



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Composición y Genealogía de Picocianobacterias en las
localidades oligotróficas de Cuatro Ciénegas, Coahuila y del
Canal de Yucatán**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE :

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

YÉSSICA YISLEM BELTRÁN DÍAZ



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

TUTOR: DRA. LUISA ISAURA FALCÓN ÁLVAREZ

2007



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.

AGRADECIMIENTOS

Especialmente agradezco a la Dra. Luisa Falcón directora de esta tesis por brindarme sus conocimientos, experiencia, su dedicación y apoyo permanente e incondicional, permitiendo mi superación académica con la culminación de este trabajo, por confiar en mi y sobre todo por su amistad.

A los miembros del jurado: Valeria Souza, Luis Eguiarte, Elva Escobar, Rosa Luz Tavera, quienes por sus comentarios y sugerencias enriquecieron y mejoraron esta versión final de mi trabajo.

Al programa SEP/CONACYT 44673 por el financiamiento del material de laboratorio

A los miembros del laboratorio de Evolución Molecular y Experimental: Laura Espinosa Asuar, Ana Escalante, Ana Noguez, Sandy, por su ayuda y consejos durante mi estancia en el lab. A Julia que fue la mejor experiencia que encontré en Estocolmo y que ahora se cuenta contigo.

Al laboratorio de Ecología de Bentos, ICMYL, Dra. Elva por brindarme todas las facilidades y apoyo en la realización de esta tesis.

Al J. Craig Venter Institute (JCVI) por las muestras aportadas con las cuales se realizó parte del trabajo.

A mi familia: Mamá, Papá, Myriana, Tía Beatriz, familia Sosa Beltrán por ayudarme, por su amor y compañía, pero sobre todo por su paciencia, no solo en la realización de la tesis sino durante toda mi vida. Gracias!!

A todos mis amigos de la facultad que está de más decir, llenaron mi paso por la facultad de momentos agradables. Gracias Marce por tu amistad, momentos y consejos (para bien o para mal) de verdad fue una suerte el contar contigo, a Bombon, Cesar, Chucho, Isa, Ixel, Martín, Paulina por ser grandes amigos y saber escuchar. A Haku, Hapus, Lisandro, Mariana y Miryam.

A mis compañeros del “Museo” por las experiencias, teorías compartidas y por dejarme conocerlos.

ÍNDICE

Índice de tablas	i
Índice de figuras	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUCCIÓN	1
El mundo bacteriano.....	1
Cianobacterias.....	2
Plancton.....	4
Picoplancton.....	6
<i>Synechococcus</i>	7
<i>Prochlorococcus</i>	10
ANTECEDENTES	12
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
ÁREA DE ESTUDIO	15
MATERIAL Y MÉTODOS	23
Muestras.....	23
Extracción de ADN.....	23
Amplificación.....	24
Clonación.....	25
Secuenciación.....	27
Análisis de secuencias.....	27
Composición.....	27
Evaluación del muestreo.....	28
Inferencia Filogenética.....	29
RESULTADOS	30
Descripción de las librerías.....	30
Afinidad de las secuencias.....	33

Descripción de las secuencias.....	36
Comparación entre comunidades.....	37
Estimador de Riqueza S_{Chao1}	39
Diversidad.....	39
Genealogía.....	41
DISCUSIÓN.....	44
CONCLUSIONES.....	51
PERSPECTIVAS.....	52
AGRADECIMIENTOS.....	53
REFERENCIAS.....	54
APÉNDICES.....	62

Índice de tablas

Tabla 1. Primers específicos para cianobacterias (Nübel et al., 1997).....	25
Tabla 2. Información sobre las clonas de las muestras de picocianobacterias, agrupadas en ribotipos de acuerdo a la secuencia más parecida en la base de datos Blast (Basic Local Alignment Search Tool).....	33
Tabla 3. Comparación de la región amplificada en secuencias del 16S rADN completo de cianobacterias tomadas del GenBank.....	36
Tabla 4. Valores obtenidos del estimador de riqueza S_{Chao1}	39
Tabla 5. Índices de diversidad basados en los ribotipos obtenidos de las secuencias del 16S rADN en ambas localidades.....	40

Índice de Figuras

Figura 1. Microfotografía electrónica de transmisión de una cianobacteria filamentosa, <i>Calothrix</i> sp. en cultivo proveniente de Cuatro Ciénegas, Coahuila, teñida con acetato de uranil y nitrato de plomo. V Vaina, PC Pared Celular, C Carboxisomas, B Heterocisto, VG Vesículas de gas. Barra mide 10 μ m. Foto tomada por Beltrán (2006).....	4
Figura 2. Árbol filogenético construido por el método neighbor-joining a partir del gen 16S rADN (990 pb), obtenido por Honda et al. (1999); muestra siete linajes evolutivos principales de cianobacterias y un origen polifilético de <i>Synechococcus</i>	9
Figura 3. Área de estudio y zona de colecta de las muestras en Pozas Azules, Cuatro Ciénegas (figura modificada de Johanneson et al., 2004).....	16
Figura 4. Mapa de ubicación de la localidad del Canal de Yucatán; entre el Mar Caribe y el Golfo de México. (figura modificada de Sheinbaum et al., 2002).....	20
Figura 5. Diagrama T-S característico en la columna de agua del Canal de Yucatán. (Modificado de Rivas et al., 2005).....	21
Figura 6. Descripción de la librería en la muestra del Canal de Yucatán.....	31
Figura 7. Composición de las clonas en la librería de Pozas Azules en Cuatro Ciénegas, Coahuila.....	32
Figura 8. Mapa de ubicación de las secuencias más parecidas en el Blast de la composición del Canal de Yucatán.....	35
Figura 9. Mapa de ubicación de las secuencias más parecidas en el Blast de la composición de Pozas Azules en Cuatro Ciénegas, Coahuila.....	35
Figura 10. Distribución de las abundancias en los ribotipos en la muestra del Canal de Yucatán.....	38
Figura 11. Distribución de las abundancias en los ribotipos en la muestra de Pozas Azules en Cuatro Ciénegas, Coahuila	38
Figura 12. Curva de rarefacción. Ribotipos observados en la muestra del Canal de Yucatán ajustada al tamaño de la muestra de Pozas Azules. Los intervalos de confianza son de 95%.....	41
Figura 13. Árbol genealógico de picocianobacterias del fragmento de 16S rADN obtenido por neighbor-joining construido con el estimador de distancia Kimura-2 parámetros. En los paréntesis se indican los números de acceso del GenBank y los números en las ramas los valores de bootstrap.....	43

RESUMEN

En esta tesis se estudiaron comunidades de picocianobacterias en una de las pozas del valle de Cuatro Ciénegas, Pozas Azules y en una comunidad marina, el Canal de Yucatán. La pregunta central es identificar a partir de relaciones genealógicas con secuencias del gen 16S rADN si existían similitudes o diferencias entre las comunidades de picocianobacterias en ambas localidades. Se trabajó con técnicas de ecología molecular como la secuenciación del 16S rADN a partir de la separación de los productos amplificados en librerías de clonas, usando primers específicos de cianobacterias con los cuales se obtuvieron fragmentos de 420 pb. Aunque el grupo de las picocianobacterias está presente en ambos cuerpos de agua, los resultados mostraron que su composición en estas localidades es distinta. En la localidad de Pozas Azules, se obtuvieron 40 clonas de las cuales el 100% presentó alta afinidad con organismos del género *Synechococcus*, previamente reportados en cuerpos de agua epicontinentales, como el lago Kinneret, el lago Tanganyika, lagos de Japón y el Lago Erie. El 100% de éstas clonas presentaron afinidad filogenética con otros miembros del picofitoplancton, de los géneros *Synechococcus* y *Cyanobium*, ambos géneros tiene una distribución estructurada, con organismos que habitan aguas epicontinentales diferentes a sus representantes marinos. La muestra del Canal de Yucatán exhibe una composición típica del picoplancton marino, con representantes de los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus*. De 136 clonas analizadas, el 98% de las clonas presentó un alto grado de similitud con una bacteria no cultivada y con miembros del género *Prochlorococcus* obtenidos en la Gran Barrera Arrecifal y en el giro oeste del Océano Pacífico. El 2% restante de las secuencias comparte una semejanza con organismos del género *Synechococcus* reportados en el Pacífico ecuatorial y en el Mar de los Sargazos. Las clonas fueron agrupadas en ribotipos para cuantificar la diversidad con los índices de Shannon y Simpson (Canal de Yucatán: $H= 3.47$, $D= 12.29$; Pozas Azules: $H= 3.16$; $D= 19.04$).

ABSTRACT

Picocyanobacterial communities were studied in surface water samples from a pond in Cuatro Ciénegas Basin, Pozas Azules and in the Yucatan Channel. The main idea is to try to identify differences and similarities in the composition of the picocyanobacterial communities based on analysis of sequences of the 16S rDNA. Research was carried using molecular ecology techniques including sequencing of 16S rDNA clone libraries generated for 420 bp fragments amplified with cyanobacterial specific primers. Although picocyanobacteria were present in both sites, their composition was different. In Pozas Azules the clone library consisted of 40 clones of which 100% of the sequences were closely related to cyanobacteria of the genus *Synechococcus* isolated from freshwater lakes in Japan, lakes Kinneret, Tanganyika and Erie. The clones of the Pozas Azules sample were phylogenetically related to freshwater representatives of two genera that have a clear distribution between freshwater and marine organisms, *Synechococcus* and *Cyanobium*. The Yucatan Channel sample had a typical marine picoplankton composition, with organisms of the genus *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. In this sample 136 clones were analyzed and 98% of all sequences related to cyanobacteria of the genus *Prochlorococcus* reported from the Great Barrier Reef and the West Pacific Gyre. The other 2% of sequences were similar to *Synechococcus* from the Equatorial Pacific and the Sargasso Sea. The clones were grouped into ribotypes in order to quantify diversity and measure Shannon and Simpson indices (Yucatan Channel: $H = 3.47$, $D = 12.29$; Pozas Azules: $H = 3.16$, $D = 19.04$).

INTRODUCCIÓN

Desde la invención del microscopio una gran cantidad de trabajos han tratado de entender cómo se conforma y cómo funciona el mundo de los procariontes. Estos esfuerzos en la actualidad reflejan el gran desconocimiento que se tiene acerca de este grupo, ya que después de 300 años, son solamente alrededor de 5000 las especies que de manera formal han sido descritas, una cifra que resulta significativamente pequeña para la vasta diversidad que actualmente puede ser estimada de un grupo cuya representación en el registro fósil es de aproximadamente 3800 ma (Wintzingerode et al., 1997; Pace, 1997; Schopf, 2000; Curtis et al., 2002). En la última década, se han obtenido importantes aproximaciones sobre el conocimiento de la diversidad de los procariontes, gracias al aumento acelerado en la utilización de nuevas técnicas que ha ofrecido la rama de la biología molecular. Se han logrado dilucidar nuevos grupos bacterianos que no habían sido detectados por las técnicas comunes de cultivo, a partir de las secuencias del genoma bacteriano (Pace, 1997; Hughes et al., 2001; Sebat, 2003).

El mundo bacteriano

Debido a que las bacterias tienen un tamaño pequeño y a que su estructura aporta información reducida sobre sus raíces evolutivas, las relaciones filogenéticas entre los procariontes se han empezado a conocer sólo a partir de los análisis genotípicos que se han impuesto gracias a la sensibilidad, rapidez y especificidad de los métodos moleculares. En la actualidad, la taxonomía de bacterias está basada principalmente en la filogenia molecular, definida por el análisis genético del ARN ribosomal (rARN) (Brock et al., 1999; Honda et al., 1999).

Utilizando secuencias de la subunidad pequeña del ARN ribosomal, se han podido estimar relaciones evolutivas (Woese, 1987). Es altamente conservado debido a que su estructura no puede sufrir cambios sin dejar de ser funcional (Ingraham e Ingraham, 2000; Prescott et al., 1999). Los genes de rADN se han convertido en marcadores filogenéticos universales con una secuencias de gran tamaño (1,500-2,000 pb) dentro de la cual, hay especificidad a nivel intraespecífico. La filogenia molecular basada en el rARN ha revelado que los cinco reinos propuestos por Margulis (1985), no representan las líneas evolutivas principales, sino que la vida celular en la Tierra ha evolucionado a partir de tres linajes

principales (Woese, 1987), de los cuales dos pertenecen exclusivamente a células procarióticas: el dominio Bacteria y el dominio Archea. La tercera línea la compone el linaje eucariótico, el dominio Eukarya (Woese, 1987; Head et al., 1998; Brock et al., 1999; Munn, 2004). Dentro del dominio Bacteria existen cerca de 12 linajes filogenéticos principales. Varios de estos grupos taxonómicos en un principio fueron identificados a partir de aspectos fenotípicos (morfología y fisiología), tales como el grupo de las espiroquetas y cianobacterias (Brock et al., 1999). No obstante, actualmente para los niveles taxonómicos arriba de especie, el análisis de las secuencias de genes que codifican para el 16S rARN, inicialmente introducido por Woese, es uno de los métodos más importantes para la elucidación de la filogenia bacteriana (Giovannoni et al., 1988; Giovannoni y Stingl, 2005) y también para la identificación de cianobacterias (Nübel et al., 1997; Ludwig, 1998)

Cianobacterias

Es un grupo extenso y diverso, conformado por organismos que se caracterizan por ser fototróficos oxigénicos, contienen clorofila *a* (Chl *a*) y como pigmentos accesorios ficobilinas¹ (Munn, 2004). En principio las cianobacterias pueden prosperar en cualquier ambiente terrestre o acuático, siempre que exista la presencia de agua y luz, incluso en condiciones extremas de temperatura y salinidad (Munn, 2004; Overmann y García-Pichel, 2000). Es un grupo con raíces evolutivas cercanas a las bacterias Gram positivas que presentan una gran diversidad morfológica. Dentro de estos organismos fototróficos se conocen formas tanto unicelulares como filamentosas, presentándose de manera simple o en colonias, exhibiendo así su considerable diversidad morfológica con gran diferenciación en sus estructuras multicelulares (Brock et al., 1999; Honda et al., 1999; Whitton y Potts, 2000). El manual de Bergey, agrupa 35 géneros en cinco subgrupos: Orden Chroococales, Orden Pleurocapsales, Orden Oscillatoriales, Orden Nostocales, Orden Stigonematales (Holt et al., 1994).

Anteriormente se conocía a las cianobacterias como algas verde-azules debido a la combinación del pigmento azul característico de la ficocianina con la pigmentación verde

¹ Ficocianinas y ficoeritrinas.

de la clorofila. Incluso en la actualidad algunos ficólogos manejan este grupo como una división de las algas, a pesar de que las cianobacterias claramente son procariontes y forman una de las mayores divisiones del dominio Bacteria (Woese, 1987; Brock et al., 1999; Ingraham e Igraham, 2000; Munn, 2004). Un aspecto relevante en el estudio de las cianobacterias es que a pesar de ser procariontes su sistema fotosintético se asemeja al de los eucariontes, sobre todo en la presencia de Chl *a* y del fotosistema II. Lo anterior es debido a que el cloroplasto eucarionte se originó por endosimbiosis de una cianobacteria unicelular cercana a *Prochloron* (Mrgulis, 1993; Moreira et al., 2000, Munn, 2004). Sus pigmentos fotosintéticos y elementos en la cadena de transporte de electrones se encuentran en las membranas tilacoides cubiertas de ficobilisomas². Entre las estructuras citoplasmáticas se encuentran vesículas de gas, muy comunes en las especies planctónicas, que les dan flotación y facilitan el desplazamiento vertical (Brock et al., 1999; Prescott et al., 1999; Whitton y Potts, 2000). En la Figura 1 se observan algunas características de ultraestructura distintivas de una cianobacteria filamentosa.

Se sabe que las cianobacterias utilizan nitrato o amoníaco como fuente de nitrógeno aunque muchas especies son fijadoras de nitrógeno (Prescott et al., 1999). Las especies más estudiadas son fotótrofos estrictos, es decir, que no crecen en la oscuridad ni asimilan compuestos orgánicos. Normalmente no producen ATP por oxidación de compuestos orgánicos, pero obtienen ATP por fotofosforilación³ y son capaces de utilizar compuestos orgánicos como fuente de carbono. En general, este grupo tiene una considerable flexibilidad metabólica, presentando incluso varios mecanismos de reproducción (Brock et al., 1999; Prescott et al., 1999).

² Partículas especiales que contienen ficobilinas y transfieren energía al fotosistema II.

³ Síntesis de enlaces fosfato de alta energía utilizando energía lumínica.

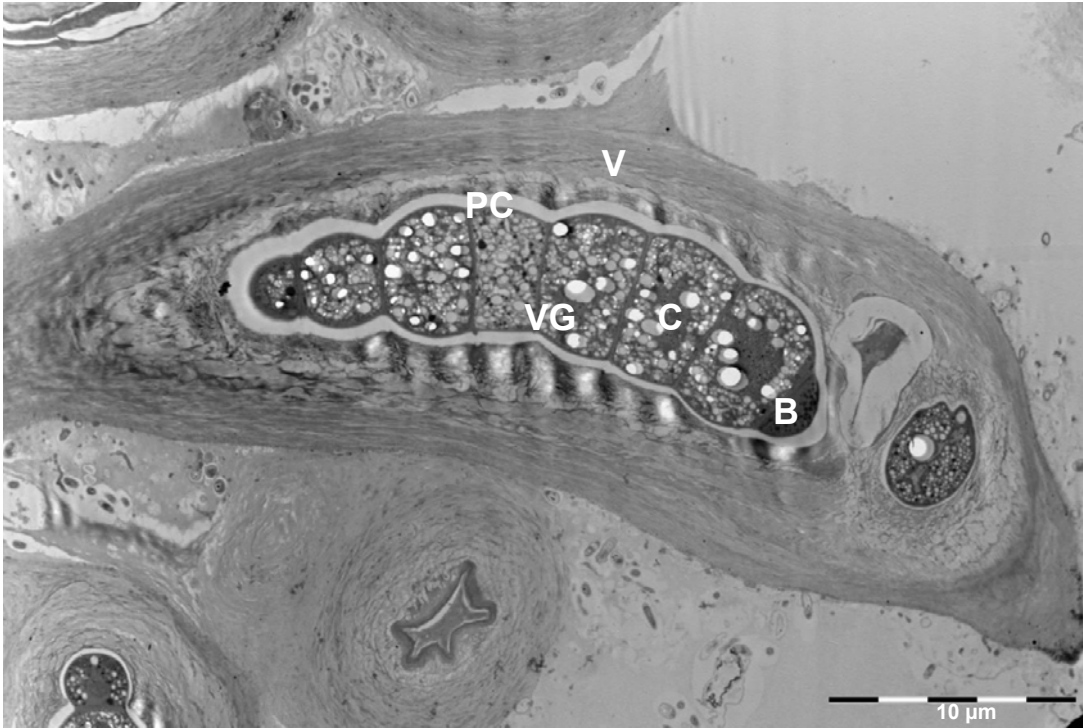


Figura 1. Microfotografía electrónica de transmisión de una cianobacteria filamentosa, *Calothrix* sp. en cultivo proveniente de Cuatro Ciénegas, Coahuila, teñida con acetato de uranilo y nitrato de plomo. V Vaina, PC Pared Celular, C Carboxisomas, B Heterocisto, VG Vesículas de gas. Barra mide 10 μm . Foto tomada por Beltrán (2006).

Existe evidencia en el registro fósil de células y compuestos orgánicos que refieren a las cianobacterias en estructuras estromatolíticas, que datan hace 3500 ma (Schopf, 2000; Hess, 2004). De hecho, la fotosíntesis oxigénica se desarrolló de cianobacterias antiguas, actividad por la cual la atmósfera conoció el oxígeno (Munn, 2004).

Plancton

Las cianobacterias son una característica común en muchos sistemas acuáticos, incluyendo lagos tropicales y templados, ríos, estuarios y océanos, principalmente como parte del plancton (Prescott et al., 1999; Ingraham e Igraham, 2000). El plancton se definen como aquellos organismos flotantes con un poder limitado de locomoción por lo que dependen de la hidrodinámica del sistema acuático en el que se encuentre. Los organismos planctónicos pueden ser clasificados de acuerdo a criterios taxonómicos o por tamaño (Brock et al., 1999). La clasificación general del plancton incluye: el bacterioplancton, fitoplancton y zooplancton (Kennish, 2001; Brock et al., 1999; Cifuentes et al, 1988).

El fitoplancton incluye pequeños organismos fotosintéticos unicelulares o filamentosos que habitan la capa superficial de los cuerpos de agua, es decir, la zona eufótica⁴ (Steenbergen et al., 1993; Kennish, 2001). Entre los principales grupos que normalmente conforman al fitoplancton, se encuentran las diatomeas, los dinoflagelados, las algas, las bacterias fotoheterótrofas y las cianobacterias entre otros (Kennish, 2001; Hess, 2004). La producción primaria de este grupo del plancton, por lo regular se encuentra en función de la interacción de factores físicos, químicos y biológicos: los más importantes son la luz, la temperatura, la circulación del agua, la salinidad y los nutrientes (Kennish, 2001).

El fitoplancton es un grupo importante de productores primarios, debido a que forma parte del 44-55% de la productividad primaria global (Overmann y García Pichel, 2000). Dado que la biomasa de cianobacterias presentes en el fitoplancton alcanza el 67%, se estima que el 80% de la fotosíntesis en el ambiente marino se lleva a cabo por este grupo de bacterias fotosintéticas. El resto se atribuye a microalgas bénticas y plantas marinas (Campbell et al., 1994; Kennish, 2001; Overmann y García Pichel, 2000).

El esquema más sencillo para clasificar el plancton de acuerdo a su tamaño, es el propuesto por Dussart:

Macroplancton	2.0 - 20.0 cm
Mesoplancton	0.2 - 20.0 mm
Microplancton	20.0 - 200.0 μm
Nanoplancton	2.0 - 20.0 μm
Picoplancton	0.2 - 2.0 μm
Femtoplacton	0.02 - 0.2 μm

Siendo el picoplancton una de las fracciones más pequeñas del fitoplancton, cuyo descubrimiento tuvo lugar a finales de la década de los 70's (Kennish, 2001; Brock et al., 1999; Sherr y Sherr, 2000; Vaultot et al., 2004).

⁴La profundidad de la zona fótica varía en función de la cantidad de luz que penetre en la columna de agua.

Picoplancton

El picoplancton se compone de organismos planctónicos fotosintéticos que incluyen tanto representantes procariontes como eucariontes (Raven, 1998; Callieri y Stockner, 2002). La mayoría de las especies que forman parte del grupo de las cianobacterias acuáticas, se encuentran en el picoplancton como las células de vida libre más pequeñas con un aparato fotosintético que ocupa cerca de la mitad de su volumen (Jonhson y Sieburth, 1979; Raven, 1998; Palenik et al., 2003). Desde su descubrimiento, la literatura ha enfatizado en la importancia que posee el picoplancton en términos de biomasa y producción, no sólo en aguas oligotróficas sino también en costeras (Jonhson y Sieburth, 1979; Campbell et al., 1994; Raven, 1998; Overmann y Garcia Pichel, 2000; Becker et al., 2004; Vaultot et al., 2004). Aunque la producción primaria en el picofitoplancton también se lleva a cabo por bacterias fotoheterótrofas, algas y diatomeas. (Hess, 2004).

Las cianobacterias picoplanctónicas presentes en los diferentes cuerpos de agua que actualmente se conocen, corresponden principalmente a géneros unicelulares: *Synechococcus*, *Prochlorococcus* y *Cyanobium* (Chisholm et al., 1988; Jonhson y Sieburth, 1979; Campbell et al., 1983; Schmidt et al., 1991; Brock et al., 1999; Palenik et al., 2003; Komárek y Hauer, 2004; DeLong y Karl, 2005; Willame et al., 2006). Los géneros *Synechococcus* y *Prochlorococcus* dominan el picoplancton en la base de la red trófica en los cuerpos de agua, contribuyendo significativamente en la producción primaria global (Ferris y Palenik, 1998; Partensky et al., 1999; Scanland, 2002; Hess, 2004; Munn, 2004; Six et al., 2004). Estos géneros exhiben una variabilidad ecotípica considerable al colonizar una gran parte de las aguas oceánicas, desde las regiones tropicales oligotróficas hasta las templadas áreas costeras y los cuerpos de agua epicontinentales, incluso en un gradiente vertical en la columna de agua (Moore et al., 1998; Rocap et al., 1999; Ernst et al., 2003; Becker et al., 2004; Six et al., 2004; Vaultot et al., 2004). A pesar de que estos géneros coexisten frecuentemente, cada uno exhibe una distribución espacial diferente en una escala global y local (Scanlan y West, 2002). Una característica destacable de estos organismos, es la especialización para adquirir los nutrientes y metales traza a partir de las concentraciones submicromolares en los cuerpos de agua oligotróficos (Palenik et al., 2003).

Una técnica que fue de gran importancia para poder establecer la ubicuidad e importancia del picoplancton, y que ha contribuido de manera significativa a estos estudios, es la

citometría de flujo, la cual permitió registrar conteos de su abundancia en las regiones oceánicas (Chisholm et al., 1988; Campbell et al., 1994; Corzo et al., 1999; Vaulot et al., 2004).

Synechococcus

Dentro del orden Chroococcales, *Synechococcus* es un género compuesto de picocianobacterias unicelulares en forma de bastones o cocos, con un diámetro menor a las 3 μm y que se divide por fisión binaria en un solo plano. Presentes en una gran variedad de hábitats tanto marinos como de agua dulce, incluso en manantiales termales (Holt et al., 1994; Robertson et al., 2001; Becker et al., 2004; Six et al., 2004). El género *Synechococcus* es muy abundante en las zonas ricas en nutrientes o en aguas mesotróficas (10^4 a 10^5 células mL^{-1}) descendiendo rápidamente en aguas pelágicas pobres en nutrientes, oligotróficas (Sherr y Sherr, 2000; Six et al., 2004). Existe una gran diversidad genética en este género, con cepas adaptadas a nichos ecológicos específicos, lo que explica su amplia distribución (Ferris y Palenik, 1998; Kirchman, 2000; Palenik et al., 2003), contribuyendo de manera significativa a la producción primaria total en una gran variedad de ecosistemas (Fuller et al., 2003; Becker et al., 2004).

Johnson (1979) reconoció por vez primera la abundancia y diversidad del género *Synechococcus* en las aguas oceánicas del Atlántico Norte y del Mar Caribe, por medio de microscopía electrónica de transmisión en poblaciones naturales (Johnson y Sieburth, 1979). Más tarde Gieskes y Kraay registraron en muestras de agua marina la presencia de células cuyo tamaño era menor a 1 μm y que contenían un derivado no identificado de clorofila *a* (Chl *a*) y zeaxantina (β,β -caroteno-3,3'-diol) como carotenoide principal. Estas células se caracterizaron como las cianobacterias ricas en ficoeritrinas reportadas antes por Johnson (1979), asignadas al género *Synechococcus* (Guillard et al., 1985). Los principales pigmentos del género *Synechococcus* son Chl *a* y ficobilinas, estos pigmentos se distribuyen en cepas que presentan ficoeritrinas rojas (PE) y en aquellas con ficocianinas azul-verde (PC) carentes de ficoeritrinas (Sherr y Sherr, 2000; Ernst et al., 2003). El género carece de Chl *b* y debido a la composición de sus pigmentos, los miembros de este género fluorescen de color naranja cuando son excitadas con luz azul. (Kirchman, 2000; Becker et al., 2004). Al parecer, cepas adaptadas a los ambientes oligotróficos han desarrollado

importantes adaptaciones para subsistir en este tipo de ambientes, como son la utilización de nitrógeno y fósforo orgánico. Además, han adoptado estrategias para conservar hierro al utilizar níquel y cobalto en algunas enzimas y reducir su maquinaria de regulación metabólica (Palenik et al., 2003). Se considera que la organización celular de los miembros de *Synechococcus* es la forma básica y más simple de la cual surgieron otras formas multicelulares complejas (Honda et al., 1999; Robertson et al., 2001)

El género *Synechococcus* es actualmente considerado como un género provisional, cuyas cepas fueron agrupadas en base a características morfológicas, fisiológicas, químicas y en el porcentaje de G+C; en seis grupos: MC-A, MC-B, MC-C (por sus siglas en inglés: Marine Cluster- A, B y C), los grupos de *Cyanobium*, *Cyanobacterium* y *Synechococcus* (Waterbury y Rippka, 1989). Sin embargo con el surgimiento de métodos moleculares se ha aumentado el conocimiento de este género y ahora con las secuencias de algunos genomas, estudios filogenéticos del 16S rADN han reconocido que diferentes cepas de este género están ampliamente dispersas en la filogenia de cianobacterias, por lo que *Synechococcus* en efecto no corresponde a un género natural. El carácter polifilético de este grupo ha sido respaldado además por otros genes: el gen de la nitrogenasa (*nifH*), la ribonucleasa P (RNasa P) (*rnpB*) y el gen de la subunidad grande de la *Rubisco* (*rbcL*) (Urbach et al., 1998; Honda et al., 1999; Robertson et al., 2001, Ernst et al., 2003); la filogenia que muestra los siete principales linajes de cianobacterias se presenta en la Figura 2.

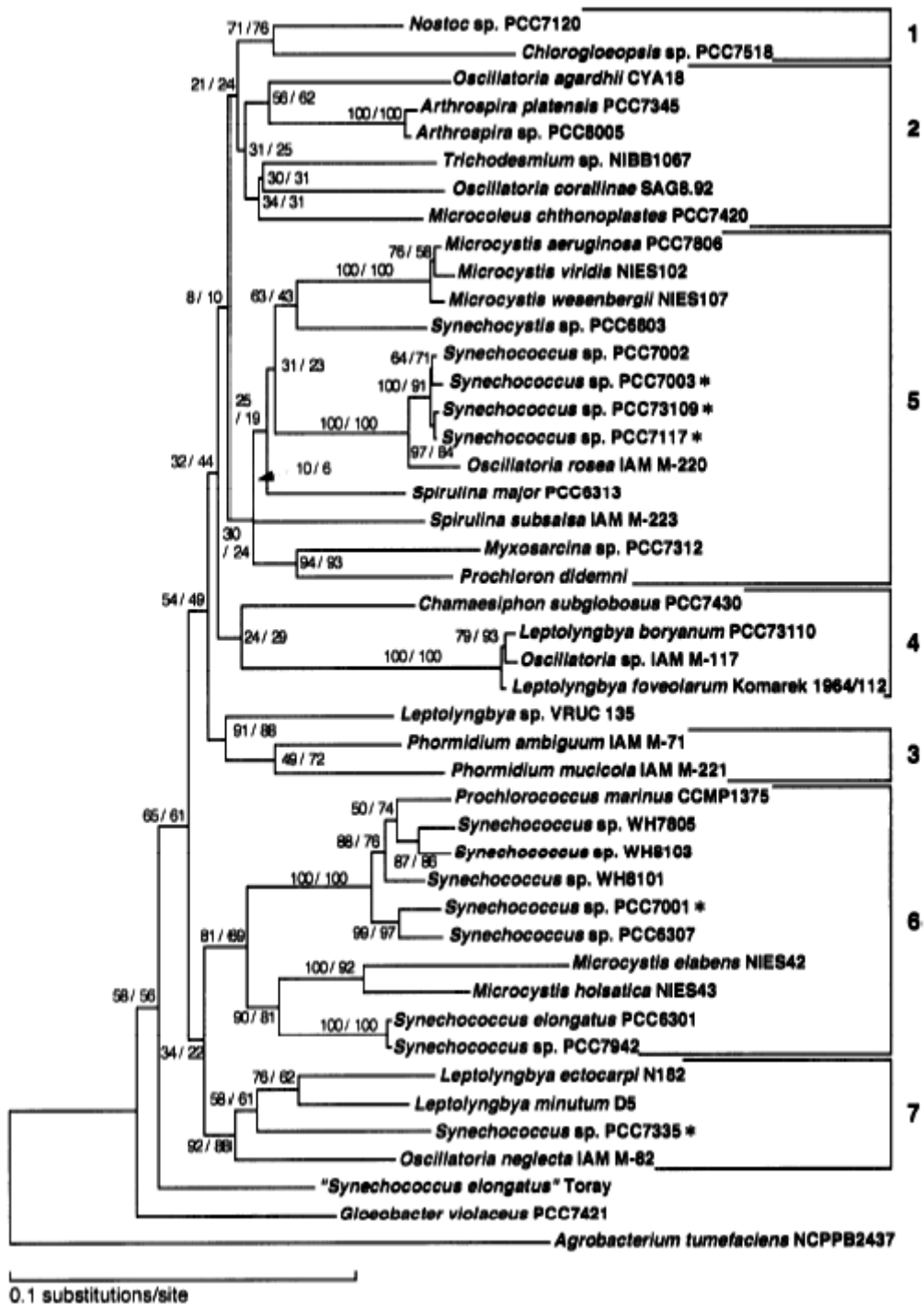


Figura 2. Árbol filogenético construido por el método neighbor-joining a partir del gen 16S rADN (990 pb), obtenido por Honda et al. (1999); muestra siete linajes evolutivos principales de cianobacterias y un origen polifilético de *Synechococcus*.

Prochlorococcus

Con ayuda de la citometría de flujo se identificó un grupo nuevo de picoplancton, más abundante que *Synechococcus*, del orden de 10^4 a $>10^5$ células mL^{-1} en los océanos Atlántico y Pacífico Norte, apenas visible con técnicas de microscopía tradicional (Chisholm et al., 1988; Goericke y Repeta, 1992; Sherr y Sherr, 2000; Munn, 2004). Estas células pequeñas fueron clasificadas como *Prochlorococcus*, un género de proclorofitos que son bacterias fototróficas oxigénicas que contienen clorofila *a* y *b* pero carecen de ficobilinas (Holt et al., 1994; Prescott et al., 1999). Debido a esta combinación de pigmentos junto con su estructura tilacoide, estos organismos se asemejan a los cloroplastos de los eucariontes fotosintéticos (Chisholm et al., 1988; Garczarek et al., 1998; Brock et al., 1999).

En general *Prochlorococcus* es un género compuesto de aquellas bacterias fotosintéticas oxigénicas, con un tamaño de 0.5 a 0.8 μm de largo por 0.4 a 0.6 μm de ancho que varía con las condiciones ambientales (Chisholm et al., 1988; Partensky et al., 1999; Kirchman, 2000; Garczarek et al., 2001). Las células de *Prochlorococcus* se caracterizan por la presencia de diviniles derivados de clorofila *a* y *b* (8-vinil clorofila *a* y *b*), denominados Chl a_2^5 y Chl b_2 únicos de este género (la Chl b_2 es el pigmento principal), además de α -caroteno y zeaxantina y carecen de ficobilinas (Chisholm et al., 1988; Urbach et al., 1998; Partensky et al., 1999; Sherr y Sherr, 2000). A pesar de la carencia de ficobilinas algunas cepas han mostrado la presencia de los genes para ficoeritrina (Hess, 2004).

El género *Prochlorococcus* domina la biomasa fotosintética en las áreas intertropicales, tales como las zonas subtropicales oligotróficas de los océanos Atlántico y Pacífico, así como en el centro de los grandes giros oceánicos (Campbell et al., 1994; Dufresne et al., 2003; Zubkov et al., 2003), en donde se asume contribuye en 50% al total de la producción primaria del picoplancton (Zubkov et al., 2003). En estas regiones, la distribución vertical de *Prochlorococcus* frecuentemente excede los límites de la zona eufótica (Moore y Chisholm, 1999; Partensky et al., 1999; Garczarek et al., 2001; Scanlan

⁵ El Chl a_2 es una molécula precursora del monovinil-clorofila *a* presente en cianobacterias y en cloroplastos.

y West, 2002), la cual se extiende desde la superficie hasta donde el nivel de luz llega a ser incluso más bajo que el 1% de la irradiación superficial (Dugdale y Wilkerson, 1992). Además de una distribución que abarca latitudes de los 40°S a los 40°N, su alta densidad y presencia en la capa eufótica, lo hacen el organismo fotosintético más pequeño y abundante conocido en el océano y presumiblemente en la Tierra (Garczarek et al., 1998; Partensky et al., 1999; Scanlan y West, 2002; Dufresne et al., 2003).

El género *Prochlorococcus* parece estar bien adaptado a vivir en el fondo de la zona eufótica, ya que una concentración elevada de Chl *b* y la presencia de Chl *a*₂ optimizan la absorción de la luz azul que penetra en aguas profundas (Chisholm et al., 1988; Munn, 2004). En estudios recientes, se ha reconocido una frecuencia bimodal en la fluorescencia de *Prochlorococcus*, lo que sugiere la existencia de dos poblaciones genéticamente diferentes que coexisten en el océano, adaptadas a crecer en diferentes intensidades de luz en el océano (Urbach y Chisholm, 1998; Bibby et al., 2003; Dufresne et al., 2003). Una de las poblaciones, está adaptada a condiciones de baja luz y alta concentración de nutrientes en la zona eufótica profunda y otra en condiciones de alta luz y bajas concentraciones de nutrientes en la superficie (Moore et al., 1998; Moore y Chisholm, 1999; Garczarek et al., 2001; Dufresne et al., 2003).

El análisis filogenético de las secuencias del 16S rADN, para *Prochlorococcus* aisladas de varias localidades indican que aquellas células aisladas con baja proporción de Chl *b/a* y un genoma pequeño formaron un grupo distinto, al cual se nombró como el clado adaptado a condiciones de alta incidencia lumínica; mientras que otras caracterizadas por altas proporciones de Chl *b/a* y un genoma mayor quedaron separados en el clado adaptado a condiciones de baja luz (Moore et al., 1998; Urbach y Chisholm, 1998; Moore y Chisholm, 1999; Rocap et al., 2002; Dufresne et al., 2003; Hess, 2004). Los estudios filogenéticos revelan que las cepas de *Prochlorococcus* comparten una mayor relación con organismos portadores de ficobilinas que con aquellos que tienen Chl *b* (Urbach et al., 1998; Honda et al., 1999). La mayoría de estos trabajos ha encontrado una relación monofilética entre *Synechococcus* y *Prochlorococcus*, en un clado de picoplancton marino (Urbach et al., 1998; Rocap et al., 2003; Scanlan y West, 2002).

ANTECEDENTES

Estudios realizados en la caracterización de las comunidades del fitoplancton se han realizado principalmente en base a criterios morfológicos, ecológicos y fisiológicos principalmente en ambientes acuáticos epicontinentales. En México los estudios del fitoplancton son dispersos, la mayoría de las especies descritas se encuentran en tesis de licenciatura y poco a poco se colocan en publicaciones (Novelo, 1998)

El interés de estudiar las comunidades de fitoplancton surge sobre todo por el papel que juega como parte importante de las cadena trófica, como productores de oxígeno y como bioindicadores (Mora-Navarro et al., 2004), sobre todo se abordan aspectos como florística, taxonomía y ecología de la ficoflora, dentro de la cual las cianobacterias figuran como Cyanoprokaryota.

Existen listados de especies del fitoplancton presentes en el lago de Chapala con la finalidad primero de generar patrones en la variables fisicoquímicas que expliquen la composición de las comunidades (Mora-Navarro et al., 2004). La caracterización del fitoplancton ha sido estudiada en los manantiales del valle de Tehuacán, Puebla, utilizando caracteres empleados en la determinación de niveles taxonómicos arriba de especie; donde aproximadamente 295 taxa fueron descritos, de los cuales 81 corresponden a cianobacterias unicelulares del orden Chroococcales (Cuesta, 1993; Novelo, 1998). También ha sido caracterizada la ficoflora en el lago de Chapala, en los manantiales de la Huasteca, en El Sol (región de alta montaña) del Nevado de Toluca y la variación vertical y temporal del fitoplancton está bien definida en el lago cráter Alchichica, Puebla, de carácter hiposalino y oligotrófico (Carmona, 1990; Cartagena, 2004; Adame, 2004; Mora-Navarro et al., 2004; Oliva, 2001). Se ha determinado la tasa de fijación de nitrógeno en cianoprocariontes de un humedal tropical en la Reserva Ecológica El Edén, Quintana Roo, donde se encuentran principalmente organismos de la división Cyanoprokaryota de tipo filamentosa y colonial (Vargas y Novelo, 2003). También existe literatura que reporta la existencia del género *Synechococcus* en cenotes de la península de Yucatán (Catzim et al., 2004)

En ambientes marinos ha sido analizada la diversidad de cianobacterias en los ambientes hipersalinos de Baja California, especialmente del bentos, aunque también son

frecuentes en suelos donde la vegetación es ausente. Al parecer la ecología microbiana de los ecosistemas hipersalinos en Baja California ha sido estudiada en extenso, pero limitada a las muestras del fondo del mar de Bahía Concepción y a aquellas de aguas poco profundas y con alta salinidad de las granjas de camarón en Ensenada de Aripez en el Golfo de California (Lopez-Cortez et al., 2001).

La presencia de cianobacterias ha sido previamente registrada en ambientes áridos donde el agua es escasa e incluso el desarrollo de las plantas es limitado, y las cianobacterias son reconocidas como colonizadoras en estos suelos áridos (Garcia-Pichel y Pringault, 2001; Garcia-Pichel et al., 2001). Se ha encontrado la presencia de cianobacterias en algunos cuerpos de agua en la zona de Cuatro Ciénegas, sobre todo formando estromatolitos (Garcia-Pichel et al., 2002; Garcia-Pichel et al., 2004; Falcón et al., 2007).

En la cuenca de Cuatro Ciénegas, Coahuila (CCC) existe la presencia de un complejo sistema hidrológico de manantiales, lagos y pozas, en donde aunque el origen del agua es aún incierto, se sabe son alimentados por aguas subterráneas (Badino et al., 2004; Jonhannesson et al., 2004; Dinger et al., 2005). Una característica relevante de este sistema acuático es su carácter oligotrófico, ya que varios de los cuerpos de agua en CCC se encuentran limitados en fósforo (Souza et al., 2006; Elser et al., 2005), restringiendo el crecimiento de algas, por lo que se sospecha que la cadena trófica del agua debe estar dominada por el grupo de las bacterias (Souza et al., 2006). La presencia de bacterias y archaeas fue comprobada en los estudios realizados con el afán de conocer la composición biológica en estos cuerpos de agua (Espinosa, 2005; Souza et al., 2006), en donde se observó que el 50% de estas bacterias tienen afinidad con otros organismos marinos (Espinosa, 2005; Souza et al., 2006, Cerritos, enviado; Escalante, enviado) aún cuando la composición del agua no es marina (Badino et al., 2004) y el mar estuvo presente en la región hace más de 35 ma.

HIPÓTESIS

H0: La composición de picocianobacterias de la columna de agua de Pozas Azules en Cuatro Ciénegas, será similar a las picocianobacterias presentes en la columna de agua de la comunidad marina del Canal de Yucatán.

Ha: Como los registros geológicos indican que la última vez que Cuatro Ciénegas tuvo contacto con el mar fue hace más de 35 ma, entonces las comunidades de picocianobacterias actuales serán distintas entre Pozas Azules y el Canal de Yucatán.

OBJETIVO

Describir y comparar la composición de picocianobacterias en las localidades oligotróficas Pozas Azules y Canal de Yucatán, utilizando primers específicos del gen 16S rADN de cianobacterias. Para así buscar la posible relación que pudieran guardar las comunidades de picocianobacterias actuales en la columna de agua de las pozas de Cuatro Ciénegas con una región oceánica próxima, en el Canal de Yucatán.

Objetivos Particulares:

Describir la composición de picocianobacterias en la superficie de la columna de agua, presentes en cada una de las localidades de este estudio.

Verificar si las comunidades de picocianobacterias en Pozas Azules, reflejan en el rADN rastros de la presencia marina en CCC.

ÁREA DE ESTUDIO

Pozas Azules

El sistema Pozas Azules forma parte de una importante serie de cuerpos de agua dentro del valle de Cuatro Ciénegas en el estado de Coahuila (CCC), al noreste de México (zona árida de la región Neártica del país). El valle forma parte de una de las zona de descarga más importantes del acuífero Cupido-Aurora, en términos del número de manantiales y de la cantidad de especies endémicas que sostiene (INE, 1999; Johannesson et al., 2004). A pesar del clima árido, CCC alberga un sistema extenso de manantiales, ríos y pozas de gran interés científico (Jonhannesson et al., 2004; Dinger et al., 2005; Souza et al., 2006).

Cuatro Ciénegas se decretó área natural protegida en 1994, en la categoría de Área de Protección de Flora y Fauna y se le considera el humedal más importante en el desierto Chihuahuense y uno de los más importantes en México, con una superficie aproximada de 84,347 ha (INE, 1999). La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) lo colocó como un sitio prioritario para la conservación, debido a la gran diversidad y alto grado de endemismos (Dinger et al., 2005; Souza et al., 2006).

El valle de CCC se sitúa entre el límite del gran Bolsón de Mapimí y el lado este de la Sierra Madre Oriental, en el área más seca del desierto de Chihuahua (Figura 3); en las coordenadas 26° 45' 00" y 27° 00' 00" latitud Norte; 101° 48' 49" y 102° 17' 53" longitud Oeste a 740 msnm, rodeado por montañas que alcanzan una elevación de hasta 3000 msnm (INE, 1999; Johannesson et al., 2004; Dinger et al., 2005; Souza et al., 2006). Forma parte de la provincia de la Sierra Madre Oriental, en una subprovincia donde predominan sierras sometidas a procesos geológicos de levantamientos abruptos, alternados con valles orientados de noroeste a sureste. El valle se encuentra rodeado al norte por las sierras La Madera y La Menchaca, al oeste por La Purísima y San Vicente, al sur por San Marcos y Pinos y al sureste por La Fragua (INE, 1999; Johannesson et al., 2004; Moline et al., 2004).

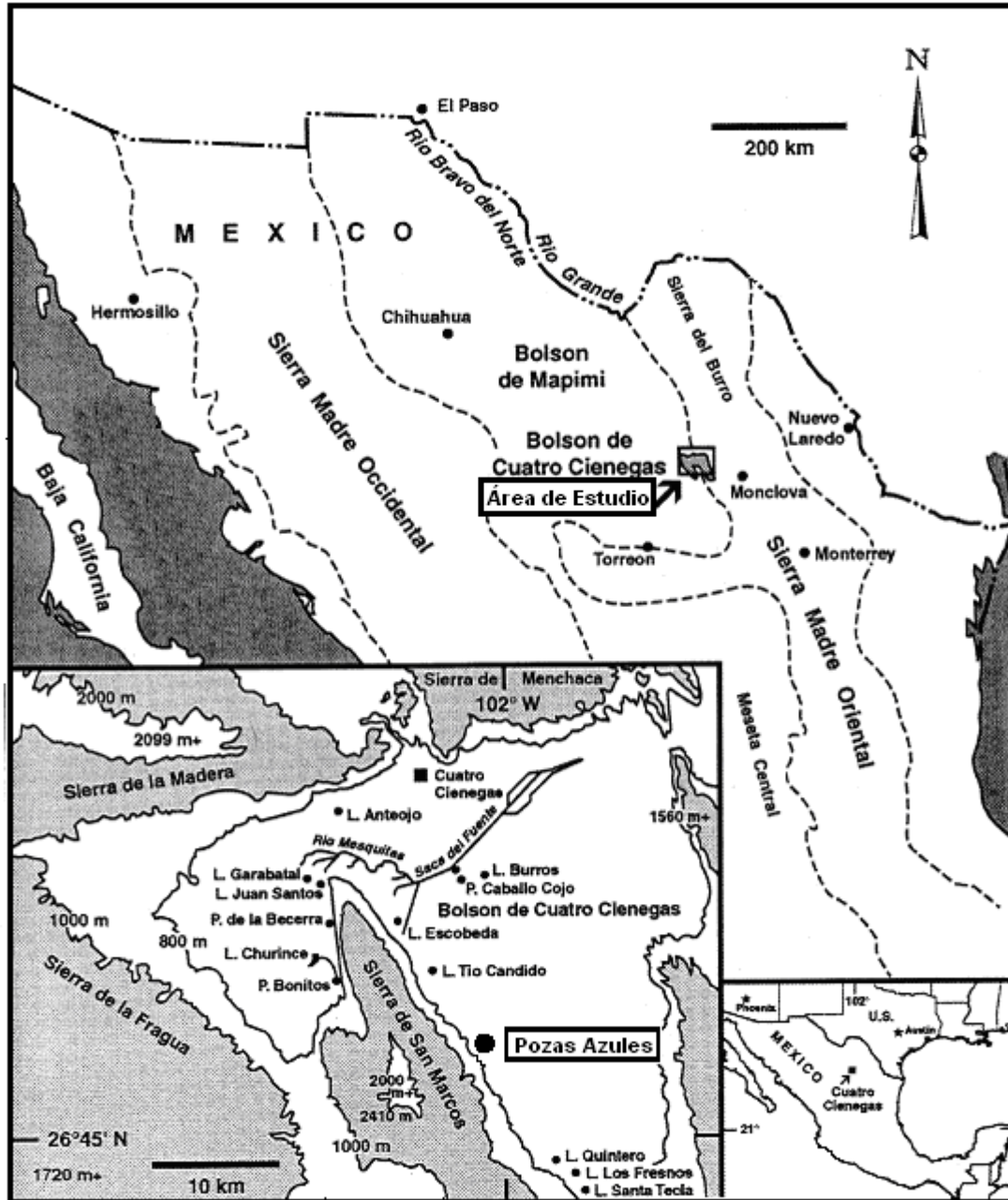


Figura 3. Área de estudio y zona de colecta de las muestras en Pozas Azules, Cuatro Ciénegas (figura modificada de Johanneson et al., 2004).

Las montañas que rodean el valle se caracterizan por la presencia de rocas calizas de origen sedimentario marino del Cretácico medio, incrustadas en rocas del Pérmico, además de evaporitas ricas en sulfato, areniscas y conglomerados de las formaciones de Cupido y San Marcos (Meyer, 1973; Johannesson et al., 2004; Moline et al., 2004).

Los estratos geológicos del Mesozoico y el suelo de formaciones graníticas junto con rocas del Paleozoico, sugieren que en el pasado existió una masa de tierra a la orillas de un mar del Pérmico. Los depósitos actuales de yeso en el centro de Coahuila indican la línea de costa y la regresión del mar, en la península de Coahuila durante el Mesozoico (INE, 1999; Lehmann et al., 1999). La estratigrafía en el valle de CCC, muestra el depósito de arcillas de mar abierto durante un periodo más prolongado que el Cretácico, pero para el periodo de hace 35 y 23 ma no existe más la presencia de estos sedimentos marinos (Badino et al., 2004).

La falla de San Marcos define el extremo sur de la Sierra del mismo nombre, la cual corta transversalmente el valle de CCC desde el sureste. Esta Sierra juega un papel hidrogeológico importante, presentando fracturas que posiblemente participan en la recarga de los manantiales, conocidos localmente como pozas. Las pozas se presentan a lo largo de la Sierra de San Marcos y en la base de la Sierra de la Madera (Badino et al., 2004; Johannesson et al., 2004; Moline et al., 2004). Se estima que existen alrededor de 200 pozas, algunas de las cuales contienen más de 1000 m³ de agua (Johannesson et al., 2004), asociados a otros ecosistemas acuáticos entre los que se encuentran lagunas, ciénegas, canales artificiales (construidos entre 1800 y 1960) y ríos (Dinger et al., 2005). Una característica sobresaliente, es el hecho de que estos ecosistemas acuáticos albergan una cantidad importante de organismos endémicos, estromatolitos vivos y comunidades microbianas que participan como la base de una cadena trófica compleja (Moline et al., 2004; Elser et al., 2005; Espinosa-Asuar, 2005).

Los diámetros de las pozas fluctúan desde menos de un metro hasta más de cien y las profundidades de 50 cm hasta 18 m. Algunas de las pozas están comunicadas natural o artificialmente entre si por un complicado sistema de drenaje (INE, 1999). Las características físico-químicas de las pozas son muy variables. La temperatura del agua varía en un rango de 18 a 35 °C, el pH es de 5.76 a 8.3, la conductividad tiene valores entre

782 $\mu\text{S cm}^{-1}$ y 7.52 mS cm^{-1} y los sólidos disueltos se encuentran en un intervalo de 0.29 gL^{-1} a 3.77 gL^{-1} (INE, 1999; Espinosa-Asuar, 2005). Estos cuerpos de agua son oligotróficos con baja concentración de fósforo y nitrógeno, pero una alta concentración de sales como sulfato de magnesio, sulfato de calcio y carbonato de Calcio (Badino et al., 2004; Elser et al., 2005; Souza et al., 2006). En estos cuerpos de agua existen aquellos con agua frías de baja salinidad, como es el caso de Pozas Azules y otros con agua termo mineral (Badino et al., 2004; Espinosa-Asuar, 2005).

Normalmente en las zonas desérticas, como en el caso de CCC, la precipitación anual varía en gran medida respecto al promedio; siendo en esta región entre 200-440 mm anuales (INE, 1999; Badino et al., 2004; Dinger, 2005). Los cálculos sugieren que el valor total de precipitación es de $2.4 \times 10^8 \text{ m}^3\text{año}^{-1}$, mientras que la evapotranspiración del valle junto con la descarga en sólo una de las pozas, tiene un valor de $2.5 \times 10^9 \text{ m}^3\text{año}^{-1}$, un factor 10 veces mayor que el de la precipitación anual, que en realidad debe ser mayor al considerar la descarga de otros cuerpos de agua. Lo anterior sugiere la existencia de una fuente de recarga externa al valle de CCC o la recarga con agua subterránea (Badino et al., 2004; Johannesson et al., 2004).

Al examinar la diversidad en el valle de CCC se han documentan 70 especies endémicas, estromatolitos vivos así como la presencia de microorganismos, sin embargo, se conoce muy poco acerca de la diversidad microbiana que existe en esta zona., (Dinger, 2005; Espinosa-Asuar, 2005; Souza et al., 2006). Algunos de los grupos más estudiados en la zona son los crustáceos, moluscos, peces y reptiles (INE, 1999; Dinger et al., 2005). Entre los organismos endémicos destacan nueve especies de peces, 13 de caracoles, cinco especies de escorpiones y numerosas especies de reptiles (Meyer, 1973), por lo que CCC es considerado una zona importante para el estudio de la diversidad en una amplia variedad de ecosistemas acuáticos y terrestres, que sorpresivamente se mantienen en medio del Desierto Chihuahuense (Badino et al., 2004; Souza et al., 2006).

Canal de Yucatán

El Canal de Yucatán fue escogido como una comunidad representativa oceánica, que se localiza entre la península de Yucatán y el extremo oeste de Cuba y conecta el Mar Caribe con el Golfo de México, entre las coordenadas 21°30'N, 86°49'W y 21°52'N, 84°57'W (Abascal et al., 2003). Es la entrada principal del afluente proveniente del Caribe hacia el Golfo de México (Figura 4), con una profundidad aproximada de 2,040 m y un ancho de 196 km, desde el Cabo San Antonio, Cuba, hasta Isla Contoy, México (Abascal et al., 2003; Ezer et al., 2003; Richardson, 2005, 2005; Rivas et al., 2005). La Corriente de Yucatán atraviesa el Canal, cruzando directamente el Golfo de México hasta el estrecho de Florida o bien formando giros anticiclónicos dentro de este mar semicerrado, convirtiéndose en la Corriente de Lazo (Biggs et al., 1998; Bunge et al., 2002; Sheinbaum et al., 2002; Abascal et al., 2003; Ezer et al., 2003). Al formar parte de la circulación del giro subtropical de Atlántico Norte, la Corriente de Yucatán que ingresa al Golfo de México es considerada una corriente intensa y muy dinámica. Características particulares de esta corriente son la velocidad media de 1.70 m s^{-1} en la parte superficial, remolinos y una estructura vertical compleja (Biggs et al., 1998; Candela et al., 2002; Sheinbaum et al., 2002; Sheng y Tang, 2003; Rivas et al., 2005). Debido a la ausencia de ríos a lo largo de las costas en la península de Yucatán y a la naturaleza carstica del lugar, no existe descarga superficial, ya que no existen indicios del aporte de materia de origen continental en la región, aún en las zonas más cercanas a la costa. Sin embargo, a causa de descarga subterránea regular, se inducen variaciones mínimas de la salinidad aún en algunas de las lagunas costeras en la región (Merino, 1997).

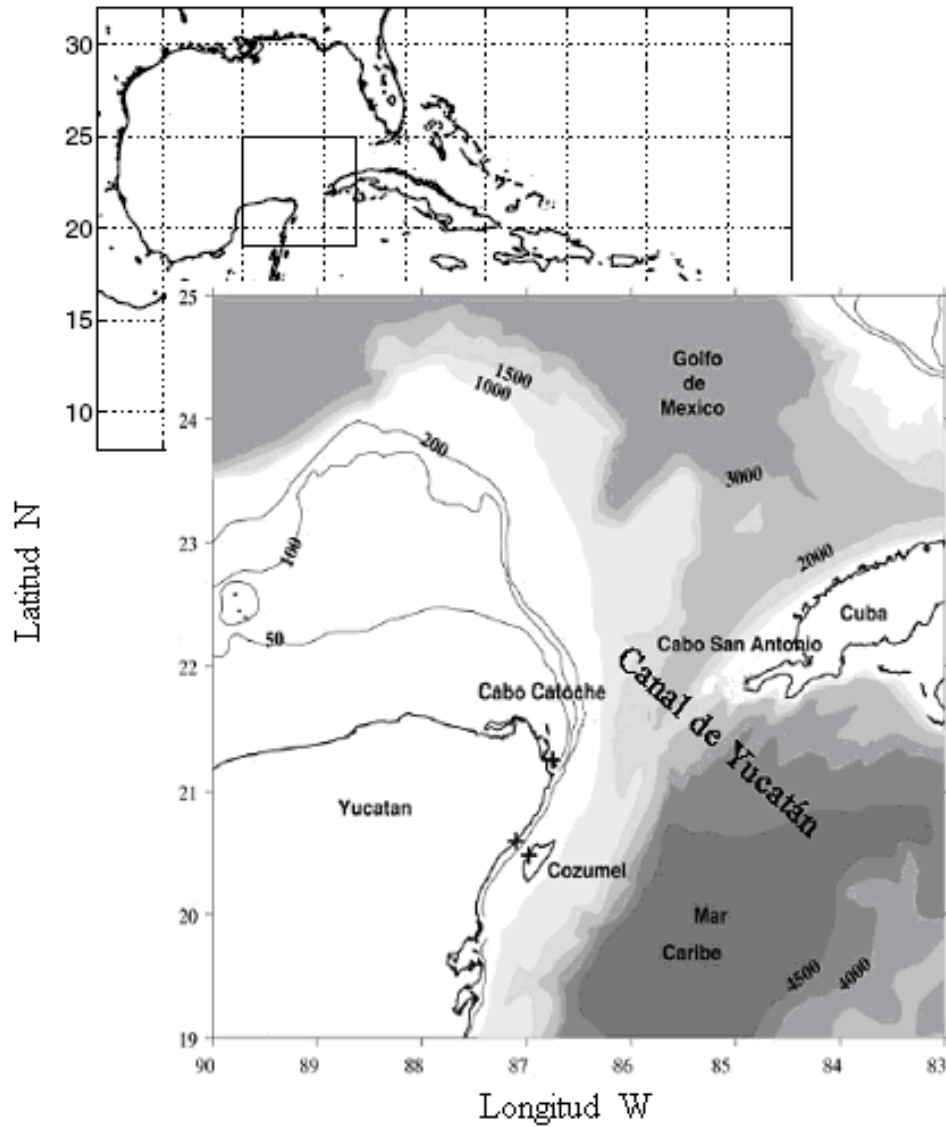


Figura 4. Mapa de ubicación de la localidad del Canal de Yucatán; entre el Mar Caribe y el Golfo de México (figura modificada de Sheinbaum et al., 2002).

El diagrama T-S (temperatura-salinidad) en el Canal de Yucatán (Figura 5) es característico de la columna de agua al oeste del Caribe e idéntico a los representativos de esta área, donde la salinidad y la temperatura incrementan juntas de 7 °C-34.9 psu hasta el máximo de salinidad en 23°C-36.8 psu (unidades practicas de salinidad, por sus siglas en inglés), que coinciden con la termoclina permanente a 150 m de profundidad (Merino, 1997; Rivas et al., 2005). Por encima de la termoclina la temperatura incrementa conforme la salinidad disminuye, hasta 50 m de la superficie, donde ambos parámetros permanecen relativamente constantes (26-27 °C, 36.3-36.4 psu) (Merino, 1997).

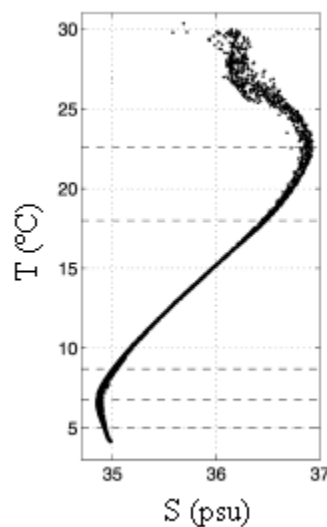


Figura 5. Diagrama T-S característico en la columna de agua del Canal de Yucatán. (Modificado de Rivas et al., 2005).

Existe una distribución vertical de salinidad en gran parte del Canal de Yucatán, cuyo valor máximo (36.8 psu) muestra una reducción cerca del talud continental al este de Yucatán, que varía en relación a la surgencia (Merino, 1997). En la zona oeste del Canal de Yucatán, existe un importante aporte de nutrientes sobre todo de nitratos, debido a la surgencia provocada por la entrada de agua de la subtermoclina hacia la plataforma continental de Yucatán, la temperatura de la subtermoclina es normalmente menor a 22.5 °C (Merino, 1997).

La región del Golfo de México y el Caribe han evolucionado de forma muy estrecha, desde la separación de África y Sur América de Norte América, con la ruptura de Pangea. Es ampliamente aceptado que el Golfo de México y el Proto-Caribe comenzaron a

abrirse con la rotación de Yucatán durante el Jurásico temprano (McKee, 1990; Pindell, 2001). La apertura del Golfo de México está cercanamente relacionada a la distribución de las plataformas carbonatadas del Cretácico en el Noreste de México (Lehmann et al., 1999). Durante el Jurásico tardío el florecimiento de nuevo suelo oceánico comenzó en el Golfo de México con el depósito de líneas de siliclastos y carbonatos. El bloque de Coahuila sufrió una distensión interna al continente hace 160 ma, cuando comenzó la fase de *rift* del Golfo de México, misma que fue completada al comienzo del Cretáceo. Durante este periodo, depósitos de carbonato se depositaron alrededor del ancestral Golfo de México, acumulados entre el bloque de Coahuila y un margen arrecifal de corales y rudistas, que actualmente forman parte de las dorsales montañosas del área de CCC (Lehmann et al., 1999; Badino et al., 2004).

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Se trabajó con muestras de columna de agua de dos localidades diferentes Una provino del Canal de Yucatán, durante la expedición Sorcerer II del J. Craig Venter Institute (JCVI) en febrero del 2004. En esta localidad se colectaron 200 L de agua a cinco metros de la superficie, el agua fue filtrada directamente a través de filtros de membrana *Supor* (Pall Life Sciene) en tres fracciones diferentes: 0.1-0.8 μm , 0.8-3 μm y 3-20 μm . Los filtros se colocaron en 5 mL de buffer de lisis, fueron almacenados primero en nitrógeno líquido y luego a -80 °C hasta el momento de la extracción (Rusch et al., 2007). La otra muestra fue colectada en la superficie (aprox. 50 cm) de una de las pozas del sistema Pozas Azules en CCC, filtrando un galón de agua a través de un filtro Millipore de nitrocelulosa de 0.45 μm . De igual manera la muestra se conservó en nitrógeno líquido hasta el momento de su extracción (Espinosa-Azuar, 2005).

Extracción de ADN

Esta tesis utilizó una alícuota de ADN total, obtenida de la fracción más pequeña (0.1-0.8 μm) proporcionada por el JCVI. El ADN fue extraído con el protocolo reportado en Venter et al. (2004).

Del filtro obtenido en Pozas Azules, se extrajo el ADN con el kit de extracción *Ultra Clean Water DNA* (MoBio Lab. Inc), utilizado para aislar grandes cantidades de ADN de microorganismos. El primer paso de la extracción es colocar los filtros en un tubo con microesferas de cristal con una solución que contiene sales y buffer, que estabilizan y dispersan homogéneamente las células para su lisis. Se utilizó la solución WD1, con el detergente SDS, un detergente que ayuda a romper la pared celular. Las muestras son sometidas a una combinación de lisis química y mecánica para liberar los ácidos nucleicos de las células microbianas. A continuación se centrifugó (los tiempos y velocidades utilizadas en las centrifugaciones se especifican en el apéndice I) para separar el ADN de los desechos celulares. El ADN en el sobrenadante es retomado para agregarle la solución WD2, removiendo así contaminantes orgánicos e inorgánicos. Nuevamente se centrifugó

para añadir al sobrenadante la solución WD3, altamente concentrada en sal. El ADN junto a las sales, es atrapado por la membrana de sílica, proporcionada en el kit, después de realizar la centrifugación, de tal manera que los contaminantes pasan a través del filtro dejando sólo el ADN en la membrana. El siguiente paso es eliminar los residuos de sal y otros contaminantes, mientras el ADN permanece atrapado en la membrana de sílica. Se añade la solución WD4 con etanol, la cual elimina los residuos de sal y otros contaminantes del ADN atrapado en la membrana de sílica. La solución WD4 fue eliminada nuevamente por centrifugación. El ADN es recuperado de la membrana agregando agua ultra pura para hidratar el ADN, con la finalidad de que una vez que las sales han sido removidas, pueda pasar a través de la membrana luego de centrifugar. En este punto se deja reposar, esperando la completa hidratación de los ácidos nucleicos. El ADN se recupera por centrifugación. De ser necesario el ADN en el tubo puede ser almacenado a -20°C . Ver los detalles del protocolo en el Apéndice I. Para asegurar la limpieza del ADN y eliminar nucleasas se realizaron lavados exhaustivos con fenol-cloroformo-isoamil alcohol y precipitaciones con etanol y acetato de sodio (ver Apéndice II).

Amplificación

La amplificación del ADN extraído de ambas muestras se realizó con la técnica conocida como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). El PCR se basa en tres simples pasos requeridos para cualquier reacción de duplicación del ADN: La doble hélice se separa en cadenas sencillas (desnaturalización); apareamiento de hebras cortas de cadena sencilla (primers) complementarias a cada una de las cadenas originales para la síntesis de nuevas cadenas; y extensión de las nuevas cadenas de ADN por medio de una ADN polimerasa (Harwood et al., 1996).

De las muestras de ambas localidades se amplificó una región para el gen de la subunidad pequeña del ADN ribosomal 16S rADN con primers específicos para cianobacterias (primer forward CYA359, reverse CYA7816R) (Tabla 1). El primer CYA781R es una mezcla equimolar de los primers CYA781(a) y CYA781(b) (Nübel et al., 1997). Con estos primers se tiene la ventaja de obtener un producto de PCR que corresponde a la región variable V3 y V4 que contiene información para evaluaciones filogenéticas (Bouttec et al., 2006).

Tabla 1. Primers específicos para cianobacterias (Nübel et al., 1997).

Primer	Secuencia (5' a 3')
CYA359F	GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG
CYA781R(a)	GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T
CYA781R(b)	GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T

La mezcla de PCR: buffer 10x, cloruro de magnesio MgCl₂, dinucleótidos (dNTPs, ATGC), primers reverse y forward, ADN polimerasa, agua y la muestra de ADN extraída (las cantidades y el protocolo se detallan en el Apéndice III). Se siguió el siguiente programa en un termociclador para amplificar la región deseada:

94°C	1 min	} 35 ciclos
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	30 min	
4°C	∞	

El producto del PCR se corrió en una electroforesis en gel de agarosa al 1%. La agarosa es un polímero lineal disuelto en buffer (Tris-acetato, TAE 0.5X) que por uniones de hidrógeno forma un gel. Esta matriz contiene poros cuyo tamaño depende de la concentración de agarosa disuelta. La concentración es referida como el porcentaje de agarosa por volumen de buffer (Harwood et al., 1996). El producto del PCR se carga junto con una solución densa (buffer de carga), en pozos formados previamente en agarosa. Junto con las muestras se corre un marcador de peso molecular (p.e. 100 pb) al conducir un campo eléctrico a través de la matriz y haciendo migrar las moléculas por sus poros. Para visualizar el ADN se empleó bromuro de etidio que fluoresce al ser irradiado con luz ultravioleta (UV). El ADN se extrae de la agarosa por el protocolo señalado en el kit de QIAquick (Apéndice IV) una vez obtenidas las bandas en el gel.

Clonación

Una vez recuperado el producto del PCR, los fragmentos de ADN obtenidos se clonan con la ayuda de vectores de clonación para separar cada hebra amplificada (Brock et al., 1999). La clonación se refiere al proceso de introducir ADN exógeno en una célula huésped (Wong, 1997). Este método se divide en dos, dependiendo de si se requiere o no

ligasa (Zhou, 1997). En esta tesis el producto del PCR fue ligado a un vector de clonación, el vector utilizado fue el pCR®2.1-TOPO® de Invitrogen siguiendo el protocolo del fabricante (Apéndice V).

Una vez que los fragmentos fueron ligados, el ADN recombinante fue introducido a una célula huésped por transformación. De este modo, las moléculas recombinantes son propagadas y replicadas en el huésped (Balbas, 1989; Wong, 1997). La transformación se realizó con un vial de células competentes (células capaces de tomar ADN ambiental) de *E. coli* del mismo kit de clonación TOPO TA Cloning®. El ADN que es mezclado en esta solución forma un complejo y se adhiere a la superficie celular y un rápido choque térmico induce la entrada del complejo al citoplasma (Apéndice V). La presencia del ion magnesio ($MgCl_2$) incrementa el número de transformantes, ya que favorece la estabilidad del ADN al momento de entrar a la bacteria (Balbas, 1989).

Las células transformantes se identificaron de manera directa sembrándolas en placas de agar con medio LB y antibióticos (ampicilina y kanamicina). Estas placas fueron previamente preparadas (Apéndice VI). En el método de identificación directa el vector constituye el sistema de selección, de tal manera que el vector codifica para una función complementaria de la célula, en este caso para la enzima β -galactosidasa. El vector codifica para el extremo amino-terminal y la célula huésped codifica para el extremo carboxilo-terminal y por complementación se observa actividad enzimática en presencia de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -Dgalactoside (X-Gal). Al momento de clonar el ADN en el gen que confiere dicha función, se inactiva la función enzimática. Al no descomponer el X-Gal, las colonias que poseen el plásmido y lograron crecer en presencia del antibiótico, se ven de color blanco, no así las que a pesar de crecer no lograron ligar el fragmento de ADN, que presentan una coloración azul (Balbas, 1989; Zhou, 1997).

Una vez seleccionadas las colonias con las células transformantes, fue necesario recuperar los plásmidos con el procedimiento de purificación de plásmidos del *Kit Montage Plasmid Miniprep₉₆* (Millipore) que se compone de dos fases: el cultivo de las células huésped seleccionadas en el medio apropiado para su crecimiento y la extracción del plásmido de dichas células. El desarrollo del protocolo con modificaciones se presenta en el Apéndice VII.

Secuenciación

La secuenciación del ADN representa el último paso en la caracterización estructural del fragmento que hace posible su análisis (Balbas, 1989). Los plásmidos fueron secuenciados de acuerdo al procedimiento de secuenciación enzimática de Sanger (Apéndice VIII).

Este método enzimático de Sanger, utiliza un templado de ADN de cadena sencilla, un primer corto de ADN y una polimerasa de ADN. En la reacción intervienen deoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) más dideoxirribonucleótidos trifosfatados terminadores (ddNTP). La polimerasa sintetiza la cadena complementaria y al incorporar un ddNTP, la cadena deja de sintetizarse, ya que este nucleótido carece del grupo 3' hidroxilo necesario para la unión fosfodiéster (Balbas, 1989). Los nucleótidos fluorocromados, que se utilizaron en este trabajo se hacen pasar por un lector láser en un secuenciador de capilares *Applied Biosystem Avant-100*. Dicho secuenciador establece el patrón de la secuencia para cada una de las clonas, mismo que se lee directamente.

Análisis de secuencias

Composición

Para realizar el análisis de las secuencias se recurrió al programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, Versión 7.0.5.3 (Hall, 1999), con el cual se lograron separar completamente las secuencias de los insertos de los plásmidos, con ayuda del mapa de caracterización del vector pCR[®]2.1-TOPO[®]. Se verificó la calidad de las secuencias al alinear las hebras 5'-3' y 3'-5' y para los análisis posteriores se utilizaron las secuencias consenso de dicha alineación. Cada una de las secuencias de los fragmentos del gen 16S rADN, provenientes tanto del Canal de Yucatán como de Pozas Azules fueron comparadas en la base de datos de la Basic Local Alignment Search Tool (Blast) de nucleótidos, en el sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI), identificando las secuencias más parecidas a las nuestras (*Best hits*), así como el lugar del cual fueron colectadas para poder establecer una composición aproximada de las localidades de este estudio.

Con la finalidad de agrupar las secuencias de cada una de las librerías, se determinaron diferentes ribotipos en base a la similitud de las secuencias. Para lo cual fue

necesario, con la ayuda del programa, *BioEdit Sequence Aligment Editor*, definir el grado de similitud que comparten entre sí diferentes géneros y especies de cianobacterias, en la región amplificada de 420 pb del 16S rADN con los primers específicos de cianobacterias (Nübel et al., 1997), y determinar si es una región que muestre diferencias que ayuden en el análisis.

Evaluación del muestreo

El análisis de las muestras comenzó al realizar la evaluación de la riqueza obtenida en las librerías de clonas, ya que para estimar la diversidad de un sitio es necesario tener una buena representatividad de la comunidad en la muestra (Huges y Bohannan, 2004). Por lo tanto las librerías del 16S rADN de las localidades comparadas en este trabajo fueron examinadas, con un estimador de riqueza basado en la abundancia, S_{Chao1} . Con la intención de corroborar si las librerías podían ser extrapoladas y representar a toda la comunidad en las localidades. Los estimadores de riqueza de especies evalúan qué tan bien se encuentra representada la diversidad bacteriana en el ambiente dentro de las librerías del 16S rADN. En principio, cuantifican el número de ribotipos presentes en la muestra y luego evalúan si la librería logró representar una fracción significativa de la diversidad en la comunidad. El estimador S_{Chao1} , cuantifica la riqueza en las librerías al realizar submuestras cuyos tamaños se grafican contra la riqueza estimada (Kemp y Aller, 2004).

La diversidad se mide en la variación de un organismo o en sus fenotipos. La diversidad genotípica es cuantificada al examinar directamente el material genético, a partir del método de secuenciación del ADN (Huges y Bohannan, 2004). Las variaciones que se encontraron en los nucleótidos de las secuencias, se evaluaron en índices de diversidad, que valoran tanto la riqueza como la homogeneidad de los OTU⁶. Los índices calculados fueron el índice de Shannon (H) y el de Simpson (D), partir de las siguientes formulas:

$$H = -\sum p_i \ln p_i$$

$$D = 1 / \sum p_i^2$$

Ambos índices se calculan a partir de la proporción del número de individuos (p_i) de la especie i con respecto al total en la muestra (S) (Magurran, 1988; Begon et al., 1996).

⁶ Unidad Taxonómica Operativa, por sus siglas en inglés. En este caso referido a los ribotipos obtenidos.

El índice de Shannon es el más utilizado y se ha aplicado a estudios en microorganismos, aunque más recientemente el índice de Simpson ha sido aplicado en estos estudios. El índice de Shannon se concentra más en la riqueza mientras que el índice de Simpson es más sensible a la abundancia de los OTUs más comunes (Magurran, 1988; Huges y Bohannan, 2004).

Dado que el tamaño de las muestras que se obtuvieron de las localidades, para este trabajo, no fue el mismo, fue necesario aplicar a los datos un análisis de rarefacción (Gotelli y Entsminger, 2006) hacia la muestra más pequeña, lo cual es utilizado para comparar la riqueza entre ambientes que no han sido igualmente muestreados (Gotelli y Colwell, 2001; Huges y Bohannan, 2004).

Inferencia Filogenética

Inicialmente se realizó un árbol de distancias con el algoritmo de neighbor-joining, usando el parámetro de Kimura-2 en el programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, con las secuencias de ambas librerías. Con este árbol se definieron los grupos de secuencias representativas.

La alineación de las secuencias representativas de ambas librerías, cuya calidad fue lo suficientemente buena para poder ser alineadas, además de otras secuencias representativas obtenidas en la base de datos del NCBI, presentadas en el Apéndice IX; fue realizada con el programa *Sequencher 4.2* (para Macintosh). A partir de esta alineación, se realizó el análisis de inferencia filogenética con el programa *PAUP* versión 4.0b10* (para Macintosh). Esta reconstrucción genealógica se efectuó con una medida de distancia Kimura-2 parámetros y el árbol genealógico se obtuvo por neighbor-joining cuyo principio es buscar las relaciones de cercanía que minimicen la longitud total del árbol genealógico, para explicar las diferencias observadas entre los OTU's del estudio (Li, 2000). La estimación estadística para reportar los clados formados se infirió con una análisis de 1000 réplicas en *PAUP**.

RESULTADOS

Descripción de las librerías

En la librería de clonas del Canal de Yucatán fueron obtenidas 144 clonas, de las cuales 136 secuencias de 16S rADN (cada una con alrededor de 420 pb) mostraron ser lo bastante buenas para el análisis. Segmentos del mismo tamaño, fueron obtenidos en 40 secuencias que se consiguieron en la librería de Pozas Azules. Cada una de las secuencias, se comparó con aquellas conocidas, depositadas en la base de datos del GenBank, para obtener una aproximación de la composición en las comunidades de picocianobacterias en el Canal de Yucatán y Pozas Azules, asignando así a cada una de las clonas su afiliación filogenética más próxima (*Best hits*). De los datos obtenidos en la comparación, en un principio fue considerada la afiliación filogenética con mayor porcentaje de similitud, la cual en algunas ocasiones no proporcionó información precisa sobre la identidad de las secuencias, por lo tanto fueron consideradas las siguientes secuencias que presentaron el mismo porcentaje de similitud (Figura 6 y 7).

Las 136 clonas en la librería del Canal de Yucatán, se agruparon en cinco *Best hits* diferentes, caracterizando a la localidad con una composición típica de un mar oligotrófico. Se encontró que 98% de las 136 secuencias resultaron similares (en al menos 99% de la secuencia), al género *Prochlorococcus*, que es el componente más abundante en la columna de agua de las zonas oligotróficas oceánicas. El 2% restante de las clonas, se tuvieron secuencias similares al género *Synechococcus*.

De las clonas en la librería de Pozas Azules se obtuvieron nuevamente cinco *Best hits*, en donde cada una de las 40 clonas mostraron similitud (más de 97%), con secuencias del género *Synechococcus*, reflejando que en esta comunidad la diversidad de picocianobacterias es dominada por este género que se sabe es representativo del picoplancton en aguas epicontinentales.

La información de las clonas de ambas localidades agrupadas en los diferentes grupos filogenéticos de acuerdo a las secuencias más parecidas obtenidas en el Blast (*Best hit*), se presentan en la Tabla 2.

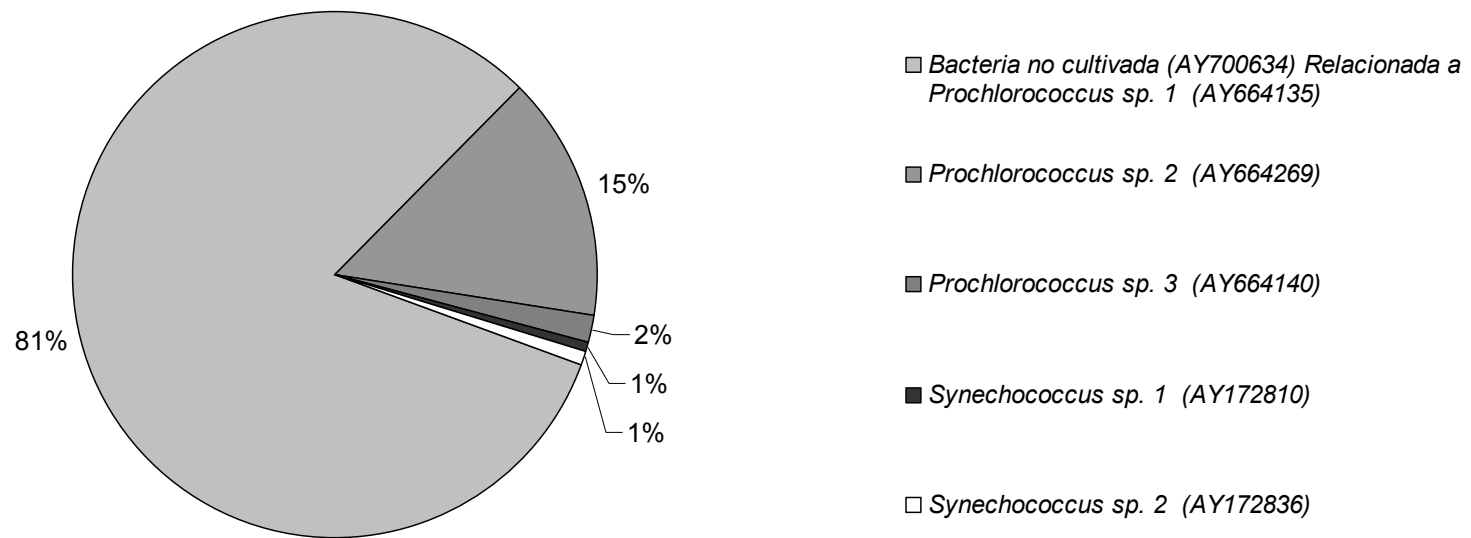


Figura 6. Descripción de la librería en la muestra del Canal de Yucatán.

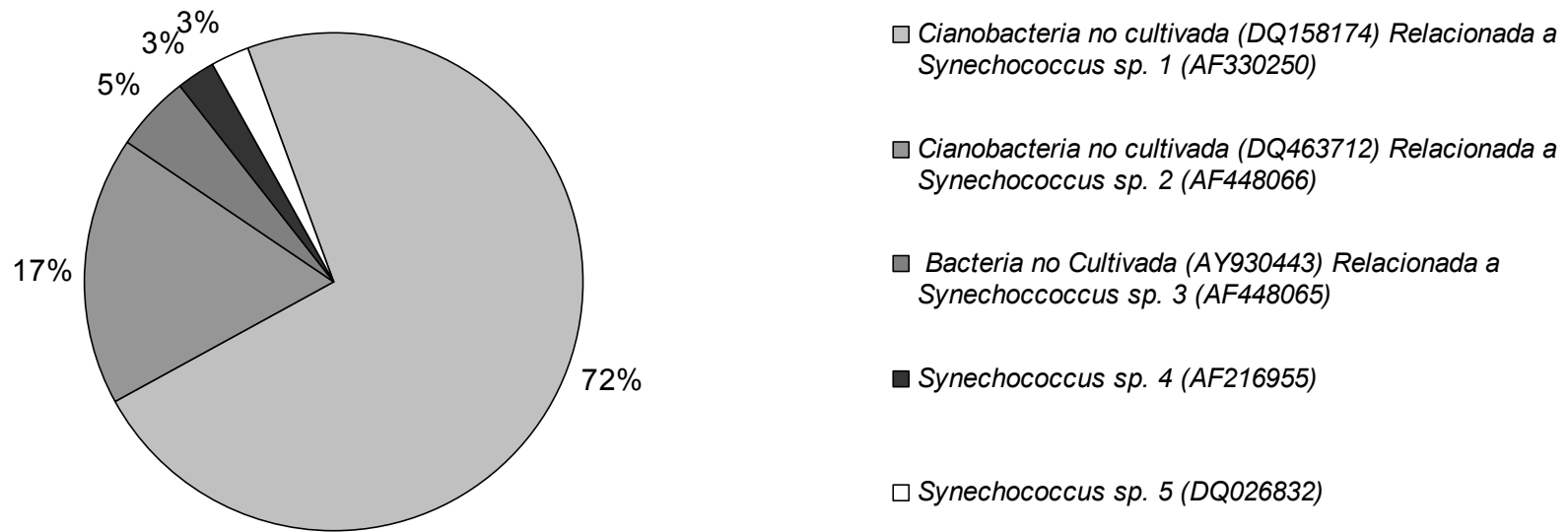


Figura 7. Composición de las clonas en la librería de Pozas Azules en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Afinidad de las secuencias

Al comparar las secuencias de las librerías con la base de datos, no sólo se obtuvieron similitudes con los organismos que han sido registrados previamente, sino también los datos de donde fueron colectados tales organismos. Es decir, obtenemos información de la distribución actual de aquellos organismos con los que se tiene parentesco (Tabla 2).

Tabla 2. Información sobre las clonas de las muestras de picocianobacterias, agrupadas en ribotipos de acuerdo a la secuencia más parecida en la base de datos Blast (Basic Local Alignment Search Tool).

Género	Best hits	Similitud (%)	n	Procedencia	Referencia
Yucatán					
<i>Prochlorococcus</i>	AY700634	99-100	112	Gran Barrera Arrecifal	Bourne y Munn, 2005
	AY664269	99-100	20	Sin información	Sin publicar
	AY664140	99-100	2	Giro oeste del Océano Pacífico	Sin publicar
<i>Synechococcus</i>	AY172810	99	1	Pacífico Ecuatorial	Fuller et al., 2003
	AY172836	99	1	Mar de los Sargazos	Fuller et al., 2003
Pozas Azules					
<i>Synechococcus</i>	DQ158174	97-99	29	Lago Kinneret	Sin publicar
	DQ463712	98-99	7	Lago Tanganyika	Sin publicar
	AY930443	98-99	2	Campo de Arroz	Sin publicar
	AF216955	98	1	Lago en Japón	Robertson et al., 2001
	DQ026832	98	1	Lago Erie	Sin publicar

Así es que, la mayoría de los representantes del género *Prochlorococcus* que se presentaron en la muestra del Canal de Yucatán provienen de ambientes marinos dentro de la zona tropical (40°N a 40°S); incluso las secuencias relacionadas al grupo de *Synechococcus* tienen similitud con organismos colectados en el Pacífico y el Mar de los Sargazos (Figura 8).

En la librería de Pozas Azules, los miembros del género *Synechococcus* que resultaron ser más parecidos a los obtenidos en este estudio, provienen de la columna de

agua en lagos distribuidos alrededor del mundo: lago Biwa en Japón, lago Kinneret en Israel, lago Erie en Norteamérica y lago Tanganyika en Tanzania (Figura 9).

A partir de los datos anteriores, se refleja una aproximación de la composición de las comunidades de picocianobacterias en las localidades del Canal de Yucatán y Pozas Azules. Dicha composición es diferente entre las comunidades. Una es típica de un ambiente marino, mientras que en la otra, la cual forma parte de un sistema hidrológico a la mitad del desierto, es parecida a la de otros cuerpos de agua epicontinentales.



Figura 8. Mapa de ubicación de las secuencias más parecidas en el Blast de la composición del Canal de Yucatán.



Figura 9. Mapa de ubicación de las secuencias más parecidas en el Blast de la composición de Pozas Azules en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Descripción de las secuencias

En la región amplificada de 420 pb, el porcentaje de similitud entre los géneros de cianobacterias oscila entre el 70-99%, mientras que dentro de los géneros dicho porcentaje es entre 80-99% (Tabla 3). Estos rangos indican que en este segmento existen diferencias que permiten diferenciar un género de otro, así mismo distinguir diferentes organismos dentro de géneros de cianobacterias, con un rango de similitud menos amplio. Estos datos muestran que el segmento amplificado de 420 pb (aproximadamente 30% del tamaño total del gen 16S), exhibe variación nucleotídica suficiente para realizar el análisis agrupando las secuencias en ribotipos con una similitud del 100%, de tal manera que sea posible poder distinguir géneros distintos o incluso otras unidades taxonómicas menores, dentro de las librerías de acuerdo a lo observado en la comparación.

Tabla 3. Comparación de la región amplificada en secuencias del 16S completo cianobacterias tomadas del GenBank.

	Secuencias comparadas	Similitud (%)
Entre géneros		
<i>Synechococcus</i> / <i>Microcystis</i>	2	99.5
<i>Oscillatoria</i> / <i>Microcoleus</i>	2	90
<i>Synechococcus</i> / <i>Synechocystis</i>	2	84
Cianobacterias del Antártico	2	82
Cianobacterias no cultivadas	4	75.2
Cianobacterias	9	71
Dentro de géneros		
<i>Microcystis</i>	2	99.2
<i>Arthrospira</i>	2	99.2
<i>Prochlorococcus</i>	2-4	97.1-99.5
<i>Synechococcus</i>	2-3	98-80
<i>Phormidium</i>	2	85

Comparación entre comunidades

En las agrupaciones realizadas al determinar ribotipos (100% de similitud de las secuencias de 420 pb), entre las secuencias del Canal de Yucatán se reconocieron un total de 58 ribotipos; sólo 43% del total de la librería está representado en ribotipos distintos. De un total de 40 clonas en la muestra de Pozas Azules, 28 ribotipos agrupan estas secuencias en un 70% de ribotipos que resultaron ser diferentes entre sí. En las Figuras 10 y 11 se muestra la distribución de abundancias de los ribotipos en cada una de las localidades, en donde se observa que la distribución de abundancias es similar en ambas librerías, del tipo serie geométrica (Kemp y Aller, 2004). Esta distribución se caracteriza por la presencia de pocos ribotipos abundantes y varios ribotipos que aparecen pocas veces manifestando a su vez que la riqueza estimada en las librerías muestra gran homogeneidad.

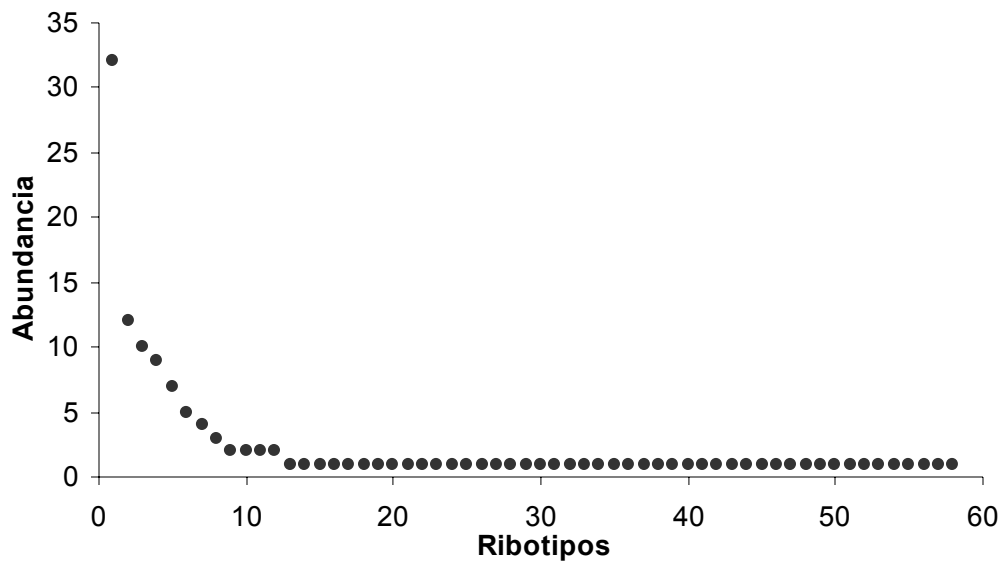


Figura 10. Distribución de las abundancias en los ribotipos en la muestra del Canal de Yucatán.

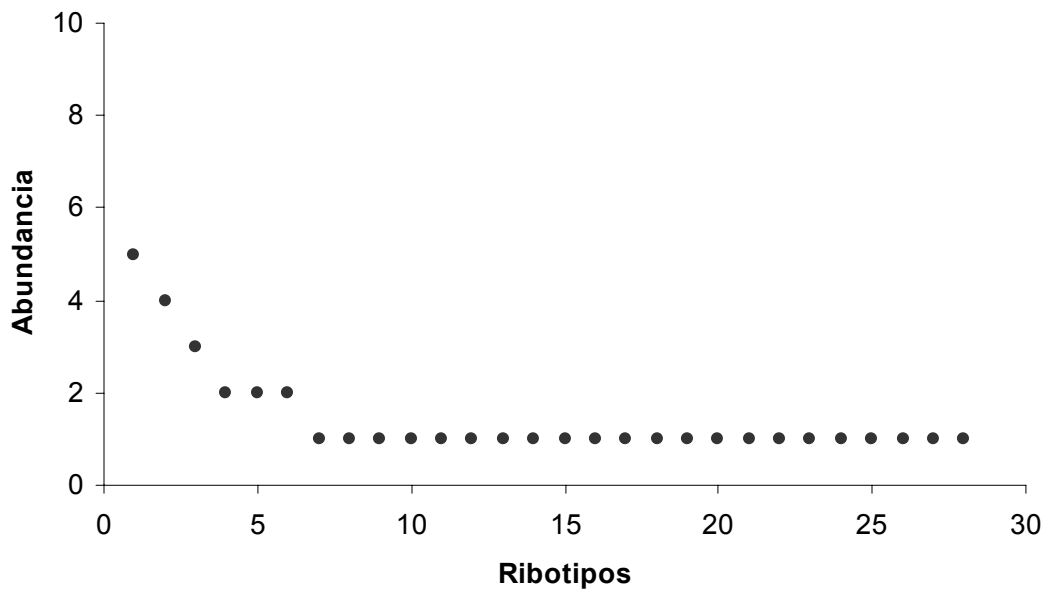


Figura 11. Distribución de las abundancias en los ribotipos en la muestra de Pozas Azules en Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Estimador de Riqueza S_{Chao1}

La librería del Canal de Yucatán tuvo 58 ribotipos, en donde el valor de riqueza S_{Chao1} , indicó que 269 ribotipos diferentes serían suficientes para representar la diversidad de la comunidad en este ambiente. Es decir, que con la librería del Canal de Yucatán solamente se logró obtener el 21% de la riqueza que se estima en una comunidad como esta.

En el caso de la muestra que representa a la localidad de Pozas Azules, en donde la librería de clonas se agrupa en 28 ribotipos, el estimador predice que 86 ribotipos pueden bien representar la riqueza de la comunidad. Por lo tanto la librería que se obtuvo de la muestra en Pozas Azules representa casi una tercera parte de la riqueza esperada en esta comunidad de picoplancton. Los valores del estimador S_{Chao1} se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Valores obtenidos del estimador de riqueza S_{Chao1} .

	Canal de Yucatán	Pozas Azules
Representantes de la librería	136	40
Ribotipos observados	58	28
Ribotipos previstos por S_{Chao1}	269	86
Riqueza muestreada (%)	21	32

Diversidad

Los valores de los índices de diversidad, junto con sus respectivos valores de homogeneidad (J) y (E), se muestran en la Tabla 5, en donde es notable una disconformidad entre ambos índices. Mientras que para el índice de Shannon la muestra más diversa es la que corresponde al Canal de Yucatán ($H=3.47$) con una homogeneidad media (0.67); para Simpson la muestra de Pozas Azules es la más diversa ($D=19.04$) con una homogeneidad mayor (0.47) que la encontrada en el Canal de Yucatán (0.094).

Tabla 5. Índices de diversidad basados en los ribotipos obtenidos de las secuencias del 16S rADN en ambas localidades.

Localidad	N	S ^a	Shannon		Simpson	
			H ^b	J ^c	D ^d	E ^e
Canal de Yucatán	136	58	3.47	0.67	12.24	0.094
Pozas Azules	40	28	3.16	0.85	19.04	0.47

^a Número total de ribotipos (con 100% de similitud) en la muestra.

^b El índice de Shannon: $H = -\sum p_i \ln p_i$, donde p_i es la proporción de clonas i respecto al total de ribotipos.

^c Es la homogeneidad del índice de Shannon; $J = H/\ln S$.

^d El índice de Simpson se calculó de $D = 1/\sum p_i^2$. El valor de D puede variar desde 1 hasta D_{\max} .

^e La homogeneidad (E) se calculó a partir de D como, $D = D/D_{\max}$ donde $D_{\max} = S$; S es el número total de ribotipos.

Dado que la librería del Canal de Yucatán exhibe un número de clonas mucho mayor (136) que las clonas en la librería de Pozas azules (40), la diversidad fue comparada entre las localidades, con un análisis de rarefacción (Figura 13) al tamaño de la muestra de Pozas Azules. Según este análisis, en una librería con 40 clonas en la muestra del Canal de Yucatán son observados 23 ribotipos. En este punto el intervalo de confianza coincide con el número de ribotipos observados, por lo que no existe una diferencia significativa en la riqueza muestreada por las librerías a este punto.

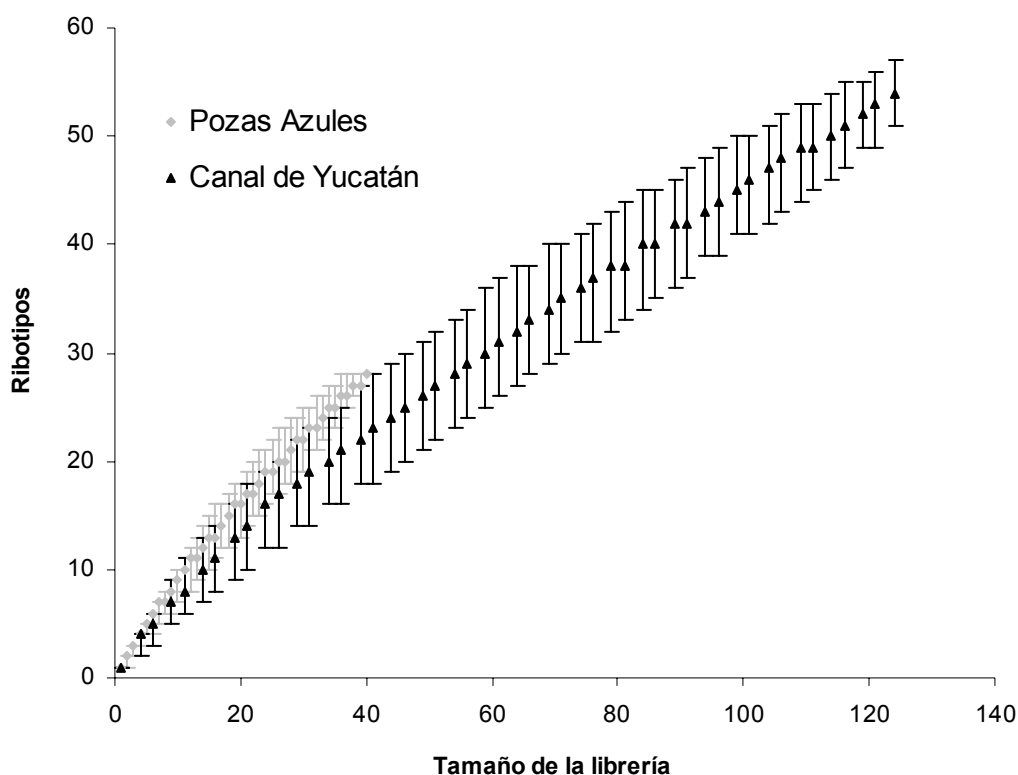


Figura 12. Curva de rarefacción. Ribotipos observados en la muestra del Canal de Yucatán ajustada al tamaño de la muestra de Pozas Azules. Los intervalos de confianza son de 95%.

Genealogía

El árbol genealógico del fragmento del 16S rADN obtenido por neighbor-joining (Figura 13), muestra dos clados principales: Uno donde se agrupan los representantes del picoplancton marino y el otro con miembros del picoplancton que habitan en aguas epicontinentales. La información al respecto de las secuencias elegidas de cada una de las librerías se presenta en el Apéndice X.

En el clado del picoplancton marino se encuentran las secuencias representativas de la librería⁷ del Canal de Yucatán (CY). A su vez éstas secuencias se agruparon en dos clados menores, en el primero las secuencias que de acuerdo a la caracterización corresponden a *Prochlorococcus* se relacionan con aquellos *Prochlorococcus* identificados por su capacidad de adaptarse a condiciones de alta intensidad lumínica.

⁷ Las secuencias tanto del Canal de Yucatán como de Pozas Azules, utilizadas en la genealogía fueron seleccionadas del análisis de distancia inicial.

Mientras que en el segundo clado se observan aquellas identificadas como *Synechococcus* en el Canal de Yucatán junto con otros representantes de este género, relacionados con *Prochlorococcus* adaptados a zonas de baja luz.

En el clado del picoplancton continental se encuentran agrupadas las secuencias obtenidas de la librería de Pozas Azules (PA) junto con las secuencias extraídas de la base de datos que resultaron ser filogenéticamente parecidos además de otras secuencias del género *Microcystis*. También están presentes en este clado secuencias del grupo *Cyanobium*.

En ninguno de los dos grandes clados de picoplancton se observa una relación cercana entre las secuencias representativas de cada una de las librerías, con aquellas que resultaron parecidas en el Blast. Sobre todo en el caso de las secuencias de Pozas Azules donde la mayoría de las secuencias formaron un clado pequeño y divergente. Sin embargo, son las secuencias del Canal de Yucatán las que se agrupan de forma más cercana con sus afinidades de Blast, particularmente en el grupo de *Synechococcus* presentes en el clado de baja luz. Todas las secuencias incluidas en este análisis pertenecen a ribotipos distintos, lo cual se observa principalmente en la divergencia que muestran las secuencias de Pozas Azules.

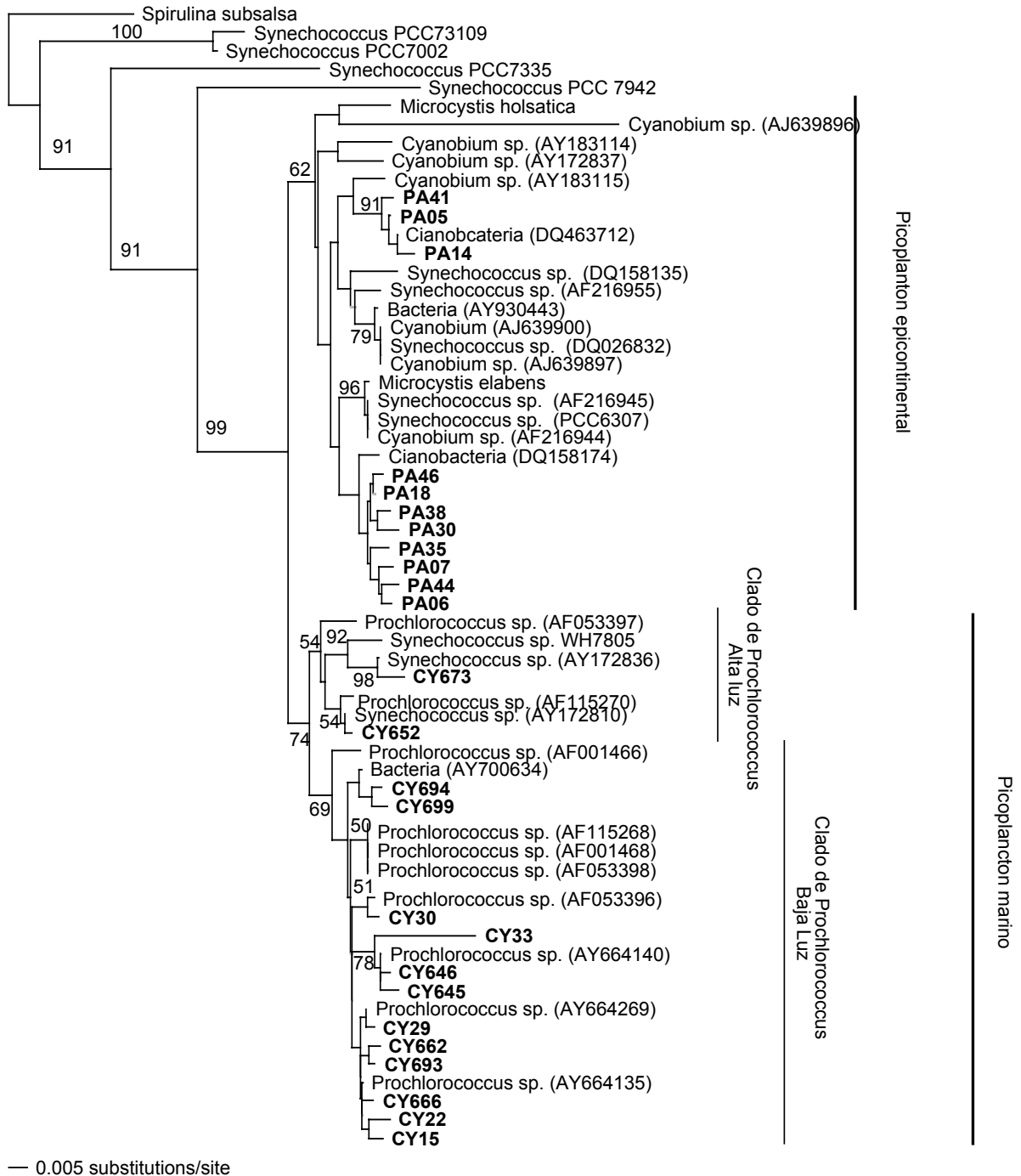


Figura 13. Árbol genealógico de picocianobacterias del fragmento de 16S rADN obtenido por neighbor-joining construido con el estimador de distancia Kimura-2 parámetros. En los paréntesis se indican los números de acceso del GenBank y los números en las ramas los valores de bootstrap.

DISCUSIÓN

Composición de picocianobacterias

Aunque hace falta mucha información de los genomas de los principales géneros de las picocianobacterias, los avances en el área con los pocos genomas secuenciados de *Prochlorococcus* y *Synechococcus*, sugieren que con una o dos copias (que resultan ser semejantes) el rARN es una herramienta apropiada para explorar relaciones genotípicas, fenotípicas y ambientales (Urbach et al., 1998; Dufresne et al., 2003; Fuller et al., 2003; DeLong, 2005). Es por eso que en este estudio, a partir de clonas ambientales del 16S rADN se logró brindar una caracterización de las comunidades de picocianobacterias, no sólo en la localidad Pozas Azules sino también en el Canal de Yucatán. El fragmento utilizado de este marcador aporta suficiente información de dos regiones variables y ha sido utilizado en varios trabajos de diversidad de cianobacterias en muestras ambientales (Bouttec et al., 2006).

La composición caracterizada por la presencia del género *Prochlorococcus* y en menor proporción por el género *Synechococcus*, típica de un ambiente marino, identificada en la librería de clonas del Canal de Yucatán, se ha reportado en otros trabajos donde ha sido evaluada la composición y diversidad del canal de Yucatán (Souza et al. en prensa). Esta composición coincide con los trabajos que se han realizado de diversidad microbiana en el océano que señalan al grupo *Prochlorococcus* ampliamente distribuido principalmente en regiones oligotróficas (Chisholm et al., 1988; Giovannoni, 1990; Partensky et al., 1999; Kirchman, 2000; Hansell, 2001; Venter et al., 2004). De igual forma, la presencia de miembros del género *Synechococcus* en el Canal de Yucatán era esperada, ya que a diferencia de *Prochlorococcus*, se distribuye en una gran cantidad de ambientes acuáticos y en el océano se caracteriza por preferir las zonas más cercanas a la costa con una mayor concentración de nutrientes (Robertson et al., 2001; Ernst et al., 2003; Becker et al., 2004). Ciertamente ambos géneros que componen la muestra del Canal de Yucatán difieren en gran medida en su fisiología y ecología, así como en que cada grupo tiende a formar diferentes ecotipos, ya sea en diferentes regiones de la zona eufótica en la costa o en mar abierto (Moore et al., 1998; Urbach y Chisholm, 1998; Hess,

2004; Ferris y Palenik, 1998), reflejando así la distribución relativa de estos dos géneros en diferentes gradientes del océano y la dominancia de *Prochlorococcus* por lo menos en la fracción utilizada en esta tesis.

En Pozas Azules, la composición es dominada por el género *Synechococcus*, que ha sido identificado y caracterizado como miembro importante del picoplancton ya sea en ambiente marinos (Fuller et al., 2003; Six et al., 2004) o en aguas epicontinentales sobre todo en lagos con una condición mesotrófica de nutrientes, como parte del biofilm o en la columna de agua (Becker et al., 2004). La distribución de *Synechococcus* sugiere que este grupo ha sufrido radiación adaptativa dentro de varios ambientes (Ernst et al., 2003). A pesar de que los estudios previos sobre la composición de Cuatro Ciénegas mostraron que el 50% de los filotipos de bacterias (diferentes de cianobacterias) resultaron estar relacionados a taxa marinos (Espinosa, 2005; Souza et al., 2006), la composición de picocianobacterias en Pozas Azules resultó estar relacionada con organismos que habitan en lagos epicontinentales (Robertson et al., 2001; Crosbie et al., 2003; Ernst et al., 2003).

Las composiciones obtenidas distan de ser similares, aunque habitan ambientes oligotróficos salinos (Melo et al., 2000; Badino et al., 2004; Espinosa-Asuar, 2005), probablemente a causa de la gran diversidad genética que presentan estos grupos, logrando adaptarse a nichos ecológicos muy específicos (Scanlan y West, 2002; Palenik et al., 2003), sobre todo cuando la composición físico-química del agua es diferente en éstas localidades (Badino et al., 2004).

Es evidente que los miembros de las comunidades analizadas en esta tesis, están relacionadas con organismos distribuidos en sitios distantes, lo cual implica que debido a la complejidad del estudio de un grupo como el de las picocianobacterias, se desconoce o es poca la información acerca de su taxonomía y filogenia (Ernst et al., 2003), y por lo tanto sobre su distribución geográfica. Sin embargo, también hay que reconocer que la información en la base de datos es limitada, sobre todo porque no todas las secuencias que se generan son depositadas en la base del GenBank o simplemente no poseen información acerca de los sitios de colecta. Así que cuando sometemos las secuencias al Blast, obtenemos cierto grado de relación filogenética con aquellos grupos que han sido previamente caracterizados en diversas partes del mundo, sesgando la información sobre

la composición de las comunidades al otorgar identidad a los organismos en base a lo previamente reportado. Existen al respecto estudios en los que se muestra la poca información que se tiene actualmente en las bases de datos, especialmente de *Prochlorococcus* y *Synechococcus* (Rusch et al. 2007). También se ha visto que la presencia de las picocianobacterias responde a un gradiente vertical de luz y nutrientes en la zona eufótica, más que a su distribución geográfica (Moore y Chisholm, 1999; Scanlan y West, 2002; Bibby et al., 2003; Six et al., 2004). Lo anterior se ha comprobado al encontrar secuencias de picocianobacterias más similares entre cepas aisladas del océano Pacífico y océano Atlántico, que en aquellas colectadas en la misma localidad a diferentes profundidades (Scanlan y West, 2002). Por lo tanto los análisis de caracterización deben soportarse con el muestreo incluso, de un gradiente de profundidad en la columna de agua.

Diversidad

Mucho se ha enfatizado en la importancia que tiene el estimar la diversidad, como un requisito en el estudio de la taxonomía, biogeografía y la conexión de los organismos en las comunidades (Martin, 2002; Curtis et al., 2002). Sin embargo, estimar la diversidad de especies microbianas, en un principio tiene sus limitaciones, dada la dificultad que existe para definir dichas especies (Martin, 2002; Cohan, 2002). Anteriormente la identificación de los organismos requería utilizar métodos de cultivo, lo cual es casi imposible para la mayoría de los procariontes (cerca del 99% no han sido cultivados) (Pace, 1997; Fuhrman y Campbell, 1998). Los sistemáticos utilizan la divergencia del ADN, particularmente del gen 16S rADN amplificado de muestras ambientales, para identificar a los organismos (Schmidt et al., 1991; Huges et al., 2001; Cohan, 2002), aunque con este método surgieron nuevas limitantes (Martin, 2002). El identificar especies bacterianas es aún un tópico no resuelto, que el gen 16S rADN por si solo no puede resolver pero si dar una primera aproximación (Fuhrman y Campbell, 1998; Rossello-Mora y Amann, 2001). En este estudio la comparación que se realizó con 420 pb del segmento de 16S rADN, mostró amplios rango de variación y por lo tanto los ribotipos fueron formados con 100% de similitud en las secuencias, que en su mayoría resultaron variar en un rango de 99-94%. Los ribotipos del Canal de Yucatán tuvieron

secuencias con diferencias hasta en 25 nucleótidos. Si bien se sugiere agrupar las secuencias obtenidas del gen 16S rADN en ribotipos, cuyas secuencias compartan al menos el 97% de similitud (Cohan, 2002; Rossello-Mora y Amann, 2001), no toman en cuenta la compleja estructura de las comunidades, ya que algunos estudios muestran que miembros del picofitoplancton que ni siquiera comparten el mismo sistema fotosintético, en sus secuencias del 16S rADN son cerca del 97-98% similar. En los estudios filogenéticos se ha observado que estos organismos forman un clado de cianobacterias unicelulares que podrían ser considerados la misma especie si fueran agrupados por el criterio del 97% (Fuhrman y Campbell, 1998; Crosbie et al., 2003; Giovannoni y Stingl, 2005). En particular, los dos ecotipos del género *Prochlorococcus*, distintos ecológicamente y fisiológicamente, difieren 2% en su 16S rADN (Moore et al., 1998). Así que agrupar secuencias con 97% de similitud, sobre todo en el grupo de las picocianobacterias puede ser un error. Incluso los datos de la diversidad genética en las aguas oligotróficas, particularmente en el océano muestran una gran diversidad dentro del género *Prochlorococcus* (Venter et al., 2004).

Si bien existe una disparidad en el tamaño de las librerías, los datos de riqueza y diversidad arrojaron información interesante, como lo es el resultado del estimador S_{Chao1} ; donde aunque la muestra del Canal de Yucatán es mayor, la riqueza presente en tal librería es menor que en Pozas Azules, aun cuando S_{Chao1} tiende a subestimar la riqueza en las librerías de menor tamaño (Kemp et al., 2003). En general, en ninguna de las muestras se representa ni la mitad de la riqueza de la comunidad, sin embargo es importante la medición de los índices de diversidad, debido a que son un parámetro bastante útil en el estudio, descripción y comparación de las comunidades. Comparando la diversidad en las comunidades de esta tesis a partir de los ribotipos, se obtiene que la localidad de Pozas Azules es más diversa, en donde se estimó una mayor riqueza y la abundancia de los ribotipos en la muestra es más homogénea tal y como lo indica el índice de Simpson, a pesar de que el tamaño de la muestra es menor que en la librería del Canal de Yucatán, ya que el índice de Simpson sacrifica sensibilidad al tamaño de la muestra por sensibilidad a la abundancia de los OTUs más comunes. Ciertamente el índice de Shannon ha sido ampliamente utilizado en comunidades microbianas, pero la aplicación de índices como el de Simpson es importante sobre todo en aquellas comunidades que no han sido

ampliamente muestreadas (Huges y Bohannan, 2004). Por el contrario, el índice de Shannon apunta a la comunidad del Canal de Yucatán como la más diversa, pero esta valoración es afectada por la sensibilidad que el índice de Shannon tiene al tamaño de la muestra (Magurran, 1988; Huges y Bohannan, 2004). En realidad todavía no existe un consenso para utilizar uno u otro índice, ya que indudablemente diferentes índices muestran diferentes aspectos de una comunidad (Huges y Bohannan, 2004) pero estos índices son una importante herramienta en la evaluación de las comunidades microbianas.

A pesar de la gran disparidad en el tamaño de las librerías, la riqueza presente en ambas librerías justo al tamaño de la muestra más pequeña, no presenta diferencias en el análisis de rarefacción, otorgando solidez a los resultados de diversidad. La rarefacción incluso señaló que la riqueza en las muestras no fue exhaustivamente muestreada, ya que la relación riqueza-esfuerzo (se entiende por esfuerzo como el tamaño de la librería) no es curvilínea (Figura 12).

Genealogía

El análisis de las secuencias de rADN desde su introducción ha producido mucha información como una herramienta que ayuda en el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas que presentan los organismos (Ludwig et al., 1998) sobre todo el gen 16S rADN en el estudio de las comunidades de cianobacterias (Urbach et al., 1998; Honda et al., 1999; Ernst et al., 2003). Tal es el caso de esta tesis, donde el análisis de distancia revela la relación de parentesco entre los organismos encontrados en la localidad de Pozas Azules y el Canal de Yucatán. En donde los *Prochlorococcus* hallados en el Canal de Yucatán se agrupan con otros *Prochlorococcus* en un clado que se plantea más reciente (Dufresne et al., 2003) y que corresponde a la agrupación de este género, caracterizada por la baja proporción de Chl *b/a*, en la región más superficial en la zona eufótica, donde normalmente la concentración de nutrientes y la intensidad de luz es alta (Moore et al., 1998; Rocop et al., 1999; Dufresne et al., 2003; Rocop et al., 2003). Por lo tanto, el hecho de tener agrupadas en este clado los *Prochlorococcus* del Canal de Yucatán, es coherente ya que el registro de muestreo menciona que la colecta se realizó en los primeros cinco metros de la columna de agua. Las secuencias del género *Synechococcus* obtenidas de la misma muestra, se agruparon con otras secuencias de

Synechococcus dentro del clado que agrupa cepas de *Prochlorococcus* adaptados a una baja intensidad de luz, junto con la cepa de *Synechococcus* WH7805 colectada en la superficie marina (Honda et al., 1999). En estos clados se observa la cercana relación entre los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus* que conforman al picoplancton en los diferentes cuerpos de agua marina. Este tipo de clados donde los géneros *Prochlorococcus* y *Synechococcus* se relacionan, es constante en varios de los árboles filogenéticos realizados en los múltiples trabajos de diversidad de cianobacterias (Ferris y Palenik, 1998; Urbach et al., 1998; Honda et al., 1999; Partensky et al., 1999; Rocap et al. 2003). En general, las agrupaciones obtenidas dentro del clado correspondiente al picoplancton marino en esta genealogía, forman parte del grupo 6 de la filogenia de cianobacterias propuesta por Honda et al. (1999) (Figura 2), en la cual se muestra que *Prochlorococcus* está más cercanamente relacionado a *Synechococcus* marinos (Honda et al., 1999; Rocap et al., 1999; Fuller et al., 2003).

Por otra parte se observa que la comunidad de picocianobacterias en Pozas Azules no tiene una relación cercana con las comunidades del Canal de Yucatán ni con ningún otro de los representantes del picoplancton marino. Cada uno de los *Synechococcus* que representaron la comunidad en Pozas Azules fue agrupado en el clado del picoplancton de aguas epicontinentales, con aquellas que se sabe provienen de otros lagos alrededor del mundo. Además de agruparse con *Synechococcus* epicontinentales, estas secuencias se relacionan con representantes del género *Cyanobium*, mismo que al igual que *Synechococcus* comprende dos grupos fisiológicamente diferentes: aquellos incapaces de crecer en medios marinos y otros con cierta tolerancia por las sales (Ernst et al., 2003). Este género fue separado de *Synechococcus* utilizando características morfológicas, ya que previamente estos géneros habían sido agrupados en base a marcadores moleculares debido a su similitud genómica (Komárek y Hauer, 2004; Willame et al., 2006).

Se sabe que *Synechococcus* es un género ampliamente distribuido en el picoplancton de aguas continentales, que al parecer presenta un radiación adaptativa dependiente del ecosistema, que se agrupa incluso conforme al contenido de pigmentos, sobre todo de PE y PC (Ernst et al., 2003; Crosbie, 2004). Por lo tanto, los dos clados en los que divergen las clonas de Pozas Azules pueden indicar que lejos de ser similares a otras picocianobacterias, éstas forman grupos distintos que divergieron hace tiempo en un

ambiente completamente distinto. Tal vez examinando más de cerca la morfología de los organismos presentes en estos dos clados, se trate de cepas que poseen una composición distinta de pigmentos, en particular la composición de ficobilinas.

Dado que organismos relacionados al genero *Synechococcus*, al parecer están presentes de manera significativa en la comunidad de Pozas Azules, un punto discutible acerca de este género es su amplia presencia en una gran cantidad de modelos filogenéticos de cianobacterias, sugiriendo que no se trata de un taxon natural (Urbach et al., 1998; Honda et al., 1999; Robertson et al., 2001, Ernst et al., 2003). Sin embargo, la combinación de presentar las características morfológicas más simples y hábitat variable puede sugerir que *Synechococcus* es un stock ancestral de cianobacterias. Por lo tanto se requiere acumular información de estudios de evolución molecular y de estudios sobre sus características fenotípicas que nos ayuden a entender qué tan diverso es este grupo.

CONCLUSIONES

La composición de picocianobacterias obtenida por la amplificación del gen 16S rADN, en la columna de agua de Pozas Azules se caracterizó por la presencia del género *Synechococcus*, dominante en gran parte de las comunidades del picoplancton en cuerpos de agua epicontinental. Mientras en la muestra del Canal de Yucatán en la composición de picocianobacterias fueron encontrados miembros de los dos principales géneros del picoplancton marino, *Prochlorococcus* y *Synechococcus*.

En una primera caracterización de la comunidad picoplanctónica, la muestra de Pozas azules parece tener una diversidad de picocianobacterias mayor que la que se puede encontrar en un ambiente marino como el Canal de Yucatán.

En el análisis genealógico realizado con el gen 16S rADN, no se encuentra ninguna relación de los organismos presentes en Pozas Azules con aquellos del Canal de Yucatán, ni con ningún otro miembro del picoplancton marino. Por lo tanto la composición de picocianobacterias en Pozas Azules es típica de aguas epicontinentales y carece de similitud con comunidades marinas.

Esta tesis sugiere que el grupo de picocianobacterias no representa un modelo biológico que ayude a descifrar y comprender el origen de un ecosistema tan valioso como lo es este oasis justo a la mitad de un desierto que lo ha albergado durante tanto tiempo.

Sin embargo, nuestros datos aportan información valiosa acerca de la historia evolutiva de las picocianobacterias, ya que el registro geológico indica que el valle de Cuatro Ciénegas dejó de estar en contacto con el mar hace aproximadamente 95 ma, aunque hay evidencia de que la última vez en que pudo haber existido un ambiente que favoreciera depósitos costeros fue entre 35-23 ma. Por lo tanto, los géneros *Synechococcus* y *Prochlorococcus* en columna de agua han estado separados por lo menos el mismo tiempo que lleva Cuatro Ciénegas separado del mar.

PERSPECTIVAS

Para describir de forma más amplia la composición del picoplancton en estas localidades es necesario combinar el análisis molecular del 16S rADN ambiental con estudios de microscópica, taxonomía y el cultivo de los organismos presentes en las localidades.

Si el ecosistema acuático presente en Cuatro Ciénegas en realidad guarda relación de ancestría con organismos marinos, es importante establecer la relación evolutiva de los organismos, estimando el tiempo de divergencia entre las comunidades actuales de Cuatro Ciénegas con aquellas en el océano con la finalidad de esclarecer cual ha sido el desarrollo de este ecosistema.

Sería importante trabajar con un marcador diferente al 16S ADN en los diferentes grupos de bacterias presentes tanto en los cuerpos de agua de Cuatro Ciénegas como en los oceánicos, que permitan hacer un análisis de reloj molecular.

Es de suma importancia continuar con los avances en las técnicas que se han aplicado al estudio de la ecología microbiana, para poder aplicarlos en este tipo de ecosistemas donde la presencia de grupos microbianos ofrece una gran cantidad de información.

REFERENCIAS

- Abascal, A.J., J. Sheinbaum, J. Candela, J. Ochoa y A. Badam (2003). Analysis of flow variability in the Yucatan Channel. *J. Geophys. Res.* 108 (C12):11-1-11-18.
- Adame, MF. (2004). Fracciones de talla de fitoplancton en un ecosistema limnetico tropical en el lago Alchichica, Puebla. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Biología. UNAM. 91 p.
- Amann, R.L., W. Ludwig y K.H. Schleifer (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microb. Rev.* 59(1):143-169.
- Badino, G. et al. (2004). Bajo el Desierto: el misterio de las aguas de Cuatro Ciénegas. Tintoretto editzioni, Italia. 272 pp.
- Balbas, P. (1989). Ingeniería Genética y Biotecnología. OEA, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington. 86 pp.
- Becker, S., A.K. Singh, C. Postius, P. Böger y A. Ernest (2004). Genetic diversity and distribution of periphytic *Synechococcus* spp. in biofilms and picoplankton of Lake Constance. *FEMS Microbiology Ecology.* 49:181-190.
- Begon, M. et al. (1996). Ecology. Individuals, Populations and Communities. Blackwell Scientific Publications. 3rd ed. 1068 pp.
- Bibby, T.S., L. Mary, J. Nield, F. Partensky y J. Barber (2003). Low-light-adapted *Prochlorococcus* species possess specific antennae for each photosystem. *Nature.* 424: 1051-1054.
- Biggs, D.C., A. Gallegos, I. Victoria, J. Aldeco, H. Herrera y D. Lopez (1998). Upper Layer Geostrophic Volume Transport of the Yucatan Current and Loop Current, 1994-1995. *Caribbean Journal of Science.* 34 (1-2): 33-40.
- Bourne, D.G. y C.B. Munn (2005). Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Environmental Microbiology.* 7 (8):1162-1174.
- Boutte, C., S. Grubisic, P. Balthasar, A. Wilmette (2006). Testing of primers for the study of cyanobacterial molecular diversity by DGGE. *J. Microb. Meth.* 65 (3):542-550.
- Brock, T. et al. (1999). Biology of Microorganisms. Price Hall. 6th ed. USA. 874 pp.
- Bunge, L., J. Ochoa, A. Badam, J. Candela y J. Sheinbaum (2002). Deep flows in the Yucatan Channel and their relation to changes in the Loop Current extension. *J. Geophys. Res.* 107 (C12):26-1-26-7.
- Callieri, C. y J. Stockner (2002). Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *Journal of limnology.* 61 (1): 1-14.
- Campbell, L., E.J. Carpenter y V. J. Iacono (1983). Identification and Enumeration of Marine Chromococoid Cyanobacteria by Immunofluorescence. *Appl. Env. Microb.* 46 (3):553-559.
- Campbell, L., H. A. Nolla, D. Vaultot (1994). The importance of *Prochlorococcus* to Community Structure in the Central North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanog.* 39 (4):954-961.
- Candela, J. et al. (2002). The potential vorticity flux through the Yucatan Channel and the Loop Current in the Gulf of Mexico. *Geophys. Res. Lett.* 29 (22):16-1-16-4.

- Carmona, J. (1990). Ficoflora de Manantiales de la huasteca Potosina. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Biología. UNAM. 105 p.
- Cartagena, MG. (2004). Taxonomía y distribución de cianofitas filamentosas de la huasteca, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Biología. UNAM. 211 p.
- Catzim, L., S. López-Adrián, R.C. Barrientos-Medina (2004). Registros del género *Synechococcus* (Cyanoprokaryota) en Yucatán, México. Anales del Instituto de Biología. Serie Botánica. 75 (002):225-228.
- Chisholm, S.W., R.J. Olsen, E.R. Zettler, R. Goericke, J.B. Waterbury y N.A. Welschmeyer (1988). A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. Nature. 334:340-343.
- Cifuentes, J.L. (1988). El océano y sus recursos. Fondo de Cultura Económica. México.
- Cohan, F.M. (2002). What are Bacterial Species?. Annu. Rev. Microbiol. 56:457-487.
- Corzo, A., F. Jiménez-Gomez, F.J.L. Gordillo, R. G. Ruiz y F. X. Niell (1999). *Synechococcus* and *Prochlorococcus*-like population detected by flow cytometry in a eutrophic reservoir in summer. Journal of Plankton Research. 21 (8):1575-1581.
- Crosbie, N.D., M. Pöckl y T. Weisse (2003). Dispersal and Phylogenetic Diversity of Nonmarine Picocyanobacteria, Inferred from 16S rRNA Gene and *cpcBA*-Intergenic Spacer Sequence Analyses. Appl. Env. Microb. 69 (9):5716-5721.
- Cuesta, I.J. (1993). Ecología de la Ficoflora de los manantiales de San Lorenzo, Puebla: flora ficología de la Cuenca del Río Papaloapan. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Biología. UNAM. 119 p.
- Curtis, T. P., W. T. Sloan y J. W. Scannell (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. PNAS. 99 (16):10494–10499.
- DeLong E.F. y D.M. Karl (2005). Genomic perspectives in microbial oceanography. Nature. 437:336-342.
- Dinger, E., A.E. Cohen, D.A. Hendrickson y J.C. Mares (2005). Aquatic invertebrates of Cuatro Ciénegas, Coahuila, México: Natives and exotics. The Southwestern Naturalist. 50 (2):237-247.
- Dufresne, A., M. Salanoubat, F. Partensky, F. Artiguenave, I.M. Axmann, V. Barbe, S. Duprat, M. Y. Galperin, E.V. Koonin, F. Le Gall, K.S. Makarova, M. Ostrowski, S. Oztas, C. Robert, I.B. Rogozin, D.J. Scanlan, N.T. De Marsac, J. Welschenbach, P. Wincker, Y.I. Wolf y W. R. Hess (2003). Genome sequence of the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* SS120, a nearly minimal oxyphototrophic genome. PNAS. 100 (17):10020-10025.
- Dugdale, R. y F. Wilkerson (1992). Nutrient limitation of new production in the sea, 107-122. En Falkowski P., A. Woodhead (eds). Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea. Plenum Press. USA.
- Elser, J., J.H Schampel, F. Garcia-Pichel, B.D. Wade, V. Souza, L. Eguiarte, A. Escalante y J.D. Farmer (2005). Effects of phosphorus enrichment and grazing snails on modern stromatolitic microbial communities. Freshwater Biology. 50:1808–1825.
- Ernst, A., S. Becker, U.I.A. Wollenzien y C. Postius (2003). Ecosystem-dependent adaptive radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. Microbiology. 149:217–228.

- Espinosa-Asuar, L. (2005). Análisis de la Diversidad de Procariontes usando el Gen 16S ribosomal: Origen marino de la Región de Cuatro Ciénegas, Coahuila. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 72 pp.
- Ezer, T., L-Y. Oey, H-Ch. Lee (2003). The variability of currents in the Yucatan Channel: Analysis of results from a numerical ocean model. *J. Geophys. Res.* 108:12(1-13).
- Falcón, L.I., R. Cerritos, L. Eguiarte, V. Souza (en prensa). Nitrogen fixation in Microbial Mat and Stromatolite Consortia from Cuatro Cienegas, Mexico.
- Ferris, M. y B. Palenik (1998). Niche adaptation in ocean cyanobacteria. *Nature.* 396:226-228.
- Fuhrman, J. y L. Campbell (1998). Microbial microdiversity. *Nature.* 393:410-411.
- Fuller, N.J., D.Marie, F. Partensky, D. Vaultot, A.F.Post y D.J. Scanlan (2003). Clade-Specific 16S Ribosomal DNA Oligonucleotides Reveal the Predominance of a Single Marine *Synechococcus* Clade throughout a Stratified Water Column in the Red Sea. *Appl. Env. Microb.* 69 (5):2430-2443.
- Garcia-Pichel, F., A. López-Cortés y U. Nübel (2001). Phylogenetic and Morphological Diversity of Cyanobacteria in Soil Desert Crusts from the Colorado Plateau. *Appl. Env. Microb.* 67(4):1902-1910.
- Garcia-Pichel, F. y O. Pringault (2001). Cyanobacteria track water in desert soils. *Nature.* 413:380-381.
- Garcia-Pichel, F., B.D. Wade, J.D. Farmer (2002). Jet-suspected, calcite-ballasted cyanobacterial waterwarts in a desert spring. *J. Phycol.* 38:420-428.
- Garcia-Pichel, F., F.A. Al-Horani, J.D. Farmer, R. Ludwig y B.D. Wade (2004). Balance between microbial calcification and metazoan bioerosion in meder stromatolitic oncolites. *Geobiology.* 2:49-57.
- Garczarek, L., G. W. M. van der Saay, J. C. Thomas y F. Partensky (1998). Isolation and characterization of Photosystem I from two strains of the marine oxychlorobacterium *Prochlorococcus*. *Photosynthesis Research.* 56:131-141.
- Garczarek, L. F. Partensky, H. Iribacher, J. Holtzendorff, M. Babin, I. Mary, J. C. Thomas y W. R. Hess (2001). Differential expression of antenna and core genes in *Prochlorococcus* PCC 9511 (Oxyphotobacteria) grown under a modulated light-dark cycle. *Environmental Microbiology.* 3 (3):168-175.
- Giovannoni, S., E. F. Delong, G. J. Olsen y N. R Pace (1988). Phylogenetic Group-Specific Oligodeoxynucleotide Probes for Identification of Single Microbial Cells. *Journal of Bacteriology.* 170 (2):720-726.
- Giovannoni, S.J. y U. Sting (2005). Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature.* 437: 343-348.
- Goericke, R. y D. Repeta (1992). The Pigments of *Prochlorococcus marinus*: The Presence of Divinyl Chlorophyll a and b in a Marine Procaryote. *Limnol. Oceanog.* 37 (2):425-433.
- Gotelli, N.J. y R.K. Colwell (2001). Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecology Letters.* 4:379-391.
- Gotelli, N.J. y G.L. Entsminger (2006). EcoSim: Null models software for ecology. Version 7. Acquired Intelligence Inc. & Kesey-Bear. Jericho, VTOS465. Disponible en <http://garyentsminger.com/ecosim.htm>.
- Guillard, R. L. S. Murphy, P.Foss, S. Liaaen-Jensen (1985). *Synechococcus* spp. as Likely Zeaxanthin-Dominant Ultraphytoplankton in the North Atlantic. *Limnol. Oceanog.* 30 (2):412-414.

- 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.
- Harwood, A. et al. (1996). Basic DNA and RNA Protocols. Humana Press. New Jersey, USA. 514 pp.
- Head, I.M., J.R. Saunders, R.W. Pickup (1998). Microbial Evolution, Diversity, and Ecology: A Decade of Ribosomal RNA Analysis of Uncultivated Microorganisms. Microbial Ecology. 35:1-21.
- Hess, W. (2004). Genome analysis of marine photosynthetic microbes and their global role. Current Opinion in Biotechnology. 15:191-198.
- Holt, J. et al. (1994). Bergey's Manual of Determinative bacteriology. 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA. 787 pp.
- Honda, D., A. Yokota, J. Sugiyama (1999). Detection of Seven Major Evolutionary Lineages in Cyanobacteria Based on the 16S rRNA Gene Sequence Analysis with Sequences of Five Marine *Synechococcus* Strains. J. Mol. Evol. 48:723-739.
- Hughes, J., J.J. Hellman, T.H. Ricketts y B.J.M. Bohannon (2001). Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. Appl. Env. Microb. 67 (10):4399-4406.
- Huges, J.B.y B. Bohannon (2004). Application of ecological diversity statistics in microbial ecology. Molecular Microbial Ecology Manual. Kluwer Academia Publishers. Netherlands. pp. 1321-1344.
- INE. (1999). Programa de Manejo del Área de Protección de Flora y Fauna Cuatrociénegas. Instituto Nacional de Ecología. 1a ed. México, D.F. 167 pp.
- Ingraham, J.L y C.A. Ingraham (2000). Introduction to Microbiology. Brooks Cole. USA. 804 pp.
- Johannesson, K.H., A. Cortés, K.C. Kilroy (2004). Reconnaissance isotopic and hydrochemical study of Cuatro Ciénegas groundwater, Coahuila, México. Journal of South American Earth Sciences. 17:171-180.
- Jonhson, P. y J. Sieburth (1979). Chroococcoid Cyanobacteria in the Sea: A Ubiquitous and Diverce Phototrophic Biomass. Limnol. Oceanog. 24 (5):928-935.
- Kemp, P. y J. Aller (2003). Bacterial diversity in aquatic and other environmets: what 16S rDNA librerries can tell us. FEMS Microbiology 47:167-177.
- Kemp, P. y J. Aller (2004). Estimating prokaryotic diversity: When are 16S rDNA libraries large enough?. Limnology and oceanography: Methods 2:114-125
- Kennish, M.J. (2001). Practical Handbook of Marine Science. CRC Press. Florida. 876 pp.
- Kirchman. D. (2000). Microbial Ecology of the oceans. Wiley -Liss. Canada. 542 pp.
- Komárek J. & Hauer T. (2004): CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera. - <http://www.cyanodb.cz>
- Lehmann, C., D.A. Osleger, I.P. Montañez, W. Sliter, A.Arnaud-Vanneau, J Banner (1999). Evolution of Cupido and Coahuila carbonate platforms, Early creataceous, northeastern Mexico. GSA Bulletin. 111 (7):1010-1029.
- Li, W-H. (2000). Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates Inc.Publishers. Massachusetts, USA. 481pp.

- Lopez-Cortez, A., F. García-Pichel, U. Nübel, R. Vázquez-Juárez (2001). Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: a polyphasic study. *Int. Microbiol.* 4:227-236.
- Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner, K.H. Schleifer (1998). Bacterial phylogeny base on comparative sequence análisis. *Electrophoresis.* 19:554-568.
- Magurran, A. (1988). *Ecological Diversity and Its Measurement.* Princeton University Press. USA. 179 pp.
- Margulis, L. (1985). *Cinco Reinos. Guía ilustrada de los phyla de la vida en la Tierra.* Ed. Labor, Barcelona. 335 pp.
- Margulis, L. (1993). *EL Origen de la Célula.* Ed. Reverte. Barcelona. 140 pp.
- Martin, A.P. (2002). Phylogenetic Approaches for Describing and Comparing the Diversity of Microbial Communities. *Appl. Env. Microb.* 68 (8): 3673-3682.
- McKee, J.W. N.W. Jones y L.E. Long (1990). Stratigraphy and provenance of strata along the San Marcos fault, central Coahuila, Mexico. *Geol. Soc. Am. Bull.* 102: 593-614.
- Melo, N., F.E. Müller-Kergén, S. Cerdeira, R. Pérez, I. Victoria, P. Cárdenas y I. Mitrani (2000). Near-surface phytoplankton distribution in the western Intra-Americas Sea: The influence of El Niño and weather events. *J. Geophys. Res.* 105 (C6):14,029-14,043.
- Merino, M. (1997). Upwelling on the Yucatan Shelf: hydrographic evidence. *J. Mar. Sys.* 13:101-121.
- Meyer, E.R. (1973). Late-Quaternary Paleocology of the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico. *Ecology.* 54 (5):982-995.
- Moline, A.B. S.M. Shuster, D.A. Hendrickson y J.C. Marks (2004). Genetic variation in a desert aquatic snail (*Nymphophilus minckleyi*) from Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico. *Hydrobiologia.* 522:179-192.
- Moore, L., G. Rocop y S.W. Chisholm (1998). Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature.* 393:464-467.
- Moore, L. y S. Chisholm (1999). Photophysiology of the Marine Cyanobacterium *Prochlorococcus*: Ecotypic Differences among Culture Isolates. *Limnol. Oceanog.* 44 (3):628-638.
- Mora-Navarro, Ma.R., J.A. Vázquez, Y.L. Vargas (2004). Ordenación de Comunidades de Fitoplancton en el Lago de Chapala, Jalisco-Michoacán, México. *Hidrobiología.* 14:91-103.
- Moreira, D., H. Le Guyader, H. Philippe (2000). The origin of red algae and the evolution of chloroplast. *Nature.* 405:69-72.
- Munn, C. B. (2004). *Marine Microbiology. Ecology & Applications.* Bios Scientific Publishers. Trowbridge, UK. 282 pp.
- Novelo, E. (1998). *Floras ficológicas del Valle de Tehuacán, Puebla.* Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias, Biología. UNAM. 599 p.
- Nübel, U., F. Garcia-Pichel y G. Muyzer (1997). PCR Primers to Amplify 16S rRNA Genes from Cyanobacteria. *Appl. Env. Microb.* 63 (8):3327-3332.
- Oliva, Ma.G. (2001). *Estudio de la variación vertical y temporal de las comunidades fitoplanctónicas durante el florecimiento de Cianofíceas en el lago cráter Alchichica, Puebla.* Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, Biología. UNAM. 133 p.

- Overmann, J. y F. Garcia-Pichel (2002). The Phototrophic Way of Life. In M. Dworkin et al. (ed.), *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*, [Online] Springer, N.Y. <http://www.mbl.ku.dk/mkuhl/ambio/materials/The%20Phototrophic%20Way%20of%20Life.pdf>.
- Pace, N. (1997). A Molecular View of Microbial Diversity and the Biosphere. *Science*. 276:734-740.
- Palenik, B., B. Brahamsha, F.W. Larimer, M. Land, L. Hauser, P. Chain, J. Lamerdin, W. Regala, E.E. Allen, J. McCarren, I. Paulsen, A. Dufresne, F. Partensky, E.A. Webb, J. Waterbury (2003). The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature*. 424:1037-1042.
- Partensky, F., W.R. Hess y D. Vaultot (1999). *Prochlorococcus*, a Marine Photosynthetic Prokaryote of Global Significance. *Microb. Mol. Biol. Rev.* 63 (1):106-127.
- Pindell, J. y L. Kennan (2001). Kinematic Evolution of the Gulf of Mexico and Caribbean. GCSSEPM Foundation 21st Annual Research Conference Transactions, Petroleum Systems of Deep-Water Bassins, pages 193-220. Disponible en <http://www.tectonicanalysis.com>
- Prescott. L. et al. (1999). *Microbiology*. WCB McGraw-Hill. USA. 962 pp.
- Raven, J. (1998). The twelfth Tansley Lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. *Funtional Ecology*. 12:503-513.
- Richardson, P (2005). Caribbean Current and eddies as observed by surface drifters. *Deep-Sea Research II*. 52:429-463.
- Rivas, D., A. Badan y J. Ochoa (2005). The Ventilation of the Deep Gulf of Mexico. *J. Phys. Oceanog.* 35:1763-1781.
- Robertson, B., N. Tezuka y M.M. Watanabe (2001). Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51:861-871.
- Rocap, G., L.R. Moore, S.W. Chisholm (1999). Molecular phylogeny of *Prochlorococcus* ecotypes. *Bulletin de l'Institut océanographique, Monaco*. No. spécial 19. p. 107-115.
- Rocap, G., D.L. Distel, J.B. Waterbury y S.W. Chisholm (2002). Resolution of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* Ecotypes by Using 16S-23S Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Sequences. *Appl. Env. Microb.* 68 (3):1180-1191.
- Rocap, G., F.W. Larimer, J. Lamerdin (2003). Genome divergence in two *Prochlorococcus* ecotypes reflects oceanic niche differentiation. *Nature*. 424:1042-1047..
- Rossello-Mora R. y R. Amann (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 25:39-67.
- Rusch, D.B., A.L. Halpern, G. Sutton, K.B. Heidelberg, S. Williamson, S. Yooseph, D. Wu, J.A. Eisen, J.M. Hoffman et al. (en prensa). The Sorcerer II Global Ocean Sampling Expedition: I. Halifax through the Galapagos.
- Scanlan, D. y N. West (2002). Molecular ecology of the marine cyanobacterial genera *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *FEMS Microbiology Ecology*. 40:1-12.

- Schmidt, T.M., E.F. DeLong y N.R. Pace (1991). Analysis of a Marine Picoplankton Community by 16S rRNA Gene Cloning and Sequence. *Journal of Bacteriology*. 173 (14):4371-4377.
- Schopf, W. (2000). The fossil Record: Tracing the Roots of the Cyanobacterial Linage. En Whitton, B. y M. Potts (eds). *The Ecology of Cyanobacteria, Their Diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 669 pp.
- Sebat, J.L., F.S. Colwell y R.L. Crawford (2003). Metagenomic Profiling: Microarray Analysis of an Environmental Genomic Library. *Appl. Env. Microb.* 69 (8): 4927-4934.
- Sheinbaum, J., J. Candela, A. Badan y J. Ochoa (2002). Flow structure and transport in the Yucatan Channel. *Geophysical research letters*. 29: X(1-6).
- Sheng, J. y L. Tang (2003). A Numerical Study of Circulation in the Western Caribbean Sea. *J. Phys. Oceanog.* 33:2049-2069.
- Sherr, E. y B. Sherr (2000). Marine Microbes. An Overview. En: Kirkman, D.L (ed). *Microbial Ecology of the Oceans*. Wiley-Lyss. Wiley-Lyss. Canada, p. 13-46.
- Six, C., B. Brahamsha, Y. Lemoine, F. Partensky (2004). Photophysiology of the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH8102, a new model organism. *Aquatic Microbial Ecology*. 35:17-29.
- Souza, V., L. Espinosa-Asuar, A.E. Escalante, L.E. Eguiarte, J. Farmer, L. Forney, L. Lloret, J.M. Rodríguez-Martínez, X. Soberon, R. Dirzo y J.J. Elser (2006). An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahua desert. *PNAS*. 103 (17):6565-6570.
- Souza, V., L.I. Falcon, G.B. Rosso, L.E. Eguiarte, K. Heidelberg, A. Castillo, A.E. Escalante, L.E. Asuar, R. Cerritos, L. Segovia, D.B. Rusch, A.L. Halpern, C. Venter (en prensa). Ocean metagenomics in the Yucatan Channel: Microbial diversity and Nitrogen cycle analysis.
- Steenbergen, C. et al. (1993). Microbial biogeochemical activities in lakes: stratification and eutrophication. En Ford T. (ed), *Aquatic Microbiology. An ecological approach*. Blackwell scientific publications. USA. 518 pp.
- Urbach, E., D.J. Scanlan, D.L. Distel, J.B Waterbury, S.W. Chisholm. (1998). Rapid Diversification of Marine Picophytoplankton with Dissimilar Light-Harvesting Structures Inferred from Sequences of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (Cyanobacteria). *J. Mol. Evol.* 46:188-201.
- Urbach, E. y S. Chisholm (1998). Genetic Diversity in *Prochlorococcus* Populations Flow Cytometrically Sorted from Sargasso Sea and Gulf Stream. *Limnol. Oceanog.* 43 (7):1615-1630.
- Vargas R. y E. Novelo (2003). Fijación de nitrógeno por Cyanoprokaryota en la Reserva Ecológica El Edén, Q.R., México. *Mexican Studies*. 19(2):277-285.
- Vaulot, D., F. Le Gall, D. Marie, L. Guillou y F. Partensky. (2004). The Roscoff Culture Collection (RCC): a collection dedicated to marine picoplankton. *Nova Hedwigia*. 79 (1-2):49-70.
- Venter, J.C., K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A. Eisen, (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science*. 304:66-74.
- Waterbury, J.B. y R. Rippka (1989). Subsection 1. Order Crocococcales. En: Staley J.B, M.P. Bryant, N. Pfennig, J.G. Holt (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1728-1746.
- Whitton, B., M. Potts (2000) *The Ecology of Cyanobacteria, Their Diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 669 pp.

Willame, R., J. Komárek, L. Hoffman (2006). Morphological and Molecular Characterization of Planktonic Cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. *J. Phycol.* 42:1312-1332.

Wintzingerode, F., U.B. Göbel y E. Stackebrandt (1997). Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews.* 21:231-229.

Woese, C. (1987). Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews.* 51 (2):221-271.

Wong, D. (1997). *The ABCs of gene cloning.* Chapman and may. New Cork. 213 pp.

Zubkov, M.V., B.M.Fuch, G.A. Tarran, P.H. Burkill y R. Amman. (2003). High Rate of Uptake of Organic Nitrogen Compounds by *Prochlorococcus* Cyanobacteria as a Key to Their Dominance in Oligotrophic Oceanic Waters. *Appl. Env. Microb.* 69 (2):1299-1304.

Zhou, MY. (1997). Universal TA cloning. En Shaefer, B (ed). *Gene cloning and analysis: current innovations.* Horizon Scientific Press. Norfolk, England. 214 pp.

APÉNDICES

Apéndice I: Extracción de ADN

1. Filtrar la muestra
2. Colocar los filtros en el tubo de microesferas y agregar 4mL de bead solution, vortex 1 min. De ser necesario colocar más filtros por tubo y agregar 0.5 mL de la solución.
3. Agregar 0.5mL de solución WD1 (y 5 μ L de RNasa). Vortex 30 s. Colocar los tubos horizontalmente en el agitador y mezclar a velocidad máxima durante 15 min.
4. Extraer los filtros cuidadosamente. Centrifugar los tubos a 5000 rpm durante 3 min.
5. Trasferir el sobrenadante a tubo limpio de 15mL y agregar 0.6mL de solución WD2. Vortex 5 s. Incubar 30 min a 4°C.
6. Centrifugar a 5000 rpm durante 6 min. Transferir sobrenadante con pipeta a un tubo limpio y añadir 8mL de solución WD3. Vortex 5 s.
7. Colocar la mezcla en un *Spin Filter* y centrifugar a 4000 rpm durante 3 min, eliminar el filtrado
8. Adicionar 3 mL de solución WD4 y centrifugar a 4000 rpm durante 3 min. Eliminar el filtrado.
9. Repetir el paso anterior con solución WD4 para asegurar que el ADN quede lo más limpio.
10. Centrifugar nuevamente a 5000 rpm por 5 min.
11. Secar el filtro durante 20 min a temperatura ambiente.
12. Colocar el filtro en un tubo nuevo y añadir 3 mL de agua Pura.
13. Dejar en reposo durante 12 hrs a 4°C.

Apéndice II: Limpieza del ADN

1. Centrifugar a 5000 rpm durante 3 min. Ahora el ADN está eluido en el filtrado. Guardar 0.5 mL del filtrado a -80°C; continuar la limpieza con lo otros 2.5 mL.
2. Agregar 1 volumen de fenol y centrifugar a 3700 rpm por 6 min. Extraer la muestra de ADN de las dos fases formadas.
3. Añadir mismo volumen de fenol-cloroformo-isoamil alcohol. Centrifugar a 3700 rpm, durante 6 min.
4. Agregar 2 µL de glycobblue, Acetato de sodio (NaOAc) 0.3 M final y dos volúmenes de Etanol. Dejando reposar 15 min a -20 °C (mínimo) o bien toda la noche.
5. Centrifugar en ángulo fijo a 7500 rpm durante 30 min a 4 °C
6. Eliminar el alcohol
7. Limpiar el pellet con 200 µL de Etanol 70% y centrifugar a 7500 rpm 1-2 min.
8. Resuspender en 30 µL de agua

Apéndice III: Reacción en Cadena de la Polimerasa; PCR

1. Dentro de tubos de PCR mezclar en el siguiente orden

- a. 33.5 μ L Agua
- b. 5 μ L buffer 10x
- c. 5 μ L $MgCl_2$ (25mM)
- d. 1 μ L dNTP's
- e. 2 μ L primer Forward Cya359F
- f. 2 μ L primer Reverse Cya781R (b)
- g. 1 μ L muestra ADN
- h. 0.5 μ L Taq

2. Colocar los tubos dentro de un termociclador

3. Amplificar los ácidos nucleicos con los tiempos indicados para cada una de las fases del PCR

Ciclos	Desnaturalización	Alineación	Polimerización
35	1 min a 94 °C	1 min a 60 °C	1 min a 72 °C
1			30 min a 72°C
1			indefinido a 4°C

Apéndice IV: Extracción del ADN de la agarosa

1. Cortar las bandas del tamaño deseado; procurando tomar la menor cantidad de agarosa.
2. Colocar la banda dentro de un tubo Ependorf y añadir 3 volúmenes de buffer QG por un volumen de gel. 100 mg son equivalentes a 100 μ L.
3. Incubar a 50 °C durante 10 min o hasta que se disuelva la agarosa. Vortex cada 2-3 min.
4. Comprobar que el color de buffer sea amarillo. Si es naranja o violeta, ajustar el pH con 10 μ L de acetato de sodio 3M, pH 5.
5. Si el tamaño del fragmento es menor a 500 pb o mayor a 400 pb, añadir un volumen de isopropanol por cada volumen de gel.
6. Armar la columna, agregar la muestra y centrifugar durante 1 min. Si el volumen es mayor a 800 μ L cargar y centrifugar varias veces. Tirar lo centrifugado.
7. Añadir 0.5 mL de buffer QG a la columna y centrifugar 1 min. Tirar lo centrifugado.
8. Para lavar; añadir 0.75 mL de buffer PE. Incubar 2-5 min a temperatura ambiente (TA) y centrifugar 1 min. Tirar lo centrifugado.
9. Centrifugar la columna durante 1 min adicional. Primero asegurarse de que el tubo de abajo no tenga líquido para que en este paso se elimine todo el etanol.
10. Colocar la columna en un tubo limpio de 1.5 mL.
11. Para recuperar el ADN, añadir 50 μ L de buffer EB o agua dentro de la membrana, y centrifugar la columna a máxima velocidad. Para aumentar la concentración, agregar en 30 μ L, incubar durante 1 min y centrifugar durante 1 min.
12. Guardar la muestra a -20° C

Apéndice V: Clonación con el vector Topo

Ligación

1. Hacer la mezcla siguiente:
 - Poner de 0.5 a 4 μL del producto de PCR a ligar (para productos ambientales poner 4 μL)
 - Agregar 1 μL de Salt Solution
 - Añadir agua estéril para completar 5 μL
 - En estos 5 μL añadir 1 μL del vector TOPO TA
2. Mezclar suavemente e incubar a TA durante 5 min. Para productos más grandes (>1 Kb) o si es una mezcla de productos, incubar 30min.
3. Poner la reacción en hielo y empezar a transformar. La reacción se puede guardar a -20°C .

Transformación

1. Añadir 2 μL de la reacción de ligación anterior en un vial de bacterias competentes. Es importante no mezclar pipeteando
2. Incubar en hielo de 5 a 30 min (para clonar PCRs grandes o mezclas de productos es mejor 30 min).
3. Poner el vial de bacterias a 42°C durante 60 s para inducirles un heat-shock.
4. Transferir el tubo en hielo inmediatamente.
5. Añadir 250 μL de medio SOC a TA
6. Tapar el tubo y agitarlo horizontalmente a 2000 rpm a 37°C durante una hora.
7. Sembrar 10-50 μL de cada reacción de transformación en las cajas de medio precalentadas. Se recomienda sembrar dos volúmenes distintos de bacterias para asegurar una correcta cantidad de colonias. Para clonación de productos ambientales, sembrar 100 y 200 μL .
8. Una reacción de clonación eficiente producirá cientos de colonias. De estas colonias se elegirán solo las blancas, evitar las colonias azul.

Apéndice VI:

Previamente a la clonación:

Tener listos:

- Tubos estériles
- Baño a 42° G
- 2 cajas con medio LB con 50 µg/mL de ampicilina o kanamicina por cada vial de bacterias competentes
- 40 mg/mL de X-gal en DMF
- Incubadora a 37° C

Para comenzar:

- Calentar medio SOC a TA
- Calentar cajas de LB a 37 °C por 30 min.
- Después de los 30 min esparcir 40 µL de X-gal en cada caja. Incubar a 37° C hasta que sean utilizados.
- Descongelar en hielo un vial de bacterias por cada transformación

Apéndice VII: Extracción de plásmidos de la célula huésped

1. Inocular cada una de las colonias seleccionadas en una alícuota de 1 mL de medio LB líquido 2X con el antibiótico (Ampicilina 100 μL a 50 mg mL^{-1} en 100 mL de medio LB), dentro de las pozas de la placa proporcionada por el kit. Cubrir dicha placa y asegurarla en el incubador. Incubar a 37° C a 2000 rpm durante 24 h. No olvidar hacer un backup de las clonas en una placa LB y dejar crecer toda la noche. seleccionadas
2. Centrifugar la placa 1500 x g por 7 min. Inmediatamente decantar el sobrenadante. Voltar y golpear ligeramente la placa sobre varias capas de toallas de papel hasta remover los residuos del sobrenadante.
3. Resuspender el pelet añadiendo 100 μL de la Solución 1 en cada una de las pozas, mezclar pipeteando hasta que las células sean resuspendidas totalmente. La resuspensión es crítica para el buen resultado de la lisis.
4. Añadir 100 μL de la Solución 2 en cada pozo. Inmediatamente mezclar vigorosamente con la mano durante 1 min. Incubar 2 min a TA. El tiempo total de lisis no debe exceder los 5 min.
5. Agregar 100 μL de la solución 3, mezclar durante 2 min. En este punto el lisado está listo para transferirlo a la placa que corresponde a la limpieza de la lisis *MultiScreen lysate clearing plate*.
6. Colocar la placa para plásmidos (MultiScreen PLAMID plate) dentro del recolector de vacío.
7. Pipetear todo el contenido de cada uno de los pozos (300 μL) y colocarlo en los pozos de la placa MultiScreen lysate clearing plate.
8. Colocar la placa en la parte superior del recolector. Verificar el sellado para el vacío y ajustar a 8 pulgadas de Hg. Aplicar vacío durante 3 min. El lisado pasa a través de la placa de limpieza y se deposita en la placa de plásmidos. Eliminar la placa de limpieza.
9. Colocar la placa de plásmidos en el sistema de vacío. Aplicar vacío a 24 pulgadas de Hg durante 10-15 min o hasta que las pozas se vacíen.

10. Añadir 200 μL de la Solución 4 a cada pozo y nuevamente aplicar vacío hasta que sean despejados de nuevo.
11. Recobrar los plásmidos añadiendo 50 μL de Solución 5 en cada pozo de la placa de plásmidos. Dejar 30 min a TA sin agitación.
12. Pipetear los plásmidos hacia la placa correspondiente para almacenar; sellando con la tapa que se proporciona.

Una vez lista la limpieza de los plásmidos. Es recomendable correr un gel de agarosa.

Apéndice VIII: Reacción de Secuenciación

Para cada una de las muestras agregar:

- i. 6 μ L Agua
- ii. 3 μ L BDT
- iii. 1.6 μ L Primers M13 F o M13 R
- iv. 4.4 μ L ADN de los plasmidos

Purificación de la Reacción de Secuenciación

Para una concentración 60% añadir:

- i. 25 μ L Agua
- ii. 60 μ L Etanol
Precipitar 30 min a TA
- iii. Centrifugar 20 min. 14000 rpm
- iv. Eliminar sobrenadante
- v. 250 μ L Etanol 70%
- vi. Centrifugar 20 min. 14000 rpm
Retirar Etanol, dejar a TA hasta evaporarse el Etanol

Apéndice IX: Secuencias obtenidas en el GenBank alineadas para la genealogía.

Grupo filogenético	Clave del GenBank
<i>Cyanobium</i> sp.	AF216944
<i>Cyanobium</i> sp.	AJ639900
<i>Cyanobium</i> sp.	AJ639897
<i>Cyanobium</i> sp.	AY172837
<i>Cyanobium</i> sp.	AY183114
<i>Cyanobium</i> sp.	AY183115
<i>Cyanobium</i> sp.	AJ639896
<i>Microcystis elabens</i>	AB001724
<i>Microcystis holsatica</i>	D89036
<i>Prochlorococcus</i> sp.	AY664135
Bajas cantidades de luz	
<i>Prochlorococcus</i> sp.	AF115270
<i>Prochlorococcus</i> sp.	AF053397
Altas cantidades de luz	
<i>Prochlorococcus</i> sp.	AF001466
<i>Prochlorococcus</i> sp.	AF001468
<i>Prochlorococcus</i> sp.	AF115268
<i>Prochlorococcus</i> sp.	AF053398
<i>Prochlorococcus</i> sp.	AF053396
<i>Spirulina subsalsa</i>	AB003166
<i>Synechococcus</i> sp.	DQ158135
<i>Synechococcus</i> sp.	AF216945
<i>Synechococcus</i> PCC 7002	D88289
<i>Synechococcus</i> PCC6307	AF001477
<i>Synechococcus</i> PCC7335	AB015062
<i>Synechococcus</i> PCC7942	AF132930
<i>Synechococcus</i> WH7805	AF001478
<i>Synechococcus</i> PCC73109	AB015061

Apéndice X: Información de las secuencias utilizadas en el análisis genealógico.

Clonas	Best Hits
Canal de Yucatán	
CY15	<i>Prochlorococcus</i> sp. AY664135*
CY22	<i>Prochlorococcus</i> sp. AY664135
CY29	<i>Prochlorococcus</i> sp. AY664269
CY30	<i>Prochlorococcus</i> sp. AY664135
CY33	<i>Prochlorococcus</i> sp. AY664269
CY645	<i>Prochlorococcus</i> sp. AY664140
CY646	<i>Prochlorococcus</i> sp. AY664140
CY652	<i>Synechococcus</i> sp. AY172810
CY662	<i>Prochlorococcus</i> sp. AY664135
CY666	<i>Prochlorococcus</i> sp. AY664135
CY673	<i>Synechococcus</i> sp. AY172836
CY693	<i>Prochlorococcus</i> sp. AY664269
CY694	<i>Prochlorococcus</i> sp. AY664135
CY699	<i>Prochlorococcus</i> sp. AY664135
Pozas Azules	
PA05	<i>Synechococcus</i> sp. DQ463712
PA06	<i>Synechococcus</i> sp. AY930443
PA07	<i>Synechococcus</i> sp. DQ026832
PA14	<i>Synechococcus</i> sp. DQ463712
PA18	<i>Synechococcus</i> sp. DQ158174
PA30	<i>Synechococcus</i> sp. DQ158174
PA35	<i>Synechococcus</i> sp. DQ158174
PA38	<i>Synechococcus</i> sp. DQ158174
PA41	<i>Synechococcus</i> sp. DQ463712
PA44	<i>Synechococcus</i> sp. AF216955
PA46	<i>Synechococcus</i> sp. DQ158174

**Prochlorococcus* sp. relacionado a una bacteria no cultivada AY700634, que fue más similar en el Blast.