Universidad Nacional Mayor De San Marcos
Universidad del Perú, Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

Estandarización y evaluación de una metodología basada en código de barras de ADN para la identificación de líquenes de la Isla Rey Jorge, Antártica

TESIS

Para optar al Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Renato Daniel La Torre Ramirez

ASESOR INTERNO

Dra. María Gisella Orjeda Fernández

ASESOR EXTERNO
Ing. Mayra Mejía Camones

Lima, Perú

2022



Reconocimiento – No Comercial – Compartir Igual – Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by/-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

La Torre, R. (2022). *Estandarización y evaluación de una metodología basada en código de barras de ADN para la identificación de líquenes de la Isla Rey Jorge, Antártica*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo incondicional y por darme el privilegio de estudiar una carrera universitaria. A mis hermanos y hermanas, con quienes siempre estaré en deuda por sus increíbles esfuerzos en cultivar un hogar pacífico y lleno de oportunidades.

A mi madre, la Sra. Rosa Ramirez Perez, por ser mi máximo modelo a seguir. Por haber trabajado día y noche para tener una vida digna y criar con valores a seis hijos por su cuenta. A todos nos dio la capacidad de acceder a estudios superiores, y nunca faltó un alimento en la mesa o un regalo en navidad. Por haberme demostrado con el ejemplo y haberme compartido su sabiduría, estoy profundamente agradecido.

Agradezco a la Prof. Gisella Orjeda por darme la oportunidad de llevar a cabo este y otros trabajos de investigación, y por ser una gran mentora y ejemplo. También a todos los investigadores, compañeros e instituciones involucrados en mi desarrollo personal, académico y profesional. En particular al Prof. Daniel Oré y la Prof. Mónica Paredes, por haberme integrado a sus grupos de investigación durante mi formación práctica.

Al Instituto Nacional de Investigación en Glaciares y Ecosistemas de Montaña (INAIGEM) por promover y fomentar la investigación en el país. En particular por haber creado el programa interno de tesistas con la Directiva Nº 001-2020-INAIGEM/GG que me otorgó el soporte financiero. A mi coasesora la Ing. Mayra Mejía Camones del INAIGEM por su disposición para absolver mis dudas y por su apoyo constante.

Esta tesis fue parte del proyecto “Aporte social, económico y ambiental en la conservación y pérdida de la biodiversidad marina – lacustre por el retroceso glaciar” financiado por el Proyecto Concytec – Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora Fondecyt. [Contrato N°003-2018-FONDECYT-BM-IADT-AV].

ABREVIATURAS

ABGD	Automatic Barcode Gap Discovery
COI	Citocromo oxidasa I
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
dNTP	Nucleósido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
GMYC	Generalized mixed Yule-Coalescent
HCl	Ácido clorhídrico
ITS	Espaciador transcrito interno
INAIGEM	Instituto Nacional de Investigación en Glaciares y Ecosistemas de Montaña
LSU	Subunidad ribosomal mayor
MgCl2	Cloruro de magnesio
ML	Máxima verosimilitud
MOTU	Unidad taxonómica operativa molecular
NaCl	Cloruro de sodio
OTU	Unidad taxonómica operativa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PTP	Poisson tree processes
PVP	Polivinilpirrolidona
rbcL-matK	Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa – maturasa K
SSU	Subunidad ribosomal menor

ÍNDICE GENERAL

Contenido Pág.

INDICE DE CUADROS I
ÍNDICE DE FIGURAS II
RESUMEN IIIV
ABSTRACT V
1. INTRODUCCIÓN 1
2. MARCO TEÓRICO 3
2.1. Características generales de los hongos liquenizados 3
2.1.1. Papel en la naturaleza 4
2.1.2. Propiedades de interés aplicativo para el humano 4
2.1.3. Sistemática y evolución 5
2.2. Identificación, delimitación y determinación de líquenes 6
2.2.1. Métodos tradicionales y moleculares 7
2.2.2. Uso del código de barras de ADN 8
2.2.3. Líquenes antárticos 9
2.2.4. Antecedentes temáticos 91
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 16
3.1. Hipótesis 16
3.2. Objetivos 16
4. MATERIALES Y MÉTODOS 17
4.1. Tipo y diseño de estudio 17
4.2. Población 17
4.3. Muestra 17
4.4. Materiales 17
4.5. Métodos de campo 18
4.6. Métodos de laboratorio 20
4.7. Análisis bioinformáticos 30
5. RESULTADOS 35
6. DISCUSIÓN 72
7. CONCLUSIONES 78
8. RECOMENDACIONES 80
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 81
ANEXOS 93

ÍNDICE DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1	Ubicación y altitud de los puntos de muestreo de líquenes	19
Cuadro 2	Concentraciones del protocolo general de PCR	26
Cuadro 3	Puntos de variación para los ensayos de optimización de parámetros de PCR	27
Cuadro 4	Clasificación de las muestras de ADN genómico según los resultados de cuantificación	28
Cuadro 5	Clasificación de los amplicones según los resultados de electroforesis	29
Cuadro 6	Características de las muestras de líquenes empleadas	36
Cuadro 7	Muestras usadas para la evaluación de protocolos inicial	37
Cuadro 8	Resultados de cuantificación de muestras de ADN genómico procesadas mediante los protocolos A, B y C	38
Cuadro 9	Descripción de muestras analizadas y resultados de cuantificación de la evaluación de protocolos fundamentados en CTAB	42
Cuadro 10	Resultados de secuenciación en términos de muestras y amplicones para cada grupo de muestra clasificado según el patrón de corrida	53
Cuadro 11	Resultados de los métodos de delimitación de especies basados en árboles, GMYC y mPTP	57
Cuadro 12	Resultados de las pruebas de eficacia del código de barras de ADN para los dos conjuntos de datos	64
Cuadro 13	Comparación de evaluaciones morfológicas e identificación molecular de líquenes	67

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Contexto genómico del código de barras fúngico	9
Figura 2	Resumen gráfico de la estandarización e implementación de métodos moleculares	22
Figura 3	Configuración del programa de amplificación en el termociclador	25
Figura 4	Corridas electroforéticas del ADN genómico extraído usando los protocolos A, B y C	39
Figura 5	Resultados de PCR con el protocolo general en ADN extraído usando los protocolos A y B	40
Figura 6	Resultado de PCR con el protocolo general en ADN extraído usando el protocolo C	40
Figura 7	Corridas electroforéticas del ADN genómico extraído usando los protocolos C, D y E	42
Figura 8	Resultado de PCR con el protocolo general en ADN extraído usando los protocolos C, D y E	43
Figura 9	Valores de concentración y calidad de ADN en la evaluación de protocolos de extracción	44
Figura 10	Resultado de PCR con el protocolo general en muestras de ADN independientes extraídas con el protocolo C	45
Figura 11	Resultado de PCR con el protocolo general en muestras de ADN independientes extraídas con el protocolo D	46
Figura 12	Resultado de PCR con el protocolo general en muestras de ADN independientes extraídas con el protocolo C modificado	47
Figura 13	Resultado de la variación en paralelo de concentración de MgCl2 y temperatura de hibridación	48
Figura 14	Resultado de la variación de concentración de cebadores	49
Figura 15	Resultado de la variación de unidades enzimáticas	50
Figura 16	Clasificación de resultados del empleo de protocolos estandarizados para la obtención del código de barras fúngico	51
Figura 17	Resultados de la búsqueda de coincidencias de secuencias en Genbank usando BLAST	54
Figura 18	Número de grupos para los dos conjuntos de datos analizados según un umbral de distancia	55
Figura 19	Delimitación de especies putativas usando ABGD para los dos conjuntos de datos	56
Figura 20	Comparación de especies putativas obtenidas mediante distintos métodos de delimitación filotípica en el conjunto de datos corto	58
Figura 21	Comparación de especies putativas obtenidas mediante distintos métodos de delimitación filotípica en el conjunto de datos largo	59
Figura 22	Valores de umbral para las pruebas de eficacia del código de barras de ADN	63

LISTA DE ANEXOS

		Pág.
Anexo 1	Colecta de líquenes antárticos en la Isla Rey Jorge, Antártica	93
Anexo 2	Protocolo estandarizado de extracción de Cubero y Crespo (2002) modificado	94
Anexo 3	Protocolo optimizado de amplificación del marcador nrITS fúngico	98
Anexo 4	Líquenes antárticos en la Isla Rey Jorge, Antártica	99

RESUMEN

Los líquenes son asociaciones simbióticas entre un hongo (micobionte), un alga y/o cianobacteria (fotobionte), y una amplia comunidad microbiana. En Antártica, son uno de los principales componentes vegetativos terrestres. Una identificación precisa de especímenes es fundamental en investigación. La identificación molecular de hongos liquenizados mediante código de barras de ADN tiene el potencial de confirmar o corregir diagnósticos tradicionales, y puede ser aplicado en casos en los que no es posible una identificación fenotípica. Sin embargo, su efectividad depende de la información disponible en las bases de datos y una taxonomía estable. En este trabajo se evaluó la utilidad del código de barras de ADN en la identificación de hongos liquenizados de la Isla Rey Jorge, Antártica. Para esto, se estandarizó una metodología de extracción, amplificación y análisis de ADN. Se modificó el método de extracción de ADN de Cubero y Crespo (2002) y se procesaron 305 muestras de líquenes antárticos. Se obtuvo ADN para el 80% de muestras. La aplicación del protocolo optimizado de PCR seguido de electroforesis resultó en un 85.7% de muestras con bandas. Según los resultados de la búsqueda por BLAST, un grupo de secuencias representa códigos de barras nuevos, sugiriendo que pueden ser nuevos registros de especies poco estudiadas molecularmente, o especies nuevas. Las pruebas de eficacia del código de barras de ADN resultaron en un alto porcentaje de identificaciones filotípicas correctas, confirmando su efectividad con el grupo de líquenes colectados florísticamente en la Isla Rey Jorge. En conclusión, la metodología estandarizada en este trabajo mostró un alto grado de efectividad para el procesamiento molecular de líquenes antárticos de distintas especies. Además, el código de barras de ADN mostró ser una herramienta útil para la identificación rápida y precisa de hongos liquenizados de la Isla Rey Jorge, Antártica.

Palabras clave: Hongos liquenizados, Antártica, estandarización, metodología, código de barras de ADN, identificación molecular

ABSTRACT

Lichens are symbiotic associations between a fungus (mycobiont), an alga and/or cyanobacteria (photobiont), and a broad microbial community. In Antarctica, they are one of the main terrestrial vegetative components. An accurate identification of specimens is essential in research. Molecular identification of lichenized fungi by DNA barcoding has the potential to confirm or correct traditional diagnoses, and can be applied in cases where a phenotypic identification is not possible. However, its effectiveness depends on the information available in databases and a stable taxonomy. In this work, the usefulness of DNA barcoding in the identification of lichenized fungi from King George Island, Antarctica, was evaluated. To do this, a DNA extraction, amplification and analysis methodology was standardized. The DNA extraction method of Cubero and Crespo (2002) was modified and 305 samples of Antarctic lichens were processed. DNA was obtained for 80% of samples. The application of the optimized PCR protocol followed by electrophoresis resulted in 85.7% of samples with bands. According to the results of the BLAST search, a group of sequences represents new barcodes, suggesting that they may be new records of species with few molecular studies, or new species. DNA barcode efficacy tests resulted in a high percentage of correct phylotypic identifications, confirming its effectiveness with the group floristically collected lichens on King George Island. In conclusion, the standardized methodology in this work showed a high degree of effectiveness for the molecular processing of Antarctic lichens of different species. Furthermore, DNA barcoding proved to be a useful tool for the rapid and accurate identification of lichenized fungi from King George Island, Antarctica.

Key words: Lichenized fungi, Antarctica, standardization, methodology, DNA barcode, molecular identification

1. INTRODUCCIÓN

Los líquenes son asociaciones simbióticas estables entre un hongo u organismo similar a hongo (micobionte primario), un alga y/o cianobacteria (fotobionte primario y secundario), y elementos de los microbioma fúngico y bacteriano asociados (Lücking et al., 2021). Los líquenes tienen un rol ecológico importante y poseen muchas propiedades de interés para los humanos (Martínez, 2016; Sancho et al., 2019; Verma y Behera, 2019; Wat y Forbes, 2015). Una identificación precisa es fundamental para obtener resultados objetivos y consistentes en investigaciones basicas o aplicadas, pues varias de las propiedades de los líquenes son específicas de la especie (Graney et al., 2017; Lumbsch y Leavitt, 2011).

Es importante definir y señalar las diferencias entre los conceptos de delimitación, determinación taxonómica e identificación de especies. La delimitación y determinación taxonómica de especies son procesos dinámicos y complejos que se nutren de diferentes líneas de evidencia, y pueden cambiar a medida que se adoptan nuevas metodologías y conceptos (Lücking et al., 2021; Schlick-Steiner et al., 2010). Por otro lado, la identificación de especies es más directa, pues consiste en la evaluación y comparación de caracteres de diagnóstico con el fin de asociar un organismo al nombre de una especie previamente definida (Goldstein y DeSalle, 2011; DeSalle et al., 2005). Estos caracteres pueden ser morfológicos, químicos, genéticos, entre otros (Singh et al., 2019).

El proceso tradicional de identificación de hongos liquenizados mediante caracteres fenotípicos requiere la participación de especialistas. Incluso cuando se cuenta con el consejo de expertos, algunas muestras de especímenes jóvenes o fragmentos de material biológico son imposibles de identificar (Hollingsworth, 2007; Printzen, 2010). Además, algunas características de los líquenes pueden variar según las condiciones ambientales y geográficas (Fahselt, 2008). Por último, el empleo de

marcadores moleculares ha revelado escenarios donde solo el uso de caracteres fenotípicos no permitiría obtener un diagnóstico preciso (Crespo y Pérez-Ortega, 2009).

Antártica es un continente valioso para la investigación y un componente importante del sistema climático de la Tierra (McLean y Rock, 2016). A pesar de ser un lugar remoto y con condiciones extremas, Antártica no se ha visto libre del impacto de la contaminación por actividades humanas, y actualmente experimenta los efectos del cambio climático (Szopińska et al., 2017; Cook y Zolnikov, 2019). En Antártica, los líquenes son uno de los principales componentes vegetativos terrestres, y han sido extensamente empleados para la evaluación de la calidad del aire gracias a sus características que los hacen buenos bioindicadores y biomonitores incluso en condiciones extremas (Sancho et al., 2019; Rosa, 2019; Zvěřina et al., 2014, 2018).

El uso del código de barras de ADN es uno de los métodos moleculares más usados para la identificación rápida y precisa de organismos, y ha mostrado ser efectivo para la identificación de hongos liquenizados (Hebert et al., 2003; Leavitt et al., 2013; Kelly et al., 2011). Sin embargo, el éxito de identificación depende de una delimitación bien establecida y de la información disponible en las bases de datos (Orock et al., 2012; Meiklejohn et al., 2019). La identificación de especies en áreas poco exploradas como Antártica, donde hay escasos estudios moleculares, puede ser imprecisa. Asimismo, varias de las documentaciones iniciales de diversidad de líquenes en base a caracteres fenotípicos han mostrado ser erróneas (Halıcı et al., 2018; Sancho et al., 2019).

La finalidad de este trabajo es evaluar la utilidad del código de barras de ADN en la identificación de hongos liquenizados de la Isla Rey Jorge, Antártica, mediante la estandarización de una metodología de aislamiento, amplificación y análisis de ADN.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Características generales de los hongos liquenizados

Los hongos liquenizados son un componente principal en la simbiosis liquénica. En la naturaleza, los hongos liquenizados (conocidos como micobiontes) se encuentran asociados obligatoriamente con un alga y/o cianobacteria (conocidas como fotobiontes) de una manera estable y tan integrada que, en conjunto, pueden ser percibidos como un único organismo – el liquen. En esta simbiosis, el micobionte, además de aportar nutrientes minerales, protege e interactúa con los fotobiontes de tal manera que asegura condiciones óptimas para una producción eficiente de nutrientes orgánicos e inorgánicos (Lücking et al., 2021; Nash, 2008). Además, hoy se reconoce la existencia e importancia de un microbioma formando parte de esta simbiosis (Honegger, 2012; Lücking et al., 2021). Por otro lado, la presencia regular de hongos secundarios con influencia estructural y química en el talo de líquenes de la familia Parmeliaceae, apunta a hongos “hiperliquenizados”, en analogía a los hiperparásitos, aunque con una biología subyacente distinta (Lücking et al., 2017).

La liquenización es un ejemplo prominente de una simbiosis exitosa, siendo una estrategia nutricional frecuente en hongos. Más de 19,000 especies de hongos (17% del total de especies fúngicas conocidas) son liquenizados obligados, en contraste con una mucho menor cantidad de fotobiontes (alrededor de 120 conocidos, entre algas y cianobacterias), los cuales pueden ser de vida libre (Nash, 2008; Honegger, 2012). Gracias a esta asociación simbiótica, varios hongos liquenizados se han adaptado a condiciones extremas, demostrando una gran resiliencia (Honegger, 2012; Armstrong, 2017). De este modo, los hongos liquenizados han sido capaces de expandirse a muchos hábitats, desde regiones tropicales hasta regiones polares. Asimismo, los líquenes pueden encontrarse colonizando sustratos naturales como rocas, tierra, hojas, animales, entre otros; y materiales industriales como plástico, caucho, metales y vidrio (Chaparro y Aguirre, 2002; Nash, 2008).

2.1.1. Papel en la naturaleza

En asociación con los fotobiontes, los hongos liquenizados tienen un papel importante en la formación y mantenimiento del equilibrio del ambiente físico y biológico del planeta. Se ha mencionado la extensa distribución de los líquenes, incluso en áreas inhóspitas como Antártica, donde son uno de los principales componentes vegetativos terrestres (Rosa, 2019). Los líquenes han mostrado una acción pedogénica, de naturaleza física y química, aunque en algunos casos también se han considerado protectores contra fenómenos físicos; contribuyendo en ambos casos al desarrollo de sustratos (Chaparro y Aguirre, 2002; Nash, 2008; Honegger, 2012). Los líquenes también participan en el ciclo de nutrientes y en el ciclo hidrológico, influyendo en la germinación de semillas al retener humedad. De esta manera, son eslabones fundamentales en una sucesión vegetal, y pioneros en sitios rocosos sin vegetación (Chaparro y Aguirre, 2002). Por otro lado, los líquenes pueden ser representados como ecosistemas en miniatura, pues propician la interacción de otros microorganismos e invertebrados pequeños, y la formación de comunidades microbianas particulares en conjunto con los componentes principales del consorcio (Nash, 2008; Lutzoni y Miadlikowska, 2009; Honegger, 2012).

2.1.2. Propiedades de interés aplicativo para el humano

Se conocen más de 800 metabolitos secundarios derivados de hongos liquenizados, la mayoría únicos y usualmente específicos de taxones, con varias aplicaciones prácticas. Estos productos secundarios extremadamente estables no son esenciales para la supervivencia o crecimiento de los hongos liquenizados, pero pueden servir como defensa contra herbívoros, patógenos, competidores, y factores abióticos externos como radiación UV (Ranković y Kosanić, 2019). Estas sustancias solo se producen bajo ciertas condiciones y en estados fisiológicos permisivos, y pueden ser aisladas con solventes orgánicos para su empleo en la industria farmacéutica por su acción antibacteriana, antiviral, antioxidante, anticancerígena, antigenotóxica,

analgésica y antipirética, entre otras (Ranković y Kosanić, 2019; Elix y Stocker-Wörgötter, 2008). También se ha documentado el uso de metabolitos secundarios como fuente de colorantes naturales y la producción de perfumes (Nash, 2008).

Los hongos liquenizados tienen varias características que permiten su aplicación como herramientas útiles para la evaluación de la calidad atmosférica. Los líquenes no tienen raíces o cutícula, por lo que absorben agua y minerales de la deposición atmosférica sobre la superficie del talo, acumulando contaminantes que se unen a las paredes celulares (Bargagli, 2016; Sancho et al., 2019). Además, son longevos, sensibles a cambios ambientales, tolerantes al estrés abiótico y perennes. Asimismo, tienen una amplia distribución, tienen pocas interacciones con el sustrato y una tasa de crecimiento lenta. Estas características contribuyen a que los líquenes sean empleados como bioindicadores y biomonitores ambientales para varios propósitos incluso en regiones remotas y extremas como Antártica (Martínez, 2016; Ranković y Kosanić, 2019; Wat y Forbes, 2015; Rivera et al., 2018).

2.1.3. Sistemática y evolución

De acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (ICNafp), cada bionte en los líquenes tiene un nombre científico latinizado distinto. El nombre científico que denota al liquen en su conjunto corresponde al del micobionte primario, el cual casi siempre es un hongo (Lücking et al., 2021).

Los hongos liquenizados conforman un grupo altamente diverso, polifilético y heterogéneo dentro del reino Fungi. La mayoría de hongos liquenizados son Ascomicetos, distribuidos en distintos órdenes, varios de los cuales incluyen también hongos no liquenizados. La simbiosis liquénica tuvo múltiples orígenes independientes y pérdidas subsecuentes, resultando en clados enteros no liquenizados derivados de ancestros con asociación simbiótica (Honegger, 2012; Lutzoni y Miadlikowska, 2009; Lücking et al., 2017).

2.2. Identificación, delimitación y determinación de líquenes

Dada la variedad de interpretaciones que pueden tener los términos “identificación”, “delimitación” y “determinación” de especies, es necesario detallar cada uno de estos. La identificación es el proceso de reconocer la identidad entre dos individuos bajo una variación considerada “normal”. Tradicionalmente, la identificación se logra mediante la comparación directa entre especímenes y el uso de claves, descripciones e ilustraciones (Talbot, 1971). La delimitación de especies es el proceso mediante el cual se reconocen unidades biológicas en base a criterios operacionales (por ejemplo, caracteres fenotípicos, ecológicos o moleculares) y es un paso importante en la determinación de especies (Gomes et al., 2013). Finalmente, la determinación se refiere al nombramiento y clasificación de los organismos, e incluye la descripción y agrupamiento, almacenamiento de información, y predicción de relaciones filogenéticas de los organismos; es decir, es un término más relacionado a la taxonomía y por lo tanto fuera del alcance de este trabajo (Shenoy et al., 2007; Talbot, 1971).

La unidad básica de clasificación biológica es la especie. A lo largo de la historia se han propuesto múltiples conceptos de especie, muchos de los cuales no son mutuamente excluyentes, y sirven más bien como líneas de evidencia para definir los límites entre especies. El elemento común de estos postulados permite conceptualizar a las especies en un sentido general como segmentos de linajes (series de ancestros-descendientes) de poblaciones conectadas (metapoblaciones) que evolucionan de manera separada (De Queiroz, 2007). Bajo esta idea conocida como el concepto unificado de especies, las especies son hipótesis que surgen de alguna línea de evidencia, pero su robustez aumenta a medida que se corrobora con fuentes de datos independientes (es decir, filogenética, morfología, anatomía, química, ecología, entre otros) (Lücking et al., 2021).

La identificación de especies depende de una taxonomía establecida y una base de datos confiable, pues involucra la comparación de caracteres de especies ya

determinadas para nombrar un espécimen. De este modo, la identificación no implica la evaluación exhaustiva de un organismo ni la revisión de la taxonomía existente, sino que depende de estos procesos para aumentar las probabilidades de ser exitosa. Hay una tendencia hacia una identificación rápida mediante el uso de métodos moleculares como el código de barras de ADN (DeSalle y Goldstein, 2019; Meiklejohn et al., 2019), aprovechando su utilidad como herramienta válida y aceptada para la identificación básica, muy aparte de su potencial debatido como herramienta de investigación taxonómica (DeSalle, 2006; Goldstein y DeSalle, 2011).

La delimitación de especies es el proceso por el cual se determinan los límites entre especies y el número de especies en un conjunto de muestras individuales (Wiens, 2007; Zhao et al., 2018). Los métodos de delimitación de especies se enfocan en detectar unidades taxonómicas operativas (OTUs, especies putativas o candidatas), validarlas como linajes evolutivamente distintos, e inferir un árbol de especies (Leavitt et al., 2015). En cuanto a la delimitación en base a marcadores moleculares, existen métodos de un único locus y multi-locus, que han demostrado una gran utilidad en establecer o comprobar las hipótesis de especies (Mallo y Posada, 2016). En la actualidad hay un énfasis en un enfoque integrativo para la delimitación de especies, es decir usando múltiples tipos de evidencia (Alors et al., 2016; Leavitt et al., 2015).

2.2.1. Métodos clásicos y moleculares

Los métodos clásicos de identificación de hongos liquenizados emplean análisis de caracteres fenotípicos. Mediante la revisión bibliográfica de la literatura disponible y el uso de claves estándar ofrecidas por diversos autores, los especímenes son asignados a un nombre según la morfología (caracteres del talo y estructuras reproductivas), anatomía (estructura interna), y su modo de reproducción (Singh et al., 2019). También se ha aprovechado el valor taxonómico de los metabolitos secundarios producidos por los hongos liquenizados para su identificación rutinaria (Xu et al., 2016; Nash, 2008). Para el quimiotipado de especímenes se ha hecho uso de métodos como

las pruebas de mancha de color, la cromatografía de capa delgada (TLC), la TLC bidimensional, la cromatografía líquida de alto rendimiento, espectroscopía de masas, entre otros (Ranković y Kosanić, 2019; Singh et al., 2019).

A la fecha, los métodos moleculares son los más avanzados y precisos para la identificación de líquenes. Se han desarrollado métodos de amplificación de marcadores por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de ADN para la identificación de especies y cepas fúngicas (Singh et al., 2019). Estos métodos dependen de una base de datos confiable, por lo que pueden perder efectividad en taxones poco estudiados o zonas no exploradas (Meiklejohn et al., 2019; DeSalle et al., 2005). Por último, en algunos casos es posible el uso de estrategias combinadas de identificación, incluyendo caracteres fenotípicos y marcadores moleculares según se considere necesario (Pérez-Ortega et al., 2012; Singh et al., 2019).

2.2.2. Uso del código de barras de ADN

El código de barras de ADN es un marcador molecular neutral estandarizado, el cual es usado como identificador de un espécimen o muestra. Para la mayoría de organismos, el uso del código de barras de ADN permite una discriminación taxonómica a un nivel de resolución de especie (Meiklejohn et al., 2019; Hebert et al., 2003). El marcador usado como código de barras difiere entre grupos de organismos. Para animales se usa el gen mitocondrial COI (subunidad I de citocromo oxidasa), en plantas terrestres se usan los loci cloroplastidiales rbcL-matK (ribulosa 1,5-bifosfato carboxiladas – maturasa K), y en hongos se usa la región nuclear ITS (espaciador interno transcrito) (Schoch et al., 2012).

Para hongos liquenizados, la región ITS ha probado ser de mucha utilidad para la identificación de especies mediante código de barras de ADN (Kelly et al., 2011; Schoch et al., 2012). La región ITS comprende los dos espaciadores internos y el gen de ARNr 5.8S del cistrón ribosomal nuclear eucariótico. La secuencia del cistrón ribosomal nuclear eucariótico consiste en el espaciador transcrito externo (ETS), el gen

de ARNr 18S, el espaciador transcrito 1 (ITS1), el gen de ARNr 5,8S, el espaciador transcrito 2, y el gen de ARNr 28S (Figura 1). Este cistrón existe en múltiples repeticiones tándem en el genoma de los hongos liquenizados. La región ITS que sirve como código de barras es secuenciada y continuamente almacenada en bases de datos como Genbank y BOLD.

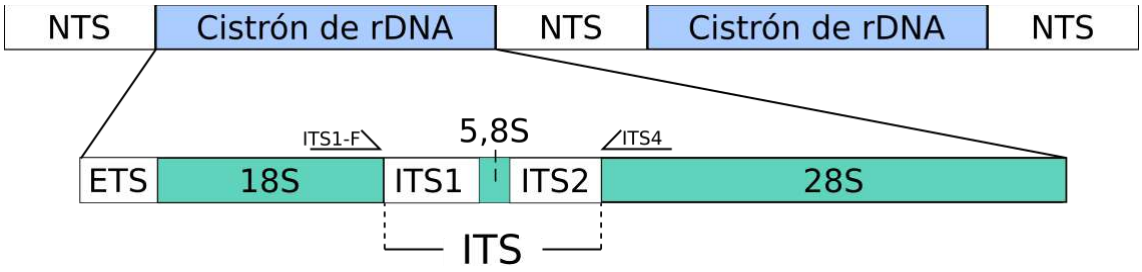


Figura 1.- Contexto genómico del código de barras fúngico. El marcador ITS consiste de las regiones ITS1, ITS2 y el gen 5,8S dentro del cistrón de ADNr repetido en tándem. Se muestran los genes 18S, 28S y otros espaciadores. Adicionalmente, se muestran la posición de los cebadores usados en este trabajo (ITS1-F e ITS4). ETS: Espaciador transcrito externo, ITS: Espaciador transcrito interno, NTS: Espaciador no transcrito.

Las estrategias para discriminar especies usando el código de barras se pueden clasificar en metodos basados en árboles, en similitud de secuencias, estadísticos y de diagnóstico (DeSalle y Goldstein, 2019; Bergmann, 2019; Casiraghi et al., 2010; Mallo y Posada, 2016). La precisión de los métodos de identificación de organismos usando el código de barras de ADN, particularmente de los basados en árboles y en similitud de secuencias, depende del “barcode gap” del clado, el cual es la separación entre la máxima distancia genética intraespecífica y la mínima distancia genética interespecífica (Mallo y Posada, 2016; Meyer y Paulay, 2005).

2.2.3. Líquenes antárticos

Antártica es un continente inhóspito y con condiciones extremas, que tiene un gran valor para la investigación biológica y ambiental. Antártica es el quinto continente

más grande de la Tierra, con un área de alrededor de 14,000,000 km^2. El 98% del continente está cubierto por capas de hielo, algunas de más de 4km de altura. En zonas donde el hielo se ha retirado, la formación y exposición de sustrato ha permitido el desarrollo de comunidades vegetales y animales, mayormente cerca al mar (Beyer y Bölter, 2012). Además de las pocas especies de animales, briofitas y líquenes macroscópicos con distribución limitada en el continente, existe una importante diversidad de comunidades microbianas capaces de sobrevivir en el ambiente extremo de Antártica en sustratos como suelo, rocas, hielo, nieve, sedimentos, agua, y en asociación con otros organismos; cuyas adaptaciones, ecología, fisiología, genética, evolución y potencial biotecnológico se ha investigado en los últimos años (Rosa, 2019). El continente antártico no se ha visto ajeno a la contaminación humana, pues se han registrado contaminantes antropogénicos transportados desde otros continentes y de fuentes locales en muestras abióticas y bióticas (Szopińska et al., 2017). Antártica también refleja las consecuencias del calentamiento global, mostrando un incremento de calentamiento anual que impacta en el derretimiento del permafrost (Rosa, 2019; Szopińska et al., 2017).

Los hongos liquenizados en asociación simbiótica conforman una de las principales vegetaciones del ecosistema de Antártica, donde tienen un gran potencial para estudios de carácter aplicativo e investigativo. Los líquenes son capaces de retener contaminantes atmosféricos que se unen a las paredes celulares, pues carecen de una cutícula protectora. Esta característica es aprovechada junto con otras metodologías para la evaluación de la calidad atmosférica y monitoreo del cambio climático (Wat y Forbes, 2015; Sancho et al., 2019; Bargagli, 2016). Además, los talos de los hongos liquenizados funcionan como microhábitats, al contener una gran riqueza y diversidad de microorganismos adaptados al frío, entre cosmopolitas y endémicos (Nash, 2008; Rosa, 2019). Por otro lado, la probable subestimación de la diversidad de hongos

liquenizados en Antártica, debido a lo incipiente de los estudios moleculares, apunta a la necesidad de esfuerzos para el descubrimiento y reevaluación de taxones.

2.2.4 Antecedentes temáticos

Kelly et al. (2011) evaluaron la utilidad del código de barras de ADN para la identificación de especies de líquenes en un contexto "florístico", es decir, en una región y sin centrarse en un solo género o grupo de especies (Kelly et al., 2011). Sus resultados mostraron un éxito de identificación mediante BLAST y un análisis de *barcode gap* de 96.3% y 94.1%, respectivamente. Por otro lado, también estudiaron un grupo de líquenes en un contexto "taxonómico", es decir, conformado solo por especies cercanamente relacionadas. En este caso, el análisis de BLAST tuvo un éxito de identificación de 92.5%, mientras que la discriminación mediante el análisis de *barcode gap* logró identificar correctamente la especie para el 75% de muestras (Kelly et al., 2011).

Kelly et al. (2011) sugirieron que el empleo del código de barras de ADN puede alcanzar altos niveles de discriminación en un contexto florístico, pues es poco probable que todas las especies cercanamente relacionadas a una especie se encuentren en el área de estudio. Sin embargo, este estudio fue llevado a cabo en una región donde la flora liquénica es extremadamente conocida. Orock et al. (2012) evaluaron la efectividad del código de barras para identificar especies en una región poco explorada usando el método de BLAST, confirmando que la utilidad de esta herramienta molecular es altamente dependiente de una taxonomía bien fundada y la generación de una base de datos de referencia (Orock et al., 2012).

Tanto Orock et al. y Kelly et al. encontraron varios obstáculos en la metodología de amplificación de ADN. Por ejemplo, la alta frecuencia de secuencias de hongos no liquenizados y las amplificaciones o secuenciaciones fallidas (Kelly et al., 2011; Orock et al., 2012). Estos obstáculos fueron tratados subsecuentemente mediante el establecimiento de cebadores universales y métodos efectivos para la obtención de

ADN genómico de alta calidad (Martín y Winka, 2000; Park et al., 2014; Schoch et al., 2012). Otras dificultades pueden estar relacionadas a variaciones biológicas de la secuencia, como repeticiones mononucleotídicas en algunas especies, múltiples versiones del gen ITS en el genoma, o la presencia de quimeras de secuencias de líquenes (Zúñiga et al., 2015; Mark y Cornejo y et al., 2016).

En Antártica, Kim et al. evaluaron la utilidad de la identificación de especies usando BLAST en una inspección florística en la Isla Rey Jorge (Kim et al., 2006). Sus resultados mostraron un éxito de identificación para menos del 50% de especies usando el código de barras; sin embargo, a diferencia del estudio llevado a cabo por Orock et al., la identificación tradicional si fue determinante de la especie para la mayoría de especímenes, reflejando que la diversidad estuvo mejor caracterizada en esta región (Kim et al., 2006; Orock et al., 2012). La poca coincidencia del código de barras de ADN con los métodos tradicionales para la identificación de especies en el estudio de Kim et al. (2006) fue reflejo del poco desarrollo de la base de datos de secuencias de ADN en ese momento. Por otro lado, recientemente se ha reconocido que la documentación inicial de la diversidad de líquenes en Antártica es errónea en varios casos (Halıcı et al., 2018), lo que también pudo haber contribuido a la discordancia entre las identificaciones por ambos métodos. Al respecto, Kim et al. emplearon las claves morfológicas e ilustraciones de Øvstedal y Smith (2001), pero una revisión taxonómica en la Isla James Ross incluyendo datos moleculares mostró discordancias para dos especies usando los caracteres morfológicos brindados por dichos autores (Halıcı et al., 2018).

Se ha sugerido el empleo de unidades taxonómicas operativas moleculares (MOTUs) delimitadas de manera objetiva (Orock et al., 2012). Los MOTUs, OTUs o filotipos son especies putativas delimitadas en base a métodos basados en ADN, las cuales pueden ser “graduadas” al sistema taxonómico formal una vez que se describen formalmente. Cuando estos filotipos son delimitados de manera objetiva y en un marco estadístico, pueden ofrecer una evidencia adicional para incrementar la robustez de

hipótesis de límites entre especies, corroborando la taxonomía tradicional. Por otro lado, si estos filotipos muestran relaciones filogenéticas discordantes con la delimitación mediante métodos tradicionales, levantan sospechas que deben ser investigadas con datos adicionales para encontrar nuevos caracteres de diagnóstico o descubrir especies crípticas (Goldstein y DeSalle, 2011; Lücking et al., 2021).

Pérez-Ortega et al. (2012) colectaron líquenes en un contexto florístico en Tierra Victoria, Antártica, e identificaron especies mediante caracteres fenotípicos. Adicionalmente, identificaron filotipos asociados a especies nombradas, para lo cual delimitaron grupos de líquenes usando el código de barras de ADN (Pérez-Ortega et al., 2012). Sus resultados mostraron la utilidad del establecimiento de un umbral de distancia genética como herramienta para estudios florísticos en líquenes, especialmente en casos donde cambios morfológicos por el ambiente pueden hacer imposible un diagnóstico tradicional preciso. A pesar de que hubo una correspondencia con las identificaciones por ambos métodos para la mayoría de especies, algunos grupos bien delimitados molecularmente no pudieron ser distinguidos usando caracteres fenotípicos estándar, mostrando la utilidad del enfoque basado en ADN para detectar linajes crípticos o semicrípticos comunes en Antártica (Pérez-Ortega et al., 2012).

La mayoría de los estudios de diversidad en líquenes han empleado el enfoque "taxonómico" descrito por Kelly et al. (2011), realizando un muestreo a fondo de una especie, género, familia o grupo para delimitar e identificar especies usando el código de barras de ADN (Del-Prado et al., 2010; Divakar et al., 2016; Ruprecht et al., 2012; Leavitt et al., 2016). Esta estrategia también es usada para estudiar la filogeografía de líquenes antárticos (Benavent, 2017). Por otro lado, se han empleado métodos más robustos de delimitación y validación estadística de especies putativas, en algunos casos usando enfoques integrativos (Alors et al., 2016; Boluda et al., 2019; Cornejo et al., 2018; Del-Prado et al., 2019; Divakar et al., 2016; Leavitt et al., 2015; Mark y Saag y et al., 2016; Widhelm et al., 2016). A pesar de la posibilidad de una discriminación más

exitosa en estudios de diversidad con enfoques florísticos, los inventarios florísticos para líquenes usualmente son poco confiables e incompletos, y se requiere una comparación crítica con regiones adyacentes y grupos taxonómicos cercanamente relacionados para evitar la detección de linajes “crípticos” o “nuevos” que son conocidos en otras regiones (Leavitt et al., 2014).

Algunos estudios empleando métodos basados en ADN para estudiar la diversidad de líquenes antárticos han usado otras regiones del cistrón de ADNr fúngico, incluso tras el establecimiento de la región ITS como código de barras fúngico (Schoch et al., 2012). Por ejemplo, el ADNr de la subunidad grande (LSU) se ha usado para análisis filogenéticos en la Isla Rey Jorge, y para la delimitación de especies en la Isla Decepción (Lee et al., 2008; Park et al., 2015; Zúñiga et al., 2015).

Zúñiga et al. (2015) estudiaron la diversidad del género *Peltigera* en Chile y en la Isla Decepción, Antártica, sin partir de una hipótesis de especies *a priori* (Zúñiga et al., 2015). En su trabajo, la delimitación de grupos se basó en la región LSU y resultó en 8 OTUs, 4 de los cuales fueron nombrados usando un criterio filogenético (>75% en *bootstrap* y >0.95 de probabilidad posterior con secuencias de referencia). Además, identificaron OTUs que no habían sido reportados previamente en las áreas de estudio, y un OTU que no estuvo relacionado a ninguna secuencia de la base de datos, por lo que podría representar una nueva especie. En suma, los resultados de su trabajo sugirieron que la diversidad de *Peltigera* en base a caracteres morfológicos podría ser una subestimación de la verdadera diversidad (Zúñiga et al., 2015).

Se han realizado otros esfuerzos para lograr una identificación de especies de líquenes, es decir, ligar especímenes desconocidos a nombres formales de especies determinadas. Gueidan et al. (2019) lograron recuperar secuencias ITS de tamaño completo de 85 especímenes de líquenes de un herbario en Australia empleando un método basado en secuenciación de amplicones por PacBio (Gueidan et al., 2019). Por otro lado, Kistenich et al. (2019) utilizaron un enfoque basado en PCR de dos pasos

seguida de secuenciación en un equipo Ion Torrent PGM para secuenciar la región de la subunidad pequeña mitocondrial (mtSSU) de ADN degradado de 54 especímenes de líquenes de colecciones históricas de hasta 150 años de antigüedad (Kistenich et al., 2019). Finalmente, se han propuesto métodos basados en meta-código de barras de ADN (DNA metabarcoding) para caracterizar la diversidad de hongos liquenizados en investigaciones de biomonitoreo, usando OTUs como *proxy* de diversidad de especies, demostrando su potencial como herramienta complementaria y objetiva para la creación de inventarios liquénicos (Wright et al., 2019).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

El empleo del código de barras de ADN permite una identificación efectiva y confiable de hongos liquenizados de la Isla Rey Jorge, Antártica.

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivo general

- Establecer una metodología estandarizada que permita evaluar la efectividad y confiabilidad de la identificación mediante código de barras de ADN de líquenes colectados en la Isla Rey Jorge, Antártica.

3.2.2. Objetivos específicos

- Estandarizar una metodología de obtención, purificación y amplificación de ADN de hongos liquenizados antárticos.
- Delimitar filotipos en base a la información genética de hongos liquenizados
- Evaluar la efectividad del código de barras de ADN para la identificación de especímenes de hongos liquenizados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Tipo y diseño de estudio

Etapa de estandarización de protocolos

Estudio analítico experimental de intervención, controlado para la estandarización de protocolos de procesamiento molecular.

Etapa de implementación

Estudio de sistematización de procesos de implementación de protocolos estandarizados para la obtención del marcador de código de barras de ADN fúngico ITS.

4.2. Población

Población

Hongos liquenizados de la vegetación liquénica en Antártica.

4.3. Muestra

Muestra

Especímenes de líquenes colectados en la Isla Rey Jorge - Antártica procesables para métodos moleculares.

4.4. Materiales

Insumos

- Materiales de escritorio (tijeras, lapiceras, cintas adhesivas)
- Guardapolvos, mascarillas quirúrgicas, guantes de nitrilo
- Papel de estraza o Kraft
- Tubos de plástico de 25 ml y 50 ml
- Microtubos de plástico de 0.6 ml, 1.5 ml y 2 ml
- Micropipetas y puntas de micropipetas de 10 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl
- Material de vidrio (probetas, matraces, vasos de precipitado)

- Instrumentos quirúrgicos (tijeras, pinzas, escalpelos)
- Racks de polipropileno
- Cajas térmicas

Equipos

- Refrigeradores y congeladores
- Balanza
- Microscopio estereoscópico
- Potenciómetro
- Microcentrífugas
- Agitador de perlas TissueLyser II
- Termobloque con agitación
- Espectrofotómetro
- Horno de microondas
- Fuente de poder
- Cámara de electroforesis horizontal
- Fotodocumentador
- Cabina de flujo laminar
- Termociclador
- Computadora portátil

4.5. Métodos de campo

La colecta fue realizada por el personal del Instituto Nacional de Investigación en Glaciares y Ecosistemas de Montaña (INAIGEM), quienes viajaron a Antártica en el marco del proyecto “Aporte social, económico y ambiental en la conservación y pérdida de la Biodiversidad marina por el retroceso glaciar en la Península Antártica”. Se recibieron muestras de líquenes de colectas de dos campañas científicas a Antártica, ANTAR XXVI (2019) y ANTAR XXVII (2020) (Anexo 1).

La metodología de colecta consistió en la identificación y caracterización del sitio de estudio, el establecimiento de 5 cuadrantes de 25 cm x 25 cm a lo largo de transectos de 25 metros, y la recolección de muestras en bolsas de papel. Las bolsas fueron colocadas en una caja térmica a temperatura ambiente hasta su traslado y procesamiento.

4.5.1. Área de estudio

En ambas campañas científicas, la colecta se realizó en varios puntos de la Isla Rey Jorge. Los sitios de muestreo se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1.- Ubicación y altitud de los puntos de muestreo de líquenes de las campañas peruanas científicas ANTAR XXVI (2019) y ANTAR XXVII (2020)

Campaña científica	Transecto	Coordenadas UTM	Lugar	Altitud (msnm)
ANTAR XXVI (2019)	T1	E 423285 3114669	Base Machupicchu	1
	T2	E 423207 3114663	Basse Machupicchu	2
	T3	E 422276 3114310	Glaciar Znosko	201
	T4	E 423650 3113438	Cerro Tumbes	25
	T5	E 423541 3113427	Cerro Tumbes	32
	T6	E 423061 3114490	Glaciar Znosko	41
	T7	E 423049 3114439	Glaciar Znosko	44
ANTAR XXVII (2020)	T1	E 423520 3106751	Base Henryk Arctowski	46
	T2	E 423575 3106751	Base Henryk Arctowski	41
	T3	E 423245 3114546	Base Machupicchu	21
	T4	E 423019 3114538	Base Machupicchu	38
	T5	E 425707 3116017	Base Comandante Ferraz	48
	T6	E 425916 3115499	Base Comandante Ferraz	53

4.5.2. Muestreo biológico

Se tomaron varias consideraciones para el muestreo en campo:

- Las muestras se extrajeron preferentemente con su sustrato, en bolsas de papel.

- Se recolectó más de una muestra para suplir posibles pérdidas o tener duplicados.
- No se recogieron muestras con sospecha de ser una especie rara y escasa.
- La recolección manual se hizo empleando guantes de nitrilo.
- Los materiales de recolección fueron lavados con agua destilada y alcohol.
- Las bolsas de muestras se colocaron temporalmente en un lugar con poca exposición solar.
- Las muestras se almacenaron en un lugar limpio, seco y oscuro en el laboratorio de la estación Macchu Picchu en Antártica, hasta su traslado y procesamiento en la Unidad de Genómica de la Universidad Peruana Cayetano Heredia que formó parte del proyecto como entidad asociada.

4.6. Métodos de laboratorio

Preparación de muestras para biología molecular

Las muestras contenidas en bolsas de colecta codificadas según el transecto y cuadrante del sitio de muestreo fueron revisadas para su separación en bolsas de papel individuales. Las bolsas individuales fueron enumeradas en orden creciente. Se agregó una letra a la codificación para diferenciar bolsas individuales conteniendo especímenes provenientes de una misma bolsa de colecta (por ejemplo; 24A, 24B). En algunos casos no fue posible la separación de dos o más especímenes, por lo que se usó una misma bolsa individual.

Se realizó una esterilización de la superficie de líquenes mediante lavados secuenciales de entre 5 y 10 segundos en etanol al 95%, hipoclorito de sodio al 0.5%, y etanol al 70%. Luego, las muestras fueron secadas empleando aire seco en condiciones estériles.

Se examinó la morfología de cada una de las muestras bajo un microscopio estereoscópico, y se registró una identificación preliminar o descripción en una base

de datos. Luego, se recogió un fragmento pequeño del talo liquénico de todas las muestras usando tijeras y pinzas. Las muestras de líquenes crustosos adheridos a un sustrato (rocas o briófitos) fueron recuperadas mediante un raspado. Todas las muestras fueron pesadas en una balanza y almacenadas en microtubos de 2 ml a 4 °C. Se recolectó un máximo de 100 mg para especímenes abundantes. Se agregó un número a la codificación de los tubos para diferenciar los fragmentos de líquenes distintos provenientes de una misma bolsa individual (por ejemplo; 10E1, 10E2).

Identificación taxonómica mediante caracteres fenotípicos

Se seleccionaron 20 muestras para la identificación mediante caracteres fenotípicos. Los especímenes enteros fueron envueltos en papel toalla y colocados en bolsas de papel rotuladas con el código y una descripción. Estas fueron enviadas al Herbario Sur Peruano (HSP) en Arequipa, el cual es administrado por el Instituto Científico Michael Owen Dillon (IMOD), para su identificación mediante métodos tradicionales que incluyen la evaluación morfológica y química de las muestras.

Estandarización de un método de aislamiento y purificación de ADN genómico

Para la estandarización de la extracción de ADN se probaron diferentes protocolos en un grupo de muestras de talo liquénico. En todos los casos se realizó primero una molienda del tejido usando el agitador de perlas TissueLyser II, con excepción de dos muestras en la primera evaluación para las cuales se emplearon micromorteros de plástico. Para el uso del TissueLyser II, se adicionó una perla de acero y una pequeña porción de perlas de vidrio (aproximadamente una tercera parte del volumen ocupado por el tejido) al tubo de 2 ml conteniendo la muestra. Los tubos cerrados fueron sumergidos en nitrógeno líquido por alrededor de 5 minutos, antes de ser colocados en el agitador de perlas configurado a una frecuencia de 30 s^{-1} por 45 segundos. Este ciclo de enfriamiento y agitación fue repetido tres veces hasta notar la transición de las muestras a un polvo fino. El número de ciclos fue el doble para muestras duras y persistentes. Se realizó una centrifugación breve para mover

el tejido reducido al fondo del tubo. El procesamiento subsecuente se realizó según las indicaciones de los protocolos evaluados.

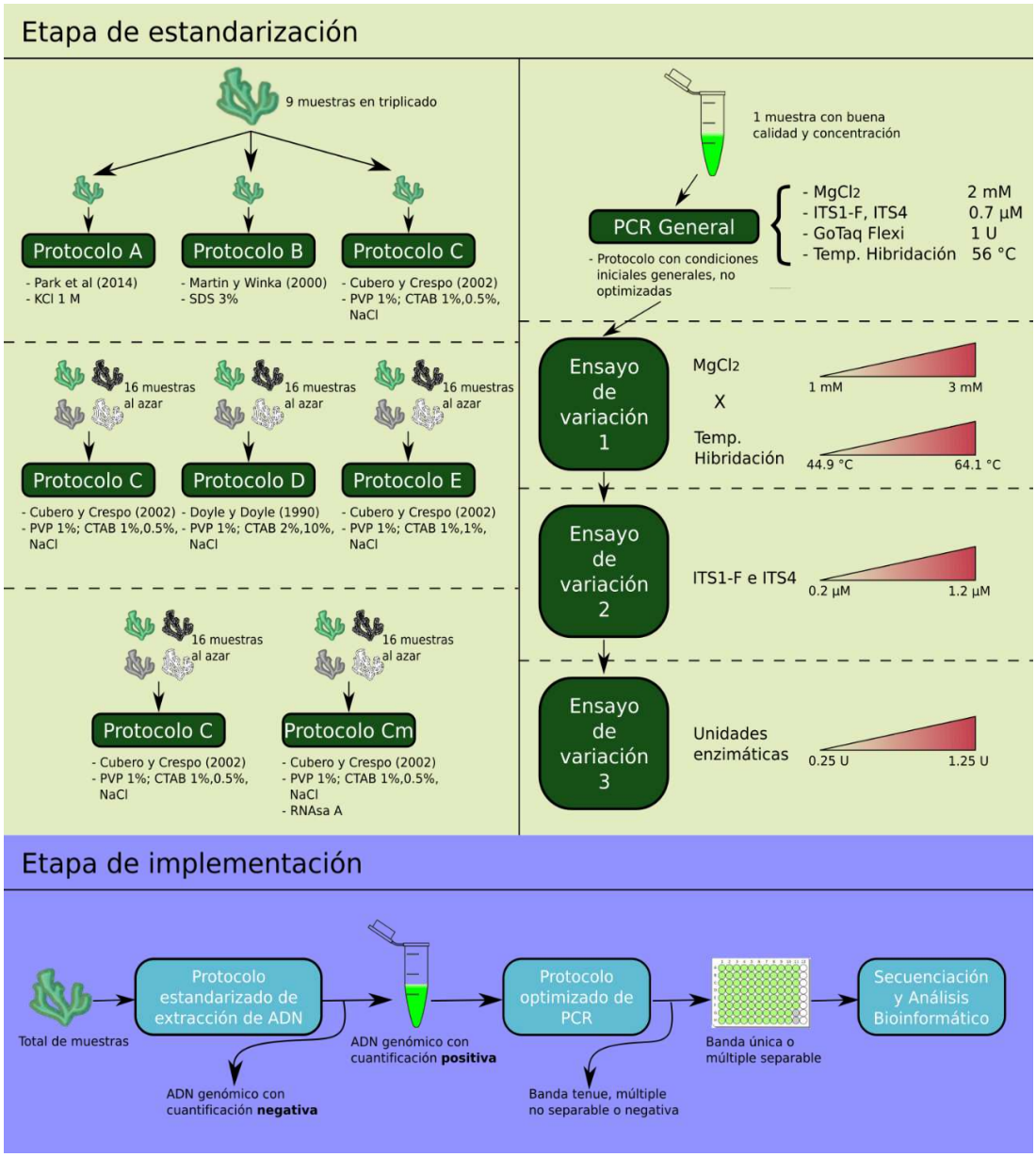


Figura 2. Resumen gráfico de la estandarización e implementación de métodos de procesamiento molecular para la obtención del marcador de código de barras fúngico ITS a partir de líquenes antárticos.

Se muestra un resumen gráfico de la metodología en la Figura 2. Inicialmente se evaluaron tres métodos de extracción de ADN para líquenes usando un grupo de nueve muestras que abarcaron casi toda la variación morfológica del total de

muestras. Cada muestra fue recogida por triplicado con el fin de realizar la extracción de ADN con cada uno de los protocolos. (A) El protocolo descrito por Park et al. (2014) consistió en la adición de solución tampón con KCl (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, KCl 1 M), separación de una fase orgánica usando cloroformo, y precipitación de la fase acuosa con isopropanol. Luego, se realizó una resuspensión del pellet en solución tampón TE 10:1 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM). (B) El protocolo de Martín y Winka (2000) modificado consistió en la adición de solución tampón (Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM) y SDS 3%, separación de la fase orgánica con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) dos o tres veces, precipitación del ADN con etanol absoluto, y lavado con etanol al 70%. El pellet se resuspendió en agua ultrapura. (C) El protocolo descrito por Cubero y Crespo (2002) incluyó la adición de solución tampón de CTAB (Tris-HCl 100 mM, EDTA 30 mM, NaCl 1 M, CTAB 1% w/v, PVP 1% w/v), separación de la fase orgánica usando cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), precipitación con dos volúmenes de solución tampón de precipitación CTAB (NaCl 40 mM, CTAB 0.5% w/v), resuspensión en NaCl 1.2 M precalentado, una separación adicional de fases acuosa y orgánica con cloroformo, y precipitación con isopropanol frío. El pellet de ADN fue lavado con etanol al 70% y resuspendido en solución tampón TE (Tris-HCl 1 mM, EDTA 0.1 mM). Todas las soluciones se prepararon en un ambiente estéril, usando reactivos con el pH ajustado según lo indicado por cada protocolo. Para evitar contaminaciones se separaron volúmenes de cada reactivo a partir de las soluciones de reserva (stock), que se emplearon como soluciones de trabajo.

Posteriormente se evaluaron dos variaciones adicionales fundamentadas en el uso del compuesto químico CTAB (Figura 2). Se comparó la efectividad de cada protocolo usando dos estrategias. Primero, cuatro muestras fueron recogidas por triplicado y cada réplica fue procesada con un protocolo distinto. Segundo, cada protocolo fue aplicado a un grupo distinto de 16 muestras independientes seleccionadas al azar. En todos los casos la molienda del tejido se realizó usando el

agitador de perlas TissueLyser II como se indicó previamente. (D) El protocolo descrito por Doyle y Doyle (1990) para la extracción de ADN a partir de tejidos vegetales consistió en la adición de solución tampón CTAB (Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, CTAB 2% w/v, PVP 1% w/v) y β-mercaptoetanol, separación de la fase orgánica con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), adición de solución tampón CTAB 10% (Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 0.7 M, CTAB 10%), una nueva separación de fases con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), precipitación del ADN con isopropanol frío, y lavados sucesivos con etanol al 70% y al 90%. El pellet fue resuspendido con solución tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM). (E) El protocolo de Cubero y Crespo (2002) se usó como se indicó previamente (protocolo C), pero empleando una solución tampón de precipitación CTAB distinta (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, NaCl 40 mM, CTAB 1% w/v) para el paso de precipitación.

Se evaluó el efecto en la calidad del ADN genómico de un paso intermedio con ARNasa, aplicada a un grupo de 16 muestras seleccionadas al azar (Figura 2). Siguiendo el protocolo descrito por Cubero y Crespo (2002) (C), después de la resuspensión del pellet en NaCl 1.2M precalentado, se agregó 2 µl de ARNasa A libre de ADNasa (10 mg/ml) y se dejó incubando en un termobloque a 37 °C durante 60 minutos. El procesamiento posterior de separación de fases, precipitación, lavado y resuspensión fue el mismo según se indica en el protocolo.

Todas las resuspensiones de pellet, de ahora en adelante referidas como muestras de ADN, fueron evaluadas empleando tres métodos indicadores. En primer lugar, se midió la concentración y pureza (cociente de absorbancias a 260 nm y 280 nm) en un espectrofotómetro de microvolúmenes Nanodrop™. Cada medición se hizo por duplicado usando 2 µl de muestra de ADN homogenizado. Por otro lado, se hizo una evaluación cualitativa del nivel de integridad o fragmentación de las muestras de ADN mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Para la corrida se estableció una diferencia de potencial eléctrico constante de 100 V durante 45 a 60

minutos. Las muestras de ADN teñidas con el colorante GelRed™ fueron visualizadas usando un fotodocumentador acoplado a un transiluminador de luz ultravioleta. Finalmente, las muestras de ADN se usaron como molde para una amplificación de la region ITS por PCR usando un protocolo general. Esta PCR se realizó usando cebadores dirigidos a la región ITS de hongos, ITS1-F (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) (Gardes y Bruns, 1993) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990). Se usaron las condiciones mostradas en el cuadro 2 en un volumen final de 25 µl, y el programa del termociclador fue configurado como se muestra en la Figura 3. Se usaron muestras de ADN conocido y agua destilada como control positivo y negativo, respectivamente. Los resultados de esta amplificación (amplicones) se visualizaron en un gel de agarosa al 2% en electroforesis del mismo modo que se explicó anteriormente para muestras de ADN genómico. Se usó el marcador de peso molecular GeneRuler 100bp para calcular la longitud en pares de base de cada amplicón. Se juzgó el éxito de la amplificación según la presencia/ausencia e intensidad de una o más bandas.

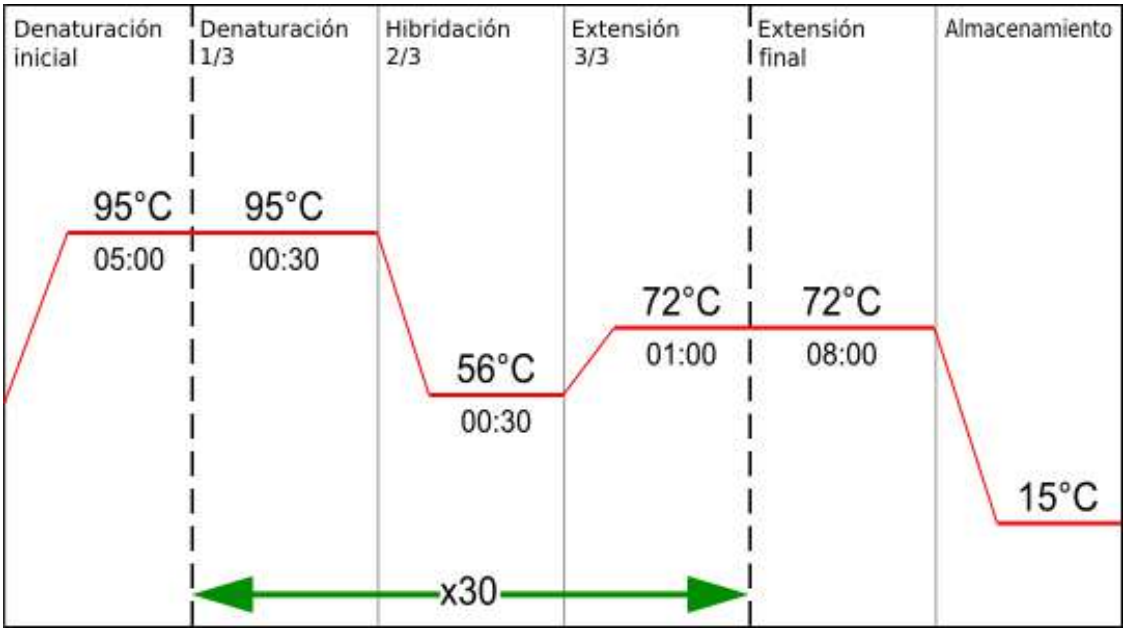


Figura 3. Configuración del programa de amplificación en el termociclador.

Cuadro 2.- Concentraciones de los reactivos del protocolo general de PCR para la evaluación del éxito de amplificación de los protocolos de extracción de ADN.

Reactivo	Concentración o cantidad final
5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer	1 X
dNTPs	0.2 mM
$MgCl_2$	2 mM
Cebador ITS1-F	0.7 µM
Cebador ITS4	0.7 µM
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	1 U
ADN molde	50 ng

Optimización de los parámetros de la PCR

Se realizó la optimización de los parámetros de amplificación de hongos liquenizados antárticos usando una muestra de ADN obtenida mediante el protocolo de extracción previamente estandarizado (Figura 2). Se realizaron ensayos secuenciales de variación de parámetros, iniciando con el protocolo general (Cuadro 2, Figura 3) en un volumen final de 25 µl. Se usó el marcador de peso molecular GeneRuler 100bp y agua como control negativo. En cada ensayo, los amplicones fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 2%, y se evaluó la presencia/ausencia de bandas y/o productos inespecíficos, así como la intensidad de banda.

Primero, se realizó un ensayo de variación de la concentración de $MgCl_2$ (1 mM a 3 mM), y temperatura de hibridación (44.9 °C a 64.1 °C) en paralelo (Cuadro 3, Figura 2). Los otros reactivos y temperaturas, y la cantidad de ADN inicial permanecieron constantes en los valores indicados en el protocolo general (Cuadro 2, Figura 3). Se conservó la combinación de concentración de $MgCl_2$ y temperatura de hibridación óptima en los ensayos de PCR posteriores.

Se realizó un ensayo de variación de los cebadores ITS1-F e ITS4 (0.2 µM a 1.2 µM, Cuadro 3). Todos los otros parámetros permanecieron constantes. Los otros reactivos fueron agregados según se indica en el Cuadro 2, con excepción de $MgCl_2$. De igual manera, la configuración del programa siguió el esquema de la Figura 3, con

excepción de la temperatura de hibridación. La cantidad de ADN inicial permaneció constante para cada punto de variación. Se usó la concentración de cebadores con el mejor resultado en el siguiente ensayo de PCR.

Finalmente, se realizó un ensayo de variación de la cantidad de enzima GoTaq® Flexi DNA Polimerasa (0.25 U a 1.25 U) (Cuadro 3, Figura 2). Todos los otros reactivos fueron constantes para cada punto de variación. La solución tampón Flexi y los dNTPs se agregaron siguiendo el protocolo general (Cuadro 2). Los otros reactivos se agregaron según los resultados de los ensayos de PCR previos. Se usó el programa mostrado en la Figura 3, excepto para la temperatura de hibridación, donde se usó el valor óptimo encontrado con el primer ensayo de PCR. La cantidad de ADN inicial fue constante. Del mismo modo que en los ensayos previos, se usó la cantidad de enzima con mejores resultados para el protocolo optimizado.

Cuadro 3.- Puntos de variación para cada ensayo durante la optimización de los parámetros de PCR.

Concentración de $MgCl_2$										
1 mM				2 mM				3 mM		
Temperatura de hibridación										
44.9°C	45.3°C	46.6°C	48.5°C	50.8°C	53.4°C	56.1°C	58.7°C	61.1°C	63.1°C	64.1°C
Concentración de cebadores										
0.2 µM	0.3 µM	0.4 µM	0.5 µM	0.6 µM	0.7 µM	0.8 µM	0.9 µM	1 µM	1.1 µM	1.2 µM
Cantidad de unidades enzimáticas										
0.25 U		0.5 U		0.75 U		1 U		1.25 U		

Aplicación y evaluación de las metodologías estandarizadas

Se usó el protocolo estandarizado de extracción de ADN (Anexo 2) y el protocolo optimizado de PCR (Anexo 3) para el procesamiento de todas las muestras de hongos liquenizados (Figura 2). Las muestras fueron separadas en grupos de 40, las cuales fueron procesadas en paralelo. Para cada grupo se usaron soluciones de trabajo distintas con el fin de reducir el riesgo de contaminación cruzada. Las

muestras de ADN genómico fueron cuantificadas y clasificadas según su concentración y pureza (Cuadro 4) antes de ser almacenadas a 4 °C. Las muestras con resultados negativos y con material adicional disponible fueron procesadas nuevamente para obtener ADN y reclasificadas según los resultados. Todas las muestras mantuvieron la misma codificación a fin de evitar errores de etiquetado. En todos los casos se trabajó en un ambiente estéril y bajo condiciones asépticas.

Cuadro 4.- Clasificación de las muestras de ADN genómico según los resultados de cuantificación.

Clasificación	Descripción
A (Aceptable)	- Concentración > 5.0 ng/µl Y calidad entre 1.7 – 2.0
I (Intermedia)	- Concentración entre 0.5 – 5.0 ng/µl Y calidad > 1.3 - Concentración > 5.0 ng/µl Y calidad entre 1.3 – 1.7 o > 2.0
N (Negativa)	- Concentración < 0.5 ng/µl - Calidad < 1.3

Las muestras de ADN con parámetros de cuantificación positivos fueron sometidas una amplificación por PCR del marcador ITS fúngico con los cebadores ITS1-F e ITS4, usando un protocolo optimizado (Anexo 3). Las amplificaciones se realizaron en grupos separados de 36 muestras usando placas de PCR o tiras de microtubos. En cada caso se usó un control positivo y negativo. Se buscó mantener una cantidad de ADN inicial por reacción de 50 ng, por lo que se realizaron diluciones de las muestras con concentraciones superiores a 100 ng/µl. Por otro lado, para muestras con una concentración igual o por debajo de 12.5 ng/µl, se agregó 4 µl de ADN genómico a la reacción. Los resultados fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%, y se clasificaron según su patrón de corrida (Cuadro 5). Se usó el marcador de peso molecular GeneRuler 100bp para estimar la longitud de los amplicones en pares de bases. Las muestras con bandas tenues fueron repetidas usando una mayor cantidad de ADN inicial, y reclasificadas según los nuevos resultados. Todos los geles de productos de PCR fueron fotografiados y analizados usando la misma codificación de las muestras. Las preparaciones de reactivos para las amplificaciones

en cada grupo se realizaron en una cabina de flujo laminar estéril, limpia y expuesta a luz ultravioleta por tres minutos previo a cada procesamiento.

Cuadro 5.- Clasificación de los amplicones según los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 2%

Clasificación	Descripción
U (Única)	Banda única y visible
MS (Múltiple separable)	Más de una banda, separadas
MNS (Múltiple no separable)	Más de una banda, cercanas o sobrepuestas
T (Tenue)	Banda única y tenue
N (Negativo)	Sin amplificación

Los amplicones fueron purificados empleando el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. La purificación se realizó según la clasificación del patrón de corrida mostrada en el Cuadro 5. Para los amplicones con bandas únicas se usó directamente el volumen contenido en cada pocillo de placa de PCR o microtubo de 0.2 ml. Por otro lado, para los amplicones con bandas múltiples separables, se usaron cortes de gel de agarosa conteniendo un solo amplicón. Para esto, se repitió la amplificación con el mismo volumen de 25 µl y se cargó todo el volumen combinado de ambas reacciones en un gel de agarosa de 2%, usando un molde y cámara más grandes de modo que pueda permitir una correcta separación de las bandas. La fuente de poder se configuró para establecer una diferencia de potencial eléctrico constante de 150 V durante 3 a 4 horas. Con el fin de conocer la naturaleza de los productos inespecíficos, se extrajeron y purificaron todas las bandas separables a lo largo del carril de corrida electroforética para la mitad de las muestras con bandas múltiples.

Finalmente, los amplicones purificados en columna fueron eluidos en 20 µl agua de grado de biología molecular y ordenados en dos placas de PCR de 96 pocillos. Estas fueron enviadas a un laboratorio externo para la secuenciación en dos

direcciones mediante el método de secuenciación de Sanger por electroforesis capilar (Figura 2).

4.7. Análisis bioinformáticos

Visualización y edición de secuencias

Se revisó cada uno de los electroferogramas resultantes de la secuenciación de Sanger usando el software Sequencher. Se descartaron aquellas corridas que no tuvieron lecturas y los que mostraron artefactos de secuenciación, como ruido significativo, o picos dobles y múltiples. Para todas las secuencias, se cortaron los extremos con lecturas ambiguas en el electroferograma.

Dado que la secuenciación fue bidireccional, se generó la secuencia consenso de aquellas muestras con secuenciación exitosa en ambas direcciones. Se volvieron a examinar los electroferogramas para casos en los que se detectó una diferencia en el llamado de bases al comparar las secuencias en ambas direcciones.

Evaluación de identidad de secuencias

Las secuencias consenso y unidireccionales fueron sometidas a una búsqueda de similitud con la base de datos de secuencias nucleotídicas GenBank del repositorio biológico NCBI, usando el algoritmo nblast de la herramienta BLAST. La configuración de los parámetros de búsqueda fue la predeterminada. Se registraron las coincidencias (*match*) con mayor puntaje, así como el porcentaje de cobertura e identidad de alineamiento. Asimismo, para cada secuencia se registraron otras coincidencias que tuvieran un puntaje igual o cercano al principal. Las secuencias asociadas a hongos no liquenizados fueron descartadas de los análisis posteriores.

Todas las secuencias asociadas en BLAST a la misma especie o género en Genbank fueron alineadas con el algoritmo Muscle (Madeira et al., 2019) para encontrar variantes y/o errores de lectura. En el caso de secuencias asociadas en BLAST a especies poco frecuentes (secuencias huérfanas), se incluyeron

secuencias públicas de la base de datos UNITE en el alineamiento (Kõljalg et al., 2020). Para encontrar el grupo de secuencias en UNITE más cercana a la secuencia huérfana (hipótesis de especie), se usó la herramienta de análisis simple massBLASTer. Cada alineamiento fue visualizado usando ClustalX2 para confirmar las variaciones de nucleótidos en los electroferogramas (Larkin et al., 2007). Para los casos en los que se corrigió la secuencia, se repitió el alineamiento y la búsqueda mediante BLAST, registrando los nuevos porcentajes de cobertura e identidad.

Análisis filogenéticos

Los datos se agruparon en dos. El conjunto de datos corto incluyó solo las secuencias consenso de las muestras con ambas direcciones secuenciadas exitosamente. Por otro lado, el conjunto de datos largo incluyó el conjunto de datos corto y además, las secuencias unidireccionales; es decir, aquellas muestras en las que solo se logró secuenciar una de las direcciones. Esta agrupación permitió evaluar el efecto de la inclusión de secuencias unidireccionales en los análisis posteriores.

Se realizó un alineamiento para cada conjunto de datos usando el software MAFFT (Katoh et al., 2019). Se usó el método de refinamiento iterativo E-INS-i, el cual es indicado para alineamientos complejos con motivos conservados separados por muchos gaps. Luego, se extrajeron las regiones del alineamiento menos ambiguas usando el software GBlocks, configurado para aceptar hasta la mitad de secuencias con gaps por sitio, un mínimo del 50% + 1 secuencias para una posición flanqueante, un mínimo de longitud de bloques de 3 pares de base, y un máximo de posiciones contiguas no conservadas de 18 (Castresana, 2000). Los alineamientos resultantes fueron visualizados en ClustalX2 a fin de remover secuencias con una alta cantidad de gaps en alguno de los extremos.

Por otro lado, el alineamiento resultante fue usado como archivo de entrada en el software jModelTest2 para la evaluación de distintos modelos de sustitución nucleotídica (Darriba et al., 2012; Guindon y Gascuel, 2003). Usando el criterio de

información de Akaike corregido (AICc), se seleccionó el modelo de transición con proporción de sitios invariables y distribución gamma (TIM1+I+G) para el conjunto de datos corto; y el modelo de Tamura-Nei con distribución gamma (TrN+G) para el conjunto de datos largo (Hurvich y Tsai, 1989; Tamura y Nei, 1993). Se llevó a cabo un análisis de máxima verosimilitud usando el software PAUP, con los modelos de sustitución previamente indicados, y un análisis de *bootstrap* con 500 réplicas limitando el número de rearreglos durante la búsqueda heurística a 1000. Los árboles fueron visualizados usando el software FigTree.

Finalmente, se usó BEAST 2 para generar un árbol ultramétrico de los dos conjuntos de datos (Bouckaert et al., 2014). Se usó el modelo de sustitución de Tamura Nei, asumiendo un reloj relajado log-normal no correlacionado con una tasa media de reloj fija en 1.0. El árbol prior fue ajustado al modelo de proceso de especiación de Yule (Pérez-Ortega et al., 2012). Se realizaron cinco corridas independientes de 20 millones de generaciones, muestreando cada 2000 pasos. Se usó Log-Combiner para combinar los resultados de registro y árboles de cada corrida independiente, removiendo los primeros 2 millones de pasos. Tras examinar las corridas en Tracer (Rambaut et al., 2018) y verificar la estabilidad de los parámetros de interés, se usó TreeAnotator para generar un árbol único, removiendo los primeros 5000 árboles.

Análisis de discriminación filotípica

Se usaron diferentes estrategias para la delimitación de grupos correspondientes a filotipos. Primero, se usó el software Mothur (Schloss et al., 2009) para calcular distancias en pares, configurando los parámetros para otorgar un puntaje de 1 y -3 para los *match* y *mismatch*, respectivamente, e ignorar la penalización por gaps en los extremos. La matriz de distancias generada se usó para agrupar las secuencias en *clusters* en base a distintos umbrales entre 0.5% y 5% usando el comando “cluster.split”. Luego, se usó el software ABGD (Puillandre et al., 2012) para la

asignación de especies putativas en base a distancias genéticas usando un marcador de código de barras. El rango de valores previos para la divergencia intraespecífica máxima *P* se mantuvo en los valores predeterminados (0.001, 0.1), y se establecieron dos valores para el *barcode gap* relativo mínimo X, 1.0 y 1.5. Se compararon los resultados usando una matriz inicial de distancias corregidas JC y K2P.

Se realizaron delimitaciones de especies con métodos basados en árboles usando un único locus. En primer lugar, el árbol ultramétrico generado previamente fue leído y modificado usando el paquete de R 'ape'. Se usaron los métodos de umbral único y múltiple de GMYC (Fujisawa y Barraclough, 2013) implementados en el paquete de R 'splits'. Finalmente, se emplearon los árboles ML para el método de delimitación de especies PTP con umbral múltiple (mPTP) bajo máxima verosimilitud (Kapli et al., 2017). Se verificó la significancia estadística de los resultados mediante la combinación de dos corridas MCMC independientes con 50 millones de pasos cada una.

Se realizó la separación de filotipos tomando en cuenta los resultados de todos los métodos de delimitación en conjunto. Dado que se agregaron secuencias públicas para muestras únicas, solo se consideraron los filotipos que incluyeron al menos una secuencia del presente trabajo.

Evaluación de la identificación mediante código de barras de ADN

Para la evaluación de la eficacia de la identificación de especímenes mediante código de barras de ADN se usaron dos estrategias. Primero, se usó el paquete de R 'spider' (Brown et al., 2012), el cual tiene funciones que permiten probar la eficacia del código de barras de ADN. Para esto, cada secuencia fue asignada al filotipo previamente determinado. Durante la evaluación, se toma una secuencia y se considera como desconocida, mientras que el resto se considera como una base de datos con identificación conocida. Si la identificación de la prueba es la misma que la asignada previamente, se considera como un resultado correcto. Se emplearon los

análisis de vecino cercano (*nearNeighbour*), mejor coincidencia cercana (*bestCloseMatch*), y un análisis basado en un umbral establecido (*threshID*).

El análisis de vecino cercano consiste en encontrar el individuo más cercano en cuanto a distancias genéticas y considerar su nombre de identificación. Se reporta el número de secuencias para las cuales el nombre de la prueba y el identificado con anterioridad fueron los mismos.

El análisis de mejor coincidencia cercana se realiza siguiendo el criterio indicado por Meier et al. (2006). Este considera al individuo más cercano a menos que se encuentre fuera del umbral establecido. Cuando se encuentran cercanos más de un filotipo, la identificación se considera ambigua. Por otro lado, el análisis basado en el establecimiento de un umbral es similar al realizado por la herramienta de identificación de especímenes de BOLD. En este análisis, se consideran todas las secuencias dentro del umbral dado.

Dado que, para el análisis de mejor coincidencia cercana y el basado en un umbral se requiere indicar un valor umbral, se usaron dos valores. El primero se identificó al realizar un gráfico de densidades de distancias genéticas en pares con la herramienta *localMinima*. Se consideró el primer mínimo local, el cual representa la transición entre las distancias intraespecíficas e interespecíficas. Por otro lado, se evaluaron las tasas de resultados falsos positivos y falsos negativos a través de un rango de umbrales con la herramienta *threshOpt.* Se usó el valor o promedio del rango de valores que minimizaron las tasas de identificaciones erróneas.

Finalmente, la segunda estrategia de evaluación de la identificación molecular consistió en la comparación de los resultados de la identificación fenotípica y molecular para un subgrupo de muestras. Para la identificación molecular se consideraron los porcentajes de cobertura e identidad del análisis de similitud BLAST, así como el filotipo determinado mediante los análisis de determinación filotípica.

5. RESULTADOS

5.1. Muestras analizadas

Se prepararon 305 muestras de líquenes antárticos de la Isla Rey Jorge para el procesamiento molecular. Entre estas, 122 correspondieron a colectas durante la campaña del 2019, y 183 a la campaña del 2020.

El examen de las muestras permitió tener una descripción preliminar y clasificar los líquenes según su tipo (Cuadro 6, Anexo 4). Se observaron 139 líquenes de tipo crustoso, 137 fruticosos, y 14 foliosos. Los líquenes crustosos mostraron la mayor diversidad en cuanto a coloración y tamaño, siendo la mayoría complicados de identificar a primera vista, por lo que varios fueron descritos solo por su color (79 muestras). Los líquenes crustosos de la especie identificada como *Placopsis antarctica* (37 muestras) fueron fácilmente reconocibles por la peculiar morfología de su talo con lóbulos claros radiando fuera de un cefalodio central más oscuro (Weiss y Orekhova, 2020). Cinco muestras fueron descritas como similares a *Rhizoplaca* por mostrar un talo con placas de color claro fusionadas (Spielmann y Pereira, 2012). Cinco muestras mostraron apotecios irregulares oscuros sobre un talo pequeño, dando la apariencia de ser apotecios sueltos adheridos entre sí y sobre un musgo. Esta descripción coincidió con *Psoroma hypnorum*, sin embargo, en vista de que se han descrito otras especies similares dentro del género con distribución en Antártica (Park et al., 2018), la identificación preliminar fue solo hasta el nivel de género. Se describieron otros géneros de líquenes crustosos fácilmente distinguibles en menor frecuencia, como *Rhizocarpon* (3 muestras), cuya morfología distintiva del talo incluye un protalo negro con areolas amarillas y apotecios negros; y *Candelariella* (1 muestra), cuyo talo consta de varias areolas amarillas que parecen desprenderse del sustrato (Spielmann y Pereira, 2012). Otras muestras no pudieron ser identificadas con precisión, pero mostraron características similares entre sí. En varias muestras se encontraron botones pequeños negros sobre talos crustosos que podrían corresponder a hongos no liquenizados, por

lo que fueron separados de la muestra principal; sin embargo, en algunos sustratos rocosos estos botones se encontraron solos. Dado que se han reportado especies de líquenes crustosos microscópicos con este tipo de morfología, como el género *Buellia* y *Rinodina* (Lamb, 1968), se prepararon 5 muestras que fueron descritas como similares a botones negros pequeños. Por otro lado, 4 muestras crustosas se describieron como similares a *Stereocaulon* sp. por tener un talo con apariencia de nieve de coloración blanca a rosa adherida a rocas.

Cuadro 6.- Características de las muestras de líquenes empleadas en este trabajo

Tipo	Descripción	Número de muestras	Porcentaje
Crustoso	Crustoso blanco, amarillo, naranja, marrón o negro	79	25.9
	Placopsis antarctica	37	12.2
	Psoroma	5	1.6
	Similares a botones negros pequeños	5	1.6
	Similar a *Rhizoplaca*	5	1.6
	Similar a *Stereocaulon* sp.	4	1.3
	Rhizocarpon	3	1
	Candelariella	1	0.3
Fruticoso	Similar a *Stereocaulon* sp.	71	23.3
	Usnea sp.	66	21.7
Folioso	*Umbilicaria* sp.	13	4.3
	Xanthoria elegans	1	0.3
Otro	Raspado de manchas de color blanco, verde o gris sobre roca	11	3.6
	Fragmentos de liquen no reconocibles	4	1.3

Casi la mitad de los especímenes de tipo fruticoso correspondieron a especies del género *Usnea* (66 muestras). Estos tienen un talo verdoso ramificado fácilmente identificable; sin embargo, las especies pares *U. aurantiacoatra* y *U. antarctica* se diferencian solo por la estrategia reproductiva, con *U. aurantiacoatra* típicamente presentando apotecios (Lagostina et al., 2018). Dado que se encontraron especímenes jóvenes y fragmentos pequeños, todas estas muestras fueron descritas como un mismo grupo hasta el nivel de género. Por otro lado, varias muestras que no pudieron ser identificadas fueron agrupadas bajo una misma descripción como similares a

Stereocaulon sp. (71 muestras), por encontrarse elevadas sobre la cubierta de briofitas a modo de nieve (Spielmann y Pereira, 2012). Para algunas muestras en este grupo la coloración del talo fue gris, y en algunos casos, el arreglo sobre el sustrato fue más laxo.

Casi todos los líquenes foliosos fueron fácilmente reconocidos como pertenecientes al género *Umbilicaria* (13 muestras), pero no se logró realizar una descripción hasta el nivel de especies. El único liquen folioso identificado como *Xanthoria elegans*, fue fácilmente reconocible por su talo con pigmentación naranja brillante (Spielmann y Pereira, 2012). Esta muestra podría confundirse como de tipo crustoso, pues el liquen se encuentra estrechamente asociado con el sustrato.

Finalmente, se recogieron 11 raspados de diferentes coloraciones sobre rocas, con el fin de recuperar posibles líquenes endolíticos o bastante adheridos al sustrato. También se recuperaron 4 fragmentos pequeños que corresponden a líquenes no identificables. Estas muestras fueron incluidas con las demás y no se trataron de manera particular.

5.2. Estandarización de métodos de extracción de ácidos nucleicos

El grupo de 9 muestras usado para evaluar los tres protocolos de extracción de ácidos nucleicos se muestra en el Cuadro 7. Este grupo fue seleccionado de tal manera que capturó la mayor parte de la variación de tipo y morfología del total de muestras.

Cuadro 7.- Muestras usadas para la evaluación de protocolos inicial en el proceso de estandarización de extracción de ADN

Muestra*	**Descripción**	**Peso†**
E1	Talo de liquen fruticoso grande *Usnea* sp.	33.2 mg
E2	Talo blanco de liquen fruticoso similar a *Stereocaulon* sp.	24 mg
E3	Talo de liquen fruticoso pequeño *Usnea* sp.	21.2 mg
E4	Talo de liquen folioso *Umbilicaria* sp.	18.8 mg
E5	Talo de liquen crustoso *Placopsis antarctica*	8 mg
E6	Talo de liquen amarillo crustoso similar a *Rhizoplaca* sp	25 mg
E7	Estructura base de liquen amarillo crustoso similar a *Rhizoplaca* sp	18.8 mg
E8	Talo blanco de liquen fruticoso similar a *Stereocaulon* sp. (=E2)	19.8 mg
E9	Talo de liquen fruticoso *Usnea* sp. (=E3)	25.3 mg

*Cada muestra se preparó por triplicado. †Los pesos de las réplicas fueron cercanos al valor promedio mostrado para cada muestra.

La cuantificación de las muestras permitió comparar la concentración y calidad del ADN genómico obtenido mediante los distintos protocolos (Cuadro 8). En general, las concentraciones de las muestras extraídas con el protocolo A y B fueron altas, en comparación con las concentraciones bajas obtenidas con el protocolo C. Con respecto a la calidad, el protocolo A tuvo los mejores resultados en comparación con el protocolo B, que resultó en calidades más variables y alejadas del rango óptimo (1.7 – 2.0), y el protocolo C, donde las calidades fueron consistentemente superiores a 2, lo cual podría indicar la presencia de una cantidad considerable de ARN. Las muestras E1 y E3 correspondientes a *Usnea* sp. mostraron rendir una mayor cantidad de ADN con el protocolo B, pero con calidades por encima del rango óptimo. Las muestras E4 y E5, correspondientes a talos de *Umbilicaria* sp. y *P. antarctica*, respectivamente, rindieron un ADN genómico de buena calidad solo con el protocolo A. Por otro lado, las muestras E6 y E7, diferentes partes del liquen crustoso amarillo similar a *Rhizoplaca* sp., solo rindieron un ADN de buena calidad usando el protocolo B. Solo la muestra E2, similar a *Stereocaulon* sp. molida con un agitador TissueLyser, produjo un ADN de concentración similar y buena calidad tanto con el protocolo A como el protocolo B (Cuadro 8).

Cuadro 8.- Resultados de cuantificación de muestras de ADN genómico procesadas mediante distintos protocolos para la estandarización de la extracción de ADN.

Muestra*	Protocolo A		Protocolo B		Protocolo C	
	Conc.	A/A	Conc.	A/A	Conc.	A/A
E1	141.8	1.72	368.6	2.51	5.8	2.13
E2	141.8	1.79	148.7	1.82	16.2	2.10
E3	76.9	1.72	223.6	2.47	2.25	2.17
E4	134.0	1.83	146.8	1.35	13.6	2.13
E5	105.5	1.99	114.9	1.64	6.1	2.07
E6	174.4	1.64	147.8	1.7	42.4	2.11
E7	191	1.46	150.6	1.75	7.1	2.05
E8	220	1.33	92.2	1.49	3.2	2.12
E9	267.2	2.18	213.9	2.73	3.6	2.70

*Las mediciones se realizaron por duplicado para cada muestra de ADN genómico. Conc.: Concentración en ng/µl, A/A: relación de absorbancias a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm.

Para los tres protocolos, los resultados de calidad estuvieron más alejados del rango óptimo para aquellas muestras cuya molienda de tejido se realizó con micromorteros de plástico (E8 y E9), en comparación con las muestras de la misma naturaleza que fueron sometidas al agitador de perlas TissueLyser (E2 y E3).

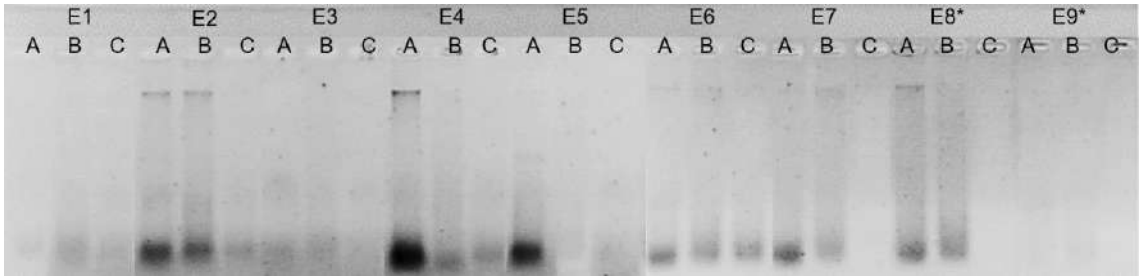


Figura 4.- Corridas electroforéticas del ADN genómico extraído de 9 muestras de líquenes (E1-E9) usando tres protocolos distintos (A, B y C). Todas las muestras fueron corridas en el mismo gel de agarosa al 2%. *E8 y E9 corresponden al mismo tipo de muestra que E2 y E3, respectivamente. Para estas, la molienda se realizó mediante presión con micromorteros de plástico.

Los resultados de cuantificación se vieron reflejados en el gel de electroforesis, donde no es posible observar algún patrón de corrida para los carriles correspondientes a las muestras extraídas con el protocolo C debido a las bajas concentraciones (Figura 4). La muestra E2 mostró resultados de corrida similares para los protocolos A y B, reflejando probablemente los resultados positivos e idénticos de cuantificación. Para la muestra E4, el protocolo A rindió un ADN genómico de una alta integridad, lo cual guarda armonía con su calidad dentro del rango óptimo. Curiosamente, la muestra E8, a pesar de tener la calidad más baja (1.33), mostró un patrón de corrida con ADN aparentemente íntegro. Dado que los carriles positivos correspondientes a la muestra E2 (del mismo tipo que E8) muestran una integridad similar, es probable que este resultado sea una característica del tipo de liquen, en vez de ser debido al uso del micromortero de plástico. Para la muestra difícil de romper del tipo *Usnea* sp., el uso del micromortero de plástico (E9) resultó en ADN menos teñido en el gel de electroforesis en comparación con la muestra procesada en el TissueLyser (E3). En varias de las muestras obtenidas con el protocolo A y B, con excepción de E1 con el protocolo A, y E5 con el protocolo B, es

posible ver una sombra o barrido (*smear*) tenue a lo largo del carril, lo que indica ADN fragmentado. Estos tipos de resultados siguen siendo buenos candidatos para la PCR, donde no se requiere de fragmentos de larga longitud para el éxito de amplificación.

A diferencia de los resultados de electroforesis, la PCR no mostró una concordancia con la concentración y calidad de las muestras. Las muestras extraídas con los protocolos A y B tuvieron un bajo éxito de amplificación (1 y 3 amplificaciones positivas, respectivamente) (Figura 5). En contraste, todas las muestras extraídas con el protocolo C resultaron en un producto positivo (Figura 6).

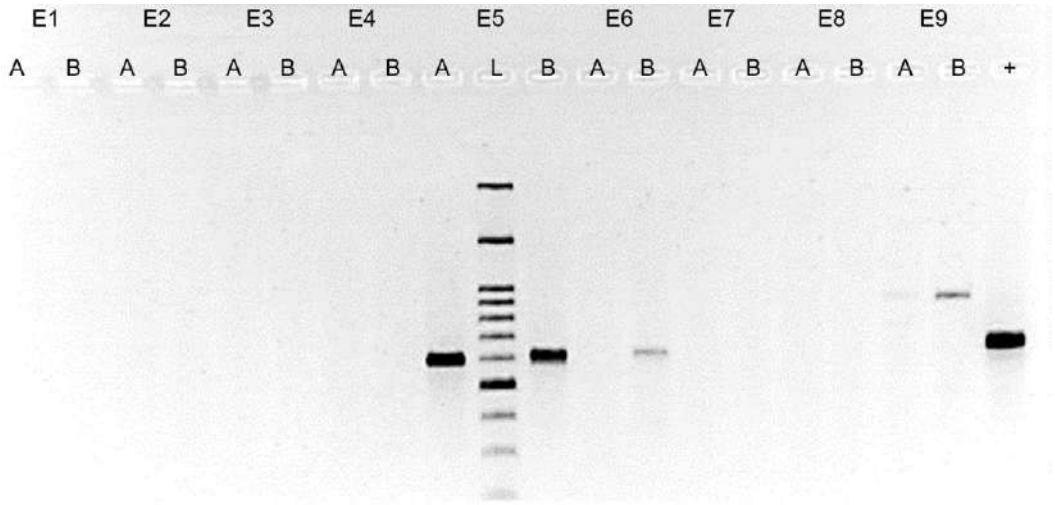


Figura 5. Resultado de la PCR con el protocolo general en las muestras de ADN extraídas con el protocolo A y B. L corresponde al carril con el marcador de peso molecular. + es el carril con el control positivo de PCR.

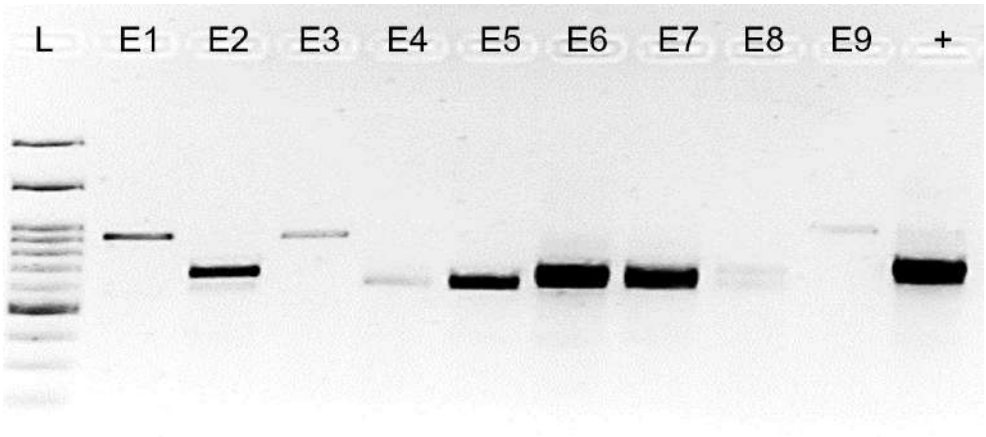


Figura 6. Resultado de la PCR con el protocolo general en las muestras de ADN extraídas con el protocolo C. L corresponde al carril con el marcador de peso molecular. + es el carril con el control positivo de PCR.

Solo la muestra E5 pudo ser amplificada usando ADN genómico obtenido mediante los tres protocolos A, B y C. Las muestras E6 y E9 obtenidas con el protocolo B resultaron en bandas positivas tenues de ~600 y ~900 pb, respectivamente (Figura 5). Con respecto a las muestras extraídas con el protocolo C, 4 mostraron una banda de alta intensidad (E1, E5, E6 y E7), 1 muestra (E2) resultó en una banda principal intensa y otra secundaria de menor longitud poco visible, y 4 muestras (E3, E4, E8 y E9) resultaron en bandas tenues (Figura 6). Las muestras E8 y E9, molidas con micromorteros de plástico, resultaron en productos más tenues en comparación con las muestras del mismo tipo procesadas con el TissueLyser (E2 y E3).

En conjunto, estos resultados sugieren una mejor capacidad del protocolo C, fundamentado en el compuesto químico CTAB, de rendir ADN genómico sin inhibidores de PCR. La presencia de productos inespecíficos para algunas muestras analizadas podría reflejar la falta de optimización del protocolo de PCR general usado, o la presencia de otros hongos no liquenizados. Para reducir la posibilidad de lo segundo, se agregó un paso previo a la preparación de muestras que incluyó el lavado con etanol y lejía diluida, antes de ser puestas a secar en un ambiente seco y estéril.

Dado que los resultados de cuantificación y electroforesis de las muestras de ADN genómico obtenidas con el protocolo C fueron subóptimos, se continuó con la estandarización del protocolo de extracción de ADN evaluando dos protocolos adicionales con el mismo fundamento (D y E).

Para la nueva ejecución de los tres protocolos, se adoptaron recomendaciones del laboratorio a fin de alcanzar un mejor rendimiento de la extracción de ADN. Estas recomendaciones incluyeron llevar a cabo las centrifugaciones a 4 °C y a una mayor velocidad, dejar precipitar el ADN en isopropanol durante toda la noche, resuspender completamente los pellets de ADN en la solución tampón de turno usando un agitador de termobloque, y aumentar tiempos y temperaturas de incubación con la solución

tampón inicial. Las medidas que probaron ser útiles para una mejor extracción de ADN se incluyen como recomendaciones en el protocolo final (Anexo 2).

Cuadro 9.- Descripción de muestras analizadas y resultados de cuantificación de la evaluación de protocolos fundamentados en CTAB para la estandarización de la extracción de ADN

Muestra*	Descripción	Peso†	Protocolo C		Protocolo D		Protocolo E	
			Conc.	A/A	Conc.	A/A	Conc.	A/A
E10	Talo de liquen naranja crustoso similar a *Rhizoplaca* sp.	23.3 mg	183.9	2.09	199.1	1.59	106.8	1.92
E11	Talo de liquen verdoso fruticoso similar a *Stereocaulon* sp.	18 mg	239	1.94	282.9	1.76	99.7	1.84

*Cada muestra se preparó por triplicado. Las mediciones se realizaron por duplicado para cada muestra de ADN genómico. †Los pesos de las réplicas fueron cercanos al valor promedio mostrado para cada muestra. Conc.: Concentración en ng/µl, A/A: relación de absorbancias a longitudes de onda de 260 nm y 280 nm.

Los resultados de cuantificación muestran un alto rendimiento para los protocolos C y D, con una cantidad de ADN cerca del doble de la obtenida mediante el protocolo E para ambas muestras (Cuadro 9). Por otro lado, la calidad estuvo cerca del rango óptimo para ambas muestras con los tres protocolos, con excepción de la muestra E19 extraída con el protocolo D. Al igual que en la primera evaluación de protocolos, el resultado de cuantificación se vio reflejado en el gel de electroforesis, donde, aunque los tres protocolos resultaron en un ADN genómico degradado, la intensidad de tinción fue menor para los carriles correspondientes al protocolo E (Figura 7).

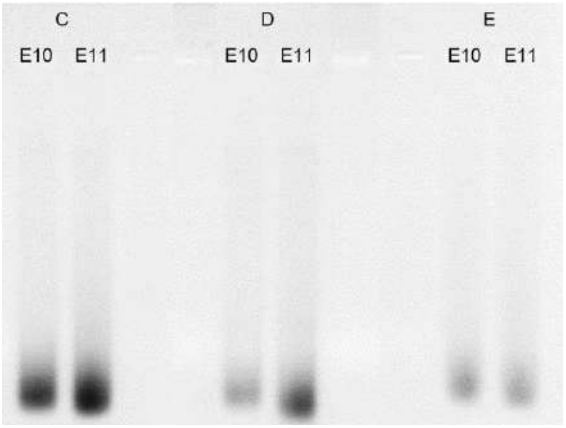


Figura 7.- Corridas electroforéticas del ADN genómico extraído de 2 muestras de líquenes (E10 y E11) usando tres protocolos distintos (C, D y E). Todas las muestras fueron corridas en el mismo gel de agarosa al 2%.

En cuanto a la prueba de PCR, las muestras extraídas con los protocolos C y E resultaron una banda muy intensa para ambas muestras, pero con algunas sombras de productos inespecíficos. En cambio, las muestras de ADN procesadas con el protocolo D no lograron amplificar (Figura 8).

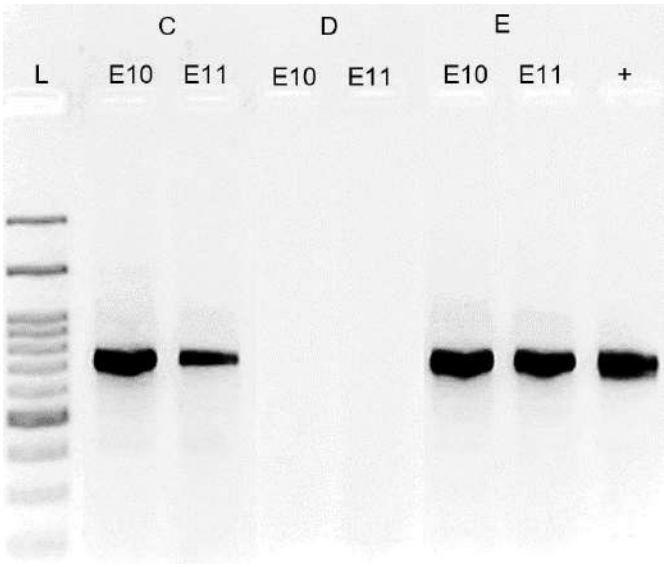


Figura 8.- Resultado de la PCR con el protocolo general en las muestras de ADN extraídas con el protocolo C, D y E. L corresponde al carril con el marcador de peso molecular. + es el carril con el control positivo de PCR.

El éxito de amplificación de los protocolos C y E puede explicarse por la similitud entre estos (se diferencian por un solo reactivo), mientras que el protocolo D incluye varios pasos distintos, pues originalmente fue adaptado para tejidos de plantas. Sin embargo, esta explicación carece de un soporte fuerte al evaluar solo dos muestras. Inicialmente se incluyeron cuatro muestras en la evaluación, pero dos no pudieron ser comparadas debido a errores en la molienda que llevaron a la ruptura de los tubos de microcentrífuga y pérdida de muestra. Para confirmar la interpretación de la evaluación de protocolos basados en CTAB, se volvieron a evaluar los protocolos C y D en 16 muestras cada uno. Las muestras fueron seleccionadas al azar y no corresponden a réplicas. Dado que el único cambio de reactivo que diferencia el protocolo C y E resultó en una menor concentración de ADN genómico (aunque similar amplificación), el protocolo E fue omitido de las siguientes evaluaciones.

Los resultados de cuantificación evidencian las concentraciones de ADN más bajas en las muestras extraídas mediante el protocolo C, en comparación con el protocolo D (Figura 9A). Las concentraciones para las muestras de ADN extraídas mediante el protocolo C estuvieron dentro del rango de 0.1 a 548.5, y una mediana de 17.8 (IQR: 14.57 a 204.62), mientras que las muestras procesadas con el protocolo D fueron de 7.2 a 560.4, con una mediana de 133.75 (IQR: 52.05 a 256.32). Con respecto a las calidades, el protocolo C resultó en valores de calidad de ADN por encima del rango óptimo (>2 para 15/16 muestras), mientras que el protocolo D resultó en calidades más cercanas, aunque frecuentemente debajo del rango óptimo (<1.7 para 9/16 muestras) (Figura 9B).

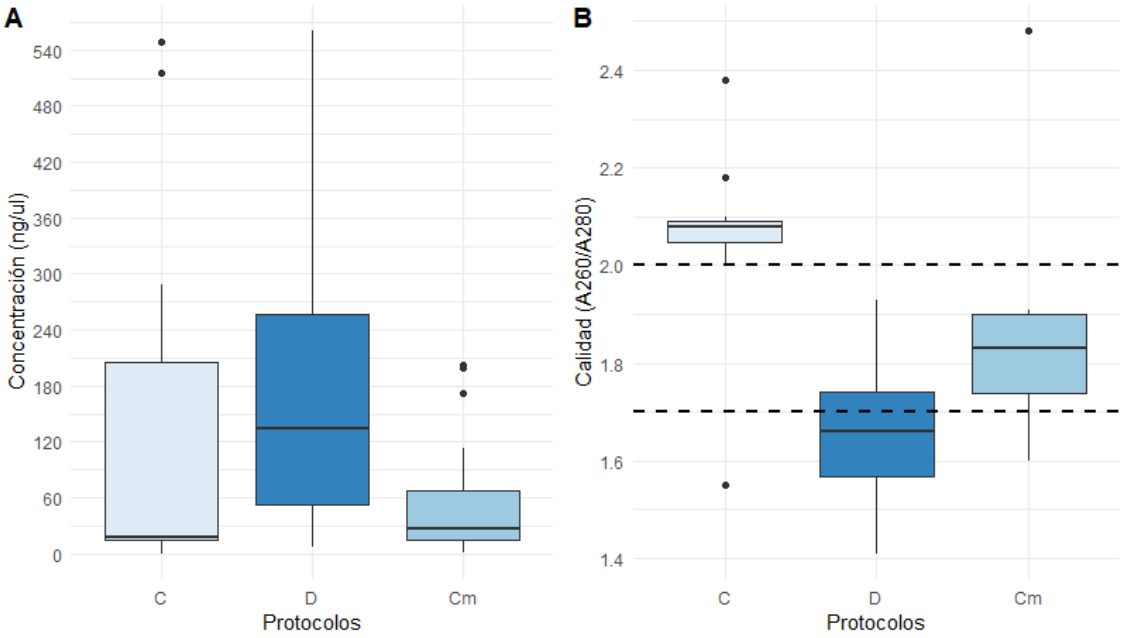


Figura 9.- Valores de concentración y calidad de ADN en la evaluación de protocolos de extracción. Gráfico de cajas de los resultados por protocolo fundamentado en CTAB usando 16 muestras independientes seleccionadas al azar. (A) Valores de concentración en ng/µl para cada protocolo. (B) Valores de calidad (cociente de absorbancias a 260 nm y 280 nm) para cada protocolo. Las líneas punteadas horizontales delimitan el rango de calidad óptimo (1.8 – 2.0). Las mediciones se hicieron por duplicado para cada muestra. C = Protocolo propuesto por Cubero y Crespo, 2002; D = Protocolo de Doyle y Doyle, 1990; Cm = Protocolo de Cubero y Crespo, 2002 modificado con un paso intermedio de ARNasa A.

Los resultados de PCR permitieron confirmar la capacidad superior del protocolo C de rendir ADN genómico amplificable en comparación con el protocolo D (Figura 10 y

11). El protocolo C resultó en 15/16 amplicones, con 3 bandas tenues correspondientes a muestras con baja concentración de ADN (E16, E18, E26) (Figura 10). Del mismo modo, la única muestra negativa E24 tuvo una concentración de ADN muy baja (0.7 ng/µl). Por otro lado, el protocolo D resultó en 9/16 amplicones, de los cuales 5 mostraron poca intensidad de tinción (E29, E36, E40, E41, E42) (Figura 11). Para el protocolo D, el éxito de amplificación no tuvo relación con la concentración de ADN, lo que podría indicar la presencia de inhibidores de PCR u otros contaminantes para las muestras negativas y con bandas tenues. Este punto es reforzado por el número de muestras con una calidad subóptima para el protocolo D (Figura 9B). Para ambos resultados se observaron productos inespecíficos de baja intensidad a lo largo del carril de corrida, lo cual se deba probablemente a que se empleó un protocolo de PCR general, que aún no fue optimizado.

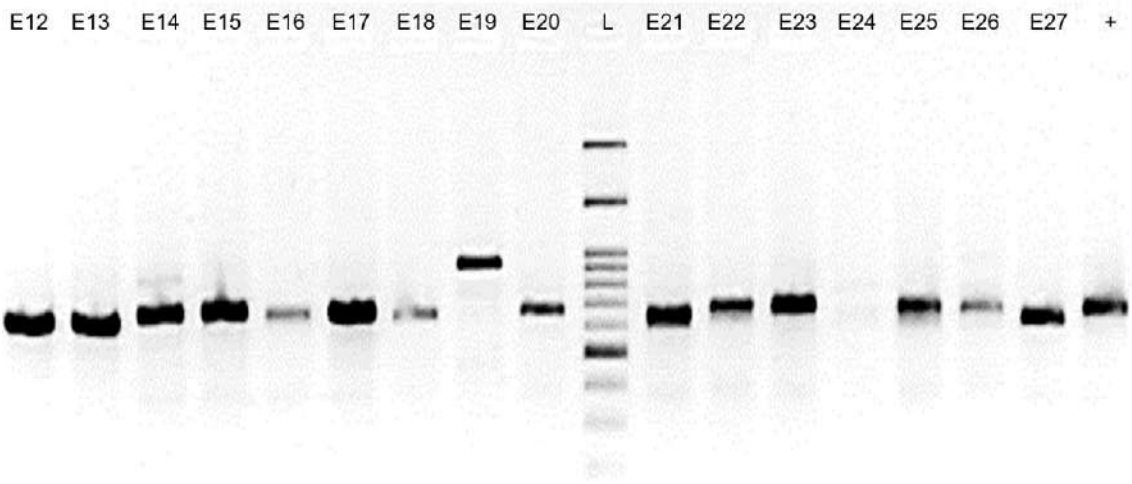


Figura 10. Resultado de la PCR con el protocolo general en 16 muestras de ADN extraídas con el protocolo C (E12-E27). L corresponde al carril con el marcador de peso molecular. + es el carril con el control positivo de PCR.

El protocolo C mostró ser el más efectivo para la obtención de ADN genómico amplificable, sin embargo, en todas las evaluaciones, el ADN tuvo una calidad por encima del rango óptimo (Figura 9B). Dado que valores de calidad mayores a 2 en espectrofotometría sugieren la presencia de una cantidad considerable de ARN en el volumen final, se realizó una evaluación adicional con el protocolo C, añadiendo

ARNasa A libre de ADNasa. El protocolo C modificado incluyó la adición de ARNasa A libre de ADNasa (10 mg/ml) e incubación a 37 °C por 60 minutos en un termobloque con agitación, antes de la segunda separación de fases con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) (Anexo 2). Al igual que en las evaluaciones anteriores, se empleó un grupo de 16 muestras seleccionadas al azar.

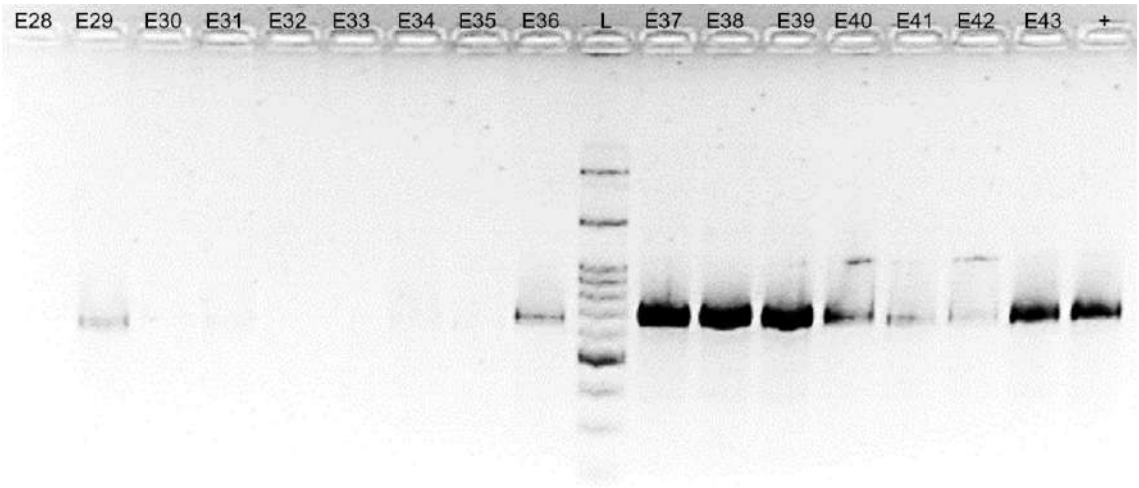


Figura 11. Resultado de la PCR con el protocolo general en 16 muestras de ADN extraídas con el protocolo D (E28-E43). L corresponde al carril con el marcador de peso molecular. + es el carril con el control positivo de PCR.

Los resultados de la cuantificación se muestran en la Figura 9, donde se observan concentraciones dentro del rango de 0.45 a 202.3 ng/µl, con una mediana de 27.45 (IQR: 14.78 a 68.2) (Figura 9A). Se evidenció una clara mejora en la calidad usando el protocolo C modificado, en comparación con los resultados del protocolo C sin ARNasa. Las calidades estuvieron dentro del rango óptimo (1.7 – 2.0) para 11/16 muestras (Figura 9B). Se obtuvo ADN con una calidad por debajo, y por encima del rango óptimo para 3 y 2 muestras, respectivamente.

La prueba de PCR con el protocolo general para este grupo de muestras extraídas con el protocolo C con ARNasa resultó en 12/16 muestras con amplicones (Figura 12). Una de las muestras (E59) mostró una banda tenue, correspondiente con una baja concentración de ADN genómico (1.17 ng/µl). Del mismo modo, las únicas dos

muestras con concentraciones por debajo de 1 ng/µl (E49 y E57) no lograron ser amplificadas. Para la mayoría de las muestras, incluyendo las que no mostraron un amplicón, se observaron sombras correspondientes a productos inespecíficos, lo cual es indicativo de la falta de optimización del protocolo de PCR usado para amplificar este grupo de muestras (Figura 12).

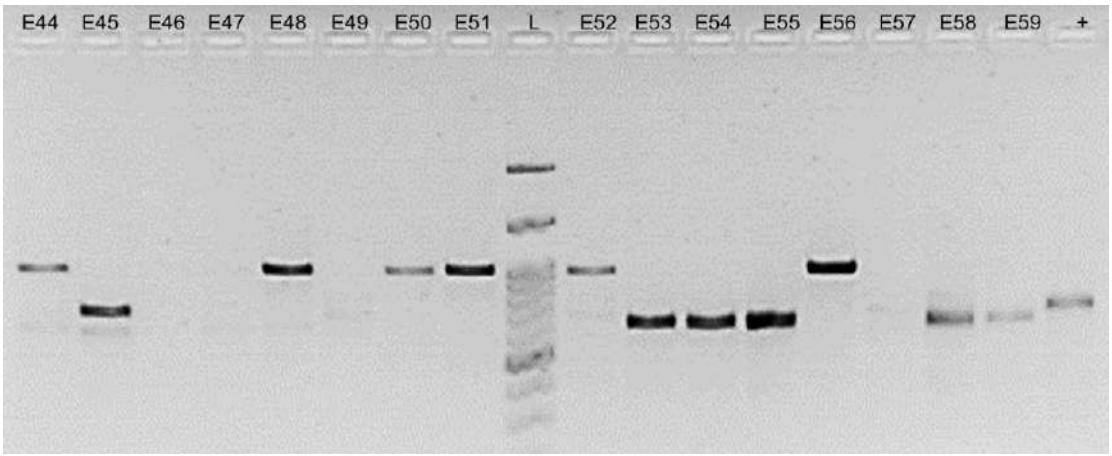


Figura 12. Resultado de la PCR con el protocolo general en 16 muestras de ADN extraídas con el protocolo C modificado (E44-E59). L corresponde al carril con el marcador de peso molecular. + es el carril con el control positivo de PCR.

5.3. Optimización del protocolo de amplificación del marcador ITS

Para los ensayos de optimización del método de amplificación por PCR del marcador de código de barras ITS, se usó la muestra de ADN E53, proveniente de la evaluación final del proceso de estandarización del protocolo de extracción de ADN. Esta muestra tiene una alta concentración de ADN genómico (171.6 ng/µl) y calidad dentro del rango óptimo (1.88). En la prueba de PCR con el protocolo general mostró una banda intensa y única entre los 600 y 700 pares de base de longitud (Figura 12).

Con el fin de evitar pasar por alto la influencia mutua entre la concentración de $MgCl_2$ y la temperatura de hibridación, se decidió hacer los ensayos de variación para estos parámetros en paralelo. Se observó la interacción entre la concentración de $MgCl_2$ y la temperatura de hibridación (Figura 13).

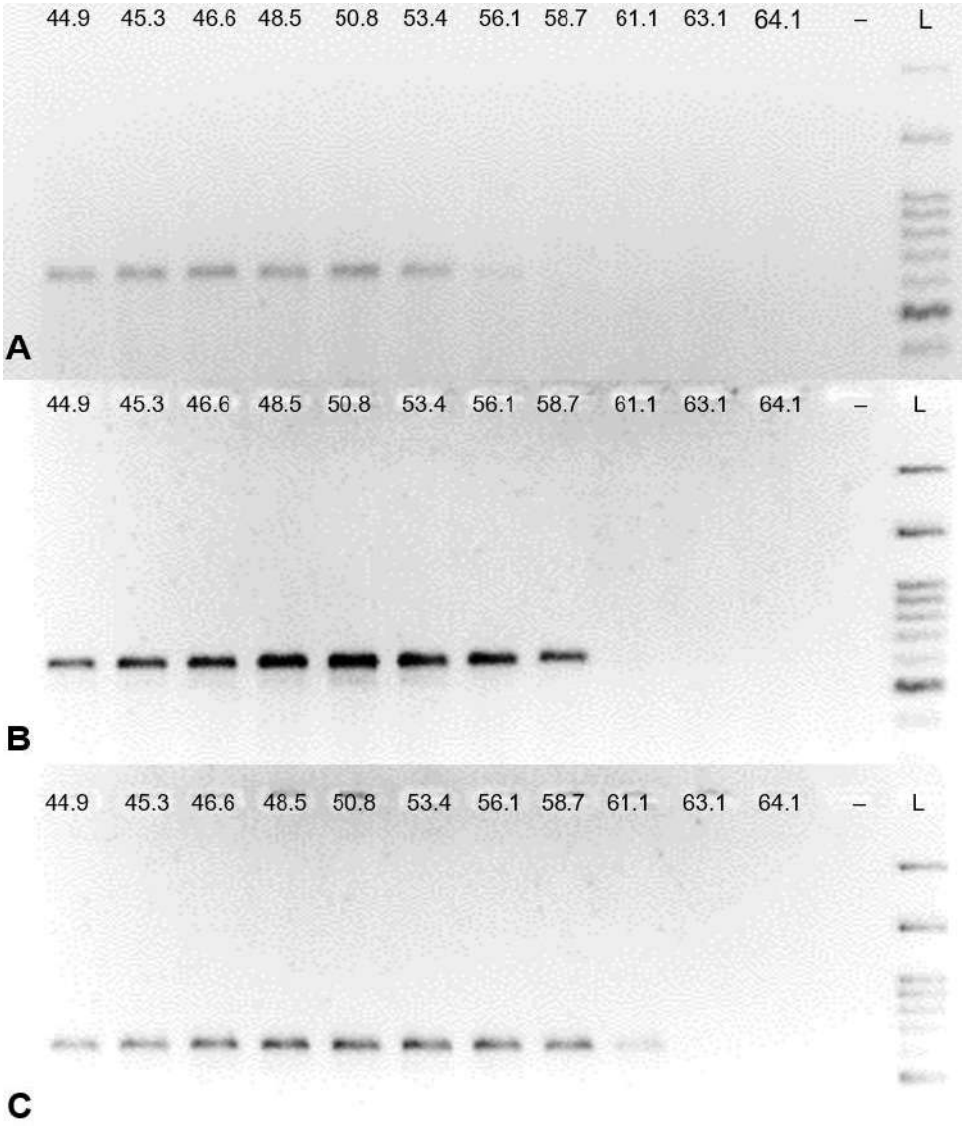


Figura 13. Resultado de la variación de concentración de $MgCl_2$ y temperaturas de hibridación en las pruebas de optimización de PCR. En la parte superior de cada carril se indica la temperatura evaluada (en °C) para una concentración de $MgCl_2$ de **A**. 1 mM, **B.** 2 mM y **C.** 3 mM. L corresponde al carril con el marcador de peso molecular. – es el carril con el control negativo de PCR.

Para las tres concentraciones, altas temperaturas inhibieron la amplificación; sin embargo, el aumento de la concentración de $MgCl_2$ permitió la unión de los cebadores al ADN a mayores temperaturas. Todos los pares de condiciones que incluyeron una concentración de $MgCl_2$ de 1 mM y tuvieron una amplificación positiva resultaron en una banda única, pero de baja intensidad, que disminuyó hasta los 56.1 °C (Figura 13A). Se evidenció la presencia de una banda inespecífica entre los 500 y 600 pares de base para las condiciones con concentraciones de $MgCl_2$ de 2 mM y 3 mM y temperaturas de

hibridación debajo de 56.1 °C y 58.7 °C, respectivamente (Figuras 13B y C). Se obtuvieron bandas únicas y con alta intensidad en las combinaciones de concentración de $MgCl_2$ – temperatura de hibridación de 2 mM – 56.1 °C, 2 mM – 58.7 °C, y 3 mM – 58.7 °C (Figura 13B). En las siguientes pruebas se usó la combinación de concentración de $MgCl_2$ de 2 mM con una temperatura de hibridación de 58 °C, por ser el par de parámetros con resultados óptimos más eficiente.

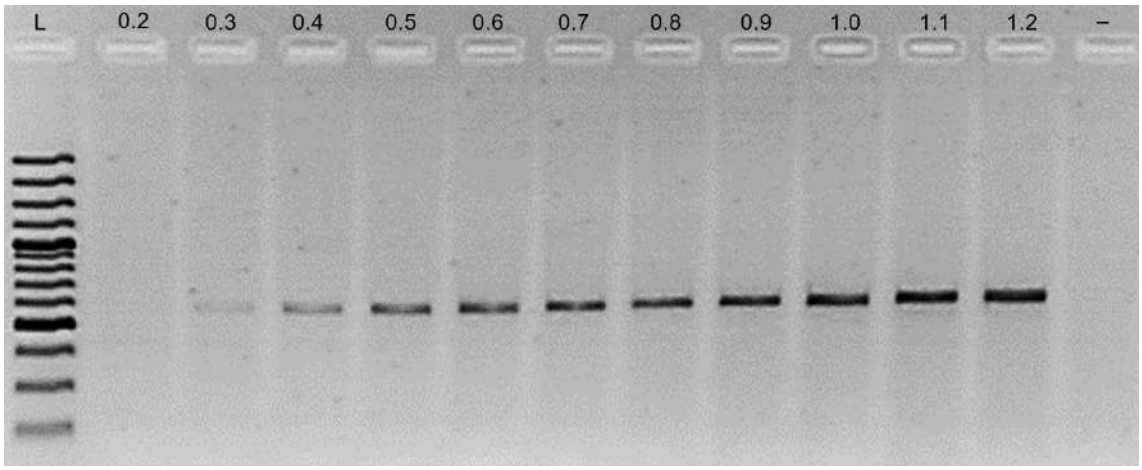


Figura 14. Resultado de la variación de concentración de cebadores en las pruebas de optimización de PCR. En la parte superior de cada carril se indica la concentración evaluada (en µM). L corresponde al carril con el marcador de peso molecular. – es el carril con el control negativo de PCR.

El resultado del ensayo de variación de concentración de cebadores mostró un aumento en la intensidad de bandas a medida que se aumentó la concentración de cebadores (Figura 14). Los carriles correspondientes a concentraciones de 1.1 µM y 1.2 µM mostraron una ligera nubosidad poco visible en la parte inferior, indicativa de una cantidad mínima de cebadores que persistieron tras la PCR debido a estar presentes en exceso. En las siguientes evaluaciones de parámetros se usó 1 µM como la concentración óptima de cebadores para este protocolo.

Finalmente, el ensayo de variación de la cantidad de enzima polimerasa GoTaq® Flexi mostró un aumento del rendimiento según la cantidad de enzima, indicado por la intensidad de la banda; sin embargo, en la prueba con 1.25 U, se observa una sombra en la parte inmediatamente superior a la banda correspondiente al amplicón (Figura 15).

Para evitar este artefacto de amplificación, se consideró 1 U de enzima como la cantidad ideal para el protocolo optimizado de PCR.

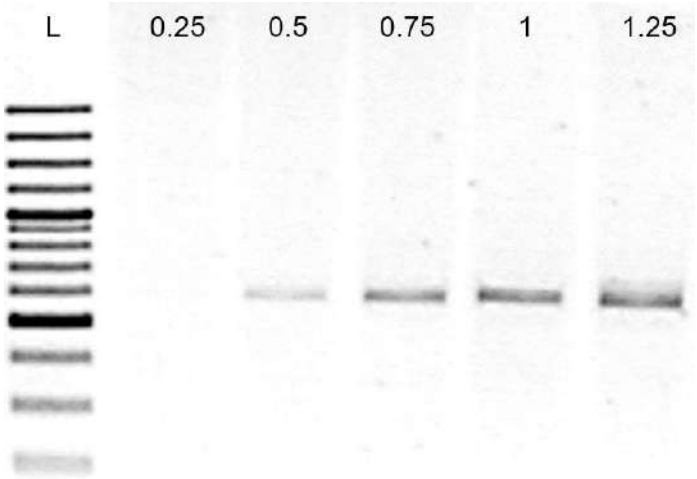


Figura 15. Resultado de la variación de unidades enzimáticas en las pruebas de optimización de PCR. En la parte superior de cada carril se indica la cantidad de enzima evaluada (en unidades enzimáticas U). L corresponde al carril con el marcador de peso molecular.

Las condiciones finales del protocolo optimizado de PCR consistieron en solución tampón Colorless GoTaq® Flexi 1X, 200 µM de cada dNTP, 2 mM de $MgCl_2$, 1 µM de cada cebador (ITS1-F e ITS4), 1 U de la enzima GoTaq® Flexi DNA Polymerase y 50 ng de ADN inicial en un volumen de reacción final de 25 µl. La configuración del programa de amplificación en el termociclador incluyó un ciclo de denaturación inicial a 95 °C por 5 minutos; seguido de 30 ciclos de 3 pasos, denaturación a 95 °C por 30 segundos, hibridación a 58 °C por 30 segundos, y extensión a 72 °C por 1 minuto; finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C por 8 minutos. El último paso opcional correspondiente a almacenamiento fue establecido en 15 °C por un tiempo indeterminado (Anexo 3).

5.4. Obtención del marcador de código de barras a partir de muestras de líquenes antárticos

La implementación del protocolo estandarizado de extracción de ADN (Anexo 2) para la extracción de ADN de las 305 muestras de líquenes antárticos resultó en 244

(80%) muestras de ADN genómico con parámetros de cuantificación adecuados para la amplificación por PCR (Figura 16A). Las 61 muestras de ADN (20%) con cuantificación negativa fueron retiradas del procesamiento.

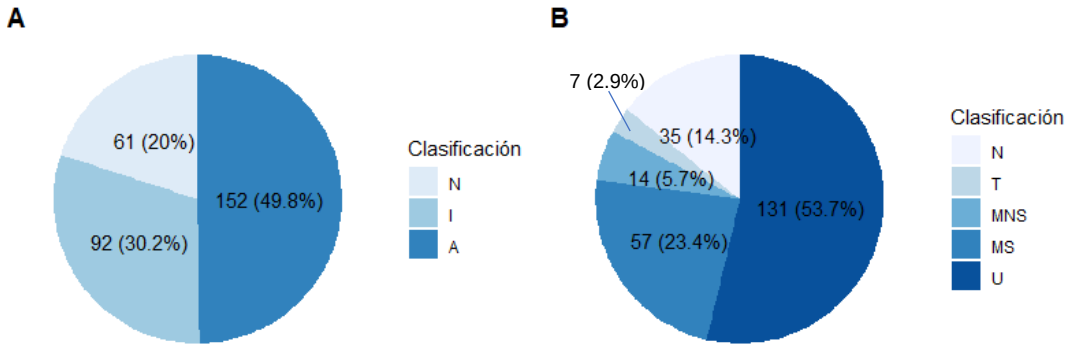


Figura 16.- Clasificación de resultados del empleo de los protocolos estandarizados para la obtención del marcador de código de barras fúngico ITS a partir de muestras de líquenes antárticos. (A) Clasificación de muestras de ADN genómico según parámetros de cuantificación. A = Aceptable, I = Intermedio, N = Negativo. (B) Clasificación de productos de PCR según el patrón de corrida. U = Banda única intensa, MS = Bandas múltiples separables, MNS = Bandas múltiples no separables, T = Banda única tenue, N = Amplificación negativa.

Para la amplificación por PCR del marcador de código de barras de ADN fúngico ITS con el protocolo optimizado (Anexo 3), se usaron las muestras de ADN obtenidas previamente como ADN molde. Se obtuvieron 131 (53.7%) muestras con una banda única, y 57 (23.4%) muestras con bandas múltiples separables (Figura 16B). Las 7 (2.9%) bandas tenues no pudieron ser mejoradas aún después de repetir la amplificación con mayor cantidad de ADN inicial, por lo que no fueron empleadas en los siguientes ensayos. De igual manera, las 14 (5.7%) muestras con bandas múltiples no separables incluyeron productos muy cercanos entre sí que no podrían separarse fácilmente en un gel de agarosa, por lo que se excluyeron de los siguientes análisis. Por otro lado, 35 (14.3%) muestras resultaron en una amplificación negativa (Figura 16B).

Como se señaló previamente, las 131 muestras que mostraron una única banda intensa fueron purificadas usando directamente el contenido del microtubo de PCR. Se seleccionaron 40 muestras con bandas múltiples separables. Para la mitad de las

muestras en este grupo se purificó solo la banda más intensa (20 amplicones); mientras que para la otra mitad se purificaron todas las bandas a lo largo del carril (41 amplicones).

5.5. Análisis de secuencias

Los 192 amplicones fueron secuenciados en ambas direcciones, por lo que en total se revisaron los electroferogramas de 384 corridas de secuenciación. 116 y 68 corridas con los cebadores ITS1-F e ITS4, respectivamente, mostraron un electroferograma limpio, libre de ruido; mientras que, en 23 y 49 corridas, respectivamente, se evidenció la presencia de picos secundarios mínimos, distinguibles del patrón de lectura principal. Entre las lecturas de secuenciación consideradas fallidas, se incluyeron 26 secuencias que mostraron un alto grado de ruido, con picos secundarios por encima del 50% de la altura de los picos principales; así como 17 secuencias que no mostraron alguna lectura en el electroferograma. Por otro lado, 43 corridas mostraron picos dobles, y 53 mostraron picos múltiples.

Se obtuvieron secuencias para 101/131 muestras que mostraron una banda única. De este grupo, se secuenciaron exitosamente ambas direcciones para 60 muestras, y una sola dirección con el cebador ITS1-F e ITS4 para 38 y 3 muestras, respectivamente (Cuadro 10). Para las muestras que mostraron bandas múltiples separables, se secuenciaron exitosamente 19/20 muestras en las cuales se cortó solo una banda. Se secuenciaron ambas direcciones para 14 muestras en este grupo, y una sola dirección con el cebador ITS1-F e ITS4 para 3 y 2 muestras, respectivamente. Por otro lado, en el grupo de muestras en las cuales se aisló más de una banda, 27/41 cortes de gel correspondientes a 18/20 muestras pudieron ser secuenciados exitosamente. En este grupo, se obtuvieron secuencias en ambas direcciones para 19 muestras, y en una sola dirección con el cebador ITS1-F e ITS4 para 1 y 7 muestras, respectivamente (Cuadro 10).

Cuadro 10.- Resultados de secuenciación en términos de muestras y amplicones para cada grupo de muestras clasificado según el patrón de corrida.

Resultado*	Bandas únicas	Bandas múltiples separables		Total
		1 amplicón	>1 amplicón	
Total de muestras	**131**	**20**	**20**	**171**
Muestras positivas	101 (59.1%)	19 (11.1%)	18 (10.5%)	138 (80.7%)
Muestras negativas	30	1	2	33
Total de amplicones	**131**	**20**	**41**	**192**
Amplicones positivos	101 (52.6%)	19 (9.9%)	27 (14.1%)	147 (76.6%)
Solo ITS1-F	38	3	1	42
Solo ITS4	3	2	7	12
Ambas	60	14	19	93
Amplicones negativos	30	1	14	45

*Para los resultados positivos se encierra en paréntesis el porcentaje con respecto al total de muestras (171) o amplicones (192) secuenciados.

El análisis de BLAST permitió asociar cada secuencia ITS con un nombre en la base de datos de Genbank (Figura 17). Como se esperaba por la descripción inicial, la mayoría de coincidencias fueron con *Usnea* sp. y *P. antarctica*. Asimismo, los líquenes foliosos fueron asignados a *Umbilicaria krascheninnikovii* (2/4) y *Umbilicaria aprina* (2/4). Los líquenes de tipo crustoso, difíciles de identificar a simple vista, fueron asociados a diferentes especies incluyendo *Rhizocarpon* sp., *Candelariella flava*, *Steinera intricata*, *Caloplaca* sp., *Lecanora* sp., *Letharia vulpina*, *Lecidella carpathica*, *Buellia frigida* y *Lecidea* sp. Por otro lado, varias de las secuencias correspondientes a muestras dentro del grupo descrito como similar a *Stereocaulon*, tuvieron coincidencias con *Stereocaulon* spp., pero también con otras especies de líquenes como *Ochrolechia* sp. y *Steinera intricata* (Figura 17). Todas las secuencias asociadas a hongos liquenizados mostraron altos porcentajes de cobertura e identidad (>97%), con excepción de 4 secuencias cuya coincidencia más alta fue con *L. vulpina* (promedio de 93.7% de cobertura y 85.6% de identidad), 2 con *Lecidea* sp. (87.3% de identidad), 1 con *B. frigida* (88.2% de identidad), 1 con *Rhizocarpon norvegicum* (88.3% de identidad), 1 con *P. cinammomeum* (84.8% de identidad), y 1 con *Caloplaca sublobulata* (96.3% de identidad); todas estas con bajo porcentaje de cobertura y/o identidad. Esta falta de asociación indica que estos últimos son códigos de barras nuevos en las bases de datos. Finalmente, 32 amplicones fueron

asociados con hongos no liquenizados, incluyendo hongos del género *Aspergillus* sp., varios hongos no cultivados, y especies como *Peziza varia*, *Rhynchostoma proteae*, *Athelia bombacina*, y *Geltingia associata* (Figura 17). Las asociaciones de hongos no liquenizados con las especies *Sarea resinae*, *Amorphoteca resinae*, y *Arrhenia subglobisemen* y otros no cultivados tuvieron poco porcentaje de identidad.

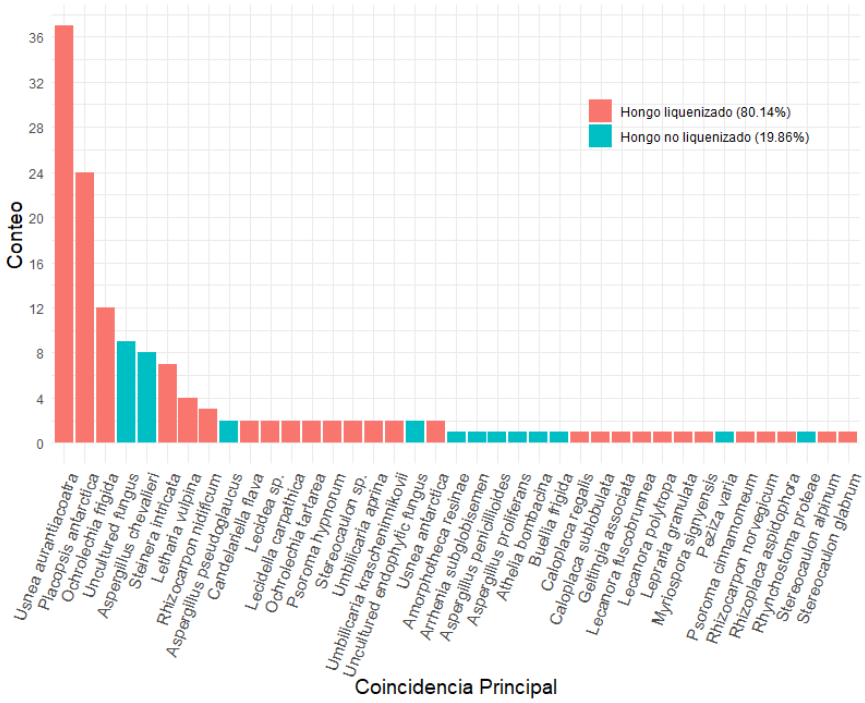


Figura 17.- Resultados de la búsqueda de coincidencias de las secuencias en la base de datos Genbank usando el algoritmo BLAST. El conteo incluye muestras con secuencias unidireccionales y en ambas direcciones. La leyenda muestra el porcentaje de hongos liquenizados y no liquenizados con respecto al total de muestras.

Para las muestras con múltiples bandas, el aislamiento de más de un amplicón permitió verificar la naturaleza de los amplicones secundarios. Mientras que en 7/20 muestras ninguna de las bandas correspondió a un hongo liquenizado o fallaron la secuenciación, en las 13/20 muestras restantes al menos una de las bandas fue asociada a un hongo liquenizado. En 2 muestras, los dos amplicones secuenciados correspondieron a hongos liquenizados distintos. En ambos casos, uno de los hongos liquenizados fue asociado a *S. intricata*, lo cual podría deberse a que este liquen puede crecer tomando como sustrato el talo de otros líquenes (Kitaura et al., 2019). Esto sugiere que, en los casos de productos de PCR con bandas múltiples, y en las

secuenciaciones fallidas por picos dobles o múltiples, la presencia de un ITS fúngico distinto en la muestra de ADN puede explicarse no solo por la presencia de hongos no liquenizados encima o dentro del liquen (epi- y endoliquénicos, respectivamente), sino también por otros hongos liquenizados liquenícolas. Es probable que este haya sido el caso para las dos muestras en cuestión, pues estas correspondieron a líquenes descritos como “similar a *Stereocaulon* sp.” y “*Psoroma* sp.”, los cuales, por su arreglo y estructura irregular, pueden camuflar el talo oscuro y pequeño de *S. intricata* si no son cuidadosamente examinados y separados. Una explicación suplementaria involucrando contaminación cruzada es menos probable en vista de que las muestras fueron lavadas como se indicó previamente.

Los análisis de discriminación filotípica basados en distancias genéticas estimadas en Mothur se realizaron siguiendo la misma configuración de parámetros usada por la base de datos de secuencias fúngicas UNITE para la separación de hipótesis de especie (Kõljalg et al., 2020). Con un umbral de 0, se identificaron 68 y 49 grupos distintos de secuencias para los conjuntos de datos largo y corto, respectivamente. En el rango de distancias genéticas de 0.005 y 0.05, se separaron de 36 a 22 grupos para el conjunto de datos largo, y entre 31 y 19 grupos para el conjunto de datos corto (Figura 18).

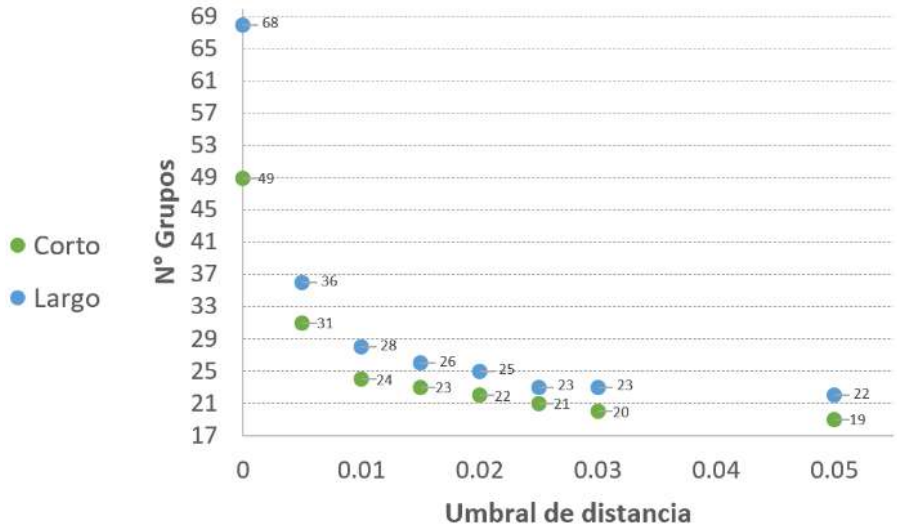


Figura 18.- Numero de grupos para los dos conjuntos de datos analizados según un umbral de distancia. El umbral se muestra en el eje X. También se muestran los resultados para el umbral 0, que indica el número de grupos distintos de secuencias.

Los resultados de delimitación de especies con ABGD fueron idénticos para las matrices de distancias con corrección JC y K2P. Mientras que el conjunto de datos largo mostró resultados similares para los dos valores de distancia de gap relativa (X=1.0 y 1.5), no se pudo obtener un resultado para el valor predeterminado de este parámetro (X=1.5) con el conjunto de datos corto (Figura 19).

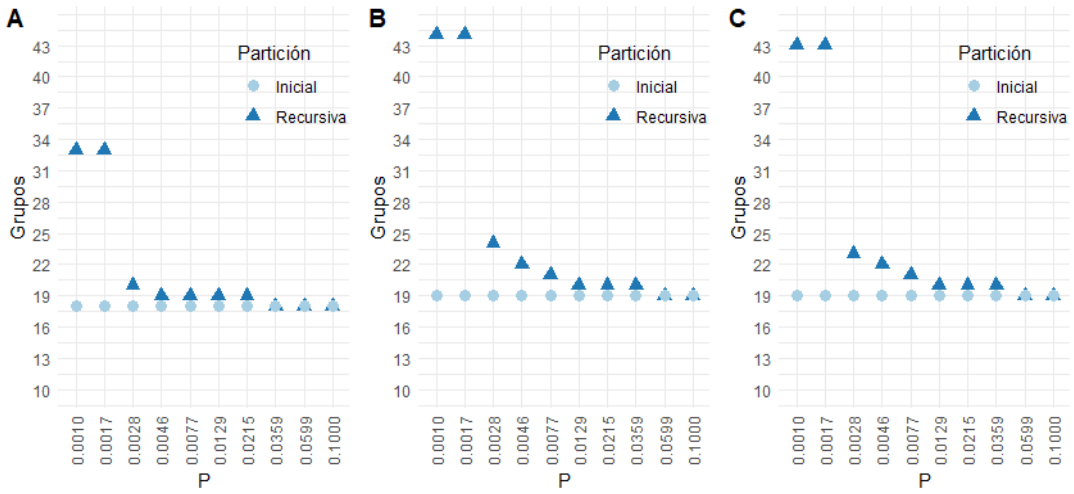


Figura 19.- Delimitación de especies putativas usando ABGD para los dos conjuntos de datos. (A) Conjunto de datos corto con X=1. (B) Conjunto de datos largo con X=1. (C) Conjunto de datos largo con X=1.5. P = valores previos de divergencia intraespecífica.

Para ambos conjuntos de datos, el número de grupos tras la partición inicial fue estable a través del rango de valores previos de divergencia intraespecífica (0.001 – 0.1), siendo 18 para el conjunto de datos corto, y 19 para el conjunto de datos largo. Como se espera, el número de grupos resultantes de las particiones recursivas fue mayor en ambos casos, resultando en una gran diferencia para valores de divergencia intraespecífica de 0.001 y 0.0017. El número de grupos tras las particiones recursivas fue cercano al inicial para valores de divergencia intraespecífica entre 0.0028 y 0.1 (Figura 19). Se tomó en cuenta el número de grupos resultantes en P = 0.0077 para la delimitación.

La delimitación mediante GMYC resultó en 30 entidades para el conjunto de datos corto tanto con el método de umbral único y múltiple (Figura 20). Por otro lado,

para el conjunto de datos largo, el número de entidades encontradas fue de 19 y 39 con el método de umbral único y múltiple, respectivamente (Figura 19). Finalmente, el método de tasas múltiples de PTP (mPTP) resultó en 19 y 20 grupos para el conjunto de datos corto y largo, respectivamente (Figura 20 y 18, Cuadro 11).

Cuadro 11. Resultados de los métodos de delimitación de especies basados en árboles GMYC y mPTP.

Conjunto de datos	sGMYC			mGMYC			mPTP		
	Grupos	IC	Prueba LR	Grupos	IC	Prueba LR	Grupos	VAP	Desviación estándar
Corto	30	16-37	9.5e-3	30	27-44	8.5e-4	19	>93%	0.000072
Largo	19	4-27	3.5e-2	39	31-63	2.3e-4	20	>98%	0.000021

IC=Intervalo de confianza, LR=índice de verosimilitud, VAP=valor de soporte promedio, sGMYC=modelo GMYC con umbral único, mGMYC=modelo GMYC con umbral múltiple, mPTP=PTP con tasas múltiples.

La comparación de la agrupación mediante diferentes métodos permitió una delimitación filotípica con diferente grado de soporte. Para el conjunto de datos corto se identificaron 19 filotipos, coincidente con el número de grupos separados mediante ABGD, mPTP, y con distancias 5% (Figura 20). La separación de grupos fue similar con ambos métodos del modelo GMYC, pero con más divisiones en comparación con los otros métodos. Por otro lado, en el conjunto de datos largo, que incluyó muestras secuenciadas en una sola dirección, también se delimitaron 19 filotipos, pero hubo una menor coincidencia en el número de grupos separados con cada método (Figura 21).

Curiosamente, el método con el modelo GMYC con umbral único resultó en el menor número de grupos (19), mientras que con un umbral múltiple se obtuvo el máximo número de grupos (39). Aunque, a diferencia del conjunto de datos corto, la separación mediante ABGD, mPTP, y con distancias 5% resultó en un número de grupos distinto, estos fueron cercanos al número de filotipos determinado (21, 20 y 22, respectivamente).

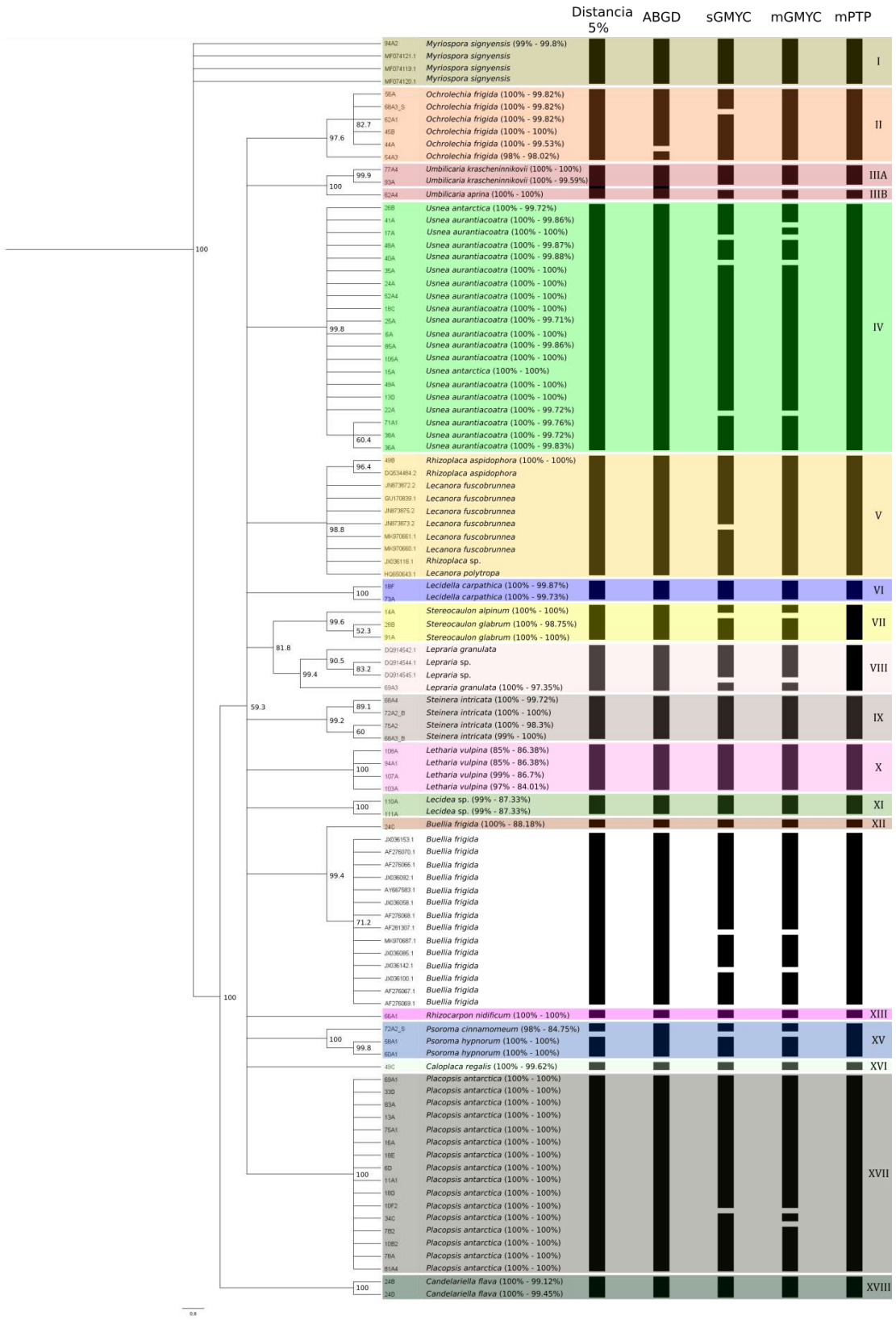


Figura 20.- Comparación de especies putativas obtenidas mediante los métodos de separación de grupos por distancia genética, ABGD, GMYC con umbral único y múltiple y mPTP en el conjunto de datos corto. Se muestran las coincidencias en BLAST y en paréntesis el porcentaje de cobertura e identidad, respectivamente. Las secuencias unidireccionales se denotan con el color gris. El árbol filogenético no enraizado se realizó con el método de máxima verosimilitud en PAUP usando el modelo TIM1+I+G. Los nodos muestran el valor de soporte de un análisis *bootstrap* de 500 réplicas.

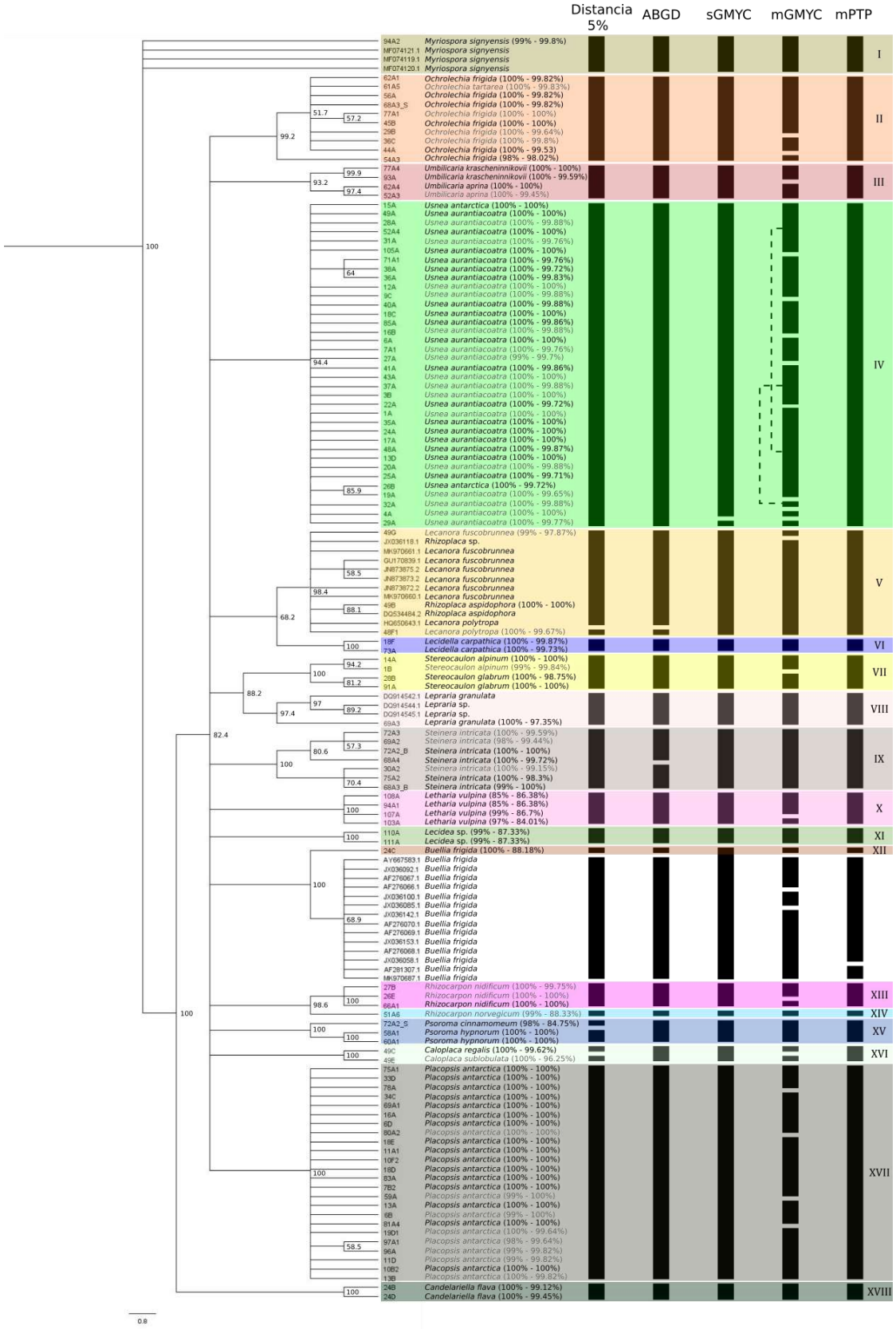


Figura 21.- Comparación de especies putativas obtenidas mediante los métodos de separación de grupos por distancia genética, ABGD, GMYC con umbral único y múltiple y mPTP en el conjunto de datos largo. Se muestran las coincidencias en BLAST y en paréntesis el porcentaje de cobertura e identidad, respectivamente. El árbol filogenético no enraizado se realizó con el método de máxima verosimilitud en PAUP usando el modelo TrN+G. Los nodos muestran el valor de soporte de un análisis *bootstrap* de 500 réplicas.

Las secuencias públicas incluidas en este trabajo conformaron filotipos con buen soporte para 3 de las 4 secuencias “singleton” (I, V, y VIII). La hipótesis de especie de la cual se obtuvieron las secuencias públicas para el filotipo V incluyó especies del género *Rhizoplaca* y *Lecanora*. En el conjunto de datos largo, estas secuencias formaron un único filotipo con el “singleton” asociado a *Rhizoplaca* (49B), pero también con las secuencias unidireccionales asociadas a *L. polytropa* (40F1) y *L. fuscobrunnea* (49G) (Figura 21). Por otro lado, el filotipo XII permaneció consistentemente con solo una secuencia (24C) aún después de la inclusión de las secuencias públicas. Esta muestra pudo conformar un grupo con las secuencias públicas solo con el método con el modelo GMYC con umbral único.

El filotipo III incluyó secuencias asociadas a *U. aprina* (77A4, 93A) y *U. krascheninnikovii* (62A4, 52A3) con alto porcentaje de cobertura e identidad (100% y >99.4%, respectivamente). En el conjunto de datos corto, la delimitación de estas dos especies como filotipos distintos fue apoyada por los métodos de GMYC, mPTP y distancia <5% (Figura 20). Sin embargo, en el conjunto de datos largo que incluyó una secuencia unidireccional asociada a *U. aprina* (52A3), solo el método GMYC con umbral múltiple y distancia <5% pudieron separar ambos grupos (Figura 21). En vista de esta discordancia con la adición de una sola secuencia unidireccional, se consideraron los subgrupos IIIA y IIIB dentro del filotipo III.

Los dos grupos con la mayor cantidad de muestras colectadas, asociadas a *Usnea* sp. y *P. antarctica* formaron los filotipos IV y XVII, respectivamente. Ambos grupos fueron obtenidos consistentemente con los métodos de delimitación de distancia >2%, ABGD y mPTP. En cambio, los métodos con el modelo GMYC resultaron en más subdivisiones dentro de cada grupo (Figuras 20 y 21). Dentro del filotipo IV, 2 secuencias (15A y 26B) tuvieron como coincidencia principal en BLAST a *U. antarctica;* sin embargo, no formaron un grupo distinto ni se diferenciaron de las secuencias restantes asociadas a *U. aurantiacoatra.*

Los filotipos VI, X, XI y XVIII fueron replicados con todos los métodos de delimitación en ambos conjuntos de datos (Figuras 20 y 21). La agrupación a una distancia genética de 0.5% indica que las secuencias en cada uno de estos tres filotipos tuvieron muy poca variación. En efecto, las 2 secuencias asociadas a *L. carpathica* (18F y 73A) en el filotipo VI mostraron solo 3 diferencias. A pesar de tener un bajo porcentaje de identidad (~86.4%), las 4 secuencias en el filotipo X (94A1, 103A, 107A, 108A) fueron idénticas, al igual que las 2 secuencias del filotipo XI (110A y 111A). Del mismo modo, las 2 secuencias del filotipo XVIII (24B y 24D) mostraron solo 2 diferencias.

Los filotipos XIII y XVI agruparon secuencias coincidentes con *R. nidificum* y *Caloplaca* sp., respectivamente. En el conjunto de datos cortos, estos filotipos consistieron de una sola secuencia bien separada de los demás grupos mediante todos los métodos de delimitación probados (Figura 20). Para el conjunto de datos largo, aunque las dos muestras del filotipo XVI fueron asociadas a distintas especies del mismo género, *C. regalis* (49C) y *C. sublobulata* (49E), solo el método de GMYC con umbral múltiple y la agrupación en base a distancias genéticas en pares las separaron en dos grupos distintos (Figura 21). En el filotipo XIII, solo el método de GMYC con umbral múltiple situó la muestra bidireccional de *R. nidificum* en un grupo aparte. Por otro lado, el filotipo XIV incluyó la muestra 51A6, cuya secuencia mostró un bajo porcentaje de identidad (88.3%) y fue delimitada consistentemente separada de las otras secuencias del mismo género (filotipo XIII). Dado que esta secuencia es unidireccional, el filotipo XIV solo pudo identificarse en el conjunto de datos largo.

Los filotipos VII y XV mostraron resultados similares con respecto a la comparación entre los distintos métodos. En ambos casos se obtuvo una agrupación consistente con los métodos ABGD, mPTP. Sin embargo, para ambos filotipos la delimitación mediante GMYC resultó en dos grupos en el conjunto de datos corto (Figura 20). No se observó esta distinción para el conjunto de datos largo, donde solo la delimitación mediante GMYC con umbral múltiple separó en dos subgrupos el filotipo

VII (Figura 21). Estos subgrupos incluyeron secuencias asociadas a *Stereocaulon alpinum* (14A y 1B), y *Stereocaulon glabrum* (28B y 91A). Por otro lado, el filotipo XV incluyó secuencias coincidentes con *P. cinnamomeum* (72A2_S) y a *P. hypnorum* (58A1, 60A1). En el conjunto de datos corto, la separación de subgrupos dentro de este filotipo también fue apoyada por el análisis de distancias genéticas en pares hasta 5% (Figura 20). En el conjunto de datos largo, la inclusión de secuencias unidireccionales al conjunto de datos largo influyó en la delimitación de grupos mediante GMYC para estos filotipos, aumentando así el soporte de la determinación (Figura 21).

El filotipo IX, con todas las secuencias asociadas a *S. intricata* con alto porcentaje de cobertura e identidad (>98% en ambos casos), mostró un consenso en la separación de grupos con los distintos métodos para el conjunto de datos corto (Figura 20). Para el conjunto de datos largo, solo el método de ABGD separó los dos *clusters* dentro del filotipo IX separados con un nodo con alto soporte (*bootstrap* de 100) (Figura 21). En ambos casos, la separación por distancias 0.5% también resultó en dichos subgrupos.

Finalmente, el filotipo II resultó en discordancias en la delimitación de grupos mediante ABGD y GMYC con umbral único para el conjunto de datos corto (Figura 20). Sin embargo, en vista del consenso de los métodos mPTP, GMYC con umbral múltiple y la separación por distancias genéticas 5%, estas secuencias fueron determinadas en un mismo filotipo. La única muestra agrupada aparte con ABGD (54A3) correspondió a una secuencia asociada con *O. frígida* con bajos porcentajes de cobertura e identidad (98%) (Figura 20). Esta separación no se observó en el conjunto de datos largo.

5.6. Evaluación del código de barras de ADN para el conjunto de datos

A fin de emplear los análisis de evaluación del código de barras de ADN, se determinaron los valores del umbral óptimo promedio y el umbral local mínimo para los dos conjuntos de datos como se indica en la metodología. Para el conjunto de datos corto, se encontraron valores de umbral óptimos en el rango de 0.038 a 0.041, con un

promedio de 0.0395; y un valor de umbral local mínimo de 0.0247. El conjunto de datos largo mostró un rango de valores óptimos de 0.017 a 0.024, con un promedio de 0.0205; mientras que el valor de umbral local mínimo fue 0.0195. El rango de valores de umbral óptimos para el conjunto de datos corto no mostró ninguna imprecisión de identificación, a diferencia del conjunto de datos largo (Figuras 22A y B). Por otro lado, las gráficas de densidad de distancias genéticas en pares fueron similares para ambos conjuntos de datos, pero el conjunto de datos largo resultó en algunas distancias situadas en el *gap* entre las distancias intraespecíficas e interespecíficas, lo cual explica la diferencia entre los valores de umbral local mínimo encontrados para ambos conjuntos de datos (Figuras 22C y D).

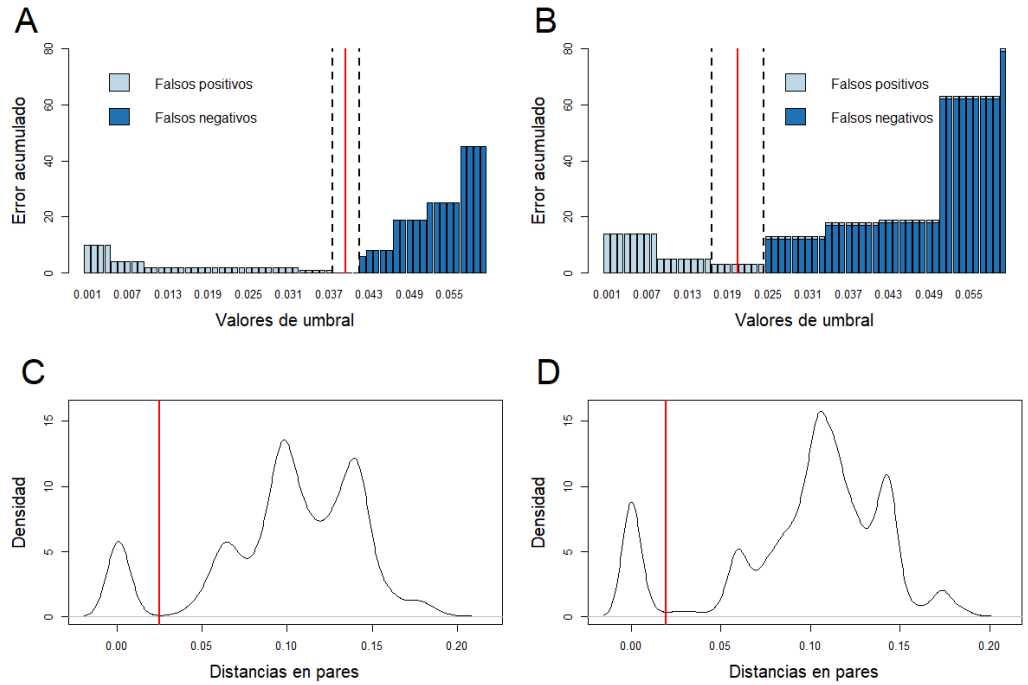


Figura 22.- Valores de umbral para las pruebas de eficacia del código de barras de ADN. Se muestran los resultados de la determinación del rango de valores de umbral óptimos para (A) el conjunto de datos corto (rango: 0.038 – 0.041, promedio: 0.0395), y (B) el conjunto de datos largo (rango: 0.017 – 0.024, promedio: 0.0205); así como del umbral local mínimo para (C) el conjunto de datos corto (valor: 0.0247), y el conjunto de datos largo (valor: 0.0195). Las líneas punteadas representan los límites del rango de valores óptimos y las líneas rojas el valor óptimo promedio o el valor del umbral local mínimo.

Las pruebas de eficacia del código de barras de ADN con los tres análisis resultaron en altos porcentajes de identificaciones filotípicas correctas para ambos conjuntos de datos (Cuadro 12).

Cuadro 12.- Resultados de las pruebas de eficacia del código de barras de ADN para los dos conjuntos de datos con el análisis de vecino más cercano (*near neighbour*), mejor coincidencia cercana (*best close match*), y el análisis basado en el establecimiento de un umbral (*threshold identification*).

Conjunto de datos*	N° Seqs	Vecino cercano		Mejor coincidencia cercana / Umbral			
		Nombre igual	Nombre distinto	Umbral óptimo		Umbral local mínimo	
				Correcto	No id	Correcto	No id
Corto	71	67 (94.4%)	4 (5.6%)	67 (94.4%)	4 (5.6%)	65 (91.6%)	6 (8.4%)
Largo	110	108 (98.2%)	2 (1.8%)	105 (95.5%)	5 (4.5%)	105 (95.5%)	5 (4.5%)

*Para ambos conjuntos de datos se muestran conteos y porcentajes excluyendo las 29 secuencias públicas agregadas en el alineamiento.

Para el conjunto de datos corto, los tres análisis dieron los mismos resultados cuando se usó el umbral óptimo, con 67 identificaciones correctas (94.4%) y 4 asignaciones incorrectas (5.6%) correspondientes a las muestras 66A1, 49C, 62A4 y 24C. Al establecer el umbral local mínimo, dos muestras más mostraron una identificación incorrecta (72A2_S y 54A3). En cambio, en el conjunto de datos largo, no se encontraron diferencias al establecer el umbral óptimo o el umbral local mínimo. El resultado para el conjunto de datos largo fue de 105 identificaciones correctas (95.5%) y 5 incorrectas (4.5%) correspondientes a las muestras 48F1, 69A3, 72A2_S, 24C y 51A6. Sin embargo, con el análisis de vecino cercano se lograron 108 identificaciones correctas (98.2%), y solo 2 identificaciones incorrectas de las muestras 24C y 51A6. Las diferencias en los resultados con los distintos umbrales para el conjunto de datos corto, son explicadas por el valor del umbral local mínimo (0.0247), el cual se encuentra por debajo del rango óptimo (0.038-0.041). Por otro lado, para el conjunto de datos largo, donde el umbral local mínimo (0.0195) se sitúa dentro del rango de umbrales óptimos (0.017-0.024), no hubo diferencias entre los análisis con establecimiento de umbrales.

Entre los especímenes que no pudieron ser identificados con las pruebas de eficacia del código de barras de ADN, el conjunto de datos corto incluyó los únicos 4 filotipos “singletons” (IIIB, XII, XIII y XVI), es decir filotipos representados por una sola secuencia (Figura 20). De la misma manera, en el conjunto de datos largo, solo las

muestras de los filotipos XII y XIV, los cuales permanecieron como “singletons” tras la adición de las secuencias unidireccionales, no pudieron ser identificados (Figura 21). Sin embargo, en el conjunto de datos corto empleando el umbral local mínimo, los análisis también fallaron en identificar las muestras 54A3 y 72A2_S, correspondientes a los filotipos II y XV, respectivamente. De igual manera, en el conjunto de datos largos, los análisis con umbrales fallaron en identificar a la muestra 72A2_S, pero también a las muestras 48F1 y 69A3, correspondientes a los filotipos V y VIII, respectivamente.

La muestra 54A3 fue situada en el mismo filotipo II con secuencias asociadas a *O. frigida* que mostraron un alto porcentaje de cobertura e identidad (100% y 99.9%, respectivamente). En cambio, la coincidencia de BLAST fue menos confiable para esta secuencia, con bajos porcentajes de cobertura e identidad (98% en ambos casos) (Figura 20). Aún más, la secuencia también estuvo asociada a un hongo no liquenizado no cultivado (KC965437.1), con un puntaje de BLAST cercano al de la coincidencia principal. Por otro lado, la secuencia 72A2_S, también mostró diferencias con respecto a las otras dos secuencias del filotipo XV asociadas a *P. hypnorum*, tanto en una mayor longitud (706 vs. 486), como un menor porcentaje de cobertura (98% vs. 100%) e identidad (84.8% vs. 100%) (Figura 20). Los electroferogramas en ambas direcciones para las muestras 54A3 y 72A2_S no mostraron señales de contaminación o ruido, sino que resultaron en picos discretos y limpios. Con respecto a la muestra 48F1, presente solo en el conjunto de datos largo en el filotipo V, estuvo asociada a *L. polytropa* con altos porcentajes de cobertura e identidad (100% y 99.7%, respectivamente) y formó un solo *cluster* bien soportado (98.4 de *bootstrap*) con las otras secuencias del mismo filotipo asociadas a especies del género *Lecanora* y *Rhizoplaca*. Un indicio de la peculiaridad de esta muestra puede verse en el análisis de discriminación de grupos por distancia genética, donde es la única en el filotipo V que se diferencia de las demás secuencias, incluyendo públicas, hasta con un 5% de distancia genética en pares (Figura 21). Esta delimitación fue replicada con el método de ABGD, pero no con mPTP

ni GMYC. En cuanto a la muestra 69A3, asociada a *L. granulata* con alto porcentaje de cobertura e identidad (100% y 97.4%, respectivamente), a pesar de que fue delimitada en un mismo filotipo VIII con 3 secuencias públicas (2 de *Lepraria* sp. y 1 de *L. granulata*) para ambos conjuntos de datos (Figuras 20 y 21), no pudo ser identificada solo para el conjunto de datos largo.

Este resultado distinto con ambos conjuntos de datos resalta el efecto de la adición de secuencias unidireccionales. Al aumentar el número de secuencias se modifica el alineamiento y se altera el patrón de sitios no ambiguos. Esto puede ser beneficioso si se adicionan secuencias con las mismas características (en relación a longitud y calidad de secuenciación). En cambio, cuando las secuencias adicionales tienen varios gaps o nucleótidos mal designados, se reduce el número de sitios no ambiguos. Para confirmar esta idea, se realizó un alineamiento entre las secuencias del filotipo VIII, la secuencia de 69A3 completa, y las secuencias parciales de la secuencia 69A3 correspondientes a los conjuntos de datos corto y largo. Se encontraron 2 sitios de variación cortados en ambos conjuntos de datos (139A/C y 142A/C), 2 cortados en el conjunto de datos corto (109T/C y 211C/A), y 2 en el conjunto de datos largo (33T/C y 142A/C). Esta pérdida de información es inevitable al realizar análisis de un solo marcador en conjuntos de datos florísticos que abarcan especies de grupos muy distantes.

5.6.1. Evaluación de los resultados de identificación morfológica

Paralelamente a la estandarización e implementación de los métodos de biología molecular, se seleccionaron 20 muestras para la identificación mediante caracteres fenotípicos por un especialista en líquenes, quien por su experiencia y uso de métodos de evaluación de caracteres diagnóstico de hongos liquenizados, es capaz de identificar de manera más precisa que un investigador no especializado en líquenes. Esta evaluación resultó en 19 determinaciones, 14 hasta el nivel de especie y 5 hasta género.

Con respecto al procesamiento molecular, solo pudieron obtenerse códigos de barras de ADN de hongos liquenizados para 11 de estas muestras (Cuadro 13).

Cuadro 13.- Comparación de evaluaciones morfológicas e identificación molecular de líquenes. La descripción preliminar fue realizada por un investigador no especializado en líquenes. En la identificación molecular se muestra el resultado usando BLAST y el *cluster* formado tras los análisis de discriminación filotípica. En verde y rojo se muestran las identificaciones coincidentes y no coincidentes, respectivamente.

Código de muestra	Descripción preliminar	Identificación molecular					Identificación morfológica
		Código de acceso (BLAST)	%C	%I	Nombre	Cluster (Filotipo)	
24B	*Candelariella*	MZ919298.1	100	99.1	*Candelariella flava isolate*	XVIII	*Chrysothrix chlorina* (Ach.) J.R. Laundon
52A4	*Usnea aurantiacoatra*	KX147253.1	100	100	*Usnea aurantiacoatra isolate*	IV	*Usnea aurantiacoatra* (Jacq.) Bory
58A1	*Psoroma* sp.	GQ927297.1	100	100	*Psoroma hypnorum voucher*	XV	*Psoroma hypnorum* (Vahl) Gray
60A1	*Psoroma* sp.	DQ534474.2	100	100	*Psoroma hypnorum voucher*	XV	*Psoroma hypnorum* (Vahl) Gray
61A1	Similar a *Stereocaulon*	DQ534474.2	100	100	*Ochrolechia frigida*	-	*Stereocaulon alpinum* var. Glabrum Müll. Arg.
61A4	Crustoso gris	KP314449.1	100	100	*Ochrolechia frígida*	-	*Lecidea* sp. 1
61A5	Similar a *Stereocaulon*	DQ219304.1	100	99.8	*Ochrolechia frigida*	II	*Stereocaulon alpinum* var. Glabrum Müll. Arg.
69A1	*Placopsis antárctica*	MH670329.1	100	100	*Placopsis antarctica voucher*	XVII	*Placopsis antarctica* D.J. Galloway, Lewis-Sm. & Quilhot
75A2	Crustoso amarillo	MH717153.1	100	98.3	*Steinera intricata isolate*	IX	*Lecidea* sp. 2
80A2	*Placopsis antárctica*	MH670325.1	100	100	*Placopsis antarctica voucher*	XVII	*Placopsis antarctica* D.J. Galloway, Lewis-Sm. & Quilhot
93A	*Umbilicaria* sp.	AY603134.1	100	99.6	*Umbilicaria krascheninnikovii voucher*	IIIA	*Umbilicaria decussata* (Vill.) Zahlbr.

%C=Porcentaje de cobertura con la coincidencia principal. %I=Porcentaje de identidad con la coincidencia principal.

Cuatro muestras no pudieron ser no pudieron ser identificadas molecularmente ya que, a pesar de tener una buena concentración y calidad de ADN, no pudieron ser amplificadas por PCR (60A3, 63A1, 77A3, 88A). Una muestra correspondiente a la especie confirmada *X. elegans* (67A2), mostró una banda única que fue secuenciada, pero resultó en picos dobles en el electroferograma, posiblemente por la presencia de un hongo secundario, cuyo ITS es de la misma longitud. Adicionalmente, cinco muestras fueron asociadas a secuencias de hongos no liquenizados (48C, 52A2, 58A1, 62A2, 63A2). Tres de estas muestras mostraron bandas múltiples en las que se aislaron las

dos bandas presentes en el carril de electroforesis, pero solo en uno de los casos, uno de los amplicones correspondió a un hongo liquenizado (58A1).

Hubo una coincidencia en la identificación morfológica y molecular hasta el nivel de especie para 5 muestras (52A2, 58A1, 60A1, 69A1, 80A2). Las muestras correspondientes a *U. aurantiacoatra* (52A4) y *P. antárctica* (69A1, 80A2) mostraron una morfología fácilmente discernible de especies cercanas, por lo que pudieron ser identificadas en la descripción preliminar en líquenes. Las otras dos coincidencias correspondieron a especímenes de *P. hypnorum* (58A1, 60A1), las cuales se colectaron con talos pequeños y apotecios oscuros grandes, dando la apariencia de ser apotecios sueltos. Mientras que en la descripción preliminar de las muestras se notó la similitud de estos especímenes con *P. hypnorum*. La existencia de otras especies de este género reportadas en Antártica requirió una confirmación morfológica por un especialista o mediante métodos moleculares.

Para la única muestra de tipo folioso (93A) identificada morfológicamente, la coincidencia entre las identificaciones fue hasta el nivel de género. Mientras que el espécimen descrito preliminarmente como *Umbilicaria* sp. fue identificado mediante caracteres morfológicos como *U. decussata*, el marcador de código de barras fue asociado con un porcentaje de cobertura e identidad de 100% y 99.59%, respectivamente, con el marcador de una muestra voucher de *U. krascheninnikovii*. La morfología de *U. krascheninnikovii* es similar a la de *U. decussata*, siendo la principal diferencia que la superficie inferior de la última está cubierta de propágulos asexuales (taloconidios) ausentes en *U. krascheninnikovii* (Krzewicka y Smykla, 2004). De la misma manera que en otras especies pares, en las que la única diferencia morfológica es el tipo de reproducción, es probable que correspondan a linajes monofiléticos o que un solo marcador no sea suficiente para separarlas molecularmente. Esto es apoyado por el hecho de que la secuencia también está asociada con menor puntaje a *U. decussata* con un porcentaje de identidad mayor a 97%. De la misma manera, el

repositorio de secuencias fúngicas curadas UNITE, guarda la secuencia de *U. krascheninnikovii* bajo el nombre de *U. decussata* y la ubica dentro de la misma hipótesis de especie junto con otras secuencias de *U. decussata* publicadas de manera independiente, con valores de distancia mínima mayores de 1.5% a 3%.

Se encontró una discordancia entre las identificaciones por ambos métodos para cuatro muestras (61A1, 61A4, 61A5, 75A2). Dos muestras inicialmente descritas como similares a *Stereocaulon* sp. (61A1, 61A5) fueron identificadas morfológicamente como *S. alpinum*, sin embargo, el marcador de código de barras fue asociado a *O. frigida* con puntajes similares, y porcentajes de cobertura e identidad de 100% y 99%, respectivamente. Para estas muestras, la búsqueda de BLAST también tuvo coincidencias secundarias con una secuencia registrada el 2005 proveniente de *O. tartarea*; sin embargo, esta podría ser una identificación errónea, ya que esta secuencia se ubica en una hipótesis de especie con secuencias de *O. frigida* en UNITE con valores de distancia mínima de 0.5% a 3.0%. Esto sugiere una inestabilidad taxonómica para el género; es decir la falta de un consenso, o un cambio acelerado en la clasificación de especies con taxonomía compleja, lo cual a su vez puede conllevar al registro de especímenes de la misma especie bajo nomenclaturas distintas (ver Beninger y Backeljau, 2019). Al respecto, el género de líquenes crustosos *Ochrolechia* parece ser complejo de delimitar, con algunas especies que inicialmente fueron incluidas en otros géneros como *Lecanora* y *Rinodina* (Howard, 1970). Más recientemente, análisis filogenéticos han permitido corregir identificaciones de *O. tartarea* y *O. frígida* mediante caracteres fenotípicos a otras especies del mismo género (Park et al., 2019). Durante la descripción preliminar de este trabajo se descartó el género *Ochrolechia* debido a que los especímenes no mostraron apotecios y crecieron tomando como sustrato briofitas, dando la apariencia de ser líquenes fruticosos elevados con su propio talo. Estos especímenes fueron descritos como similares a *Stereocaulon*, por ser una especie de distribución común en Antártica y por su apariencia a modo de nieve. La revisión

posterior de los especímenes permitió confirmar la identificación de *O. frígida* por la presencia de apéndices blancos pequeños a modo de espinas típicas de la especie, aunque la ausencia de apotecios mostró ser un obstáculo para la identificación morfológica (Spielmann y Pereira, 2012).

La muestra con descripción inicial “crustoso gris” (61A4) fue identificada morfológicamente como *Lecidea* sp. 1, sin embargo, el marcador de código de barras de ADN fue idéntico a una secuencia correspondiente a *O. frigida*. A diferencia de las otras muestras con secuencias asociadas a esta especie (61A1, 61A5), esta creció sujeta a una roca y no mostró apotecios, por lo que no fue descrita como “similar a *Stereocaulon*”. Una de las características de *O. frígida* es su crecimiento encima de musgos, a diferencia de *O. parella* que crece sobre rocas, por lo que esta muestra podría indicar que el modo de crecimiento de *O. frígida* no es exclusivamente en musgos (Spielmann y Pereira, 2012). En vista que esto puede dificultar la identificación de los líquenes, se sugieren análisis complementarios que incluyan más marcadores moleculares para encontrar la significancia taxonómica de este hallazgo. Por otro lado, es importante notar que las tres muestras asociadas molecularmente a *O. frígida* provienen de una misma bolsa de colecta, lo que puede levantar sospechas sobre contaminación cruzada por esporas o una mala separación de tejidos durante la preparación de muestras. Mientras que esta idea es posible, es poco probable debido a que la extracción de ADN fue general, y en presencia de más de un hongo, la secuenciación habría resultado en picos dobles o múltiples. Por otro lado, otras muestras si fueron correctamente descritas e identificadas molecularmente como *Stereocaulon* (14A, 28B, 1B, 91A), por lo que es más probable que la discordancia entre los métodos de identificación se haya debido a la dificultad de la identificación por caracteres fenotípicos (ausencia de algunos caracteres de diagnóstico y el crecimiento en un sustrato no reportado previamente), que a una contaminación cruzada.

La muestra descrita como “crustoso amarillo” (75A2), fue identificada morfológicamente como *Lecidea* sp., mientras que el marcador ITS indicó que se encontraba asociada a *S. intricata* con porcentajes de cobertura e identidad de 100% y 98.3%, respectivamente. *S. intricata* es una especie que ocupa varios sustratos incluyendo otros líquenes, lo que se ve reflejado en que 5/7 secuencias identificadas molecularmente como *S. intricata* fueron obtenidas de muestras con bandas múltiples. En 3 de estas muestras con bandas múltiples se secuenciaron todas las bandas a lo largo del carril. En dos de ellas, la banda secundaria perteneció a otro hongo liquenizado. Dado que para la muestra 75A2, solo se secuenció una de las bandas, es probable que no se haya evaluado la secuencia correspondiente al liquen identificado morfológicamente como *Lecidea* sp., sino que a un hongo secundario. Esto es probable en vista de que, aunque *S. intricata* es de tipo crustoso, su talo es reportado como irregular y oscuro, en contraste con la coloración amarilla y clara de la muestra 75A2.

Finalmente, la muestra 24B descrita como *Candelariella* mostró resultados de identificación discordantes. Mediante el código de barras de ADN, esta muestra se identificó como *C. flava*, mientras que mediante caracteres fenotípicos se reconoció como *Chrysothrix chlorina*. Ambas especies son crustosas, de color amarillo brillante, y tienen una distribución que incluye Antártica; sin embargo, *C. chlorina* se caracteriza por ser pulverulenta, mientras que *C. flava* presenta talos que van desde indistintos a areolados y pulverulentos (CNALH, 2022). Estas similitudes en el tipo de talo, junto con la coloración, pueden haber dificultado la identificación morfológica. Por otro lado, se han reportado diferencias en la química de los compuestos secundarios de especies del género *Candelariella* y *Chrysothrix* (Laundon, 1981).

6. DISCUSIÓN

En este estudio se estandarizó una metodología de extracción de ADN genómico y amplificación del marcador del código de barras fúngico, nrITS, de hongos liquenizados. Esta metodología estandarizada fue implementada en 305 muestras a fin de evaluar la utilidad del uso del código de barras para la identificación de hongos liquenizados de la Isla Rey Jorge, Antártica.

En la primera evaluación de métodos convencionales de extracción de ADN se usaron tres protocolos distintos, pero solo el propuesto por Cubero y Crespo (2002) resultó en ADN amplificable para todas las muestras. De manera similar a las plantas, los líquenes se caracterizan por contener moléculas problemáticas durante la extracción de ADN, como los compuestos fenólicos y polisacáridos. Si estos no son removidos, pueden interferir con posteriores procesos moleculares (Schrader et al., 2012; Rossen et al., 1992). Los resultados sugieren que, en este trabajo, estos compuestos no fueron removidos efectivamente para la mayoría de muestras evaluadas con los protocolos propuestos por Park et al. (2014), y Martín y Winka (2000). Esto podría explicarse por las modificaciones realizadas en todos los casos. Además, aunque las muestras fueron almacenadas a temperatura constante y libres de humedad, el tiempo transcurrido entre la colecta y la evaluación pudo haber influenciado los resultados. Al respecto, varios estudios han explorado la respuesta fisiológica al estrés, incluyendo la desecación en plantas, y en menor extensión en hongos y líquenes (Beckett et al., 2008; Albergaria et al., 2020; Orosz et al., 2018; Rangel et al., 2015). Mientras que se conoce la considerable tolerancia a la desecación de los líquenes, los mecanismos involucrados en la protección o reparación de los organismos socios, al igual que en plantas, pueden involucrar una respuesta a especies reactivas de oxígeno mediante alcaloides, flavonoides y otros compuestos fenólicos (Beckett et al., 2008). Adicionalmente, los compuestos fenólicos y polisacáridos varían en cantidad y calidad en los diferentes grupos de líquenes, y en cada organismo socio (Zagoskina et al., 2013; Karunaratne

et al., 2014; Elix y Stocker-Wörgötter, 2008). Por otro lado, en el protocolo de Cubero y Crespo (2002), a diferencia de los otros dos protocolos en la evaluación inicial, se emplea PVP, el cual tiene un rol importante en la unión y remoción de compuestos fenólicos, y puede haber sido determinante para el mejor resultado de este protocolo (Guttman y Higuchi, 1956).

Es importante señalar que los tres protocolos de extracción de ADN evaluados han sido reproducidos exitosamente por varios autores, incluso para estudios a escala genómica (Kondratyuk et al., 2014, 2015; Alonso-García et al., 2021; Zakeri et al., 2019; Moya et al., 2020; Singh et al., 2013; Lagostina et al., 2017; Zakeri et al., 2017; entre otros). Sin embargo, existen múltiples factores adicionales a los mencionados más arriba que dificultan la comparación entre los resultados de extracción. Entre estos factores se incluyen las especies evaluadas, las modificaciones propias de cada laboratorio (solo en algunos casos reportadas en detalle), y los reactivos empleados. Por ejemplo, en una prueba exploratoria (datos no mostrados), el uso de la enzima Hot Start Taq DNA Polimerasa resultó en un producto de PCR de alta intensidad para 16 muestras aleatorias extraídas con el protocolo de Park et al. (2014), que habían resultado negativas usando la enzima GoTaq Flexi DNA Polimerasa. En ese sentido, este trabajo no descarta la eficacia de los protocolos de Park et al. (2014), y Martín y Winka (2000), sino que resalta la capacidad del protocolo estandarizado derivado de Cubero y Crespo (2002), de rendir ADN amplificable bajo las condiciones evaluadas.

El protocolo optimizado de PCR tuvo modificaciones menores con respecto al protocolo general. La amplificación por PCR con condiciones subóptimas provoca la aparición de artefactos como productos inespecíficos, o una banda tenue o invisible (Innis et al., 2012). Es importante resaltar que las condiciones finales fueron óptimas con la enzima empleada, la cual no fue variada debido a límites presupuestales. El uso de enzimas con mayor eficiencia podría dar un mejor resultado sin la necesidad de una optimización minuciosa, particularmente para la amplificación de regiones abundantes

en el genoma del organismo en estudio como es el marcador nrITS. La cantidad de ADN molde es un factor determinante para la presencia de artefactos y el éxito de amplificación; sin embargo, no se exploró esta variable durante la optimización del protocolo debido a que el ADN genómico extraído fue una mezcla de los dos o más organismos que constituyen la simbiosis. Si bien esto no permitió controlar la cantidad inicial de ADN del micobionte, no interfirió con la amplificación del marcador debido a que se usaron cebadores específicos de Fungi.

La implementación de la metodología de manipulación de ADN al total de muestras permitió tener una mejor idea de la universalidad de estos protocolos. En este trabajo, 47/67 muestras para las que no se pudo obtener ADN genómico en cantidad adecuada fueron líquenes crustosos con una muy baja cantidad de material inicial (< 3.6 mg). Esto indica que este tipo de muestras escasas podría necesitar una técnica de extracción más sensible o una estandarización específica. Por otro lado, las muestras con PCR negativa (14.3%) no estuvieron asociadas a algún tipo de liquen o característica de los especímenes en particular. Por lo tanto, la falta de amplificación para estas muestras podría reflejar las limitaciones de la enzima y la técnica usada en este trabajo. A pesar de haberse optimizado el protocolo de PCR, varios estudios han mostrado distintas eficiencias de amplificación usando diferentes enzimas o técnicas de amplificación, como el uso de perlas de PCR (Martín y Winka, 2000; McInerney et al., 2014; Milla, 2015).

Todas las muestras con secuenciación exitosa fueron asociadas a Fungi, demostrando la especificidad del par de cebadores ITS1-F e ITS4, el cual es ampliamente empleado para estudiar líquenes. Se han descrito otras combinaciones de cebadores para el marcador ITS fúngico con resultados similares, y en algunos casos se han diseñado cebadores para grupos particulares de hongos liquenizados (White et al., 1990; Vialle et al., 2009; Gardes y Bruns, 1993; Gargas y Taylor, 1992).

Se conoce que los talos liquénicos guardan una gran diversidad de hongos no liquenizados epiliquénicos o endoliquénicos, así como otros líquenes liquenícolas (Honegger, 2012). Se han realizado estudios metagenómicos en Antártica que han revelado la comunidad fúngica y microbiana asociada a los talos liquénicos (Park et al., 2015; Coleine et al., 2018). Al respecto, en este trabajo varias muestras tuvieron bandas múltiples o bandas únicas que al ser secuenciadas mostraron estar compuestas por dos o más secuencias, lo cual confirma la presencia de hongos secundarios. Asimismo, se identificaron hongos contaminantes como lo del género *Aspergillus*. Estos hongos son cosmopolitas y tolerantes al frío, por lo que se encuentran incluso en la atmósfera antártica (Rosa, 2019; Rosa et al., 2021). El almacenamiento en la BAP Carrasco y el tiempo desde la colecta hasta el procesamiento molecular puede haber propiciado el crecimiento y frecuencia relativamente alta de estos hongos secundarios en el presente estudio.

Para aislar el código de barras del hongo liquenizado en muestras con bandas múltiples se puede cortar y purificar la banda correspondiente al micobionte, pero se requiere conocer previamente el tamaño teórico del amplicón. En cambio, para amplicones de la misma longitud provenientes de hongos distintos de la misma muestra, alternativas como la clonación de fragmentos y el uso de geles de electroforesis denaturantes podrían ayudar en la detección y separación de secuencias.

En algunos casos, los electroferogramas de secuenciaciones exitosas mostraron picos dobles en sitios específicos, lo que sugiere la presencia de polimorfismos. Este hecho se conoce como variabilidad intragenómica, y se refiere a la existencia de copias distintas dentro del mismo genoma, lo cual podría confundir los estimados de variabilidad y la efectividad de la identificación (Schoch et al., 2012). Al respecto, se ha estudiado la variabilidad intragenómica del marcador ITS y su posible influencia en el uso de este marcador como código de barras de ADN. Por ejemplo, Bradshaw et al. (2020) no encontraron algún efecto en la identificación de especímenes del complejo de

especies *Rhizoplaca melanophthalma* debido a la variación intragenómica del marcador ITS. Sin embargo, dado que el grado de variación intragenómica difiere entre distintos grupos de hongos, su efecto debe ser considerado al estudiar otros grupos de líquenes particulares (Schoch et al., 2012; Mark y Cornejo y et al., 2016). Finalmente, en varias especies de plantas, no se reportaron dificultades en la identificación debido a la variación intragenómica (Song et al., 2012).

La delimitación de grupos mediante distintos métodos permitió la determinación robusta de filotipos. El uso de un umbral único es el método más simple, pero su aplicación es limitada en niveles taxonómicos amplios, como las del presente trabajo. Todos los métodos resultaron en un número de grupos cercano a la cantidad de filotipos determinados, con excepción del método basado en el modelo GMYC. Al respecto, es probable que la delimitación de especies con el método GMYC se haya visto influenciada por la aplicación a un nivel taxonómico amplio, y el poco número de especies por nivel taxonómico (Talavera et al., 2013). Por otro lado, el método basado en árboles, mPTP, resultó en una delimitación precisa para el mismo conjunto de datos, lo cual resalta su robustez en comparación con el método GMYC.

Los métodos de evaluación del código de barras de ADN permitieron verificar la efectividad de su uso para la identificación de líquenes antárticos. Como se esperaba, no se tuvo una identificación de filotipos conformados por una sola secuencia. Las muestras correspondientes a filotipos conformados por más de una secuencia y que no pudieron ser identificadas se diferenciaron del resto de secuencias en el mismo filotipo por tener bajos porcentajes de identidad y cobertura en BLAST. Este resultado sugiere que la inclusión de un mayor número de individuos podría separar estas muestras en filotipos distintos.

En general, el descubrimiento de códigos de barras nuevos para las bases de datos sugiere que los especímenes estudiados corresponden a especies nuevas, o especies previamente descritas pero no estudiadas molecularmente (DeSalle y

Goldstein, 2019). De cualquier modo, este tipo de hallazgo debe ser acompañado de una determinación taxonómica con caracteres fenotípicos. En este trabajo, la falta de asociación en BLAST de un grupo de muestras indicó que estas no han sido registradas previamente en las bases de datos, es decir, son códigos de barras nuevos. Esta hipótesis se vio apoyada por los resultados de delimitación filotípica, donde códigos de barra desconocidos se agruparon entre sí, o se diferenciaron de las secuencias públicas añadidas.

Con respecto al método de colecta usado en este trabajo, se realizó una colecta indiscriminada y desigual de líquenes, descrita por Kelly et al. (2011) como “florística”. Al igual que en su trabajo, se confirmó la utilidad del código de barras de ADN en la discriminación de especies en especies ampliamente divergentes. Por otro lado, las colectas de tipo “taxonómico” son más rigurosas en el muestreo, pero permiten evaluar hipótesis de especie previamente establecidas, confirmándolas o revelando nuevos grupos crípticos. Uno de los pocos trabajos florísticos en Antártica, realizado por Pérez-Ortega et al. (2012) en la Isla James Ross, resultó en varios líquenes no reportados en este estudio. Esto puede deberse a que en este caso se evitó la colecta de líquenes de rara ocurrencia. Kim et al. (2006) también realizaron una colecta de tipo florístico en la Isla Rey Jorge; sin embargo, su trabajo no incluyó métodos de delimitación filotípica, y su identificación mediante BLAST tuvo poco éxito probablemente por el poco avance de las bases de datos en el momento. En ambos casos, la diversidad de líquenes encontrados fue distinta, posiblemente por la heterogeneidad de la colecta para este estudio.

Finalmente, la comparación con la identificación fenotípica mostró casos en los que la similitud morfológica del liquen puede confundir un diagnóstico preciso. En estos casos, el código de barras de ADN fue asociado a un nombre de especie distinto con altos porcentajes de cobertura e identidad. Aunque, al igual que otros métodos, existen varios obstáculos en la manipulación del ADN que pueden confundir la identificación si

no son tomados en cuenta, ambas identificaciones deben ser consideradas en evaluaciones posteriores que identifiquen caracteres de diagnóstico excluyentes entre las dos especies identificadas.

En este trabajo, la estandarización e implementación de métodos moleculares resultó en un conjunto de datos que permitió confirmar la efectividad del código de barras de ADN. De este modo, el código de barras de ADN demostró ser una herramienta efectiva para la identificación de líquenes de la isla Rey Jorge, y se evidenció su papel complementario para la confirmación o corrección de identificaciones fenotípicas en especímenes de diagnóstico complejo. Debido a su capacidad de identificación rápida y precisa de hongos liquenizados, el empleo del código de barras de ADN tiene una gran relevancia para estudios de carácter investigativo y aplicativo en Antártica.

7. CONCLUSIONES

- La metodología estandarizada en este trabajo es universal y efectiva para el procesamiento molecular de líquenes antárticos de la isla Rey Jorge, con el 80% de ADN genómico con buenos parámetros de cuantificación, y un 83% de amplificaciones positivas.
- El análisis de secuencias empleado permitió la determinación y evaluación de filotipos robustos a partir de un grupo florístico, los cuales fueron corroborados con múltiples métodos de discriminación filotípica.
- El código de barras de ADN es una herramienta útil para la identificación rápida y precisa de hongos liquenizados de la isla Rey Jorge, Antártica, con un alto porcentaje de identificaciones filotípicas correctas.
- La identificación morfológica es positivamente complementada con el uso del código de barras de ADN, permitiendo confirmar o corregir diagnósticos complejos.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar una colecta florística más extensiva y homogénea, a fin de evitar la presencia de secuencias “singleton” o poco representadas, y tener una asignación de filotipos más precisa.
- Realizar los procedimientos de extracción de ADN por duplicado, y emplear un kit comercial u otro protocolo más específico en el caso de muestras de cantidad escasa.
- Usar y optimizar una enzima más eficiente para la amplificación por PCR, como Hot Start Taq, para la obtención de un mayor porcentaje de éxito de amplificación.
- Emplear técnicas complementarias a la PCR para la separación y secuenciación de amplicones múltiples, o polimorfismos de la misma longitud que pueden surgir por la presencia de hongos secundarios.
- Realizar una revisión taxonómica exhaustiva de los especímenes en los filotipos X, XI, XII y XV, pues representan secuencias nuevas para las bases de datos de ADN.
- Realizar una revisión fenotípica de los especímenes que mostraron una discordancia en la identificación fenotípica y molecular, a fin de encontrar nuevos caracteres diagnósticos excluyentes o corregir el diagnóstico.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERGARIA, Edward Teixeira, OLIVEIRA, Antônio Fernando Morais and ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino, 2020. The effect of water deficit stress on the composition of phenolic compounds in medicinal plants. *South African Journal of Botany*. 131:12-17. DOI 10.1016/j.sajb.2020.02.002.

ALONSO-GARCÍA, Marta, GREWE, Felix, PAYETTE, Serge and VILLARREAL A., Juan Carlos, 2021. Population genomics of a reindeer lichen species from North American lichen woodlands. *American Journal of Botany*. 2021. 108:159-171 no. 1. DOI 10.1002/ajb2.1601.

ALORS, David, LUMBSCH, H. Thorsten, DIVAKAR, Pradeep K., LEAVITT, Steven D. and CRESPO, Ana, 2016. An integrative approach for understanding diversity in the *Punctelia rudecta* species complex (Parmeliaceae, Ascomycota). *PLoS ONE* Vol.11, no. 2. DOI 10.1371/journal.pone.0146537.

ARMSTRONG, Richard A., 2017. Adaptation of Lichens to Extreme Conditions. En: SHUKLA, Vertika, KUMAR, Sanjeev and KUMAR, Narendra (eds.), *Plant Adaptation Strategies in Changing Environment*. Singapore: Springer. p. 1-27. ISBN 978-981-10-6744-0. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6744-0_1

BARGAGLI, Roberto, 2016. Moss and lichen biomonitoring of atmospheric mercury: A review. *Science of the Total Environment*. 572:216-231. DOI 10.1016/j.scitotenv.2016.07.202.

BECKETT, R. P., KRANNER, I. and MINIBAYEVA, F. V., 2008. Stress physiology and the symbiosis. En: *Lichen Biology*. 2:152-181. ISBN-13, 978-0-511-41407–7.

BENAVENT, Isaac Garrido, 2017. *Filogeografía y biología de líquenes Antártidos* [en línea]. Universidad Complutense de Madrid. Recuperado a partir de: https://eprints.ucm.es/45651/

BENINGER, Peter G. and BACKELJAU, Thierry, 2019. Understanding taxonomic and nomenclatural instability – a case study of the Manila clam. *Aquaculture*. 504:375-379. DOI 10.1016/j.aquaculture.2019.02.016.

BERGMANN, T., 2019. *Character-based barcoding, a symbiosis and potential successor of traditional taxonomy and modern DNA barcoding*. Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover. Recovered from: https://www.repo.uni-hannover.de/handle/123456789/4568

BEYER, Lothar and BÖLTER, Manfred, 2012. *Ecological Studies: Geoecology of Antarctic Ice-Free Coastal Landscapes*. ISSN, 0070–8356.

BOLUDA, C. G., RICO, V. J., DIVAKAR, P. K., NADYEINA, O., MYLLYS, L., MCMULLIN, R. T., ZAMORA, J. C., SCHEIDEGGER, C. and HAWKSWORTH, D. L., 2019. Evaluating methodologies for species delimitation: The mismatch between phenotypes and genotypes in lichenized fungi (*Bryoria* sect. *implexae*, Parmeliaceae). *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 42:75-100. DOI 10.3767/persoonia.2019.42.04.

BOUCKAERT, Remco, HELED, Joseph, KÜHNERT, Denise, VAUGHAN, Tim, WU, Chieh-Hsi, XIE, Dong, SUCHARD, Marc A., RAMBAUT, Andrew and DRUMMOND, Alexei J., 2014. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLOS Computational Biology*. 10:e1003537 no. 4. DOI 10.1371/journal.pcbi.1003537.

BRADSHAW, Michael, GREWE, Felix, THOMAS, Anne, HARRISON, Cody H., LINDGREN, Hanna, MUGGIA, Lucia, ST. CLAIR, Larry L., LUMBSCH, H. Thorsten and LEAVITT, Steven D., 2020.

Characterizing the ribosomal tandem repeat and its utility as a DNA barcode in lichen-forming fungi. *BMC Evolutionary Biology*. 20:2 no. 1. DOI 10.1186/s12862-019-1571-4.

BROWN, Samuel D. J., COLLINS, Rupert A., BOYER, Stephane, LEFORT, Marie-Caroline, MALUMBRES-OLARTE, Jagoba, VINK, Cor J. and CRUICKSHANK, Robert H., 2012. Spider: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*. 12:562-565 no. 3. DOI 10.1111/j.1755-0998.2011.03108.x.

CASIRAGHI, Maurizio, LABRA, Massimo, FERRI, Emanuele, GALIMBERTI, Andrea and MATTIA, Fabrizio de, 2010. DNA barcoding: A six-question tour to improve users' awareness about the method. *Briefings in Bioinformatics*. 11:440-453 no. 4. DOI 10.1093/bib/bbq003.

CASTRESANA, J., 2000. Selection of Conserved Blocks from Multiple Alignments for Their Use in Phylogenetic Analysis. *Molecular Biology and Evolution*. 17:540-552 no. 4. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334.

CHAPARRO, Martha y AGUIRRE, Jaime, 2002. *Hongos liquenizados*. 1. El Malpensante S.A. ISBN, 958-701-241–0.

CNALH, 2022. http//:lichenportal.org/cnalh/index.php. *Lichen Portal*.

COLEINE, Claudia, STAJICH, Jason E., ZUCCONI, Laura, ONOFRI, Silvano, POMBUBPA, Nuttapon, EGIDI, Eleonora, FRANKS, Ashley, BUZZINI, Pietro and SELBMANN, Laura, 2018. Antarctic Cryptoendolithic Fungal Communities Are Highly Adapted and Dominated by Lecanoromycetes and Dothideomycetes. *Frontiers in Microbiology* Vol9. Recovered from: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01392

COOK, Danielle and ZOLNIKOV, Tessa Rava, 2019. Antarctica. En: ZOLNIKOV, Tara Rava (ed.), *Global Adaptation and Resilience to Climate Change*. Cham: Springer International Publishing. p. 31-49. Palgrave Studies in Climate Resilient Societies. ISBN 978-3-030-01212-0. Recovered from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-01213-7_3

CORNEJO, Carolina, CHABANENKO, Svetlana and SCHEIDEGGER, Christoph, 2018. Are species-pairs diverging lineages? A nine-locus analysis uncovers speciation among species-pairs of the *Lobaria meridionalis*-group (Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 129:48-59. DOI 10.1016/j.ympev.2018.07.011.

CRESPO, Ana and PÉREZ-ORTEGA, Sergio, 2009. Cryptic species and species pairs in lichens: A discussion on the relationship between molecular phylogenies and morphological characters. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 66:71-81 no. S1. DOI 10.3989/ajbm.2225.

CUBERO, Oscar F. and CRESPO, Ana, 2002. Isolation of Nucleic Acids From Lichens. In: KRANNER, Ilse C., BECKETT, Richard P. and VARMA, Ajit K. (eds.), *Protocols in Lichenology: Culturing, Biochemistry, Ecophysiology and Use in Biomonitoring*. Berlin, Heidelberg: Springer. p. 381-391. Springer Lab Manuals. ISBN 978-3-642-56359-1. Recovered from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-56359-1_23

DARRIBA, Diego, TABOADA, Guillermo L., DOALLO, Ramón and POSADA, David, 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 9:772-772 no. 8. DOI 10.1038/nmeth.2109.

DE QUEIROZ, Kevin, 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*. 56:879-886 no. 6. DOI 10.1080/10635150701701083.

DEL-PRADO, Ruth, BUARUANG, Kawinnat, LUMBSCH, H. Thorsten, CRESPO, Ana and DIVAKAR, Pradeep K., 2019. DNA sequence-based identification and barcoding of a morphologically highly plastic lichen forming fungal genus (*Parmotrema*, Parmeliaceae) from the tropics. *The Bryologist*. 122:281 no. 2. DOI 10.1639/0007-2745-122.2.281.

DEL-PRADO, Ruth, CUBAS, Paloma, LUMBSCH, H. Thorsten, DIVAKAR, Pradeep K., BLANCO, Oscar, PAZ, Guillermo Amo de, MOLINA, M. Carmen and CRESPO, Ana, 2010. Genetic distances within and among species in monophyletic lineages of Parmeliaceae (Ascomycota) as a tool for taxon delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56:125-133 no. 1. DOI 10.1016/j.ympev.2010.04.014.

DESALLE, Rob, 2006. Species discovery versus species identification in DNA barcoding efforts: Response to Rubinoff. *Conservation Biology*. 20:1545-1547 no. 5. DOI 10.1111/j.1523-1739.2006.00543.x.

DESALLE, Rob, EGAN, Mary G. and SIDDALL, Mark, 2005. The unholy trinity: Taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 360:1905-1916 no. 1462. DOI 10.1098/rstb.2005.1722.

DESALLE, Rob and GOLDSTEIN, Paul, 2019. Review and Interpretation of Trends in DNA Barcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 7:1-11 no. September. DOI 10.3389/fevo.2019.00302.

DIVAKAR, Pradeep K., LEAVITT, Steven D., MOLINA, M. Carmen, DEL-PRADO, Ruth, LUMBSCH, H. Thorsten and CRESPO, Ana, 2016. A DNA barcoding approach for identification of hidden diversity in Parmeliaceae (Ascomycota): *Parmelia* sensu stricto as a case study. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 180:21-29 no. 1. DOI 10.1111/boj.12358.

DOYLE, J. J. and DOYLE, J. L., 1990. Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*. 12:13-15 no. 1.

ELIX, John A. and STOCKER-WÖRGÖTTER, E., 2008. Biochemistry and secondary metabolites. In: *Lichen Biology*. 2. Cambridge University Press. p. 104-133. ISBN-13, 978-0-511-41407–7.

FAHSELT, D, 2008. Individuals and populations of lichens. In: *Lichen Biology*. 2. Cambridge University Press. p. 252-273. ISBN-13, 978-0-511-41407–7.

FUJISAWA, Tomochika and BARRACLOUGH, Timothy G., 2013. Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. *Systematic Biology*. 62:707-724 no. 5. DOI 10.1093/sysbio/syt033.

GARDES, M. and BRUNS, T. D., 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*. 2:113-118 no. 2. DOI 10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.

GARGAS, Andrea and TAYLOR, John W., 1992. Polymerase Chain Reaction (PCR) Primers for Amplifying and Sequencing Nuclear 18S rDNA from Lichenized Fungi. *Mycologia*. 84:589-592 no. 4. DOI 10.1080/00275514.1992.12026182.

GOLDSTEIN, Paul Z. and DESALLE, Rob, 2011. Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. *BioEssays*. 33:135-147 no. 2. DOI 10.1002/bies.201000036.

GOMES, Ana C. S., ANDRADE, Ana, BARRETO-SILVA, Juan S., BRENES-ARGUEDAS, Tania, LÓPEZ, Dairon C., FREITAS, Camila C. de, LANG, Carla, OLIVEIRA, Alexandre A. de, PÉREZ, Alvaro J., PEREZ, Rolando, SILVA, João B. da, SILVEIRA, Alexandra M. F., VAZ, Marcel C., VENDRAMI, Juliana and VICENTINI, Alberto, 2013. Local plant species delimitation in a highly diverse Amazonian forest: Do we all see the same species? *Journal of Vegetation Science*. 24:70-79 no. 1. DOI 10.1111/j.1654-1103.2012.01441.x.

GRANEY, Joseph R., LANDIS, Matthew S., PUCKETT, Keith J., STUDABAKER, William B., EDGERTON, Eric S., LEGGE, Allan H. and PERCY, Kevin E., 2017. Differential accumulation of PAHs, elements, and Pb isotopes by five lichen species from the Athabasca Oil Sands Region in Alberta, Canada. *Chemosphere*. 184:700-710. DOI 10.1016/j.chemosphere.2017.06.036.

GUEIDAN, Cécile, ELIX, John A., MCCARTHY, Patrick M., ROUX, Claude, MALLEN-COOPER, Max and KANTVILAS, Gintaras, 2019. PacBio amplicon sequencing for metabarcoding of mixed DNA samples from lichen herbarium specimens. *MycoKeys*. 53:73-91. DOI 10.3897/mycokeys.53.34761.

GUINDON, Stéphane and GASCUEL, Olivier, 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*. 52:696-704 no. 5. DOI 10.1080/10635150390235520.

GUTTMAN, David and HIGUCHI, Takeru, 1956. Possible Complex Formation Between Macromolecules and Certain Pharmaceuticals X* The Interaction of Some Phenolic Compounds with Polyethylene Glycols, Polypropylene Glycols, and Polyvinylpyrrolidone. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*. 45:659-664 no. 10. DOI 10.1002/jps.3030451002.

HALICI, Mehmet Gökhan, BARTAK, Milos and GÜLLÜ, Mithat, 2018. Identification of some lichenised fungi from James Ross Island (Antarctic Peninsula) using nrITS markers. *New Zealand Journal of Botany*. 56:276-290 no. 3. DOI 10.1080/0028825X.2018.1478861.

HEBERT, Paul D. N., CYWINSKA, Alina, BALL, Shelley L. and DEWAARD, Jeremy R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 270:313-321 no. 1512. DOI 10.1098/rspb.2002.2218.

HOLLINGSWORTH, Peter M., 2007. DNA barcoding: potential users. *Genomics, Society and Policy*. 3:44-47 no. 2. DOI 10.1186/1746-5354-3-2-44.

HONEGGER, R., 2012. 15 The Symbiotic Phenotype of Lichen-Forming Ascomycetes and Their Endo- and Epibionts. In: HOCK, Bertold (ed.), *Fungal Associations* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer. p. 287-339. The Mycota. ISBN 978-3-642-30826-0. Recovered from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-30826-0_15

HOWARD, Grace E., 1970. The Lichen Genus *Ochrolechia* in North America North of Mexico. *The Bryologist*. 73:93 no. 1. DOI 10.2307/3241590.

HURVICH, Clifford M. and TSAI, Chih-Ling, 1989. Regression and time series model selection in small samples. *Biometrika*. 76:297-307 no. 2. DOI 10.1093/biomet/76.2.297.

INNIS, Michael A., GELFAND, David H., SNINSKY, John J. and WHITE, Thomas J., 2012. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press. ISBN 978-0-08-088671-8.

KAPLI, P, LUTTEROPP, S, ZHANG, J, KOBERT, K, PAVLIDIS, P, STAMATAKIS, A and FLOURI, T, 2017. Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*. 33:1630-1638 no. 11. DOI 10.1093/bioinformatics/btx025.

KARUNARATNE, Desiree Nedra, JAYALAL, R. G. U. and KARUNARATNE, V., 2014. Lichen Polysaccharides. In: *The Complex World of Polysaccharides*. p. 215-226. ISBN, 978-953-51-0819–1.

KATOH, Kazutaka, ROZEWICKI, John and YAMADA, Kazunori D, 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*. 20:1160-1166 no. 4. DOI 10.1093/bib/bbx108.

KELLY, Laura J., HOLLINGSWORTH, Peter M., COPPINS, Brian J., ELLIS, Christopher J., HARROLD, Paul, TOSH, James and YAHR, Rebecca, 2011. DNA barcoding of lichenized fungi demonstrates high identification success in a floristic context. *New Phytologist*. 191:288-300 no. 1. DOI 10.1111/j.1469-8137.2011.03677.x.

KIM, J. H., AHN, In Young, HONG, Soon Gyu, ANDREEV, Mikhail, LIM, Kwang Mi, OH, Mi Jin, KOH, Young Jin and HUR, Jae Seoun, 2006. Lichen flora around the Korean Antarctic Scientific Station, King George Island, Antarctic. *Journal of Microbiology*. 44:480-491 no. 5.

KISTENICH, Sonja, HALVORSEN, Rune, SCHRØDER-NIELSEN, Audun, THORBEK, Lisbeth, TIMDAL, Einar and BENDIKSBY, Mika, 2019. DNA sequencing historical lichen specimens. *Frontiers in Ecology and Evolution*. 7:1-20 no. JAN. DOI 10.3389/fevo.2019.00005.

KITAURA, M. J., COSTA, P. C., SCUR, M. C. and LORENZ, A. .. P., 2019. Genetic and morphological variations of the lichenized fungus *Steinera intricata* (Arctomiaceae, Lecanoromycetes) from southern South America to Antarctic Peninsula. *Polar Biology*. 42:907-918 no. 5. DOI 10.1007/s00300-019-02486-4.

KÕLJALG, Urmas, NILSSON, Henrik R., SCHIGEL, Dmitry, TEDERSOO, Leho, LARSSON, Karl-Henrik, MAY, Tom W., TAYLOR, Andy F. S., JEPPESEN, Thomas Stjernegaard, FRØSLEV, Tobias Guldberg, LINDAHL, Björn D., PÕLDMAA, Kadri, SAAR, Irja, SUIJA, Ave, SAVCHENKO, Anton, YATSIUK, Iryna, ADOJAAN, Kristjan, IVANOV, Filipp, PIIRMANN, Timo, PÖHÖNEN, Raivo, ZIRK, Allan and ABARENKOV, Kessy, 2020. The Taxon Hypothesis Paradigm—On the Unambiguous Detection and Communication of Taxa. *Microorganisms*. 8:1910 no. 12. DOI 10.3390/microorganisms8121910.

KONDRATYUK, S., KÄRNEFELT, I., THELL, A., ELIX, J., KIM, J., JEONG, M.-H., YU, N.-N., KONDRATIUK, A. and HUR, J.-S., 2014. A revised taxonomy for the subfamily Caloplacoideae (Teloschistaceae, Ascomycota) based on molecular phylogeny. *Acta Botanica Hungarica*. 56:141-178 no. 1-2. DOI 10.1556/abot.56.2014.1-2.12.

KONDRATYUK, S. Y., KÄRNEFELT, I., THELL, A., ELIX, J. A., KIM, J., KONDRATIUK, A. S. and HUR, J.-S., 2015. Brownlielloideae, a new subfamily in the Teloschistaceae (Lecanoromycetes, Ascomycota). *Acta Botanica Hungarica*. 57:321-343 no. 3-4. DOI 10.1556/034.57.2015.3-4.6.

KRZEWICKA, Beata and SMYKLA, Jerzy, 2004. The lichen genus *Umbilicaria* from the neighbourhood of Admiralty Bay (King George Island, maritime Antarctic), with a proposed new key to all Antarctic taxa. *Polar Biology*. 28:15-25 no. 1. DOI 10.1007/s00300-004-0638-9.

LAGOSTINA, Elisa, DAL GRANDE, Francesco, ANDREEV, Mikhail and PRINTZEN, Christian, 2018. The use of microsatellite markers for species delimitation in Antarctic *Usnea* subgenus *Neuropogon*. *Mycologia*. 110:1047-1057 no. 6. DOI 10.1080/00275514.2018.1512304.

LAGOSTINA, Elisa, DAL GRANDE, Francesco, OTT, Sieglinde and PRINTZEN, Christian, 2017. Fungus-specific SSR markers in the Antarctic lichens *Usnea antarctica* and *U. aurantiacoatra* (Parmeliaceae, Ascomycota). *Applications in Plant Sciences*. 5:1700054 no. 9. DOI 10.3732/apps.1700054.

LAMB, I. Mackenzie, 1968. Antarctic Liches II. The Genera *Buellia* and *Rinodina*. *British Antarctic Survey Scientific Reports*. No. 61.

LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J. and HIGGINS, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23:2947-2948 no. 21. DOI 10.1093/bioinformatics/btm404.

LAUNDON, J. R., 1981. The Species of *Chrysothrix*. *The Lichenologist*. 13:101-121 no. 2. DOI 10.1017/S0024282981000169.

LEAVITT, S. D., ESSLINGER, Theodore L., DIVAKAR, Pradeep K., CRESPO, Ana and LUMBSCH, H. Thorsten, 2016. Hidden diversity before our eyes: Delimiting and describing cryptic lichen-forming fungal species in camouflage lichens (Parmeliaceae, Ascomycota). *Fungal Biology*. 120:1374-1391 no. 11. DOI 10.1016/j.funbio.2016.06.001.

LEAVITT, S. D., ESSLINGER, Theodore L., HANSEN, Eric Steen, DIVAKAR, Pradeep K., CRESPO, Ana, LOOMIS, Bradley F. and LUMBSCH, H. Thorsten, 2014. DNA barcoding of brown Parmeliae (Parmeliaceae) species: A molecular approach for accurate specimen identification, emphasizing species in Greenland. *Organisms Diversity and Evolution*. 14:11-20 no. 1. DOI 10.1007/s13127-013-0147-1.

LEAVITT, S. D., FERNÁNDEZ-MENDOZA, Fernando, PÉREZ-ORTEGA, Sergio, SOHRABI, Mohammad, DIVAKAR, Pradeep, LUMBSCH, Thorsten and CLAIR, Larry St, 2013. DNA barcode identification of lichen-forming fungal species in the *Rhizoplaca melanophthalma* species-complex (Lecanorales, Lecanoraceae), including five new species. *MycoKeys*. 7:1-22. DOI 10.3897/mycokeys.7.4508.

LEAVITT, Steven D., MOREAU, Corrie S. and THORSTEN LUMBSCH, H., 2015. The Dynamic Discipline of Species Delimitation: Progress Toward Effectively Recognizing Species Boundaries in Natural Populations. In: UPRETI, Dalip Kumar, DIVAKAR, Pradeep K., SHUKLA, Vertika and BAJPAI, Rajesh (eds.), *Recent Advances in Lichenology: Modern Methods and Approaches in Lichen Systematics and Culture Techniques, Volume 2* [online]. New Delhi: Springer India. p. 11-44. ISBN 978-81-322-2235-4. Recovered from: https://doi.org/10.1007/978-81-322-2235-4_2

LEE, Jin Sung, LEE, Hong Kum, HUR, Jae Seoun, ANDREEV, Mikhail and HONG, Soon Gyu, 2008. Diversity of the lichenized fungi in King George Island, Antarctica, revealed by phylogenetic analysis of partial large subunit rDNA sequences. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18:1016-1023 no. 6.

LÜCKING, Robert, HODKINSON, Brendan P. and LEAVITT, Steven D., 2017. The 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota – Approaching one thousand genera. *The Bryologist*. 119:361-416 no. 4. DOI 10.1639/0007-2745-119.4.361.

LÜCKING, Robert, LEAVITT, Steven D. and HAWKSWORTH, David L., 2021. Species in lichen-forming fungi: balancing between conceptual and practical considerations, and between phenotype and phylogenomics. *Fungal Diversity*. 109:99-154 no. 1. DOI 10.1007/s13225-021-00477-7.

LUMBSCH, H. Thorsten and LEAVITT, Steven D., 2011. Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity*. 50:59-72 no. 1. DOI 10.1007/s13225-011-0123-z.

LUTZONI, François and MIADLIKOWSKA, Jolanta, 2009. Lichens. *Current Biology*. 19:2 no. 13.

MADEIRA, Fábio, PARK, Young mi, LEE, Joon, BUSO, Nicola, GUR, Tamer, MADHUSOODANAN, Nandana, BASUTKAR, Prasad, TIVEY, Adrian R N, POTTER, Simon C, FINN, Robert D and LOPEZ, Rodrigo, 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research*. 47:W636-W641 no. W1. DOI 10.1093/nar/gkz268.

MALLO, Diego and POSADA, David, 2016. Multilocus inference of species trees and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 371: no. 1702. DOI 10.1098/rstb.2015.0335.

MARK, Kristiina, CORNEJO, Carolina, KELLER, Christine, FLÜCK, Daniela and SCHEIDEGGER, Christoph, 2016. Barcoding lichen-forming fungi using 454 pyrosequencing is challenged by artifactual and biological sequence variation. *Genome*. 59:685-704 no. 9. DOI 10.1139/gen-2015-0189.

MARK, Kristiina, SAAG, Lauri, LEAVITT, Steven D., WILL-WOLF, Susan, NELSEN, Matthew P., TÕRRA, Tiiu, SAAG, Andres, RANDLANE, Tiina and LUMBSCH, H. Thorsten, 2016. Evaluation of traditionally circumscribed species in the lichen-forming genus *Usnea*, section *Usnea* (Parmeliaceae, Ascomycota) using a six-locus dataset. *Organisms Diversity and Evolution*. 16:497-524 no. 3. DOI 10.1007/s13127-016-0273-7.

MARTÍN, Maria P. and WINKA, Katarina, 2000. Alternative Methods of extracting and Amplifying Dna from lichens. *The Lichenologist*. 32:189-196 no. 2. DOI 10.1006/lich.1999.0254.

MARTÍNEZ, Isabel, 2016. Los líquenes y su conservación. *Conservación Vegetal* [en línea]. No. 20. DOI 10.15366/cv2016.20. Recuperado a partir de: http://hdl.handle.net/10486/676707

MCINERNEY, Peter, ADAMS, Paul and HADI, Masood Z., 2014. Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Molecular Biology International*. 2014:1-8. DOI 10.1155/2014/287430.

MCLEAN, Lydia and ROCK, Jenny, 2016. The importance of Antarctica: assessing the values ascribed to Antarctica by its researchers to aid effective climate change communication. *Polar Journal*. 6:291-306 no. 2. DOI 10.1080/2154896X.2016.1241488.

MEIER, Rudolf, SHIYANG, Kwong, VAIDYA, Gaurav and NG, Peter K. L., 2006. DNA barcoding and taxonomy in Diptera: a tale of high intraspecific variability and low identification success. *Systematic Biology*. 55:715-728 no. 5. DOI 10.1080/10635150600969864.

MEIKLEJOHN, Kelly A., DAMASO, Natalie and ROBERTSON, James M., 2019. Assessment of BOLD and GenBank – Their accuracy and reliability for the identification of biological materials. FUGMANN, Sebastian D. (ed.), *PLOS ONE*. 14:e0217084 no. 6. DOI 10.1371/journal.pone.0217084.

MEYER, Christopher P. and PAULAY, Gustav, 2005. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*. 3:1-10 no. 12. DOI 10.1371/journal.pbio.0030422.

MILLA, Ana Karina, 2015. Implementación de una metodología basada en la combinación de las técnicas de PCR y TP-PCR para el diagnóstico molecular de la distrofia miotónica tipo 1 en el Instituto Nacional de Ciencias Neurológicas en el año 2014. *Repositorio de Tesis - UNMSM* [en línea]. [Accedido 26 febrero 2022]. Recuperado a partir de: https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/4461

MOYA, Patricia, MOLINS, Arantzazu, CHIVA, Salvador, BASTIDA, Joaquín and BARRENO, Eva, 2020. Symbiotic microalgal diversity within lichenicolous lichens and crustose hosts on Iberian Peninsula gypsum biocrusts. *Scientific Reports*. 10:14060 no. 1. DOI 10.1038/s41598-020-71046-2.

NASH, Thomas H, 2008. *Lichen biology*. 2. Cambridge University Press. ISBN-13, 978-0-511-41407–7.

OROCK, Elizabeth Ayuk, LEAVITT, Steven D., FONGE, Beatrice Ambo, CLAIR, Larry L. St and LUMBSCH, H. Thorsten, 2012. DNA-based identification of lichen-forming fungi: Can publicly available sequence databases aid in lichen diversity inventories of Mount Cameroon (West Africa)? *Lichenologist*. 44:833-839 no. 6. DOI 10.1017/S0024282912000424.

OROSZ, Erzsébet, VAN DE WIELE, Nathalie, EMRI, Tamás, ZHOU, Miaomiao, ROBERT, Vincent, DE VRIES, Ronald P and PÓCSI, István, 2018. Fungal Stress Database (FSD)—a repository of fungal stress physiological data. *Database*. 2018:bay009. DOI 10.1093/database/bay009.

ØVSTEDAL, D. O. (Dag Olav) and SMITH, R. I. (Ronald Ian) Lewis, 2001. *Lichens of Antarctica and South Georgia*. Cambridge University Press. ISBN 0-521-66241-9.

PARK, Chae Haeng, HONG, Soon Gyu and ELVEBAKK, Arve, 2018. *Psoroma antarcticum*, a new lichen species from Antarctica and neighbouring areas. *Polar Biology*. 41:1083-1090 no. 6. DOI 10.1007/s00300-018-2265-x.

PARK, Chae Haeng, KIM, Kyung Mo, ELVEBAKK, Arve, KIM, Ok Sun, JEONG, Gajin and HONG, Soon G. yu, 2015. Algal and fungal diversity in Antarctic lichens. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 62:196-205 no. 2. DOI 10.1111/jeu.12159.

PARK, Jung Shin, OH, Soon-Ok, WOO, Jeong-Jae, LIU, Dong, PARK, Sook-Young and HUR, Jae-Seoun, 2019. First report of the lichen *Ochrolechia akagiensis* (Ochrolechiaceae, Ascomycota) in Korea. *The Korean Journal of Mycology*. 47:95-104 no. 2. DOI 10.4489/KJM.20190012.

PARK, Sook-Young, JANG, Seol-Hwa, OH, Soon-Ok, KIM, Jung A. and HUR, Jae-Seoun, 2014. An Easy, Rapid, and Cost-Effective Method for DNA Extraction from Various Lichen Taxa and Specimens Suitable for Analysis of Fungal and Algal Strains. *Mycobiology*. 42:311-316 no. 4. DOI 10.5941/MYCO.2014.42.4.311.

PÉREZ-ORTEGA, Sergio, ORTIZ-ÁLVAREZ, Rüdiger, GREEN, T. G. Allan and RÍOS, Asunción de los, 2012. Lichen myco- and photobiont diversity and their relationships at the edge of life

(McMurdo Dry Valleys, Antarctica). *FEMS Microbiology Ecology*. 82:429-448 no. 2. DOI 10.1111/j.1574-6941.2012.01422.x.

PRINTZEN, Christian, 2010. Lichen Systematics: The Role of Morphological and Molecular Data to Reconstruct Phylogenetic Relationships. In: LÜTTGE, Ulrich, BEYSCHLAG, Wolfram, BÜDEL, Burkhard and FRANCIS, Dennis (eds.), *Progress in Botany 71* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer. p. 233-275. Progress in Botany. ISBN 978-3-642-02167-1. Recovered from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-02167-1_10

PUILLANDRE, N., LAMBERT, A., BROUILLET, S. and ACHAZ, G., 2012. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*. 21:1864-1877 no. 8. DOI 10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x.

RAMBAUT, Andrew, DRUMMOND, Alexei J, XIE, Dong, BAELE, Guy and SUCHARD, Marc A, 2018. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic Biology*. 67:901-904 no. 5. DOI 10.1093/sysbio/syy032.

RANGEL, Drauzio E. N., ALDER-RANGEL, Alene, DADACHOVA, Ekaterina, FINLAY, Roger D., KUPIEC, Martin, DIJKSTERHUIS, Jan, BRAGA, Gilberto U. L., CORROCHANO, Luis M. and HALLSWORTH, John E., 2015. Fungal stress biology: a preface to the Fungal Stress Responses special edition. *Current Genetics*. 61:231-238 no. 3. DOI 10.1007/s00294-015-0500-3.

RANKOVIĆ, Branislav and KOSANIĆ, Marijana, 2019. Lichens as a Potential Source of Bioactive Secondary Metabolites. In: RANKOVIĆ, Branislav (ed.), *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential* [online]. Cham: Springer International Publishing. p. 1-29. ISBN 978-3-030-16814-8. Recovered from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8_1

RIVERA, Mariana, CATAN, Soledad Perez, FONZO, Carla Di, DOPCHIZ, Laura, ARRIBERE, Maria, ANSALDO, Martin, MESSUTI, Maria and BUBACH, Debora F., 2018. Lichen as biomonitor of atmospheric elemental composition from Potter Peninsula, 25 de Mayo (King George) Island, Antarctica. *Annals of Marine Science*. p. 016-019. DOI 10.17352/ams.000009.

ROSA, Luiz Henrique, 2019. *Fungi of Antarctica*. ISBN 978-3-030-18366-0.

ROSA, Luiz Henrique, PINTO, Otávio Henrique Bezerra, CONVEY, Peter, CARVALHO-SILVA, Micheline, ROSA, Carlos Augusto and CÂMARA, Paulo Eduardo Aguiar Saraiva, 2021. DNA Metabarcoding to Assess the Diversity of Airborne Fungi Present over Keller Peninsula, King George Island, Antarctica. *Microbial Ecology*. 82:165-172 no. 1. DOI 10.1007/s00248-020-01627-1.

ROSSEN, Lone, NØRSKOV, Pernille, HOLMSTRØM, Kim and RASMUSSEN, Ole F., 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*. 17:37-45 no. 1. DOI 10.1016/0168-1605(92)90017-W.

RUPRECHT, Ulrike, LUMBSCH, H. Thorsten, BRUNAUER, Georg, GREEN, T. G. Allan and TÜRK, Roman, 2012. Insights into the diversity of Lecanoraceae (Lecanorales,Ascomycota) in continental Antarctica (Ross Sea region). *Nova Hedwigia*. 94:287-306 no. 3-4. DOI 10.1127/0029-5035/2012/0017.

SANCHO, Leopoldo, PINTADO, Ana and GREEN, T., 2019. Antarctic Studies Show Lichens to be Excellent Biomonitors of Climate Change. *Diversity*. 11:42 no. 3. DOI 10.3390/d11030042.

SCHLICK-STEINER, Birgit C., STEINER, Florian M., SEIFERT, Bernhard, STAUFFER, Christian, CHRISTIAN, Erhard and CROZIER, Ross H., 2010. Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annual Review of Entomology*. 55:421-438 no. 1. DOI 10.1146/annurev-ento-112408-085432.

SCHLOSS, Patrick D., WESTCOTT, Sarah L., RYABIN, Thomas, HALL, Justine R., HARTMANN, Martin, HOLLISTER, Emily B., LESNIEWSKI, Ryan A., OAKLEY, Brian B., PARKS, Donovan H., ROBINSON, Courtney J., SAHL, Jason W., STRES, Blaz, THALLINGER, Gerhard G., HORN, David J. Van and WEBER, Carolyn F., 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*. DOI 10.1128/AEM.01541-09.

SCHOCH, Conrad L., SEIFERT, Keith A., HUHNDORF, Sabine, ROBERT, Vincent, SPOUGE, John L., LEVESQUE, C. André, CHEN, Wen and CONSORTIUM, Fungal Barcoding, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109:6241-6246 no. 16. DOI 10.1073/PNAS.1117018109.

SCHRADER, C., SCHIELKE, A., ELLERBROEK, L. and JOHNE, R., 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*. 113:1014-1026 no. 5. DOI 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.

SHENOY, Belle Damodara, JEEWON, Rajesh and HYDE, Kevin D., 2007. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity*. 26 I:1-54 no. July.

SINGH, Garima, DIVAKAR, Pradeep K., DAL GRANDE, Francesco, OTTE, Jürgen, PARNMEN, Sittiporn, WEDIN, Mats, CRESPO, Ana, LUMBSCH, H. Thorsten and SCHMITT, Imke, 2013. The sister-group relationships of the largest family of lichenized fungi, Parmeliaceae (Lecanorales, Ascomycota). *Fungal Biology*. 117:715-721 no. 10. DOI 10.1016/j.funbio.2013.08.001.

SINGH, Sachin, ARYA, Mamta and VISHWAKARMA, Shailesh Kumar, 2019. Advancements in Methods Used for Identification of Lichens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 8:1450-1460 no. 08. DOI 10.20546/ijcmas.2019.808.169.

SONG, Jingyuan, SHI, Linchun, LI, Dezhu, SUN, Yongzhen, NIU, Yunyun, CHEN, Zhiduan, LUO, Hongmei, PANG, Xiaohui, SUN, Zhiying, LIU, Chang, LV, Aiping, DENG, Youping, LARSON-RABIN, Zachary, WILKINSON, Mike and CHEN, Shilin, 2012. Extensive Pyrosequencing Reveals Frequent Intra-Genomic Variations of Internal Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA. *PLOS ONE*. 7:e43971 no. 8. DOI 10.1371/journal.pone.0043971.

SPIELMANN, Adriano Afonso and PEREIRA, Antonio Batista, 2012. Lichens on the Maritime Antarctica (A small field guide for some common species). *Lichens on the Maritime Antarctica*. 4: no. 3.

SZOPIŃSKA, Małgorzata, NAMIEŚNIK, Jacek and POLKOWSKA, Żaneta, 2017. How Important Is Research on Pollution Levels in Antarctica? Historical Approach, Difficulties and Current Trends. In: DE VOOGT, Pim (ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 239* [online]. Cham: Springer International Publishing. p. 79-156. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. ISBN 978-3-319-33972-6. Recovered from: https://doi.org/10.1007/398_2015_5008

TALAVERA, Gerard, DINCĂ, Vlad and VILA, Roger, 2013. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. *Methods in Ecology and Evolution*. 4:1101-1110 no. 12. DOI 10.1111/2041-210X.12107.

TALBOT, P. H. B., 1971. Principles of fungal taxonomy. *Principles of fungal taxonomy*.

TAMURA, K and NEI, M, 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*. 10:512-526 no. 3. DOI 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023.

VERMA, Neeraj and BEHERA, Bhaskar C., 2019. Future Directions in the Study of Pharmaceutical Potential of Lichens. In: RANKOVIĆ, Branislav (ed.), *Lichen Secondary Metabolites: Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential* [online]. Cham: Springer International Publishing. p. 237-260. ISBN 978-3-030-16814-8. Recovered from: https://doi.org/10.1007/978-3-030-16814-8_9

VIALLE, Agathe, FEAU, Nicolas, ALLAIRE, Mathieu, DIDUKH, Maryna, MARTIN, Francis, MONCALVO, Jean-Marc and HAMELIN, Richard C., 2009. Evaluation of mitochondrial genes as DNA barcode for Basidiomycota. *Molecular Ecology Resources*. 9:99-113 no. s1. DOI 10.1111/j.1755-0998.2009.02637.x.

WAT, L. Van der and FORBES, P. B. C., 2015. Lichens as biomonitors for organic air pollutants. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 64:165-172. DOI 10.1016/j.trac.2014.09.006.

WEISS, Johanna and OREKHOVA, Alla, 2020. Biometrical analysis and thallus morphology characteristics of *Placopsis antarctica* from King George Island, Antarctica (Short Communication). *Czech Polar Reports*. 10:161-168 no. 2. DOI 10.5817/CPR2020-2-13.

WHITE, T. J., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J., 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. *PCR Protocols*. No. Januaryp. 315-322. DOI 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1.

WIDHELM, Todd J., EGAN, Robert S., BERTOLETTI, Francesca R., ASZTALOS, Matt J., KRAICHAK, Ekaphan, LEAVITT, Steven D. and LUMBSCH, H. Thorsten, 2016. Picking holes in traditional species delimitations: an integrative taxonomic reassessment of the *Parmotrema perforatum* group (Parmeliaceae, Ascomycota). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 182:868-884 no. 4. DOI 10.1111/boj.12483.

WIENS, John J., 2007. Species delimitation: New approaches for discovering diversity. *Systematic Biology*. 56:875-878 no. 6. DOI 10.1080/10635150701748506.

WRIGHT, Benjamin, CLAIR, Larry L. St and LEAVITT, Steven D., 2019. Is targeted community DNA metabarcoding suitable for biodiversity inventories of lichen-forming fungi? *Ecological Indicators*. 98:812-820 no. November 2018. DOI 10.1016/j.ecolind.2018.11.061.

XU, Maonian, HEIDMARSSON, Starri, OLAFSDOTTIR, Elin Soffia, BUONFIGLIO, Rosa, KOGEJ, Thierry and OMARSDOTTIR, Sesselja, 2016. Secondary metabolites from cetrarioid lichens: Chemotaxonomy, biological activities and pharmaceutical potential. *Phytomedicine*. 23:441-459 no. 5. DOI 10.1016/j.phymed.2016.02.012.

ZAGOSKINA, N. V., NIKOLAEVA, T. N., LAPSHIN, P. V., ZAVARZIN, A. A. and ZAVARZINA, A. G., 2013. Water-soluble phenolic compounds in lichens. *Microbiology*. 82:445-452 no. 4. DOI 10.1134/S0026261713030132.

ZAKERI, Zakieh, DIVAKAR, Pradeep and OTTE, Volker, 2017. Taxonomy and Phylogeny of *Aspiciliella* , a Resurrected genus of Megasporaceae, Including the New Species *A. portosantana*. *Herzogia* 30:166-176. DOI 10.13158/heia.30.1.2017.166.

ZAKERI, Zakieh, OTTE, Volker, SIPMAN, Harrie, MALÍČEK, Jiří, CUBAS, Paloma, RICO, Víctor J., LENZOVÁ, Veronika, SVOBODA, David and DIVAKAR, Pradeep K., 2019. Discovering cryptic species in the *Aspiciliella intermutans* complex (Megasporaceae, Ascomycota) – First results using gene concatenation and coalescent-based species tree approaches. *PLOS ONE*. 14:e0216675 no. 5. DOI 10.1371/journal.pone.0216675.

ZHAO, Yan, YI, Zhenzhen, WARREN, Alan and SONG, Weibo B., 2018. Species delimitation for the molecular taxonomy and ecology of the widely distributed microbial eukaryote genus *Euplotes* (Alveolata, Ciliophora). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 285: no. 1871. DOI 10.1098/rspb.2017.2159.

ZÚÑIGA, Catalina, LEIVA, Diego, RAMÍREZ-FERNÁNDEZ, Lía, CARÚ, Margarita, YAHR, Rebecca and ORLANDO, Julieta, 2015. Phylogenetic diversity of peltigera cyanolichens and their photobionts in southern Chile and Antarctica. *Microbes and Environments*. 30:172-179 no. 2. DOI 10.1264/jsme2.ME14156.

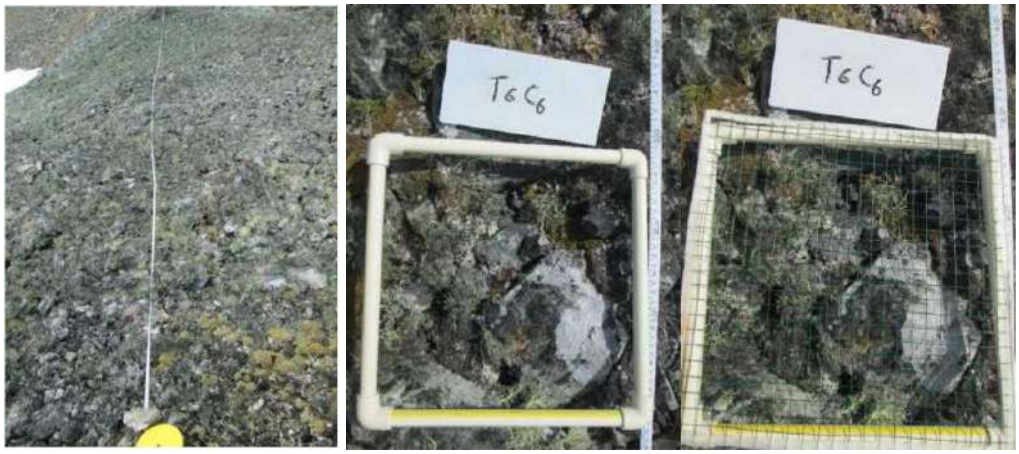
ZVĚŘINA, Ondřej, COUFALÍK, Pavel, BARTÁK, Miloš, PETROV, Michal and KOMÁREK, Josef, 2018. The contents and distributions of cadmium, mercury, and lead in *Usnea antarctica* lichens from Solorina Valley, James Ross Island (Antarctica). *Environmental Monitoring and Assessment*. 190:1-9 no. 1. DOI 10.1007/s10661-017-6397-1.

ZVĚŘINA, Ondřej, LÁSKA, Kamil, ČERVENKA, Rostislav, KUTA, Jan, COUFALÍK, Pavel and KOMÁREK, Josef, 2014. Analysis of mercury and other heavy metals accumulated in lichen *Usnea antarctica* from James Ross Island, Antarctica. *Environmental Monitoring and Assessment*. 186:9089-9100 no. 12. DOI 10.1007/s10661-014-4068-z.

ANEXOS

Anexo 1.- Colecta de líquenes antárticos en la Isla Rey Jorge, Antártica

Método de transecto-cuadrante



Se tendieron transectos (izquierda) y se establecieron cuadrantes usando una malla metálica (derecha).

Sitios de muestreo



Zona morrénica del cerro Tumbes (izquierda) y zona morrénica del glaciar Znosko (derecha).



Colecta de líquenes durante la campaña ANTAR XXVI (izquierda) y ANTAR XXVII (derecha)

Anexo 2.- Protocolo estandarizado de extracción de Cubero y Crespo (2002) modificado

Tiempo de ejecución: 1 - 1.5 días

1. Colocar hasta 100mg del talo del liquen en un tubo de microcentrífuga de 2 ml.

   Preferentemente, la muestra debe ser lavada una vez con pasos sucesivos de lejía 0.5%, etanol 95% y etanol 70% por un corto tiempo. Este lavado puede afectar la química del liquen, por lo que es recomendable usar una submuestra o realizarlo después de la identificación fenotípica.

2. Romper el tejido con un agitador de perlas. Para TissueLyser II, agregar una perla de acero y una cantidad de perlas de vidrio proporcional a 1/3 del volumen de la muestra. Realizar tres ciclos de congelamiento y agitación.

   Para cada ciclo, el congelamiento se realiza sumergiendo los tubos con la muestra en nitrógeno líquido durante 1 minuto. Para la agitación, configurar el agitador de perlas a una frecuencia de 30 s^{-1} durante 45 segundos.

   Para muestras duras y difíciles de reducir como *Usnea* sp. se recomienda aumentar el número de ciclos hasta el doble.

   Preferentemente usar tubos de microcentrífuga Eppendorf para reducir la posibilidad de que se rompan durante la agitación.

   El uso de un micromortero de plástico resultó en ADN de menor calidad en comparación con el agitador de perlas

3. Agregar 400 µl de solución tampón CTAB (Tris-HCl 100 mM [pH 8.0], EDTA 30 mM, NaCl 1 M, CTAB 1% w/v, PVP 1% w/v). Mezclar por inversión.

   Dado que la destrucción del tejido se hizo en seco, la muestra en polvo puede escapar fuera al abrir el tubo. A fin de reducir esto, se recomienda someter los tubos a un *spin-down* y vortex.

   En la eventualidad de un escape de la muestra en polvo, se recomienda la esterilización de los guantes, el espacio y los materiales de trabajo.

4. Realizar un *spin-down* y dejar incubando a 70 °C en un termobloque a 800 rpm durante 45 minutos.

   Se recomienda mezclar por inversión periódicamente, tratando de que la mayor parte de la muestra esté cubierta con la solución tampón.

   Al término de la incubación, dejar a temperatura ambiente antes de seguir al siguiente paso.

5. Agregar 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Agitar vigorosamente durante 5 minutos.
6. Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
7. Transferir con una micropipeta la fase superior a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml nuevo.

   Típicamente, el volumen de la fase superior es aproximadamente 300 µl.

   Cuidar de no transferir la fase intermedia, que en algunos casos es transparente, pero más viscosa.

8. Agregar 2 volúmenes de solución tampón de precipitación CTAB 0.5% (NaCl 40 mM, CTAB 0.5% w/v). Mezclar por inversión.
9. Centrifugar a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4°C.

   Si no observa un *pellet* en la primera centrifugación, usar una mayor velocidad y tiempo de centrifugación. Si el resultado no cambia, continuar con los siguientes pasos independientemente de la presencia de un *pellet*.

10. Descartar el sobrenadante, con cuidado del *pellet* si es visible. Dejar secando con el tubo invertido durante 15 minutos.
11. Agregar 400 µl de NaCl 1.2 M precalentado a 37°C. Resuspender el *pellet* si es visible.

    Para acelerar la resuspensión, puede colocar el tubo a 50°C, mezclando por inversión periódicamente. Al término, dejar a temperatura ambiente antes de seguir al siguiente paso.

    Si el *pellet* persiste, usar una punta de micropipeta para desintegrar el *pellet*.

12. Añadir 2 µl de ARNasa A libre de ADNasa (10 mg/µl) e incubar a 37°C en un termobloque a 800 rpm durante 1 hora.

    Al término de la incubación, dejar a temperatura ambiente antes de seguir al siguiente paso.

13. Agregar 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Agitar vigorosamente durante 5 minutos.
14. Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
15. Transferir con una micropipeta la fase superior a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml nuevo.

    Típicamente, el volumen de la fase superior es aproximadamente 350 µl.

    Cuidar de no transferir la fase intermedia.

16. Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol frío (-20 °C) y dejar los tubos a -20°C por lo menos 1 hora.

    El periodo de precipitación con isopropanol puede extenderse hasta un día sin diferencias en los resultados.

17. Centrifugar a 12 000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
18. Descartar el sobrenadante y dejar secando con el tubo invertido durante 15 minutos.

    Es posible que para algunas muestras no se encuentre un pellet visible. Se recomienda continuar con los siguientes pasos independientemente de este resultado.

19. Lavar el *pellet* agregando 500 µl de etanol 70% frío (4 °C). Agitar en un termobloque a 800 rpm durante 15 minutos.
20. Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
21. Descartar el sobrenadante y dejar secando con el tubo invertido durante 15 minutos.

    Puede acelerarse el secado dejando en incubación a 50 °C con la tapa abierta durante 5 a 15 minutos. Tener en cuenta que una deshidratación excesiva del *pellet* puede dificultar su posterior resuspensión.

22. Agregar 50 µl de solución tampón TE (Tris-HCl 0.1 mM [pH 8.0], EDTA 0.1 mM) precalentado (37 °C) y dejar incubando a 60°C en un termobloque a 800 rpm hasta que el *pellet* se haya resuspendido y el volumen sea homogéneo.

    Se recomienda agitar y/o usar un vortex si el *pellet* o parte del *pellet* persisten. Realizar esto de manera gentil y con extremo cuidado para evitar fragmentar el ADN.

Anexo 3.- Protocolo optimizado de amplificación del marcador nrITS fúngico

Tiempo de ejecución: 3 horas

- Concentraciones finales y cantidad de ADN molde por reacción:

Reactivo	Concentración o cantidad final
5X Colorless GoTaq® Flexi Buffer	1 X
dNTPs	0.2 mM
$MgCl_2$	2 mM
Cebador ITS1-F	1 µM
Cebador ITS4	1 µM
GoTaq® Flexi ADN Polimerasa	1 U
ADN molde	50 ng

- Configuración del programa en el termociclador:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95 °C	5 minutos	1
95 °C	30 segundos	30 (1/3)
58 °C	30 segundos	30 (2/3)
72 °C	1 minuto	30 (3/3)
72 °C	8 minutos	1
15 °C	-	1

- En este trabajo se usó un volumen final de 25 µl. Volúmenes de 15 µl y 50 µl dieron resultados similares.
- Se recomienda usar controles positivos y negativos.
- Al preparar la mezcla, tomar en cuenta el error instrumental aumentando el número de reacciones totales en 0.5 o 1.
- La enzima en este protocolo fue GoTaq® Flexi ADN Polimerasa. El uso de enzimas más eficientes como Hot Start Taq ADN Polimerasa brinda mejores resultados.

Anexo 4.- Líquenes antárticos en la Isla Rey Jorge, Antártica

Ochrolechia frigida



Placopsis antarctica



Candelariella flava



Rhizocarpon sp.



Umbilicaria sp.

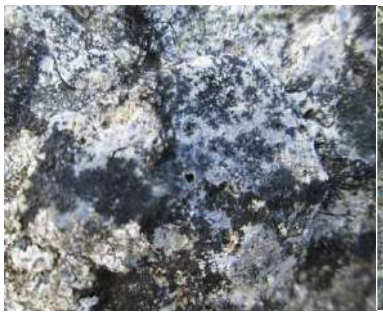


Usnea sp.





Líquenes crustosos







Líquenes similares a *Stereocaulon*



