



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

Aplicación del código de barras de ADN: propuesta de aplicación didáctica en Bachillerato

M^a Lorena Sánchez Barrado

Grado de Biología

Año académico 2015-16

Trabajo tutelado por el Dr. Carlos Juan Clar
Departamento de Biología

| | | | | |
|--|-------|----|-------|----|
| Se autoriza a la Universidad a incluir este Trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación | Autor | | Tutor | |
| | Sí | No | Sí | No |
| | x | | x | |

Palabras clave del trabajo:
DNA Barcoding, gen COI, Aplicación didáctica

Contenido

| | | |
|--------|---|----|
| 1. | INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 2. | OBJETIVOS | 5 |
| 3. | MATERIAL Y MÉTODOS..... | 5 |
| 3.1. | OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS | 5 |
| 3.2. | OBTENCIÓN DE TEJIDO | 6 |
| 3.3. | TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS..... | 6 |
| 3.3.1. | Extracción de ADN | 6 |
| 3.3.2. | Amplificación del fragmento del gen citocromo oxidasa subunidad 1(COI) por PCR..... | 7 |
| 3.3.3. | Comprobación de la amplificación del gen COI..... | 8 |
| 3.3.4. | Purificación de los productos de PCR | 8 |
| 3.3.5. | Preparación de las muestras para la secuenciación de la región COI..... | 9 |
| 3.4. | TRATAMIENTO DE DATOS..... | 10 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 10 |
| 5. | CONCLUSIÓN | 12 |
| 6. | PROPUESTA DE APLICACIÓN DIDÁCTICA: DESCUBRIENDO LA BIODIVERSIDAD DE NUESTRO ENTORNO MEDIANTE EL CÓDIGO DE BARRAS DE ADN | 13 |
| 6.1. | INTRODUCCIÓN | 13 |
| 6.2. | CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROPUESTA DE APLICACIÓN DIDÁCTICA..... | 14 |
| 6.3. | PLANIFICACIÓN DOCENTE..... | 15 |
| 6.3.1. | Selección y secuenciación de los contenidos | 15 |
| 6.3.2. | Temporalización | 17 |
| 6.4. | METODOLOGÍA DIDÁCTICA..... | 18 |
| 6.5. | EVALUACIÓN | 19 |
| 6.6. | DESARROLLO DE LA UNIDAD DIDÁCTICA 6: Biomoléculas II. ADN i proteínas..... | 19 |
| 6.6.1. | Introducción | 19 |
| 6.6.2. | Planificación docente | 19 |
| 6.6.3. | Desarrollo de la unidad didáctica | 21 |
| 7. | AGRADECIMIENTOS | 26 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA | 27 |
| 9. | ANEXOS | 30 |

1. INTRODUCCIÓN

El *DNA Barcoding* es una técnica de identificación molecular de especies que consiste en la utilización de una pequeña región de un gen (*DNA Barcode*), que ha sido elegida por consenso, para la identificación de animales, plantas u hongos.

La técnica de *barcoding* fue propuesta por primera vez en 2003 por el Dr. Paul Hebert de la Universidad de Guelph (Canadá) (Hebert *et al.*, 2003a), y está basada en la secuenciación de cortas regiones del genoma altamente variables y que aparecen en un elevado número de copias por célula. La idea era utilizar estas secuencias para la identificación de especies, de forma análoga a cómo lo hacen los códigos de barras industriales que identifican productos específicos en la tienda.

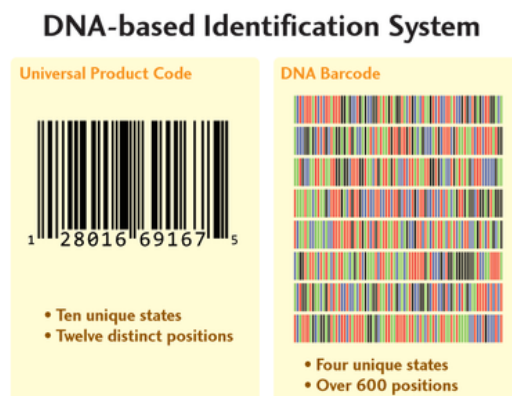


Figura 1. Analogía entre código de barras de un producto y *DNA Barcode*. Fuente: University of Guelph

El código de barras de ADN ideal, debe ser fácil de amplificar y alinear. Para facilitar la amplificación, el *DNA barcode* debería presentar regiones de unión a cebadores muy conservadas, flanqueando la región génica elegida y así, podrían utilizarse la misma pareja de cebadores en un amplio rango de organismos, es decir funcionarían como cebadores universales. Además, los marcadores genéticos son más fáciles de amplificar si se presentan en múltiples copias. Por otro lado, si los códigos de barras genéticos son fáciles de alinear facilitan la identificación de especies basada en árboles filogenéticos, método habitualmente utilizado para la identificación de especies utilizando códigos de barras genéticos. En el artículo original que presentaba el concepto de *DNA barcoding*, el Dr. Paul Hebert y sus colaboradores argumentaban las razones de por qué los genes mitocondriales eran preferibles a los nucleares para los objetivos del *DNA Barcoding* en animales: a diferencia de los genes nucleares, los mitocondriales carecen de intrones, son generalmente haploides y presentan una frecuencia muy baja o incluso nula de recombinación (Hebert *et al.*, 2003a). Además, aunque las inserciones y deleciones son prevalentes en los genes mitocondriales que codifican para DNA ribosómico, son raras en los genes mitocondriales que codifican para proteínas, siendo estos últimos más fáciles de alinear (Hebert *et al.*, 2003a). De los trece genes mitocondriales que codifican para proteínas, Hebert *et al.* (2003a) propusieron el gen que codifica para la citocromo c oxidasa I (COI) como *DNA barcode* para animales por dos razones. Por un lado, la disponibilidad de cebadores universales que hacen posible la amplificación del gen COI en un amplio espectro de filos. Por otro, que el porcentaje de sustitución nucleotídica en este gen es

suficientemente alto como para distinguir entre especies estrechamente relacionadas en todos los grupos de animales excepto en cnidarios (el 98% de las especies del mismo género en 11 filos de animales estudiados, presentan más del 2% de divergencia en la secuencia del COI) (Hebert *et al.*, 2003b). Actualmente, el gen COI es reconocido por el CBOL (*The Consortium for the Barcode of Life Project*) como el marcador genético para animales.

En otros grupos de organismos, el gen COI no funciona tan bien como código de barras genético. En plantas y hongos no es lo suficientemente variable y en hongos además contiene intrones de gran tamaño (Chase *et al.*, 2005). El espaciador de genes ribosomales nucleares ITS (Schoch *et al.*, 2012) está reconocido actualmente por el CBOL como el código de barras de ADN oficial para hongos, mientras que en plantas, se ha propuesto la utilización conjunta de dos regiones de ADN: los genes que codifican para la subunidad grande de la enzima RuBisCo (Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa) (*rbcl*) y para la maturasa K (*matK*) (Kress *et al.*, 2005; Chase *et al.*, 2007). Estos genes localizados en el genoma del cloroplasto son oficialmente los códigos de barras genéticos en plantas (CBOL plant working group, 2009; Hollingsworth *et al.*, 2009). La RuBisCo, considerada la proteína más abundante de la tierra, cataliza el primer paso de la fijación del carbono y la citocromo c oxidasa participa en la cadena transportadora de electrones en la respiración celular. Por tanto, los genes utilizados como códigos de barras de ADN están implicados en reacciones clave de la vida: el almacenamiento de energía en carbohidratos y la oxidación de estos para formar ATP.

Desde que se estableció la técnica del *DNA Barcoding*, sus aplicaciones han ido en aumento e incluyen la identificación de nuevas especies (Hausmann *et al.* 2009) o de especies crípticas (Hebert *et al.*, 2004), la identificación de plantas y animales incluso cuando sus rasgos característicos están ausentes (faltan flores o frutos, estados larvarios...). La técnica permite también la identificación de la dieta de un animal analizando su contenido estomacal o sus heces (Lee *et al.*, 2015), así como también puede utilizarse en la conservación de especies (Eaton *et al.*, 2010), identificación de plagas o en seguridad alimentaria.

Por otro lado, también se han propuesto varios proyectos de "ciencia ciudadana" en los que estudiantes o público en general participan o elaboran proyectos de investigación utilizando el *DNA Barcoding*. Así en el 2008, dos estudiantes del Trinity School de New York, analizaron las especies de pescado que contenía el shushi de diversos establecimientos de la ciudad y descubrieron que 3/4 de las pescaderías y 2/3 de los restaurantes no etiquetaban los productos correctamente (<http://phe.rockefeller.edu/barcode/sushigate.html>). En la ciudad de New York, se celebra un concurso de proyectos de investigación como parte del proyecto *The Urban Barcode Project*

[\(http://www.urbanbarcodeproject.org/\)](http://www.urbanbarcodeproject.org/), en el que equipos formados por 2-4 estudiantes y un tutor presentan sus proyectos de investigación, llevados a cabo aplicando el *DNA Barcoding*, para estudiar la biodiversidad en parques y jardines, controlar las especies de animales y plantas invasoras o los vectores de enfermedades infecciosas, identificar especies exóticas o en peligro de extinción en alimentos o el etiquetado fraudulento en estos. Stoeckle *et al.* (2011) presentaron un estudio en el que analizaban la composición de diferentes infusiones herbales comerciales utilizando el código de barras de ADN para la identificación de sus componentes. Los resultados indicaban que 1/3 de las infusiones analizadas contenían especies vegetales que no se indicaban en la etiqueta. En el grupo de investigación, participaron 3 estudiantes del Trinity School de New York que procesaron parte de las muestras en el comedor de su casa (*TeaBOL: Tea Barcode of Life Project*).

Los ejemplos anteriores han inspirado este proyecto de fin de grado en el que se propone una aplicación didáctica del *DNA Barcoding* para la asignatura de biología y geología del primer curso de bachillerato. Siguiendo la metodología del *DNA Barcoding* se propone el desarrollo, durante el período que cubre dos trimestres de un curso escolar, de parte de los conceptos incluidos en el currículo de las Islas Baleares para la mencionada asignatura (Decreto 35/2015). La elección de la técnica del *DNA Barcoding*, como punto de partida para el estudio de diversos conceptos de biología, obedece a introducir a los alumnos en el conocimiento científico en un contexto de aprendizaje actual y ligado a la vida cotidiana. El diagnóstico genético y los test de ADN se utilizan hoy día habitualmente y los alumnos están familiarizados con ellos incluso a partir de las series de televisión. Por tanto, esta técnica puede captar su interés desde el principio y la comprensión de estos análisis y de sus múltiples aplicaciones puede permitir además, dar una visión transversal por el impacto ético y legal que pueden tener. Por otro lado ayudaría al conocimiento biológico del entorno urbano y rural cercano de los alumnos, contribuyendo a su valoración, respeto y cuidado. Proporciona finalmente pautas para entender el dogma fundamental de la biología molecular y así comprender mejor la herencia genética y sus implicaciones.

El proyecto que se presenta, consta de dos partes. La primera describe el proceso seguido como proyecto piloto para la identificación de unos especímenes de invertebrados recogidos por alumnos de primero de ESO del IES Guillem Sagra de Palma. Todo el procesado de las muestras se realizó en el laboratorio de Genética de la UIB. El objetivo era conocer y estudiar con detalle la metodología a seguir para la identificación de especies mediante el código genético de barras y evaluar la viabilidad de la realización de la técnica mencionada en un centro educativo público, con las constricciones de infraestructura y financiación que se tienen actualmente. En la segunda parte, se desarrolla una propuesta de aplicación didáctica para la asignatura de Biología y Geología del

primer curso de bachillerato como aplicación del código de barras de ADN. La idea principal es que conocer el proceso metodológico llevado a cabo para descubrir la diversidad de seres vivos que se encuentran en las áreas verdes del centro educativo, mediante su identificación por los códigos de barras de ADN, servirá como hilo conductor tanto a nivel conceptual como metodológico, para construir los procesos de enseñanza y aprendizaje y en definitiva construir el conocimiento.

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es estudiar la viabilidad del desarrollo de los contenidos de un curso escolar siguiendo la metodología del código de barras de ADN, como propuesta de aplicación didáctica para la asignatura de Biología y Geología del primer curso de bachillerato. Para ello se ha planteado una primera fase experimental en el laboratorio para determinar si la técnica del código de barras de ADN es una técnica sencilla para la identificación molecular de organismos y si sería factible llevar a cabo esta técnica en un centro público de enseñanza secundaria.

Si los resultados de esta primera parte fuesen favorables se desarrollará una propuesta de aplicación didáctica de la mencionada técnica en el desarrollo del currículo de la asignatura de Biología y Geología del primer curso de bachillerato.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de pequeños invertebrados se obtuvieron durante los meses de febrero y marzo por los alumnos de primero de ESO del IES Guillem Sagrera de Palma de Mallorca, en las proximidades del cementerio de la Vileta, el bosque de Bellver y las zonas verdes del centro educativo. La recogida se realizó por muestreo directo, mediante la observación de los puntos de presencia probable de organismos invertebrados como vegetación, debajo de piedras y troncos, y su captura directa con ayuda de pinzas, manga entomológica o frasco aspirador (Figura 2). Las muestras se conservaron sumergidas en etanol absoluto en viales de plástico y guardados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

Los especímenes recogidos fueron identificados por los alumnos hasta el nivel de clase con la ayuda de claves dicotómicas. La identificación se completó por la autora del trabajo en el laboratorio de la UIB con ayuda de varias guías de campo y páginas web. En la tabla 1 se detallan las muestras



Figura 2. Material utilizado en la recolección de las muestras

estudiadas y su procedencia.

Tabla 1. Código, nombre científico y procedencia de las muestras estudiadas.
IES: IES Guillem Sagrera

| Código | Nombre científico | Procedencia | Código | Nombre científico | Procedencia |
|--------|--|-------------|--------|-----------------------------|-------------|
| TFG 01 | <i>Muscina prolapsa</i> | IES | TFG 13 | <i>Lithobius sp.</i> | Vileta |
| TFG 02 | <i>Helix aspersa</i> | IES | TFG 14 | <i>Hebecnema fumosa</i> | Vileta |
| TFG 03 | <i>Apis mellifera</i> | IES | TFG 15 | <i>Himantarium sp.</i> | Vileta |
| TFG 04 | <i>Crematogaster scutellaris</i> | IES | TFG 16 | <i>Loboptera decipiens</i> | Vileta |
| TFG 05 | <i>Trixoscelis mendezabali</i> | IES | TFG 17 | Lycosidae | Vileta |
| TFG 06 | <i>Thaumetopoea pytiocampa</i> | IES | TFG 18 | <i>Vanessa Atalanta</i> | Bellver |
| TFG 07 | <i>Armadillo officinalis (juvenil)</i> | IES | TFG 19 | <i>Tudorella ferruginea</i> | Bellver |
| TFG 08 | <i>Chrysolina peregrina</i> | Vileta | TFG 20 | <i>Reticulitermes sp.</i> | Bellver |
| TFG 09 | <i>Scolopendra oraniensis</i> | Vileta | TFG 21 | Araneae | Bellver |
| TFG 10 | Salticidae | Vileta | TFG 22 | <i>Empoasca sp.</i> | Bellver |
| TFG 11 | Opiliones | Vileta | TFG 23 | <i>Oxythyrea funesta</i> | Bellver |
| TFG 12 | <i>Armadillo officinalis</i> | Vileta | TFG 24 | <i>Thomisus onustus</i> | Bellver |

3.2. OBTENCIÓN DE TEJIDO

La obtención del tejido se realizó en el laboratorio. Para evitar la contaminación de las muestras se utilizaron placas de Petri, bisturís, pinzas y tubos de microcentrífuga (tipo Eppendorf) esterilizados. Sobre una placa de Petri, con ayuda de bisturí y pinzas, se extrajo una pequeña porción de tejido de cada muestra que dependiendo del espécimen consistió en varios apéndices, porciones de músculo o el organismo entero. El tejido obtenido se guardó en tubos de microcentrífuga que se mantuvieron congelados hasta su procesamiento. Con algunas de las muestras, el procesamiento se inició a continuación de la obtención del tejido. En estos casos, se mantuvieron en una estufa a 37 °C durante 15 minutos, para la eliminación completa del etanol residual procedente de la conservación.

3.3. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

3.3.1. Extracción de ADN

La extracción del ADN de las muestras se realizó siguiendo el protocolo especificado en el kit comercial utilizado, DNeasy® Blood & Tissue de Qiagen, que consta de cuatro etapas:

Digestión: en el tubo de microcentrífuga que contiene cada muestra, se añaden 180 µl de tampón ATL y 20 µl de solución de proteinasa K. Se trituran las muestras con la ayuda de una punta de pipeta, se homogeniza la muestra en un agitador vórtex y se le da un pulso de centrifuga para asegurar que la muestra queda cubierta por los reactivos. Se incuban a 56 °C durante toda la noche.

Adsorción del ADN: sobre las muestras ya lisadas se añaden 400 µl de la mezcla formada por tampón AL y etanol 100% a partes iguales. El contenido de los tubos de microcentrífuga

se dispensa sobre una columna de centrifugación (*spin column*) y se centrifugan 1 min a 8000 r.p.m. Se descarta la fase líquida.

Lavado: sobre la columna de centrifugación se dispensan 500 µl de tampón AW₁, se centrifuga durante un minuto a 8000 r.p.m. y se descarta el filtrado. Se añaden 500 µl de tampón AW₂ sobre la columna de centrifugación, se centrifuga durante 3 minutos a 14.000 r.p.m., y se descarta el filtrado.

Elución: se dispensan 150 µl de tampón de elución (AE) sobre la membrana de la columna de centrifugación, se incuba 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifuga 1 minuto a 8000 r.p.m. Se obtiene la primera elución (E₁). Se repite este paso para completar la elución del ADN obteniendo la segunda elución (E₂).

Finalizada la extracción, se cuantifica el ADN obtenido en las eluciones E₁ y E₂ en un espectrofotómetro Nanovueplus® (GE Healthcare)

3.3.2. Amplificación del fragmento del gen citocromo oxidasa subunidad 1(COI) por PCR

Para la amplificación del fragmento de ADN que nos interesa, de unas 700pb (pares de bases), del gen mitocondrial que codifica para la subunidad I de la enzima citocromo c oxidasa (COI), se han utilizado los cebadores estándar denominados LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' (forward)) y HCO 2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (reverse)) (Folmer, 1994).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador (G-storm) con un volumen total de 25 µl que contenía, 1 µl de muestra, 1,75 µl de MgCl₂ (Bioline), 1 µl de dNTP's (QIAGEN®), 0,5 µl de cada cebador, LCO 1490 y HCO 2198, 0,05 µl de Taq ADN polimerasa (BioTaq™ DNA Polymerase. Bioline), 2,5 µl de tampón de reacción (Bioline) y 17,7 µl de agua ultrapura tipo I (Milli-Q®) (tabla 2).

Tabla 2. Reactivos utilizados en la PCR con LCO 1490 y HCO 2198

| | |
|-----------------------------|------|
| MgCl ₂ (50 mM) | 1,75 |
| dNTP's (10 mM) | 1 |
| LCO 1490 (10 µM) | 0,5 |
| HCO 2198 (10 µM) | 0,5 |
| Taq DNA polimerasa (5u/ µl) | 0,05 |
| Tampón (10x) | 2,5 |
| H ₂ O | 17,7 |

Las condiciones de la amplificación consistieron en una fase inicial de desnaturalización de 5 minutos a 96 °C, seguido de 35 ciclos de 30 s a 96 °C (desnaturalización), 30 s a temperatura de hibridación (48 °C) y 1 minuto a 72 °C (elongación), seguidos de una fase final de elongación a 72 °C durante 10 minutos.

3.3.3. Comprobación de la amplificación del gen COI

Para comprobar en qué productos de la PCR se ha amplificado el gen COI correctamente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), utilizando un marcador de peso molecular de 1 kb.

El gel de agarosa al 1% (p/v) se preparó disolviendo en un matraz Erlenmeyer, 1,5 g de agarosa en 150 ml de tampón TAE 10x, calentando la mezcla hasta su completa disolución. Después de enfriar la mezcla bañando el matraz externamente con agua fría, se añaden 3 gotas de bromuro de etidio (0,5 µg/ml), se vierte la solución sobre un molde de 15 cm x 20 cm y se dejó enfriar hasta su solidificación.

Se prepararon las muestras para la electroforesis añadiendo 1µl de tampón de carga a 4 µl de muestra (producto de PCR). Una vez solidificado el gel de agarosa se coloca en una cubeta de electroforesis que contiene tampón TAE 10x y se siembran las muestras y el marcador de peso molecular. Se realizó la electroforesis con un voltaje de 95 v durante 25 minutos.

3.3.4. Purificación de los productos de PCR

La purificación de los productos obtenidos en la PCR se realizó siguiendo el protocolo del kit comercial utilizado, MSB® Spin PCRapace (Stratec Molecular). A los productos obtenidos de la PCR que presentaron una banda para el gen COI en la electroforesis, se le añadieron 250 µl de tampón de adhesión. Esta mezcla se dispuso sobre una columna de centrifugación (*spin column*) montada sobre un tubo colector y se centrifugaron 3 minutos a 12000 r.p.m. Se descartó el tubo colector con el filtrado y la columna de centrifugación se pasó a un tubo Eppendorf nuevo. Sobre la membrana de la columna de centrifugación se dispensaron 20 µl de tampón de elución. Se mantuvieron 5 min a temperatura ambiente y se centrifugaron durante un minuto a 10000 r.p.m. Se descartó la columna de centrifugación y se conservó el filtrado. Se midió la concentración de ADN en las muestras purificadas en un espectrofotómetro Nanovueplus® (GE Healthcare).

3.3.5. Preparación de las muestras para la secuenciación de la región COI

Para la preparación de la reacción de secuenciación de la región del COI de las muestras, se utilizó el kit BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Para la amplificación de ambas cadenas del gen COI, se preparó una mezcla con los reactivos especificados en la tabla 3. El volumen final de reacción fue de 10 µl añadiendo 1 µl de muestra.

Tabla 3. Reactivos utilizados en la PCR para la secuenciación del COI

| MIX reacción de secuenciación (µl) | | |
|------------------------------------|----------|----------|
| | LCO 1490 | HCO 2198 |
| Tampón Bigdye (5x) | 1,2 | 1,2 |
| Cebador (10 µM) | 0,2 | 0,2 |
| Bigdye terminator | 0,6 | 0,6 |
| H ₂ O | 7 | 7 |

La reacción en cadena de la polimerasa PCR se llevó a cabo en un termociclador Thermal cycler (Applied Biosystems) siguiendo la condiciones de amplificación especificadas por el fabricante del kit comercial utilizado: una fase inicial de 3 minutos a 94 °C, seguido de 25 ciclos de 10 s a 96°C, 5 s a 50 °C y 4 min a 60 °C.

Para la purificación de los productos de la PCR anterior, se llevó a cabo la precipitación del DNA obtenido. A cada muestra se le añadió 50 µl de etanol 100% (v/v) y 2 µl de acetato de sodio 3mM y pH 5,2. Se centrifugaron 30 minutos a velocidad máxima (14000 r.p.m.) y se retiró el sobrenadante. A continuación se añadieron 100 µl de etanol al 70% (v/v) y se centrifugaron 15 minutos a velocidad máxima. Se retiró nuevamente el sobrenadante y se eliminaron los restos de etanol manteniendo las muestras durante 15 minutos en una bomba de vacío. Las muestras (pellets) se mantuvieron congeladas hasta el momento de enviarlas, para su secuenciación, a los Servicios Cientificotécnicos de la UIB. La secuenciación se realizó en un analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems). Antes de cargar las muestras se añadieron 20 µl de agua ultrapura tipo I.

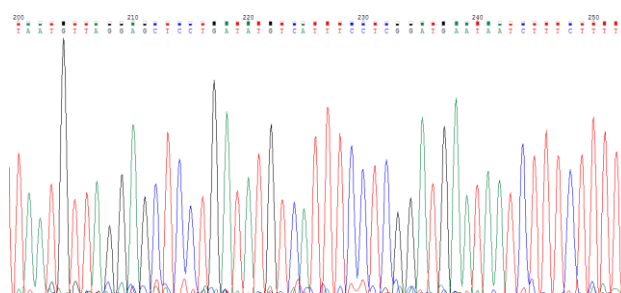


Figura 3. Cromatograma obtenido en la secuenciación de la muestra TFG 17

3.4 TRATAMIENTO DE DATOS

Los cromatogramas de las secuencias de nucleótidos obtenidos se editaron con el programa CodonCode Aligner v. 5.0 (CodonCode Corporation, www.codoncode.com). Este programa permite ensamblar las secuencias directa e inversa de cada muestra y editarlas para obtener una secuencia consenso definitiva. A continuación se eliminaron los cebadores de todas las secuencias. Las secuencias consenso así obtenidas, se compararon con las existentes en la base de datos del *Barcode of Life Database* ([BOLD](#)) (Ratnasingham y Hebert, 2007) y del GenBank® (Benson *et al*, 2005) cargándolas en su sistema de identificación en formato FASTA a través del programa BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool (Madden, 2002)). Se consiguió así la identificación de las especies a partir de las secuencias de nucleótidos del gen COI obtenidas para cada caso y el porcentaje de similitud con las secuencias registradas en estas bases de datos. Para mostrar las relaciones filogenéticas entre las secuencias de nucleótidos obtenidas de las muestras estudiadas y las existentes en las bases de datos que presentaban mayor similitud con las mismas, se elaboraron sus árboles filogenéticos con el programa MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) siguiendo el método Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987) y validándose con el test Bootstrap para 500 réplicas (Felsenstein, 1985). Las secuencias se alinearon previamente con el programa MAFFT v.7 (Katoh *et al.*, 2013) y se editaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999).

Los árboles filogenéticos construidos para cada muestra pueden consultarse en el [Anexo I](#).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La utilización de la técnica del código de barras de ADN ha permitido la identificación de 15 muestras de las 24 recogidas, en 11 de ellas hasta el nivel de especie.

Inicialmente, de las 24 muestras de partida, en 17 se consiguió amplificar el gen COI utilizando la misma temperatura de hibridación para todas ellas y con concentraciones variables de ADN comprendidas entre 8,2 ng/μl y 84,0 ng/μl. El resultado podría haberse mejorado probando diferentes temperaturas de hibridación en la PCR y diferentes concentraciones de ADN hasta conseguir una amplificación del gen COI. No se ha hecho debido a que uno de los objetivos de este trabajo era realizar todo el proceso metodológico para comprobar si es factible realizarlo, con los medios existentes, en un centro educativo. Dado que es difícil que un centro disponga de un termociclador y por tanto, se puedan realizar todos los ciclos necesarios para conseguir amplificar el gen COI en todas las muestras, se trataba de ver los resultados obtenidos realizando el proceso de la manera más simple posible.

Se continuó trabajando con las 17 muestras en las que se había amplificado el gen COI para obtener las secuencias de nucleótidos del mismo y se obtuvieron secuencias de calidad en 15 de ellas. En la muestra TFG 09 no se obtuvieron secuencias de calidad posiblemente debido a la baja concentración de ADN (8,2 ng/ μ l). En la muestra TFG 10 se observaba duplicidad de la señal, esto podría ser debido a la amplificación simultánea de otros fragmentos de ADN existentes en la muestra, procedentes de parásitos, contaminación, etc.

Comparando las secuencias obtenidas con las existentes en las bases de datos del BOLD y GenBank® se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 4. En 11 de ellas, el porcentaje de similitud obtenido con la primera especie más cercana fue del 99 % o superior por lo que puede considerarse que la identificación es sólida a no ser que haya una especie muy afín a las mismas que todavía no haya sido analizada o registrada en las bases de datos consultadas.

De las otras cuatro muestras, la muestra TFG 04, al construir su árbol filogenético, aparece como una especie hermana a *Crematogaster scutellaris* con un valor de bootstrap de 100. Si como en la mayoría de estudios filogenéticos, tenemos en cuenta que un valor de bootstrap de 70 o superior se considera estadísticamente fiable y da solidez a la asociación, podría considerarse confirmada la identidad de la muestra TFG 04 como *C. scutellaris*, como así se había determinado inicialmente con las guías de campo.

La muestra TFG 13, se ha identificado como *Lithobius sp.* y no se ha podido determinar la especie, puesto que en las bases de datos consultadas, la secuencia de nucleótidos estudiada presentaba porcentajes de similitud parecidos entre cuatro especies: *L. stygius*, *L. borealis*, *L. latro* y *L. curtipes* y su árbol filogenético tampoco ofrecía más información.

Una situación parecida se ha producido con la muestra TFG 20, *Reticulitermes sp.*, en la que no ha podido concretarse la especie ni en las bases de datos, ni con su árbol filogenético, a pesar de su identificación inicial, con guías de campo, como *Reticulitermes lucifugus*.

La muestra TFG 17, se ha identificado como una especie de la familia Lycosidae. Tanto en las bases de datos, con un porcentaje de similitud del 98 % (BOLD) y 95 % (GenBank®), como en su árbol filogenético (bootstrap de 94) es muy probable que se trate de *Hogna radiata* o de otra especie muy cercana pero no se ha concretado por no haber sido posible su identificación con las guías de campo.

Tabla 4. Resultados de similitud entre las secuencias obtenidas en el estudio y las existentes en las bases de datos del BOLD (A) y en GenBank (B)

| A. BOLD | | | | | |
|---------|----------------------------------|----------------------------------|---------------|---------------------------------|---------------|
| Código | Nombre Científico | Primera Especie | Similitud (%) | Segunda Especie | Similitud (%) |
| TFG 01 | <i>Muscina prolapsa</i> | <i>Muscina prolapsa</i> | 99,82 | <i>Muscina stabulans</i> | 90,3 |
| TFG 03 | <i>Apis mellifera</i> | <i>Apis mellifera</i> | 99,84 | <i>Apis mellifera</i> | 99,82 |
| TFG 04 | <i>Crematogaster scutellaris</i> | <i>Crematogaster scutellaris</i> | 95,73 | <i>Crematogaster schmidtii</i> | 89,16 |
| TFG 05 | <i>Trioxoscelis mendezabali</i> | <i>Trioxoscelis marginella</i> | 89,81 | <i>Trioxoscelis fumipennis</i> | 89,67 |
| TFG 06 | <i>Thaumetopoea pytiocampa</i> | <i>Thaumetopoea pytiocampa</i> | 99,83 | <i>Thaumetopoea wilkinsoni</i> | 92,3 |
| TFG 12 | <i>Armadillo officinalis</i> | <i>Armadillo officinalis</i> | 100 | <i>Haloniscus sp.</i> | 82,37 |
| TFG 13 | <i>Lithobius sp.</i> | <i>Lithobius stygius</i> | 83,09 | <i>Lithobius borealis</i> | 82,88 |
| TFG 14 | <i>Hebecnema fumosa</i> | <i>Hebecnema fumosa</i> | 100 | <i>Hebecnema nigricolor</i> | 94,75 |
| TFG 17 | Lycosidae | <i>Hogna radiata</i> | 97,84 | <i>Alopecosa kochi</i> | 91,89 |
| TFG 18 | <i>Vanessa atalanta</i> | <i>Vanessa atalanta</i> | 100 | | |
| TFG 19 | <i>Tudorella ferruginea</i> | <i>Tudorella ferruginea</i> | 100 | <i>Tudorella sulcata</i> | 91,65 |
| TFG 20 | <i>Reticulitermes sp.</i> | <i>Reticulitermes grassei</i> | 94,62 | <i>Reticulitermes lucifugus</i> | 94,27 |
| TFG 22 | <i>Empoasca pteridis</i> | <i>Empoasca pteridis</i> | 99,46 | <i>Empoasca vitis</i> | 98,21 |
| TFG 23 | <i>Oxythyrea funesta</i> | <i>Oxythyrea funesta</i> | 99,44 | <i>Protaetia cuprea</i> | 87,84 |
| TFG 24 | <i>Thomisus onustus</i> | <i>Thomisus onustus</i> | 99,3 | <i>Dolomedes senilis</i> | 89,8 |

| B. GenBank® | | | | | |
|-------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|
| Código | Nombre Científico | Primera Especie | similitud (%) | Segunda Especie | similitud (%) |
| TFG 01 | <i>Muscina prolapsa</i> | <i>Muscina prolapsa</i> | 99 | <i>Muscina stabulans</i> | 90 |
| TFG 03 | <i>Apis mellifera</i> | <i>Apis mellifera</i> | 99 | <i>Apis mellifera intermissa</i> | 99 |
| TFG 04 | <i>Crematogaster scutellaris</i> | <i>Crematogaster scutellaris</i> | 95 | <i>Crematogaster lineolata</i> | 85 |
| TFG 05 | <i>Trioxoscelis mendezabali</i> | <i>Trioxoscelis mendezabali</i> | 99 | <i>Trioxoscelis fumipennis</i> | 89 |
| TFG 06 | <i>Thaumetopoea pytiocampa</i> | <i>Thaumetopoea pytiocampa</i> | 99 | <i>Thaumetopoea wilkinsoni</i> | 92 |
| TFG 12 | <i>Armadillo officinalis</i> | <i>Armadillo officinalis</i> | 97 | <i>Mongoloniscus sinensis</i> | 80 |
| TFG 13 | <i>Lithobius sp.</i> | <i>Lithobius latro</i> | 84 | <i>Lithobius curtipes</i> | 83 |
| TFG 14 | <i>Hebecnema fumosa</i> | <i>Hebecnema fumosa</i> | 100 | <i>Hebecnema nigricolor</i> | 95 |
| TFG 17 | Lycosidae | <i>Hogna radiata</i> | 95 | <i>Varacosa avara</i> | 91 |
| TFG 18 | <i>Vanessa Atalanta</i> | <i>Vanessa atalanta</i> | 100 | <i>Vanessa abyssinica</i> | 95 |
| TFG 19 | <i>Tudorella ferruginea</i> | <i>Tudorella ferruginea</i> | 99 | <i>Tudorella sulcata</i> | 91 |
| TFG 20 | <i>Reticulitermes sp.</i> | <i>Reticulitermes grassei</i> | 95 | <i>Reticulitermes speratus</i> | 94 |
| TFG 22 | <i>Empoasca pteridis</i> | <i>Empoasca sp.</i> | 99 | <i>Empoasca fabae</i> | 88 |
| TFG 23 | <i>Oxythyrea funesta</i> | <i>Oxythyrea funesta</i> | 99 | <i>Protaetia cuprea</i> | 88 |
| TFG 24 | <i>Thomisus onustus</i> | <i>Dolomedes senilis</i> | 89 | <i>Thomisus spectabilis</i> | 89 |

5. CONCLUSIÓN

Con los resultados observados podemos concluir que la metodología del código de barras de ADN es una técnica sencilla para la identificación molecular de organismos, puesto que se identificaron el 63 % por ciento de las muestras estudiadas. Además sería posible llevarla a cabo en un centro educativo si se dispusieran del equipo y material necesarios, siendo esto último el factor limitante para poder llevar a cabo la técnica del código de barras de ADN en el centro educativo.

De las etapas que han de realizarse en el proceso, todas salvo las PCR, y la obtención de la secuencia de nucleótidos, podrían llevarse a cabo en un laboratorio de un centro educativo si dispusiera de los medios adecuados. Las etapas inviables, lo son debido al elevado coste del equipo o los reactivos utilizados y por tanto habría que recurrir a algún servicio técnico que las realizase.

En la tabla 5 se presenta una estimación del presupuesto necesario para la adquisición del equipo, material de laboratorio y reactivos que han de utilizarse en el procedimiento a seguir y que habitualmente no se tienen en un centro público de enseñanza secundaria. También se han incluido los gastos que supondrían la realización de las PCR y secuenciación por un servicio técnico de biología molecular.

Tabla 5. Presupuesto estimado del equipo, material fungible y servicio técnico necesarios para llevar a cabo la metodología del código de barras de ADN.

| A. Equipo | | Precio (€) | B. Material Fungible | | Precio (€) |
|---------------------------------|-------------------|------------|---|---------------------------|------------|
| Micropipeta 0,1-2,5µL Easy 40+ | LABBOX | 75 | Puntas de micropipeta 100-1000 µL | LABBOX | 4,68 |
| Micropipeta 10-100µL Easy 40+ | LABBOX | 75 | Puntas de micropipeta 1-200µL | LABBOX | 3,9 |
| Micropipeta 100-1000µL Easy 40+ | LABBOX | 75 | Puntas de micropipeta 0,1-10µL | LABBOX | 4,07 |
| Microcentrifuga MC15K | LBX Instrumentals | 689,68 | Microtubos centrifuga 1,5mL | LABBOX | 21,16 |
| Kit básico electroforesis | Bioted | 495 | DNeasy® Blood & Tissue | Qiagen | 301,29 |
| | | | DNA Barcode Amplification & Electrophoresis Kit with CarolinaBLU™ Stain | Biological Supply Company | 421,08 |
| | | | MSB Spin PCRapace | Strattec Molecular | 112 |
| Total | | 1409,68 | | | |
| C. Servicio técnico | | | | | |
| PCR | | 88 | | Total | 868,18 |
| Secuenciación (10 muestras) | | 70 | | | |
| Total | | 158 | | Total A+B+C | 2435,86 |

La inversión económica necesaria para poner en marcha el proyecto haría muy difícil la implementación del mismo. No obstante cabría la posibilidad de ir desarrollando el proyecto a lo largo de varios cursos académicos o plantear un proyecto multicéntrico de acuerdo con la Conselleria d'Educació i Universitat.

Una vez subsanados los obstáculos económicos, sería factible la aplicación de la metodología del código de barras de ADN en la identificación de especímenes animales y vegetales y a partir de este proceso, desarrollar gran parte de los contenidos incluidos en el currículo de la asignatura de Biología y Geología del primer curso de bachillerato.

6. PROPUESTA DE APLICACIÓN DIDÁCTICA: DESCUBRIENDO LA BIODIVERSIDAD DE NUESTRO ENTORNO MEDIANTE EL CÓDIGO DE BARRAS DE ADN

6.1 INTRODUCCIÓN

La propuesta de aplicación didáctica que se presenta trata de concretar, siguiendo como eje conductor la metodología del código de barras de ADN, los elementos que determinan los procesos de enseñanza y aprendizaje de la asignatura Biología y Geología del primer curso de bachillerato

definidos por la Ley Orgánica 8/2013, de 9 de diciembre, para la mejora de la calidad educativa (LOMCE) y regulados por el Decreto 35/2015, de 15 de mayo, por el cual se establece el currículo de bachillerato en las Islas Baleares.

La asignatura Biología y Geología forma parte del grupo de asignaturas troncales opcionales del primer curso de bachillerato de ciencias y, según aparece en el currículo de la misma (Decreto 35/2015), esta asignatura permite a los alumnos “consolidar los conocimientos y destrezas en ciencias, así, como completar su formación para que sean ciudadanos responsables, respetuosos con ellos mismos, los demás y el medio ambiente y capaces de tener criterios propios y de mantener el interés por aprender y descubrir”.

En el presente trabajo se concretarán los elementos del currículo relacionados con los contenidos de biología de la asignatura mencionada, y que pueden relacionarse de alguna forma con la aplicación del código de barras de ADN para la identificación de organismos vivos. No se incluirá el desarrollo de los contenidos de geología de la asignatura de Biología y Geología del primer curso de bachillerato por estar más apartados del eje conductor elegido.

6.2 CONTEXTUALIZACIÓN DE LA PROPUESTA DE APLICACIÓN DIDÁCTICA

El currículo de la asignatura biología y geología del primer curso de bachillerato (Decreto 35/2015) destaca que, al ser la biología y la geología ciencias que estudian la naturaleza, su contenido ha de relacionarse con el entorno más cercano a los alumnos. Por ello, se ha elegido para el desarrollo de la programación didáctica, la identificación de organismos vivos, procedentes del entorno cercano de los alumnos, mediante el uso de sus códigos de barras de ADN.

Así, los contenidos de esta asignatura se irán trabajando en el orden que permita a los alumnos, entender y aplicar la metodología del *DNA Barcoding* para la identificación de especímenes animales y vegetales recogidos en su entorno cercano, como pueden ser, las zonas verdes del centro educativo o de los alrededores. Este trabajo en el medio natural permitirá que los alumnos conozcan los ecosistemas característicos, la flora y la fauna propias de las Islas Baleares y así apreciar el valor del entorno natural. Así mismo, les permite conocer los principales problemas ambientales, asumir el impacto de las actividades humanas y fomentar actitudes que conduzcan a proteger su entorno.

6.3 PLANIFICACIÓN DOCENTE

Los objetivos formalizados en el documento prescriptivo del currículo (Decreto 35/2015) y su relación con las competencias básicas, contenidos (se indica la unidad didáctica (UD) en la que se trabajarán) y los criterios de evaluación, pueden consultarse en el [Anexo II. Tabla II a](#)

6.3.1 Selección y secuenciación de los contenidos

De los contenidos especificados en el currículo de la asignatura de biología y geología del primer curso de bachillerato (Decreto 35/2015), se han seleccionado aquellos que podrían relacionarse con la comprensión y aplicación de la metodología seguida para la identificación de organismos vivos mediante su código de barras de ADN. Estos contenidos, se han reorganizado y secuenciado de manera que permitan a los alumnos entender y aplicar la metodología señalada. Puede consultarse la organización de los contenidos en unidades didácticas en el [Anexo II. Tabla II b](#)

En la figura 4, se presenta un esquema de la progresión del desarrollo de los contenidos seleccionados, indicando la unidad didáctica en la que se trabajarán. Se propone comenzar con los conceptos que hacen referencia a realidades macroscópicas, más cercanas y conocidas por los alumnos, y acabar con el desarrollo de aquellos conceptos relativos a realidades microscópicas, más lejanas y difíciles de concretar por los alumnos.

Así, comenzando con el estudio de los biomas, ecosistemas y biodiversidad se conseguiría la introducción al tema que nos ocupa: el estudio de la biodiversidad del entorno cercano a los alumnos. La aplicación práctica de esta UD, consistiría en la recolección de muestras de organismos invertebrados y vegetales existentes en las zonas verdes del centro educativo o zonas próximas.

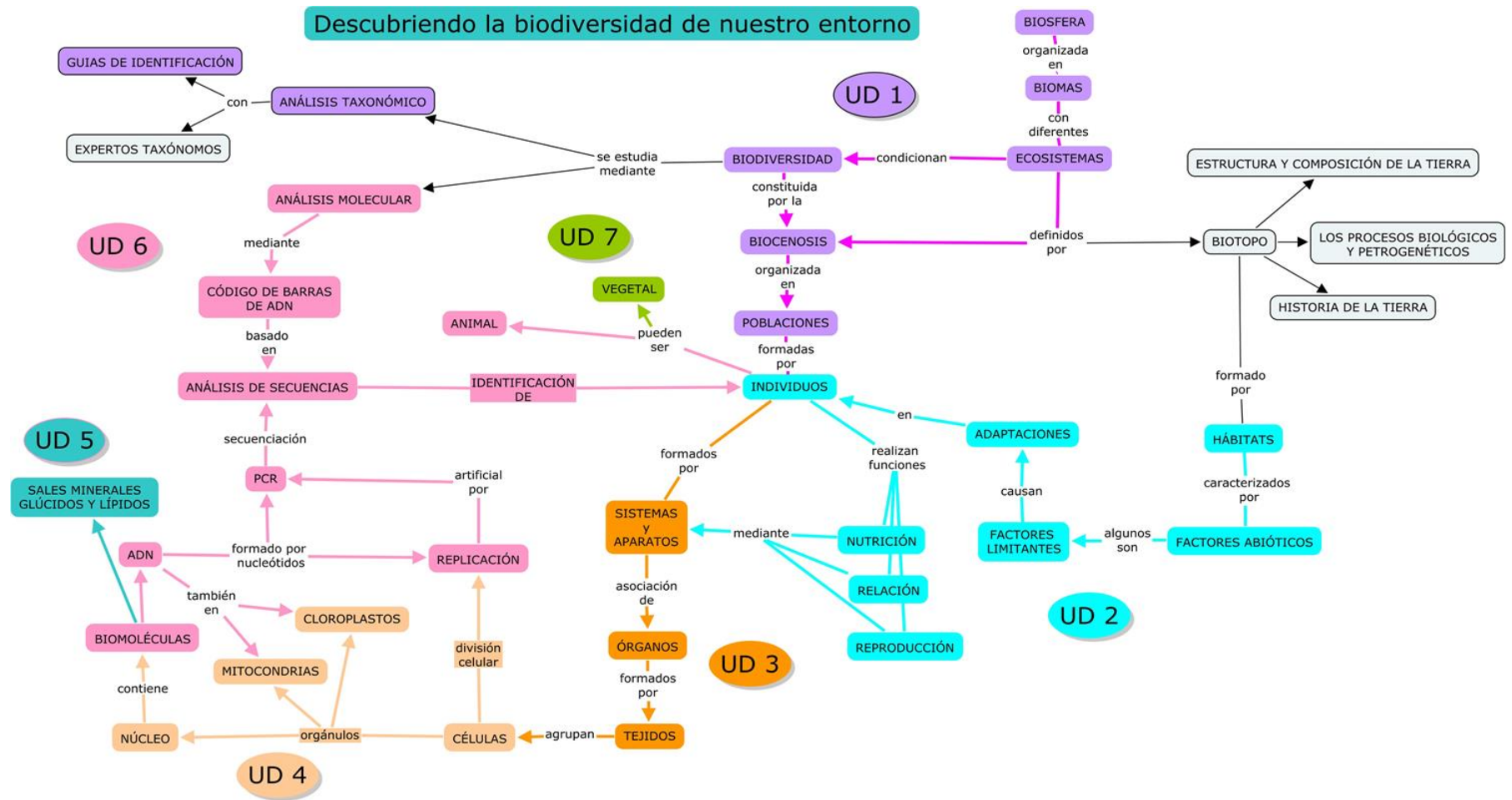


Figura 4. Secuenciación de los contenidos. Se señalan las distintas unidades didácticas (UD) en diferentes colores

Se continuará con las funciones que definen a los seres vivos y las adaptaciones que estos experimentan según el medio en el que viven, como ejemplo práctico podrían estudiarse las muestras recogidas, para trabajar después, en la tercera unidad didáctica, los contenidos relacionados con los niveles de organización, dejando para la unidad didáctica 4, la organización celular, así como el ciclo celular.

En la unidades didácticas 5 y 6 se desarrollarán los contenidos relativos a la estructura y función de los bioelementos y biomoléculas, prestando especial atención a la molécula del ADN, clave para la identificación de los especímenes recolectados. Se llevará a cabo la metodología del código de barras de ADN como actividad práctica de laboratorio.

Por último, para el desarrollo de la UD 7, “Las plantas: Funciones y adaptaciones al medio”, se propondrá a los alumnos el diseño y aplicación (si fuera económicamente posible) de un proyecto para el estudio de muestras de especímenes vegetales recogidos, nuevamente, en las zonas verdes del centro educativo o zonas próximas. Actividad con la que podrán aplicar todo lo aprendido.

6.3.2 Temporalización

Las unidades didácticas se desarrollarán a lo largo de dos trimestres distribuidas como se indica en la figura 5.

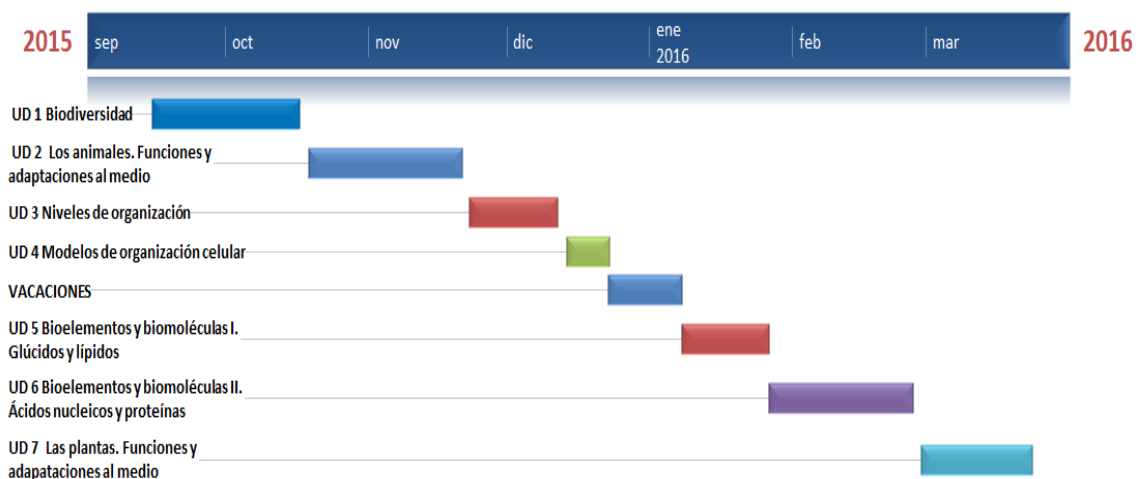


Figura 5. Distribución temporal de las unidades didácticas

6.4 METODOLOGÍA DIDÁCTICA

Tal y como propone la LOMCE, las actividades educativas en el bachillerato han de favorecer la capacidad del alumno para aprender por sí mismos, para trabajar en equipo y para aplicar los métodos de investigación apropiados. Para ello se planteará una metodología activa, haciendo partícipe al alumno de la construcción de su aprendizaje. Partiendo de lo que el alumno ya sabe, pues en algunos de los temas tratados se repiten ciertos aspectos ya trabajados en la educación secundaria obligatoria, se irá redescubriendo el tema, ampliando y desarrollando los contenidos de manera gradual y ordenada, según los va necesitando el alumno. Para conseguir más implicación y motivación de los alumnos, se relacionarán los temas con aspectos de su entorno y se pondrá énfasis en las implicaciones sociales de estos nuevos conocimientos.

Se utilizarán las tecnologías de información y comunicación (TIC) para facilitar el proceso de recopilación, organización y transmisión de los nuevos conocimientos. Para que los alumnos consoliden sus destrezas en relación a la metodología científica y el trabajo colaborativo en equipo, se plantearán actividades de trabajo experimental en el laboratorio y en el medio natural, donde los alumnos trabajarán en pequeños grupos, para observar fenómenos, formular hipótesis, comprobarlas y elaborar informes con los datos recopilados. En el desarrollo de las actividades de aprendizaje se aplicarán las estrategias de la investigación científica: planteamiento de problemas, formulación de hipótesis, búsqueda de información, elaboración de estrategias de resolución, diseño y montajes experimentales, análisis y comunicación de resultados.

En las unidades didácticas se describirán el conjunto de actividades de enseñanza que ha de realizar el docente y las actividades de aprendizaje que ha de realizar el alumno y que le posibilitan alcanzar las competencias establecidas en los objetivos de aprendizaje.

Para ello las actividades planteadas seguirán ciclo de aprendizaje constructivista propuesto por Sanmartí (2000) que consta de cuatro fases: exploración de las ideas previas (fase I), introducción de nuevos contenidos (fase II), estructuración de los conocimientos (fase III), y aplicación del conocimiento (fase IV). Esta secuencia determina los diferentes tipos de actividades: iniciales (fase I), desarrollo (fases II y III) y de síntesis (fase IV).

En este trabajo se desarrolla la secuencia didáctica correspondiente a la unidad didáctica 6.

6.5 EVALUACIÓN

Los criterios de evaluación recogidos en el currículo de bachillerato de las Islas Baleares se han concretado en el [anexo II](#), tabla II a.

La evaluación será continua y se tendrá en cuenta el progreso del alumno en relación a la formación adquirida en la asignatura de Biología y Geología. La evaluación continua se realizará en diferentes momentos (Sanmartí, 2007): evaluación inicial y diagnóstica, al comienzo de curso, evaluación formativa, durante del desarrollo de la unidad didáctica y evaluación final y sumativa al final de cada unidad didáctica.

Se utilizarán **matrices de valoración** (rúbricas) para evaluar los productos de las actividades: exposiciones orales, participación en debates, trabajos en grupo....

6.6 DESARROLLO DE LA UNIDAD DIDÁCTICA 6: Biomoléculas II. ADN i proteínas

6.6.1 Introducción

Esta unidad didáctica se inicia con la identificación de los conocimientos previos que poseen los estudiantes acerca de los ácidos nucleicos, proteínas y biotecnología para posteriormente desarrollar una serie de competencias que les ayudarán a la adquisición de nuevos conceptos y técnicas de experimentación.

Por otro lado se pretende recrear el procedimiento del método científico a partir de una situación real propuesta por el profesor (la identificación de las muestras de organismos invertebrados recogidas por los alumnos al inicio del curso) para contribuir al desarrollo de competencias que les ayudarán a la adquisición de nuevos conocimientos y técnicas de experimentación.

6.6.2 Planificación docente

En la tabla 6 se presentan los elementos curriculares de la unidad didáctica 6: objetivos, contenidos, criterios de evaluación, temporización y recursos.

Tabla 6. Resumen de los elementos curriculares que se considerarán en la unidad didáctica 6

| UNIDAD DIDÁCTICA 6. Biomoléculas II. Ácidos nucleicos y proteínas. | |
|---|---|
| Objetivo general | Conocer la relación entre la estructura y las funciones biológicas de los ácidos nucleicos y las proteínas y las aplicaciones en la sociedad derivadas de los avances en este campo de conocimiento. |
| Objetivos específicos | <ul style="list-style-type: none"> • Identificar las ideas previas de los estudiantes sobre la biotecnología y sus aplicaciones. • Conocer las características de los ácidos nucleicos y de las enzimas (proteínas), que los convierten en las moléculas clave para el desarrollo de la vida. • Estimular la argumentación escrita a través de la lectura de artículos de divulgación de conocimientos científicos. • Relacionar conceptos de biología con la biotecnología. • Promover el pensamiento crítico de los alumnos ante los usos de las nuevas técnicas biotecnológicas. • Conocer y aplicar las técnicas experimentales utilizadas en la metodología del código genético de ADN: extracción del ADN de tejidos animales, PCR, electroforesis, secuenciación de ADN. |
| Contenidos | <p>Conceptuales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Características y funciones de los ácidos nucleicos y las proteínas. • Identificación de organismos vivos mediante su código de barras de ADN: <ul style="list-style-type: none"> ○ Extracción del ADN ○ Amplificación del ADN por PCR ○ Electroforesis en gel de agarosa ○ Secuenciación del ADN ○ Análisis de las secuencias de ADN: bioinformática |
| | <p>Procedimentales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Búsqueda e interpretación de información sobre temas científicos • Debates sobre temas científicos • Elaboración de mapas conceptuales que sintetizen los conceptos aprendidos • Aplicación del método científico • Interpretación de situaciones de la vida cotidiana relacionadas con conceptos estudiados • Precisión, orden y claridad en el tratamiento de datos y presentación de resultados |
| | <p>Actitudinales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cooperación responsable en el trabajo en grupo • Reconocimiento de la utilidad práctica del conocimiento científico • Respeto a las conclusiones obtenidas por los compañeros • Valoración de las aportaciones de los avances científicos en la mejora de la calidad de vida |
| Criterios de evaluación | <ul style="list-style-type: none"> • Relacionar el papel de los biocatalizadores con su mecanismo de acción, justificar la necesidad de estos en las reacciones biológicas y explicar la composición, estructura y funciones de los ácidos nucleicos. • Interpretar procesos biológicos mediante modelos adecuados • Aplicar las técnicas de laboratorio estudiadas. • Describir y aplicar las etapas del método científico seguido en la identificación de los organismos vivos recogidos. |
| Temporización | 18 sesiones de 55 minutos |
| Recursos | <ul style="list-style-type: none"> • Libros de texto • Ordenadores con acceso a internet. • Kits comerciales para la aplicación de la metodología del código genético de ADN (se especifican en la actividad correspondiente). • Material de laboratorio (se especifica en la actividad correspondiente) |

6.6.3 Desarrollo de la unidad didáctica

A continuación se describen las distintas etapas de desarrollo de la unidad didáctica. La evaluación se incluye en todas las fases como un proceso continuo.

I. Exploración. Se proponen actividades que permitan descubrir los conocimientos previos que poseen los estudiantes para así identificar los diferentes puntos de partida y poder regular el aprendizaje de los alumnos. Además, se intentará despertar la curiosidad de los alumnos y así motivarlos para adquirir nuevos conocimientos.

a) Objetivos:

- Identificar las ideas previas de los estudiantes sobre los ácidos nucleicos y proteínas.
- Estimular la argumentación escrita a través de la lectura de textos que contienen conocimientos relacionados con la ciencia y la elaboración de las actividades requeridas.
- Relacionar conceptos que se trabajarán a lo largo de la unidad didáctica con situaciones de la vida cotidiana.

b) Actividades: se propone la lectura del artículo de prensa “El primer hongo con un cromosoma sintético se acerca a la vida artificial “ Nuño Domínguez 27/03/2014 (<http://esmateria.com/2014/03/27/el-primer-hongo-con-un-cromosoma-sintetico-seacerca-la-vida-artificial/>).

La lectura se realizará en grupos integrados por tres alumnos. Terminada la lectura, se proponen una serie de actividades, que tienen como objetivo estimular la argumentación escrita del alumno.

- A. Después de la lectura del artículo realiza las siguientes actividades
1. Poner un título nuevo al artículo.
 2. Hacer un resumen en 5 líneas.
 3. Realizar un mapa conceptual del escrito.
 4. Leer atentamente el texto y subrayar los conceptos que se mencionan.
 5. Definir: biotecnología, genoma, cromosoma, ADN
 6. ¿Cuáles son las técnicas genéticas actuales que se citan en el texto?
 7. ¿Cuál es la idea principal que expone el texto? ¿Qué informaciones que no son dadas por el artículo son necesarias para comprenderlo?
 8. Enumera las palabras que no entiendas

9. ¿Qué ideas nuevas te aporta el texto? ¿Esa información puede ser verificada?
- B. Poner en común las respuestas de los distintos grupos.
- C. Plantear un debate en clase a partir de la discusión de la siguiente pregunta:
¿Crees que es realmente beneficioso para nosotros el poder crear genes sintéticos?

La actividad completa puede consultarse en el [Anexo III a](#)

- c) **Evaluación.** Se recogerán los cuestionarios elaborados por los alumnos y se analizarán antes de la siguiente clase para comprobar la comprensión de los conceptos discutidos.

II. Introducción de nuevos conocimientos. Se trata de enlazar lo que el alumno ya sabe con los nuevos conocimientos que adquirirá durante el desarrollo de la unidad didáctica.

a) Objetivos:

- Conocer las características de los ácidos nucleicos y de las proteínas, que los convierten en las moléculas clave para el desarrollo de la vida.
- Conocer las técnicas experimentales utilizadas en la metodología del código genético de ADN: PCR, electroforesis, secuenciación de ADN.

b) Actividades: preparación de una exposición oral en grupos de tres personas. Cada grupo elegirá uno de los apartados propuestos (tabla 7) y expondrá su trabajo al resto del grupo-clase. Para la búsqueda de información podrán utilizarse los libros de texto, los enlaces especificados en cada apartado u otros que el alumno considere oportunos.

Tabla 7. Temas y enlaces web sugeridos para la actividad de la fase II

| 1. Introducción | 2. Replicación | 3. Transcripción |
|--|---|--|
| Genoma | Replicación 1 | Transcripción |
| Proyecto Genoma humano | Replicación2 | Transcripción 1 |
| Fases del proyecto Genoma Humano | Replicación 3 | Transcripción 2 |
| Línea del tiempo genética y genómica | Tutorial sobre la replicación | Transcripción 3 |
| | Juego crear un gen | From gene to ptotein |
| | | Transcripción eucariotas y procariotas |

Tabla 7. Temas y enlaces web sugeridos para la actividad de la fase II (continuación)

| 4. Traducción del mensaje | 5. Técnicas de laboratorio | 6. Identificación de especies. |
|--|--|--|
| Síntesis de proteínas 1 | a) PCR | Bioinformática |
| Síntesis de proteínas 2 | Animación PCR | Bases de datos biológicas |
| Síntesis de proteínas 3 | The PCR song | Bases de datos de secuencias |
| Los aminoácidos | The PCR song Lyrics | Práctica Blast |
| Funciones de las proteínas | b) Electroforesis en gel de agarosa | Alineamiento de secuencias |
| | Animación electroforesis | Alineamientos múltiples |
| | Simulación electroforesis | Ensamblaje de secuencias |
| | Simulación electroforesis (esp) | Análisis de filogenias |
| | Laboratorio virtual electroforesis | |
| | c) Secuenciación de ADN | |
| | Introducción secuenciación | |
| Secuenciación Sanger 1 | | |
| Laboratorio secuenciación | | |

- c) **Evaluación.** Se evaluará y calificará la presentación (calificación grupal) y la exposición oral (calificación individual). Cada parte representa el 50% de la calificación final.

III. Sistematización. Actividades de síntesis que permitirán al alumno recopilar los nuevos conocimientos introducidos en el apartado anterior

a) Objetivos:

- Aclarar y afianzar los conceptos introducidos en el apartado II.

b) Actividades:

1. Ir a la página <http://learn.genetics.utah.edu/es/> y realizar las actividades siguientes:

- a) Construir una molécula de ADN
- b) Transcribir y traducir un gen

Después de realizar las actividades, redacta una explicación de lo que has hecho.

2. Responde las siguientes preguntas:

- a) ¿Por qué es un polímero el ADN? ¿Qué elementos lo forman?
- b) ¿Qué es un gen?
- c) ¿Cuáles son las moléculas que aportan información al ADN?
- d) ¿En qué consiste la complementariedad de las bases nitrogenadas?
- e) ¿Qué es el Dogma Central de la biología?

- f) ¿Qué relación hay entre los genes y las proteínas?
- g) Define transcripción y traducción
- 3. Realiza la actividad sobre las funciones de las proteínas en el siguiente enlace:
http://www.lourdes-luengo.es/unidadesbio/proteinas/mis_%20transparencias_proteinas/proteinas10.jpg
- 4. Practica la transcripción y traducción en el siguiente enlace:
<http://biomodel.uah.es/lab/cibertorio/analysis/trans.htm>
- 5. [Simulación de la secuenciación de DNA](#)
- 6. [Práctica de alineamientos múltiples](#)
- 7. [Práctica de análisis de filogenias](#) (ejercicios 2, 3, 4)

IV. Aplicación: permite que el alumno aplique los conocimientos adquiridos en situaciones nuevas, donde pueda argumentar y discutir basándose en lo que ha aprendido. Se trata de que los estudiantes puedan reflexionar de forma crítica y aplicar sus conocimientos.

a) Objetivos:

- Aplicar los conocimientos adquiridos en situaciones nuevas.
- Reflexionar de forma crítica sobre metodología a utilizar durante la realización del experimento.
- Aplicar el método científico.

b) Actividades:

1. **Práctica de laboratorio:** Identificación de organismos invertebrados mediante su código de barras de ADN. **¿Qué organismos fueron recogidos en la primera práctica del curso?**

La taxonomía de los seres vivos presenta numerosos problemas por el gran número de especies existentes y en ocasiones la dificultad de observar los caracteres que las identifican. En muchas ocasiones hay que recurrir a especialistas en taxonomía para realizar una correcta identificación de los organismos.

Actualmente se desarrolla un proyecto para caracterizar a los seres vivos por su ADN conocido como *The Barcode of Life* ([BOL](#)) y lo promueve *The Consortium for the Barcode of Life* ([CBOL](#)). Se ha creado una base de datos, *Barcode of Life Database*

([BOLD](#)), que mantiene la Universidad de Guelph, Ontario, y permite a los investigadores recoger y analizar los datos de códigos de barras de ADN.

Como código de barras de ADN, se ha escogido un gen del ADN mitocondrial, no muy largo, que puede aislarse y secuenciarse con relativa facilidad: el gen mitocondrial que codifica para la subunidad 1 de la enzima citocromo oxidasa (COI o COX1). Este gen presenta la suficiente variabilidad para permitir la discriminación entre especies próximas.

La práctica de laboratorio consiste en la identificación, mediante el análisis de sus códigos de barras de ADN, de los especímenes de invertebrados recogidos. Las muestras serán identificadas buscando la secuencia de ADN más parecida entre las registradas en la base de datos del proyecto, *The Barcode of Life Database* ([BOLD](#)) y GenBank® ([BLAST](#)) del *National Center for Biotechnology Information* ([NCBI](#)) y posteriormente creando un árbol filogenético de los individuos determinados.

Procedimiento a seguir (los protocolos que se utilizarán en cada fase pueden consultarse en el [anexo III b](#))

1.a Leer el procedimiento a seguir en cada etapa de la metodología del código de barras de ADN. Comprender el objetivo de la experiencia, discutirlo con los compañeros de grupo y consultar al profesor las dudas que surjan.

1. b Etapas a seguir en el laboratorio:

- a) **Extracción** de ADN de los organismos recolectados con ayuda del kit comercial DNeasy® Blood and tissue Kit (Qiagen).
- b) **Amplificación** del fragmento del gen utilizado como código de barras de ADN, el gen COI, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
Se utilizará el kit comercial DNA Barcode Amplification and Electrophoresis Kit with CarolinaBLU™ Stain (Carolina Biological Supply Company).
- c) **Comprobación de la amplificación** del gen deseado mediante la realización de una electroforesis en gel de agarosa.
- d) **Purificación de los productos PCR** con el kit MSB Spin PCRapace (Strattec molecular).
- e) **Secuenciación** de los fragmentos de ADN amplificados.

f) Análisis de las secuencias obtenidas con herramientas bioinformáticas

1. c Actividades post-laboratorio

a) Basándose en la experimentación realizada, construir una conclusión que explique la solución al problema.

b) Elaboración de un informe escrito en el que se detalle cada uno de los pasos del método científico ejecutados en la actividad realizada

c) Evaluación. Se evaluará y calificará la ejecución de los procedimientos en el laboratorio (individual) y el informe escrito elaborado (grupal).

7. AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Juan Clar por la ayuda prestada y los valiosos comentarios y sugerencias que han contribuido al enriquecimiento de este trabajo. Al Dr. José Antonio Jurado Rivera por su generosidad y la ayuda prestada durante el trabajo experimental en el laboratorio. A los integrantes del laboratorio de Genética por su disponibilidad a ayudar en todo momento.

A Margalida Bosch Sabater y M^a Angels Alou Mir, profesoras del IES Guillem Sagrera, por su implicación en el proyecto.

8. BIBLIOGRAFÍA

7. a. Bibliografía citada

- Benson, D. A., Karsch-mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., Wheeler, D. L. (2005). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 33 (Database Issue), D34–D38. <http://doi.org/10.1093/nar/gki063>
- CBOL Plant Working Group, Hollingsworth, P. M., Forrest, L. L., Spouge, J. L., Hajibabaei, M., Ratnasingham, S., Little, D. P. (2009). A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12794–12797. <http://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haidar, N., & Savolainen, V. (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1889–1895. <http://doi.org/10.1098/rstb.2005.1720>
- Chase, M. W., Cowan, R. S., Hollingsworth, P. M., van den Berg, C., Madriñán, S., Petersen, G., Pedersen, N. (2007). A proposal for a standardised protocol to barcode all land plants. *Taxon*, 56(2), 295-299.
- Eaton, M. J., Meyers, G. L., Kolokotronis, S. O., Leslie, M. S., Martin, A. P., Amato, G. (2010). Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conservation Genetics*, 11(4), 1389-1404.
- Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39,783-791.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology Biotechnology* 3, 294–299
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98
- Hausmann, A., Hebert, P. D., Mitchell, A., Rougerie, R., Sommerer, M., Edwards, T., Young, C. J. (2009). Revision of the Australian *Oenochroma vinaria* Guenée, 1858 species-complex (Lepidoptera: Geometridae, Oenochrominae): DNA barcoding reveals cryptic diversity and assesses status of type specimen without dissection. *Zootaxa*, 2239, 1-21.
- Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., de Waard J.R. (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270(1512), 313-21.
- Hebert, P. D., Ratnasingham, S., de Waard, J. R. (2003b). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270 (1), S96-S99.

- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), 14812-14817.
- Hollingsworth, M. L., Andra Clark, A. L., Forrest, L. L., Richardson, J., Pennington, R., Long, D. G., Hollingsworth, P. M. (2009). Selecting barcoding loci for plants: evaluation of seven candidate loci with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources*, 9(2), 439-457.
- Katoh, K., Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30(4), 772-780.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., Janzen, D.H. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*, 102 (23), 8369–8374.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, doi: 10.1093/molbev/msw054
- Lee, P. S., Sing, K. W., & Wilson, J. J. (2015). Reading mammal diversity from flies: the persistence period of amplifiable mammal mtDNA in blowfly guts (*Chrysomya megacephala*) and a new DNA mini-barcode target. *PloS one*, 10 (4), e0123871.
- Madden, T. (2002). The BLAST Sequence Analysis Tool. [Updated 2003 Aug 13]. In: McEntyre J, Ostell J, editors. *The NCBI Handbook* [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US), 16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/>
- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular ecology notes*, 7(3), 355-364. doi 10.1111/j. 1471-8286.2006.01678. x.
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425
- Sanmartí, N. (2000). *El diseño de unidades didácticas*. En: Canal, P., Perales, J., (edres). *Didáctica de las Ciencias Experimentales*. Alcoy. Ed. Marfil. 239-266.
- Sanmartí, N. (2007). *10 ideas clave. Evaluar para aprender*. Barcelona: Editorial Graò, 19-28
- Schoch, C. L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen, W. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 6241–6246
- Stoeckle, M. Y., Gamble, C. C., Kirpekar, R., Young, G., Ahmed, S., Little, D. P. (2011). Commercial teas highlight plant DNA barcode identification successes and obstacles. *Scientific reports*, 1.

7. b. Otra bibliografía consultada

- Camacho, J., Quintanilla, M. (2008). *Enseñar a argumentar en la clase de química*. Actas del VIII Congreso de Historia y Filosofía de la Ciencia del Cono Sur. Montevideo (Uruguay). Publicación FONDECYT 1070795.
- Canyelles, X. (2003). *Insectes de les Illes Balears*. Mallorca: Editorial Moll. ISBN: 84-273-6014-2
- Chinery, M. 1988. *Guía de los Insectos de Europa*. Barcelona: Ediciones Omega, S.L. ISBN: 84-282-0839-5.
- Consejería de medio ambiente de Andalucía. *Caracoles terrestres de Andalucía, guía y manual de identificación*.(2002).Cádiz : Fundación Gypaetus. ISBN: 84-935194-2-1.
- Gatica, M. Q., Rosales, S. D., Rubilar, C. M. (2010). *Unidades Didácticas en Biología y Educación Ambiental*. Colombia: FONDECYT. ISBN: 978-958-44-7007-2
- Jenner, R. A., Dhubhghaill, C., Ferla, M. P., Wills, M. A. (2009). Eumalacostracan phylogeny and total evidence: limitations of the usual suspects. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1), 1.
- Jones, D. 2004. *Guía de campo de los arácnidos de España y de Europa*. Barcelona: Ediciones Omega, S.L. ISBN: 8428207518
- Miyazawa, H., Ueda, C., Yahata, K., Su, Z. H. (2014). Molecular phylogeny of Myriapoda provides insights into evolutionary patterns of the mode in post-embryonic development. *Scientific reports*, 4.

9. ANEXOS

Anexo I. Árboles filogenéticos

(<https://www.dropbox.com/s/txe78px5lzytnux/ANEXO%20I.pdf?dl=0>)

Anexo II. Tabla II a: Planificación docente

(<https://www.dropbox.com/s/57fl41s4vkb4794/Anexo%20II%20a.pdf?dl=0>)

Anexo II. Tabla II b: Organización de los contenidos en unidades didácticas

(<https://www.dropbox.com/s/jbqsfo012fheym0/Anexo%20II%20b.pdf?dl=0>)

Anexo III a. Actividad de exploración

(<https://www.dropbox.com/s/kliemf6ie9ismou/Anexo%20III%20a.pdf?dl=0>)

Anexo III b. Actividad de aplicación. Protocolos de laboratorio.

(<https://www.dropbox.com/s/hsss7cpn80mexrz/Anexo%20III%20b.pdf?dl=0>)