



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Estudios evolutivos y morfológicos de
cianobacterias relacionadas a *Calothrix*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA

PRESENTA:
JULIA DOMÍNGUEZ ESCOBAR

DIRECTORA DE TESIS
DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ



México, DF.

Febrero del 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

Autorización de voto aprobatorio

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

"Estudios evolutivos y morfológicos de cianobacterias relacionadas a Cylindrocapsa"

realizado por Domínguez Escobar Julia, con número de cuenta 40300136-9, quien opta por titularse en la opción de Tesis en la Licenciatura en Biología. Dicho trabajo cuenta con nuestra auto aprobación

Propietaria	Dra.	Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de María de Guadalupe Souza Salcivar	
Propietaria	Dr.	Luis Enrique Aguilar Truero	
Propietario Titulo	Dra.	Luisa Isaura Falcón Álvarez	
Suplente	Dea.	Karina Borge Paz	
Suplente	M. en C.	Rene Carrillo Floris	

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, D.F., a 22 de enero de 2008
EL COORDINADOR DE LA UNIDAD DE ENSEÑANZA DE BIOLOGÍA

DR. ZENÓN CANO SANTANA

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Señor titular: antes de firmar este documento, visite el estudio que le muestra la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Para Laura
A Rebeca y Alvaro

*Una nación sin educación está
anémica, porque corre por
sus venas sangre empobrecida*

JUSTO SIERRA

Esta tesis se llevó a cabo en el laboratorio de Evolución Experimental y Molecular del Instituto de Ecología, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Luisa I. Falcón Álvarez en donde se recibió asesoría técnica de la M. en C. Laura Espinosa Asuar. Fue parte final de los trabajos del Taller de Tesis: “Genética Evolutiva: de las bacterias hasta los grandes clados de angiospermas”. Existió apoyo por parte de STINT (Suecia), para realizar una estancia en el laboratorio de la Dr. Birgitta Bergman en la Universidad de Estocolmo, en donde se recibió asesoría técnica de Susanne Lindval. Los apoyos económicos provienen de los proyectos SEMARNAT/SEP 44673Q, IN223105 y SEP/CONACyT 56045.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora *Luisa* por su dedicación, paciencia, confianza y por brindarme conocimiento desde diversos enfoques; su apoyo permitió hacer de este proceso una etapa divertida y productiva. Además generó las bases para hacer más fácil lo que sigue.

A mis sinodales: *Luis Eguiarte, Valeria Souza, René Cerritos y Karina Boege* por sus valiosas correcciones.

A mi *Madre*, gracias por regalarme una carrera universitaria, por cuidarme y quereme tanto y por siempre confiar en mí, sabes que todo esto sería imposible sin tí. A mi hermano: *Pelón*, a tí te debo estar en el mal camino, gracias por presentarme la universidad y este maravilloso mundo de la ciencia. *Rebe* gracias por caminar siempre junto a mí. *Tina* gracias por creer en mí y estar siempre a mi lado. A mis amigos de la prepa: *Duva, Don Rodri, Marité, Jimena, Marigel*.

Yis (hija) gracias por una infinidad de cosas, desde entender las simplezas que necesito para poder trabajar (café) hasta las miles de horas que me regalaste para que esta tesis fuera posible.

Especial agradecimiento a *Lau*, quien además de enseñarme a trabajar en el Laboratorio me ayudó a elevar mi umbral a la frustración y me brindó su cariño y el de su familia (gracias Emilio y Diego por distraerme un poco). Gracias *Alejandro* por tus sugerencias.

A mis amigos:

Lorena muchas, muchas gracias por estar siempre ahí, por compartir tantas horas de angustia, mudanzas y fiestas. *Marcia* gracias por preocuparte siempre por tu "amiga controlología" y todas esos cafecitos que le dan sentido a la vida. Gracias *Alina* por tenerme tanta paciencia y por tu apoyo siempre que lo he necesitado. *German* gracias por decir siempre lo que es y por darme ese abrazo en el momento preciso. *Silvia y Alfonso* gracias por brindarme su cariño y

compañía en la etapa final. Moni, te agradezco tu locura sin la cual este último año no hubiese sido tan divertido, y por responder todas mis preguntas descontextualizadas durante el proceso de escritura. *Xarini*, gracias por desempolvarme un poco. Y gracias a todas las personas que compartieron buenos y malos tiempos en la facultad de Ciencias.

Sandivel gracias por todos esos dolores de estómago generados por la risa y que rompieron con la monotonía de cada día; gracias, también, por tu tiempo para hacer los análisis de ML. *Reno*, gracias por toda tu ayuda, tus correcciones y por las simplezas que hicieron del trabajo de laboratorio una etapa divertida, ahhh...y por las pelis. Jaimito gracias por estar siempre ahí para personas como yo. Además, gracias por compartir esos momentos de pura adicción al cafecito. Thanks *Karo*, have known you is one of the best things I got from this process. *Bea*, gracias por el tiempo y las atenciones que me diste.

Valeria, quiero agradecerte especialmente por haberme brindado tu cobijo cuando me invitaste a trabajar en tu laboratorio, la manera en que ves y sientes la ciencia es una enseñanza única. *Luis Eguiarte* gracias por tus revisiones y todo el conocimiento que me transmitiste durante los dos años de Taller.

ÍNDICE

Índice de tablas	i
Índice de figuras	ii
Abreviaturas	iii
Resumen	iv
Abstract	v
I. Introducción	1
I.1 Introducción	1
I.2 Justificación	3
I.3 Objetivo	3
I.4 Antecedentes	4
I.5 Descripción del sitio de origen de cada cultivo	6
II. Material y Métodos	8
II.1 Morfología	8
II.1.1 Cultivos	8
II.1.2 Microscopía óptica	8
II.1.3 Microscopía electrónica de transmisión	8
II.1.4 Análisis morfológicos	9
II.2 Análisis filogenético	10
II.2.1 Extracción de ADN	10
II.2.2 Amplificación de material genético por medio de PCR	10
II.2.3 Clonación	10
II.2.4 Secuenciación	11
II.2.5 Análisis filogenético	12
II.2.6 Análisis de diversidad nucleotídica	13
III. Resultados	14
III.1 Morfología	14
III.2 Análisis filogenético	18
III.2.1 Filogenia	18
III.2.2 Análisis de diversidad nucleotídica	22
IV. Discusión	23
IV.1 Morfología	23
IV.2 Análisis filogenético	25
IV.2.1 Filogenia	25
IV.2.2 Análisis de diversidad nucleotídica	30
V. Conclusión.....	33
VI. Perspectivas.....	34
VII. Referencias.....	35
VIII. Apéndices.....	40
Apéndice I. Medios de Cultivo	40
Apéndice II. Microscopio Electrónico de Transmisión.....	43
Apéndice III. Extracción de bandas de gel.....	46
Apéndice IV. Clonación	47
Apéndice V. Secuencias de la base de datos ARB	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Procedencia de cada muestra.....	8
Tabla 2. Primers para amplificar y secuenciar.....	12
Tabla 3. Secuencia más parecida en la base de datos del <i>16S rRNA</i>	19
Tabla 4. Estimados de diversidad genética y prueba de neutralidad del gen <i>16S rRNA</i> (1299pb) de cinco poblaciones.....	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microfotografías de microscopio óptico de luz. Morfología representativa de **A.** Pozas Azules, **B.** Zanzíbar, **C.** PCC7103, **D.** Askö, **E.** PCC7504 y **F.** Isla de Heron. Heterocisto indicado con flecha. Barra de escala 10µm.....15

Figura 2. Microfotografías con microscopio electrónico de Transmisión (TEM). **I.** Pozas Azules, **II.** Zanzibar, **III.** PCC7103, **IV.** Askö, **V.** PCC7503, **VI.** Isla de Heron. **A.** Célula Vegetativa, **B.** Heterocisto y **V.** Vaina. Barra de escala 5-2µm (I- IIA y I-IIB), 1-2µm (III- IVA y III-IVB) y 2µm (IVA-B y VA-B).....16

Figura 3. Análisis comparativo: Promedio y desviación estándar de los valores de **a.** Ancho de célula vegetativa, **b.** Ancho de vaina, **c.** Ancho de heterocisto, **d.** Ancho de filamento y **e.** Número de carboxisomas. Las estructuras se indican por medio de una línea blanca (a, c, d) y por medio de flecha (b y e). El resultado de la ANOVA para cada parámetro se indica con **F.** Los sitios que no comparten letra son estadísticamente diferentes con una $P < 0.05$17

Figura 4. Las secuencias generadas en este estudio se muestran en negritas y los valores contiguos representan el porcentaje de similitud al género indicado por el recuadro. La línea punteada representa que son grupos parecidos a *Rivularia*. **A.** Árbol filogenético inferido a partir de secuencias (1299 pb) del gen *16S rRNA* mediante Máxima Verosimilitud (ML). Los valores de Bootstrap determinados por 1000 réplica para NJ/MP se muestran en los nodos. **B.** Árbol filogenético inferido de la secuencia del gen *16S rRNA* (290 pb) mediante Neighbor-Joining (Kimura 2-parámetros). Valores de Bootstrap determinados por 500 réplicas.....21

ABREVIATURAS

DGGE	Gel de electroforesis de gradiente desnaturalizante (por sus siglas en inglés Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
dNTP's	Deoxinucleótidos Trifosfato
IPTG	Isopropil- β -D-tri-galactósido
LB	Luria Base
ML	Máxima verosimilitud (por sus siglas en inglés Maximum Likelihood)
MP	Máxima Parsimonia
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés National Center for Biotechnology Information)
Pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador salino de fosfato (por sus siglas en inglés Phosphate Buffer Saline)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RDB	Base de datos del proyecto ribosomal (por sus siglas en inglés Ribosomal Data Base Project)
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	Ácido desoxiribonucleico ribosomal
TA	Temperatura ambiente
TEM	Microscopio óptico de transmisión (por sus siglas en inglés Transmission Electronic Microscopy)
UV	Ultravioleta
μ L	Microlitros

RESUMEN

Las cianobacterias constituyen un grupo muy diverso de organismos fotosintéticos oxigénicos y fijadores de nitrógeno. A pesar de la importancia por su papel en la historia de la vida en la Tierra, poco se sabe de la taxonomía de este grupo. El género *Calothrix* pertenece a un grupo de cianobacterias formadoras de heterocistos (células especializadas en la fijación de nitrógeno). Además, es conocido por ser colonizador de una gran cantidad de hábitats y por su capacidad de soportar desecación, radiaciones UV y de fijar N y C. En este estudio se pretende establecer la relación filogenética entre distintas cepas que han sido caracterizadas dentro del género *Calothrix*, así como hacer una descripción de las características morfológicas de la estructura del filamento. Las cepas analizadas provienen del Mar Báltico (PCC7504 y PCC7103 depositadas en la colección Pasteur y Askö), Zanzibar (Tanzania), Isla de Heron (Australia) y Cuatro Ciénegas (México). Se tomaron microfotografías con microscopio óptico y electrónico de transmisión y se analizaron 37 secuencias del gen *16S rRNA* (1299 pb). Diferencias significativas ($P < 0.05$) se encontraron entre las estructuras analizadas de cada cultivo. El ancho de vaina y filamento de Pozas Azules resultó significativamente diferente ($P < 0.05$) al de los otros cultivos y, el número de carboxisomas de un cultivo del Báltico (PCC7504) presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) al resto de las cepas. El análisis filogenético demostró que dos de los cultivos del Báltico (PCC7103 y Askö) constituyen un grupo monofilético del género *Calothrix*, el cultivo PCC7504 pertenece al género *Tolypothrix* y el cultivo de Australia pertenece a *Rivularia*. Por otro lado, el cultivo de México presentó mayor similitud al género *Rivularia*, pero se agrupa en un clado aparte, por lo que nosotros proponemos que se trata de un nuevo género de cianobacterias filamentosas con heterocistos. Nuevos estudios serán necesarios para determinar las relaciones evolutivas entre cianobacterias relacionadas al género *Calothrix*, pero este tipo de estudios permiten avanzar en el conocimiento de su historia de vida.

ABSTRACT

Cyanobacteria are a very diverse group of oxygenic photosynthetic and nitrogen fixing organisms. Despite their important role in the history of life on earth, little is known about the taxonomy of this group. The genus *Calothrix* belongs to a group of heterocyst-forming (specialized cells in nitrogen fixation) cyanobacteria, which are known to be important primary colonizers in a great diversity of environments due to their ability to resist UV radiation, desiccation and fix C and N. This study aims to establish the phylogenetic relationship between different strains of cyanobacteria supposed to pertain to the genus *Calothrix*, via descriptions of morphological characteristics of the structure of the filament and phylogenetic analysis. The strains analyzed in this study come from the Baltic Sea, Tanzania, Australia and México. We took microphotographs with TE and optical microscopy and analyzed 37 sequences of the *16S rRNA* gene (1299 pb). The size of the sheath and width of the filament of strains from Mexico were significantly different ($P < 0.05$) to all other strains. The number of carboxisomes in the Baltic strain (PCC7504) presented significant differences ($P < 0.05$) to the rest of the groups. The phylogenetic analysis showed that two of the Baltic strains (PCC7103 and Askö) constitute a monophyletic group of the genus *Calothrix*, Baltic strain PCC7504 belongs to the genus *Tolypothrix* and the Australian strain (HI) belongs to *Rivularia*. On the other hand, although the culture from Mexico had similarity to the genus *Rivularia*, it showed a significant distance suggesting they are a new genus of filamentous cyanobacteria. Further studies will be needed to determine the evolutionary relation between strains related to *Calothrix* although these studies help to better understand their natural history.

I. INTRODUCCION

I.1 Introducción

Las cianobacterias han jugado un papel significativo en la historia de la Tierra, como productores primarios de oxígeno y fijadoras de nitrógeno, elementos fundamentales para la vida. Son un grupo muy diverso distribuido de bacterias en un rango muy amplio de hábitats, tanto acuáticos como terrestres, que van desde desiertos frío y calientes, valles, zonas antárticas, mares oligotróficos, etc. (Tomitani et al. 2006). Son morfológicamente uno de los grupos más diversos entre los procariontes. Se conocen formas unicelulares y filamentosas y, dentro de cada uno de estos tipos morfológicos hay también una gran variedad.

La taxonomía bacteriana ha dividido al grupo de las cianobacterias en cinco secciones: I) Orden Chroococcales. Unicelulares con reproducción por fisión binaria, II) Orden Pleurocapsales. Unicelulares con reproducción por bipartición múltiple, III) Orden Oscillatoriales. Filamentosas sin heterocistos que se dividen en un sólo plano, IV) Orden Nostocales. Filamentosas con heterocistos que se dividen en un sólo plano y V) Orden Stigonematales. Filamentosas con heterocistos que se dividen por más de un plano (Waterbury, 1991). Nuevas clasificaciones se han propuesto en base no sólo a características morfológicas, sino también mediante análisis moleculares (Bauer, 2007; Honda et al.1998).

Los primeros estudios taxonómicos basados en la composición de pigmentos y otros caracteres morfológicos, clasificaron a las cianobacterias como algas (Lugomela, 2002). Posteriormente, gracias al descubrimiento de que la pared celular de las cianobacterias es típica de bacterias gram negativas y que tienen una organización subcelular procarionte, se propuso una reclasificación como bacterias. Las cianobacterias difieren de las bacterias rojas y verdes en aspectos fundamentales, principalmente en que las cianobacterias son fototrofos oxigénicos (Madigan et al. 1999). Las cianobacterias fueron los primeros organismos en realizar fotosíntesis oxigénica, utilizando la clorofila *a* para capturar la luz, agua como fuente de electrones y generando oxígeno como producto final. Los cloroplastos de algas y plantas evolucionan de la asociación simbiote con una cianobacteria (Dyer, 2003), por lo que el aparato fotosintético de las plantas es similar al de las cianobacterias, siendo la clorofila *a* el

pigmento primario y las ficobiliproteínas (ficocianinas y ficoeritrinas), pigmentos auxiliares. La evolución de la fotosíntesis oxigénica tuvo como resultado la transformando de la atmósfera reductora en una oxigénica, promoviendo la diversificación de especies y procesos metabólicos. Antes de la evolución de las cianobacterias, organismos fotosintéticos utilizaban sulfuro de hidrógeno (H₂S) como fuente de hidrógeno y electrones, produciendo azufre o sulfato como desperdicio, o utilizando ácidos orgánicos como acetato como aceptor y donador de electrones, produciendo ácidos orgánicos más sencillos como desperdicio (Madigan et al .1999).

Algunas cianobacterias son capaces de alternar fotosíntesis oxigénica y anoxigénica si se encuentran en ambientes con altas concentraciones de sulfuro de hidrógeno. En respuesta a las condiciones de luz en términos de cantidad y calidad son capaces de modificar la superficie fotosintética de los tilacoides, y de cambiar el tamaño y la composición de ficobiliproteínas de los ficobilisomas. La fisiología tan versátil que exhiben les confiere una amplia tolerancia ecológica, que contribuye a su éxito competitivo (Albert et al .1991).

Clasificaciones artificiales se han generado para dividir al grupo de las cianobacterias, siendo el proceso de reproducción el criterio más utilizado. Varios estudios moleculares con el gen *16S rRNA* han sido realizados, pero no fue sino hasta que Honda et al. (1998) propone siete grandes linajes para el grupo de las cianobacterias, cuando se comienzan a entender mejor las relaciones evolutivas entre los distintos taxones que conforman este grupo. Ya en sus análisis moleculares se incluye el grupo de las proclorofitas, que había sido considerado como un grupo separado, por carecer de ficobilinas y tener clorofila b, al igual que las plantas (Rocap et al .1999). Grupos unicelulares, que han sido clasificados dentro del género *Synechococcus*, se distribuyen de manera polifilética en todo el árbol, sin embargo, la topología de las filogenias resultó siempre consistente entre los diversos métodos de reconstrucción y marcadores utilizados. También se encontró que el grupo de las cianobacterias formadoras de heterocistos es monofilético. Dicha hipótesis se ha confirmada con diversos marcadores moleculares: *nifH*, gen de la nitrogenasa; *rnpB*, gen de la fosforilasa de RNA; *psbA*, gen de la proteína D1 del fotosistema II; *rpoC*, gen de la RNA polimerasa dependiente de DNA; *hetR*, gen involucrado en la formación de heterocistos, etc. (Honda et al. 1998; Tomitani et al. 2006). Los órdenes que conforman el grupo de cianobacterias formadoras de heterocistos, *Nostocales* y *Stigonematales*, se han encontrado mezclados, por

lo cual no ha sido fácil establecer las relaciones evolutivas entre éstas cianobacterias (Rajaneimi et al. 2005; Sihvonen et al. 2007). El género *Calothrix*, dentro del orden Nostocales, pertenece al grupo de cianobacterias formadoras de heterocitos. Tomitani et al. (2006) proponen una edad de 2, 100-2, 400 Ma para el grupo de cianobacterias que forman heterocistos.

Estudios se han realizado utilizando al género *Calothrix* como modelo para entender procesos como: la síntesis de pigmentos y modulación en respuesta a cambios ambientales, fragmentación de filamentos inducidas por estrés, transporte de electrones como forma de regulación en la diferenciación de filamentos entre otros (Campbell et al. 1993; Dillon, et al. 2003; Prasana et al. 2004; Adamer et al. 2005). Sin embargo, pocos análisis moleculares se han hecho para entender los procesos y relaciones evolutivas de este grupo, siendo algunos estudios recientes con cepas provenientes del Báltico los más robustos (Sihvonen et al. 2007).

I.2 Justificación

A pesar de su importancia, la taxonomía y filogenia de los grupos de cianobacterias que diferencian heterocistos son todavía inciertas. Nuestro análisis propone estudiar desde distintos enfoques, cepas que representen mejor la diversidad de este grupo de cianobacterias formadoras de heterocistos, para comprender de manera más profunda sus relaciones evolutivas y así, poder proponer grupos taxonómicos naturales.

I.3 Objetivo

Determinar la relación filogenética entre cultivos de cianobacterias provenientes de diferentes regiones geográficas que han sido etiquetadas preliminarmente como miembros del género *Calothrix*, así como hacer una descripción de las características morfológicas de cada cultivo.

I.4 Antecedentes

La familia *Rivulariaceae* se encuentra clasificada dentro de la sección 19 del Manual de Bergey de Sistemática Bacteriológica (Castenholz, 1989). En cultivo, la familia es mejor conocida por cepas clasificadas dentro del género *Calothrix*. Su característica clave es la estructura del tricoma en forma de cono, sin embargo, muchas veces se ha utilizado la presencia de un heterocisto basal para establecer relaciones de parentesco. A continuación se numeran las características distintivas de la familia *Rivulareaceae*:

1. Tricoma uniseriado en forma de cono.
2. Formación de ramas falsas.
3. Heterocistos terminales y con un solo poro, algunas veces bajo determinadas condiciones se pueden encontrar heterocistos intercalares.
4. Las divisiones celulares son usualmente intercaladas y localizadas.
5. El adelgazamiento del tricoma puede terminar en largos cabellos, particularmente en bajas condiciones de fósforo.
6. Formación de hormogonias (pequeños fragmentos del tricoma que contienen entre tres y diez células), cuando hay deficiencia de fósforo.
7. Los tricomas se pegan al sustrato de manera individual o en grupos, formando agregados semiesféricos.

En el Manual de Bergey de Sistemática Bacteriológica se incluyen los géneros *Calothrix*, *Gloeotrichia*, *Rivularia*, *Sacconema*, *Isactis*, *Dichothrix*, *Gardnerula* y *Microchaete* como miembros tradicionales de la familia *Rivulareaceae* (Castenholz, 1989). Sin embargo, sólo secuencias de los géneros *Rivularia*, *Calothrix* y *Gloeotrichia* se encuentran publicadas, por lo que el estudio de las relaciones evolutivas entre estos grupos se ve restringido a una pequeña porción de la diversidad.

Las características generales del género *Calothrix* son: Filamentos heteropolares, diferenciados en la parte basal (generalmente adherida al sustrato) y apical, sin ramificaciones. Se pueden encontrar solitarios o en pequeños grupos, pero sin compartir vaina mucilaginosas, rara vez se llegan a observar filamentos con falsas ramificaciones, los

filamentos a veces rodean el sustrato. Tricomas casi siempre con heterocistos basales, esféricos o semiesféricos y ocasionalmente intercalares. Vainas siempre presentes, firmes usualmente, lameladas en ocasiones y de color amarillo-café. Sin vesículas de gas, pero se llegan a observar en hormogonios (Desikachary, 1959).

Los filamentos del género *Rivularia* se describen morfológicamente similares a los del género *Calothrix*, siendo el hecho de no formar acinetos la única característica que distingue este grupo (Holt et al. 1994).

El género *Tolypothrix* está clasificado dentro de la familia *Scytonemataceae*, al presentar ramificación falsa del tricoma. Sin embargo, las relaciones evolutivas de este grupo permanecen inciertas (Jeeji-Bai, 1976). Cepas de este género han sido nombradas como *Calothrix* y viceversa.

Calothrix es un género cosmopolita, que se distribuye a lo largo de un gradiente muy amplio de hábitats, como los litorales rocosos, tapices bacterianos en la antártica, arrecifes tropicales, ambientes alpinos endolíticos y desiertos (Sihvonen et al. 2006). Se sabe que tanto el género *Calothrix* como *Rivularia* forman asociaciones simbiotes con muchos organismos eucariontes, tales como algas, briofitas, helechos y cícadras (Dexter-Dyer, 2003; Rai et al. 2004).

Estudios filogenéticos en general, se han enfocado en cepas de cianobacterias planctónicas, mientras que las cepas bentónicas han sido relegadas (Sivonen et al. 2007). Entre los pocos estudios que hay sobre la diversidad del género *Calothrix* se encuentra el que realizaron Sihvonen et al. (2007), en donde un grupo de cepas resultó similar a nivel morfológico, pero a nivel genético presentó una gran diversidad, al agruparse en cuatro distintos géneros: *Rivularia*, *Calothrix*, *Gloeotrichia* y *Tolypothrix*. Además, encuentra que los análisis morfológicos arrojan datos que no pueden ser correlacionados con los grupos establecidos mediante filogenias moleculares.

Narayan et al. (2006) estudiaron la diversidad de cepas de los géneros *Nostoc*, *Anabaena* y *Calothrix* basándose en parámetros fisiológicos y bioquímicos, encontrando que los grupos

que se conformaron al construir un dendrograma basado en una matriz de similitud, están constituidos por cepas de distintos géneros, lo cual nos dice que géneros cianobacterianos no pueden ser diferenciados basándose únicamente en parámetros fisiológicos, ya que muchas veces éstos se ven afectados por condiciones ambientales.

I.5 Descripción del sitio de origen de cada cultivo

Pozas Azules. Se encuentra dentro del Valle de Cuatro Ciénegas en el Estado de Coahuila (26°45'N, 101°48'O) al noreste de México (zona árida de la región Neártica del país). El pH del agua, al precipitarse el carbonato de calcio, permite la formación de estromatolitos. Es un ambiente oligotrófico, con altas concentraciones de magnesio, calcio, carbonato y sulfato, pero bajo en fosfatos y nitratos (Souza et al.2006). La temperatura varía entre los 18°C y 35° (Johannesson et al. 2004; Falcón et al.2007). Colectado de estromatolito.

Zanzíbar. La laguna de Paje está localizada al este de la costa de la Isla de Zanzíbar (Tanzania), al oeste del océano Índico (06°16'S, 30°32'E). Un arrecife coralino (de aprox. 2 Km) corre de manera paralela a la línea de quiebre, creando una laguna intermareal entre el arrecife y la línea de costa. El fondo de la laguna es de arena fina y blanca. La temperatura del agua oscila normalmente entre los 30°C y 37°C y la salinidad entre 14 y 32 ups (unidades prácticas de salinidad) (Bauer, 2007). Proviene de tapiz microbiano.

Isla de Heron. La isla es una playa carbonatada, que pertenece al grupo de islas de la Gran Barrera Arrecifal y está localizada a 85 km aproximadamente al noroeste de la costa de Queensland, Australia (23°27',151°55'E) al este del Océano Pacífico (Rassheed et al. 2003). La temperatura promedio del agua oscila entre los 20 °C y 26 °C con un mínimo de 15°C y un máximo de 29°C (Bauer, 2007). Proviene de tapiz microbiano.

Askö. El cultivo proviene del Centro de Investigaciones Marinas de Estocolmo, que pertenece a la Universidad de Estocolmo y es uno de los tres centros de investigación marina en Suecia. Desconocemos el sitio exacto de muestreo dentro del Báltico.

Las cepas **PCC7103** y **PCC7504** están disponibles en la colección de cianobacterias del Instituto Pasteur. Las cepas provienen del Báltico (Sihvonen et al.2007).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1 Morfología

II.1.1 Cultivos. En este estudio se trabajó con seis cultivos de cianobacterias (ver Tabla 1), por cuyos filamentos fueron identificados como miembros del género *Calothrix* (Waterbury, 1991).

Tabla 1. Procedencia de cada muestra.

Cultivos	Procedencia	Medio de cultivo [~]	Referencia
1. Askö*	Báltico	Z8 ^a	Laboratorio de Askö, Centro de Investigaciones Marinas de Estocolmo.
2. PCC7103*	Báltico	BG-11 ^b	Colección del Instituto Pasteur
3. PCC7504*	Báltico	BG-11 ^b	Colección del Instituto Pasteur.
4. Zanzíbar*	Tanzania	SO ^c	Bauer, 2007.
5. Isla de Heron*	Australia	SO ^c	Bauer, 2007.
6. Pozas Azules+	México	SO ^d	Falcón, 2007.

^a Kotai (1972), ^b Allen (1968), ^{c, d} Falcón (2003).

*Donados por Birgitta Bergman (Instituto Botánico de la Universidad de Estocolmo, Suecia).

+Luisa Falcón (Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, UNAM).

[~]Para más información de los medios de cultivo ver apéndice I.

Los cultivos se mantuvieron en matraces de 50 mL en una cámara de incubación programada con una temperatura promedio de 29 °C, ciclos de 14/10 luz-oscuridad a 50-100 $\mu\text{E m}^{-1} \text{s}^{-1}$. El crecimiento de las células fue monitoreado con un microscopio óptico (Zeiss, Axioscope), y 3 mL de cultivo fue transferido a medio nuevo cada tres semanas.

II.1.2 Microcopía óptica. Los cultivos fueron observados mediante un microscopio óptico (Axioscope, Zeiss). Imágenes fueron tomadas con una cámara digital Canon (Power Shot G6) con un aumento de 400X.

II.1.3 Microscopía electrónica de transmisión. Un ml de medio de cada cultivo se centrifugó (2 min, 13 000 x g). El precipitado se lavó con PBS. Posteriormente, para fijar las muestras, se sumergieron en paraformaldehído al 2.5 % durante una hora a temperatura ambiente y se lavaron con PBS tres veces. Se añadieron dos gotas de tetróxido de osmio (250 mg

OsO₄/12.5ml agua ddH₂O) y 4 gotas de PBS a cada muestra dejándolas incubar a 4°C toda la noche. Después del periodo de incubación se deshidrataron secuencialmente con etanol al 20%, 50%, 70 %, 90%, 95%, absoluto y dos veces con acetona dejándolas reposar 20 min en cada concentración. Se lavaron tres veces con PBS y se sumergieron en una resina EPON/Acetona (1:1) durante una hora con el fin de dejar que la resina penetrara las células lentamente y evitar cualquier modificación morfológica. Las muestras se dejaron solidificar en cápsulas de gelatina con EPON durante 48 horas a 60 °C. Secciones gruesas (1.5 µm) y finas (60 nm) se realizaron con un microtomo (MT-7000 ULTRA, RMC) colectándolas en rendijas de cobre. Para tener un contraste que permitiera la observación de las secciones en el microscopio electrónico, éstas se trataron con acetato de uranio. Inicialmente se incubaron en completa oscuridad durante 20 min con acetato de uranio al 2%, después se lavaron con agua destilada. Una segunda incubación se realizó con citrato de plomo al 3%. Las secciones se dejaron secar y se examinaron con un microscopio electrónico de transmisión (modelo EM 906, Zeiss, Oberkochen, Alemania). Para más detalle ver Apéndice II.

II.1.4 Análisis morfológicos

Las microfotografías fueron analizadas para estimar ancho de célula vegetativa, ancho de vaina, ancho de filamento, ancho de heterocisto y número de carboxisomas. Las medidas se tomaron mediante el programa ImagenJ 1.38x (Wayne Rasbard, USA). El promedio y la desviación estándar de cada parámetro se estimaron con STATISTICA para Windows (Tulsa, USA, 2000). Las variables morfológicas son estimadas de un mismo individuo y no son independientes entre ellas, por lo cual se realizó un análisis de varianza multivariado para analizarlas en conjunto. Los datos de ancho de célula vegetativa presentaron una distribución normal, sin embargo los demás parámetros tuvieron que ser normalizados, mediante logaritmo natural para el caso de ancho de vaina, número de carboxisomas y ancho de heterocisto y, con raíz cuadrada de Arco-Seno(x/100) el ancho de filamento. Posteriormente, se realizaron ANOVAS y pruebas pareadas de Tukey para determinar cuales sitios fueron distintos en relación a cada parámetro. Dichos análisis se realizaron con el software JMP7 versión 7.0.1 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

II.2 Análisis filogenético

II.2.1 Extracción de ADN. La extracción del material genético se realizó mediante el protocolo de extracción de ADN para cultivos (Falcón, 2003). Al momento de tomar la muestra a partir de la cual se extraería el ADN, ésta se observó al microscopio para identificar los filamentos de *Calothrix*, ya que en la tesis no se trabajó con cultivos axénicos. A estas muestras se les añadió 10 volúmenes de buffer de extracción (20mM trisHCl, pH 7.5-8.2, 50mM EDTA, 20 mM NaCl) y proteinasa k (10mg ml⁻¹) concentración final de 0.25mg/ml. Las muestras fueron mezcladas e incubadas a 50 °C durante toda la noche. Se agregaron dos volúmenes de fenol y se centrifugó a 14 000 rpm x 5', dos veces y un volumen de cloroformo, recuperando, en cada paso la fase acuosa. Para precipitar se agregó 1/10 (v/v) de acetato de sodio y 2 (v/v) de etanol al 100%. En este paso se agregaron 3 µLs de glicoblué para no perder el pellet de ADN. Incubar a -20 °C x 45'. Posteriormente a la incubación las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm x 20'. Se deshechó el sobrenadante y se añadieron 200µL de etanol al 70% para limpiarlas. Se mezcló suavemente y se retiró el sobrenadante con pipeta. El ADN se resuspendió en 30 mL de dH₂O.

II.2.2 Amplificación del material genético por medio de PCR. El gen *16S rRNA*, un fragmento del 23S y el ITS comprendido entre los dos anteriores se amplificaron con el primer 27F y con el primer 23sR (ver Tabla 2). La reacción de PCR fue de un volumen final de 50µL y contenía los siguientes elementos: 5 mL 10X buffer, 4.1 mL 2.5mM MgCl (25mM), 2µL 0.2 mM dNTP's (10mM), 3µL (10µM) de cada primer, 32.9 mL ddH₂O y 5U DNA Taq Amplificasa (Facultad de Veterinaria, UNAM). La reacción de PCR se realizó en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc) y consistió en 25 ciclos a 94°C por 45s, 54 °C a 45s y 68°C por 120s con un paso previo de desnaturalización a 94°C por 5 min. Un periodo final de extensión se realizó a 68 °C por 7 min. El producto de PCR se purificó mediante el protocolo de extracción de bandas con el kit de Qiagen, (Austin, USA) (ver Apéndice III).

II.2.3 Clonación. Una vez purificado el producto de PCR, se generó una librería de 24 clonas para cada cultivo. El producto de PCR (fragmento aproximado de 1800 pb) fue ligado con el

vector pGEM®-T easy Vector System (Promega, Madison, USA) de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor y protocolos estándares (para más detalle ver Apéndice IV).

El producto de ligación se mezcló con células competentes de *E. coli* JM109 (Promega) y se incubó por 30min. Posteriormente se les dio un choque térmico por 60 segundos, dejándolas reposar 2min en hielo. Se sembraron 200µl de la mezcla en cajas de petri LB/ampicilina/IPTG. Después de un día de incubación a 37 °C, se seleccionaron las colonias blancas y se sembraron nuevamente en placas y en tubos de 1.5 ml con medio LB/amp a partir de las cuales se extrajo el vector con el Kit Montage plasmid Miniprep de Millipore (para mayor detalle ver Apéndice IV).

II.2.4 Secuenciación. Una vez que se extrajo el plásmido de cada clona, se amplificó en una reacción final de 15µL: 2µL de BigDye, 1.6µL del primer 781 general para bacterias de forma inicial para identificar las clonas y 8.4 µL de agua. El programa de secuenciación consiste en un ciclo inicial de 5min a 95 °C, 45 ciclos de 10 s a 95 °C, 45 ciclos de 10 s a 50°C y 45 ciclos de 4 min a 60 °C. La secuenciación de los fragmentos se llevó a cabo por medio de un lector láser en un secuenciador de capilares Applied Biosystems Avant-100.

Inicialmente las secuencias se alinearon con el programa Sequencher 4.1.4 (Genes Corporation, Ann Arbor, USA). Posteriormente se construyó un árbol bajo el método de distancia Neighbor-Joining (Kimura 2-parámetros) y un representante de cada clado se comparó con la base de datos 16S rRNA de Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov>) compatible con la base de datos del Proyecto ARB (<http://www.arb-home.de>), para identificar a las clonas. Una vez identificadas las clonas que presentaron similitud al género *Calothrix*, se amplificaron 4 fragmentos más, con los primers 27F, 359F, 1402R y 23sR. Se verificó que no tuviéramos quimeras con el programa "Chimera_Check" del la base de datos del Proyecto Ribosomal (Cole et al. 2003).

Tabla 2. Primers para amplificar y secuenciar

Primer	Secuencia	Referencia
27F	5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	Lane, et al. 1991.
CYA359F	5'GGG GAA TYT TCC GCA ATG 3'	Nübel et al. 1997
CYA781Rb	5'GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T 3'	Nübel et al. 1997

II.2.5 Análisis filogenético. Las secuencias de ensamblaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor, Versión 7.0.9.0 (Hall, 1999). Cada una de las secuencias consenso fue comparada en la base de datos de Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>), por medio de la herramienta Blast (Basic Local Alignment Search Tool, http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-NAST_align.cgi), para verificar que el mejor hit fuera una cianobacteria del género *Calothrix* o relacionado. Para la filogenia central de esta tesis se alinearon 80 secuencias de 1,299 pb del gen *16S rRNA*. Se trabajó con un fragmento de 1, 299 pb ya que no logramos obtener la secuencia completa del ITS para todas las clonas y además, por la limitante de la existencia de secuencias en las bases de datos, ya que generalmente éstas son de un promedio de 1, 300 pb. La alineación de 80 secuencias, en donde se incluyen 36 secuencias del Greengenes (ver apéndice VI), se realizó con el programa BioEdit (Hall, 1999), con refinamientos a mano. Una vez terminada la alineación, se realizó un análisis para hacer inferencias filogenéticas con el programa PAUP versión 4.0b10 (para Macintosh). La secuencia de *16S rRNA* de *Croccosphaera watsonii* (cianobacteria unicelular) fue el grupo externo. Se eligió esta cianobacteria como grupo externo, para generar un marco evolutivo que sitúe a las cianobacterias en el tiempo, ya que se ha reportado que representa el linaje con el que se dió la simbiosis que originó el cloroplasto (cita). Para la reconstrucción filogenética por medio de Máxima Verosimilitud, el modelo de evolución nucleotídica se escogió por medio del criterio de información de Akaike (AIC), por medio de un análisis de Modeltest (Posada y Crandall, 1998). El modelo seleccionado fue (GTR+I+G), donde I = 0.3894 (proporción de sitios invariables) y G = 0.5246 (distribución gamma). Se eligió el modelo de ML por ser el que permite incluir en el análisis, las tasas de sustitución específicas para los datos calculadas por medio de Modeltest. También se analizaron relaciones filogenéticas con Máxima Parsimonia y Neighbor-Joining (K2P). Se realizaron Bootstrap de 1000 y 500 réplicas

para las topologías de los árboles de NJ y MP respectivamente. Por limitaciones prácticas no se realizaron bootstrap para la topología de ML.

II.2.6 Análisis de diversidad nucleotídica

Los análisis de diversidad genética se realizaron con el paquete de software DnaSP (Rozas et al. 2003). Para cada población, se calcularon estadísticos de diversidad genética a nivel de haplotipos y nucleótidos. Se obtuvieron dos estimados de diversidad nucleotídica, uno basado en las diferencias pareadas entre dos secuencias (π) y otro basado en el número de sitios segregantes (θ). Se probó neutralidad con la prueba de Tajima (1989).

III. RESULTADOS

III.1 Morfología

Se observó una morfología clásica del género *Calothrix* en todas las cepas. Filamentos separados, generalmente rectos, sin ramificaciones; vainas firmes, de un color amarillo a café claro y formaciones de hormogonios como proceso de reproducción (Silva y Peinaar, 2000). La morfología típica de cada cultivo se muestra en la figura 1. Al observar los matraces de cada cultivo se percibió que el cultivo de la Isla de Heron presenta una coloración verde, el de PCC7103 y Askö un color verde oscuro y los cultivos de Pozas Azules, PCC7504 y Zanzíbar de color café. Las células vegetativas fueron generalmente redondas, sin embargo se observaron también células ovaladas en el cultivo de Zanzíbar. En los seis cultivos se observaron heterocistos terminales, pero también se observaron heterocistos intercalares en los cultivos del Báltico, Askö y PCC7103. Se observaron membranas tilacoidales distribuidas a través de todo el protoplasma, sin ninguna diferencia entre cultivo. Es decir, no hubo un patrón característico de cada cultivo.

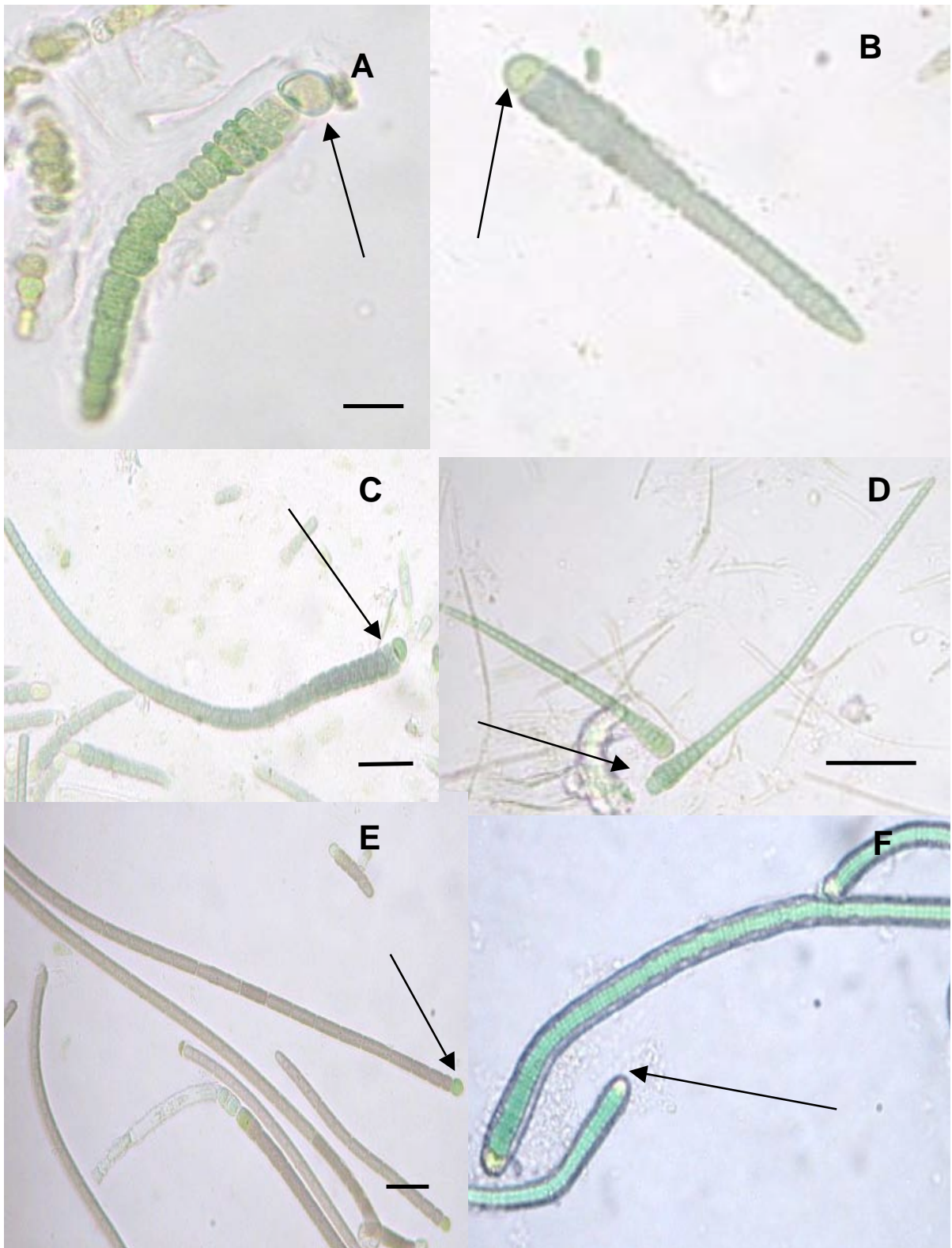


Figura 1. Microfotografías de microscopio óptico de luz. Morfología representativa de: **A.** Pozas Azules, **B.** Zanzibar, **C.** PCC7103, **D.** Askö. **E.** PCC7504 y **F.** Isla de Heron. Heterocisto indicado con flecha. Barra de escala 10 μ m.

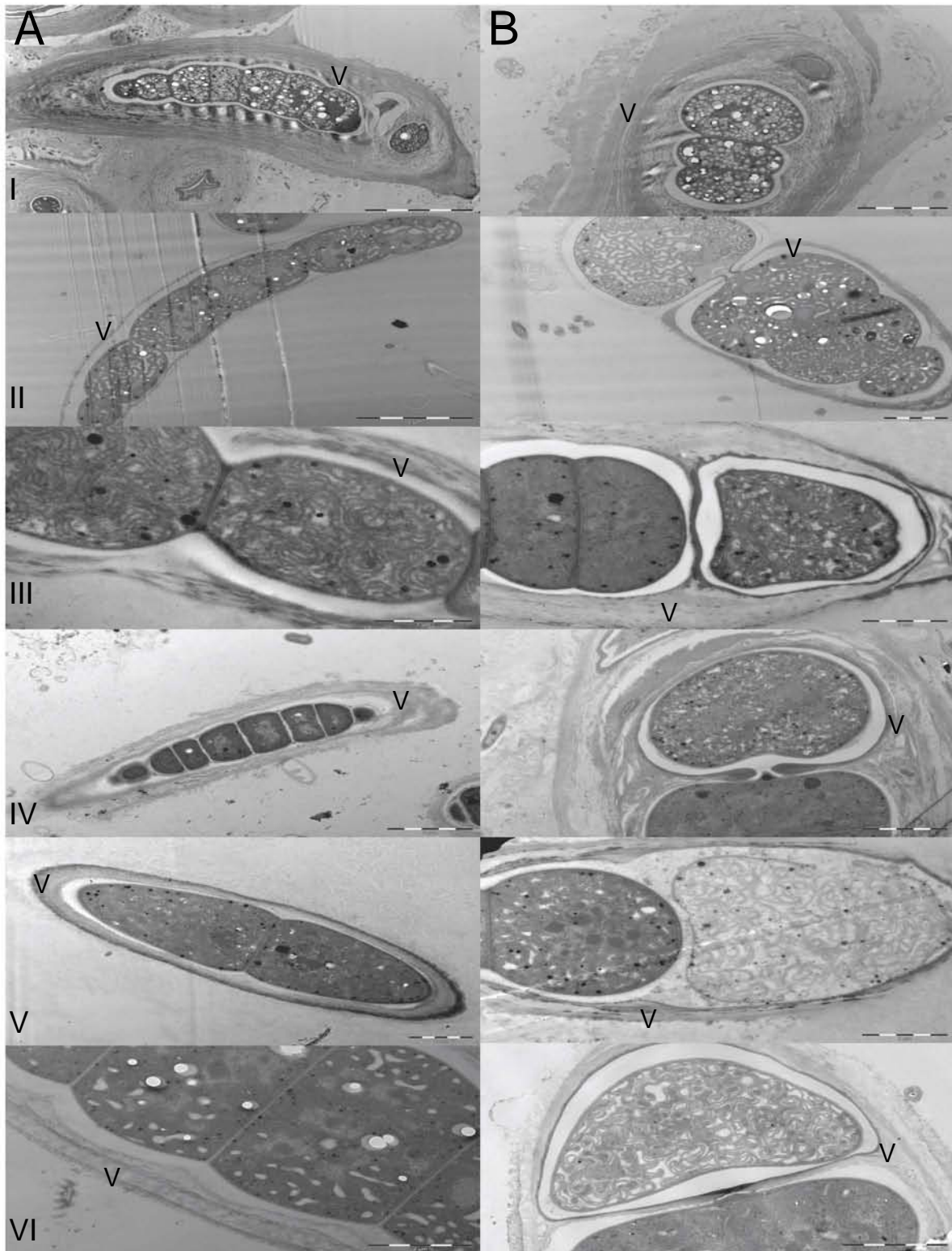


Figura 2. Microfotografías con microscopio electrónico de transmisión (TEM). **I.** Pozas Azules, **II.** Zanzíbar, **III.** PCC7103, **IV.** Askö, **V.** PCC7503 y **VI.** Isla de Heron. **A.** Célula Vegetativa. **B.** Heterocisto y **V.** Vaina. Barra de escala 5-2 μ m (I- IIA y I-IIB), 1-2 μ m (III-IVA y III-IVB) y 2 μ m (IVA-B y VA-B).

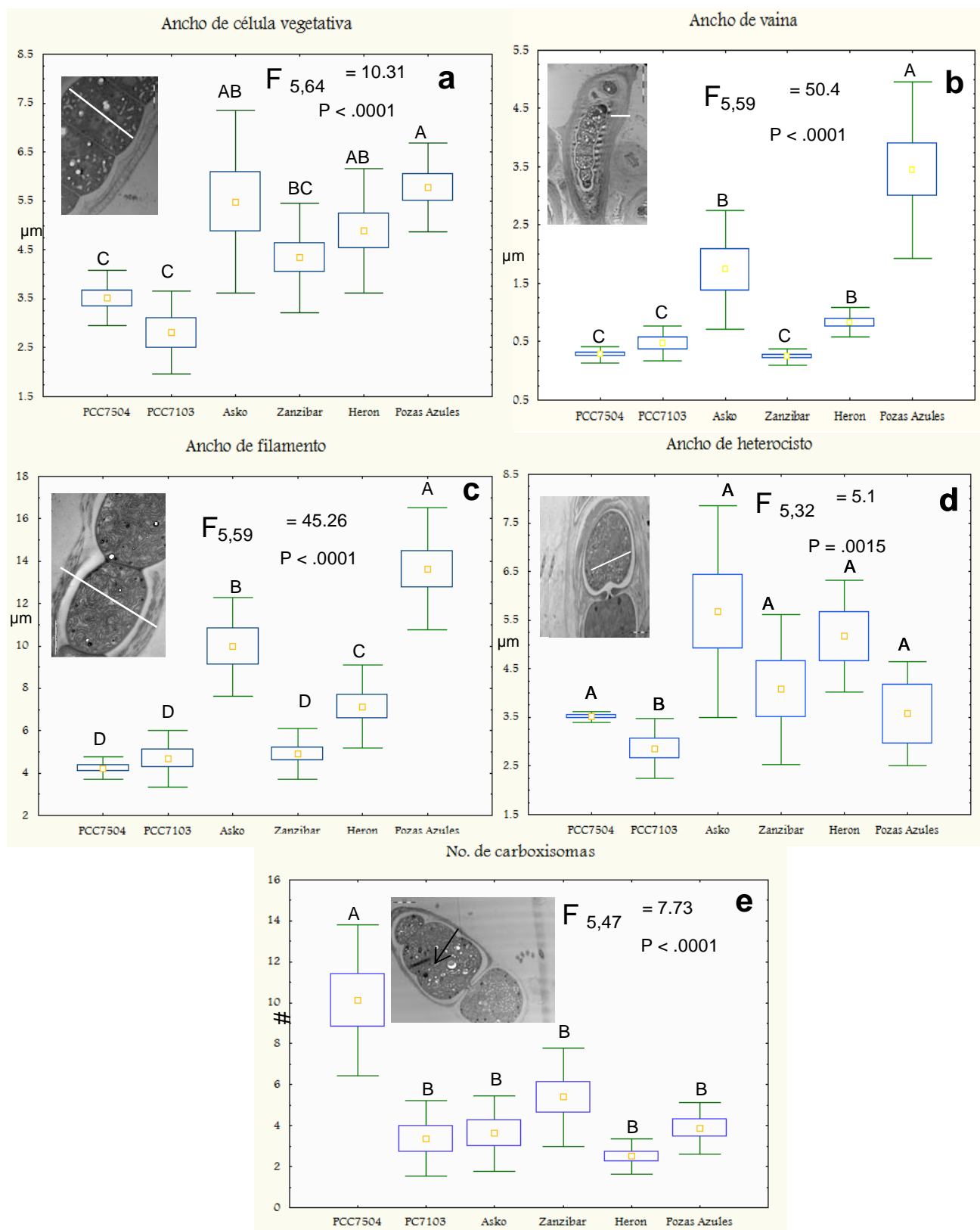


Figura 3. Análisis comparativo: Promedio y desviación estándar de los valores de **a.** Ancho de célula vegetativa, **b.** Ancho de vaina, **c.** Ancho de heterocisto, **d.** Ancho de filamento y **e.** Número de carboxisomas. Las estructuras se indican por medio de una línea blanca (a, b,c, d) y por medio de flecha (e). El resultado de la ANOVA para cada parámetro se indica con **F**. Los sitios que no comparten letra son estadísticamente diferentes con una $P < 0.05$.

El análisis de varianza multivariado (AMOVA) resultó significativo con una ($F = 8.11$, $P < 0.0001$). Mediante las pruebas pareadas de Tukey encontramos diferencias significativas para cada cultivo dependiendo de los distintos atributos analizados. En el caso del ancho de la célula vegetativa, sólo Pozas Azules resultó completamente distinto al resto de los cultivos, ya que la isla de Heron y Askö resultaron ser similares entre si y los dos cultivo de la colección Pasteur también entre ellos, mientras que Zanzíbar es intermedio entre los dos grupos anteriores (Fig. 3). Los promedios de ancho de vaina y filamento se agruparon para el caso de los cultivos de Zanzíbar, PCC7504 y PCC7103; dejando por fuera a Pozas Azules que en los dos atributos resultó significativamente diferente al grupo, los cultivos de Askö y Heron presentaron similitud para el ancho de vaina, pero son diferentes entre si y al resto para el ancho de filamento. Los promedios del ancho del heterocisto resultaron ser similares entre si, así como para el número de carboxisomas, siendo PCC7504 el único cultivo estadísticamente diferente ($P < 0.05$). Estos resultados con ilustrados en la Figura 3.

III. 2 Análisis Filogenético

III.2.1 Filogenia

De la librería de 24 clonas del cultivo se Zanzíbar, no se lograron obtener secuencias del género *Calothrix*, aunque se podían identificar filamentos similares con microscopía. Al analizar un fragmento de 500 pb (ver Métodos), por medio de la herramienta BLAST, las secuencias más parecidas fueron siempre de *Phormidium* y *Lyngbya*. Lo cual fue verificado con una segunda librería (48 clonas).

Se obtuvieron un total de 43 secuencias, de las cuales 11 son del cultivo PCC7103, 4 de Askö, 8 de PCC7504, 18 de Pozas Azules y dos de la Isla de Heron. En la Tabla 4 se muestran las secuencias más parecidas, al compararlas con las secuencias de la basa de datos de 16S rRNA de Greengenes (<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>).

Tabla 3. Secuencia más parecida de la base de datos del *16S rRNA*

Sitio	Secuencia más parecida	No. de acceso*
PCC7103	<i>Calothrix sp.</i> cepa PCC 7103 (Sihvonen et al.2007)	AM230700
	<i>Calothrix sp.</i> cepa. BECID16 (Sihvonen et al.2007)	AM230682
Askö	<i>Calothrix sp.</i> cepa BECID16 (Sihvonen et al.2007)	AM230682
	<i>Calothrix sp.</i> cepa. UKK3412 (Sihvonen et al.2007)	AM230681
PCC7504	<i>Tolypothrix sp.</i> cepa. PCC 7504 (Sihvonen et al.2006)	AM230669
	<i>Tolypothrix sp.</i> cepa TOL328 ((Sihvonen et al.2006)	AM230706
Pozas Azules	<i>Rivularia atra</i> BIR MGR1 str. BIRMGR1 (Sihvonen et al.2007)	AM230675
	<i>Calothrix sp.</i> ANT.PROGRESS2.4 (Taton et al.2006)	AY493597
Isla de Heron	<i>Rivularia atra</i> BIR MGR1 str. BIRMGR1 (Sihvonen et al.2007)	AM230675
	<i>Rivularia sp.</i> cepa. PCC 7116 (Sihvonen et al.2007)	AM230677

*El porcentaje de identidad se muestra en la figura 4.

Las topologías de los árboles filogenéticos generados por los métodos de Neighbor-Joining (Kimura-2 parámetros), Máxima Verosimilitud (ML) y Máxima Parsimonia (MP) resultaron muy parecidas, por lo que se decidió reportar los valores tanto de NJ como de MP en el árbol de ML.

En la genealogía (Fig. 3) se distinguen 4 grupos: el clado I constituido por los géneros *Synechococcus* (AP008231, BX56969), *Prochlorococcus* (AF115268, AE017126), *Phormidium* (AY493585); el grupo II, dividido en tres subgrupos: 1) las secuencias de Isla de Heron, 2) una secuencia de *Rivularia* y 3) dos secuencias del género *Rivularia* (AM230675 y AM230665) agrupadas junto con la secuencia de *Calothrix* (AY493597) que resultó ser la segunda secuencia más parecida a las secuencias de Pozas Azules; el clado III, esta conformado por secuencias de distintos géneros, que se pueden agrupar en 5 subgrupos: 1) *Trichormus* (AJ630455); 2) Espinos (proveniente de un estromatolito, Michoacán; México), *Anabaena* (DQ023200), *Nodularia* (AJ133177); 3) *Gloetrichia* (AM230703, AM230704); 4) *Anabaena* (AY584512, AY584512), *Nostoc* (AB113665, AY742473, BA000019) y *Tolypothrix* (AB093486); 5) ocho secuencias del cultivo PCC7504, *Tolypothrix* (AM230669) y *Calothrix* AB074504; el grupo IV está constituido por las secuencias del cultivo PCC7103 y la secuencia reportada de la cepa (Sihvonen et al.2007). Las cuatro secuencias del cultivo de

Askö conforman un grupo separado, cuyo grupo más cercano es de secuencias de *Calothrix* (AM230683, AM230681 y AM230682). A excepción de las secuencias de *Calothrix* AB074504 y *Calothrix* AY493597, todas las secuencias de este género se agruparon dentro del mismo clado.

Para resolver la topología del grupo III, se generó un árbol de distancia NJ (K2P), en donde incluimos cinco secuencias de *Calothrix* (AM230695, AM230689, AM230682, AM230683 y AM230700), todas las secuencias del grupo III, las secuencias de las bandas de DGGE reportadas por Bauer (2007) (DQ072874, DQ072873 y DQ072872), las secuencias de *Lyngbya* (PCC81069 y *Phormidium* (AY575933) como grupo externo y, una secuencia más de *Calothrix* (AY147030), en base a la cual se definió la identidad de *Calothrix* AY493597 (ver Figura 4B).

El análisis filogenético anterior nos permitió verificar que efectivamente las secuencias del género *Calothrix* (bootstrap del 100%) conforman un linaje separado de *Rivularia* y que al parecer es un grupo monofilético dentro de las cianobacterias. Las secuencias de la Isla de Heron resultaron ser iguales entre ellas y a la secuencia DQ72872, pero esta vez la secuencia basal es una *Rivularia*, por lo cual sugerimos que, la cianobacteria filamentosa que se observó en el cultivo de pertenece al género *Rivularia* y no a *Calothrix*. Las secuencias parciales de *16S rRNA* (DQ072874, DQ072873) no presentaron similitud al género *Rivularia*, ya que siguen separadas por distancias muy largas. Cabe aclarar que se generó este segundo árbol, en un intento por determinar la relación de las clonas de Pozas Azules con el género *Rivularia*, y ya que Bauer (2007) sugirió que posiblemente sus secuencias perteneciesen a este grupo, nosotros decidimos verificar su hipótesis, ya que además el cultivo de la Isla de Heron se aisló de las muestras de Bauer.

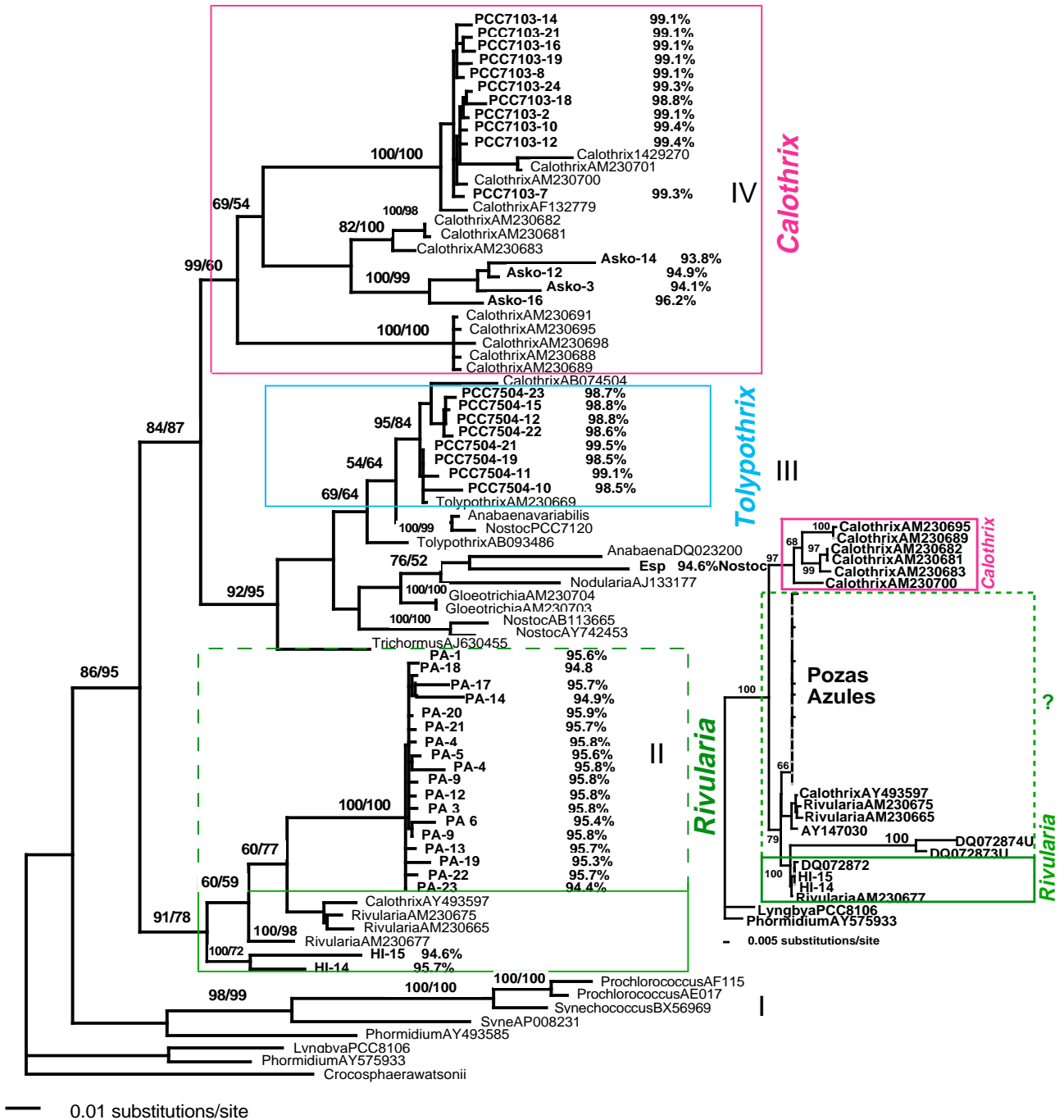


Figura 4. Las secuencias generadas en este estudio se muestran en negritas y los valores contiguos representan el porcentaje de similitud al género indicado por el recuadro. La línea punteada representa que son grupos parecidos a *Rivularia*. **A.** Árbol filogenético inferido a partir de secuencias (1299 pb) del gen *16S rRNA* mediante Máxima Verosimilitud (ML). Los valores de Bootstrap determinados por 1000 réplica para NJ/MP se muestran en los nodos. **B.** Árbol filogenético inferido de la secuencia del gen *16S rRNA* (290 pb) mediante Neighbor-Joining (Kimura 2-parámetros). Valores de Bootstrap determinados por 500 réplicas.

III.2.2 Análisis de diversidad nucleotídica y prueba de selección

Los estimados de diversidad se presentan en la Tabla 5, junto con la prueba de neutralidad. Todas las poblaciones presentaron valores similares de diversidad haplotípica (0.972-1) y la diversidad nucleotídica fue similar para las poblaciones de PCC7103, Pozas Azules y PCC7504 (0.00679-0.00849) y un poco mayor para las dos poblaciones con una N pequeña (Askö y Isla Heron). Todos los estimados de la prueba de Tajima (D) resultaron ser negativos, lo cual nos sugiere selección purificadora. Dicha prueba de neutralidad resultó estadísticamente no significativa para todas las poblaciones, excepto para Pozas Azules ($p < 0.01$).

Tabla 4. Estimados de diversidad genética y prueba de neutralidad del gen *16S rRNA* (1299pb) de cinco poblaciones.

Población	N	No. de haplotipos	H	Sitios segregantes	π	Θ	Prueba de Tajima (D)
PCC7504	9	8	0.972± 0.064	33	0.00842 ± 0.00158	0.00949	-0.56557
PCC7103	12	12	1 ± 0.034	41	0.00679 ± 0.034	0.01089	-1.71955
Askö	4	4	1 ± 0.177	87	0.03539 ± 0.00804	0.0379	-0.62001
Isla Heron	2	2	1 ± 0.5	50	0.03900 ± 0.0195	0.039	-----
Pozas Azules	18	18	1 ± 0.019	82	0.00849 ± 0.00158	0.01923	-2.33654*

Para el estimado de Tajima $P < 0.05$ y * indica que es estadísticamente significativo.

IV. DISCUSION

IV.1 Morfología

Los análisis morfológicos nos indican que hay variación dentro y entre cada uno de los cultivos en cuanto a tamaño, estructura y número de carboxisomas. Sin embargo, dicha variación no se puede relacionar directamente con patrones de ancestría-descendencia, sino quizá a una serie de factores que ejercen presiones sobre las estructuras de cada filamento. Con lo anterior no me refiero a que no exista variación a nivel genotípico, sino simplemente que la diversidad observada a nivel fenotípico y genotípico que encontramos no se puede correlacionar.

Quizá el único caso en el cual podría correlacionarse es el del cultivo PCC7504, que presentó una diferencia significativa al resto de los cultivos en el número de carboxisomas. Dicho grupo es el único que pertenece al género *Tolypothrix*, y que al presentar falsas ramificaciones de los filamentos (Jeeji-Bai, 1976) es fácil separar de la morfología *Calothrix*. Sin embargo, en nuestro cultivo este fenómeno no se presentó y no hay evidencia suficiente que nos permita separar este grupo a nivel morfológico. En el caso del cultivo de Pozas Azules, encontramos una clara diferenciación en cuanto al ancho de filamento y de vaina, que también se hizo evidente a nivel genotípico, en donde todas las secuencias de Pozas Azules se separaron del género *Rivularia*, constituyendo posiblemente un nuevo grupo.

La vaina, siendo una cubierta extracelular constituida principalmente por polisacáridos y pigmentos, proporciona resistencia y defensa a condiciones de desecación, radiación, depredación y radiación UV (Castenholz et al. 2000; Phoenix et al. 2002). La cubierta externa de los filamentos de Pozas Azules, los protege de la depredación ocasionada por la carencia de nutrientes de este cuerpo de agua, desafortunadamente no se cuenta con información sobre el sitio de muestreo del cultivo de Askö, pero sería interesante analizar qué condiciones ambientales comparten, este y Pozas Azules, que promuevan el desarrollo de vainas gruesas. Al principio de este estudio los filamentos estaban rodeados de una vaina mucilaginosa muy gruesa. Incluso fue imposible tomar una fotografía clara de un filamento de Pozas azules en septiembre del 2006, pero el grosor de la vaina se ha ido perdiendo. Se sabe que la presencia

de vaina en las cianobacterias cultivadas puede llegar a perderse (Ward y Castenholz, 2000). Cultivos descritos por García-Pichel et al. (1996), que poseían vainas, las perdieron después de dos años en laboratorio.

Se observó que la metodología para hacer observaciones en microscopía electrónica ocasiona una subestimación del número real de estas estructuras, ya que en muchos casos los carboxisomas se revientan y aparecen en las microfotografías como huecos en las células. No se observó que hubiera una variación en la compactación de las inclusiones intracelulares. *En Trichodesmium*, debido a las vesículas de gas, se observa una diferenciación de la compactación entre filamentos con mayor y menor número de vesículas (Siddiqui et al. 1992). *Calothrix*, al ser bentónica, no presenta vesículas de gas, por lo que no es raro no observar diferencias a este nivel.

La identificación de ficobiliproteínas, ficoeritrinas y ficocianinas asociadas a la membrana requiere de análisis inmunocitoquímicos (Siddiqui et al. 1992) que en este estudio no se realizaron.

Los seis cultivos provienen de sitios distintos: tres provienen de la región nórdica del Mar Báltico en donde las temperaturas oscilan considerablemente (Sihvonen et al. 2007), otro proviene de un ecosistema tropical (Zanzíbar), en donde la temperatura promedio es de 33.5°C; el cultivo de la isla Heron se mantiene a una temperatura de 23 °C bajo ciclos de marea al alta y baja, ya que es una zona intermareal en donde encontramos las formaciones de tapices microbianos de donde se extrajo la muestra (Bauer, 2007) y por último; Pozas Azules es un ecosistema acuático oligotrófico con una temperatura que oscila entre los 18°C y 35° (Beltrán, 2007). Las diferencias anteriores se ven reflejadas en la variación que encontramos, sin embargo, es necesario analizar los cultivos desde un enfoque ecológico para tratar de dilucidar que interacciones ambientales generan la morfología del filamento.

Los resultados indican que las características morfológicas no proporcionan suficiente evidencia para identificar cepas del género *Calothrix* y discernir entre las que no pertenecen a este grupo, aunque si nos permiten identificar diferencias significativas. Fiore et al. (2007) encuentran que a nivel ultraestructural el género *Brasilonema* es similar al género *Scytonematacean* y a otros tipos de filamentosas, pero los resultados del análisis molecular mediante el gen *16S rRNA*, demuestran que se trata de un grupo separado. La identificación de cepas basada únicamente en la morfología es imprecisa, ya que muchos de los caracteres

analizados varían en función de las condiciones ambientales y del tiempo, donde las cepas han sido cultivadas (Sinclair et al. 1977; Rippka et al. 2001) .

IV.2 Análisis filogenético

IV.2.1 Filogenia

A pesar de que en el cultivo de Zanzibar se observan cianobacterias que encajan perfectamente dentro del perfil de *Calothrix*, no se logró obtener una secuencia de este grupo. Sigler (2003) reporta que, aunque observó filamentos del *Calothrix* en una preparación en el microscopio óptico, los análisis moleculares realizados para determinar la diversidad de la misma comunidad, no detectan la presencia del género. Por otro lado, en estudios moleculares de comunidades bacterianas, la presencia de *Calothrix* no se percibe o se subestima, ya que es difícil extraer ADN de cepas de este género, debido a la capa de mucopolisacáridos que constituye la vaina que envuelve los filamentos (Sihvonen et al .2007; García-Pichel et al. 2001). Una evaluación de la diversidad realizada por medio de electroforesis de un gel desnaturizante por gradiente, DGGE (por sus siglas en inglés) revela que la comunidad de la Isla de Paje (Zanzíbar), está constituida por cianobacterias de los géneros como *Cyanothece*, *Gloeocapsa*, *Chroococaceae*, *Spirulina*, *Leptolyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium* y *Lyngbya* (Bauer, 2007), pero no de *Calothrix*. Para evitar conclusiones erróneas sobre la presencia de *Calothrix* o de un género (morfológicamente) similar en la Isla de Paje (Zanzíbar), es necesario generar nuevos métodos de extracción de ADN, que nos permitan verificar si las observaciones morfológicas son acertadas.

Honda et al. (1998) proponen siete grandes linajes para el grupo de las cianobacterias, en donde grupos como *Nostoc* y *Phormidium* demuestran relaciones monofiléticas dentro de las cianobacterias, sin embargo, los géneros *Leptolyngbya* y *Synechococcus* se distribuyen a través de varias ramas, conformando así grupos polifiléticos. Papke et al. (2003) encontraron que el aislamiento geográfico juega un papel importante en los patrones filogenéticos y de distribución de las cianobacterias, sin embargo, muchos linajes de este grupo presentan

relaciones evolutivas inciertas. Lo mismo sucede con las secuencias de diversos géneros, incluidas en nuestro análisis filogenético.

Una vez más, la monofilia de las cianobacterias formadoras de heterocistos se ve reflejada en este análisis, aunque no fuera nuestro intento probarlo, ya que estamos conscientes de que secuencias de cada uno de los géneros de cianobacterias que se conocen tendrían que incluirse. Todas las secuencias de las cianobacterias con heterocistos conforman un grupo monofilético soportado por un valor de bootstrap de 89%. La monofilia se ha probado ya en muchas ocasiones y no sólo con el gen *16S rRNA*, sino también con genes como *hetR* (gen involucrado en la diferenciación de los heterocistos) y *nifH* (gen de una de las subunidades de la nitrogenasa) (Honda et al. 1998; Tomitani et al. 2006; Marquardt, 2007). Lo anterior soporta la posibilidad de empezar a datar tiempos de divergencia entre cianobacterias de este grupo, para comenzar líneas de investigación que permitan entender patrones de divergencia de otros miembros del dominio Bacteria.

Dentro del grupo III encontramos todas las secuencias del cultivo PC7504, junto a la secuencia ya reportada de dicha cepa. Otros géneros se encuentran representados y demuestran, al igual que las secuencias anteriores, una topología congruente con resultados de estudios anteriormente publicados (Rajaniemi et al. 2005; Taton et al. 2006; Sihvonen et al. 2007).

A pesar de que se esperaba que las secuencias de Pozas Azules y Heron se agruparan dentro del clado *Calothrix*, ya que los filamentos habían sido clasificados dentro de este grupo, resultó que éstas constituyen un clado separado y que, además existe mayor similitud con el género *Rivularia*. Los porcentajes de similitud obtenido por BLAST, de las secuencias de Pozas Azules son menores al 97%, consistente con la topología del árbol, ya que si bien se encuentran dentro del grupo de las secuencias de *Rivularia*, representan un linaje aparte (bootstrap 100%). Dos secuencias de *Rivularia* y una de *Calothrix* constituyen el grupo hermano al clado de Pozas Azules. Las secuencias de la Isla de Heron se agrupan entre ellas y se relacionan distantemente con *Rivularia* (AM230677), por lo que proponemos que el cultivo de la Isla de Heron, que había sido previamente caracterizado como *Calothrix*, pertenece en realidad al género *Rivularia*. Para determinar si efectivamente el cultivo de la Isla de Heron, se trata de filamentosas del género *Rivularia*, se buscaron más secuencias de dicho género. Sin embargo, encontramos que sólo hay ocho secuencias publicadas de *Rivularia* y que

además, han sido generadas en el mismo estudio (Sihvonen et al. 2007) que se llevó a cabo con cepas organismos provenientes del Báltico, por lo tanto todas son muy similares y no proporcionan una mejor resolución.

Estudios morfológicos y moleculares demostraron la presencia del género *Calothrix* en una comunidad epifítica de cianobacterias en la Isla de Heron (Bauer et al. 2007). En base a claves taxonómicas se propuso la presencia de al menos dos especies de *Calothrix* y además, una secuencia parcial del gen 16S rRNA seleccionada a partir de bandas de DGGE, presentó mayor similitud a *Calothrix* AY147030. Adicionalmente se encontraron dos secuencias parciales (DQ072874, DQ072873) que se agruparon dentro del mismo clado.

Las secuencias parciales (290 pb) de 16S rRNA (DQ072874, DQ072873), se incluyeron en nuestro estudio, en un intento de clarificar su relación con el género *Calothrix*, y corroborar la hipótesis de Bauer (2007), en donde propone que pueden pertenecer al género *Rivularia* o *Kyrtuthrix*. Sin embargo, en nuestra inferencia filogenética no presentan similitud a este género, ya que las secuencias siguen separándose por ramas mucho más largas, conformando un clado muy distinto. Existen varias posibilidades: 1) que represente secuencias del género *Kyrtuthrix*, 2) de un género nuevo o, 3) que simplemente se trate de un error de secuenciación, al provenir de una banda de DGGE.

El utilizar un fragmento tan pequeño del gen *16S rRNA* (290 pb) lleva a una pérdida de información ya que todas las secuencias de Pozas Azules parecen ser exactamente iguales, a diferencia de lo que observamos con la filogenia generada con el fragmento de 1299 pb, en donde a pesar de no observar una gran diversidad, es evidente que no son cultivos clonales.

Taton et al. (2006) reportaron la presencia de *Calothrix* sp. ANT.LPR (AY493597) en un lago en la Antártica, al obtener un grado de similitud de un 98.3% con una secuencia de "*Calothrix* sp. CCMEE5085" (AY147030) de un tapiz microbiano del parque nacional de Yellowstone, USA. Esto es, "*Calothrix* ANT.LPR" (AY493597) se definió por su similitud a "*Calothrix* sp. CCMEE5085" (AY147030). De acuerdo con Komárek y Agnostiddis (1989), cerca del 50% de las cepas de cianobacterias disponibles en colecciones han sido mal identificadas. La similitud filogenética que encontramos entre las dos secuencias de "*Calothrix*" (AY493597 y AY147030) y las dos de *Rivularia* (AM230675 y AM230665) nos permite proponer que *Calothrix* sp. CCMEE 5085 (AY147030) fue definida incorrectamente y, subsecuentemente *Calothrix* sp. ANT.LPR (AY493597), cuando en realidad pertenecen al

grupo *Rivularia*. Lo mismo ocurre con el cultivo de Pozas Azules, cuya morfología es típica del género *Calothrix*. Falcón et al. (2007) encontró que la única secuencia de *nifH* compartida por los sitios estudiados, Churince y Poza Azul, presentó mayor similitud a una secuencia nombrada como *Calothrix sp.* (U73130) proveniente de la misma cepa de Yellowstone CCMEE (Zehr et al. 1996). Poza Azul y Churince, son sitios que pertenecen al Valle de CCC, por lo que, aunado además a la evidencia morfológica del parecido a *Calothrix* se esperaba entonces, que las secuencias de Pozas Azules se agruparan dentro del clado *Calothrix*, sin embargo presentaron mayor similitud al género *Rivularia*. Por consiguiente se propone que: 1) las cianobacterias del cultivo de Pozas Azules podrían pertenecer al género *Rivularia* o un grupo hermano que se ha separado y, 2) que las secuencias *Calothrix* AY493597 y *Calothrix* AY147030, provenientes de Yellowstone, han sido identificadas como *Calothrix* cuando en realidad pertenecen al género *Rivularia*. Debe hacerse una revisión a fondo, para verificar la identidad de la cepa *Calothrix sp.* CCMEE 5085 (AY147030).

Los géneros *Calothrix* y *Rivularia* pertenecen a las cianobacterias formadoras de heterocistos, clado monofilético y consistente en todos los análisis evolutivos. Sin embargo, las relaciones evolutivas entre ellas no están propiamente definidas (Sihvonen et al. 2007). Las diferencias más importantes entre los géneros anteriormente mencionados son los requerimientos altos de sales de *Rivularia* y la diferenciación de acinetos de *Calothrix*, por lo que es muy difícil establecer caracteres que permitan diferenciarlos morfológicamente de manera correcta. Además, la identificación de cepas basada solamente en caracteres morfológicos, es imprecisa para muchos organismos, ya que muchas de sus características se ven afectadas por condiciones ambientales y en ocasiones se pierden en condiciones de laboratorio.

Cuatro Ciénegas es un valle en el desierto Chihuahuense en el cual encontramos un ecosistema acuático. En sus orígenes la región estaba sumergida en el fondo del océano, pero en el Cretácico un proceso de elevación se llevó a cabo, ocasionando que especies propias de marismas y zonas costeras quedaran aisladas. Una vez elevado el terreno sobre el nivel costero, se incrementó el aislamiento físico de los organismos presentes, dicha separación generó un aislamiento genético que finalmente se reflejó en procesos de extinción y especiación (Contreras, 2004). Es por eso que en el valle de Cuatro Ciénegas habitan una gran cantidad de especies endémicas (Espinosa, 2006). No es entonces sorprendente, que al igual

que encontramos géneros endémicos de crustáceos y moluscos, que posiblemente tengamos en los estromatolitos de Pozas Azules, a un género de cianobacterias con heterocistos endémico. Otros análisis de diversidad molecular de comunidades microbianas de CCC (Falcón et al. 2007) indican que los grupos ahí presentes tienen afinidad filogenética con otros organismos, pero muestran distancias importantes, lo cual refleja el aislamiento del Valle.

La topología del árbol nos sugiere que el género *Calothrix* es un grupo monofilético de cianobacterias y que los géneros *Calothrix*, *Rivularia* y *Tolypothrix* presentan un morfotipo similar pero genéticamente forman grupos muy distintos (Sihvonen et al. 2007). *Calothrix brevísima* se ha utilizado como objeto de estudio para analizar procesos fisiológicos (Pandey et al. 2004; Pandey, 2006) pero ningún estudio se enfoca al área evolutiva. Además, la secuencia se depositó en la base de datos del Gen Bank, pero el artículo no se publicó. Estudios más detallados serán necesarios para clarificar la presencia de *Calothrix* en un grupo tan distinto.

El análisis filogenético agrupó a los seis cultivos dentro de tres género: *Calothrix*, *Tolypothrix* y *Rivularia*. Por otro lado, ninguna característica morfológica nos permitió generar grupos para clasificar los cultivos. El número de carboxisomas del cultivo del Báltico (PCC7504), fue el único parámetro que presentó una diferencia significativa ($p > 0.05$) al resto del grupo, pero al no haber ningún otro cultivo del género *Tolypothrix* y al no separarse los otros cultivos, no hay evidencia que nos indique que este parámetro es una característica clave para separar este género del resto.

Es clara la necesidad de generar estudios moleculares, para analizar la diversidad y las relaciones evolutivas entre el grupo de las cianobacterias. La secuenciación de genes completos será un primer paso para entender patrones de diversificación, integrando información de los distintos niveles de organización (orden, género y especie). Las técnicas para cultivar cianobacterias han ido mejorando y conforme se avanza en estudios ecológicos, se han podido desarrollar mejores medios para seleccionar al organismo que queremos cultivar. Sin embargo, hay condiciones como la irradiación de rayos UV y concentraciones salinas, que no son fáciles de reproducirse en laboratorio.

Las cianobacterias son un grupo bacteriano recientemente estudiado y actualmente grandes grupos de investigación enfocados al estudio de este linaje, se encuentran trabajando alrededor del Mar Báltico, lo que ha generado que se encuentren disponibles muchas

secuencias provenientes de ésta región geográfica segando la apreciación de la diversidad de géneros como *Calothrix*.

El estudio de la diversidad cianobacteriana basada en la utilización de cultivos tipo como referencia para la identificación de cepas (tradicón taxonómica), ha permitido la disponibilidad de cultivos axénicos. Aunque la investigación de la diversidad, a partir de secuencias obtenidas de comunidades bacterianas, confirman que los cultivos tipo representan sólo una pequeña fracción de la diversidad total (Golubic, 1999), los cultivos nos han dado la oportunidad de encontrar nuevos organismos que habíamos descartado por sesgos metodológicos (extracción de ADN, etc.).

El aislamiento y caracterización de cepas de cianobacterias de diversos biotipos, es muy importante para el estudio de la diversidad cianobacteriana. Incluso ahora cuando numerosas técnicas cultivo-independientes se han generado y la biología molecular está produciendo miles de secuencias, las observaciones morfológicas proveen un enfoque integral entre las características fenotípicas y genotípicas, que además nos permite entender mejor la fisiología y ecología de las cianobacterias (Taton et al. 2005).

IV.2.2 Análisis de diversidad nucleotídica

Durante siglos hemos sido conscientes de la variación que existe entre individuos (Hedrick, 1999) y que ésta es esencial para que la selección como fuerza evolutiva, actúe sobre las poblaciones. A partir de la generación de estudios de genética de poblaciones a nivel molecular, se evidenció que existe una gran variación contenida en los genes (Castillo, 2007). Y a pesar de que hasta hace algunos años se creía que las bacterias eran completamente clonales, ahora se sabe que la diversidad en poblaciones bacterianas existe. Maynard et al. (1993) muestran que la estructura poblacional de las bacterias puede ser desde completamente clonal hasta panmítica. En el caso de las cianobacterias, se sabe que existe recombinación y que además, esto les confiere una gran capacidad para reparar daños en el ADN generados por radiaciones UV (Cohen y Gurevitz, 1998).

Nosotros encontramos una gran diversidad dentro de cada uno de nuestros cultivos y también que ésta, ha sido moldeada por una selección purificadora que elimina variación

detrimental. Lo anterior, resulta lógico si recordamos que el RNA ribosomal es esencial para la supervivencia de los organismos y que por lo tanto el gen que codifica para esta proteína es un marcador altamente conservado, ya que cualquier mutación puede comprometer las interacciones que se dan entre esta proteína y otras, que conforman la maquinaria de la síntesis proteica (Farely et al. 1995).

Millar et al. (2006) analizan la diversidad nucleotídica en seis diferentes genes involucrados con el metabolismo del nitrógeno, de una cianobacteria termofílica llamada *Mastigocladus laminosus*. Para la secuencia de los genes *narB* y *nifHD* (largo promedio de 2000 nucleótidos) encuentran un promedio de 7 polimorfismos, mientras que para los otros cuatro genes, los sitios polimórficos van de 3 a 0. Francioli et al. (2006) encontraron gran variación nucleotídica en genes housekeeping en *Staphylococcus aureus*, siendo de 530 el rango de sitios polimorfismos en un gradiente de 10 genes. Anteriormente se ha reportado una gran variabilidad entre colonias de *Calothrix* provenientes del Báltico, al realizar análisis de marcadores moleculares de secuencias cortas repetidas en tandem (Sihvonen et al. 2007). Por otro lado, lo que hemos observado mediante pruebas realizadas sobre secuencias depositadas en la base de datos del proyecto ribosomal, para estimar diversidad de géneros como *Calothrix*, *Rivularia* y *Tolypothrix*, son valores altos de sitios polimórficos, siendo estos de 81 sitios segregantes, 28 y 14 respectivamente. Saavedra y Peña (2005) reportan un polimorfismo nucleotídico de un fragmento del secuencia de 511 pb del gen *16S rRNA* mitocondrial con un promedio de 10 sitios segregantes. Siendo nuestros resultados comparables si se toma en cuenta que en este estudio se trabajó con un fragmento de alrededor de 1300 pb. Son mínimos los estudios que se tienen de evolución molecular de genes de cianobacterias, por lo cual es difícil contrastar información que nos permita determinar si es mucha la variación o no. Millar et al. (2006) comparan sus resultados con la diversidad encontrada en primates, lo cual me parece arriesgado y hasta incorrecto ya que son organismos que niquiera pertenecen al mismo dominio, aunque comprensible por la carencia de estudios. Por nuestra parte, al tener material para analizar, como es la alineación de secuencias de la misma especie, nos pareció importante hacer inferencias acerca de la historia evolutiva de esta especie y así, generar más información que nos permita adentrarnos al estudio evolutivo a nivel poblacional de las cianobacterias.

En genética de poblaciones, la detección de fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones, es una de las tareas más importantes (Hedrick, 1999). Bajo contexto de la teoría neutral, la prueba de Tajima es una de las más utilizadas para detectar selección natural y se basa en la relación que existe entre los estimadores de diversidad θ y π . El estimado de π se refiere a la diversidad nucleotídica, que es el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias al azar (Nei y Kumar, 2000), mientras que θ es el número de sitios segregativos en una secuencia. Los valores negativos que encontramos nos sugieren selección purificadora, sin embargo, ya que la prueba de Tajima se ve afectada por procesos demográficos (por ejemplo cuellos de botella) no es trivial la interpretación de nuestros resultados. Para el caso de Pozas Azules, la prueba de Tajima resultó ser estadísticamente significativa ($P < 0.05$), lo que sustenta aún más, que sea la selección purificadora la que está moldeando la diversidad de esta población. La diversidad que encontramos sugiere que quizá dentro de nuestros cultivos existen varias especies y no sólo una como se pensaba en un principio. Estudios posteriores serán necesarios para resolver esta pregunta.

V. CONCLUSIÓN

Las conclusiones generales de esta tesis son las siguientes:

- Los resultados de esta tesis nos demuestran una gran diversidad genotípica entre cepas de cianobacterias filamentosas, que han sido clasificadas como miembros del género *Calothrix*.
- De seis cultivos que se examinaron en esta tesis, sólo Askö y PCC7103 pertenecen al género *Calothrix*, el cultivo de Heron es de *Rivularia* y el cultivo de Pozas Azules se agrupa con las secuencias de *Rivularia*, pero representa un clado separado que es quizás un género nuevo.
- Encontramos que el género *Calothrix* es un grupo diverso y monofilético.
- Los métodos de extracción de ADNA de cianobacterias son más eficaces para ciertos grupos, siendo la vaina del filamento una estructura que dificulta la extracción.
- La taxonomía clásica nos permite observar la diversidad que se pierde por metodologías moleculares.
- El género *Tolypothrix* a pesar de ser morfológicamente muy parecido a *Calothrix*, comprende un grupo genotípico completamente aparte.
- Hace falta generar más secuencias del gen *16S rRNA* completo del género *Calothrix* y de otros género cercanos para entender mejor sus relaciones evolutivas.
- Los análisis de diversidad nucleotídica demuestran que este grupo de cianobacterias no son clonales y que además, este tipo de secuencias se encuentra bajo selección purificadora.

VI. PERSPECTIVAS

El grupo de las cianobacterias es muy importante por su diversidad, su papel ecológico y por las relaciones simbióticas que dieron paso a la evolución de organismos eucariontes fotosintéticos. Para entender la historia natural de sus orígenes y por lo tanto de los procesos ecológicos y evolutivos, es necesario tener una buena taxonomía que nos permita unir sus características fenotípicas y genotípicas. Estudios de esta índole están en la base de las preguntas que nos llevan a entender los procesos que modelan a los organismos.

Esta tesis sienta bases sólidas para generar nuevos estudios en genética de poblaciones, evolución molecular y ecología. A continuación se proponen estudios que podrían hacerse para ampliar el conocimiento de las cianobacterias:

- Hacer la descripción del género nuevo que se propone en esta tesis.
- Continuar con la caracterización molecular de cepas con morfología clásica del género *Calothrix*, para tratar de representar mejor la diversidad de este grupo en México y en el mundo.
- Realizar análisis moleculares con marcadores menos conservados, como *nifH*, *Cpcb*-*IGS* (gen para la producción de ficocianina), para tener una resolución más fina.
- Comparar la composición de cepas de cianobacterias con heterocistos en tapices microbianos, de diferentes localidades de México, para tratar de determinar los grupos que están presentes y tratar de correlacionarlo con factores ambientales, como temperatura, pH y concentración de nutrientes.
- Evaluar el papel que tiene las cianobacterias filamentosas con heterocistos en la fijación del nitrógeno en los tapices y estromatolitos.
- Sería interesante estudiar cómo se estructuran las poblaciones de *Calothrix* de diferentes sitios, es decir, generar un estudio de genética de poblaciones.
- Tratar de fechar edades de divergencia dentro de los géneros formadores de heterocistos.

VII. REFERENCIAS

- Adamer, F., Kaftan, D. & Nedbal, L. 2005. Stress-Induced filament fragmentation of *Calothrix elenkinii* (cyanobacteria) is facilitated by death of high-fluorescence cells. *J. Phycol.* 41: 835-839.
- Bauer, K. 2007. Diazotrophy and diversity of benthic cyanobacteria in tropical coastal zones. Doctoral Thesis in Plant Physiology at Stockholm University, Sweden. 48.
- Campbell, D. Houmard, J., & Marsac, N. T. 1993. Electron Transport Regulates Cellular Differentiation in the Filamentous Cyanobacteria *Calothrix*. *The Plant Cell.* 5: 451-463.
- Carpenter, E. J., Capone, D. G. & Rueter, J. G (eds). 1991. Marine Pelagic Cyanobacteria: *Trichodesmium* and other Diazotrophs. Kluwer Academic Publishers in the Netherlands. 9-28.
- Charpy, L. & Larkum, A. W. D. (1999) Marine Cyanobacteria. *Bulletin of Oceanographic Institut. Monaco.* (19): 623. Hedrick, P., W., 2000. *Genetics of Population.* Jones and Bartlett Publishers. Second edition. USA.
- Castenholz, R. W. 2001. Phylum BX. Cyanobacteria, . 473-599. En Boone, D. R, Castenholz, R. W. & Garrity, G. M. (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2nd. Ed., Vol.3. Springer, New York.
- Castillo, A. 2007. La selección Natural a Nivel Molecular. 11-48. En Eguiarte, L.E., Souza, V. & Aguirre, X. (comp). *Ecología Molecular.* México.
- Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J. Wang, Q., Kulam, S. A. Chandra, S. McGarrell, D. M. Schmidt, T. M., Garrity, G. M. & Tiedje, J. M. 2003. The ribosomal Data Base Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 31: 442-443.
- Diez, B. Bauer, K. & Bergman, B. 2007. Epilithic cyanobacteria communities of marine tropical beach rock (Heron Island, Great Barrier reef): Diversity and diazotrophy. *Appl. and Env. Microbiology,* 73. 3497-3504-
- Dillon, J. G. & Castenholz, R. W. 2003. The synthesis of the UV-screening pigment, scytonemin, and photosynthetic performance in isolates from closely related natural populations of cyanobacteria (*Calothrix sp.*). *Environ. Microbiology.* 5(6): 484-491.
- Dyer, B. D. 2003. *A Field Guide to Bacteria.* New York, USA. 355.

- Espinosa-Asuar, L. 2005. Análisis de la diversidad de procariontes usando el gen 16S rRNA: origen marino de la región de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Tesis de Maestría. Ciencias Biomédicas. UNAM. 72.
- Falcón, L.I., 2003. Unicellular Nitrogen Fixing Cyanobacterial from the Tropical North Atlantic and Subtropical North Pacific Oceans. USA. PhD Thesis. Stony brook University. 215.
- Falcón, L.I., Cerritos, R., Eguiarte, L. E. & Souza, V. 2007. Nitrogen Fixation in Microbial Mat and Stromatolite Communities from Cuatro Cienegas, Mexico. *Microbial Ecology*.
- Fiore, M. F., Sant'Anna, C. L., Azevedo, M. T. P. Komárek, J., Kaštovský, J., Sulek. & Sturion-Lorenzi, A. 2007. The cyanobacterial genus *Brasilonema*, Gen. Nov., a molecular and phenotypic evaluation. *J. Phycol.* 43:789-798.
- Johannesson, K. H., Cortés, A. & Kilroy, K. C. 2004. Reconnaissance isotopic and hydrochemical study of Cuatro Ciénegas groundwater, Coahuila, México. *J. of South American Earth Sciences.* 17:171-180
- Hall. T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids, Symp. Ser.* 41: 95-98.
- Hedrick, P., W., (2000) *Genetics of Population*. Jones and Bartlett Publishers. Second edition. USA
- Honda, D., Yokota, A. & Sugiyama, J. 1998. Detection of seven major evolutionary lineages in cyanobacteria based on the 16S rRNA gene sequence analysis with new sequence of five marine *Synechococcus* strains. *J. Mol Evol.* 48:723-739.
- Komárek. J. & Hauer. T. 2004. CyanoDB.cz –Online Data Base of cyanobacterial genera-
<http://www.cyanodb.cz>
- Lane, D. J. 1991. 16s/23S rDNA sequencing. *Nucleotic acids techniques*, p. 115-175. En Strackebrant, E. & Godfellow (ed). *Bacterial Systematics*. John Willey and Sons, New York, NY.
- Lugomela, C., Bergman, B. & Waterbury, J. 2002. Cyanobacterial diversity and nitrogen fixation in coastal areas around Zanzibar, Tanzania.
- Madigan, M., Martinko, J., M. & Parker, J., 2000. Brock. *Biology of Microorganisms*. Editorial Prentice Hall, 9th. edition. USA.
- Marquardt, J., Palinka, K., A. 2006. Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. *Arch Microbiol* 187:397413.

- Maynard-Smith, J., Smith, N. H., O'Rourke, M. & Spratt, B. G. 1993. How clonal are bacteria?. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 4384-4388.
- Mazard, S. L., Fuller NJ, Orcutt KM, Bridle O, Scanlan DJ. 2004. PCR analysis of the distribution of unicellular cyanobacterial diazotrophs in the Arabian Sea. *Appl Environmental Microbiol.* 70(12):7355-64.
- Miller, S. R., Purugganan, M. D., & Curtis, S. E. 2006. Molecular Population genetics and Phenotypic Diversification of Two Populations of the thermophilic Cyanobacterium *Mastigocladus laminosus*. *Appl Environmental Microbiol.* 72: 2793-2800.
- Nei, M. & Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nübel, U., García-Pichel, F. & Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA. *Genes from Cyanobacteria. Appl. Env. Microb.* 63 (8): 3327-3332.
- Papke, R. T., Ramsing, N. B., Bateson, M. M. & Ward, D. M. 2003. Geographical isolation in hot spring cyanobacteria. *Environmental Microbiology.* 5(8): 650-659.
- Phoenix, V. R., Martinez, R. E., Konhauser, K. O. & Ferris, F. G. 2002. Characterization and Implications of the Cell Surface Reactivity of *Calothrix sp.* Strain KC97. *Appl. and Env. Microbiology.* 4827-4834.
- Rai, A. N., Bergman, B. & Rasmussen, U. (eds) 2004. *Cyanobacteria in Symbiosis*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 355.
- Rajaniem, P., Hrouzek, P., Kaštovská, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffman, L., Komárek, J. & Sivonen, K. 2005. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *IJSEM.* 55: 11-26.
- Rasheed, M., Wild, C., Franke, U. & Huettel, M. 2003. Benthic photosynthesis and oxygen consumption in permeable carbonate sediments at Heron Island, Great Barrier Reef, Australia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 59: 139-150.
- Rocap, G., Moore, L.R. & Chisholm, S. W. 1999. Molecular phylogeny of *Prochlorococcus* ecotypes. *Bulletin of Oceanographic Institut. Monaco.* 19: 107-115.
- Rossello-Mora, R. & Amann, R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS. Microbiology Reviews.* 25:39-67.
- Rozas, J., Sánchez, J. C., Del-Barrio, X., Rozas, R., (2003). DnaSP, DNA Polymorphism analysis by the coalescent and other methods. Versión 4.10.4. Universidad de Barcelona.

- Saavedra, C. & Peña, J. B. 2005. Nucleotide diversity and Pleistocene population expansion in Atlantic and Mediterranean scallops (*Pecten maximus* and *P. Jacobaeus*) as revealed by the mitochondrial 16S ribosomal RNA gene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 323:138-150.
- Sihvonen, L., M. Lyra, C., Fewer, P., Rajaniemi-Wacklin, P., Lehtimäki, J. M., Wahlsten, M., Sivonen, K. (2007) strains of the cyanobacterial genera *Calothrix* and *Rivularia* isolated from Baltic Sea display cryptic diversity and are distantly related to *Gloeotrichia* and *Tolypothrix*. *FEMS. Microbial Ecol.* Vol: 61. 74-84.
- Silva, S. M. F. & Peinar, R. N. 2000. Benthic Marine Cyanophyceae from Kwa-Zulu Natal, South Africa. 456.
- Sinclair, C. & Whitton, B. A. 1997. Influence of nitrogen source on morphology of Rivulariaceae (Cyanophyta). *J. Phycol.* 13 (4): 335-340.
- Sivonen, K., Halinen, K., Sihvonen, L. M., Koskenniemi, K., Sinkko, H., Rantasärkkä, K., Moisander, P. H. & Lyra, C. 2007. Bacterial Diversity and Function in the Baltic Sea an Emphasis on Cyanobacteria. *Ambio*. Vol. 36. 2-3: 180-185.
- Souza, V., Espinosa-Asuar, L., Escalante, A., E., Eguiarte, L. E., farmer, J., Forney, L., lloret, L., Rodríguez-martínez, J. M., Soberon, X., Dirzo., Elser, J. J., (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahua desert. *PNAS*. 103 (17): 6565-6570.
- Taton, A., Grubisic, S., Ertz, D., Hodgson, D. A., Piccardi, R., Biondi, N. Tredici, M. R., Mainini, M., Losi, D., Marinelli, F. & Wilmotte, A. 2006. Polyphasic study of antarctic cyanobacteria strains. *J. Phycol.* 42: 1257-1270.
- Tomitani, A., Knoll, A. H. Cavanaugh, C. M. & Ohno, T. 2006. The evolutionary diversification of cyanobacteria: Molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *PNAS*. Vol. 103. 14:5442-5447.
- Waterbury, J. B. 1991. The cyanobacteria: isolation, purification and identification. *The Prokaryotes*. Vol. II- Springer-Verlag, New York, 4770.
- Ward, D. M. 1998. A natural species concept for prokaryotes. *Current Biology in Microbiology*. 1:271-277.
- Whitton, B. A. & Potts, M. (eds). 2000. *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 669.
- Willame, R., Boutte, C., Grubisic, S., Wilmotte, A., Komárek, J. & Hoffmann, L. 2006. Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *J. Phycol.* 42:1312-1232.

- Yeager, C. M., Kornosky, J. L., Morgan, R. E., Cain, E. C., García-Pichel, F., Housman, D. C., Belnap, J. & Kuske, C. 2007. Three distinct clades of cultured heterocystous cyanobacteria constitute the dominant N₂-fixing members of biological soil crusts of the Colorado Plateau, USA. *FEMS Microbiol Ecol.* 60: 85-97.
- Zehr, J. P., Mellon, M. T. & Hiorns, W. D. 1997. Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. *Microbiology.* 143: 1443-1450.

VIII. Apéndices

Apéndice I. Medios de cultivo

Medio SO (Falcón, 2003)

Minerales	ml de solución stock para añadir	solución stock (gramos por mililitros)	Concentración final (μM)
EDTA	5	1	13.4
K_2HPO_4	2.5	6.1	224.1
$\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-H}_2\text{O}$	2.5	4	94.3
Metales traza de 1 cianobacteria			
$\text{ZnSO}_4\text{-}7\text{H}_2\text{O}$		0.222	0.7
$\text{MnCl}_2\text{-}4\text{H}_2\text{O}$		1.4	14.7
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2\text{-H}_2\text{O}$		0.025	85.9nM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\text{-}2\text{H}_2\text{O}$		0.390	1.6
Ácido cítrico- H_2O		6.25	32.5
Citrato férrico amonio		6	22.9

Añadir 750mL de agua de mar filtrada y autoclaveada. Aforar a 1mL con agua bidestilada.

Medio Bg 11 (Allen, 1968 modificado)

K_2HPO_4	0.04gr
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.075g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.036g
Ácido Citrico	0.006g
$NaCO_3$	0.02g
EDTA(stock SO)	1.800mL
Metales Traza (stock SO)	1mL

Aforar con agua destilada a 1L

pH 7.1

Medio Z8 (Kotai, 1972)

Preparar stock de las siguientes soluciones (1L)

Z8IV

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.37g

Z8II

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.41g
Na_2CO_3	0.21g

Z8III

Solución Fe

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.28g (disolver en 10mL de HCl 0.1M)

Solución EDTA

EDTA 0.39g (disolver en 10mL de NaOH 0.1M)

Añadir 1mL de la solución Fe y 0.95 mL de la solución EDTA. Aforar a 1L.

Z8salina

NaCl 8.75g

MgSO₄.7H₂O 3.75g

Agregar 10mL de cada stock y aforar a 1L

Apéndice II. Microscopía electrónica de transmisión

Fijación

- Mezclar con el paraformaldehído al 2% y dejar por una hora. Se puede dejar toda la noche, es incluso mejor. La cantidad depende del tamaño de la muestra, si se tienen las células en un tubo de 1.5 mL, se debe cubrir la muestra totalmente (aprox. 1mL)
- Para lavar se vierte el paraformaldehído y se agrega (hasta llenar) buffer de fosfato. Repite tres veces.
- Agrega 10 gotas (con Pipeta Pasteur) de tetraóxido de osmio al 2% y 5 gotas del buffer de fosfato. Esto depende de que tipo de muestras estas trabajando.
- Lava 3 veces con el buffer de fosfato

Deshidratación

- Después de lavar añade etanol al 30%. Deja incubar durante 15 minutos (cubre completamente la muestra).
- Añade secuencialmente etanol al 50%, 70%, 90%, 95% y absoluto, con un periodo de incubación de 15 minutos entre cada una de las concentraciones.
- Repite con etanol absoluto una vez más pero incuba durante 20 minutos.
- Añade acetona. Incuba 15 minutos. Repite una vez más pero incuba durante 20 minutos.

Debes lavar con el buffer después de cada uno de los pasos de la serie anterior.

Embebimiento

- Se debe añadir Epon diluido en acetona (50%/50%). Dejar incubar toda la noche.
- Se remueve el EPON y agrega nuevo al 100% con una pipeta pasteur. Debes cubrir completamente la muestra evitando formar burbujas.
- Deja incubar por 48h a 60°C (se puede dejar más de 48 horas, esto es sólo el tiempo mínimo).

Soluciones

Gluteraldehído

Prepara una solución stock al 25% y diluye posteriormente con paraformaldehído 1:10, para tener una concentración final 2,5 %. Por ejemplo, 4.5 ml de paraformaldehido y 0.5ml de gluteraldehído.

Tetraóxido de Osmio

Una ampolleta de OsO₄ 250 mg

12.5ml de agua destilada

Paraformaldehído al 2%

2g paraformaldehído

100ml de agua destilada

Calentar a 60 °C (importante que no hierva) y añade NaOH 1M hasta que la solución se vea transparente.

EPON

TAAB 812 12g

DDSA 6.5 g

MNA 6.5 g

BDMA 0.3 g

Mezcla por 15 minutos.

*Es importante tener EPON fresco

Solución stock de PBS 0.1M

Para 1 Litro

11.5 g Na_2HPO_4

2g. KH_2PO_4

pH final 7.2

Apéndice III. Extracción de bandas de gel

Qiagen gel extraction kit, marca Quiagen. Cat No. 28706

Procesar un máximo de 400 mg de agarosa por columna. Todos los pasos son o bien a 10 000g o bien 13 000 rpm (en microcentrífuga ALC 4214 Rotor 6642)

- 1) Cortar las bandas del tamaño deseado, tratando de tomar la menor cantidad de agarosa posible.
- 2) Pesar la banda. Añadir 3 volúmenes de buffer QG por un volumen de gel (100mg son equivalentes 100µL).
- 3) Incubar a 50 °C durante 10min, o hasta que se disuelva la agarosa. Vortex cada 2.3 min.
- 4) Comprobar que el color del buffer sea amarillo. Si es naranja o violeta, ajusta el pH con 10µL de acetato de sodio 3M pH 5.
- 5) Si el tamaño del fragmento es menor a 500pb o mayor a 4 000 pb, añadir un volumen de isopropanol por cada volumen de gel.
- 6) Armar la columna, agregar la muestra y centrifugar durante 1min. Tirar lo centrifugado. Si el volumen es mayor a 800µL, cargar y centrifugar varias veces. Tirar lo centrifugado.
- 7) Añadir 0.5 mL de buffer QG a la columna y centrifugar 1min.
- 8) Para lavar, poner 0.75 mL de buffer PE. Incubar 2-5 min a TA y centrifugar 1 min. Tirar lo centrifugado.
- 9) Centrifugar la columna durante 1min adicional; antes asegurarse que el tubo de abajo no tenga líquido para que en este paso se elimine todo el etanol.
- 10) Poner la columna en un tubo limpio de 1.5 µL.
- 11) Para eludir el DNA, añadir 50µL de buffer EB o agua al centro de la membrana, y centrifugar la columna a máxima velocidad. Para aumentar la concentración, eludir en 30µL. Incubar durante 1min y centrifugar durante 1min.
- 12) Guardar la muestra a -20 °C.

Apéndice IV. Clonación

Ligación

Centrifugar suavemente el vector para colectar el contenido de los tubos en el fondo

1. Vortex al 2X buffer rápido de ligación antes de usar
2. Hacer una mezcla con siguientes reactivos

Reactivos	Reacción estándar
2X buffer rápido de ligación	5µl
pGEM®-T Easy Vector	0.5µl
Producto de PCR	3µl
T4 ligasa	0.5µl
ddH ₂ O	1 µl
Total	10 µl

3. Mezclar suavemente la reacción con la pipeta. Incubar una hora a temperatura ambiente. Alternativamente se puede incubar a 4° C o toda la noche

Transformación

Previo a la transformación se deben de tener cajas de petri con medio 2xLB y ampicilina, IPTG y X-Gal

1. Añadir 3µL de la reacción de ligación en un tubo estéril de 1.5ml en hielo.
2. Remover el tubo del células competentes de alta eficiencia del congelador a -20 °C y poner en hielo para descongelarlas. Mezclar suavemente moviendo el tubo.
3. Cuidadosamente añadir 20 µL de células a cada tubo preparado en el paso 1
4. Mezclar suavemente por inversión de los tubos.
5. Incubar en hielo de 30 min.
6. Poner el vial de bacterias a 42° C durante 2min para darles un choque térmico.
7. Transferir en hielo inmediatamente durante 5min.

8. Añadir 1ml de medio LB a TA, incubar 1hr. A 37° C
9. Preparar en cajas LB, con 50µL de x-gal, 100 µL de IPTG a temperatura ambiente.
10. Sembrar 100 -200µL de cada reacción de transformación en las cajas. Se recomienda sembrar dos volúmenes distintos de bacterias para asegurar una correcta cantidad de colonias.
11. Incubar las cajas
12. Una reacción de clonación eficiente producirá cientos de colonias. De estas colonias se elegirán solo las blancas. No tomar las colonias azules
13. Sembrar el número de colonias requeridas para el análisis en placas LB2X /amp y en la placa para cultivos (kit Montage Plasmad Miniprep₉₆) con 1mL de medio LB2X/Amp liquido en cada pozo.
14. Incubar a 37° C a 320 rpm toda la noche (18 -24 horas)
15. Tomar con palillo esterilizado cada una de las colonias sembradas en placa y ponerlas en tubos de LB/glicerol 15% para guardar la librería de clonas.

Extracción de plásmido (kit Montage Plasmad Miniprep₉₆, marca millipore)

1. Centrifugar la placa para cultivos a 3 250 rpm de 5-7min. Inmediatamente después de centrifugar decantar sobrenadante. Invertir la placa sobre varias toallas de papel para remover los residuos de sobrenadante. No remover bien el sobrenadante minimiza la
2. Resuspender el precipitado en 100µL de la solución 1. Mezclar pipeteando o con shaker de 5-7 min. Este paso es crítico para obtener una lisis exitosa.
3. Añadir 100µL de la solución 2. Mezclar inmediatamente de forma vigorosa con un shaker por un min. Incubar a TA de 2-3 min. El paso anterior no debe exceder de 5min.
4. Añadir 100µL de la solución 3, para neutralizar el lisado. Mezclar inmediatamente de forma vigorosa con un shaker por un min. Incubar a TA de 2min. En este momento, el lisado bacterial esta listo para ser transferido a la placa MultiScreen para limpiar. El lisado se puede guardar (hasta 24 horas) a 4°C.
5. Poner la placa MultiScree de plásmidos dentro de la caja de vacío.

6. Transferir 300 μ L de lisado a la placa MultiScreen para limpiar.
7. Poner la placa para limpiar sobre la caja de vacío. Ajusta la bomba de vacío a 8 pulgadas de Hg. Haz vacío por 3min, para dejar pasar el lisado a la placa de plsmido. Vacía la placa MultiScreen para limpiar y colócala dentro de la caja de vacío, para evitar ensuciarla.
8. Transfiere la placa de plámido sobre la caja de vacío y aplica vacío a 20 pulgadas de Hg por 5-7 min. Dejar en vacío hasta que se filtre toda la solución. El plásmido se queda atrapado en el filtro de la placa.
9. Añadir 200 μ L de solución 4. Aplicar vacío (20 pulgadas de Hg) por 5-7 min o hasta que se filtre totalmente.
10. Recuperar el plásmido añadiendo 50 μ L de la solución 5. Mezclar por 5min o incubar a TA por 30min.
11. Transfiere el plásmido pipeteando a placa de almacenaje del kit.
12. Almacenar a -20 °C.

Medio Luria-Bertani 2X

Triptona	20g
Extracto de levadura	10g
NaCl	10g

Aforar a 1L y esterilizar.

Apéndice VI. Secuencias de la base de datos del ARB incluidas en el análisis filogenético

Secuencias	Origen	Referencia	No. de acceso
<i>Croccosphaera watsonii</i>	Arabian Sea	Mazard et al. 2004	AY620237
<i>Prochlorococcus sp.</i>	Mar	Rocap et al. 1999.	AF115268
<i>Prochlorococcus sp.</i>	Mar	Dufresne et al. 2003	AE017126
<i>Synechococcus sp.</i>	Mar	Palenik et al. 2003	BX569694
<i>Synechococcus sp.</i>	Desconocido	Sugita et al. 2007	AP008231
<i>Phormidium sp.</i>	Lago Nakura, Kenya	Ballot et al. 2004	AY575933
<i>Lyngbya PCC 8106</i>	Desconocido	Stal et al. 2005	AAVU01000000
<i>Rivularia sp.</i>	Mar Báltico	Sihvonen et al. 2007	AM230665
<i>Rivularia sp.</i>	Mar Báltico	Sihvonen et al. 2007	AM230677
<i>Rivularia sp.</i>	Mar Báltico	Sihvonen et al. 2007	AM230675
<i>Trichormus sp.</i>	Mar Báltico	Sihvonen et al. 2007	AJ630455
<i>Gloeotrichia sp.</i>	Mar Báltico	Sihvonen et al. 2007	AM230703
<i>Gloeotrichia sp.</i>	Mar Báltico	Sihvonen et al. 2007	AM230704
<i>Anabaena sp.</i>	Mar Báltico	Sihvonen et al. 2007	DQ023200
<i>Nodularia sp.</i>	Mar Báltico	Lehtimäki et al. 2000	AJ133177
<i>Tolypothrix sp.</i>	Mar Báltico	Lehtimäki et al. 2000	AB093486
<i>Tolypothrix sp.</i>	Acuario, Estocolmo	Sihvonen et al. 2007	AM230669
<i>Anabaena variabilis</i>	Mar Báltico	Sihvonen et al. 2007	AY584512
<i>Nostoc PCC7120</i>	Desconocido	Kaneko et al. 2001	BA000019
<i>Nostoc sp.</i>	Grenoble, Francia.	Horiguchi et al. 2003	AB113665
<i>Nostoc sp.</i>	Mar Báltico	Svenning et al. 2005	AY742453
<i>Calothrix sp.</i>	Mar báltico	Sihvonen et al. 2007	AM230700
<i>Calothrix sp.</i>	Desconocido	Turner et al. 1999	AF132779
<i>Calothrix sp.</i>	Desconocido	Cranenburgh, et al. 1996	1429270
<i>Calothrix sp.</i>	Arena fina de desierto	Sihvonen et al. 2007	AM230681
<i>Calothrix sp.</i>	Báltico, Ventila hidrotermal	Sihvonen et al. 2007	AM230701
<i>Calothrix sp.</i>	Mar báltico	Sihvonen et al. 2007	AM230683
<i>Calothrix sp.</i>	Desconocido	Miura et al. 2006	AM230688
<i>Calothrix sp.</i>	Mar báltico	Sihvonen et al. 2007	AM230689
<i>Calothrix sp.</i>	Mar báltico	Sihvonen et al. 2007	AM230691
<i>Calothrix sp.</i>	Mar báltico	Sihvonen et al. 2007	AM230695
<i>Calothrix sp.</i>	Mar Báltico	Sihvonen et al. 2007	AM230698
<i>Calothrix sp.</i>	Ventila hidrotermal	Sihvonen et al. 2007	AB074504

<i>Calothrix sp.</i>	Antártica	Taton et al. 2003	AY493597
<i>Calothrix sp.</i>	Mar Báltico	Sihvonen et al. 2007	AM230682
<i>B14-DGGE</i>	Australia	Bauer et al. 2007	DQ072873
<i>C13-DGGE</i>	Australia	Bauer et al. 2007	DQ072874
<i>C12-DGGE</i>	Australia	Bauer et al. 2007	DQ072883