Ruan, Y., Zheng, XY., Zhang, HL., Zhu, W., Zhu, J. (2012). Olfactory dysfunctions in Neurodegenerative Disorders. J. Neurosci. Res. 90: 1693-1700

Salazar, I., Sánchez, P. (1998). Lectin bilding patterns in the vomeronasal organ and accessory olfactory bulb of the rat. Anat. Embryol. 198:331-339

Salazar, I., Sánchez, P., Lombardero, M., Cifuentes, JM. (2001). Histochemical identification of carbohydrate moieties in the accessory olfactory bulb of the mosuse using a panel of lectins. Chem. Senses. 26: 654-652

Santos, D., Aneiros, A., Macías, M., Llaneza, MA., Abella, J., Santos, H. (2010). Síntomas sensoriales en la enfermedad del Parkinson. Rev. Neurol. 50: 65-74

Soriano, C., Guillazo, G., Redolar, DA., Vale, A. (2007). Fundamentos de Neurociencia. Barcelona, España: UOC.

IDENTIFICACIÓN DEL SEXO EN TRUCHA COMÚN MIGRADORA UTILIZANDO MARCADORES GENÉTICOS

Noemi González González
e- mail: noemicelanova@hotmail.com

Trabajo Fin de Grado
Tutora:
- Paloma Morán Martínez
Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

En este estudio se efectuó una aproximación experimental al proceso de determinación sexual basada en la amplificación parcial del gen *sdY* de Yano et al. (2013) en *Salmo trutta*. Comprobamos la precisión del método en poblaciones del río Lérez determinando el sexo y estudiando su relación con otros parámetros: talla, peso, edad río y edad mar. Los resultados determinaron que la amplificación por PCR del fragmento del *sdY* es un método válido para la determinación del sexo, la proporción de hembras es superior a la de machos en un porcentaje similar a la de otras poblaciones estudiadas y que no se aprecian diferencias significativas en peso y longitud entre machos y hembras como tampoco las hay para la edad de río y edad de mar.

Palabras clave: *gen sdY, determinación sexual, reo, amplificación por PCR, Salmo trutta, río Lérez.*

INTRODUCCIÓN

La trucha común (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758) es una especie de salmónido que exhibe diferentes comportamientos de migración dependiendo del ambiente. La distribución geográfica de esta especie se extiende de forma natural desde el océano Ártico (norte de Noruega) y el mar Blanco (Rusia), hasta las montañas del Atlas en el norte de África. También desde Islandia hasta el mar Aral en Afganistán y Pakistán (Behnke, 1972).

En ríos con acceso al mar los juveniles pueden migrar al mar y retornar al río de nacimiento para completar su ciclo de vida (trucha anádroma o reo) o permanecer en agua dulce durante todo su ciclo vital realizando movimientos restringidos dentro del río (trucha residente o trucha). Este fenómeno por el cuál la población se divide entre individuos migradores y residentes se denomina migración parcial (Jonsson & Jonsson, 1993). Normalmente, en los ríos localizados en áreas costeras con acceso al mar, ambos tipos viven en simpatría. Cuando los adultos migradores vuelven al río de origen para el desove, las truchas residentes y los reos pueden reproducirse entre ellos y los juveniles crecen sin distinción alguna en el mismo río. Cuando llega la época del esguinado, la decisión entre migrar o permanecer en el río se toma cuando se excede cierto umbral de condiciones ecológicas y genéticas, lo que presenta un claro ejemplo de plasticidad fenotípica (Ferguson, 2006).

En muchas poblaciones descritas en la literatura, predominan las hembras sobre los machos entre la fracción migradora de la trucha común. Las poblaciones de reo se caracterizan, generalmente, por tener una proporción de sexos de 2-3 hembras por macho (Baglinière *et al.* 2001).

Los reos, al igual que las truchas residentes, se reproducen entre diciembre y mediados de febrero. Los juveniles, tras permanecer entre 1 y 4 años en el río, migran al mar como esguines en primavera. Aproximadamente el 50% de la población retorna al río el mismo año del esguinado a partir del mes de junio, aunque no siempre con fines reproductores. La edad de primera maduración tiene lugar entre el primer y el tercer invierno tras el esguinado. El 25% de los reos retornan al río para reproducirse por lo menos una segunda vez, habiéndose detectado individuos que habían frezado hasta en cuatro ocasiones (Baglinière *et al*. 2001).

Es en la etapa de reproducción cuando comienza la aparición de caracteres sexuales secundarios y donde se puede realizar un sexado visual fiable. Por lo general, la determinación del sexo en esta etapa no representa dificultad, ya que se puede determinar el sexo por las características externas. En cambio, en etapas previas es necesario abrir la cavidad visceral y exponer las gónadas para determinar el sexo. Incluso así, la diferenciación entre machos y hembras en fases tempranas de la madurez sexual puede ser difícil siendo necesario el empleo de equipos ópticos para identificar las gónadas. La identificación no invasiva del sexo en salmónidos es en determinadas etapas de su ciclo vital muy complicada.

La determinación de la proporción de sexos y la sucesión de cambios en la fase de maduración que ocurren durante el año son de enorme importancia para adquirir un conocimiento completo de la biología de una población explotada. Por otro lado, la determinación de los sexos tiene como aplicación primordial proporcionar información esencial sobre la dinámica de la reproducción de una población. La información obtenida de estos análisis es útil para: establecer edad y talla en las que los peces alcanzan la madurez sexual, el momento y lugar de reproducción y la duración del ciclo desde el comienzo del desarrollo del ovario hasta la puesta de los huevos. Junto con las estimaciones de la fecundidad, esta información puede emplearse para calcular las dimensiones de la población y su potencial reproductivo. Los datos tienen varios usos prácticos. La edad y la talla en el momento de la madurez sexual son importantes para evaluar la edad óptima de la primera captura de una especie. Otro aspecto a considerar es el momento y lugar del desove, que facilita la organización de la pesca recreativa.

Todas las especies de salmónidos investigadas hasta la fecha han estado caracterizadas por un sistema de determinación sexual masculino heterogamético. Se ha demostrado que en su mayoría comparten un sistema de determinación sexual común (XX/XY) pero no tienen cromosomas sexuales reconocibles al microscopio (Devlin & Nagahama, 2002). Es por ello que se abre el debate sobre si comparten un gen maestro de determinación del sexo.

El descubrimiento del gen *sdY* como el gen de determinación sexual en la trucha arco iris (Yano *et al*., 2012) ha sido especialmente relevante. El gen *sdY* (sexually dimorphic on the Y-chromosome) codifica una proteína de 192 aminoácidos mostrando una secuencia homóloga con el dominio carboxilo terminal del factor regulador del interferón 9 (IRF9). La estructura del gen que se deduce del alineamiento del ADNc *sdY* (nº de acceso del GenBank AB626896) con la secuencia *OmyY1*, muestra que está compuesto por 4 exones que comprenden 7,694 pb de la secuencia de 21,126 pb de *OmyY1*.

En una investigación posterior (Yano *et al.*, 2013) demuestran que la secuencia del gen *sdY* está conservada en varias especies de salmónidos y que está estrechamente vinculada al locus de determinación sexual.

Yano *et al.* (2013) proponen un método de determinación del sexo basado en la amplificación parcial del gen *sdY.* De modo que después de la amplificación se detectaría la presencia de banda en machos que estaría ausente en hembras.

Objetivos

- Comprobar la precisión de que el procedimiento de sexado genético realizado en salmónidos puede tener éxito en las poblaciones de trucha (*Salmo trutta*) de ríos que drenan al atlántico.
- Determinar, por métodos genéticos, el sexo de la población de reos del río Lérez durante los años 2010 y 2011.
- Estudiar la relación del sexo con otros parámetros (talla, peso, edad río y edad mar) en la población del río Lérez.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras

Como muestras control del método de sexado se dispone de 80 muestras de aleta adiposa de truchas macho y hembra, conservadas en etanol, de los ríos Lérez y Ulla que fueron sexadas visualmente de forma inequívoca.

Como muestras problema se dispone de 372 muestras de ADN extraído de la aleta de reos retornados al río Lérez y que fueron capturados en la presa de Bora como parte de una investigación anterior (Marco-Rius, 2013). Corresponden 149 al año 2010 y 223 al año 2011. Todas las muestras habían sido amplificadas por PCR para 6 microsatélites. Esta amplificación se considera como control positivo de la buena calidad del ADN.

De estas muestras hay datos de peso y longitud tomados en el momento de su captura. Además, para algunos peces, hay datos de la edad de río (años de permanencia en el río) y la edad de mar (años de permanencia en mar). Las edades fueron calculadas mediante la lectura de escamas según se explica en Marco-Rius *et al.,* (2012) por Mateo de la Fuente como parte de su TFG (Facultad de Ciencias del Mar).

Las escamas son las estructuras más utilizadas en salmónidos por su facilidad de extracción y por no causar un grave traumatismo al pez. La escalimetría permite, no solamente determinar la edad del pez, sino que también posibilita el reconocimiento de diferentes fases vitales que ocurren en medios distintos. También hace posible conocer las reproducciones que ha realizado y en qué momento, estableciendo el crecimiento del individuo. En el caso de un pez anádromo –reo- es posible distinguir la fase juvenil que tiene lugar en el río, de la fase de crecimiento marino. El establecimiento de la edad fluvial y marina en los distintos individuos analizados permite conocer la edad media de esguinado y de mar de la población (Baglinière *et al.,* 1985).

Extracción de ADN

El ADN se extrajo a partir de una pieza de aleta con resina de Chelex (BioRad).

Para ello se calienta el chelex en agitación a 60ºC y se añade a cada tubo 400 µL y 20 µL de pronasa (concentración de 20 mg/mL). Posteriormente se calienta la mezcla a 55ºC en agitación para almacenar en nevera o congelador.

Amplificación de ADN

Para evitar contaminaciones las muestras se prepararon en una cabina de flujo laminar y la amplificación se realizó en un volumen de 1 µL de ADN genómico. Para obtener el volumen final de 20 µL añadimos 16,5 µL de agua, 2 µL de buffer 10x, 1 µL de dNTPs 10mM, 0,2 µL de KAPA Taq (Kapa Biosystems) y por último 0,2 µL de cada cebador 10mM.

El protocolo de amplificación por PCR consiste en un primer paso de desnaturalización a 95ºC durante 3 minutos, 30 ciclos que constan de 30 segundos de desnaturalización a 95ºC, 1 minuto de anillamiento a 60ºC, 30 segundos de extensión a 72ºC y por último un paso de elongación.

Se utilizó la PCR 270 Thermal cycler de Applied Biosystem. El nombre y la secuencia de los cebadores específicos, directo e inverso son respectivamente *sdY* E1S1: 5'-ATGGCTGACAGAGAGCCAGAATCCAA -3' y *sdY* E2AS4: 5'-CTTAAAACCACTCCACCCTCCAT - 3' (Yano *et al.,* 2013).

Electroforesis en gen de agarosa

Para observar los resultados y asegurar que la amplificación ha sido correcta, los productos de la PCR se cargaron en geles de agarosa al 2% junto con un marcador de peso molecular. Las condiciones de la Electroforesis son 100 mv durante 20 – 30 minutos.

Visualización del gel

Una vez terminada la electroforesis se observa el gel de agarosa con una cámara CCD *Video Cámara module* y con luz ultravioleta.

Análisis estadístico

Los análisis se llevaron a cabo usando el software estadístico SPSS Statistics de IBM y el software R (R Development Core Team, 2014).

Mediante el software SPSS se estudió la proporción de individuos de cada sexo. Con el paquete *ggplot2* del software R se realizaron las gráficas donde se representa el número de reos en función del mes de entrada en el río, del peso y de la longitud.

Con el objetivo de evaluar la relación del sexo con la longitud y el peso de los individuos se utilizó un modelo linear del software R. El análisis de regresión lineal es una técnica estadística utilizada para estudiar la relación entre variables cuantitativas. Del mismo modo se analizó la relación entre el sexo y la migración con el objetivo de estudiar si hembras y machos migran al mar con la misma edad y si vuelven al río con la misma edad.

Las preguntas que se plantean en el análisis son las siguientes:

- ¿Hay diferencias en peso entre machos y hembras?
- ¿Hay diferencias en tamaño entre machos y hembras?
- ¿Hay diferencias en la edad de río entre machos y hembras? Es decir, ¿migran antes las hembras o los machos?
- ¿Hay diferencias en la edad de mar entre machos y hembras? Es decir, ¿retornan antes las hembras o los machos?

RESULTADOS

Extracción de ADN

El protocolo de extracción con resina de Chelex ha permitido una sencilla y rápida extracción de ADN. La cantidad y calidad de ADN extraído ha sido suficiente para llevar a cabo una adecuada amplificación.

Amplificación de ADN

Una de las mayores dificultades de este proceso es la alta probabilidad de contaminación de las muestras.

La preparación de las muestras en una cabina de flujo laminar junto con los correspondientes controles positivos y negativos permitió amplificar las muestras estudiadas y obtener buenos resultados libres de contaminación. En la Figura 1 se observan las bandas correspondientes a la amplificación de la secuencia conservada del gen sdY en genomas masculinos de reo. Las muestras donde se aprecia una ausencia de banda se corresponden con las hembras.

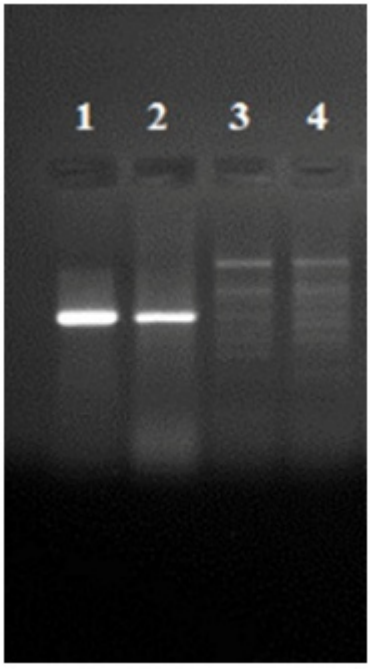


Figura 1. Amplificación del gen sdY en Salmo trutta. En la calle 1 se visualiza un control de macho, en la calle 2, un macho y en las calles 3-4 hembras.

Análisis de datos

En la Tabla 1 podemos ver el resultado global del sexado en *Salmo trutta* analizado con el software estadístico SPSS Statistics de IBM. El 78,0% de las 372 muestras analizadas se corresponde con hembras y el 22,0% con machos. Observamos cómo predominan éstas sobre los machos con una proporción de 3,5 hembras por macho.

Tabla 1. Resultado del sexado. H: hembra, M: macho, N: número de individuos

		N	PORCENTAJE
SEXO	H	290	78,0 %
	M	82	22,0 %
	Total	372	100,0 %

Tabla 2. Resultado del sexado por año. H: hembra, M: macho, N: número de individuos

Sexo	2010		2011	
	N	%	N	%
H	113	75,8%	177	79,40 %
M	36	24,2%	46	20,60 %
TOTAL	149	100,0%	223	100 %

Si analizamos la distribución por sexos de las muestras para cada año analizado observamos cómo se mantienen unos porcentajes muy similares predominando las hembras sobre los machos con una proporción de sexos de 2-3 hembras por macho (Tabla 2).

Para el trabajo se disponía de una tabla con la información detallada de cada pez: fechas de recogida, datos de longitud, peso, factor de condición (relación volumétrica en función del peso) y el sexado visual realizado por los pescadores en algunas muestras. De algunas muestras se conocía la edad de río y mar calculada mediante la lectura de las escamas.

Tabla 3. Calendario de la migración de adultos de retorno al río Lérez (2010-2011)

MES	N	%
ABRIL	4	1,07 %
MAYO	10	2,69 %
JUNIO	66	17,74 %
JULIO	141	37,90 %
AGOSTO	67	18,01 %
SEPTIEMBRE	19	5,11 %
OCTUBRE	16	4,30 %
NOVIEMBRE	29	7,79 %
DICIEMBRE	20	5,38 %

Observando el mes de retorno de los 372 reos en el río Lérez podemos ver cómo la migración de adultos se inicia tímidamente en el mes de abril y algo más en mayo. La proporción de reos capturados se incrementa notablemente en junio (17,74%) para alcanzar su máximo en julio (37,90%). Tras este pico se inicia un descenso que alcanza su mínimo en octubre (4%), seguido de un remonte otoñal en noviembre relacionado con la reproducción, pero de menor magnitud que el estival (Tabla 3 y Figura 2).

Los 372 reos capturados en la presa de Bora entre 2010 y 2011 presentan una talla media de 344 mm y un peso medio de 490 g.

Respecto al total de las muestras fueron 86 las que fueron sexadas visualmente por los pescadores, de las que solamente 64 concordaron con el sexado genético. Lo que representa un acierto del 55,04%.

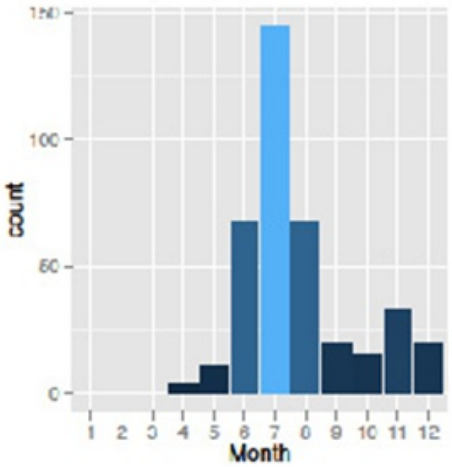


Figura 2. Representación de la migración de adultos de retorno de reo. En el eje X se indica el mes de retorno (month) y en el eje Y, el número de individuos (count)

Mediante los análisis que se llevaron a cabo usando el software R (R Development Core Team, 2014) se obtuvieron las siguientes estimaciones para las preguntas planteadas:

- ¿Hay diferencias en peso entre machos y hembras?

No. No las hay (Coeficiente de regresión = 6.61; P = 0.86)

- ¿Hay diferencias en tamaño entre machos y hembras?

No. No las hay (Coeficiente de regresión = -0.86; P = 0.92)

- ¿Hay diferencias en la edad de río entre machos y hembras?

No. No las hay (Coeficiente de regresión = -0.07; P = 0.61)

- ¿Hay diferencias en la edad de mar entre machos y hembras?

No. No las hay (Coeficiente de regresión = -0.05; P = 0.77)

DISCUSIÓN

Observando los resultados se puede afirmar que el método llevado a cabo en este estudio es fiable para la identificación no destructiva del sexo en las poblaciones atlánticas de *Salmo trutta*. A pesar de requerir el manejo del animal para realizar un corte de la aleta para la extracción de ADN, este método no necesita abrir la cavidad visceral para exponer las gónadas matando al pez. En el artículo de Petterson *et al.,* (2014) se relata cómo el hecho de realizar el corte en la aleta adiposa no afecta a los peces.

El método tiene dos inconvenientes. Por una parte, al tratarse de un método basado en la ausencia-presencia de una banda amplificada, es necesario realizar controles internos de amplificación. Si el ADN no está en buenas condiciones o hay presencia de inhibidores se obtendría un falso positivo para la presencia de machos.

Por otra parte la contaminación. Esta resultó ser un problema importante en el inicio de este trabajo ya que muchos controles se vieron afectados. Sin embargo, el problema se solucionó realizando las amplificaciones en una cabina de flujo laminar y utilizando material (tubos, puntas, gradillas, agua...) en exclusiva para este experimento.

La eficacia de este método queda patente en las amplificaciones de ADN realizadas con los controles de los ríos Lérez y Ulla. Estas muestras fueron sexadas mediante criterios morfológicos de forma inequívoca con el fin de tener en cuenta todos los posibles errores del método. Este es un paso previo e imprescindible para validar la efectividad del método ya que en la literatura hay referencias sobre falsos positivos o negativos del marcador en algunas poblaciones. En el estudio llevado a cabo por Yano *et al.,* (2012) se encontraron dos especies de la subfamilia *Coregoninae (Coregonus lavaretus* y *Coregonus clupeaformis)* que amplificaban el gen *sdY* en ambos genomas, tanto en machos como en hembras. En el mismo trabajo se indica también la incapacidad para amplificar el gen en *Esox lucius* de la familia Esocidae que es considerado como la especie hermana más próxima a los salmónidos.

Hasta la aparición de métodos como el utilizado en este trabajo la identificación no invasiva del sexo en salmónidos se realizaba mediante el método inmunoenzimático de la vitelogenina (Pérez *et al.,* 2005; Saura *et al.,* 2009). Es una proteína específica de las hembras de vertebrados ovíparos que se encuentra presente durante el ciclo de maduración ovárica. Para que sea válido este método es necesario que se haya iniciado en el adulto la fase de producción de huevos para que la vitelogenina esté presente en la sangre del individuo. Su gran inconveniente en comparación con la amplificación del gen *sdY* es que no es válido para juveniles.

Las proporciones de sexos obtenidas en este estudio concuerdan con la mayoría de poblaciones

estudiadas hasta ahora (Jonsson, 1985; Richard, 1986; Bagliniere, 2001; Caballero, 2002). Las poblaciones migradoras de reo se caracterizan, generalmente, por tener una proporción de sexos de 2-3 hembras por macho, lo cual representa una estrategia reproductiva que fomenta la fecundidad pero que obliga a una mayor competencia entre machos sedentarios y anádromos. Las hembras anádromas consiguen un aumento en la fecundidad con el aumento del tamaño corporal al desarrollarse en el ambiente marino. El proceso de maduración en el río se desencadena con mayor facilidad en los machos, que no requieren de un aumento de tamaño para incrementar la calidad de sus gametos. Por esta razón el ciclo de vida sedentario es mayoritario en este sexo (Toledo, 1996; Caballero, 2003).

Cuando se comparan los datos obtenidos con la proporción de sexos realizada visualmente por los pescadores, utilizando los individuos capturados en la estación de Bora, su acierto es solamente del 55,0% debido a la falta de caracteres sexuales secundarios en los peces que retornan al río. Sobre todo los que lo hacen tempranamente, bien en edad o en el mes de retorno. Por lo tanto el método de sexado genético es muy útil para la gestión de las poblaciones.

Los análisis realizados utilizando los datos disponibles de peso y longitud indican que el sexo no es determinante ni para el tamaño ni para peso de los adultos por lo que no se observan diferencias significativas entre machos y hembras. El tamaño de los individuos es muy importante en el rio ya que es un rasgo vital para la supervivencia en la migración al mar debido a la mayor capacidad de osmorregulación de los individuos mayores. En el mar el tamaño deja de ser importante porque ya han sobrevivido al cambio de ambiente. Sucede tanto en machos como en hembras y todos los individuos, independientemente del sexo, tienden a compensar su tamaño en el mar. Esto hace que los más pequeños crezcan un poco más y los grandes dejen de crecer hasta equipararse (Marco-Rius *et al.,* 2012).

Por último, observamos que no hay diferencias entre la edad de río y de mar entre hembras y machos. Se concluye por tanto que el sexo es determinante sólo en ámbitos de migración ya que las hembras en el medio marino consiguen un aumento en la fecundidad con el aumento del tamaño corporal. El tamaño favorece una mayor producción de huevos y acceder a territorios de alta calidad para el desove y desarrollo de los huevos (Jonsson & Jonsson, 1993).

CONCLUSIONES

- La amplificación por PCR del fragmento del gen sdY es un método válido para la determinación del sexo en truchas del río Lérez y Ulla.

- En los reos del río Lérez la proporción de hembras es superior a la de machos en un porcentaje similar a la de otras poblaciones analizadas.

- No hay diferencias significativas en peso y longitud entre machos y hembras como tampoco las hay para la edad de río y de mar.

BIBLIOGRAFÍA

Baglinière, J. L., Bomassi, P., Bousquet, B., Chancerel, F., De Pontual, H., Dumas, J., Euzenat, G., Fontenelle, G., Fournel, F., Gayou, F., Luquet, J.F., Maisse, G., Martin Ventura, J.A., Marty, A., Nihouarn, N., Porcher, J.P., Prevost, E., Prouzet, P., Pustelnik, G., Richard, A., & Troadec, H. (1985). La détermination de l'âge par scalimétrie chez le saumon Atlantique (Salmo salar) dans son aire de répartition méridionale: utilisation pratique et difficultés de la méthode. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture. 298: 69-105.

Baglinière, J. L., Ombredane, D., & Marchand, F. (2001). Critères morphologiques pour l'identification des deux formes (rivière et mer) de truite (Salmo trutta) prèsentes sur un même bassin. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture. 357-360: 375-383.

Behnke, R. J. (1972). The systematics of salmonid fishes of recently glaciated lakes. Journal of the Fisheries Board of Canada. 29: 639-671.

Caballero, P. (2002). Ciclo vital del reo (Salmo trutta Linnaeus, 1758) en la cuenca del río Ulla. Memoria Diploma de Estudios Avanzados. Santiago de Compostela.

Caballero, P. (2013). Biología y ecología del salmón atlántico (Salmo salar) y el reo o trucha de mar (Salmo trutta) en Galicia. Sociedad de ciencias de Galicia. 77-99.

Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture. 208: 191-364.

Ferguson, A. (2006). Genetics of sea trout, with particular reference to Britain and Ireland. Sea Trout. Biology, conservation and management. 12: 157-182.

Jonsson, B., & Jonsson, N. (1993). Partial migration: niche shift versus sexual maturation in fishes. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 3: 348-365.

Marco-Rius, F., Caballero, P., Morán, P., & de Leaniz, C. G. (2012). And the last shall be first: heterochrony and compensatory marine growth in sea trout (Salmo trutta). PloS one. 7: e45528.

Marco-Rius F., Sotelo G., Caballero P., Morán P. (2013). Insights for planning an effective stocking program in anadromous brown trout (Salmo trutta). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 70: 1092-1100.

Pérez J., Izquierdo J.I., García-Vázquez E. (2005). Female biased harvest on Atlantic salmon in Spain. Fisheries Research. 74: 127-133.

Petersson, E., Rask, J., Ragnarsson, B., Karlsson, L., & Persson, J. (2014). Effects of fin-clipping regarding adult return rates in hatchery-reared brown trout. Aquaculture. 422: 249-252.

Richard, A. (1986). Les populations de truit de mer, Salmo trutta L., de L´Orne et de las Touques (Basse-Normandie): Scalimetrie, sexage, caracteristiques biometriques, demographiques et migratories. These Doc. Univ. de Rennes.

Saura, M., Caballero, P., Caballero, A., & Morán, P. (2009). Determinación de la proporción de sexos en salmones capturados durante la temporada de pesca. Investigación: cultura, ciencia y tecnología. 1: 56-59.

Toledo, M. M. (1996). Ciclos de vida y estrategias reproductivas de la trucha común (Salmo trutta L.). Tesis doctoral. Universidad de Oviedo.

Yano, A., Guyomard, R., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Klopp, C., Cabau, C., Bouchez, O., Fostier, A., & Guiguen, Y. (2012). An Immune-Related Gene Evolved into the Master Sex-Determining Gene in Rainbow Trout, Oncorhynchus mykiss. Current Biology. 22: 1423-1428.

Yano, A., Nicol, B., Jouanno, E., Quillet, E., Fostier, A., Guyomard, R., & Guiguen, Y. (2013). The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. Evolutionary applications. 6: 486-496.

APROVEITAMENTO MICOLÓXICO SOSTIBLE NOS MONTES COMUNAIS DO CONCELLO DE MOS (PONTEVEDRA)

Jessica María Urgal Alonso
e-mail: jessicaurgal@gmail.com

Trabajo Fin de Grado
Tutora:
- Marisa Castro
Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

Neste proxecto faise unha avaliación do posible aproveitamento micolóxico sostible nos Montes Comunais do concello de Mos (Pontevedra), utilizando varias propostas: venda directa, aluguer do terreo, explotación micoturística, etc. co fin de contribuír á implantación de sistemas innovadores para o desenvolvemento socioeconómico do medio rural.

Palabras clave: *Micoloxía, cogomelos, aproveitamento sostible, montes comunais*

INTRODUCCIÓN

Ata hai relativamente poucos anos o único rendemento económico que se esperaba dos montes era a produción de madeira, sen embargo na actualidade estanse desenvolvendo outras alternativas de aproveitamento dun xeito máis ecolóxico e conservacionista (Conesa Mor, 2000; Sevilla Martínez, 2008). Dentro destes novos planos teñen gran importancia os fungos, especialmente os produtores de cogomelos, unha vez que se clarificou quen é o propietario do produto, a pesar de non ter nada que ver coa súa plantación (García Asensio, 2004).

Na actualidade coñécense ao redor de 80.000 especies de fungos no mundo, das que un 20% producen frutificacións observables a simple vista (macromicetos). En Galicia só se coñecen ao redor das 2.000 (Soliño *et al.*, 2000, 2001; Marcote *et al.*, 2008). A nivel mundial existen aínda moitas especies sen descubrir, estímase que o número total podería aproximarse aos 1,6 millóns (Kirk *et al.*, 2001; Hawksworth & Bull, 2008).

A parte vexetativa da gran maioría dos fungos está constituída por células filamentosas, as hifas, que no seu conxunto constitúen o micelio ou «branco de fungo», visible a simple vista, aínda que na maior parte das especies encontrase no interior do substrato (terra, ramas, follas, plantas, animais ou outros fungos). As hifas crecen radial e indefinidamente en todas direccións, formando círculos, os «corros de bruxas» (Castro *et al.,* 2005). Producen esporas gaméticas en corpos frutíferos (cogomelos), que oscilan entre poucos miligramos e varios quilos de peso (Carlile *et al.,* 2001).

Os fungos no medio natural desenvolven un importante papel ecolóxico, polo que a súa conservación é moi importante tanto nos ecosistemas agrícolas como nos forestais (Palm & Chapela, 1997; Sánchez Rodríguez *et al.,* 2004; Cristóvão & Baptista, 2006). De feito, os saprotróficos son os grandes descompoñedores de restos leñosos e os que facilitan a entrada aos insectos xilófagos; os necrotróficos (parásitos) poden causar danos en organismos sans, pero tamén teñen a función de eliminar das plantacións forestais aos seres vivos menos dotados ou doentes, e os micorrícicos asócianse ás raíces da inmensa maioría das plantas aumentando a súa capacidade de captación de nutrientes, facilitando a absorción dalgúns elementos como o fósforo e protexendo o sistema radical do ataque de patóxenos (Becker, 1956; Arnolds, 1991).

Desde a antigüidade os cogomelos foron utilizados polo home con diversos fins: gastronómicos, médicos, domésticos, culturais, etc. (Samorini, 1999). Posiblemente o primeiro uso foi como alimento, ao tempo que apañaban bulbos, raíces, herbas, tubérculos e froitos (Castro, 2011). Tamén tivo gran importancia o uso en medicina e, na actualidade, a micoterapia está a ser moi interesante no tratamento

de diversos cancros e na loita contra a enfermidade do Alzheimer (Bianchi, 2009). Outros son utilizados para a obtención de tintas, de materiais téxtiles, fabricación de insecticidas e funxicidas, etc. (Castro, 2014a). Polo tanto, son un recurso socialmente moi valorado grazas ao aumento do nivel e calidade de vida das últimas décadas e, máis recentemente, por mor da crise económica. Sen embargo, a ausencia de modelos de xestión sostible do recurso conduciu á súa infravaloración, á escasa integración na economía e, sobre todo, á deficiente conservación dos micotopos.

O deterioro dos micotopos en Galicia parte dos anos 50, cando algúns empresarios comezaron a comercializar cogomelos en grandes cantidades, comprando aos apañadores locais e revendéndoos aos mercados europeos: Italia, Francia, Cataluña, etc. *(información persoal empresa Champivi*l). Familias enteiras dedicáronse (e continúan a dedicarse) durante o outono á recolecta deste produto en terreos particulares, sen autorización por parte dos propietarios e sen medidas de conservación reguladas. Esta degradación e sobreexplotación está conducindo a que algunhas sociedades micolóxicas soliciten xa unha lexislación específica ao respecto e que algúns propietarios e concellos delimiten e defendan o aproveitamento na súa zona mediante planes de ordenación propios, como o do concello de A Veiga (BOP Ourense, 24 de xullo de 2012).

O obxectivo deste traballo é coñecer cal é o método máis adecuado para realizar un aproveitamento micolóxico sostible no «Monte Salgueirón» de Mos, utilizando unha ou varias formas de aproveitamento: venda directa, aluguer do terreo, explotación micoturística, etc. co fin de contribuír á implantación de sistemas innovadores para o desenvolvemento socioeconómico do medio rural.

METODOLOXÍA

Este proxecto inspirase en dous programas que se están a desenvolver na Península Ibérica: MYAS en Castela-León (Fundación CESEFOR, online) e CUSSTA en Andalucía (Moreno Arroyo, 2011), e no único proxecto oficial que funciona en Galicia desde 2012, TREGUMELOS (Concello da Veiga, 2012).

Para que os cálculos e propostas foran reais, non potenciais, sería necesario facer un catálogo completo das especies que brotan na zona, é dicir, un seguimento na zona de estudo durante un mínimo de 3 anos debido a que a frutificación pode ser anual ou ocorrer cada dous ou tres anos (Castro, 2014b).

Simultaneamente, para desenvolver un Plano de Aproveitamento Micolóxico Sostible sería necesario parcelar o monte co fin de coñecer a produtividade real das plantacións en relación ás especies comercializables (Fernández Toirán, 1994; Martínez Peña, 2003). Debido á escasa duración da materia na que se integra non foi posible realizar persoalmente este traballo de campo, polo que os datos da micobiota corresponden aos que se encontran en poder da Comunidade de Montes «Monte Salgueirón» (inéditos) e as bases de datos do Laboratorio de Micoloxía da UVIGO (Soliño & Castro, 2005).

Os de produtividade micolóxica potencial para a Comunidade Galega corresponden aos obtidos no Centro Forestal de Lourizán, durante 20 anos de investigación, publicados por Fernández de Ana Magán & Fernández Rodríguez (2000).

E os prezos que alcanzan os cogomelos, tanto “a pé de campo” como no mercado corresponden aos indicados por apañadores particulares que venden a empresas recolectoras/exportadoras de Galicia, como Janeiro S.L. (Melide) e Marrón Glacé (Ourense), e de Zamora, como Faúndez (Rabanales) e Prosilvestre (Villar de Ciervos).

E, por último, como para calcular a produtividade potencial é necesario coñecer de forma precisa os datos relativos ás plantacións: especie arbórea, superficie ocupada, idade, situación do sotobosque, etc. a información foi subministrada pola directiva da Comunidade de Montes «Monte Salgueirón», a partir do “Proxecto Técnico de Ordenación” que está a ser aplicado nunha extensión aproximada de 504 ha, nas que foron plantadas diferentes especies forestais e ornamentais de folla perenne e/ou caduca (Táboa 1), e nas que o sotobosque é limpo anualmente para evitar incendios e potenciar o crecemento das árbores.

Descripción da zona de estudo

O territorio denominado Monte Salgueirón, cunha altitude de 621m, está situado no termo municipal de Mos (Pontevedra). Ten climatoloxía suave, xa que está claramente influenciada polos ventos mariños; aínda que parecen diferenciarse dúas zonas, o val (Tm anual 14,8ºC) e o monte (Tm anual 13,6ºC), con néboas frecuentes e maior número de xeadas. A actividade bioclimática nesta zona é continua desde xaneiro a decembro, aínda que se observan dous máximos nos meses de xuño e setembro (Carballeira *et al.,* 1983). A humidade é importante debida á pluviosidade propia destas zonas altas próximas ao mar, cunha media de 1.800 mm/ano, e ás abundantes néboas que aparecen durante todo o inverno (Martínez Cortizas & Pérez Alberti, 1999). Este monte está basicamente asentado sobre granito de feldespato alcalino con grandes biotitas, polo tanto podemos deducir que o solo é ácido, apto para a produción de cogomelos.

Segundo o indicado no Proxecto Técnico de Ordenación Forestal consta dunha extensión aproximada de 504 ha, nas cales pódense atopar unha ampla variedade de especies forestais con diferentes idades, desde plantacións recentes de 2013 ata algunhas con 40 anos (Táboa 1).

Táboa 1. Especies forestais presentes no "Monte de Salgueirón", hectáreas que ocupan e idade.

ESPECIE ARBÓREA	HECTÁREAS	IDADE (anos)
Pinus pinaster Ait.	196,00	40 25-30 18-21 12 1-4
Eucalyptus globulus Labill.	96,25	20-25 8-12 3-4
Pinus radiata D.Don	69,72	25-30 18-27
Castanea sativa Mill. e *Castanea* x *couderii* A.Camus	20,07	20 2-4
Pseudotsuga menziesiii (Mirb.) Franco	4,00	16-21
Outras	---	---

Destacan as plantacións de *Pinus* con 265,72 ha, as de *Eucalyptus* con 96,25 ha, Castanea con 20,07 ha, *Pseudotsuga* (4 ha).

RESULTADOS E DISCUSIÓN

Na actualidade, o Monte Salgueirón está sendo explotado unicamente para aproveitamento de madeira, por iso trátase de analizar o beneficio económico complementario, a maisvalía, que suporía o aproveitamento micolóxico.

Cabe destacar que durante o desenvolvemento dunha plantación, o conxunto de fungos que crece nela vai cambiando ao longo do tempo, hai unha sucesión de comunidades fúnxicas, e en consecuencia de especies (Castro, 2002). Son diferentes as asociadas a estadíos iniciais da plantación das asociadas aos maduros (Winterhoff, 1992). E, en Galicia a tempada de maior produtividade de cogomelos corresponde ao outono, aínda que se as temperaturas son suaves a micetación pode durar ata a metade do inverno. A primavera tamén pode ser propicia para a recollida de cogomelos, aínda que a diversidade da micobiota é cualitativa e cuantitativamente menor, a excepción de especies primaverais (Figura 1), sendo variable dun ano para outro.

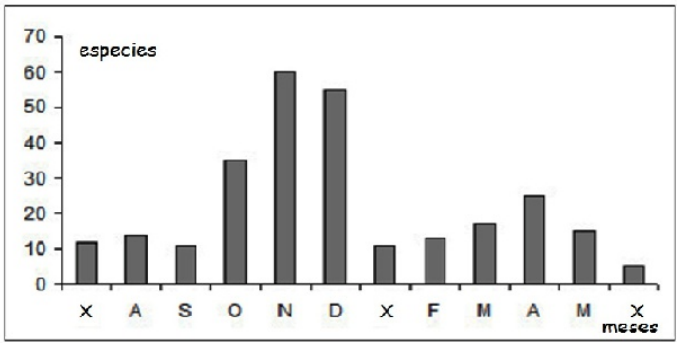


Figura 1. Micetación anual en piñeirais galegos obtida durante 5 anos consecutivos (Castro, 1985)

Ao longo destes últimos anos observouse unha riqueza micolóxica interesante no Monte Salgueirón, polo que "a priori" parece reunir condicións idóneas para ser potencialmente rendible o aproveitamento micolóxico, conservando simultaneamente a produtividade madeireira. Entre as especies fúnxicas observadas, selecciónanse as de maior interese para desenvolver este plano de aproveitamento, e das case 200 especies observadas, ao redor de 60 poden ser aproveitadas dunha ou outra maneira (comestibles, medicinais, artesanía, ornamentación, fotografía, etc.).

Táboa 2. Principais especies de cogomelos presentes baixo piñeiros no Monte Salgueiron [comestibles: C** = boa calidade, C* = media, C = baixa, F = fotografía), T = tinguir, O = ornamentación, Te = tecidos].

ESPECIE DE COGOMELO	NOME VULGAR	USOS
Agaricus sylvaticus Schaeff.	fungo das febras	C*
Amanita rubescens Pers.	cogomelo do viño	C*
Armillaria mellea (Vahl: Fr.) P. Kumm	palote da madeira	C
Boletus edulis Bull.: Fr.	andoa	C*
Boletus erythropus (Pers.: Fr.) Krombh	andoa de pé vermello	C
Boletus pinophilus Pilát et Dermek in Pilát	andoa dos piñeiros	C*
Callistosporium luteoolivaceum (Berk. et M.A.Curtis) Singer	colibia da madeira	F
Calocera viscosa (Pers.: Fr.) Fr.	espaguete viscoso	F
Cantharellus cibarius Fr.	cantarela	C**
Craterellus lutescens (Pers.) Fr.	trompeta dourada	C**
Craterellus tubaeformis (Fr.) Quél.	trompeta escura	C**
Clavulina rugosa (Bull.: Fr.) J. Schrot. in Cohn	fideo de monte	C
Clitopilus prunulus (Scop.: Fr.) P. Kumm.	muiñeira	C*
Cordyceps militaris (L.: Fr.) Link.	maza de procesionarias	F
Helvella lacunosa Afzel.: Fr.	orella de gato	C
Hydnum repandum L.: Fr.	lingua de ovella	C*
Hygrophoropsis aurantiaca (Wulfen.: Fr.) Maire	falsa cantarela	C
Laccaria laccata (Scop.: Fr.) Cooke	cogomelo lacado, lacaria	C
Lactarius deliciosus (L.: Fr.) Gray	níscalo, fungo da muña	C**
Macrolepiota excoriata (Schaeff.: Fr.) Wasser	zarrota pequena	C
Mycena seynii Quél.	micena das piñas	F
Phellinus pini (Brot.: Fr.) A. Ames	isca do piñeiro	Te, F
Pisolithus arhizus (Scop.: Pers.) Rausch.	bomba de tinguir	T
Pseudohydnum gelatinosum (Scop.: Fr.) P. Karst.	lingua de ovella viscosa	C F
Psilocybe capnoides (Fr.: Fr.) Noordel	psilocibe doce da madeira	F
Rhizopogon roseolus (Corda) Th. Fr.	ovo de carrizo vermello	F
Russula nigricans (Bull. →) Fr.	netorra negra, rúsula negra	C F
Sarcodon imbricatum (L.: Fr.) P. Karst.	lingua de ovella moura	C F
Schizophyllum commune Fr.	concha aveludada	O
Setulipes androsaceus (L.: Fr.) Antonín	marasmio pé de arame	F
Sparassis crispa Wulfen: Fr.	coliflor de monte	C* F
Suillus bovinus (L.: Fr.) Kuntze	andoa viscosa das vacas	C
Suillus luteus (L.: Fr.) Gray	andoa anelada	C*
Tricholoma portentosum (Fr.: Fr.) Quél.	tortullo	C
Tricholomopsis rutilans (Schaeff.: Fr.) Singer	tortullo da madeira	C F
Xerocomus badius (Fr.: Fr.) J.-E.Gilbert	andoa escura	C*

Probablemente, a micobiota asociada aos piñeirais sexa a máis interesante neste tipo de planos (táboa 2), sobre todo no referente a especies comestibles como os *Lactarius gr. deliciosus* moi apreciados nos mercados nacionais (Castro *et al.,* 2005), sendo importante o marco de plantación e a idade da masa forestal no relativo a cantidade e calidade dos cogomelos (Fernández Toirán, 1994; Fernández de Ana Magán & Rodríguez Fernández, 2000).

Tamén as plantacións de eucaliptos na Galicia litoral teñen unha produtividade elevada en madeira, que pode verse reforzada polo aproveitamento micolóxico, xa que neste micotopo poden atoparse unha gran cantidade de especies comestibles, sempre que o marco de plantación sexa amplo (Lago, 2008), e outras raras, relacionadas exclusivamente co eucalipto (Lago-Álvarez & Castro, 2004). No Monte Salgueirón o marco de plantación é moi pequeno.

O terceiro micotopo importante na zona de estudo corresponde aos soutos (plantacións de *Castanea spp.*) micoloxicamente ricos a nivel de Galicia (Freire, 1982; Soliño *et al.,* 2000, 2001). As principais especies observadas no Monte Salgueirón figuran na táboa 3, entre elas destaca a presenza de *Amanita caesarea*, unha das comestibles mellor valoradas nos mercados nacionais e internacionais.

Táboa 3. Principais especies cogomelos que medran nos soutos do Monte Salgueiron [comestibles: C** = boa calidade, C* = media, C = baixa, F = fotografía, Me = medicinal, T = tinguir, O = ornamentación, Te = tecidos].

NOME CIENTÍFICO	NOME VULGAR	USOS
Amanita caesarea (Scop.: Fr.) Pers.	cesárea, cogomelo dos césares	C**
Amanita vaginata (Bull.: Fr.) Vittad.	ovo de rata	C
Amanita rubescens Pers.	cogomelo do viño	C*
Astraeus hygrometricus (Pers.) Morgan	estrela de terra	F
Boletus aestivalis (Paulet) Fr.	andoa de verán	C
Boletus edulis Bull.: Fr.	andoa, madeirudo	C*
Cantharellus cibarius Fr.	cantarela	C**
Clitopilus prunulus (Scop.: Fr.) P. Kumm.	muiñeira	C*
Craterellus cornucopioides (L.: Fr.) Pers.	trompeta dos mortos	C**
Fistulina hepatica Schaeff.: Fr.	figado de boi, lingua de boi	C*
Hydnum rufescens Fr.	lingua de ovella avermellada	C*
Lactarius vellereus (Fr.: Fr.) Fr.	pementeiro aveludado	C
Leccinum quercinum Pilát et Dermek	andoa de mosca alaranxada	F
Macrolepiota procera (Scop.: Fr.) Singer	zarrota, cogordo, choupín	C
Marasmius rotula (Scop.: Fr.) Fr.	marasmio de colar	F
Mycena pura (Pers.: Fr.) P. Kumm.	micena pura	F
Nectria coccinea (Pers.: Fr.) Fr.	gota vermella da madeira	F
Polyporus squamosus Huds.: Fr.	pé de cabra	C F
Russula cyanoxantha (Schaeff.) Fr.	netorra, carboeira	C**
Russula virescens (Schaeff.) Fr.	netorra verde, gorro verde	C**
Trametes versicolor (L.: Fr.) Pilát	poliporo versicolor	F Me O
Tremella mesenterica Schaeff.: Fr.	exudado alaranxado	F
Xerocomus subtomentosus (L.: Fr.) Quél.	andoa avedulada	C

As especies comestibles de cogomelos poden ser clasificadas como comercializables ou non, tendo en consideración o decreto que regula as condicións de comercialización de cogomelos para uso alimentario e as listas de especies autorizadas para venda (Soliño & Castro, 2004; BOE de 16 de enero). As comestibles non comercializables poden aproveitarse para consumo particular.

En relación ao prezo que se paga a un apañador "a pé de monte" por unha especie determinada, e o que a especie pode alcanzar en fresco nos mercados aumenta ata un 200% Castro (2014b). Si se trata de cogomelos deshidratados esta diferenza é maior, ata 400% ou máis (Táboa 4).

Táboa 4. Comparación de prezos "a pé de monte", empresa exportadora e mercados (2013)

ESPECIES	€/kg "pé de monte"	€/kg distribuidora	€/kg mercado fresco
Amanita caesarea	10-25	> 40	> 80
Boletus pinophilus	3-15	> 20	> 40
Cantharellus cibarius	2-20	> 30	> 40
Craterellus tubaeformis	2-10	> 15	> 30
Lactarius deliciosus	5-10	> 25	> 30

Nos traballos de Fernández de Ana Magán & Fernández Rodríguez (2000) e Fernández de Ana Magán & Blanco Dios (2002), complementados por Hifas da Terra (2006), estudando produtividade fúnxica ao longo de 20 anos en diversas localidades de Galicia, indícase unha produción de *Boletus gr. edulis* (en soutos) e de *Lactarius gr. deliciosus* (en piñeirais) entre 50 e 300 kg/ha/ano, e lixeiramente menor, de 50 a 200 kg/ha/ano, para *Cantharellus gr. cibarius* (tamén en piñeirais). Información semellante foi obtida na Comarca de Pinares (Soria) en traballos realizados durante 2 anos consecutivos en plantacións de *Pinus sylvestris* (Fernández Toirán, 1994, 2002).

En Galicia a comercialización e valorización de especies comestibles é óptima nos últimos anos, aínda que resulta difícil coñecer con exactitude o valor deste comercio debido ao escaso control que se leva no campo. Algún empresario fala de exportacións por valor de 20 millóns de euros por outono na súa empresa (comunicación verbal de J. Posada, 2003).

Con estes datos pódese calcular un beneficio medio por hectárea e ano para andoas, níscalos e cantarelas (Táboa 5). Debe considerarse un valor medio porque en anos de climatoloxía favorable e cuantitativamente máis produtivos, os prezos por quilo "a pé de campo" son menores, mentres que nos de menor produción, aumentan

Táboa 5. Prezo e produtividade por hectárea e ano dalgunhas especies comercializables presentes no Monte Salgueirón

ESPECIES DE COGOMELOS	MICOTOPO	PREZO (€/kg)	PRODUCIÓN kg/ha/ano	BENEFICIO MEDIO (€/ha/ano)
Boletus gr. *edulis* (andoas)	souto	3-15	50-300	750-900
Lactarius gr. *deliciosus* (niscalos)	piñeiral	5-20	50-300	1000-1500
Cantharellus gr. *cibarius* (cantarelas)	piñeiral	2-20	50-200	400-1000

Con datos obtidos a partir de ensaios no campo e tomando como exemplo unha plantación de 400 plantas/ha con 10 anos, deseñada para a produción de madeira (Fernández de Ana Magán & Rodríguez Fernández, 2000), observouse que os cogomelos aportan unha cantidade inferior á de produción de madeira, pero semellante á das castañas e, en calquera caso, complementaria.

O aproveitamento pode ser feito mediante apaña directa ou indirecta, como se explica a continuación.

Aproveitamento directo

Este aproveitamento pode ser feito de forma directa pola Comunidade de Montes propietaria do terreo ou ben por aluguer a outra persoa para que a explote durante todo o outono. Nesta modalidade os ingresos para os comuneiros serían acordados no momento de establecer o contrato sobre produción estimada.

Na segunda hipótese, o importe recibido por parte do propietario é menor, pero non ten o traballo de realizar a recolección, nin asume a responsabilidade pola supervisión do material comercializable e as posibles consecuencias negativas se houbera algún erro na identificación.

En ambos os dous casos prohíbese a entrada a persoas non autorizadas, podendo sinalizar un acoutamento do terreo como se indica no recente Decreto 50/2014 (DOG do 10 de abril).

Se o beneficio medio que figura na táboa 5 se aplica á superficie repoboada no Monte Salgueirón poden obterse por venta directa de andoas recollidas baixo castiñeiro entre 15 e 18.000 €; de níscalos, nas plantacións de piñeiros, entre 260 e 400.000 € e, coas cantarelas, unicamente recollidas baixo piñeiro (non se contabiliza a produción baixo castiñeiros) entre 100 e 265.000 €, o que da unha produción entre 380 e 680.000 €/ano, cantidade nada desprezable.

Aproveitamento indirecto: micoturismo

Outra posibilidade de aproveitamento está baseada na venda de permisos diarios, de fin de semana ou de tempada completa a particulares, individuos ou familias. Esta modalidade permite controlar as especies que se poden apañar, os días da semana en que se pode facer a recolla (permite ter días de veda), a cantidade autorizada por persoa e día, etc. Tendo en conta que o brote de cogomelos en Galicia se estende desde mediados de setembro ata mediados de decembro na zona próxima ao litoral (Freire, 1982; Castro, 2014b), correspóndelle un tempo máximo 12-14 semanas.

Sen embargo esta modalidade permite aproveitar especies comestibles de calidade boa e media, e non só as comerciables (Soliño & Castro, 2004), así como outras non comestibles para ornamentación e artesanía (tinguir ou facer tecidos), para estudo, facer fotografías, etc. E, en certa medida, con este sistema garántese a protección do entorno, xa que sería necesaria gardería micoforestal e estableceríanse períodos de veda, co que tamén se potencia a conservación das especies e do solo (Shiva & Verma, 2002; Hermida Ramón, 2004).

Este tipo de explotación micolóxica tamén implica unha certa infraestrutura para a emisión de permisos por parte dos xestores (individuais, de grupo, diario, fin de semana ou tempada), a formación da gardería micoforestal e, inclusive, de guías micolóxicos que poden mellorar os servizos de asistencia e aumentar así os ingresos e o número de permisos solicitados.

Os ingresos no Monte Salgueirón, pensando que se atopa preto dunha cidade como Vigo cunha poboación ao redor de 300.000 habitantes e unha afección micolóxica grande, que se pon de manifesto coa presenza da Asociación Micolóxica A Zarrota, a máis antiga de Galicia, ten unha previsión de ingresos duns 18.000 €, que resulta moi inferior aos cálculos obtidos por venta directa.

Esta modalidade “micoturística” implica gastos ao propietario, que debe ter en consideración á hora de analizar as diferentes opcións; sen embargo, conleva un aproveitamento integral para o medio rural: aumentan os postos de traballo directos na zona (gardería micoforestal e guías micolóxicos) e pode mellorar a ocupación hoteleira rural e restauración da zona; así como a venda de produtos agrícolas locais, artesanía, etc. Inflúe positivamente no desenvolvemento integral do medio rural, e non beneficia unicamente aos propietarios do monte.

CONCLUSIÓNS

1. O aproveitamento micolóxico sostible pode ser unha maisvalía na explotación forestal dos montes galegos en xeral, e do Monte Salgueirón en particular, tanto para os propietarios do monte como para a zona rural onde se encontran as plantacións arbóreas.

2. O aproveitamento sostible pode ser feito de dúas maneiras diferentes

a) Venta de cogomelos frescos, apañados directamente polos propietarios ou aluguer a un terceiro, que lles paga a cantidade acordada sobre produción estimada. Este sistema é o que se aconsella aos comuneiros do Monte Salgueirón.

b) Desenvolvemento dun proxecto “micoturístico” que axuda á poboación para un desenvolvemento rural integral. Consideramos que debería ser desenvolvido por algunha institución municipal ou da comunidade sen fins lucrativos directos, xa que o valor económico obtido “a priori” por este sistema é moito menor para o propietario do monte; aínda que inflúe positivamente no desenvolvemento integral do medio rural.

BIBLIOGRAFÍA

Arnolds, E. 1991. Decline of ectomycorrhizal fungi in Europe. Agric. Ecosyst. Env. 35: 209-244.

Becker, G. 1956. Observations sur l'Ecologie des Champignons Supérieurs. Imprimèrie P. Carrère. Rodez.

Bianchi, V. 2009. I funghi medicinali per vivere a lungo in perfetta salute. Edizioni l'Età dell'Acquario. Vicenza.

BOE. 2009. Real Decreto 30/2009, de 16 de enero, por el que se establecen las condiciones sanitarias para la comercialización de setas para uso alimentario. Madrid.

BOP Ourense. 2012. Ordenanza reguladora do 24 de xullo, para o aproveitamento micolóxico no termo municipal da Veiga. Ourense.

Boutié, P., Masson, C-L., Charlot, C., Rapior, S., Roussel, B. 2002. Histoire des utilisations thêrapeutiques de l´amadouvier, Fomes fomentarius (L.: Fr.) Fr. Rev. Hist. Pharmacie 90 (336): 599-614.

Carballeira, A., Devesa., C., Returerto, R., Santillán, E. & Ucieda, F. 1983. Bioclimatología de Galicia. Fundación Pedro Barrié de la Maza. A Coruña.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C. & Gooday, G.W. 2001. The Fungi. Elsevier LTD. London.

Castro, M.L. 1985. Macromicetes de pinares gallegos. Universidad de Santiago de Compostela (Tesis doctoral).

Castro, M.L. 2002. Micosocioloxía: sistematización dos factores ecolóxicos. Ass. Micol. Pantorra 2: 89-85

Castro, M.L. 2011. Apontamentos históricos da Macromicoloxía Galega. Mykes 14: 43-77.

Castro, M.L. 2014a. Os cogumelos na génese das culturas: Noroeste Ibérico. Brigantia 33-34: 67-90 [2012-2013].

Castro, M.L. 2014b. Relación entre factores ecolóxicos, biolóxicos e patróns de frutificación de macromicetos en Galicia. Mykes 17 (en prensa).

Castro, M.L., Justo, A., Lorenzo, P. & Soliño, A. 2005. Guía micolóxica dos ecosistemas galegos. Baía Edicións. A Coruña.

Concello da Veiga, 2012. Turismo micolóxico. In www.aveiga.es/downloads/turismo_micoloxico.pdf [consultado 10/03/2014].

Conesa Mor, J.A. 2000. Altres aprofitaments forestals. Universitat de Lleida.

Cristóvão, A. & Baptista, A. 2006. Os cogumelos silvestres no Douro-Duero In Cristóvão, A.; Tibério M. & Cabero Diéguez, V. (coord.) Microproduções Agrícolas e Desenvolvimento Local no Douro ~ Duero. UTAD. Vila Real (Portugal).

DOG. 2014. Decreto 50/2014, do 10 de abril, polo que se regulan os aproveitamentos madeireiros e leñosos, de cortiza, de pastos e micolóxicos en montes ou terreos forestais de xestión privada na Comunidade Autónoma de Galicia e o contido, organización e funcionamento do Rexistro de Empresas do Sector Forestal. Santiago de Compostela.

Fernández de Ana Magán, F.J. & Blanco Dios, J.B. 2002. Productividade de Boletus gr. edulis en plantacións de castiñeiro híbrido (Castanea x couderii A. Camus). Anais Ass. Micol. Pantorra 2: 35-43.

Fernández de Ana Magán, F.J. & Rodríguez Fernández, A. 2000. Os cogumelos nos ecosistemas forestais galegos. EdicióńsXerais. Vigo.

Fernández Toirán, M. 2002. La producción de setas en la gestión forestal. Ass. Micol. Pantorra 2: 71-82

Fernández Toirán, M.L. 1994. Estudio de la producción micológica actual en la Comarca de Pinares de Soria y ensayo de técnicas de mejora de la misma. Universidad de Santiago de Compostela (Tesis Doctoral).

Freire, L. 1982. Macromycetes de la Selva Negra (Santiago de Compostela). Universidad de Santiago de Compostela (Tesis doctoral).

Fundación CESEFOR, online. Proyecto Mycología y Aprovechamientos Sostenible: Regulación y Comercialización (MYAS-RC) de los recursos micológicos de Castilla-León In www.myasrc.es [consultado 14/04/2014].

García Asensio, J.M. 2004. Los aprovechamientos micológicos en España. Régimen Jurídico. FEMP & Dykinson. Madrid

Hawksworth, D.L. & Bull, A.T. 2008. Biodiversity and Conservation in Europe. Springer Verlag. Alemania.

Hermida Ramón, R.N. 2004. Métodos de gestión del potencial micológico en el «Monte Forgoselo» (A Coruña). Anais Ass. Micol. Pantorra 4: 15-25.

Hifas da Terra. 2006. Un monte de cogomelos: Produtividade de cogomelos, métodos de mellora da produción, ordenación dos sistemas de aproveitamento e proxecto piloto de micorrización. Vacaloura, Boletín do Proxecto Natureza Viva 3: 3-23.

Kirk, P.M.; Cannon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A. 2001. Dictionary of the Fungi 9th Edition. CABI Publishing International. Oxon.

Lago, M. 2008. Micoflora (Basidiomycotina) en los eucaliptales del N.O. de la Península Ibérica. Guineana 14: 1-502.

Lago-Álvarez, M. et Castro, M.L. 2004. Macrobasidiomicetos asociados a Eucalyptus en la Península Ibérica. Fungi non Delineati 3(27): 1-84

Marcote, J.M.C., Pose, M. & Traba, J.M. 2008. Cogomelos de Galicia. Xunta de Galicia. Santiago de Compostela

Martínez Cortizas, A. & Pérez Alberti, A. 1999. Atlas Climático de Galicia. Xunta de Galicia. Santiago de Compostela

Martínez Peña, F. 2003. Producción y aprovechamiento de Boletus edulis Bull.: Fr. en un bosque de Pinus sylvestris L. Bases para la ordenación y valoración económica del recurso micológico forestal. Junta de Castilla y León.

Moreno-Arroyo, B. 2011. Balance del Plan Cussta en Andalucía In www.micosylva.com [consultado 14/04/2014].

Palm, M.E. & Chapela, I.H. 1997. Mycology in sustainable development. Expanding concepts, vanishing borders. Parkway Publ. North Carolina.

Samorini, G. 1999. Nuevas fronteras de la etnomicologia In Fericglá (ed.) Los enteogénios y la ciencia: 49-80. La Liebre de Marzo. Barcelona.

Sánchez Rodríguez, J.A.; Flórez Serrano, J.; Sierra Fernández, J.L.; Gerra Burton, B. & Chamorro Suárez, M. 2004. Los Hongos. Manual y guía didáctica de micología. IRMA S.L.. León.

Sevilla Martínez, F. 2008. Una teoría ecológica para los montes ibéricos. IRMA S.L. León.

Shiva, M.P. & Verma, S.K. 2002. Aproaches to sustainable management and biodiversity conservation. International Book Distributors. Uttaranchal (India).

Soliño, A. & Castro, M.L. 2004. Cogomelos comerciables de Galicia (España): catálogo xustificado. Anais Ass. Micol. Pantorra 4: 67-74.

Soliño, A. & Castro, M.L. 2005. Coroloxía e fenoloxía dos macromicetos galegos: modelo dun sistema informático de información. Mykes 8: 7-22 + CD

Soliño, A., Justo, A. & Castro, M.L. 2000. Recopilación bibliográfica (1850-1997) de citas macromicoloxicas de Galicia II: Basidiomycota (non Agaricales, Auriculariales, Boletales e Cantharellales) - Ascomycota. Mykes 3: 3-72.

Soliño, A., Justo, A. & Castro, M.L. 2001. Aportacións ó catálogo macromicolóxico Galego (Ascomycota, Basidiomycota). Mykes 4: 37-64.

Winterhoff, W. (ed.) 1992. Fungi in Vexetation Science. Kluwer Academic Publishers. London.

CULTIVO DE CARACOLES CÓNIDOS (*Conus spp.*) ORIENTADO A LA EXPLOTACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANALGÉSICAS DE SU VENENO

Andrea Diéguez Docampo, Roi Rodríguez González,
Rodrigo Rodríguez Granjel, Marta Seijo Vila
andieguez@alumnos.uvigo.es, roirodriguez@alumnos.uvigo.es,
rodrirodriguez@alumnos.uvigo.es,marseijo@alumnos.uvigo.es

Trabajo Asignatura Zoología I
Tutora:
- Mª Fuencisla Mariño
Departamento de Ecología y Biología Animal
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

En este trabajo se plasman las ideas preliminares de un hipotético cultivo de caracoles cónidos (*Conus spp.*) con el fin último de obtener su veneno y utilizarlo en la industria farmacéutica por sus potentes propiedades analgésicas. Se describen las características biológicas del género (alimentación, reproducción y composición y derivados del veneno), la estrategia de cultivo (condición y método de cría en acuicultura), así como procedimiento de extracción del veneno. Es necesario realizar investigaciones futuras más detalladas.

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es una disciplina de la Zoología Aplicada que consiste en la manipulación de biotopos acuáticos naturales o artificiales para la producción de especies útiles para el hombre y, por tanto, incluye todas las actividades de crianza o cultivo de organismos que viven en dichos biotopos Barnabé (1991).

En este trabajo se ha querido aunar información con el objetivo de diseñar un hipotético sistema de cría acuícola para especies de gasterópodos marinos de la familia Conidae, pertenecientes al género *Conus* (Figura 1). Dicha familia cuenta únicamente con este género, aunque actualmente los expertos estén intentando realizar subdivisiones, pues incluye unas 700 especies. Las especies seleccionadas procederán de las aguas de Filipinas, donde es frecuente la captura de cónidos para la comercialización de sus valiosas conchas.

Se ha seleccionado este animal ya que posee un veneno de gran interés. Es uno de los gasterópodos con el mecanismo de alimentación y defensa más sofisticado, siendo su picadura incluso mortal para los humanos. Su veneno puede resultar beneficioso ya que contiene unas toxinas (conotoxinas) que se pueden utilizar como analgésico; estas conotoxinas son herramientas ideales en los estudios de neurofisiología debido a su elevada especificidad y se considera que en futuro próximo podrían ser de utilidad en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso (López, 2001).

Estos peculiares animales poseen una concha con forma cónica y pueden llegar a medir hasta 23 cm de longitud y, aunque son pequeños y lentos, su ataque puede ser sumamente rápido. Las especies más tóxicas son *C. geographus*, conocido de manera coloquial como “caracol cigarrillo” (se cree que a la víctima sólo le queda el tiempo de fumarse un cigarrillo antes de morir) y *C. textiliis*. Las especies que causan el mayor número de picaduras en el hombre son *C. purpurascens* y *C. dall*i.

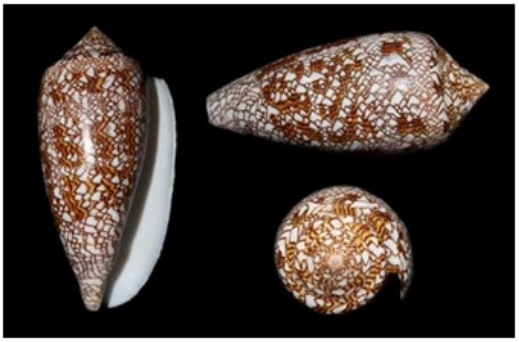


Figura 1. Concha del cónido *Conus textile* (Wikimedia Commons, en línea)

Características biológicas del género Conus

Alimentación

Los miembros de género Conus son carnívoros, se alimentan mediante la captura activa de animales vivos (Figura 2). Se consideran unos de los gasterópodos más especializados, en los que la rádula se reduce a unos pocos dientes que sirven para inyectar veneno (rádula toxoglosa). Los dientes, huecos y curvados en forma de arpón, gracias a la acción de una glándula del veneno se descargan desde el extremo de una larga probóscide que se puede lanzar hacia fuera rápidamente para capturar la presa. Una vez que se produce la descarga el diente no se recupera, habiendo acertado o no en el objetivo. Ésta adaptación resulta muy eficaz para un depredador que se mueve lentamente, impidiendo que una presa más veloz logre huir. La presa se trata generalmente de un pez, un anélido u otro gasterópodo, que luego es llevado al interior del tubo digestivo (Brusca & Brusca, 2005; Hickman *et al.,* 2009).

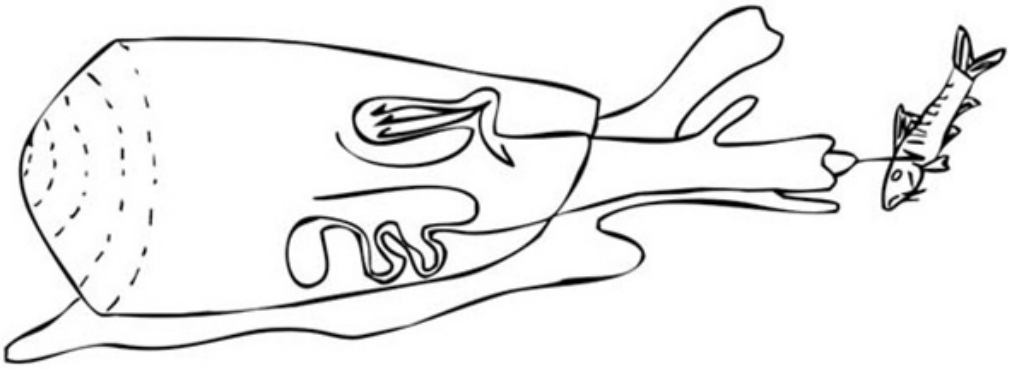


Figura 2. Representación de un caracol cónido (género Conus) en plena captura de una presa. Se presenta un esquema de su característico y complejo aparato radular.

Según experimentos de Rolán (1992), lo más conveniente sería que en cautividad se alimentase a estos animales con el poliqueto Nereis diversicolor, fundamentalmente triturado o vivo, y con peces vivos autóctonos fáciles de criar o de gran disponibilidad y de un tamaño similar al de las presas típicas de los cónidos, *Gobius niger* reúne dichos requisitos. Más adelante se hará referencia a las ventajas adicionales de proporcionar alimento vivo a estos caracoles.

Reproducción

No se tiene demasiada información acerca de la reproducción y el ciclo vital de las distintas especies de *Conus*. Ello supone el principal problema para la consecución de un cultivo viable y autónomo de estos animales; se hace necesaria una investigación exhaustiva centrada, en gran medida, en el desarrollo larvario.

Rolán (1992) afirma que poseen sexos separados, pero no existe dimorfismo evidente entre las conchas de hembras y machos. Los machos presentan un pene situado detrás de la cabeza, en el lateral derecho de la línea media. Hay, en principio, dos tipos de pene: uno simple, tubular, con formas y tamaños variables, que es el más común; y otro de tipo más complejo que presenta una zona ensanchada antes de su final y suele terminar en un pico afilado y curvado. El aparato genital de la hembra está representado exteriormente, en general, por un simple poro (Rolán, 1992). Existe, por tanto, fecundación interna.

Las hembras depositan sus huevos en cápsulas u ootecas aplanadas en forma de hoja dispuestas en hileras sobre la superficie de piedras, conchas u otros sustratos firmes (Rolán, 1992). Las larvas eclosionan dentro de las cápsulas y, tras completar su desarrollo intracapsular, las larvas escapan a través de una perforación en el borde externo de la cápsula.

El desarrollo larvario puede ser planctotrófico o lecitotrófico. Es decir, las larvas de algunas especies son planctónicas y viajan durante algún tiempo con las corrientes (alta capacidad de dispersión), mientras que las de otras especies se desarrollan intracapsularmente y carecen de fase pelágica, poseen reducida

capacidad de dispersión. Ello explica la relativamente restringida distribución de muchas especies y el alto grado de endemismo que se aprecia en archipiélagos e islas oceánicas (Rolán, 1992).

Composición y derivados del veneno

El veneno consiste en una mezcla de péptidos tóxicos (conotoxinas); cada especie de *Conus* lleva péptidos específicos de los neurorreceptores de sus presas predilectas (Hickman *et al.,* 2009). Estos péptidos están constituidos por proteínas y carbohidratos estables a bajas temperaturas, con una fracción termolábil a temperaturas altas. Las conotoxinas pueden actuar de 3 maneras: inhibiendo el receptor de acetilcolina en las postsinapsis, bloqueando los canales de calcio de las terminaciones nerviosas, o bien, bloqueando los canales de sodio de las células musculares (Field-Cortazares & Calderón, 2010). Son, además, herramientas valiosas en la investigación sobre los diferentes receptores y canales iónicos de las células nerviosas (Hickman *et al.,* 2009).

El primer anestésico derivado de toxinas de cónidos, el Ziconotide, fue aprobado por el U.S Food and Drug Administration en Diciembre de 2004 y es actualmente comercializado para el tratamiento del dolor crónico con una eficacia 100 veces mayor que la morfina y sin causar dependencia(Field-Cortazares & Calderón, 2010); mientras, hay otras en fases clínicas iniciales (Rauck *et al.,* 2009; Smith & Deer, 2009), y muchas de ellas son herramientas ya habituales en laboratorios de neurociencia para investigación biomédica básica. Las increíbles modificaciones post-traslacionales de estas toxinas, sin parangón en ningún otro animal de ningún otro filo, podrían abrir igualmente nuevas estrategias farmacológicas o de química combinatoria aún por explorar para el diseño de nuevos fármacos, por lo que la caracterización y conservación de su biodiversidad son fundamentales.

Acuicultura: medio de cultivo

Condiciones de cultivo

Para la crianza adecuada de una especie hay que identificar las necesidades alimenticias y fisicoquímicas, tanto de los adultos como de las larvas (fase presente en la mayoría de los seres marinos) las cuales deben asemejarse al hábitat de los ejemplares seleccionados originarios del Mar de Filipinas. Las características fisicoquímicas del medio que mayor influencia tienen sobre la viabilidad del cultivo se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Características fisicoquímicas del medio que mayor relevancia tienen sobre el cultivo de *Conus sp*. (FAO, en línea; Seafriends, en línea; AWI, en línea)

pH	Los puntos medios ácido y alcalino de mortalidad en peces (extrapolables a moluscos) son aproximadamente de 4 y 11, la reproducción puede verse afectada entre 4-6 y 9-10; además, el pH afecta a la toxicidad de otras sustancias, como el amonio y el nitrito. El agua que se vuelva ácida puede ser corregida adicionando cal (Parker, 2000).
Temperatura	Será aproximadamente de 28,5ºC durante todo el año.
Salinidad	Deberá mantenerse en torno 33,5 y 34,5 %0PSS (Escala Práctica de Salinidad).
Gases disueltos (O_2)	Se fijará una concentración de O_2 de entre 4 y 5 mL por litro de agua.
Turbidez	Prácticamente nula, el agua se ha de mantener lo más cristalina posible.
Otros	Se deberán conocer y tener controlados, a valores aún por ensayar, los siguientes parámetros: dureza total, nitrógeno, fosfatos, silicatos, cloruros, cloro, sulfuro de hidrogeno, dióxido de carbono libre, sodio, magnesio, potasio, calcio, hierro, arsénico, DBO y DQO. También debemos controlar factores biológicos como la presencia de micro y macroorganismos con potencial infectivo o que puedan generar toxicidad (diferentes géneros de microalgas, etc.).

Método de cultivo

El desarrollo de la especie comienza con los reproductores y pasa por las fases de huevo, larva, post-larva y adulto. Las etapas de cultivo correspondientes se denominan: mantenimiento de reproductores, "hatchery" (huevo + larva), "nursery" (post-larvas o juveniles) y engorde de los adultos. Los límites dependen de la especie a cultivar y del sistema de cultivo elegido (Barnabé, 1991); en este caso se diseñarán dos estanques: en uno se mantendrán los individuos adultos reproductores (engorde de los juveniles y mantenimiento de los reproductores) y en otro se desarrollarán los huevos y crecerán las larvas.

"Cualquier sistema de cultivo debe tender a cerrar el ciclo vital de un organismo, pues sólo así es posible mejorar la calidad de la reproducción y no depender de la variabilidad natural" (Coll-Morales, 1991), es decir, desarrollar un sistema de cultivo integral. Para ello es mejor comenzar por un semicultivo, que deja algunas etapas a la naturaleza, para asegurarse la rentabilidad del sistema antes de proceder a controlar todo el ciclo y pasar a cultivo integral, lo que en cualquier caso es un proceso a largo plazo(Coll-Morales, 1991).

El semicultivo más sencillo consiste en capturar post-larvas o larvas de una especie y engordarlas en cultivos controlados. De ahí se pasa a capturar reproductores, controlar la puesta, el desarrollo de la larva y el engorde de las post-larvas o alevines; de manera posterior se procede directamente a cerrar el ciclo utilizando adultos procedentes del engorde como reproductores para el siguiente ciclo (Coll-Morales, 1991).

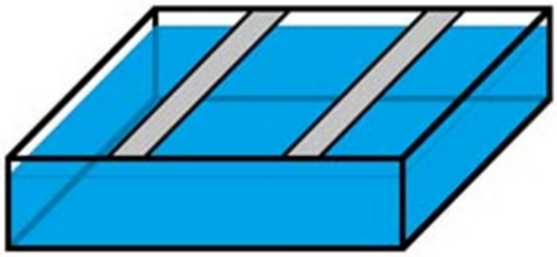


Figura 3. Representación esquemática del tanque en el que se cultivarán de forma intensiva los individuos adultos. Tiene 1 m de profundidad y pasarelas sobre el agua para que los operarios dispongande mayor accesibilidad en la manipulación de los caracoles.

Las instalaciones para el crecimiento de los huevos y larvas serían semejantes a las señaladas adecuadas para carnívoros (generalmente crustáceos y peces) (Coll-Morales, 1991), que consisten en la adición de fitoplancton y zooplancton.

El método de cultivo a utilizar sería de tipo intensivo: alta densidad (máximo 10 individuos por m2, dado que son organismos que viven sobre el sustrato) en tanques de 1 m de profundidad, con pasarelas metálicas sobre el agua a fin de conseguir una mayor facilidad de manipulación de los individuos (Figura 3). Deberá llevarse un control exhaustivo del agua y, asimismo, el caudal deberá aumentarse de forma proporcional al número de ejemplares presentes en el estanque, ya que se concentran un mayor consumo de oxígeno y el incremento de la producción de catabolitos tóxicos, principalmente amoníaco. El cultivo intensivo exige una gran inversión inicial en mano de obra, instalaciones y una tecnología muy depurada, pero implica la mayor producción por unidad de superficie cultivada (Coll-Morales, 1991).

Se cultivará solamente una especie (monocultivo), lo cual permite un mayor control de la dinámica del estaque (Coll-Morales, 1991). Las instalaciones se establecerán en tierra, cerca de la costa o en el límite de costa dado que se ha de bombear el agua del mar al estanque: se planificará un sistema cerrado de circulación de agua, que permita depurar y readecuar las características de la misma en cada ciclo; dado que no existe un sistema cerrado perfecto (Parker, 2000; Coll-Morales, 1991), el agua será periódicamente renovada para contrarrestar pérdidas.

Procedimiento de extracción del veneno

En un punto a determinar entre cada ceba se llevaría a cabo la extracción del veneno. Consistiría en un mecanismo manual, en el que el operario contaría con debidas protecciones para las extremidades y pinzas para el agarre y manipulación del animal. Se usarían agujas hipodérmicas para retirar una pequeña cantidad de veneno de la glándula del veneno del animal, mediante una punción en la zona media de un lateral del pie.

El veneno acumulado se guardará un corto espacio de tiempo hasta obtener un volumen suficiente para su venta; será entonces empaquetado y distribuido. La experiencia en el cultivo y manejo de estos animales permitirá llevar a cabo una selección de los organismos que más interés susciten (Parker, 2000), es decir, que más veneno produzcan o que mayor descendencia viable puedan generar. Esto acarreará la consecución gradual de un cultivo más provechoso. Sería también interesante la investigación en ingeniería genética que permitiera la consecución de venenos todavía más interesantes.

CONCLUSIONES

En este trabajo se trata de plantear la posibilidad de cultivo de un gasterópodo del cual apenas existen experiencias previas, lo cual conlleva que la viabilidad del proyecto no está asegurada.

Puede resultar que los animales no se desarrollen del mismo modo que lo harían en su hábitat natural, a pesar de que se intenten simular las condiciones ambientales lo más fielmente posible. Quizás la profundidad de las aguas en las que viven sería una de las condiciones que difícilmente se podrían imitar. Existe la posibilidad de que en cautividad los animales pierdan toxicidad debido a que no necesitan llevar a cabo una captura activa de sus presas y ausencia de depredadores; esto se resuelve proporcionándoles alimento vivo.

Por otro lado, se trata asimismo de un trabajo con cierto riesgo hacia la integridad de los operarios que manipulen a los animales. No se debe escatimar en medidas de prevención, ya que, como se ha mencionado, la picadura de estos animales puede llegar a ser mortal.

Para terminar, en base a los argumentos expuestos, se le dará mayor relevancia a su interés como proyecto preliminar teórico que a su posible desarrollo práctico a corto o medio plazo.

BIBLIOGRAFÍA

AWI (en línea). eWOCE - Electronic Atlas of WOCE Data In www.ewoce.org/data/index.html [recuperado 24/09/2014].

Barnabé, G. (1991). Acuicultura. Barcelona: Omega.

Brusca, R. C. y Brusca, G. J. (2005). Invertebrados. (2ª ed.). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

Coll-Morales, J. (1991). Acuicultura marina animal. (3ª ed.). Madrid: Mundi-Prensa.

FAO (en línea). Selección de lugares para la acuicultura In www.fao.org/docrep/l8156s/l8156s04.htm [recuperado 24/09/2014].

Field-Cortazares, J. y Calderón, R. (2010). Picadura por caracol Conus. Bol. Clín. Hosp. Infant. Edo. Son 27(2): 137–141.

Hickman, C. P., Roberts, L.S., Keen, S.L., Larson, A., L'Anson, H. y Eisenhour, D.J. (2009). Principios Integrales de Zoología (14ª ed.). Madrid: McGraw-Hill Interamericana.

López, J. (2001). Conotoxinas. Spira 1(1): 7–11.

Parker, R.O. (2000). Aquaculture Science. (2ª ed.) New York: Delmar.

Rauck, R.L., Wallace, M. S., Burton, A.W., Kapural, L., North, J.M. (2009). Intrathecal ziconotidde for neuropathic pain: a review. Pain Pract. 9: 327–337.

Rolán, E. (1992). La familia Conidae (Mollusca: Gastrophoda) en el archipiélago de Cabo Verde (África Occidental). Tesis Doctoral. Santiago de Compostela: Servicio de Publicacións e Intercambio Científico da Universidade de Santiago de Compostela.

Seafriends (en línea). The chemical composition of seawater In www.seafriends.org.nz/oceano/seawater.htm [recuperado 24/09/2014].

Smith, H.S. y Deer, T.R. (2009). Safety and efficacy of intrathecal ziconotide in the management of sever chronic pain. Ther. Clin. Risk Manag. 5: 521–534.

Wikimedia Commons (en línea) File:Conus textile a1.jpg In commons.wikimedia.org/ wiki/File:Conus_textile_a1.jpg [recuperado 2/11/2014].

PLANTAS CARNÍVORAS: POPULARES, PERO GRANDES DESCONOCIDAS

Paula Estévez Caride
e-mail: pecaride@outlook.es

Trabajo Botánica II
Tutora:
- Marisa Castro
Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

En el siguiente trabajo se pretende hacer una breve introducción a las plantas carnívoras y aquellas características que las determinan como tales, así, como otros datos que las hacen unas plantas tan especiales gracias a las adaptaciones y relaciones que han establecido a lo largo de su evolución.

Palabras clave: *plantas carnívoras, adaptaciones de plantas, mecanismos de captura, mutualismo, simbiosis, nutrición, digestión.*

INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de las plantas carnívoras supuso un gran shock para la comunidad científica en su época, que en un primer momento nunca aceptó como real, su capacidad para alimentarse de animales. Se conservan grabados de la Edad Media, como el Manuscrito de Voynich (1404-1438), en el que se describen algunos géneros como *Drosera* y se comentan algunas de sus cualidades para el tratamiento de catarros, pero en ningún caso sus características "carnívoras" (Barthlott et al., 2007).

En 1770, comenzaron a suponerse estas características gracias al descubrimiento de *Dionaea muscipula* en América. John Ellis, se encargó de enviar una carta a Carl von Linné (Linneo) con una descripción precisa de la planta, en la que comentaba su capacidad para capturar insectos y, por lo visto, alimentarse de ellos. La respuesta de Linné, fue cortante, y al igual que otros reconocidos botánicos, no aceptaron esa posibilidad basándose en que iba "*contra el orden natural establecido por Dios*" (Barthlott *et al.,* 2007).

El carnivorismo de estas plantas se mantuvo latente hasta la primera documentación científica realizada por Charles Darwin, quien en 1875 publicó su obra "Plantas insectívoras", en la que demuestra su capacidad y adaptaciones para capturar insectos y alimentarse a partir de ellos. De nuevo, Charles Darwin fue descalificado y no se aceptó la posibilidad de que estas plantas pudiesen presentar estas capacidades, pero, con el paso del tiempo y el descubrimiento de especies así como la profundización en su estudio, ha permitido confirmar este hecho (Barthlott *et al.,* 2007). Esta imagen de plantas carnívoras que choca con la pasividad y el rol vegetativo de las plantas, ha atraído la mirada tanto de Darwin en su momento: "Me importa más la historia de *Drosera* que el propio origen de todas las especies del mundo" (Rice, 2006). y "Son las plantas más maravillosas del mundo" (Król *et al.,* 2011) ; como el de todas las personas en la actualidad, aunque a pesar de esto, la mayor parte de la gente desconoce muchas de sus características.

Concepto y origen de las adaptaciones

Las plantas carnívoras presentan ciertas características que les permiten asimilar los nutrientes de sus capturas y la formación de estructuras foliares especializadas para generar trampas.

El origen de estas adaptaciones es independiente entre cada familia, ya que han aparecido en distintos momentos de la historia evolutiva de estas plantas. Los registros fósiles (Figura.1), son muy escasos ya que las estructuras son blandas y difíciles de preservar, por lo que es difícil seguir la historia evolutiva de cada especie, género o familia.

Figura1: Archaeamphora longicervia, posible ancestro de Sarracenia (Rice, 2006).

Adaptaciones dirigidas a la atracción de presas: Pueden atraer visualmente a los insectos mediante la luz reflejada en las gotas de mucílago, así como mediante colores llamativos en las hojas (como el rojo, púrpura y amarillo, procedentes de naftoquinonas, flavonoides y antocianinas). También pueden formar patrones de estos colores, o reflejar la luz ultravioleta (Figura 2) en lugares estratégicos de la trampa.

Las hojas pueden presentar capas muy finas de tejido foliar que permiten pasar la luz dentro de la trampa para confundir a las presas (Figura 9.8), y la mayoría pueden generar olores atrayentes procedentes del néctar situado en zonas peligrosas de la trampa, o del agua con olor dulce retenida en los jarros.

Es muy frecuente la presencia de pelos dentro de trampas jarro que evitan la huida de los insectos, así como ornamentaciones en algunas partes de la trampa que ayudan a la caída de las presas.

Existen algunos géneros y especies que mimetizan su ambiente a pesar de no tener otros métodos de atracción, o no tan elaborados como los anteriores. Por ejemplo, *Cephalotus follicularis* es difícilmente distinguible de la vegetación cercana gracias a su color y a que las trampas están embebidas en el sustrato, por lo que es sencillo que algunos insectos terrestres como hormigas caigan en la trampa.

Figura 2: Nepenthes khasiana con luz normal (izq.), y luz UV (derech.). Rajani Kurup, Anil J. Johnson, Sreethu Sankar y Sabulai Baby.

En el caso de los géneros acuáticos o semiacuáticos como *Genlisea* y *Utricularia*, se conoce que liberan atrayentes solubles en el agua para captar protozoos. *Utricularia* además, posee la curiosidad de poder presentar microorganismos como algunas bacterias y diatomeas que se establecen a lo largo de su estructura, facilitando la atracción pequeños crustáceos que las predan, y permitiendo que la planta pueda capturarlos mediante este método de atracción indirecto (Barthlott *et al.,* 2007).

Adaptaciones foliares: Las especializaciones foliares se basan en la formación de trampas pegajosas, de cepo, de caída o de succión, con estructuras y mecanismos dirigidos a la captura de animales (ver apartado: tipos de trampas).

Adaptaciones para la digestión y absorción: la absorción de los nutrientes es posible debido a la producción de enzimas y la presencia de células especializadas en la secreción y absorción. Por otro lado, las relaciones mutualistas o simbióticas con otros organismos que viven en ellas, permiten una mejora del proceso digestivo.

La absorción de los nutrientes difiere en cada especie, y pueden captar nitrógeno, fósforo, calcio, potasio, magnesio y hierro de sus presas (en diferentes proporciones según el género de carnívora). Las enzimas que producen no son muy variadas, por lo que no pueden aprovechar completamente las presas. Las más frecuentes son: amilasas, quitinasas, esterasas, lipasas, peroxidasas, fosfatasas, proteasas y ribonucleasas (Barthlott *et al.,* 2007).

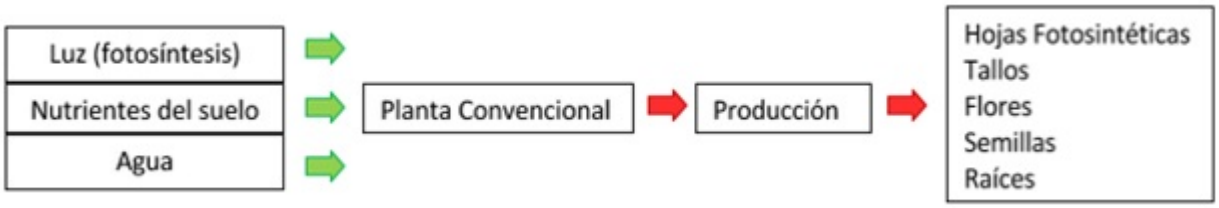
Las glándulas que generan las enzimas y a la vez se encargan de la absorción de los productos digestivos, se pueden clasificar en tres tipos: sésiles, situadas sobre la superficie de la hoja (como las de *Aldrovanda, Byblis, Dionaea, Drosophyllum, Genlisea, Nepenthes, Pinguicula, Triphyophyllum* y *Utricularia*); sobre un tallo o tentáculo, que actúa como estructura de soporte (en *Byblis, Drosera, Drosophyllum, Pinguicula* y *Tryphyophyllum*); y/o sumergidas por debajo de la epidermis de la trampa (Barthlott *et al.,* 2007).

El proceso de digestión se lleva a cabo en una especie de cámara digestiva, que puede ser de diferentes tipos: cámaras formadas por la trampa, llenas con el fluido digestivo y que consumen a las presas de forma continua (en todas las trampas de tipo caída o jarro, y en *Utricularia* y *Genlisea*); cámaras de digestión cíclica, la digestión en estas solo se da cuando la planta captura con éxito a su presa, llenándose entonces del líquido digestivo (en trampas de tipo cepo); por último, el líquido digestivo puede ser liberado en la superficie de la planta en zonas o áreas muy cercanas a la presa (en trampas adhesivas) (Barthlott *et al.,* 2007).

Características

Muchas plantas reúnen algunas de las adaptaciones que entrarían dentro del concepto de planta carnívora, pero el principal limitante para poder decir que una planta es carnívora, es que obtenga un beneficio relevante a partir de sus capturas.

Comparando una planta convencional con una carnívora, podemos ver ciertas diferencias a nivel de entradas energéticas y del gasto de esta energía en los tejidos de la planta.



En el caso de plantas convencionales, las entradas de luz, nutrientes y agua son abundantes, pero el gasto en producción de los tejidos es muy costoso.

Por otro lado, las carnívoras tienen unas entradas de energía diferentes, siendo la captación de nutrientes y luz menor. A pesar de esto hay un aporte extra, el de los nutrientes procedentes de las presas. Las raíces en la mayor parte de carnívoras son mínimas o no funcionales y solo intervienen como soporte y absorción de agua (incluso en algunos géneros no existen: *Genlisea, Utricularia*, y *Aldrovanda*). Por lo tanto, la absorción de minerales es mínima, e incluso hay géneros que no pueden captarlos (*Darlingtonia*), así como pueden verse dañadas por las presencias de esos nutrientes. (International Carnivorous Plant Society, online).

En cuanto a la energía obtenida por fotosíntesis, se reduce muchísimo, ya que las hojas y tallos están muy poco dedicados a esta función en muchas especies. Tampoco se invierte tanto en producción de pigmentos, fotosistemas y estomas, así como el número de capas celulares de las estructuras como las hojas son mucho menores. Esto permite que el coste en biomasa de las trampas sea mucho más económico que el de una hoja fotosintética típica, a pesar de que suponga una pérdida de eficacia fotosintética muy importante (lo que también supone una gran pérdida de competitividad en el medio y que la planta tenga un gasto en carbono en estas estructuras que no puede recuperar a través de la fotosíntesis).

Dependiendo del tipo de carnívora, pueden vivir sin presas ya que con sus raíces pueden mantenerse estables por un tiempo, otras pueden alternar nutrientes absorbidos desde la raíz con las capturas, así como algunas son completamente dependientes de las presas. *Sarracenia flava*, por ejemplo, solo produce trampas durante la primavera, mientras que el resto del año mantiene hojas fotosintéticas llamadas filodios (Figura 3) (International Carnivorous Plant Society, online).

En todos los casos, la reproducción se ve muy afectada por el número de presas obtenidas, y es casi obligatoria para todos los géneros.

Figura 3: Filodios de *Sarracenia flava*. International Carnivorous Plant Society.

Distribución y hábitat

El hecho de tener una eficacia fotosintética tan baja, hace que estas plantas no puedan competir en ambientes completos en nutrientes con otras plantas convencionales. De ahí, que hayan conseguido un nicho en hábitats más severos, como suelos ácidos, con poco oxígeno, encharcados, con residuos tóxicos o metales pesados (típicos de *Sarracenia, Darlingtonia, Heliamphora* y *Nepenthes*), donde si pueden ser competentes frente a otras plantas que no resisten las condiciones o son menos eficaces en ese medio.

Un requerimiento básico para estas plantas es la enorme necesidad de humedad, por lo que se dan con facilidad en lugares encharcados, bordes de ríos, bosques lluviosos o zonas tropicales. Uno de los lugares clave son las turberas, donde el *Sphagnum* (principal sustrato para los cultivos de estas plantas) forma capas muy densas de materia orgánica viva y muerta, y acidifica el medio, lo que lo hace ideal para estas plantas. Otra gran cantidad de géneros son epífitos de plantas de su entorno, consiguiendo obtener mayor cantidad de luz en ambientes con plantas más competentes. También hay especies que pueden encontrarse en zonas de montaña y creciendo en lugares rocosos, incluso pueden llegar a encontrarse algunas especies en suelos alcalinos de algunas marismas, o en suelos de serpentinita como el caso de *Darlingtonia* (Rice, 2006).

Las acuáticas prefieren lugares con poca concentración de nitrógeno y fósforo para reducir su competencia con otras plantas.

En España podemos encontrar géneros como *Pinguicula, Drosera,Utricularia*, y *Drosophyllum lusitanicum* (especie endémica de España y Portugal).

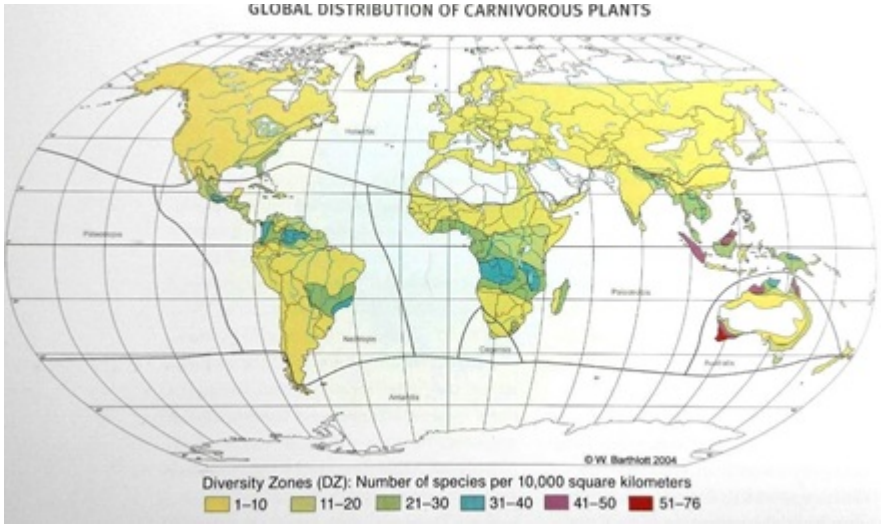


Figura 4: Distribución global de plantas carnívoras. W. Barthlott

Ventajas y desventajas del carnivorismo

Estabilidad y supervivencia: La economía de las estructuras foliares les permite sobrevivir en ambientes donde la obtención de nutrientes es muy baja. Por otra parte, con tan poca eficacia fotosintética, se verán restringidas a estas zonas, ya que no podrán competir con plantas fotosintéticamente más eficientes en un medo normal. Esto también supone un problema si los ambientes no son estables, por ejemplo, que haya aumento de los nutrientes, descenso del nivel de agua, o aumento de vegetación convencional al rededor, lo que presionará a las carnívoras. A su vez, el crecimiento de las carnívoras es bastante lento, y muchas de ellas son especies anuales o perennes, lo que implica la necesidad de mantenerse durante varios años hasta poder florecer. Lo que las hace más sensibles ante la competencia de otras plantas, los cambios del ambiente y las actividades humanas (Barthlott *et al.,* 2007).

Polinización: Existe un pequeño problema alimentación – polinización. Para evitar eliminar a sus propios polinizadores, algunas especies se han adaptado formando talos florales alejados de las trampas, mientras que otras, aprovechan el momento en el que sus trampas están deterioradas, reducidas o no funcionales para florecer (generalmente al final invierno - inicios de la primavera).

En el caso de géneros como *Utricularia*, las trampas están situadas en el agua mientras que la flor se sitúa en la zona aérea, permitiendo la polinización.

Por otro lado, algunos de los sistemas de atracción de polinizadores y presas difieren, el género *Pinguicula* presenta una coloración específica para atraer a los polinizadores a la flor, mientras que emite un olor característico en las hojas para las presas.

Predadores, comensales y simbiontes: Es muy frecuente la presencia de simbiontes (bacterias, larvas de algunos insectos…) en la mayoría de estas plantas, tanto en el mucílago como en los líquidos que contienen las trampas jarro o de caída, ayudando a la digestión de las presas.

En el caso de las trampas jarro, puede llegar a haber incluso redes alimenticias complejas en estos líquidos (W. Adlassnig *et al.,* 2011).

Por otro lado, en algunos géneros y especies se dan casos de mutualismo y comensalismo con otros animales. Por ejemplo, es muy frecuente que algunas arañas roben presas de las plantas jarro, o se escondan en las flores para capturar polinizadores. Las ranas suelen esconderse dentro de los jarros, e incluso realizar las puestas de huevos dentro de ellas, como *Microhyla nepenthicola* en *Nepenthes ampullaria.*

Nepenthes hemsleyana, N. raflledsiana elongata y *N. bicalcarata*, alteran el nivel de líquido de los jarros permitiendo que los murciélagos *Kerivoula hardwicki*i descansen dentro durante el día, obteniendo así las

heces de estos que contienen grandes cantidades de nitrógeno (Grafe *et al.,* 2011; Schöner *et al.,* 2013). También en *N. bilcarata*, se dan relaciones con hormigas *Camponotus schmitzi* que viven en la planta y que aportan prácticamente todos los nutrientes que la planta necesita, procedentes de sus residuos. La planta a su vez les ofrece un lugar donde vivir y néctar. Además, las hormigas se encargan de eliminar a algunos organismos indeseables de los fluidos, como larvas de mosquito que se alimentan de las presas de la planta, nadando en el fluido y sacando a las larvas fuera (Bazile *et al.,* 2012; Schamann*et al.,* 2013).

Otro caso similar al de los murciélagos, se da con *Nepenthes lowi*i y *N. rajah*, que a cambio de generar gran cantidad de néctar con la que atrae a animales, recibe sus excrementos.

En cuanto a predadores, existen diversos animales que se alimentan de estas plantas, como por ejemplo algunas babosas y caracoles, e incluso algunas polillas y avispas (Barthlott *et al.,* 2007), así como pueden presentar algunos parásitos.

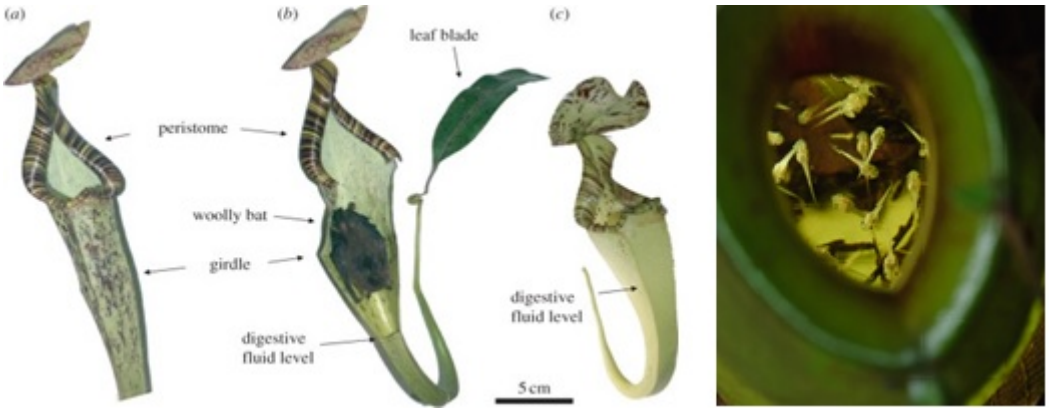


Figura 5: *Nepenthes rafflessiana elongata* y *Kerivoula hardwickii* (izq.), Grafe et al. 2011. Renacuajos de *Microhyla nepenthicola* en *N. ampullaria* (derech.). Chi'en C. Lee

Tipos de trampas

Los mecanismos de captura se pueden clasificar en 4 tipos de trampas:

Trampas de succión: *Utricularia* es el único género con este tipo de captura. Esta planta acuática forma pequeñas bolsas o nasas con pequeños pelos. Antes de la captura, la planta vacía de agua las bolsas, que presentan una pequeña tapa que las deja cerradas y vacías. Cuando un animal roza los pelos, la tapa se abre y se produce una entrada masiva de agua junto con la presa dentro de la bolsa, quedando encerrado dentro. Este es el movimiento vegetal más rápido del mundo.

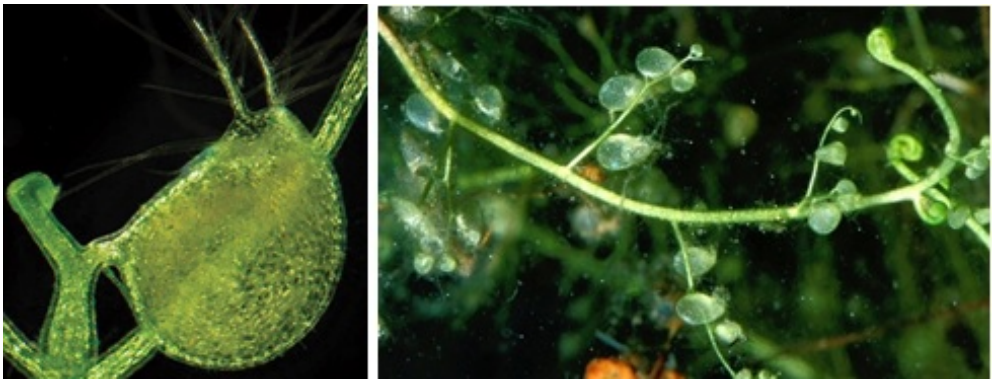


Figura 6: Trampa de *Utricularia gibba* (izq.), Enrique Ibarra Laclette y Claudia Anahí Pérez Torres. *Utricularia striata* (derech.), Barry Rice.

Trampas adhesivas: Las especies con este sistema de captura, se basan en la atracción por el olor dulzón del mucílago y el brillo de este cuando le da la luz. El mucílago es generado por glándulas secretoras (formadas por una o más células) distribuidas por la superficie de hojas y tallos. Dependiendo del género, el mucílago surge de una glándula en la superficie del tejido o de tentáculos que las elevan.

Cuando la presa toca el mucílago, se queda pegada, y al intentar escapar acaba pegándose a más gotas o tentáculos y queda embebida, asfixíandose. La hoja y los tentáculos pueden llegar a tener movimientos activos que ayudan a atrapar mejor a la presa, como en *Drosera* y *Pinguicula*.

La composición del mucílago es una solución formada por una mezcla de polisacáridos ácidos como el ácido glucónico, la galactosa, xilosa y arabinosa (Barthlott *et al.,* 2007).

Dentro de este tipo de sistemas de captura se encuentran los géneros *Drosera, Drosophyllum, Pinguicula, Byblis, Roridula* y *Triphyophyllum* (International Carnivorous Plant Society, online).

Figura 7: 1. *Drosophyllum lusitanicum*, Diogo Oliveira. 2. *Drosera rotundifolia*, Juza. 3,6. *Triphyophyllum y Roridula*, Nicole Rebbert. 4. *Pinguicula jaumavensis*, cascadecarnivores.com. 5. *Byblis*, Georg Benda.

Trampas cepo: Las trampas cepo están representadas por dos géneros muy emparentados: *Aldrovanda* (acuática) y *Dionaea*. El sistema de captura se basa en dos lóbulos que al recibir estímulos por la presa en un cierto periodo de tiempo, se cierran bruscamente al perder su estado de alta tensión. Las dos son ejemplos relevantes de la captura activa de presas, siendo *Dionaea* uno de los géneros más conocidos y más populares.

Figura 8: *Aldrovanda vesiculosa* y *Dionaea muscipula*. International Carnivorous Plant Society.

Trampas de jarro o de caída: Las trampas jarro o de caída, se centran en estructuras en forma de tubo o de jarro que contienen agua con diversas enzimas y compuestos disueltos.

Atraen a los insectos produciendo néctar alrededor del peristoma, con el color que adquieren, e incluso con paredes muy finas que permiten que traspase mucho la luz para hacer creer al animal que no está atrapado, vuele hacia el techo para que choque y caiga al fondo de la trampa (típico en *Darlingtonia californica*, Figura 9.8). Los peristomas también pueden presentar diferentes ornamentaciones que faciliten la caída de los insectos, como molduras dirigidas al interior del jarro.

Algunas de las especies o géneros presentan tapas que regulan la entrada de agua, en ciertas Nepenthes, la tapa incluso actúa como una catapulta al caer gotas de lluvia sobre ella, propulsando al interior del jarro a los insectos que intentan protegerse debajo de la tapa (Bauer *et al.,* 2012).

Los tubos o jarros están recubiertos de pequeños pelos dirigidos hacia abajo, lo que evita que los insectos y otros animales puedan subir por las paredes y huir. Además, los fluidos, en particular los de Nepenthes, son visco-elásticos, lo que ayuda al ahogamiento de las presas (Gaume & Forterre, 2007).

Dentro de estos mecanismos de trampas, se encuentran los géneros *Brocchia, Catopsis, Cephalotus, Darlingtonia, Genlisea, Heliamphora, Nepenthes* y *Sarracenia*. (International Carnivorous Plant Society, online). En muchos de estos géneros, las simbiosis con bacterias son muy frecuentes, incluso algunos están obligados a depender de ellas o de otros microorganismos para poder llevar a cabo la digestión de las presas.

Figura 9: 1. *Heliamphora*, Stewart McPherson. 2. *Sarracenia leucophylla*, Stephen C. Doonan. 3. *Nepenthes ephippiata*, JeremiahsCPs. 4. *Darlingtonia califórnica*, Janet y Iain Clark. 5. *Brocchinia reducta*, BotBI. 6. *Catopsis*, Ian Hook. 7. *Cephalotus follicularis*, Paraflora. 8. Techo de la trampa de *Darlingtonia califórnica*, vevasbotanicalarea.blogspot.com

Protocarnívoras

El concepto de protocarnívora o paracarnívora, se utiliza para aquella planta con características carnívoras (capacidad para capturar), pero incompletas, es decir, la planta no consigue realizar al digestión y absorción de los nutrientes. Estas plantas suelen presentar trampas de caída, o tricomas pegajosos para realizar las capturas.

La tendencia o dirección evolutiva de esas especies, es la que determina que con el paso del tiempo completen sus características para ser consideradas carnívoras o no. A pesar de que esto parece fácil, muchas especies llevan a la discusión de si realmente son o no carnívoras:

Por ejemplo, *Rodirula* genera en vez de mucílago resina, donde no difunden ni las enzimas ni los nutrientes. Pero a pesar de esto, su escarabajo mutualista (*Pameridea roridulae*), se alimenta de sus

presas y defeca sobre la superficie planta, pudiendo entonces absorber los nutrientes de los residuos de este escarabajo (International Carnivorous Plant Society, online). Por otro lado, no todos los géneros forman las hojas "carnívoras" durante todo el año, si no que las forman solo en algunas épocas. Algunos también tienen capacidad para abortar la formación de las trampas en condiciones ambientales favorables (International Carnivorous Plant Society, online).

CONCLUSIONES

En los complejos caminos de la evolución, las plantas carnívoras suponen un extraordinario ejemplo de la capacidad de adaptación de las especies al entorno, y de cómo en aras de la supervivencia, la selección natural permite generar formas de vida diferentes para adaptarse a las circunstancias del medio. Así, en algún momento pasado, el hecho de tener la capacidad de nutrirse de presas caídas accidentalmente en su interior, supuso a estas plantas una ventaja evolutiva, que les permitió crecer en ambientes difíciles donde apenas había competencia. A partir de ahí los mecanismos evolutivos han encaminado estas plantas hacia lo que son hoy en día: trampas elaboradas, capacidad de digestión de la presa, asimilación eficaz de los nutrientes… El coste de todas estas modificaciones parece compensarse con la menor inversión en el costoso proceso fotosintético.

A pesar de que solo pueden mantenerse en hábitats muy limitados debido a su falta de competencia con otras plantas, existe una enorme variedad de especies, mecanismos de captura, enzimas y métodos de atracción. Con el avance de los estudios, se van conociendo nuevas especies que confirman sus características de carnivorismo, y otras, con el paso del tiempo perderán estos caracteres. Lo que sí es seguro, es que estas plantas continuarán sorprendiéndonos con sus adaptaciones.

BIBLIOGRAFÍA

Adlassnig, W., Peroutka, M., and Lendl, T. (2011). Traps of carnivorous pitcher plants as a habitat: composition of the fluid, biodiversity and mutualistic activities. Ann Bot. 107(2): 181–194.

Barthlott, W., Porembski, S., Seine, R., Theisen, I. (2007). The Curious World Of Carnivorous Plants. A Comprehensive Guide to Their Biology and Cultivation. Portland, London. Timber Press.

Bauer, U., D. Giusto, B., Skepper, J., U. Grafe, T. and Federle, W. (2012).With a Flick of the Lid: A Novel Trapping Mechanism in Nepenthes gracilis Pitcher Plants. PLoS ONE 7(6): e38951.

Bazile, V., J. A. Moran, G. Le Moguédec, D. J. Marshall & L. Gaume 2012. A carnivorous plant fed by its ant symbiont: a unique multi-faceted nutritional mutualism. PLoS ONE 7(5): e36179

Gaume, L., and Forterre, Y. (2007). A Viscoelastic Deadly Fluid in Carnivorous Pitcher Plants. PLoS ONE 2(11): e1185.

Grafe, T. U., R. Schöner, C., Kerth, G., Junaidi, A., and G. Schöner, M. (2011). A novel resource-service mutualism between bats and pitcher plants. Biol. Lett. 23 7(3):436-439.

International Carnivorous Plants Society (online) www.carnivorousplants.org/ [consultado 9/11/2014]

Król, E., J. Plachno, B., Adamec, L., Stolarzl, M., Dziubińska, H. and Trębaczl, K. (2011). Quite a few reasons for calling carnivores "the most wonderful plants in the world". Ann Bot. Jan 2012; 109(1): 47–64.

Rice, B.A. (2006). Growing Carnivorous Plants. Oregon., U.S.A.:Timber Press.

Scharmann, M., G. Thornham, D., U. Grafe, T. And Federle, W. (2013). A Novel Type of Nutritional Ant-Plant Interaction: Ant Partners of Carnivorous Pitcher Plants Prevent Nutrient Export by Dipteran Pitcher Infauna. PLoS ONE 8(5): e63556.

Schöner, C., Schöner, M., Kerth, G., and Grafe, U. (2013). Supply Determines Demand: Influence of Partner Quality and Quantity on the Interactions between Bats and Pitcher Plants. In Abstracts. 16th International Bat Research Conference y 43rd North American Symposium on Bat Research.

ARTESANÍA CON ORO VEGETAL: "CAPIM DOURADO"

Ana González Iglesias & Laura Soliño Castiñeira

Trabajo Botánica II
Tutora:
- Marisa Castro
Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

Syngonanthus nitens "hierba del oro" es una especie de Eriocaulaceae que existe en la región de Jalapão , estado de Tocantins (Brasil). Su principal característica es el color brillante y dorado, de ahí su nombre común "Capim Dourado", que literalmente significa "hierba del oro".

La elaboración de trabajos artesanales con *Syngonanthus nitens* se inició en Jalapão. Los pueblos indígenas enseñaron el arte a los habitantes locales a su paso por la región alrededor de la década de 1930. Durante décadas, la artesanía se practicó sólo por mujeres, para usos domésticos y/o venta esporádica.

Palabras clave: *Capim dourado, artesanía, recolección, conservación, Jalapão, Brasil.*

INTRODUCCIÓN

La "hierba del oro" o "capim dourado" se produce de forma natural en Brasil, preferentemente en el "Parque Estadual do Jalapão" (estado de Tocantins) al norte del País (Figura 1). El nombre de Jalapão se refiere al de una planta muy común de la región (*Operculina macrocarpa*), utilizada para curar problemas de estómago.

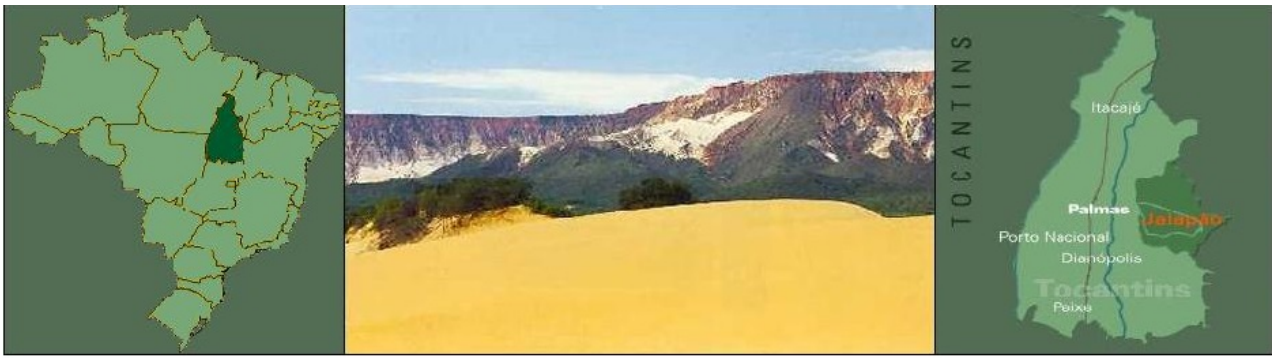


Figura 1: Situación geográfica e paisaje del P.E. do Jalapão

El Parque comprende unas 158.885 hectáreas, en las que se pueden observar diferentes paisajes: dunas de arena doradas, densos bosques, amplias extensiones de tierras rojas, sierras coloridas, arroyos, lagunas, ríos de aguas cristalinas, grandes cascadas,...; La mayor parte del territorio es llano o suavemente ondulado siendo su punto más alto la Sierra de las Traíras, con una altitud de 1.340 metros. Y, climatológicamente presenta una temperatura media de 30ºC, con dos períodos bien definidos, uno lluvioso de octubre a abril y el otro seco de mayo a septiembre

La "hierba del oro" es una planta dicotiledónea, que pertenece a la familia Eriocaulaceae. Fue descrita originalmente por Bongard (1831) como *Eriocaulon nitens*, posteriormente, Kunth (1841) hizo la

combinación de la especie en *Paepalanthus* y pasadas dos décadas, Koernicke (1863), basándose principalmente en la pilosidad de las espatas y hojas y en la longitud de los escapos (tallos), propuso tres variedades (*Paepalanthus nitens var. β, Paepalanthus nitens var. α* y *Paepalanthus nitens var.* γ) para ese taxón.

Ruhland, en 1903, la incluyó en el género *Syngonanthus* (Engler, 1903) y propuso cinco variedades (englobando algunas de las propuestas por Koernicke, 1863), con distribución en las regiones Nordeste, Centro-Oeste y Sudeste de Brasil: *Syngonanthus nitens var. erectus* y *Syngonanthus nitens var. hirtulu* (región de Goiás), *Syngonanthus nitens var. filiforme* (estados de Pernambuco, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo y Goiás), *Syngonanthus nitens var. koernicke*i (región de Minas Gerais) y *Syngonanthus nitens var. nitens* (sin distribución precisa).

Recientemente fue propuesta otra variedad por Moldenke (1973), Syngonanthus nitens var. viviparus.

Las menciones al "capim dourado" o "hierba del oro" se refieren exclusivamente a Syngonanthus nitens; pero la variabilidad morfológica entre las poblaciones de plantas identificadas bajo ese nombre hacen pensar si pertenecen todas al mismo taxón y si existe diversidad y variación morfológica con poblaciones localizadas en otras regiones brasileñas.

Averiguar esa diversidad es interesante bajo el punto de vista de la conservación, una vez que no se tienen conocimientos si la presión de la recogida de la "hierba del oro" ocurre solamente sobre un taxón o más (Takashi & Coutinho Watanabe, 2009).

Otros autores consideran que la gran variabilidad morfológica asociada a la distribución geográfica tiene sentido en un contexto evolutivo, en el que las adaptaciones de un organismo son indisociables del ambiente en el que viven (Takashi & Coutinho Watanabe, 2009).

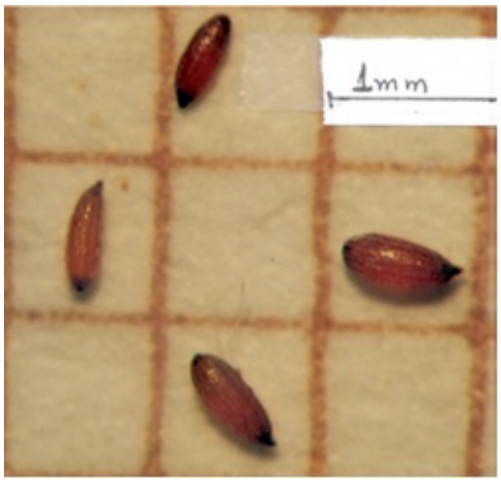
Descripción de la planta

La especie *Syngonanthus nitens* fue ampliamente descrita por Parra (1998). A partir de un rizoma se forma una roseta de hojas, que crece cerca del suelo, y tiene 3-4 cm. de longitud. Cada roseta puede vivir varios años y producir escapos muchas veces en su vida, normalmente dos; pero existen plantas que pueden producir entre 10 y 20 por año.

Los escapos florales son largos y dorados, con flores dispuestas en capítulos, rodeados por brácteas involucrales de color crema brillante, generalmente glabras, que no sobrepasan las flores (Figuras 2 y 3).

Figuras 2 y 3: Flor de *Syngonanthus nitens* inmadura (izda.) y seca (dcha) (foto tomada de http://bellisgirl.blogspot.com.es/2012/06/capim-dourado-biojoias.html).

Los frutos secos, cápsulas loculicidas, tienen dos semillas por cada uno. Así, un capítulo produce entre 40 y 60 semillas de menos de 1 milímetro, de color marrón (Bonesso Sampaio *et al.,* 2010) (Figura 4 y 5).



Figuras 4 y 5: Semilla y capítulos de capim dourado (foto M.Castro).

El ciclo biológico de la floración de *Syngonanthus nitens* se desarrolla entre los meses de agosto a noviembre, siguen el siguiente patrón (Bonesso Sampaio *et al.,* 2010):

- 1 al 7 de agosto: los escapos están crecidos y comienzan la producción de las flores.
- 1 al 7 de septiembre: comienzan a producirse las semillas.
- 14 al 20 de septiembre: algunas semillas ya están maduras, pero la mayoría aún siguen verdes.
- 20 de septiembre al 1 de octubre: las semillas ya han madurado, comienza la recolección de los escapos.
- 1 al 7 de octubre: las semillas maduras comienzan a caer de los capítulos.
- 14 de octubre al 1 de noviembre: las semillas caen completamente.
- 1 al 7 de noviembre: los escapos, sin semillas, pierden su brillo.

Investigaciones sobre la cosecha de la planta

Los recolectores de las comunidades de Mumbuca fueron los primeros en preocuparse del futuro de la cosecha y buscaron ayuda en los investigadores para saber cuál era la mejor época y como debe ser recogida la "hierba del oro". Así, los artesanos y recolectores más experimentados unieron sus conocimientos a los resultados de los investigadores (Antunes Daldegan, 2007; Bonesso Sampaio *et al.,* 2010; Borges da Silva *et al.,* 2010, entre otros). Además, la recogida de información relativa a la época de floración y fructificación (agosto-noviembre), a lo largo de varios años de estudio, en los caminos de varias ciudades de Tocantins y del Oeste de Baia permitió definir el período de cosecha más adecuado. De hecho, los resultados de estas investigaciones fueron confirmados por los recolectares con mayor experiencia (Bonesso Sampaio *et al.,* 2010).

Las poblaciones de *Syngonanthus nitens* son muy resistentes al fuego, aunque varía mucho según la distribución interanual de las precipitaciones. De acuerdo a lo indicado por los cosechadores con más experiencia, las últimas investigaciones aconsejan el uso bianual del fuego como herramienta para estimular la producción de flores, ya que incendios en intervalos más largos no causan el decrecimiento poblacional, pero tampoco promueven la floración (Belloni Schmidt, 2005; Belloni Schmidt et. al., 2011)

Cosecha y recolección de la planta

Existen variaciones geográficas en el momento de la maduración y la producción de las semillas, por lo

que el tiempo considerado ideal para la recogida de la "hierba del oro" es muy variable entre las diferentes poblaciones. En general, las fechas están comprendidas entre el 15 de Septiembre, no antes para asegurar que los tallos estén bien secos, y el 15 de Octubre, no después porque la lluvia puede provocar la descomposición de la planta. La variabilidad en el período de recolección parece estar relacionado con el anterior período de lluvias (Figura 6).

Figura 6: Cosechadores recolectando Capim dourado (foto tomada http://joalgoldengrass.com/about-us/).

Se recolecta tirando de la parte extrema de la planta (capítulo) ya que las fibras doradas y de aspecto metálico forman parte del escapo floral, a veces es necesario sostener la roseta basal con el pie para que no arrancar toda la planta. Un cosechador con experiencia puede recoger 1 kg. de "hierba del oro" en 3 o 4 horas.

Importancia social y económica de la artesanía del "capim dourado"

La técnica de coser pequeños manojos de tallos de "hierba del oro" proviene de las mujeres indígenas de Jalapão y fue enseñado de generación en generación. Durante décadas, se recolectaba y trabajaba únicamente por mujeres y el comercio era realizado en pequeña escala por los artesanos y sus familias, dirigido a turistas y comerciantes que pasaban por la región (Gomes Lima, 2008).

Estos trabajos se mostraron por primera vez a un público numeroso en 1993 en FECOARTE (Feira de Folclore, Comidas típicas e Artesanato do Estado de Tocantins), incentivados por Eleusa Miranda Costa (primera dama del municipio). Los artesanos presentaron sus trabajos y tanto las autoridades presentes como el público en general los clasificaron en primer lugar debido a la originalidad de las piezas en "capim dourado" (Wikipedia, 2011). Varias telenovelas brasileñas se encargaron de popularizar su uso entre la población sudamericana y portuguesa.

Debido al aumento en el número de artesanos, desde mediados de la década de 1980 los gobernantes de Tocantins divulgaron este tipo de artesanía a través de exposiciones en ferias regionales y nacionales (Figura 7).

Figura 7: Artesanía realizada con Capim dourado (foto tomada de http://bellisgirl.blogspot.com.es/2012/06/capim-dourado-biojoias.html).

Entre 1999 y 2001 ocurrió el primer gran incremento de artesanos, por ello buscaron nuevas técnicas y el gobierno ofreció cursos para difundir la práctica entre hombres, mujeres y niños. Hoy en día es raro encontrar una casa en Jalapão donde ninguno de sus residentes se dediquen a la artesanía del "capim dourado" (Figura 8).

Figura 8: Mujer tejiendo Capim dourado (foto tomada http://joalgoldengrass.com/about-us/).

Esta proliferación provocó que, desde el año 2001, se crearan asociaciones de artesanos y coleccionistas, con diferentes grados de organización, habilidades de marketing y gestión de los ingresos. Y, como respuesta a la eleva recolección de la "hierba del oro" en Jalapão, el Instituto de Naturaleza de Tocantins, máxima autoridad ambiental del estado, estableció una ordenanza para la normalización de su uso (2004).

Esta normativa fue desarrollada en base al conocimiento de los artesanos tradicionales y los recolectores de la comunidad, apoyada por estudios científicos se estableció que:

- La "hierba del oro" solo puede ser recogida después del 20 de septiembre, siempre y cuando la planta esté totalmente madura. Esta fecha fue decidida a partir del conocimiento tradicional y de un estudio fenológico de producción y dispersión de semillas (Bonesso Sampaio et al., 2010).
- Durante la recolección las flores de la hierba del oro (capítulos) deben ser cortadas y depositadas en los campos.
- Los coleccionistas solo podrán realizar la práctica de la recolección si están afiliados a alguna asociación registrada.
- Se prohíbe la comercialización de la "hierba del oro en estado natural" (fresca).

Con estas medidas se pretende realizar un aprovechamiento sostenible de las plantas e incrementar el control social sobre la cosecha, colaborar con las asociaciones locales de artesanos y generar ingresos para las comunidades de Jalapão.

CONCLUSIONES

1. La legislación vigente parece ser adecuada para mantener la sostenibilidad de las actividades extractivas y artesanales en beneficio de las poblaciones del estado de Tocantins.
2. La recolección temprana, es decir antes del 20 de Septiembre, no permite un aprovechamiento sostenido de la planta y es perjudicial para la población que vive casi exclusivamente del "capim dourado".
3. Las quemas bianuales estimulan la floración de la "hierba del oro" y son ideales para el crecimiento de la población a largo plazo. Intervalos más largos de la quema carecen de utilidad.

BIBLIOGRAFÍA

Antunes Daldegan, G. (2007) Análise da distribuição espacial de áreas de potencial ocorréncia de Capim Dourado na região do Jalapäo (TO) por sensoriamento remoto. Brasília.

Belloni Schmidt, I. (2005) Etnobotánica e ecología populacional Syngonanthus nitens: Sempre-viva utilizada para artesanato no Jalapäo, Tocantins. Brasilía.

Belloni Schmidt, I.; Bonesso Sampaio, M.; Benedetti Figueiredo, I. & Ticktin, T. (2011); Fogo e Artesanato de Capim-dourado no Jalapão – Usos Tradicionais e Consequências Ecológicas. Biodiv. Brasileira 1 (2): 67-85.

Bonesso Sampaio, M.; Belloni Schmidt, I.; Benedetti Figueiredo, I. & Takeo Sano, P. (2010) Boas prácticas de manejo para o extrativismo sustentavel do Capim dourado Buriti. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília 72 p.

Bongard, A. G. H. von. (1831). Essai monographique sur les especes d'Eriocaulon du Brasil. Mém. Acad. Imp. Sci. St.-Pétersbourg, Sér. 6, Sci. Math. 4(1): 601–655.

Borges da Silva, R.; Clementino dos Santos, A.; Expedito Cavalcante da Silva, J.; Bernardes Taverny de Oliveira, L. & Dos Santos Araújo, A. (2010) Diagnóstico do solo em áreas de ocorrência de Capim Dourado na região do Jalapão, estado do Tocantins. Instituto de Desenvolvimento Rural do Estado de Tocantins.

Engler, H.G.A. von (1903) Das Pflanzenreich. Regni vegetabilis conspectus. Im Auftrage der Königl. preuss. Akademie der Wissenschaften / herausgegeben. Heft 13 / IV 30: 1-294

Gomes Lima, R. (2008) Capim dourado: costuras e trançados do Jalapão. Centro Nacional de Folclore e Cultura Popular. Ministerio da Cultura.

Koernicke, F. (1863) Eriocaulaceae. In: Martius, K.F.P. & Eichler, A.W. & Urban, I. (eds) Flora Brasiliensis. Typographia Regia, München, 312–320.

Kunth, K.S. (1788-1850) Enumeratio Plantarum Omnium Hucusque Cognitarum 5 vols. Stutgardiae et Tubingae: sumtibus J.G. Cottae

Moldenke, H.N. (1973) Original description of *Syngonanthus nitens var. viviparus.* Phytologia 25: 223,

Parra, L. R. (1998) Flora da Serra do Cipo, Minas Gerais: Syngonanthus Ruhland (Eriocaulaceae). Bol. Bot. Univ. São Paulo 17:219-254.

Ruhland, W. (1903) Eriocaulaceae. In: Engler A (Ed) Das Pflanzenreich. IV 30 (Heft 13). W. Engelmann, Leipzig, 1–294.

Takashi Coutinho Watanabe, M. (2009) Análise morfométrica e variabilidade morfológica em populações de Syngonanthus nitens (Bong.) Ruhland (Eriocaulaceae). Departamento de Botánica. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Wikipedia (2011) Capim dourado In pt.wikipedia.org/wiki/Capim_dourado [consultado 16/01/2011]

ALGAS PARÁSITAS DE METAZOOS

Rodrigo Rodríguez Grajel
e- mail: rodrirodriguez@alumnos.uvigo.es

Trabajo Botánica I
Tutora:
- Aida Morales
Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo
Facultad de Biología
Universidad de Vigo.

Resumen

A continuación se realiza una revisión bibliográfica de ciertas algas parásitas de metazoos (animales). Se tratan las afecciones de esta naturaleza en algunos invertebrados: cangrejo cacerola (*Limulus polyphemus*), diversos artrópodos (producidas por *Helicosporidium sp.*), corales de arrecife (producidas por *Phormidium corallyticum*) y moluscos (*Coccomyxa parasitica*); así como en vertebrados: prototecosis (infecciones por *Prototheca sp.*) en bóvidos y humanos.

INTRODUCCIÓN

Las algas son organismos autótrofos que colonizan prácticamente cualquier nicho ecológico. Existen algas adaptadas al ambiente terrestre, aunque la mayoría vive en ecosistemas acuáticos, en cuyo caso pueden hallarse formando parte del fitoplancton (flotando) o del bentos, esto es, asociadas a sustratos sólidos como rocas, lodo o arena. También podemos hallar algas que viven sobre vegetales o en el interior de éstos (epífitas/endófitas), así como sobre y en el interior de animales (epizóicas/endozóicas, respectivamente) o asociadas a hongos (micobióticas o liquénicas); entre ambos organismos se pueden establecer relaciones de simbiosis, mutualismo e incluso parasitismo.

Parasitismo de Invertebrados

Los invertebrados, en su mayoría marinos, son el principal hospedador de la mayor parte de las algas cuyo ciclo vital comprende, al menos, un estadío parásito. Muchas son epibiontes, desarrollándose sobre la cutícula de ciertos crustáceos (Pérez-Martinez & Barea-Arco, 2000); aunque en ocasiones, como veremos a continuación, penetran en el hospedador convirtiéndose en endobiontes.

Caso del cangrejo cacerola

El cangrejo cacerola o herradura americano (*Limulus polyphemus*), que vive en la región norte de la costa oeste del Atlántico, es un crustáceo acuático (subclase Xiphosura) cuya historia evolutiva ha permanecido prácticamente inmutable desde hace más de 200 millones de años (Braverman *et al.,* 2012), por lo que ha sido calificado como un fósil viviente (Smith & Berkson, 2005) y ha sido intensamente estudiado. Se ha convertido en un modelo para el estudio del sistema nervioso, la fagocitosis celular o el desarrollo embrionario de los invertebrados marinos, entre otros; tiene, además, gran importancia en diferentes industrias, como la pesca de cebo o a modo de fertilizante para la agricul¬tura (Shuster *et al.,* 2003). Probablemente, su uso más sobresaliente sea en la industria bio¬médica, dado que de su sangre (hemolinfa) se pueden aislar amebocitos que producen una sustancia útil en la detección de mínimas concentraciones de diferentes endotoxinas en humanos (Walls *et al.,* 2002).

Una patología común documentada por Leivobitz & Lewbart (1987) como causante de gran parte de las muertes en cangrejos cacerola, tanto salvajes como en cautiverio, está causada, según Braverman et al. (2012), por el parasitismo de un alga verde de la familia Ulvaceae (Figura. 1). Esta alga causa lesiones degenerativas en el dorso del exoesqueleto, los ojos y ocelos, la membrana artrodial (situada sobre el

corazón) y la base de su espina caudal o telson (Leivobitz & Lewbart, 1987). Estudios en microscopía óptica y cultivos in vitro del alga revelaron que los esporófitos jóvenes de ésta (zigotos) emplean sus procesos rizoidales para insertarse en la lámina quitinosa que compone la superficie del exoesqueleto y, en ocasiones, alcanzar los órganos internos.

Este ataque puede acarrear deformidades en el exoesqueleto, necrosis, degeneración de los tejidos oculares e incluso hemorragias cardíacas (Braverman *et al.,* 2012). Además, es frecuente que la herida resultante sea infectada de forma secundaria por otros patógenos, bacterianos o micóticos (Figura 2). Una de las razones por las que esta afección prevalece y entraña gravedad es que los cangrejos cacerola maduros cesan en la muda de la cutícula, por lo que no pueden librarse del alga de manera natural; tal es la importancia de este fenómeno que hay evidencias de que otro artrópodo acuático, la langosta americana (*Homerus americanus*), es también parasitado por esta alga, aunque con mínimas consecuencias debido a que sí se produce la ecdisis en individuos adultos. Además, se han hecho estudios que demuestran que el alga es resistente a las propiedades inmunológicas y al potencial de expulsión mecánica de bioinvasores que poseen los exudados generados en las glándulas hipodérmicas de *L. polyphemus* (Harrington *et al.,* 2008).

Helicosporidium sp.

Helicosporidium sp. es una alga verde apoclorótica unicelular de gran variabilidad fenotípica (Denton *et al.,* 2009). Su ciclo biológico comprende fases de vida vegetativa, fases filamentosas y hasta la formación de quistes, precisamente su estadío parásito. Es capaz de infectar a múltiples invertebrados ya que se desarrolla en ambientes acuáticos tan diversos como estanques, suelos húmedos o la savia de los árboles.

Los quistes están formados por una película inerte que contiene una única célula con forma de filamento espiral, en torno a tres células ovoides (Figura 3). Después de su ingestión por un hospedador, normalmente un insecto, las enzimas digestivas del mismo provocan la ruptura de la película protectora y la liberación de las células ovoides, que dañan el tejido del intestino, y la célula filamentosa (Bläske-Lietze *et al.,* 2006). Ésta consigue atravesar el epitelio intestinal y alcanzar el hemocele, dónde su escisión libera gran cantidad de células hijas, las cuales auto-esporulan y dejan en el insecto la descendencia vegetativa (Denton *et al.,* 2009).

Mal de la banda negra de los corales: *Phormidium corallyticum*

Algunos corales constructores de arrecifes en el Atlántico occidental, como *Montastraea annularis, M. cavernosa, Colpophyllia natans, Diploria clivosa, D. labyrinthiformis y D. strigosa* (Kuta & Richardson, 1996), son susceptibles a una infección conocida como enfermedad de la banda negra (Figura 4).

Rützler et al. (1983) confirman que la cianobacteria filamentosa *Phormidium corallyticum* es el agente etiológico, y especulan que la histólisis observada en el coral penetrado se debe a la producción de un exudado tóxico por parte de este organismo (Figura 5). De forma inmediata, el tejido coralino se ve invadido por numerosas bacterias sulforreductoras, densas poblaciones de la bacteria sulfooxidante *Beggiatoa spp*., y numerosas bacterias heterotróficas (Richardson & Kuta, 2003), que conforman un tapete microbiano. El cultivo de P. corallyticum fuera del coral anfitrión (Rützler *et al.,* 1983) reveló que esta alga requiere de ciertas sustancias orgánicas para su crecimiento óptimo, todavía no identificadas, contenidas en el tejido del coral. Kuta & Richardson (1996), en un estudio de casi 1.400 colonias de coral, obtuvieron que un 0,72 % de las especies estaban afectadas con esta enfermedad (Figura 6). Además, la supervisión a lo largo del año dilucidó que una gran parte de las especies se correspondían con un patrón de patogenicidad estacional, estando limitada en estos casos la infección a los meses más cálidos, en los que la temperatura del agua es superior a 25 ºC; a esta temperatura, *P. corallyticum* realiza la fotosíntesis oxigénica de manera óptima (Richardson & Kuta, 2003).

Afecciones en Moluscos: *Coccomyxa parasitica*

Del género *Coccomyxa* se conocen principalmente algas de agua dulce, o epífitas y ficobiontes de líquenes. Sin embargo, el alga *Coccomyxa* parasitica fue descrita por primera vez por Stevenson y South (1974) como un parásito de la vieira gigante de Terranova (*Placopecten magellanicus*), una especie de gran valor comercial que se ve reducido por la intensa coloración verde que imprime el alga (Cremonte & Vázquez, 2012).

Coccomyxa parasitica (Figura 7b), organismo unicelular morfológicamente heterogéneo, con capacidad de reproducción mediante autosporas, forma colonias de morfologías muy diversas que se distribuyen por varios órganos del hospedador, fundamentalmente por los pliegues superior e inferior del manto (Stevenson & South, 1974); una infección masiva causa importantes daños en el hospedador (Naidu, 1971). El análisis de un elevado número de vieiras constató que la concentración de la infección disminuye exponencialmente desde el exterior al interior del animal (Stevenson y South, 1974) (Figura 8). Naidu (1971) añade que los requerimientos fotosintéticos del alga provocan un descenso en la presencia de infección directamente proporcional a la profundidad a la que se encuentran los ejemplares de P. magellanicus, esto es, al descenso de iluminación.

Existen abundantes documentos que señalan a *Coccomyxa* parasitica como causante de infecciones en otras especies de bivalvos. La almeja panopea (*Panopea abbreviata*), que en los últimos años ha adquirido gran interés comercial (Ciocco, 2000), es endémica del suroeste atlántico, un bivalvo de gran tamaño que vive enterrado a más de 70 cm en sedimentos blandos de tipo fangoso, prolongando sus sifones 20 cm sobre la superficie. El alga fue hallada en el interior de los hemocitos (Figura 7.A) que se infiltran en el tejido conectivo del extremo terminal de los sifones, en los cuales se estabilizó y logró reproducirse (Figura 9). Esto está de nuevo relacionado con las necesidades fotosintéticas del alga; los tejidos del sifón tendrían una exposición a la luz mínima para la supervivencia de *C. parasitica* (Vázquez *et al.,* 2010). Así es que la luz ha sido considerada un factor esencial para el control de la distribución y abundancia del alga en el interior tisular. Vázquez *et a*l. (2000) hacen también referencia a que los daños producidos en *P. abbreviata* están causados, principalmente, por la provocación de trastornos en la disposición de los músculos y fibras conectivas de los sifones. Asimismo, el alga es combatida por la almeja panopea mediante la formación de vacuolas digestivas en el interior de los hemocitos, provocando su reabsorción; esto podría suponer un continuo desgaste energético perjudicial para el animal.

El mejillón azul (*Mytilus edulis*) es otra especie de bivalvo no exenta del parasitismo de *Coccomyxa*. El alga fue hallada formando pústulas verdes en los tejidos gonadales y en la región del manto y el músculo aductor posteriores (Rodríguez *et al.,* 2008) (Figura 10). Dado que los componentes de las valvas de estos animales son secretados por el manto, la invasión de éste en individuos juveniles conlleva su deformación y el consecuente crecimiento anormal de la concha. También cabe añadir a la problemática generada por *C. parasitica* (Mortensen *et al.,* 2005) la esterilidad parcial o total de los ejemplares cuyas gónadas fueron infectadas, así como la pérdida de interés comercial (Cremonte y Vázquez, 2012).

Parasitismo de Vetebrados: Infecciones por *Prototheca sp.*

La mayoría de las infecciones provocadas por algas en animales vertebrados están causadas por organismos del género *Prototheca* (Figura 11). Alguna excepción la componen patologías producidas por Shewanella algae, que se cree responsable de la infección secundaria en diversas heridas, como las generadas por mordedura de cobra (Liu *et al.,* 2013); o una clorofícea parásita de un pez japonés, *Sillago japonica* (Koike *et al.,* 2013), entre otros.

Existen diferentes casos documentados de infecciones por Prototheca. De 1969 a 1974, aproximadamente 250 ejemplares de salmón del Atlántico (*Salmo salar*) de una piscifactoría murieron debido a una infección que afectó principalmente a los riñones; la posterior necropsia reveló que la mayoría de los órganos estaban infestados de un nueva especie del género *Prototheca, P. salmonis* (Gentles & Bond, 1977). Desde entonces se han registrado patologías provocadas por esta alga en

multitud de animales, como ranas, murciélagos (Mettler, 1975), perros o gatos; de estos dos últimos casos los síntomas son variados: diarreas, formación de nódulos cutáneos, ceguera, encefalitis y disfunciones multiorgánicas (Font & Hook, 1984; Kaplan *et al.,* 1976; Schulzte *et al.,* 1998).

Mastitis bovina

La mastitis bovina es una de las principales enfermedades infecciosas del ganado lechero que produce cuantiosas pérdidas económicas. Consiste en una infección intramamaria provocada por alguno de múltiples organismos patógenos que pueden causar la enfermedad. *Prototheca*, más concretamente *P. zopfii* (Zaror *et al.,* 2011) (Figuras 12 y 13), no es un causante habitual de mastitis, sino que más bien se trata de un parásito ocasional, que aparece bajo rutinas de ordeño deficientes y malas condiciones de higiene. Se ha conseguido aislar de entre, además de las ubres, una gran variedad de muestras ambientales, como plantas, suelo, barro, arroyos, patios de estabulación, agua de bebederos, agua de drenaje, material de cama, unidades de ordeño e incluso heces de vaca (Porras–Almeraya, 1994; Zaror *et al.,* 2011). La infección provocada por el alga se podría prevenir en alto grado mediante una adecuada higiene de los recintos, las unidades de ordeño y las ubres de los animales, lo cual no siempre se cumple rigurosamente (Porras–Almeraya (1994) encontró que en un hato se utilizaba una única toalla para limpiar y secar la ubre de todas las vacas).

Las glándulas mamarias de las vacas donde se aisló *Prototheca* presentaron tres hallazgos constantes: reducción de tamaño e incremento a la palpación en la consistencia de las glándulas infectadas, sin presentar signos de inflamación marcada; disminución de la producción láctea y, fundamentalmente, refracción al tratamiento por los antibióticos comerciales convencionalmente utilizados en ganadería (Porras–Almeraya, 1994). Esto supone grandes pérdidas comerciales, a las que se suma de manera secundaria la eliminación de la leche contaminada con antibióticos. A pesar de que existen ciertos tratamientos no frecuentes que consiguen erradicar la infección, su elevado coste convierte al sacrificio del animal en la práctica más común entre los ganaderos para evitar que la enfermedad se propague por el rebaño (Zaror *et al.,* 2011).

Infección en humanos

Las afecciones por *Prototheca* en humanos son extremadamente raras y están limitadas, principalmente, al tejido cutáneo de las extremidades (Gentles & Bond, 1977), en que se produce la formación de úlceras purulentas (Figura 14); también se pueden producir, sin embargo, infecciones intestinales y prototecosis diseminada en pacientes inmunodeprimidos (Zaror *et al.,* 2011). Esto queda patente en estudios de Klintworth *et al*. (1968), en que la infección ocurrió en una mujer con diabetes mellitus y un carcinoma mamario con metástasis generalizada; y Davies *et al*. (1964), en que la infección por una nueva especie, *P. segbwema*, se extendió por los nódulos linfáticos de la pierna de un productor de arroz de Sierra Leona. El tratamiento usual para *Prototheca*, resistente a los antibióticos convencionales y con gran capacidad reproductiva, consiste en un efecto sinérgico de un antibiótico de la familia de las tetraciclinas, de amplio espectro, y anfotericina B, este último el que resultados más positivos ha obtenido contra *Prototheca spp*. (Lee *et al.,* 1975; Lass-Flörl & Mayr, 2007).

Cabe mencionar un estudio que García–Cuevas y Suárez–Delgadillo (2009) realizaron en un hospital mexicano con el fin de determinar la influencia de *Prototheca*, como parte de las infecciones nosocomiales (adquiridas en el hospital), sobre niños en período neonatal. Los factores determinantes a la hora de producirse la infección son la cada vez más acentuada inmadurez de los niños prematuros y, en consecuencia, la utilización de tecnología más especializada, que actúa como nuevas fuentes de entrada para las infecciones. De entre los niños infectados por el alga, alrededor de un 25% falleció, bien por la acción directa del parásito (el 16% de ellos), bien por consecuencias derivadas del mismo.

ANEXO DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía in vivo del prosoma (cefalotórax) en la región del gran ojo lateral compuesto (LE). Ambos, caparazón y ojo, están parcialmente cubiertos por algas verdes. Tomado de Braverman *et al*. (2012).

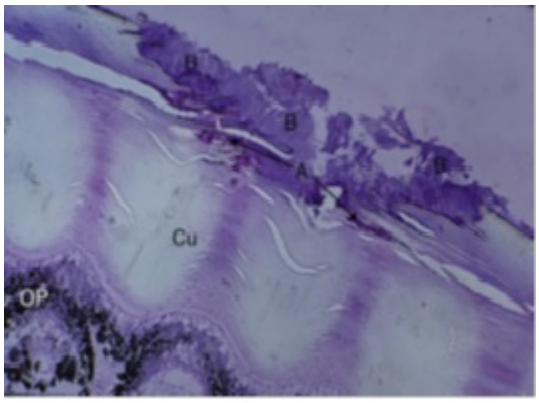


Figura 2. Microfotografía de un ocelo (OP) afectado por las algas verdes invasivas (A), que han erosionado la cutícula (Cu), favoreciendo la infección secundaria por bacterias (B). Tomado de Braverman *et al.* (2012).

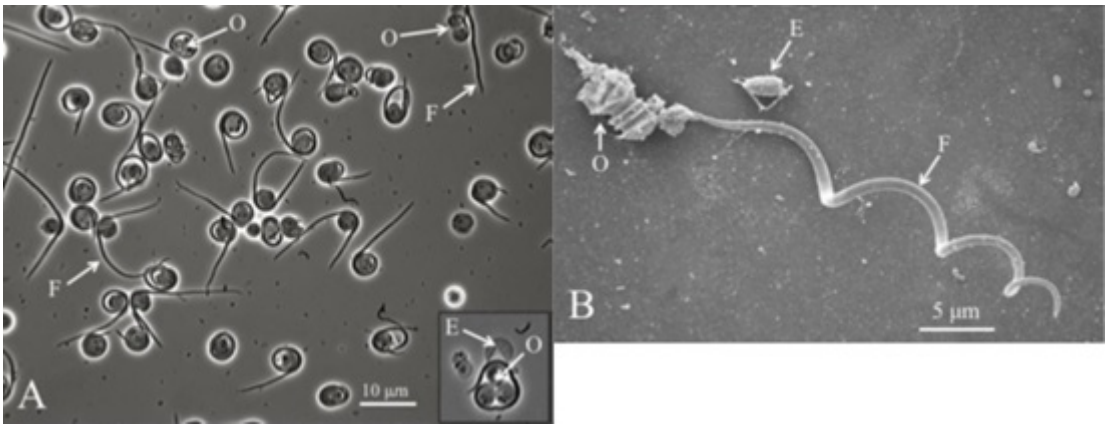


Figura 3. Ruptura del quiste de Helicosporidium observada bajo el microscopio óptico [A] y detalle de una célula filamentosa bajo el microscopio electrónico de barrido [B]. Se observan grupos de tres células ovoides (O), células filamentosas (F) y películas vacías (E). Tomado de Tartar (2013).

Figura 4. Mal de la banda negra en el coral *Colpophyllia natans*. Tomado de Richardson (1998).

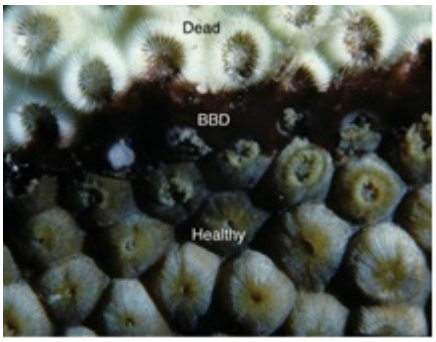


Figura 5. Fotografía in situ del de la banda negra en el coral *Montastraea cavernosa*. Se aprecia el esqueleto (Dead), la banda de patógenos (BBD) y el tejido todavía saludable (Healthy). Modificado de Richardson & Kuta (2003).

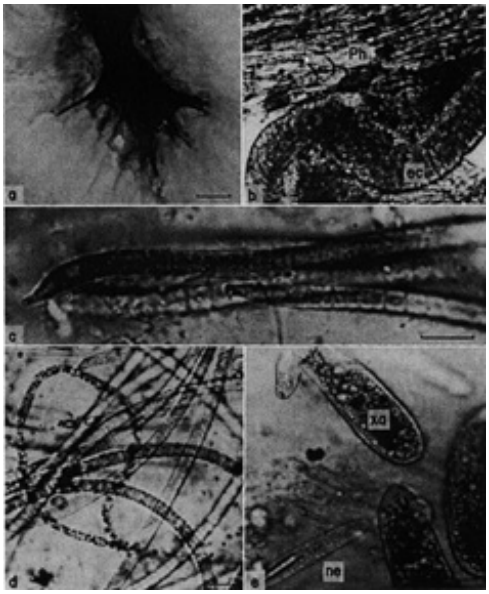


Figura 6. Fotografías a diferentes aumentos de: filamentos de *Phormidium* penetrando en el ectodermo del coral (a); (b) una visión similar a (a) en sección transversal, en dónde "Ph" representa el alga y "ec" el ectodermo del coral; detalle de los filamentos de *Phormidium* (c, d: filamentoso) y *Beggiatoa* (d: granular); ciliados (*Philaster sp.*) llenos con zooxantelas consumidas del coral: "xa", distíngase un nematocisto aislado sin sin explotar: "ne". Tomado de Rützler *et al*. (1983).

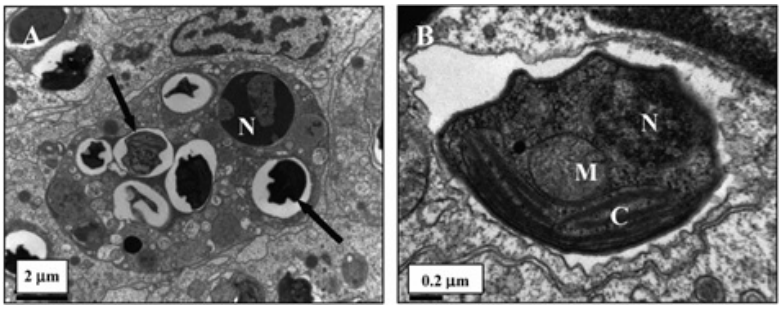


Figura 7. Micrografía electrónica del alga *Coccomyxa*. Se aprecia una célula (hemocito, N: núcleo) afectada con numerosas inclusiones de células del alga (A) y el detalle de una de éstas (B), en dónde se aprecian cloroplastos: C, una mitocondria: M y su núcleo: N. Modificado de Rodríguez *et al*. (2008).

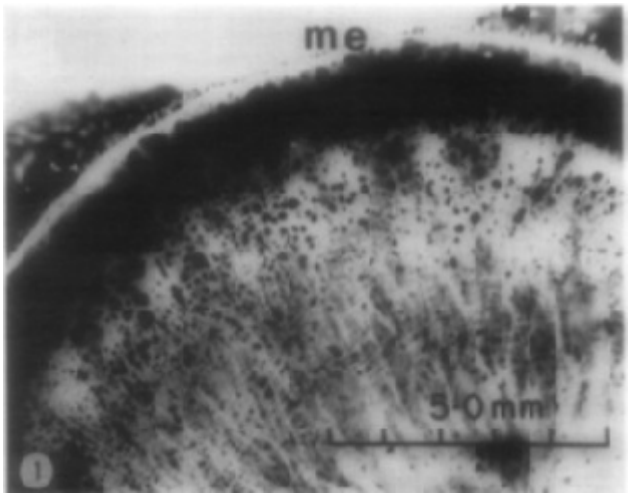


Figura 8. Superficie del manto de una vieira gigante (*Placopecten magellanicus*), en que se aprecia un decrecimiento de la infección desde el exterior (me) hacia el interior. Tomado de Naidu (1971).

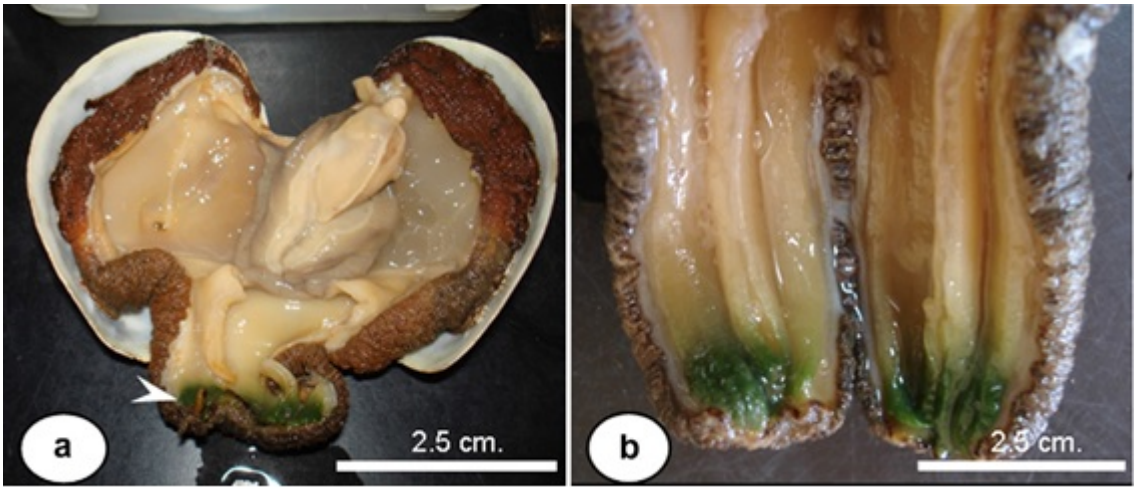


Figura 9. Panopea abbreviata con infección por *Coccomyxa* (manchas verdes). Almeja diseccionada (a) y detalle de los sifones (b). Modificado de Vázquez *et al*. (2010).

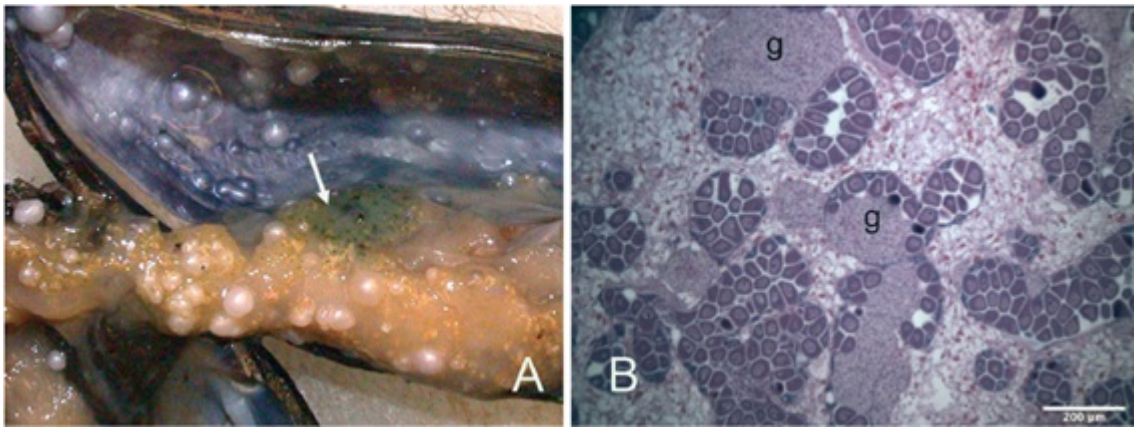


Figura 10. *Mytilus edulis* con numerosas perlas (A) en que se aprecian áreas infectas con *Coccomyxa*. (B) Sección histológica de las áreas afectadas en que se aprecia que la infección produce grandes lesiones granulomatosas: g. Modificado de Rodríguez *et al*. (2008).

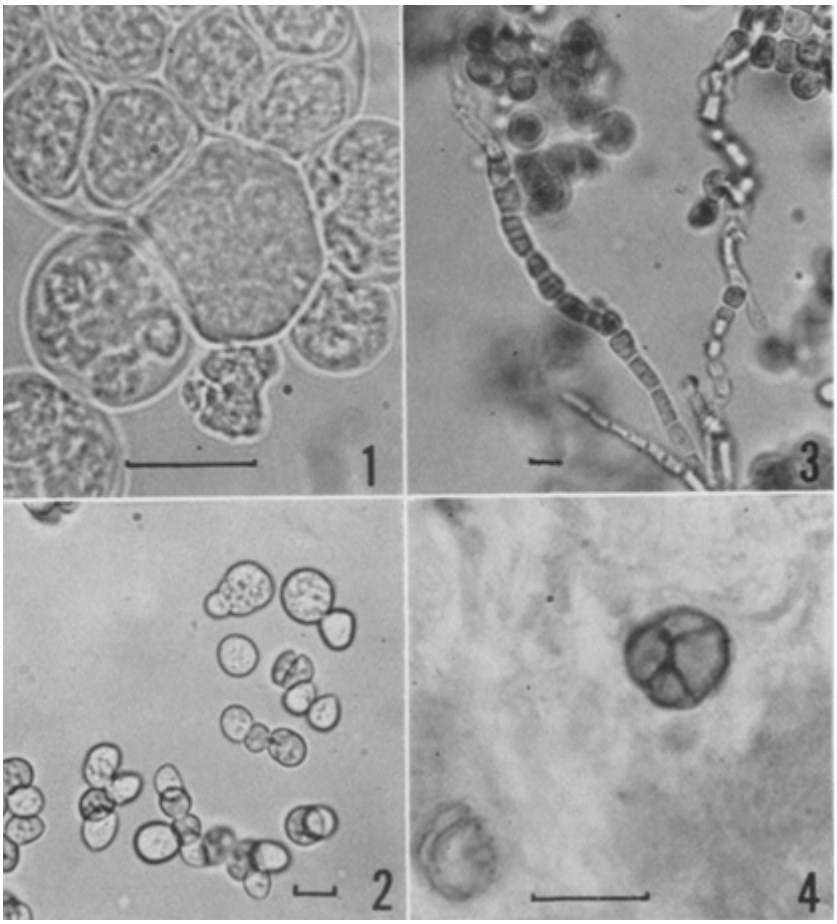


Figura 11. Esporangio y aplanosporas de diferentes especies de *Prototheca*. A saber: *P. zopfi*i (1), *P. filamenta* (2, 3) y *P. wickerhamii* (4). Tomado de Arnold & Ahearn (1972).

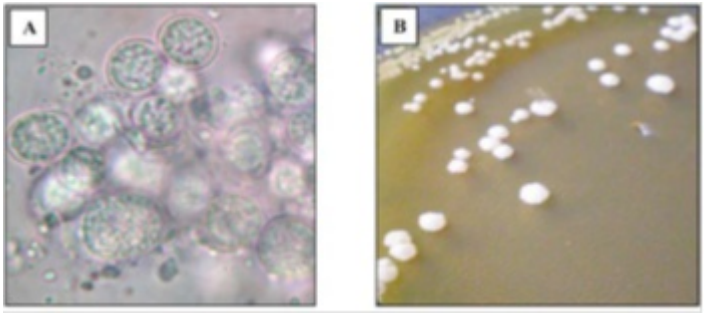


Figura 12. Examen microscópico directo (preparación en fresco) de una muestra de leche positiva a *Prototheca zopfii* (A) y de colonias típicas de *Prototheca zopfii* (B). Tomado de Zaror *et al*. (2011).

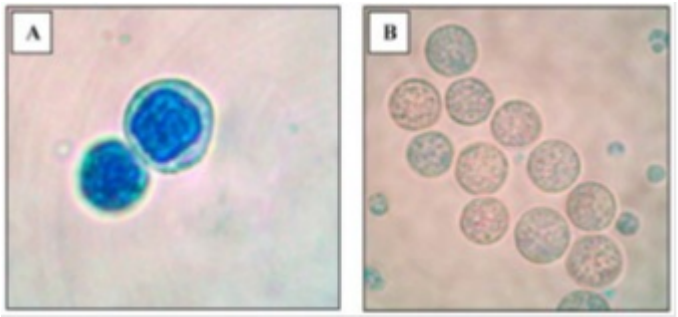


Figura 13. Células de *Prototheca zopfii* en diferentes estados del ciclo de vida (A y B). Tomado de Zaror *et al.* (2011).

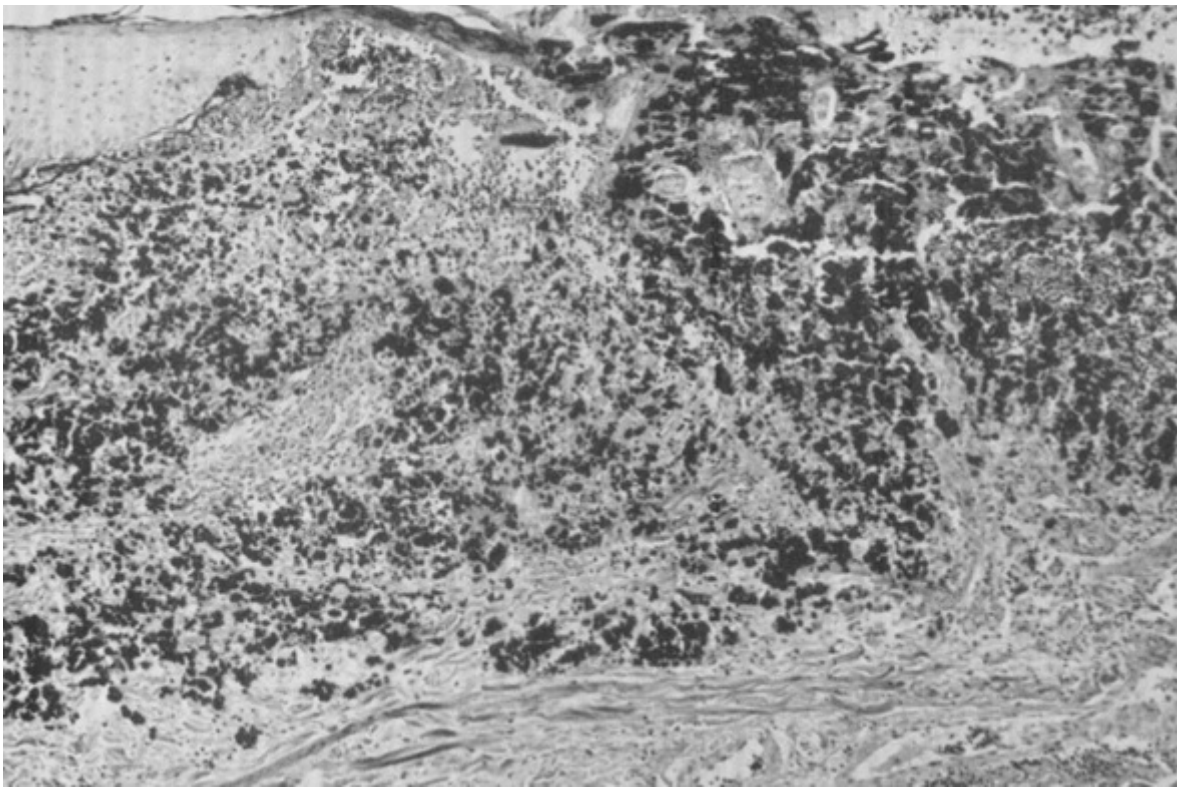


Figura 14. El alga *Prototheca wickerhamii* (puntos negros) se extiende a una profundidad de 5 mm en esta úlcera cutánea. Tomado de Klintworth *et al.* (1968).

BIBLIOGRAFÍA

Arnold, P. y Ahearn, D. G. (1972). The Systematics of the *Genus Prototheca* with a Description of a New Species P. filamenta. Mycologia 64: 265–275.

Bläske- Litze, V.-U., Shapiro, A. M., DENTON, J. S., Botts, M., Becnel, J. J. y Boucias, D. (2006). The development of the algal *entomopathogen Helicosporidium*. J Eukaryot Microbiol 53: 165–176.

Braverman, H., Leibovitz, L. y Lewbart, G. A. (2012). Green algal infection of American horseshoe crab (Limulus polyphemus) exoskeletal structures. J Invert Pathol 111: 90–93.

Ciocco, N. F. (2000). Almeja panopea, un nuevo recurso pesquero para el Mar Argentino. Infopesca Internacional 6: 36–39.

Cremonte, F. y Vázquez, N. (2012). Estado sanitario de las poblaciones de Moluscos Bivalvos en Argentina. Rev Arg Parasitol 1: 137–139.

Davies, R. R., Spencer, H., y Wakelin, P. O. (1964). A case of Human *Protothecosis*. Trans R Soc Trop Med Hyg 58: 448–451.

Denton, J. S., Bläske-Lietze, V.-U., Boucias, D. (2009). Host age and pathogen dosage impact cyst morphogenesis in the invertebrate pathogenic alga Helicosporidium sp. (Chlorophyta: Trebouxiophyceae). J Invert Pathol 102: 36–39.

Font, R. L. y Hook, S. R. (1984). Metastatic Protothecal Retinitis in a Dog. Electron Microscopic Observations. Vet Pathol 21: 61–66.

García-Cuevas, G. y Suárez–Delgadillo, M. S. (2009). Evolución clínica de un brote por Prototheca sp. Archivos de Investigación Materno Infantil 1 (1): 22–23.

Gentles, J. C. y Bond, P. M. (1977). Protothecosis of Atlantic Salmon. Sabouraud 15: 133–139.

Harrington, J., Leippe, M. y Armstrong, P. B. (2008). Epithelial immunity in a marine invertebrate: a cytolytic activity from a cuticular secretion of the American horseshoe crab, Limulus polyphemus. Mar Biol 153: 1165–1171.

Kaplan, W., Chandler, F. W., Holzinger, E. A., Plue, R. E. y Dickinson, R. O. (1976). Protothecosis in a cat: First recorded case. Med Mycol 14: 281–286.

Klintworth, G. K., Fetter, B. F. y Nielsen Jr., H. S. (1968). Protothecosis, an algal infection: report of a case in man. J Med Microbiol 1: 211–216.

Koike, K., Akai, N., Liao, L. M., Ikeda, K. y Yoshimatsu, S. (2013). Chlorophycean parasite on a marine fish, Sillago japonica (Japanese sillago). Parasitol Int 62: 586–589.

Kuta, K. G. y Richardson, L. L. (1996). Abundance and distribution of black band disease on coral reefs in the northern Florida Keys. Coral Reefs 15: 219–223.

Lass-Flörl, C. y Mayr, A. (2007). Human Protothecosis. Clin Microbiol Rev 20: 230–242.

Lee, W.-S., Lagios, M. D. y Leonards, R. (1975). Wound infection by Prototheca wickerhamii, a saprophytic alga pathogenic for man. J Clin Microbiol 2: 62–66.

Leibovitz, L. y Lewbart, G. A. (1987). A green algal (Chlorophycophytal) infection of the exoskeleton and associated organ structures in the horseshoe crab, Limulus polyphemus. Biol Bull 173: 430.

Liu, P.-Y., Shi, Z.-Y., Shyu, C.-L., Wu, Z.-Y., Lai, K.-L., Chang, C.-Y., Chen, Y.-J., Huang, J.-A., Mao, Y.-Chiao y Tung, K.-C. (2013). Cobra bite wound infection caused by Shewanella algae. Int J Infect Dis, disponible en: http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2013.08.014 [07/12/2013].

Mettler, F. (1975). Generalisierte Protothecose bei einem Flughund (Pteropus lylei). Vet Pathol 12: 118–124.

Naidu, K. S. (1971). Infection of the giant scallop, Placopecten magellanicus (Gmelin) from Newfoundland with an endozoic alga. J Invert Pathol 17: 145–157.

Pérez-Martínez, C. y Barea-Arco, J. (2000). Relación entre el tamaño del hospedador y la intensidad de infección de un alga epibionte. Limnetica 19: 193–198.

Porras–Almeraya, A. (1994). Aislamiento de Prototheca en un brote de mastitis bovina. Vet Mex 25 (1).

Richardson, L. L. (1998). Coral diseases: What is really known? Trends Ecol Evol 13: 438–443.

Richardson, L. L. y Kuta, K. G. (2003). Ecological physiology of the black band disease cyanobacterium Phormidium corallyticum. FEMS Microbiol Ecol 43: 287–298.

Rodríguez, F., Feist, S. W., Guillou, L., Harkestad, L. S., Bateman, K., Renault, T. y Mortensen, S. (2008). Phylogenetic and morphological characterisation of the green algae infesting blue mussel Mytilus edulis in the North and South Atlantic oceans. Dis Aquat Organ 81: 231–240.

Rützler, K., Santavy, D. L., y Antonius, A. (1983). The Black Band Disease of Atlantic Reef Corals. Mar Ecol 4: 329–358.

Schultze, Ring, Morgan y Patton (1998). Clinical, cytologic and histopathologic manifestations of protothecosis in two dogs. Vet Ophthalmol 1: 239–243.

Shuster, C. N., Barlow, R. B., Brockmann, H. J. (2003). The American Horseshoe Crab. Cambridge, USA: Harvard University Press.

Smith, S. A. y Berkson, J. (2005). Laboratory culture and maintenance of the horseshoe crab (Limulus polyphemus). Lab Anim 34: 27–34.

Stevenson, R. N. y South, G. R. (1974). Coccomyxa parasitica sp. nov. (Coccomyxaceae, Chlorococcales), a parasite of giant scallops in Newfoundland. Brit Phycol J 9: 319–329.

Tartar, A. (2013). The Non-Photosynthetic Algae Helicosporidium spp.: Emergence of a Novel Group of Insect Pathogens. Insects 4: 375–391.

Vázquez, N., Rodríguez, F., Ituarte, C., Klaich, J. y Cremonte, F. (2010). Host–parasite relationship of the geoduck Panopea abbreviata and the green alga Coccomyxa parasitica in the Argentinean Patagonian coast. J Invert Pathol 105: 254–260.

Walls, E., Berkson, J., Smith, S. A. (2002). The horseshoe crab, Limulus polyphemus: 200 million years of existence, 100 years of study. Rev Fish Sci 10: 30–73.

Zaror, L., Valenzuela, K. y Kruze, J. (2011). Mastitis bovina por Prototheca zopfii: primer aislamiento en Chile. Arch Med Vet 43: 173–176.

Número VI

REVBIGO

Revista da Facultade de Bioloxía da Universidade de Vigo

Traballos Académicos

Hipermutación somática: Una Visión Global. Alberto Bugallo 25

Diseño de un museo virtual de zoología. Álvaro Castro 34

Evolution of exonic and intronic regions in primates. Andrés A. Lanzós 43

Interacción suelo- planta en cultivos de interés comercial. Laura Fernández 52

Presencia de Melatonina en Alimentos de Origen Vegetal. Antía Verde 62

Detección de NCAM y PSA como posibles biomarcadores de cáncer colorrectal. Jónatan Reboredo 72

Actividad antimicrobiana de las Bacterias del Género *Pseudoalteromonas*. Fernando Mesías 82

Puesta a punto de marcadores celulares para el estudio morfológico del bulbo olfativo humano. Elsa Núñez 88

Identificación del sexo de trucha común migradora utilizando marcadores genéticos. Noemi González 97

Aproveitamento micolóxico sostible nos montes comunais do Concello de Mos (Pontevedra). Jéssica Mª Urgal 105

Cultivo de Caracoles cónidos (*Conus spp.*) Orientado a la explotación de las propiedades analgésicas de su veneno. Andrea Dieguez 114

Plantas carnívoras: Populares, pero grandes desconocidas. Paula Estévez 119

Artesanía con oro vegetal: "Carpim Dourado". Ana González 128

Algas parásitas de metazoos. Rodrigo Rodríguez 134