

Títol del treball: Detecció genètica mitjançant PCR a temps real de la presència de l'espècie invasora musclo zebra (*Dreissena polymorpha*)

Estudiant: Mariona Palacios Marco
Correu electrònic: u1911982@campus.udg.edu

Grau en: Biologia

Tutor: Luis Peñarrubia Lozano
Cotutor*:
Empresa / institució: Universitat de Girona

Vistiplau tutor (i cotutor*):

Nom del tutor: Luis Peñarrubia Lozano

Nom del cotutor*:

Empresa / institució: Universitat de Girona

Correu(s) electrònic(s): luis.penarrubia@udg.edu

*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 27/05/2015

RESUM

El musclo zebra (*Dreissena polymorpha*, Pallas, 1771) és una espècie de mol·lusc bivalve originari de la regió del mar Caspi i Negre. A partir del segle XIX es va expandir per diverses conques del centre d'Europa, arribant a la Península Ibèrica en 2001. La presència de *D. polymorpha* provoca impactes tant a nivell ecològic, afectant la biodiversitat del territori que envaeix, com econòmic, obstruint infraestructures artificials de conducció d'aigua.

Per tal de poder controlar i gestionar la infestació, s'han establert diversos plans de control i seguiment, en els quals hi participen entitats com l'Agència Catalana de l'Aigua (ACA), la Confederació Hidrogràfica de l'Ebre (CHE), i l'Agència Basca de l'Aigua (URA). Aquests plans de control es duen a terme mitjançant l'observació de larves al microscopi, que és una metodologia poc específica i poc sensible que pot generar falsos positius. Per això els mètodes moleculars poden ser una alternativa més fiable que resoldria els problemes tant de inespecificitat com de sensibilitat.

Mitjançant el gen de la histona H2B i la tècnica PCR a temps real es pretén optimitzar un mètode per poder determinar el grau d'infestació de *D. polymorpha* a partir de mostres ambientals de filtrats d'aigua. Per això cal optimitzar tots els passos previs, com l'extracció de DNA i l'amplificació per PCR. Les mostres utilitzades en aquest projecte corresponen a cinc localitzacions de Catalunya mostrejades en dues èpoques de l'any.

Els resultats obtinguts mostren que hi ha presència de DNA de *D. polymorpha* en totes les localitzacions analitzades. En canvi l'ACA només n'ha confirmat la presència en una d'elles (embassament de la Baells), cosa que demostra la millor especificitat i sensibilitat de les tècniques moleculars com la PCR respecte a les tècniques visuals tradicionals. També s'ha vist que a les mostres de l'hivern hi ha més prevalença de DNA de *D. polymorpha* a la columna d'aigua que a l'estiu, resultats que coincideixin amb les èpoques de reproducció i de posta.

Aquesta anàlisi molecular pot servir com a eina rutinària per als plans de control i seguiment de *D. polymorpha*. Gràcies a la seva rapidesa i gran especificitat en detectar DNA de *D. polymorpha*, els esforços de prevenció es podrien enfocar a les localitzacions de risc de infestació.

RESUMEN

El mejillón cebra (*Dreissena polymorpha*, Pallas, 1771) es una especie de molusco bivalvo originario de la región de los mares Caspio y Negro. A partir del siglo XIX se ha expandido por diversas cuencas del centro de Europa, llegando a la Península Ibérica en 2001. La presencia de *D. polymorpha* provoca impactos tanto a nivel ecológico, ya que afecta a la biodiversidad del territorio que invade, como económico, ya que obstruye las infraestructuras artificiales de conducción de agua.

Para poder controlar y gestionar la infestación, se han establecido diversos planes de control y seguimiento, en los que participan entidades como la Agencia Catalana del Agua (ACA), la Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE), y la Agencia Vasca del Agua (URA). Estos planes de control se realizan mediante la observación de larvas al microscopio, que es una metodología poco específica y poco sensible que puede generar falsos positivos. Por eso los métodos moleculares pueden ser una alternativa más fiable que resolvería los problemas tanto de especificidad como de sensibilidad.

Mediante el gen de la histona H2B y la técnica de la PCR a tiempo real se pretende optimizar un método para poder determinar el grado de infestación de *D. polymorpha* a partir de muestras ambientales de filtrados de agua. Para ello es necesario optimizar todos los pasos previos, como la extracción de DNA y la amplificación por PCR. Las muestras utilizadas en este proyecto corresponden a diferentes localizaciones de Cataluña muestreadas en dos épocas del año.

Los resultados obtenidos muestran que hay presencia de DNA de *D. polymorpha* en todas las localizaciones analizadas. La ACA solamente ha confirmado la presencia en una de ellas (embalse de La Baells), cosa que demuestra la mejor especificidad y sensibilidad de las técnicas moleculares como la PCR respecto a las técnicas visuales tradicionales. También se ha visto que en las muestras de invierno hay más prevalencia de DNA de *D. polymorpha* en la columna de agua que en el verano, resultados que coinciden con las épocas de reproducción y de puesta.

Este análisis molecular puede servir como herramienta rutinaria en los planes de control y seguimiento de *D. polymorpha*. Debido a su rapidez y su gran especificidad en detectar DNA de *D. polymorpha*, los esfuerzos de prevención podrían enfocarse en las localizaciones de riesgo de infestación.

ABSTRACT

Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*, Pallas, 1771) is a bivalve mollusc species native from the Caspian and Black seas region. Since XIX century has expanded to central Europe, and it established in the Iberian Peninsula in 2001. The presence of *D. polymorpha* causes ecological impacts, affecting biodiversity, and economic impacts, blocking water-conductor infrastructures.

In order to control and manage the infestation, different control and management plans have been established. Some of these organizations are Agencia Catalana de l'Aigua (ACA), Confederacion Hidrogràfica de l'Ebre (CHE), and Agencia Basca de l'Aigua (URA). These monitoring plans are carried out by observing larvae through a microscope, a technique with low specificity and sensitivity that can generate false positives. For this reason the molecular methods can be an alternative more reliable that could fix the problems like un-specificity and low sensitivity.

Using gene histone H2B and Real-Time PCR, it is expected to be optimized a method to determine the infestation grade from environmental filtered-water samples. For do this, it's necessary to optimize the previous steps, like DNA isolation and PCR amplification. The samples used in this project belong to different locations from Catalonia sampled in two seasons.

Results obtained show that *D. polymorpha* DNA is present in all analysed locations. ACA has only confirmed the presence in one of them (La Baells Reservoir), suggesting the better molecular techniques specificity and sensitivity than traditional visual methods. We also have seen that in winter there are more *D. polymorpha* DNA prevalence in the water column than in summer, according with the reproduction period.

This molecular analysis can be used like routine tool into the *D. polymorpha* control and management plans. Because its quickness and its great *D. polymorpha* DNA detection, the prevention efforts could be focussed to the locations with risk of infestation.

AGRAÏMENTS

M'agradaria donar les gràcies a les diverses persones que han fet possible aquest treball, així com les que m'han donat suport. Primerament a en Luis Peñarrubia per totes les hores que ha dedicat a ajudar-me i orientar-me durant tot el projecte, i gràcies al qual he après tant coneixements teòrics com maneres de treballar que em seran de molta ajuda en el futur. Al Dr. Jordi Viñas, ja que sense ell no hauria pogut començar aquest projecte, i em va guiar durant el començament d'aquest. També m'agradaria agrair a l'Agència Catalana de l'Aigua pel subministrament de les mostres, sense les quals no s'hagués pogut dur a terme el treball. A en Mario García-Risco per el suport incondicional que ha permès que seguís endavant en molts moments crítics. I finalment, com no, a la família també pel seu suport sense la qual no hauria arribat fins aquí.

Índex

1.- INTRODUCCIÓ	3
1.1.- ESPÈCIES INVASORES	3
1.2.- MUSCLO ZEBRAT (<i>Dreissena polymorpha</i>)	3
1.3.- RANG D'EXPANSIÓ DE <i>D. polymorpha</i>	4
1.3.1.- Rang d'expansió a Europa	4
1.3.2.- Rang d'expansió a la Península Ibèrica	4
1.4.- IMPACTES PRODUI TS PER <i>D. polymorpha</i>	5
1.4.1.- Impactes ecològics	5
1.4.2.- Impactes econòmics	5
1.5.- PLANS DE CONTROL I SEGUIMENT DE <i>D. polymorpha</i>	6
1.6.- MARCADORS MOLECULARS	6
2.- OBJECTIUS	8
3.- MATERIAL I MÈTODES	9
3.1.- OBTENCIÓ DE SEQÜÈNCIES DE REFERÈNCIA D'INDIVIDUS ADULTS	9
3.1.1.- Obtenció de les mostres	9
3.1.2.- Extracció de DNA	9
3.1.2.1.- Kit comercial Real Pure DNA Extraction	9
3.1.2.2.- Protocol FENOL/CLOROFORM	9
3.1.2.3.- Kit comercial E.Z.N.A. Mollusc DNA	10
3.1.3.- Valoració de la quantitat i qualitat del DNA	10
3.1.4.- Amplificació per PCR	10
3.1.5.- Neteja del producte de PCR	11
3.1.6.- Reacció de seqüenciació de DNA	12
3.1.7.- Precipitació del DNA	12
3.1.8.- Obtenció de les seqüències del gen H2B	13
3.1.9.- Anàlisi de les seqüències de DNA obtingudes	13
3.2.- OPTIMITZACIÓ DE LA RECTA PATRÓ PER LA QUANTIFICACIÓ DE DNA	13
3.2.1.- Selecció de la mostra de DNA	13
3.2.2.- Preparació dels punts de la recta patró per la RT-PCR	13
3.2.3.- Amplificació de la recta patró per Real Time-PCR	14
3.3.- OPTIMITZACIÓ DE EXTRACCIÓ DE DNA DE MOSTRES AMBIENTALS DE FILTRATS D'AIGUA	15
3.3.1.- Obtenció de les mostres	15
3.3.2.- Processament de les mostres	15
3.3.3.- Extracció de DNA	16
3.3.4.- Valoració de la quantitat i qualitat del DNA	17
3.4.- OPTIMITZACIÓ DE L'AMPLIFICACIÓ PER PCR DE LES MOSTRES DE DNA DE FILTRATS	17
3.5.- OPTIMITZACIÓ DE LA RT-PCR ESPECIFICA PEL GEN H2B DE <i>D. polymorpha</i>	18
3.5.1.- Preparació de les mostres	18
3.5.2.- Controls de l'amplificació per RT-PCR	18
3.5.3.- Amplificació per RT-PCR	18
3.6.- ANÀLISI DE L'ESPECIFICITAT DE LA TÈCNICA DE QUANTIFICACIÓ DEL NIVELL D'INFESTACIÓ DE <i>D. polymorpha</i> DESENVOLUPADA	19
3.6.1.- Anàlisi de les corbes de dissociació de la RT-PCR	19
3.6.2.- Comprovació per seqüenciació del gen H2B	19
4.- RESULTATS I DISCUSSIÓ	20
4.1.- OPTIMITZACIÓ DE LA RECTA PATRÓ DEL GEN H2B	20
4.2.- OPTIMITZACIÓ DE EXTRACCIÓ DE DNA DE MOSTRES AMBIENTALS DE FILTRATS D'AIGUA	21

4.3.- OPTIMITZACIÓ DE L'AMPLIFICACIÓ PER PCR DEL GEN H2B EN MOSTRES DE FILTRATS	23
4.4.- DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE NIVELLS D'INFESTACIÓ DE <i>D. polymorpha</i> EN MOSTRES AMBIENTALS DE FILTRATS D'AIGUA	24
4.4.1.- Criteris de consideració de presència de DNA de <i>D. polymorpha</i> en una mostra	24
4.4.2.- Anàlisi del nivell d'infestació de <i>D. polymorpha</i> dels filtrats d'aigua	24
4.4.3.- Anàlisis de les seqüències obtingudes pel gen H2B	26
5.- CONCLUSIONS	28
6.- BIBLIOGRAFIA	29

Índex de taules i figures

Imatge 1: Mapa de la distribució de <i>D. polymorpha</i> a Europa.	4
Imatge 2: Localització dels 5 punts de la conca hidrogràfica de Catalunya seleccionats per l'anàlisi	16
Imatge 3: exemple de recta patró de RT-PCR amb 7 punts ben amplificats i un bon control negatiu.	20
Imatge 4: recta patró mitjana calculada a partir de les rectes patró de les 4 RT-PCR realitzades.	21
Imatge 5: gel d'agarosa al 1.5% de la PCR de <i>D. polymorpha</i> abans de l'optimització de la tècnica	23
Imatge 6: gel d'agarosa al 1.5% de la PCR gradient on es pot veure el gradient de temperatures	23
Imatge 7: gel d'agarosa al 1.5% de la PCR-Touch Down on es veu que ja no apareixen múltiples bandes	24
Imatge 8: comparació de la concentració de les mostres de filtrats de 100 litres d'estiu i d'hivern	25
Imatge 9: alineament de les seqüències obtingudes pel gen H2B	27
Taula 1: reactius i el volum utilitzats per preparar la MIX de la PCR per una mostra	11
Taula 2: temperatures i temps del programa de PCR, juntament amb la reacció que es duu a terme.	11
Taula 3: reactius i el volum utilitzats per preparar la MIX de seqüenciació per una mostra.	12
Taula 4: temperatures i temps del programa de seqüenciació, juntament amb la reacció que es duu a terme.	12
Taula 5: dilucions de la recta patró de la RT-PCR amb les concentracions de DNA de <i>Dreissena polymorpha</i> .	14
Taula 6: reactius i el volum utilitzats per preparar la MIX de la Real Time-PCR per una mostra	14
Taula 7: temperatures i temps del programa de PCR a temps real, juntament amb la reacció que es duu a terme.	15
Taula 8: resultats de les extraccions de les mostres de filtrats.	22
Taula 9: resultats de la RT-PCR per les mostres ambientals analitzades.	25

1.- INTRODUCCIÓ

1.1.- ESPÈCIES INVASORES

Les espècies exòtiques invasores (EEI) són espècies que s'han desplaçat del seu hàbitat natural i s'han introduït ja sigui fortuït o intencionadament i s'han distribuït en un nou ecosistema. Normalment, aquestes espècies ocasionen canvis que poden suposar una amenaça per la diversitat tant de la fauna com de la flora autòctona, com la nàiada auriculada (*Margaritifera auriculària*, Spengler, 1793), la llúdria (*Lutra lutra*, Linnaeus, 1758) i l'espínós (*Gasterosteus gymnurus*, Linnaeus 1758), entre d'altres. Les EEI solen ser espècies amb molta capacitat d'adaptació produint grans impactes tant a nivell ecològic com econòmic. Respecte als impactes ecològics, podem destacar que afecten a l'equilibri de la comunitat, la diversitat i les relacions interespecífiques (Karatayev et al., 2015). Respecte a las implicacions en el camp econòmic, cal destacar que a part dels costos que suposa el seu control o eradicació, s'ha de sumar la incidència sobre els recursos aprofitables per l'home i les repercussions sanitàries (MMARM, 2007). Degut a les pèrdues tant de biodiversitat com econòmiques, les EEI han despertat l'interès de diferents organismes i administracions per poder controlar i gestionar els problemes que ocasionen (URA, 2013; CHE, 2014; ACA, 2015).

Concretament en ecosistemes aquàtics suposen un gran risc per el seu equilibri, ja que són ecosistemes més fràgils, per això els efectes produïts en aquests ecosistemes són més severos (URA, 2013). En els ecosistemes aquàtics a més de pèrdues de biodiversitat, també repercuteixen negativament sobre usos industrials i lúdics de l'aigua (CHE <http://www.chebro.es/>).

A Catalunya hi ha nombroses espècies que envaeixen les zones fluvials, les més importants són el cranc roig americà (*Procambarus clarkii*, Girard, 1852), el musclo zebnat (*Dreissena polymorpha*, Pallas 1771), diverses espècies de peixos, com el silur (*Silurus glanis*, Linnaeus 1758). També abunden les espècies vegetals, com la canya (*Arundo donax* L.) i la falguera d'aigua (*Azolla filiculoides* Lam.) (ACA <http://aca-web.gencat.cat/aca/>).

1.2.- MUSCLO ZEBRAT (*Dreissena polymorpha*)

Dreissena polymorpha (Pallas, 1771), entre d'altres, és una espècie que ha proliferat en diverses conques hidrogràfiques de la península Ibèrica. És un mol·lusc bivalve d'aigua dolça, pertany a la família dels dreissenids. És una espècie originària del mar Caspi i Negre (CHE, 2007) que a partir del segle XIX es va expandir per el centre d'Europa, la principal expansió del musclo es va donar gràcies a la construcció de canals que connectaven els rius de l'Europa oriental i el mar Caspi i el mar Negre (Bij de Vaate et al., 2002).

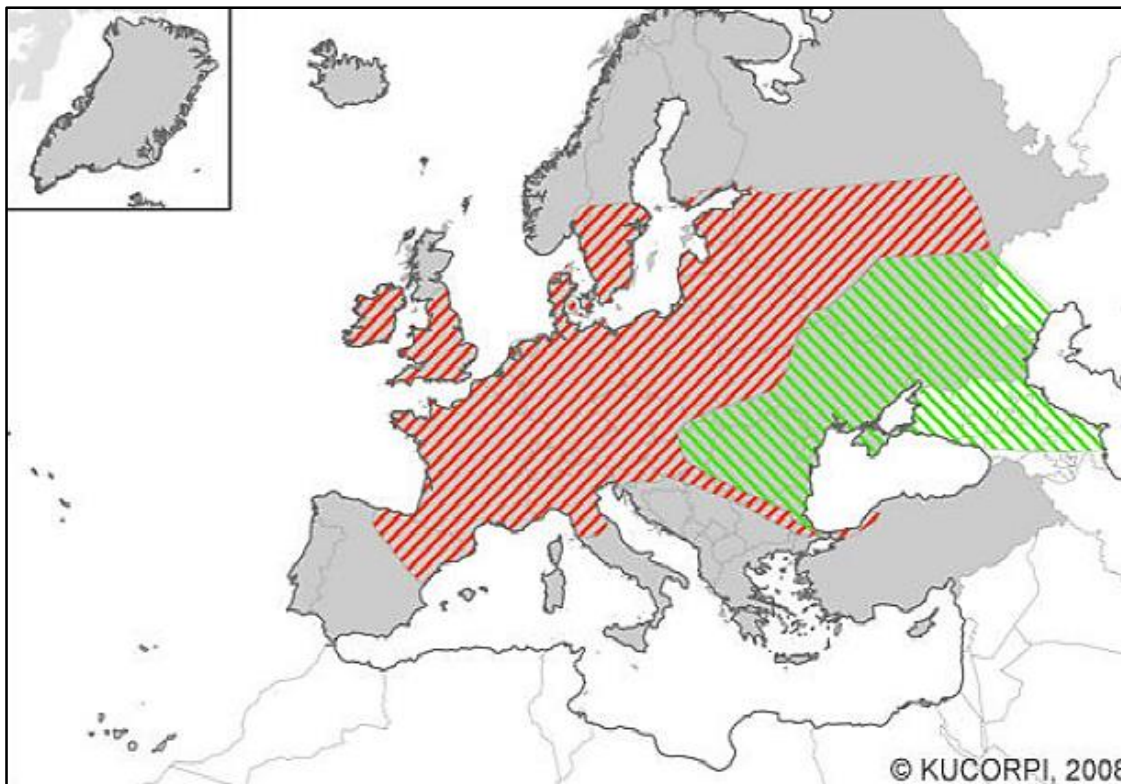
Habita principalment en rius, embassaments, llacs i llacunes d'aigua dolça de regions temperades. És una espècie gregària, tendeix a agrupar-se formant capes (CHE, 2007). Tolerà un ampli rang de paràmetres fisicoquímics, excepte en aigües contaminades per metalls pesants (URA, 2013). Les variables que tenen més incidència són la temperatura, el pH i la concentració de calci, tot i que és la combinació òptima d'aquests factors la que permet assolir densitats màximes (URA, 2013).

És una espècie que estableix fortes relacions de competència inter i intraespecífiques per l'espai. Hi ha varies espècies que s'alimenten o són paràsits de *D. polymorpha*, durant la fase larvària és consumit per altres espècies planctòniques, durant la fase adulta serveix d'aliment a sangoneres, crancs de riu, peixos i aus, el paràsit més comú a Europa és *Bucephalus polymorpha* (Baer, 1827) (CHE, 2007).

1.3.- RANG D'EXPANSIÓ DE *D. polymorpha*

1.3.1.- Rang d'expansió a Europa

Multitud d'espècies originàries del mar Caspi s'han expandit a través d'Europa, s'han descrit tres gran corredors pels quals varies espècies, inclòs *D. polymorpha* han pogut colonitzar altres territoris (Bij de Vaate et al., 2002). El corredor del nord connecta el riu Volga amb el mar Bàltic, el corredor central que connecta el riu Dnièper també amb el mar Bàltic i el corredor del sud que connecta el riu Danubi amb el riu Rin (Bij de Vaate et al., 2002). És creu que la ruta per la qual va arribar a la península Ibèrica és pel corredor del sud mitjançant el transport de iots d'un llac a un altre, ja que poden sobreviure varies setmanes fora de l'aigua. (Bij de Vaate et al., 2002).



Imatge 1: Mapa de la distribució de *D. polymorpha* a Europa. les zones amb línies verdes corresponen a les àrees natives i les zones amb línies vermelles corresponen a les àrees d'invasió (Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe, DAISIE, 2008, <http://www.europe-aliens.org/default.do>).

1.3.2.- Rang d'expansió a la Península Ibèrica

A l'estiu del 2001 és va tenir constància per primer cop de la presència de *D. polymorpha* a la Península Ibèrica a la conca del riu Ebre, específicament a la part mitja del riu a l'embassament de Riba-roja i de Flix (Ruiz-Altava et al., 2001). Durant aquests anys s'ha anat expandint per tota la conca de l'Ebre, tant cap a la part alta com la baixa del riu Ebre (Duran et al., 2008).

A part de l'Ebre també ha colonitzat altres conques al voltant, com la conca del riu Mijares, la del riu Xúquer i la del riu Segura més al sud (MMARM, 2007), més tard també va arribar a la conca del riu Llobregat més al nord (ACA, 2015). En alguns punts només s'ha trobat la presència de larves, en altres la presència tant de larves com d'adults (MMARM, 2007).

1.4.- IMPACTES PRODUI TS PER *D. polymorpha*

1.4.1.- Impactes ecològics

Els impactes ecològics que produeix *D. polymorpha* depenen de cada ecosistema, però en general afecten a la biodiversitat. Provoquen canvis en l'estructuració de l'habitat que afecta a les espècies bentòniques, a causa de l'activitat filtradora la composició i densitat del plàncton es veu afectada, també afecten les relacions inter i intraespecífiques i el cicle dels nutrients (Karatayev et al., 2015). L'estructura poblacional que formen serveix de refugi per organismes bentònics, d'aquesta manera evita la seva depredació (Karatayev et al., 2015).

D. polymorpha és una espècie gregària, les agrupacions que formen poden arribar a filtrar grans quantitats d'aigua, aquest fet altera la forma i la velocitat amb la qual la matèria orgànica és compactada i sedimentada i això modifica els cicles biogeoquímics del ecosistema (CHE, 2007). Aquestes agrupacions també, recobreixen els substrats i provoquen el desplaçament d'espècies bentòniques natives, com els mol·luscs autòctons (*Margaritifera auriculària*) (CHE, 2007) i altres de la família *Unionidae* sobre la qual té un gran impacte negatiu (Karatayev et al., 2015).

1.4.2.- Impactes econòmics

Els danys econòmics són deguts a la interferència directa o indirecta amb activitats humanes. Obstrueixen infraestructures com, canonades d'aigua d'abastiment per poblacions, d'agricultura i ramaderia, d'indústries i també els sistemes de refrigeració de centrals tèrmiques (Duran et al., 2012). Els musclos s'adhereixen a les parets i en poc temps acaben obstruint completa o parcialment els conductes (CHE, 2007), acceleren la corrosió dels metalls en contacte amb l'aigua, no és un efecte directe, sinó que els bacteris que es troben entre els bicus i les parets de la canonada creen un espai anòxic i reductor (MMARM, 2007), recobreixen els bucs de les embarcacions i per tant incrementen les despeses de manteniment. També danyen motors, ja que s'introdueixen en els sistemes de navegació (CHE, 2007).

Des del 2001 fins al 2009 la invasió de *D. polymorpha* ha suposat un cost de 13.7 milions d'euros, entre despeses de defensa, control i prevenció, sobretot en el període comprès entre el 2005 i 2009 (Duran et al., 2012).

1.5.- PLANS DE CONTROL I SEGUIMENT DE *D. polymorpha*

Un cop *D. polymorpha* s'ha establert en l'habitat és molt difícil eliminar-lo de la zona, per això és important establir el grau d'infestació per poder gestionar el manteniment de les infraestructures afectades. Com més ràpidament es detecti la presència de larves es podrà gestionar millor els plans de control i així evitar despeses innecessàries. La detecció ràpida de

larves pot ajudar a la prevenció d'invasions a conques hidrogràfiques noves, aquest és l'objectiu de *la Estrategia Nacional para el Control del Mejiñón Cebra a España* (MMARM, 2007).

Els plans de gestió, control i detecció precoç han sorgit gràcies a la feina de diverses entitats, tant governamentals com privades. Les més importants són la Confederació Hidrogràfica de l'Ebre (CHE), l'Agència Catalana de l'Aigua (ACA), Agència Basca de l'Aigua (URA), així com IBERDROLA S.A. que tot i ser una empresa privada també hi col·labora. Aquests plans de gestió classifiquen els embassaments en funció del risc d'invasió del *D. polymorpha*. Com a resultat, es poden classificar en 4 grups, de la A a la D, en funció de la presència d'adults o larves o del risc a que estiguin exposats (CHE, 2014):

- Grup A → masses d'aigua amb presència confirmada d'exemplars adults.
- Grup B → masses d'aigua amb presència larvària confirmada.
- Grup C → masses d'aigua en risc.
- Grup D → masses d'aigua sense presència de musclo, ni adults ni larves i sense risc de colonització.

A dins d'aquests plans de control i seguiment, el diagnòstic de presència de larves es fa de manera visual al microscopi, a partir de mostres qualitatives i quantitatives. Els qualitatives es fan mitjançant dues tècniques: arrossegament i pesca vertical. Per els quantitatives es filtren 100L d'aigua superficial mitjançant una xarxa de plàncton de 50µm, aquestes mostres es fixen amb formol 4% per la seva observació (ACA, 2015). Un cop preses les mostres s'analitzen al laboratori mitjançant un microscopi amb llum polaritzada, primer s'analitzen les qualitatives i només es determina presència o absència, en cas de presència es determina l'abundància mitjançant les quantitatives (ACA, 2015).

La recollida de mostres es fa en dues èpoques de l'any, ja que es produeixen dos pics de màxima reproducció, un de maig a juliol (més intensa) i l'altre de finals d'agost a mitjans d'octubre. Les larves produïdes durant les postes romanen a la columna d'aigua durant 3 mesos, passat aquest temps cauen i es fixen el bentos (CHE, 2007). El seguiment anual de larves és important ja que un cop s'ha establert aquesta espècie és molt difícil eradicar-la, per tant si la infestació es detecta d'hora, permetrà dissenyar i aplicar plans d'actuació adequats i d'aquesta manera evitar costos associats.

1.6.- MARCADORS MOLECULARS

Tots els plans de control i seguiment es duen a terme mitjançant observacions de larves al microscopi, però aquesta metodologia és poc sensible i pot generar falsos positius ja que les larves de *D. polymorpha* són semblants a les larves d'altres micro-invertebrats. Per tant, els mètodes moleculars són una alternativa per resoldre aquest problema, també permeten obtenir un anàlisi ràpid, efectiu i econòmic, ja que es tracta de marcadors genètics.

Al Laboratori d'Ictiologia Genètica (LIG) de la Universitat de Girona es vol desenvolupar un mètode mitjançant un marcador genètic per tal de detectar la presència de larves de *D. polymorpha*. Prèviament al LIG es va realitzar una seqüenciació massiva de *D. polymorpha* a dins d'una de les seves línies de recerca (Peñarrubia et al., 2015). Fa dos anys es va dirigir des del LIG un Treball Final de Grau (Noguera I., Grau en Biologia, 2013), que tractava d'analitzar les

seqüències generades per la seqüenciació massiva en busca de gens de còpia única per homologia amb altres seqüències presents a les bases de dades genòmiques.

De tots els diferents gens de còpia única que es van trobar, es van fer proves preliminars d'amplificació per PCR per detectar la seva especificitat. Per comprovar-ho, es van amplificar, mitjançant PCR, en diferents espècies properes de bivalves i mol·luscs com: *Corbicula fluminea* (O. F. Müller, 1774), *Margaritifera auriculària*, *Pomacea caniculata* (Lamarck, 1828) així com *D. polymorpha*. El gen que millor resultat va generar va ser el gen de la histona H2B, ja que va presentar una elevada especificitat per *D. polymorpha*, al no amplificar per cap de les altres espècies que es van analitzar. Aquest gen, com a codificador d'una proteïna histona, presenta una seqüència molt conservada dins de l'espècie. Malgrat això, es va observar que també amplificava per l'espècie germana a *D. polymorpha*, el musclo quagga (*D. bugensis*). Anàlisis prèvies del LIG demostren que a les conques de la península Ibèrica només hi ha present invasió de *D. polymorpha* (L. Peñarrubia comunicació personal), descartant la possibilitat d'amplificació creuada de *D. bugensis* en mostres de filtrats d'aigües recol·lectades al nostre país.

Per poder quantificar el grau d'infestació de diferents embassaments, es fa servir el mètode de *Real Time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), que permet obtenir la concentració inicial de la seqüència del marcador a partir de l'amplificació del DNA juntament amb unes sondes que emeten fluorescència. Mitjançant el marcador H2B i la tècnica RT-PCR es pot obtenir una quantificació de *D. polymorpha* de cada mostra i així poder comparar nivells d'infestació.

2.- OBJECTIUS

Due to the high ecologic and economic impacts produced by *D. polymorpha* invasions, the fast detection in the initial steps is crucial to stop its spread among freshwater environments. In this way, a total of 4 main objectives have been established for this project:

1. Optimizing the DNA isolation protocols from water-filtered environmental samples using different conditions and reagents.
2. Optimizing the specific PCR amplification of the H2B marker in order to detecting the presence of *D. polymorpha* DNA in the water-filtered environmental samples.
3. Optimizing the Real Time-PCR (qPCR) amplification using a pattern curve of the single-copy gene H2B amplifications in order to determine the detection and quantification of *D. polymorpha* DNA levels.
4. Analysing different water-filtered environmental samples in search of specific *D. polymorpha* DNA to be detected and quantified in order to determine the infestation levels during the year, and determine the potential risk of future invasions.

3.- MATERIAL I MÈTODES

3.1.- OBTENCIÓ DE SEQÜÈNCIES DE REFERÈNCIA D'INDIVIDUS ADULTS

3.1.1.- Obtenció de les mostres

Per poder dur a terme tot aquest protocol es van seleccionar deu individus adults de *D. polymorpha* obtinguts prèviament pel Laboratori d'Ictiologia Genètica (LIG) a dins d'una de les seves línies de recerca actuals. Els deu individus es van mostrejar durant l'estiu de l'any 2012 a l'embassament de La Baells (riu Llobregat), i van ser emmagatzemades en etanol 70% fins a la seva anàlisi.

3.1.2.- Extracció de DNA

L'obtenció de DNA dels deu individus adults s'ha optimitzat mitjançant tres protocols diferents. A partir dels resultats obtinguts, s'ha seleccionat el protocol d'extracció que ha produït el DNA de major qualitat i quantitat. Les tres metodologies realitzades són:

3.1.2.1.- Kit comercial Real Pure DNA Extraction (Duvitz®, Valencia, Spain):

1. Afegir 25 mg de teixit de músculo en un *ependorf* de 1.5mL + 180µL del tampó de lisi + 20µL de proteïnasa K.
2. Incubar a 55°C durant 1h mínim.
3. Afegir 200µL tampó de lisi prèviament escalfat a 70°C.
4. Afegir 100µL d'Isopropanol i barrejar invertint l'*ependorf*.
5. Transferir tot el volum a una columna MicroSpin, que conte una membrana de sílice que reté el DNA i un tub de recollida.
6. Centrifugar les mostres a 8000rpm durant 1 minut i descartar el tub de recollida amb l'eluit.
7. Traspasar la columna a un nou tub de recollida.
8. Afegir 500µL de tampó de desinhibició i centrifugar a 1000rpm durant 1 minuts i descartar l'eluit.
9. Afegir 500µL de tampó de rentat que conté etanol. Centrifugar 1200 rpm durant 1 minut i eliminar l'etanol eluit.
10. Repetir el pas 9 a 1400rpm durant 1 minut.
11. Centrifugar les mostres a màxima velocitat durant 90 minuts.
12. Descartar el tub de recollida i depositar la columna MicroSpin a un nou tub *ependorf* de 1.5mL.
13. Afegir 100µL de tampó d'elució prèviament escalfat a 70°C, deixar incubar durant 1 minut i centrifugar a màxima velocitat durant 1 minut.
14. Eliminar la columna MicroSpin.
15. Retolar correctament l'*ependorf* i guardar.

3.1.2.2.- Protocol FENOL/CLOROFORM:

1. Afegir 20mg de teixit en un tub *ependorf* de 1.5mL + 400µL de tampó de digestió TENS + 10µL de proteïnasa K.
2. Incubar a 56°C durant tota la nit (*over night*).
3. Afegir 250µL de fenol + 250µL de cloroform:alcohol isoamílic (24:1)
4. Barrejar manualment (no vòrtex) i centrifugar a màxima velocitat durant 5 minuts.

5. Recuperar la fase aquosa en un tub *ependorf* de 1.5mL nou i descartar la resta.
6. Afegir 25µL de Clorur de Sodi (NaCl) 5M.
7. Afegir 800µL d'etanol 95%, invertir el tub 2.3 vegades i centrifugar a màxima velocitat durant 5 minuts.
8. Descartar el sobrenedant i afegir 800µL d'etanol 70% i centrifugar a màxima velocitat durant 5 minuts.
9. Descartar el sobrenedant, fer un pols de centrifuga i pipetejar el sobrenedant restant.
10. Assecar el pellet a 56°C durant 2 minuts.
11. Resuspendre en 50-200µL d'aigua destil·lada (segons la mida del pellet).

3.1.2.3.- *Kit comercial E.Z.N.A. Mollusc DNA (OMEGA Bio-Tek): És una barreja dels dos protocols anteriors.*

1. Es fa servir cloroform:alcohol isoamílic en lloc de isopropanol igual que en el protocol de fenol/cloroform.
2. Després d'aquest pas s'hi afegeix un pas amb RNAses.
3. I abans d'obtenir el DNA extret té varis passos de rentat.
4. I finalment té dos passos d'elució del DNA.

3.1.3.- Valoració de la quantitat i qualitat del DNA

Un cop obtingudes les extraccions de DNA dels deu individus a partir de les tres diferents metodologies, s'ha procedit a avaluar la seva qualitat a partir d'una electroforesi en gel d'agarosa a l'1 %.

A continuació s'han valorat els nivells de quantificació obtinguts pels diferents mètodes per determinar quina extracció ha estat la més adient per aquest tipus de mostra. La quantificació s'ha realitzat tant amb un *QUBIT v2.0 fluorometer (Life Technologies)* com amb un *NANODROP ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific)*. El *NANODROP* utilitza valors d'absorbància de espectrofotometria a una determinada longitud d'ona (260 nm), i podria estar detectant partícules que no siguin de DNA però que absorbeixin a la mateixa longitud d'ona. *QUBIT* és un mètode que utilitza la fluorescència d'un fluorocrom unit a seqüències de DNA de doble cadena per ser quantificat, cosa que fa aquesta tècnica molt més específica i sensible a l'hora de quantificar (Thermo Fisher Scientific Inc., 2014).

3.1.4.- Amplificació per PCR

Després d'optimitzar el mètode d'extracció de DNA, cal realitzar una PCR amb els *primers* (encebadors) específics *Forward* i *Reverse* pel gen H2B de *D. polymorpha*. Aquest *primers* específics han estat dissenyats i validats prèviament al *LIG*, i s'ha comprovat la seva especificitat davant mostres de DNA d'altres espècies de bivalves i mol·luscs. Com a resultat, aquests *primers* presenten especificitat exclusiva per DNA de *D. polymorpha* (i *Dreissena bugensis* espècie germana, però absent a la Península Ibèrica).

La amplificació per PCR s'ha preparat a partir d'una mix per cada mostra amb els reactius i els volums següents:

Taula 1: reactius i el volum utilitzats per preparar la MIX de la PCR per una mostra.

REACTIUS DE LA MIX DE PCR	
REACTIU	VOLUM
Buffer	3µL
MgCl ₂	0.9µL
dNTP	3µL
<i>Primer Forward</i>	0.6µL
<i>Primer Reverse</i>	0.6µL
H ₂ O miliQ	19.75µL
Taq polimerasa	0.15µL
TOTAL	28µL de Mix

A continuació s'han afegit 2µL de l'extracció de DNA per cada mostra. Finalment, s'ha introduït al termociclador *2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)* per la seva amplificació amb les següents indicacions:

Taula 2: temperatures i temps del programa de PCR, juntament amb la reacció que es duu a terme.

PROGRAMA DE TERMOCICLADOR PER PCR		
TEMPERATURA	TEMPS	REACCIÓ
94°C	3 minuts	Inicialització
94°C	30 segons	Desnaturalització
50°C	1 minut i 30 segons	Unió <i>primers</i>
72°C	1 minut i 30 segons	Elongació cadena
72°C	5 minuts	Elongació final
15°C	Indefinit	Conservació

Un cop finalitzades les amplificacions per PCR de les mostres de DNA dels deu individus, s'ha procedit a avaluar la seva qualitat a partir d'una electroforesi en gel d'agarosa al 1.5 %. A partir dels resultats, s'han seleccionat les tres millors amplificacions per obtenir les seqüències de DNA.

3.1.5.- Neteja del producte de PCR

Mitjançant la tècnica ExoSAP-IT s'ha netejat el producte de PCR al afegir una exonucleasa I i una fosfatasa alcalina, produint la degradació de les seqüències de *primers* i els nucleòtids lliures residuals de la reacció d'amplificació per PCR. Després d'una incubació a 37°C durant 60' per tal de que els enzims eliminin els productes sobrants, finalment s'augmenta la temperatura a 80°C durant 15' per inactivar els dos enzims exonucleasa i fosfatasa.

3.1.6.- Reacció de seqüenciació de DNA

Una vegada s'han obtingut els productes de PCR nets, s'ha procedit a la realització de la reacció de seqüenciació. Aquesta reacció permetrà obtenir les seqüències de DNA mitjançant la reacció de Sanger (Sanger and Coulson, 1975) gràcies al marcatge fluorescent diferencial per cada nucleòtid. S'ha preparat una MIX amb els següents reactius:

Taula 3: reactius i el volum utilitzats per preparar la MIX de seqüenciació per una mostra.

REACTIUS DE LA MIX DE SEQÜENCIACIÓ	
REACTIU	VOLUM
Buffer Big Dye	2.5µL
H ₂ O miliQ	4µL
<i>Primer Forward</i>	0.5µL
Big Dye 3.1 premix	1µL
TOTAL	8µL de MIX

A continuació s'ha afegit 2 µl de cada producte d' ExoSAP-IT, i s'ha introduït al termociclador 2720 *Thermal Cycler (Applied Biosystems)* amb les següents condicions d'amplificació:

Taula 1: temperatures i temps del programa de seqüenciació, juntament amb la reacció que es duu a terme.

PROGRAMA DE TERMOCICLADOR PER SEQÜENCIACIÓ		
TEMPERATURA	TEMPS	REACCIÓ
96°C	1 minut	Inicialització
96°C	10 segons	Desnaturalització
50°C	5 segons	Unió primers
60°C	4 minuts	Elongació cadena
60°C	1 minut	Elongació final
4°C	Indefinit	Conservació

3.1.7.- Precipitació del DNA

Una vegada s'ha fet la reacció de seqüenciació, cal precipitar el DNA mitjançant el protocol *Ethanol/EDTA/Sodium Acetate precipitation*:

1. Introduir 10µL de la reacció de seqüenciació a la placa de 96 pouets.
2. Afegir 2µL de EDTA 125mM.
3. Afegir 2µL de acetat de sodi 3M.
4. Afegir 50µL d'etanol 100%.
5. Centrifugar en una centrifuga de plaques a 2219xg durant 45 minuts a 4°C.
6. Invertir la placa embolicada en paper i fer un pic de centrifuga a 190xg, els reactius sobrants s'absorbiran al paper.
7. Afegir 70µL d'etanol 70%.
8. Centrifugar 1650xg durant 15 minuts a 4°C.
9. Invertir la placa embolicada amb paper i centrifugar a 190xg durant 1 minut.
10. Resuspendre amb 10µL de formamida.

3.1.8.- Obtenció de les seqüències del gen H2B

Les seqüències de DNA s'han obtingut per electroforesi capil·lar fluorescent mitjançant un seqüenciador automàtic *ABI 3100 Sequencer (Applied Biosystems)*, que es troba a disposició del LIG a les seves infraestructures. Cal introduir les dades de les mostres al programa del seqüenciador i seguidament s'introdueix la placa amb les mostres i es posa en marxa l'electroforesi capil·lar fluorescent.

3.1.9.- Anàlisi de les seqüències de DNA obtingudes

S'han analitzat les seqüències de DNA obtingudes eliminant les zones de mala qualitat. Una vegada netes, s'ha procedit al seu alineament amb la seqüència de referència del *contig 76* del gen H2B de *Dreissena polymorpha* fent servir el programa Bioedit v7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

3.2.- OPTIMITZACIÓ DE LA RECTA PATRÓ PER LA QUANTIFICACIÓ DE DNA

3.2.1.- Selecció de la mostra de DNA

De les mostres obtingudes durant l'optimització de l'extracció de DNA d'individus adults s'han seleccionat les tres mostres que s'han seqüenciat ja que eren les que presentaven més qualitat i quantitat del DNA. Aquesta selecció s'ha realitzat mitjançant la valoració qualitativa amb l'electroforesi en gel d'agarosa i les quantificacions amb QUBIT i NANODROP.

3.2.2.- Preparació dels punts de la recta patró per la RT-PCR

La preparació de les dilucions de DNA per la construcció de la recta patró s'ha realitzat a partir de la mostra de DNA que presenta millors valors de qualitat i quantitat de les tres seleccionades (les altres dues es van quedar a la reserva). A partir de la seva quantificació, s'ha normalitzat la concentració de DNA fins a un total de 50ng/μL.

Una vegada s'ha obtingut el DNA a la concentració de 50ng/μL, s'han preparat diferents alíquotes en tubs *ependorf* de 200 μL. Per reduir la pèrdua de DNA de *D. polymorpha* a causa del segrest que produeix el plàstic amb el que estan fets els tubs *ependorf*, les alíquotes de DNA es preparen afegint DNA de salmó al doble de concentració (100ng/μL), ja que és una espècie llunyana filogenèticament, així que no interfereix en els resultats de la PCR de les nostres mostres. Les nostres alíquotes finals tindran, per tant, 200 μL de DNA stock de *D. polymorpha* i de salmó a una proporció 1:2 (50ng/μL : 100ng/μL respectivament).

A partir d'aquestes alíquotes de DNA stock, s'han preparat 10 dilucions de DNA per portar a terme la construcció de la recta patró:

Taula 5: dilucions de la recta patró de la RT-PCR amb les concentracions de DNA de *Dreissena polymorpha*.

Dilució	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹
Concentració (ng/ µL)	50	5	5·10 ⁻¹	5·10 ⁻²	5·10 ⁻³	5·10 ⁻⁴	5·10 ⁻⁵	5·10 ⁻⁶	5·10 ⁻⁷	5·10 ⁻⁸

3.2.3.- Amplificació de la recta patró per Real Time-PCR

Per construir la recta patró s'han amplificat les deu dilucions de DNA mitjançant els mateixos primers de la PCR convencional, que amplifiquen pel gen H2B de *D. polymorpha*. Cada una de les dilucions s'ha amplificat per triplicat per incrementar la fiabilitat de les amplificacions.

Taula 6: reactius i el volum utilitzats per preparar la MIX de la Real Time-PCR per una mostra

REACTIUS DE LA MIX DE RT-PCR	
REACTIU	VOLUM
<i>SyBR Green Master Mix</i>	10 µL
<i>Primer Forward</i>	0.6 µL
<i>Primer Reverse</i>	0.6 µL
H ₂ O miliQ	6.8 µL
TOTAL	18 µL de Mix

El reactiu SyberGreen Mix conté l'enzim polimerasa juntament amb el fluorocrom intercalant del DNA de doble cadena (SyBR Green) que permetrà la quantificació de DNA a temps real.

S'ha preparat una MIX per la Real Time-PCR que conté tots els reactius necessaris per cada mostra. A cada tub, s'ha afegit un volum de DNA de 2 µL corresponent els deu punts de la recta per triplicat (n=30 mostres). Les rèpliques són necessàries, ja que en cas de que una d'elles sortís desviada poder descartar-la. Les tres rèpliques de cada dilució han de coincidir en el mateix punt i cada dilució de DNA ha de seguir una relació de concentració 1:10 respecte a la següent.

Finalment, s'ha inclòs un control negatiu també per triplicat, que té tots els reactius de la PCR però sense DNA que amplificar. D'aquesta manera es pot detectar falsos positius de la reacció i es podran detectar contaminacions o amplificacions creuades dels reactius.

Taula 7: temperatures i temps del programa de PCR a temps real, juntament amb la reacció que es duu a terme.

PROGRAMA DE TERMOCICLADOR PER LA RT-PCR		
TEMPERATURA	TEMPS	REACCIÓ
95°C	10 minuts	Inicialització
95°C	15 segons	Desnaturalització
60°C	1 minut	Unió primers
95°C	15 segons	Mesura de senyal del fluorocrom mitjançant la corba de dissociació del DNA
60°C	30 segons	
95°C	15 segons	

Les amplificacions a temps real s'han fet mitjançant el termociclador *ABI 7300 Real-Time PCR Sequencer Detector System (Applied Biosystems)*. Els resultats s'han analitzat fent servir el programa *7300 SDS v1.3.1 (Applied Biosystems)*.

3.3.- OPTIMITZACIÓ DE L'EXTRACCIÓ DE DNA DE MOSTRES AMBIENTALS DE FILTRATS D'AIGUA

3.3.1.- Obtenció de les mostres

Gràcies a la col·laboració del Laboratori d'Ictiologia Genètica (LIG) de la Universitat de Girona amb l'Agència Catalana de l'Aigua (ACA), s'han pogut obtenir 25 mostres de resuspensions de filtrats de 100L d'aigua provinents de diferents punts de la xarxa hidrogràfica de Catalunya. Les mostres s'han conservat congelades fins al moment de l'extracció de DNA. De les 25 mostres s'han seleccionat 5 punts hidrogràfics (Taula 8, imatge 2) que es repeten en les dues estacions de mostratge (estiu i hivern) per tal de poder comparar la prevalença de la infestació de *D. polymorpha* durant tot l'any. També s'ha tingut en compte la seva situació geogràfica per tal de representar gran part de les conques de Catalunya, punt clau per l'anàlisi del risc potencial d'expansió de *D. polymorpha*.

3.3.2.- Processament de les mostres

S'ha mesurat el volum de mostra per les deu mostres (cinc punts per dues etapes de mostreig) procedents de filtrats de 100L d'aigua (Taula 8). Per l'extracció de DNA, s'han preparat alíquotes de 5 mL de les mostres.

Una vegada s'ha mesurat el volum, s'ha obtingut el pes sec. Les deu alíquotes de 5 mL s'han centrifugat (5 vegades acumulatives en tubs *eppendorf* de 1.5 mL) a 5000rpm durant 5 minuts descartant el sobrenedant. Paral·lelament, també s'han calculat el pes sec total de les mostres, centrifugant la resta de cada mostra en tubs Falcon de 50 mL a 5000rpm durant 5 minuts descartant el sobrenedant. Finalment s'ha deixat evaporar el sobrenedant residual tant de les mostres totals com de les alíquotes en una estufa a 72°C 24 hores fins que s'ha assecat i finalment s'ha pesat (tenint en compte el pes del tub *eppendorf*, Taula 8).



*Imatge 2: Localització dels 5 punts de la conca hidrogràfica de Catalunya seleccionats per l'anàlisi de nivell de infestació de *D. polymorpha*. BA = Embassament de la Baells (Berguedà), GA = Embassament de Gaià (Tarragonès/Alt Camp), LL = Embassament de la Llosa del Cavall (Solsonès), SP = Embassament de Sant Ponç (Solsonès) i BO = Embassament de Boadella (Alt Empordà). De cada punt es van obtenir dues mostres, una del mes de Maig o Juny i l'altre del mes de Setembre o Octubre (veure Taula 8 per més detalls).*

3.3.3.- Extracció de DNA

Un cop obtingut el pellet de 5mL s'ha procedit a iniciar l'extracció i purificació del DNA mitjançant un kit específic per mostres ambientals: *FastDNA™ SPIN Kit for Soil* (MP Biomedicals) juntament amb l'aparell *FastPrep®-24 Instrument* (MP Biomedicals):

1. Afegir 780µL de *Sodium Phosphate Buffer* (SPB) al pellet sec obtingut i resuspendre'l.
2. Traspasar tota la mostra a un tub *Lysing Matrix E* i afegir 122µL de *MT Buffer*.
3. Ajustar el tub en el suport del *Fastprep* i sotmetre'l a 3 períodes d'agitació de 30 segons a potència 5.5. entre agitacions cal deixar reposar al gel durant 5 minuts.
4. Centrifugar a 14000xg durant 30 segons.
5. Transferir el sobrenedant en un *ependorf* de 1.5mL i afegir 250µL de PPS i homogeneïtzar manualment unes 10 vegades. Centrifugar a 14000xg durant 5 minuts.
6. Transferir el sobrenedant en un tub *Falcon* de 15mL i afegir 1000µL de *Binding Matrix* prèviament agitada. Agitar durant 2 minuts i deixar reposar 3 minuts per deixar sedimentar.
7. Extreure 700µL a un *SPIN* filtre i centrifugar a 14000xg durant 1 minut. Buidar el tub i retenir el filtre.

8. Repetir el pas 11 fins que s'acabi el sobrenedant del tub Falcon.
9. Afegir 500µL de SEWS-M (+EtOH) al SPIN filtre i centrifugar a 14000xg durant 1 minut. Retenir el filtre.
10. Centrifugar a 14000xg durant 2 minuts per assecar la matriu de les restes de SEWS-M. Llençar el tub i retenir el filtre.
11. Transferir el filtre amb la matriu a un *Catch-Tube* net i deixar-lo assecar durant 5 minuts a temperatura ambient.
12. Finalment, afegir 100µL d'aigua destil·lada sense DNAses a la matriu en el filtre i afitar amb vòrtex o resuspendre amb la punta de la pipeta. Centrifugar a 14000xg durant 1 minut i llençar la matriu amb el filtre.

3.3.4.- Valoració de la quantitat i qualitat del DNA

A causa de la presència d'inhibidors de la PCR presents a les mostres ambientals naturals, cal optimitzar els grams de pes sec de filtrat que calen per obtenir un DNA de suficient qualitat i quantitat minimitzant la presència d'inhibidors. La qualitat i la quantitat de les extraccions obtingudes s'han mesurat mitjançant electroforesi en gel d'agarosa al 1 % i s'ha quantificat amb un *QUBIT v2.0 fluorometer (Life Technologies)* com amb un *NANODROP ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific)*.

3.4.- OPTIMITZACIÓ DE L'AMPLIFICACIÓ PER PCR DE LES MOSTRES DE DNA DE FILTRATS

El primer pas per poder optimitzar la metodologia basada en la Real-Time PCR per la identificació i quantificació de DNA específic de *D. polymorpha*, és optimitzar la correcta amplificació per PCR convencional. D'aquesta manera ens assegurem de l'especificat dels *primers* respecte al gen H2B.

La optimització de l'amplificació del gen H2B mitjançant tres variants de la PCR:

1. PCR estàndard: s'ha d'amplificar el DNA de les mostres de filtrats fent servir el programa de PCR que s'ha utilitzat per obtenir les seqüències del gen H2B dels individus adults (apartat 3.1.4, Taules 1 i 2)
2. PCR en gradient de temperatura: consisteix en el mateix programa de PCR anterior, però amplificant a diferents temperatures (de 60°C a 70°C) a la fase d'hibridació dels *primers* (fase d'*annealing*) en el termociclador, és a dir, cada columna de pous del termociclador està a una temperatura diferent. Amb aquest mètode es determina la temperatura òptima d'*annealing* dels *primers*.
3. PCR *Touch-Down*: consisteix en realitzar el mateix programa de PCR, però durant els 10 primers cicles es va variant la temperatura d'*annealing*, comença a 70°C i va disminuint fins a 60°C (T° òptima), i els següents 25 cicles es fan a 60°C. A més temperatura els *primers* s'uneixen més específicament, i quan disminueix la temperatura s'afavoreix que els *primers* siguin més efectius ja que s'hibriden més, d'aquesta manera durant els primers cicles creen còpies del fragment específic, i aleshores durant els cicles següents es facilita la creació de més quantitat de còpies al baixar la temperatura.

Finalment també cal assegurar que els controls negatius surten bé, ja que sinó es podrien trobar falsos positius. Aquest punt és important, ja que la contaminació és un fet que es pot produir amb facilitat.

3.5.- OPTIMITZACIÓ DE LA RT-PCR ESPECIFICA PEL GEN H2B DE *D. polymorpha*

3.5.1.- Preparació de les mostres

Gràcies a l'existència de la recta patró preparada anteriorment (apartat 3.2), es disposa d'un rang de concentracions de DNA de *D. polymorpha* vàlid per poder ser identificat i quantificat. Per això, s'han realitzat diferents dilucions de les mostres per l'amplificació (des de 10^0 fins a 10^{-3} , 4 dilucions per cada una de les deu mostres), per tal d'assegurar que alguna d'elles entri a dins del rang de valors de la recta patró.

3.5.2.- Controls de l'amplificació per RT-PCR

Per tal d'assegurar la correcta amplificació de les mostres de DNA s'han fet servir 3 tipus de control de la PCR a temps real:

1. Rèpliques: de la mateixa manera que a l'apartat 3.2.3., cada una de les dilucions de mostres de DNA s'ha amplificat per triplicat, de manera que s'asseguri la fiabilitat de l'amplificació. Si una mostra es desvia dels valors de les altres dues es pot descartar.
2. Control negatiu de la PCR: Com al apartat 3.2.3., s'ha amplificat un control negatiu per tal de detectar possibles falsos positius. Les mostres que amplifiquin al mateix cicle que els controls negatius es consideraran negatives per DNA de *D. polymorpha*.
3. Mostra control de la PCR: es va analitzar una mostra de filtrat d'aigua on sabem segur que no hi ha presència de *D. polymorpha*. D'aquesta manera es podrà verificar la tècnica comparant els resultats obtinguts. S'ha fet servir una mostra de la Cubeta 3 de l'Estany de Banyoles (6 metres de fondària, data de recol·lecció: 26-11-2013), subministrada per membres del Laboratori d'Ecologia Molecular Microbiana de la Universitat de Girona (Taula 8).
4. Contaminacions controlades (*SPIKES*): Per poder detectar la presència d'inhibidors a les mostres de DNA, a cada RT-PCR s'han afegit paral·lelament totes les mostres a analitzar, afegint a cada mostra 2 μ L de DNA d'un punt de la recta patró (concentració coneguda). D'aquesta manera, com sabem la concentració, podem detectar si amplifica de manera normal o si no amplifica on toca per la presència d'inhibidors naturals a cada mostra.

3.5.3.- Amplificació per RT-PCR

S'ha preparat una MIX per la Real Time-PCR que conté tots els reactius necessaris per cada mostra i cada control de la PCR, seguint les mateixes concentracions que a l'apartat 3.2.3 (Taula 6). A cada tub, s'ha afegit un volum de DNA de 2 μ L corresponent a cada mostra (3 rèpliques per 4 dilucions per 10 mostres i el control negatiu). A més, el mateix s'ha fet per amplificar els *SPIKES* o contaminacions controlades, afegint els 2 μ L corresponents a cada mostra més 2 μ L més corresponents al punt de la recta amb la dilució de 10^{-2} (0.5 ng/ μ L).

Les amplificacions a temps real s'han fet seguint els protocols de l'apartat 3.2.3 (Taula 7) mitjançant el termociclador *ABI 7300 Real-Time PCR Sequencer Detector System (Applied Biosystems)*. Els resultats s'han analitzat fent servir el programa *7300 SDS v1.3.1 (Applied Biosystems)*.

3.6.- ANÀLISI DE L'ESPECIFICITAT DE LA TÈCNICA DE QUANTIFICACIÓ DEL NIVELL D'INFESTACIÓ DE *D. polymorpha* DESENVOLUPADA

3.6.1.- Anàlisi de les corbes de dissociació de la RT-PCR

S'han analitzat totes les corbes de dissociació de la RT-PCR de totes les mostres per tal d'assegurar l'especificitat de l'amplificació. S'ha observat la derivada de la corba d'amplificació, per tal de detectar si només amplifica en un pic de dissociació. En cas de que hi hagués més d'un pic, estaríem davant d'una amplificació creuada de la RT-PCR, la qual amplificaria més d'un fragment de DNA.

3.6.2.- Comprovació per seqüenciació del gen H2B

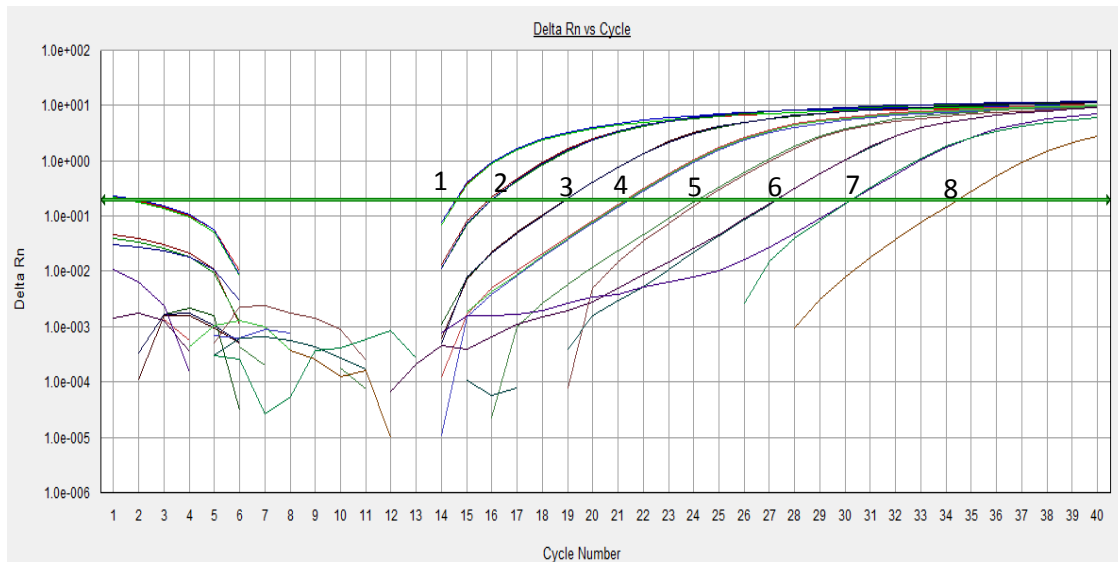
Per verificar els resultats obtinguts i l'especificitat de la tècnica desenvolupada, s'ha realitzat tot el protocol de seqüenciació per tal d'obtenir les seqüències del gen H2B a partir de l'amplificació del DNA de les mostres ambientals de filtrats d'aigua. S'ha fet seguint els mateixos protocols descrits a l'apartat 3.1 (des del 3.1.4 fins al 3.1.9). A més, s'ha fet el mateix amb dues mostres de DNA de *D. bugensis*, que és l'espècie germana de *D. polymorpha*.

S'ha fet l'alineament de les seqüències obtingudes de les mostres de filtrats juntament amb les obtingudes dels individus adults de *D. polymorpha* (apartat 3.1), dels adults de *D. bugensis*, i la seqüència del gen H2B del *contig 76* obtinguda per la seqüenciació massiva, que ens serviran com a referència.

4.- RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1.- OPTIMITZACIÓ DE LA RECTA PATRÓ DEL GEN H2B

Per analitzar les rectes patró de cada RT-PCR es realitza una recta patró mitjana a partir dels punts de totes les rectes patró realitzades, i a partir d'aquesta es pot calcular l'eficiència mitjana de les rectes.



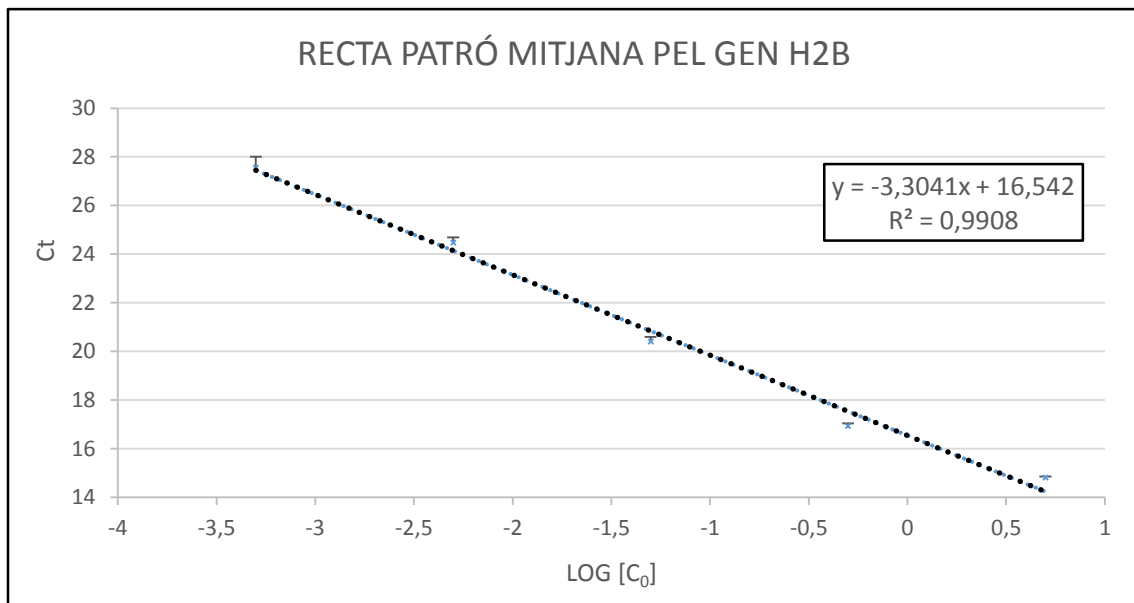
Imatge 2: exemple de recta patró de RT-PCR amb 7 punts ben amplificats i un bon control negatiu. Al eix de les X es situa el cicle al qual es detecta la fluorescència i a l'eix de les Y es situa l'increment del nombre de còpies. (1= dilució 10^{-1} , concentració: $5\text{ng}/\mu\text{L}$; 2= dilució 10^{-2} , concentració: $0.5\text{ ng}/\mu\text{L}$; 3= dilució 10^{-3} , concentració: $0.05\text{ng}/\mu\text{L}$; 4= dilució 10^{-4} , concentració: $0.005\text{ng}/\mu\text{L}$; 5= dilució 10^{-5} , concentració: $0.0005\text{ng}/\mu\text{L}$; 6= dilució 10^{-6} , concentració: $0.00005\text{ng}/\mu\text{L}$; 7= dilució 10^{-7} , concentració: $0.000005\text{ng}/\mu\text{L}$; 8= control negatiu).

Pel càlcul de la recta patró mitjana, es desestimen els valors de les rèpliques que tinguin una desviació entre elles més gran de 0.3, també es desestimen els punts que amplifiquen al mateix cicle que el control negatiu. Primer s'ha calculat la mitjana de les tres rèpliques i partir d'aquest valor s'ha fet la mitjana i la desviació estàndard. A continuació, ja que la recta patró es fa amb concentracions conegudes de mostra, s'ha calculat el logaritme d'aquestes concentracions. A l'eix de les X es situen els valors corresponents al logaritme de la concentració inicial de la mostra i en l'eix de les Y es situen els valors corresponents al cicle en que es comença a detectar la fluorescència, ja que fins que aquesta no supera un llindar no és detectable. El coeficient de determinació r^2 és de 0.9908. A partir d'aquesta recta mitjana i la fórmula següent s'ha calculat l'eficiència:

$$\text{Eficiència} = 10^{-1/\text{pendent}}$$

En aquest cas, el pendent és -3.3041, per tant l'eficiència és de 2.0079 que correspon a 100.395 %. S'accepten valors d'eficiència entre 80-120% o $1'9-2'1$ (Life Technologies Corporation, 2011). Quan l'eficiència és inferior a 2 és perquè no tots els primers amplifiquen en cada cicle, en el nostre cas, l'eficiència és pràcticament 2, i per tant indicador d'una molt bona especificitat.

Amb una eficiència de 2.0079 podem determinar que les nostres rectes patró són òptimes i per tant indiquen que el nostre experiment és robust i reproducible (Bio-Rad Laboratories, Inc., 2006).



Imatge 4: recta patró mitjana calculada a partir de les rectes patró de les 4 RT-PCR realitzades. A l'eix de les X logaritme de la concentració inicial i a l'eix de les Y el nombre de cicles que calen per detectar la fluorescència llindar.

4.2.- OPTIMITZACIÓ DE L'EXTRACCIÓ DE DNA DE MOSTRES AMBIENTALS DE FILTRATS D'AIGUA

S'han escollit 5 punts de la conca hidrogràfica de Catalunya, aquests són l'embassament de la Baells (Berguedà), l'embassament de Gaià (Tarragonès/Alt Camp), l'embassament de la Llosa del Cavall (Solsonès), l'embassament de Sant Ponç (Solsonès) i l'embassament de Boadella (Alt Empordà) (Taula 8, imatge 2) . De cada punt s'han obtingut dues mostres, una del mes de Maig o Juny i l'altre del de Setembre o Octubre. De totes les mostres s'han obtingut els paràmetres que es mostren a la taula 8.

Aquests paràmetres s'han utilitzat per calcular la concentració de DNA de *D. polymorpha* i així poder comparar els graus d'infestació dels diferents punts de mostreig en les dues estacions.

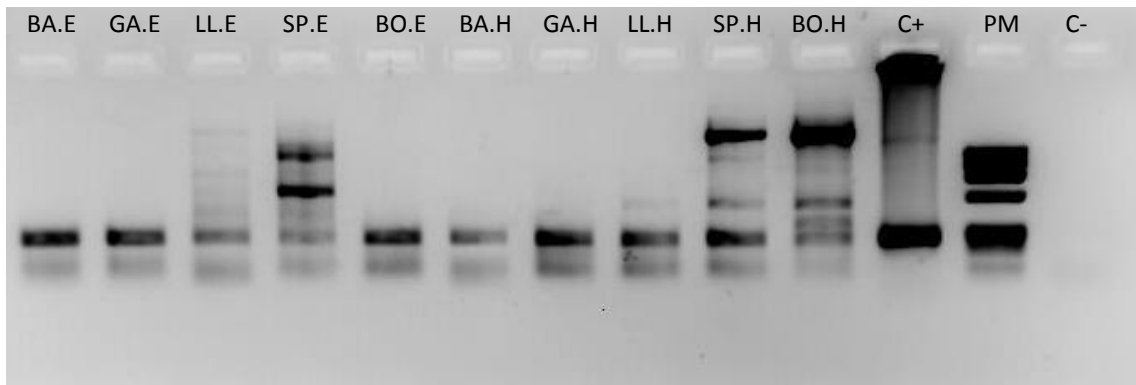
Taula 8: resultats de les extraccions de les mostres de filtrats.

EMBASSAMENT	MOSTRA					EXTRACCIÓ DNA				
	COORDENADES	DATA RECOL·LECCIÓ	CODI LABORATORI*	VOLUM RESUSPENSIO FILTRATS (mL)	PES SEC TOTAL (g)	VOLUM EXTRACCIÓ (mL)	PES SEC NET EXTRACCIÓ (g)	NANODRO P (ng/ μ L)	QUBIT (ng/ μ L)	
LA BAEELS	42º 7' N	08/05/2014	BA.E	17	0,03	5	0,02	9	<0,1	
	1º 52' E	01/10/2014	BA.H	9	0,079	5	0,05	7,6	<0,1	
EL CATLLAR- GAIÀ	41º 11' N	04/06/2014	GA.E	62	0,21	5	0,07	8,2	<0,1	
	1º 19' E	01/10/2014	GA.H	30	0,296	5	0,14	39,7	5,45	
LA LLOSA DEL CAVALL	42º 5' N	21/05/2014	LL.E	22	0,02	5	0,01	10,4	0,591	
	1º 34' E	29/09/2014	LL.H	15	0,13	5	0,12	14	0,835	
SANT PONÇ	41º 57' N	21/05/2014	SP.E	20	0,153	5	0,1	8,1	0,26	
	1º 36' E	29/09/2014	SP.H	8	0,07	5	0,06	12,5	0,798	
DARNIUS- BOADELLA	42º 20' N	14/05/2014	BO.E	44	0,02	5	0,01	8,4	<0,1	
	2º 50' E	17/09/2014	BO.H	36	0,137	5	0,08	13,4	0,748	
BANYOLES	42º 07' N	26/11/2013	C3	50	-	50	-	-	39,8	
	2º 45' E									

El codi de laboratori fa referència al nom de la mostra a dins del laboratori (E= recollecció a l'estiu; H= recollecció a l'hivern). El volum de resuspensió filtrats es refereix a la quantitat d'aigua amb que va resuspendre la filtració; el pes sec total es refereix al pes obtingut un cop assecat el filtrat; el volum d'extracció correspon al volum provinent del volum de resuspensió utilitzat per obtenir el pes sec de l'extracció i l'extracció de DNA; el pes sec de l'extracció correspon al pes obtingut a partir d'assecar el volum d'extracció; el NANODROP i QUBIT correspon als valors de quantificació mitjançant aquests mètodes. La mostra de Banyoles es fa servir com a control negatiu, ja que és un punt on es sap segur que no hi ha presència de *D. polymorpha*.

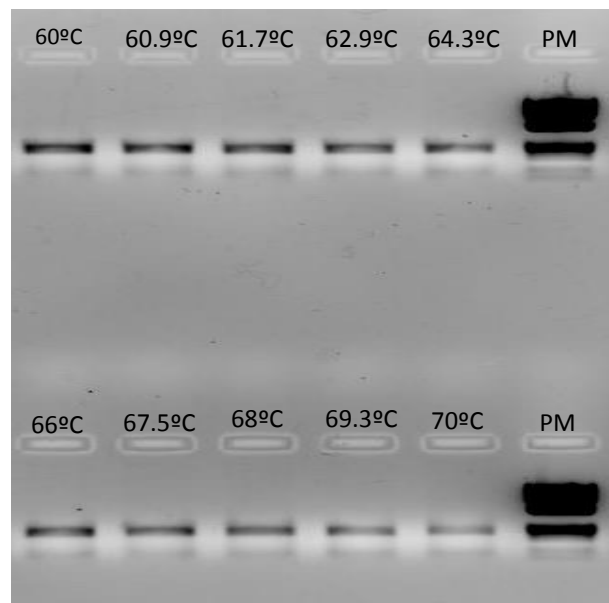
4.3.- OPTIMITZACIÓ DE L'AMPLIFICACIÓ PER PCR DEL GEN H2B EN MOSTRES DE FILTRATS

La imatge 5 correspon a un gel d'agarosa on es mostren els resultats d'una PCR del gen H2B de *D. polymorpha*. Es pot veure com el control negatiu és correcte perquè no hi ha banda d'amplificació, i es pot veure com el control positiu també és correcte, aquest, igual que la RT-PCR, ens permetria detectar si hi ha inhibidors de la PCR en les mostres. En quant a les mostres, es veuen varies bandes en una mateixa mostra quan només se n'hauria de veure una a 250Kb, és per això que es realitza l'optimització de la PCR mitjançant els programes de gradient i *Touch-Down*.



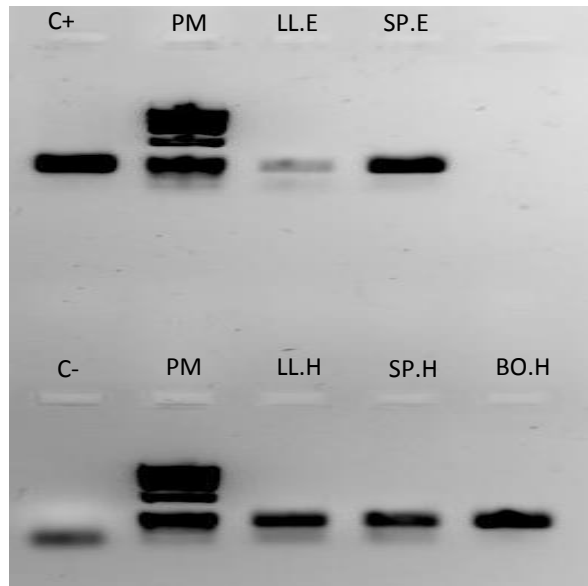
Imatge 5: gel d'agarosa al 1.5% de la PCR de *D. polymorpha* abans de l'optimització de la tècnica (C+= control positiu amb mostra d'adult *D. polymorpha*); PM= marcador de pes molecular; C- = control negatiu).

En la foto del gel de la PCR-gradient imatge 6 es veu com a més de 60°C aquestes bandes ja no apareixen, tot i que a mesura que augmenta la temperatura d'*annealing* la quantitat de producte de PCR disminueix.



Imatge 6: gel d'agarosa al 1.5% de la PCR gradient on es pot veure el gradient de temperatures (PM=marcador de pes molecular).

Després de determinar la temperatura òptima gràcies a la PCR gradient, es realitza la PCR *Touch-Down* (imatge 7) de les mostres on hi havia diverses bandes, i es pot veure que aquestes ja no apareixen i s'aconsegueix més producte de PCR.



Imatge 7: gel d'agarosa al 1.5% de la PCR-Touch Down on es veu que ja no apareixen múltiples bandes.

4.4.- DETECCIÓ I QUANTIFICACIÓ DE NIVELLS D'INFESTACIÓ DE *D. polymorpha* EN MOSTRES AMBIENTALS DE FILTRATS D'AIGUA

4.4.1.- Criteris de consideració de presència de DNA de *D. polymorpha* en una mostra

A partir de la RT-PCR s'obté la concentració inicial de DNA del gen H2B de cada mostra. Per determinar si el resultat és positiu ha de complir un o més dels següents requisits:

1. Almenys una dilució ha d'entrar dins del rang vàlid de concentracions de la recta patró.
2. Es considerarà positiva si amplifica com a mínim uns 6 cicles abans que el negatiu.
3. Només es podran considerar amplificacions correctes si no hi ha presència d'inhibició de la PCR. La qual cosa es comprova amb les contaminacions controlades (*SPIKES*).
4. S'han d'observar amplificacions seriadades de les dilucions de les mostres.
5. Al mirar la corba de dissociació, la derivada de l'amplificació només pot presentar un pic. És a dir, que només amplifiquem una única seqüència per totes les mostres (la del gen H2B). En cas de distorsió a la corba de dissociació, comprovar la seqüència obtinguda per aquella mostra fent servir la seqüenciació per Sanger.
6. Els requisits anteriors s'han de complir per dues de les tres replicues.

4.4.2.- Anàlisi del nivell d'infestació de *D. polymorpha* dels filtrats d'aigua

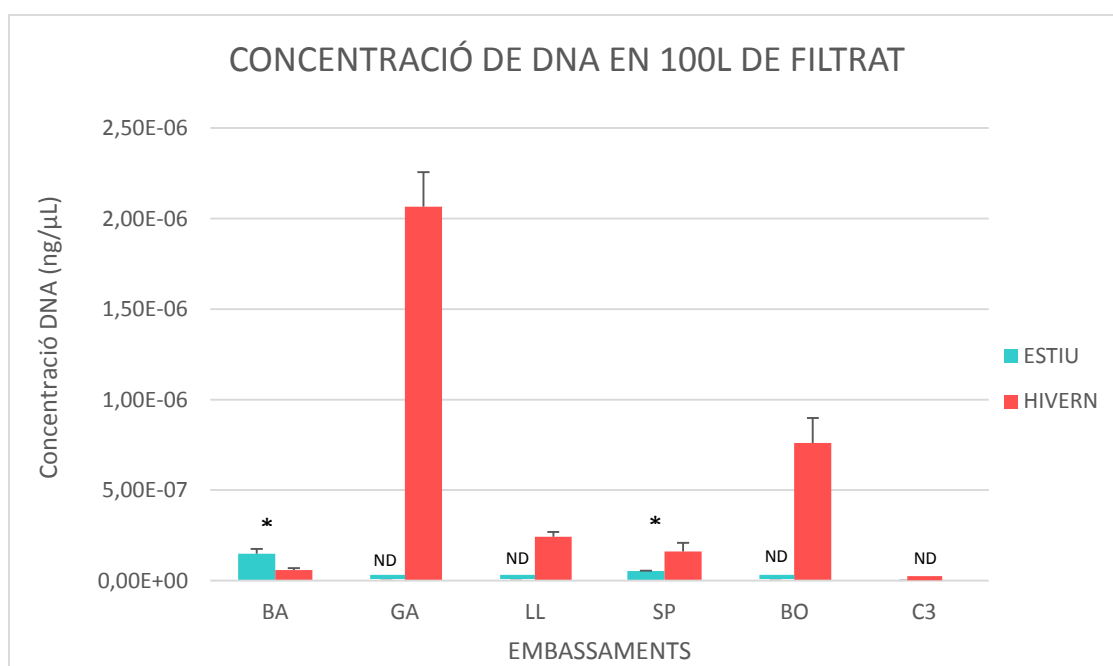
En funció d'aquests requisits s'han determinat quines mostres són negatives i quines positives, les negatives estan subratllades en vermell a la taula 9.

Taula 9: resultats de la RT-PCR per les mostres ambientals analitzades.

MOSTRA	AMPLIFICACIÓ	INHIBIDORS	SENSIBILITAT	CONCENTRACIÓ
BA.E	+	-	$10^0- 10^{-1}$	$1.484 \cdot 10^{-7} \pm 2.72 \cdot 10^{-8}$
BA.H	+	-	$10^0- 10^{-1}$	$5.901 \cdot 10^{-8} \pm 9,50 \cdot 10^{-9}$
GA.E	-	+ (10^0)	Amplifica al negatiu	No detectada
GA.H	+	+ (10^0)	$10^{-1}- 10^{-2}$	$2.065 \cdot 10^{-6} \pm 1.92 \cdot 10^{-7}$
LL.E	-	+ ($10^0- 10^{-1}$)	Amplifica al negatiu	No detectada
LL.H	+	+ (10^0)	$10^{-1}- 10^{-2}$	$2.431 \cdot 10^{-7} \pm 2.65 \cdot 10^{-8}$
SP.E	+	+ (10^0)	10^{-1}	$5.267 \cdot 10^{-8} \pm 2.72 \cdot 10^{-9}$
SP.H	+	+ (10^0)	$10^{-1}- 10^{-2}$	$1.618 \cdot 10^{-7} \pm 4.63 \cdot 10^{-8}$
BO.E	-	+ (10^0)	Amplifica al negatiu	No detectada
BO.H	+	+ (10^0)	$10^{-1}- 10^{-2}$	$7.603 \cdot 10^{-7} \pm 1.39 \cdot 10^{-7}$
C3 (Banyoles)	-	+ ($10^0- 10^{-1}$)	Amplifica al negatiu	No detectada

Les mostres amb absència de *D. polymorpha* es troben marcades en vermell. La columna INHIBIDORS mostra a quina o quines dilucions de les mostres de DNA es van detectar inhibidors de la PCR. La columna SENSIBILITAT fa referència a les dilucions de les mostres de DNA que van resultar positives pel gen H2B de *D. polymorpha*. La columna CONCENTRACIÓ mostra els valor finals mitjans de concentració de DNA de *D. polymorpha* calculat a partir dels factor de dilució realitzats des de les mostres inicials de 100L d'aigua.

Seguidament a partir de les concentracions inicials de les mostres, i mitjançant els valors de la taula 9 s'ha calculat la concentració de DNA de *D. polymorpha* de les masses d'aigua de les quals es van filtrar els 100 litres de filtrats inicials proporcionats per l'ACA. I s'ha realitzat el gràfic següent, on es mostra la comparativa de concentració entre les mostres d'estiu i les d'hivern.



Imatge 8: comparació de la concentració de les mostres de filtrats de 100 litres d'estiu i d'hivern. BA = Embassament de la Baells (Berguedà), GA = Embassament de Gaià (Tarragonès/Alt Camp), LL = Embassament de la Llosa del Cavall (Solsonès), SP = Embassament de Sant Ponç (Solsonès), BO = Embassament de Boadella (Alt Empordà), C3 = Estany de Banyoles (Cubeta 3). ND = not detected.

En el gràfic es pot veure com totes les mostres analitzades són positives per a DNA de *D. polymorpha* a l'hivern. Aquest fet concorda amb el fet de que l'època de posta és al juliol-agost, deixant molts gàmetes a la columna d'aigua.

A les mostres de l'estiu, en canvi, només hi ha dos dels cinc punts que presenten resultats positius. Tant a Gaià, com a la Llosa del Cavall i com a Boadella no hi ha presència de DNA de *D. polymorpha*. Es van comparar les concentracions mitjanes entre la mostra de l'estiu i la d'hivern tant per La Baells com a Sant Ponç, mitjançant el test paramètric de la T de Student de comparació de mitjanes. Les dues comparacions van resultar en valors significatius (La Baells: $t = 7.0063$, $p = 1.65 \cdot 10^{-5}$; Sant Ponç: $t = -4.072$, $p = 0.0152$) suggerint una prevalença diferencial al llarg de l'any. En general, malgrat que es pot apreciar presència durant tot l'any de DNA de *D. polymorpha* a les columnes d'aigua, d'alguna mostra, hi ha més prevalença de DNA de *D. polymorpha* a l'hivern que a l'estiu, això concorda amb l'època de posta i el cycle reproductiu de l'espècie. Durant l'any es produeixen dos pics de màxima reproducció, un de maig a juliol i l'altre de finals d'agost a mitjans d'octubre, la primera és més intensa. Les larves produïdes durant la primera època (maig-juliol), si la temperatura de l'aigua es manté sobre els 15-20°C, produiran les larves de la segona època (finals d'agost-octubre) (URA, 2013).

La mostra de Banyoles corresponent al control negatiu ha sortit negativa per DNA de *D. polymorpha*. Gràcies a aquest resultat negatiu podem verificar la tècnica de diagnòstic desenvolupada en aquest treball.

De les cinc localitzacions analitzades, l'ACA només té constància de la presència de *D. polymorpha* a l'embassament de la Baells (ACA, 2015), però segons els nostres resultats hi ha DNA a tots els embassaments, tot i que pot ser que només sigui DNA de gàmetes. S'hauria de tenir en compte el risc que aquesta presència pot comportar. Degut a la sensibilitat i l'especificitat que aporten els mètodes moleculars sobre els mètodes de quantificació al microscopi, s'haurien d'afegir als plans de control i seguiment de la invasió.

4.4.3.- Anàlisi de les seqüències obtingudes pel gen H2B

Com sabem que aquesta tècnica també amplifica per l'espècie germana de *D. polymorpha*, (*D. bugensis*), en aquest treball també s'han seqüenciat dos individus adults de *D. bugensis*. Gràcies a la seqüenciació per Sanger hem trobat diferències a les seqüències de nucleòtids entre les dues espècies. Així hem validat que les mostres que han donat positives són de *D. polymorpha* i no de *D. bugensis* (imatge 9). Aquest resultat concorda amb el fet de que no s'ha detectat presència de *D. bugensis* en cap conca hidrogràfica ni de Catalunya, ni de la península Ibèrica.

Per analitzar les seqüències dels filtrats s'han alineat juntament amb la seqüència de referència del gen H2B extreta del *contig 76* (Noguera I., Grau en Biologia, 2013), les seqüències obtingudes d'adults de *D. polymorpha* a l'apartat 3.1 i finalment amb les seqüències d'adults de *Dreissena bugensis* obtingudes a l'apartat 3.6.2. A continuació es mostra aquest alineament representant només una seqüència de filtrats, concretament la Baells a l'hivern, ja que al ser un gen amb la seqüència tan conservada, totes les mostres de filtrats positives van resultar amb la mateixa seqüència exactament. A la imatge 9 també es representen només una seqüència de cada origen (adult de *D. polymorpha* i adult de *D. bugensis*), juntament amb la seqüència de referència del gen H2B del *contig 76*.

Tant la seqüència d'adult de *D. polymorpha*, com la dels filtrats s'alineen perfectament amb la seqüència de referència del gen H2B, en canvi la seqüència de *D. bugensis* presenta 5 posicions variables (marcades en taronja), per tant, malgrat que s'ha vist que els nostres primers poden amplificar la seqüència d'aquesta espècie, es pot diferenciar mitjançant la seqüenciació. El fet de que els nostres primers amplifiquin per *D. bugensis* no suposa un problema per la validació del mètode ja que se sap que aquí a Catalunya no hi ha presència d'aquesta espècie.

	5	15	25	35	45	55
Contig 76	----CGCGCG	CTCCACTGAC	AAGAAGAAGC	GCAGGAGGAG	GAGGGAATCC	TACGCCATCT
DP	AGCTCGCGCG	CTCCACTGAC	AAGAAGAAGC	GCAGGAGGAG	GAGGGAATCC	TACGCCATCT
FILTRATS	ACCTCGCGCG	CTCCACTGAC	AAGAAGAAGC	GCAGGAGGAG	GAGGGAATCC	TACGCCATCT
DB	---TCGCGCG	CTCCACTGAC	AAGAAGAAGC	GCAGGAGGAG	GAGGGAATCA	TACGCCATCT

	65	75	85	95	105	115
Contig 76	ACATCTACAA	AGTCTTGAAG	CAGGTGCACC	CCGACACCGG	AGTGTCCAGC	AAGGCCATGT
DP	ACATCTACAA	AGTCTTGAAG	CAGGTGCACC	CCGACACCGG	AGTGTCCAGC	AAGGCCATGT
FILTRATS	ACATCTACAA	AGTCTTGAAG	CAGGTGCACC	CCGACACCGG	AGTGTCCAGC	AAGGCCATGT
DB	ACATCTACAA	AGTCTTGAAG	CAGGTGCACC	CCGACACCGG	AGTGTCCAGC	AAGGCCATGT

	125	135	145	155	165	175
Contig 76	CGATCATGAA	CAGCTTTGTC	AACGACATCT	TCGAGCGCAT	TGCTGCCGAG	GCTTCCC GCC
DP	CGATCATGAA	CAGCTTTGTC	AACGACATCT	TCGAGCGCAT	TGCTGCCGAG	GCTTCCC GCC
FILTRATS	CGATCATGAA	CAGCTTTGTC	AACGACATCT	TCGAGCGCAT	TGCTGCCGAG	GCTTCCC GCC
DB	CGATCATGAA	CAGCTTTGTC	AACGACATCT	TCGAGCGCAT	TGCTGCCGAG	GCTTCCC GCC

	185	195	205	215	225	235
Contig 76	TTGCCACTA	CAACAAGCGA	TCCACCATCA	CAAGCAGAGA	GATCCAGACC	GCTGTGCGTC
DP	TTGCCACTA	CAACAAGCGA	TCCACCATCA	CAAGCAGAGA	GATCCAGACC	GCTGTGCGTC
FILTRATS	TTGCCACTA	CAACAAGCGA	TCCACCATCA	CAAGCAGAGA	GATCCAGACC	GCTGTGCGTC
DB	TTGCCACTA	CAACAAGCGA	TCCACCATCA	CAAGCAGAGA	GATCCAGACC	GCTGTGCGTC

	245	255				
Contig 76	TCCTGCTGCC	TGGTG-----				
DP	TCCTGCTGCC	TGGTGAGGTG				
FILTRATS	TCCTGCTGCC	TGGTGAGG--				
DB	TCCTGCTGCC	TGGTGAGAT-				

Imatge 9: alineament de les seqüències obtingudes pel gen H2B de les mostres de filtrats, de les mostres d'adults de *D. polymorpha* i de *D. bugensis* amb la seqüència de referència del contig 76. Contig 76 = fragment teòric de seqüència amplificada per PCR del gen H2B. D.P = seqüències d'adults de *D. polymorpha* obtingudes a l'apartat 2.1. DB = seqüències del gen H2B d'adults per *D. Bugensis*. FILTRATS = seqüència obtinguda a partir de l'amplificació de la mostra BA.H (La Baells Hivern). La resta de filtrats amb seqüència idèntica a BA.H no han estat representades a la imatge. En taronja estan marcades les posicions variables de la sequencia de *D. bugensis*.

5.- CONCLUSIONS

The main conclusions of this project are:

1. We have optimized a DNA isolation protocol from environmental filtered-water samples, I have obtained enough DNA from the samples despite the presence of PCR inhibitors.
2. We have optimized a *D. polymorpha* DNA identification system using a specific molecular methodology. Until now, ACA used microscopic technics, that it can produce false positives. The molecular technic presents higher specificity than traditional techniques, avoiding false positives.
3. We have optimized a quantify system of *D. polymorpha* infestation level in environmental filtered-water samples. This technic is more sensitive and specific than the methods that ACA uses.
4. We have analysed ten samples from five locations, detecting presence of *D. polymorpha* infestation levels in winter for every site. Despite two samples were also positives for summer, there is a clear tendency of more *D. polymorpha* DNA in the water columns after the reproductive period.
5. Finally, ACA just has observed using visual methods the presence of larvae and adults in one of the five locations analysed (La Baells Reservoir). Lack of visual detections together with our molecular results indicate the potential risk of future *D. polymorpha* invasions, due to the DNA detected here could belong to *D. polymorpha* gametes. These gametes detection can be a method to prevent the infestation, and these genetic analyses should be included in the current control and management plans from the different public organizations in order to focus their efforts to prevent the proliferation in these locations.

6.- BIBLIOGRAFIA

Agencia Catalana de l'Aigua (ACA) (2015). Informe musclo zebra 2014. Estat de la presència de musclo zebra a les conques internes de Catalunya. (<http://aca-web.gencat.cat/aca/>).

Agència Catalana de l'Aigua (ACA) (2015) Espècies invasores. Data de consulta 29-05-2015. (<http://aca-web.gencat.cat/aca/appmanager/aca/aca?nfpb=true&pageLabel=P1230054461208201705783>).

Applied Biosystems (2011). Real-time PCR: Understanding Ct. Life technologies. (<http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/nucleic-acid-amplification-expression-profiling/pdfs.par.70657.file.dat/understanding%20ct%20application%20note.pdf>).

Bij de Vaate, A., Jazdzewski, K., Ketelaars, H. A., Gollasch, S., & Van der Velde, G. (2002). Geographical patterns in range extension of Ponto-Caspian macroinvertebrate species in Europe. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(7), 1159–1174.

Bio-Rad Laboratories, Inc. (2006) Real-Time PCR. Applications Guide. (http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf).

Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE). (2007). Mejillón cebra. El mejillón cebra en la Cuenca del Ebro. (<http://www.chebro.es/>).

Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE). (2009). Especies Exòticas Invasoras de aguas continentales. Data de consulta 29-05-2015. (<http://www.chebro.es/contenido.visualizar.do?idContenido=36639&idMenu=4241>).

Confederación Hidrográfica del Ebro (CHE). (2014). Monitorización de la presencia larvaria de *Dreissena polymorpha* en la Cuenca Hidrográfica del Ebro, campaña 2013. Informe interno (<http://www.chebro.es/>).

Durant, C., Anadón, A. (2008). The zebra mussel invasion in Spain and navigation rules. *Aquatic Invasions*, 3(3), 315–324.

Durán, C., Lanao, M., Pérez, L. P. Y., Chica, C., Anadón, A., & Touya, V. (2012). Estimación de los costes de la invasión del mejillón cebra en la cuenca del Ebro (periodo 2005-2009). *Limnetica*, 31(2), 213–230.

Karatayev, A. Y., Burlakova, L. E., & Padilla, D. K. (2015). Zebra versus quagga mussels: a review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts. *Hydrobiologia*, 97–112.

Ministerio Medio Ambiente, Rural y Marino (MMARM). (2007). Estrategia Nacional para el Control del Mejillón Cebra (*Dreissena polymorpha*) en España.

Noguera, I. (2013). Cerca i caracterització d'elements genòmics d'interès en el genoma del musclo zebra (*Dreissena polymorpha*). Treball Final de Grau en Biologia. Universitat de Girona.

Peñarrubia, L.; Sanz, N.; Pla, C.; Vidal, O.; Viñas, J. (2015) Using Massive Parallel Sequencing for the development, validation, and application of population genetics markers in the invasive bivalve zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *PLoS ONE* doi: 10.1371/journal.pone.0120732.

Ruiz-Altaba, C.; Jiménez P.J.; López, M.A. (2001). El temido mejillón cebra empieza a invadir los ríos españoles desde el curso bajo del río Ebro. *Quercus* 188, 50–51.

Sanger F, Coulson AR (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 94(3):441-448.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2014). Comparision of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements. *Life technologies* (<https://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/global/life-sciences/Laboratory%20Instruments/Files/1014/Qubit-fluorometric-quantitation-vs-spectrophotometer-measurements.pdf>).

URA (Confederación Vasca del Agua). (2013). Plan de Acción para el Control de la expansión del mejillón cebra en la Comunidad Autónoma del País Vasco 2013-2015. Cimera Estudios Aplicados, S. A. para la Agencia Vasca del Agua. (www.uragentzia.euskadi.net).

Zaiko, A., Olenin, S., (2006) *Dreissena polymorpha*. Delivering Alien Invasive Species Inventories for Europe (DAISIE). 29-05-2015 (http://www.europe-aliens.org/pdf/Dreissena_polymorpha.pdf).