

Justificación de concesión de ayudas a la

Convocatoria de ayuda a proyectos de investigación liderados por jóvenes investigadores (Tomando la Iniciativa)

1. Datos de identificación.

Título de la propuesta	Cuando tres son multitud: efectos del parasitismo sobre organismos simbioses
Nombre y apellidos del solicitante	Sonia Merinero Mesa
Datos de contacto: e-mail	sonia.merinero@gmail.com
Departamento/Instituto/Grupo de Investigación/Otros	Área de Biodiversidad y Conservación, Universidad Rey Juan Carlos
Dirección, código postal, provincia	C/Tulipán sn 28933, Móstoles, Madrid

2. Memoria Técnica. Actividades y resultados de investigación

2.1. Introducción (Planteamiento, objetivos y justificación)

Los líquenes suponen un recurso imprescindible para otras especies que dependen exclusivamente de ellos: los hongos liquenícolas, parásitos que difieren en virulencia y especificidad. Se asume que los hongos liquenícolas específicos con respecto al hospedador son comensalistas porque aparentemente no causan daños en su hospedador más allá de la deformación del talo liquénico por la generación de agallas cuando el parásito forma estructuras reproductoras (Lawrey & Diederich 2003). Sin embargo, hasta ahora ningún trabajo ha evaluado los efectos de la interacción entre el hongo parásito y el liquen en la *fitness* de ambos. Igualmente, desconocemos si los parásitos están presentes de forma asintomática en los líquenes, y los factores que determinan la formación de agallas sobre sus hospedadores.

El objetivo general de este proyecto fue identificar si los hongos liquenícolas pueden ser parásitos asintomáticos sobre sus hospedadores, y si reducen la *fitness* del liquen sobre el que inducen la formación de agallas. El sistema de estudio lo constituyen las especies modelo *Lobaria pulmonaria* y *L. scrobiculata*, parasitadas por hongos liquenícolas muy específicos, *Plectocarpon lichenum* y *P. scrobiculatae*, respectivamente (Ertz et al. 2005). Para ello, el proyecto se estructuró en dos objetivos específicos:

1) Cuantificar cambios en la *fitness* del liquen hospedador. Se evaluaron las tasas de crecimiento en biomasa y área de especímenes con y sin agallas procedentes de una misma población. Además, se evaluó el cambio en el número y tamaño de las agallas de *Plectocarpon* durante el experimento.

2) Evaluar la presencia de *Plectocarpon* en *Lobaria* sin signos de infección. Para ello, se han diseñado cebadores específicos del gen RPB2 de *Plectocarpon* a partir de las secuencias de ADN disponibles en GenBank. Una vez desarrollados, se han empleado estos cebadores para amplificar regiones del marcador RPB2 en talos de *Lobaria* con y sin agallas.

2.2. Descripción de la ejecución- Metodología

La metodología desarrollada para alcanzar los objetivos propuestos fue la siguiente:

1. Experimento de crecimiento. Se recolectaron al azar 26 talos de *Lobaria* de tamaño similar con y sin agallas de *Plectocarpon* en una población con elevada incidencia del parásito para cada especie ($n=100$). Se evaluaron las tasas de crecimiento de los líquenes en una cámara de cultivo durante 14 días siguiendo el protocolo y las condiciones óptimas de humedad, temperatura y luz para el crecimiento de estas especies indicados por Bidussi et al. (2013). Se cuantificó el peso y área de los talos al inicio y al final del experimento, con el fin de calcular las tasas relativas de crecimiento tanto en área como en biomasa y el cambio en masa específica del talo (*specific thallus mass*; $STM = \text{Biomasa} / \text{Área}$).

2. Diseño de cebadores específicos de *Plectocarpon*. Como estrategia de diseño, se alinearon secuencias de *Plectocarpon* disponibles en GenBank (*Pl. nephromeum* y *Pl. lichenum*) con secuencias de *Lobaria* para el mismo marcador. Se seleccionaron como cebadores regiones muy conservadas en el parásito que diferían notablemente de las mismas regiones en el hospedador. Se diseñaron varios cebadores (directos y reversos) para amplificar de manera efectiva el fragmento de interés.

3. Validación de los cebadores específicos para la amplificación del marcador ITS en talos con agallas de *Plectocarpon*. Una vez diseñados los cebadores, se probaron todas las combinaciones posibles de los mismos para amplificar el ADN de *Plectocarpon* en talos de *Lobaria* con agallas del parásito (en diferentes regiones del talo a diferentes distancias de cada agalla) y en talos sin signos de infección, recolectados en diferentes poblaciones. Se comprobó la identidad de las secuencias mediante la herramienta Blast de la base de datos de GenBank.

2.3. Resultados obtenidos (cumplimiento de objetivos)

Ambos objetivos generales del proyecto se han cumplido satisfactoriamente.

Respecto a la parte molecular del proyecto, se han desarrollado siete cebadores del gen RPB2 (marcador molecular) específicos para el género *Plectocarpon*, que amplifican fragmentos de ADN de longitudes diferentes de *Pl. lichenum* y *Pl. scrobiculatae*. Los resultados preliminares sugieren que estos cebadores no amplifican en talos sin agallas, y tampoco lo hacen en regiones de talos con agallas cuando se muestrea tejido del líquen alejado de las agallas. Este patrón fue consistente en ambas especies de *Lobaria*.

En relación al experimento de crecimiento, se comprobó que los talos parasitados de ambas especies de líquen crecen significativamente menos que los especímenes sanos, tanto en área como en biomasa. No obstante, la magnitud de los efectos del parásito difirió entre especies hospedadoras. En *L. pulmonaria*, el crecimiento en biomasa y área de los talos parasitados fue reducido, pero mantuvo la proporcionalidad existente en los especímenes sanos, ya que la inversión en biomasa siempre fue que mayor que la inversión en área. Por el contrario, el incremento en biomasa de los talos de *L. scrobiculata* parasitados fue muy bajo, por lo que el grosor de los talos parasitados al final del experimento fue inferior que al inicio. Estos resultados indican que *Plectocarpon* es un parásito y no un organismo comensalista dado el efecto negativo que ejerce sobre la eficacia biológica de sus líquenes hospedadores mediante la drástica reducción de las tasas de crecimiento del líquen. Menores tasas de crecimiento influyen en aspectos como la asignación de recursos a otras funciones (e.g. reproducción) y finalmente en la dinámica poblacional del líquen. Uno de los posibles mecanismos subyacentes a esta reducción del crecimiento podría tener que ver con una interferencia del parásito en el

metabolismo primario del líquen, reduciendo el parásito la asignación de carbono del hospedador al crecimiento.

2.4. Conclusiones y valoración de la ejecución

Los objetivos de este proyecto se han cumplido satisfactoriamente y dan lugar a una serie de resultados muy novedosos, puesto que la información disponible sobre las relaciones entre hongos parásitos y sus líquenes hospedadores es muy limitada. Con este proyecto, se rechaza la generalizada asunción de que los hongos liquenícolas específicos por sus hospedadores son un componente comensalista o un elemento más de la simbiosis líquénica, ya que éstos reducen notablemente el crecimiento de sus hospedadores. Además, la caracterización molecular de *Plectocarpon* nos permite concluir que es improbable que estos hongos se encuentren de forma asintomática (sin inducir agallas) en sus líquenes hospedadores.

Los resultados obtenidos en este proyecto suponen un importante avance en el conocimiento de las relaciones parásito-hospedador, suponiendo una base sólida para desarrollar y testar nuevas hipótesis sobre las relaciones evolutivas y ecológicas de estas interacciones bióticas apenas exploradas.

2.4. Publicaciones resultantes

Actualmente estoy trabajando en dos manuscritos que se encuentran en fase de borrador. El primer manuscrito se titula **“When three’s a crowd: fungal parasites reduce the growth of their symbiotic hosts”**. El segundo manuscrito, en fase más preliminar, se titula **“Fungus-specific primers of *Plectocarpon*: application for the assessment of the presence of a lichen parasite”**.

Informe de gastos del proyecto “Tomando la Iniciativa 2015”

Proyecto: Cuando tres son multitud: efectos del parasitismo sobre organismos simbioses.

Beneficiaria: Sonia Merinero.

Actualmente el proyecto se encuentra finalizado y se han empleado los 2000 € para alcanzar los objetivos propuestos en la solicitud de la convocatoria. Se han destinado 131.34 € para cubrir los gastos de desplazamiento a los puntos de muestreo en el campo; 1500 € se han utilizado para el diseño y validación de cebadores específicos de *Plectocarpion*, para lo que se ha necesitado material fungible de laboratorio como kit de extracción de ADN, reactivos para PCRs (exostar, exosap, maxter mix), y el envío de productos de PCR para su secuenciación en empresas externas como MACROGEN y en servicios internos de la Universidad Rey Juan Carlos (CAT). En el experimento de crecimiento se necesitaron placas Petri de plástico cuadradas (103.77 €) y un sacabocados para extraer agallas de talos infectados y calcular el crecimiento real del liquen. Finalmente, se emplearon 200 € para cubrir el gasto de inscripción del congreso de la EEF 2015 donde se divulgaron los resultados de este proyecto (se adjuntan justificante).

En la siguiente tabla se desglosan estos gastos, cuyas facturas están disponibles en formato pdf en el archivo comprimido adjunto (*justificación gastos pyto AEET.rar*).

Desplazamiento Campo	Total (€)
Gasolina	20.01
Gasolina	25.1
Gasolina	39.73
Gasolina	47
	131.84
Análisis genética	
Acefesa: exostar	76.47
Acefesa: exo sap	108.15
macrogen	11.4
macrogen	49.4
macrogen	49.8
macrogen secuencias (72.2 + 38 + 95)	205.2
macrogen	167.2
macrogen	38
secuencias CAT (126+105+35)	266
Werfen_master mix	253.31
Werfen_kit de extracción ADN	283.56
	1508.49
Experimento de crecimiento en cámara de cultivo:	
Placas petri	103.77
Sacabocados	57.28
	161.05
Inscripción congreso EEF Roma	200
	200
TOTAL EMPLEADO (€):	2001.38