



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VARIACIÓN ESTACIONAL EN LA DIVERSIDAD
DE *Pseudomonas* ASOCIADAS A UN SISTEMA
ACUÁTICO FLUCTUANTE

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

ALEJANDRA RODRÍGUEZ VERDUGO

DIRECTORA DE TESIS:

BIÓL. ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Rodríguez Verdugo Alejandra 56229006 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 404087320</p>
<p>2. Datos del tutor Biól. Ana Elena Escalante Hernández</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dra. Gloria Soberón Chávez</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dra. Valeria Francisca Eugenia Leopoldina de María de Guadalupe Souza Saldivar</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dr. Pablo Vinuesa Fleischmann</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Dr. Zenón Cano Santana</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Variación estacional en la diversidad de <i>Pseudomonas</i> asociadas a un sistema acuático fluctuante 68 p 2008</p>

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a dos excelentes investigadores: la Dra. Valeria Souza y el Dr. Luis E. Eguiarte. Gracias por haberme permitido realizar mi tesis en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, por enseñarme genética de poblaciones y ecología microbiana, por orientarme y guiarme hasta la culminación de mi carrera y por haberme brindado la oportunidad de conocer el maravilloso lugar que es Cuatro Ciénegas. Ha sido un gran placer conocerlos no sólo en el aspecto académico sino en el aspecto personal.

Un infinito agradecimiento a mi tutora, amiga y a veces psicóloga Ana Elena Escalante. Me conociste en el primer semestre de la carrera, cuando estaba confundida y asustada. Ahora, gracias a tus enseñanzas y a tu ayuda, concluyo la carrera, creo que un poco menos confundida pero un poco más asustada. Ha sido un placer trabajar contigo no sólo como alumna sino como colega, dando clases de Procariontes y (esperemos que muy pronto) publicando artículos. No sé qué me deparé el futuro, pero sí sé que me encantaría seguir trabajando contigo. Muchas gracias por todo.

Un agradecimiento especial a la Dra. Luisa Falcón, por sus valiosos comentarios y observaciones sobre el trabajo escrito. Quiero agradecerte por ser crítica y por recordarme que la Biología es una ciencia dura; en el futuro prometo ser menos especulativa y aferrarme a mis datos.

Agradezco a los Drs. Pablo Vinuesa y Zenón Cano y a las Dras. Valeria Souza y Gloria Soberón por su participación como sinodales del examen de grado. Más específicamente quisiera agradecer a Pablo Vinuesa por sus comentarios relacionados con las filogenias y el análisis de resultados; a Zenón Cano por sus críticas relacionadas con los aspectos ecológicos de la tesis; a Valeria Souza por sus comentarios relacionados con la evolución bacteriana y a Gloria Soberón por hacerme reflexionar sobre los conceptos de especie y poblaciones en bacterias.

Muchas gracias a todos los integrantes del laboratorio que más que colegas se han convertido en buenos amigos. A los mecánicos Marcos, Alex y Jaime que integran la banda "Pelos". A la banda de plantas: Santiago, Alicia, Richard, Robert, Nuri, mi estimada Sandrita, mi amiguis Celes y al vicioso de Enrique. A las chicas guapas de bacterias: Julia, Yislem, Morena, Eria, Andrea y Esme. A los chicos no tan guapos de bacterias: Germán, René y Chango león. A las buenísimas técnicas del laboratorio: Laura Espinoza y Erika Aguirre. A mi tutora Ana E. Escalante y a mi amiguito Rodrigo. A Manuel y a Antonio por haberme enseñado a hacer geles y medios de cultivo. Y por último, muchas gracias a las investigadoras Ana Noguez y Luisa Falcón.

Finalmente, dentro del laboratorio he de agradecer a René Cerritos (alias *Renis renis*). Muchas gracias por haberme soportado durante todo el proceso de realización de la tesis. Gracias por resolver todas mis dudas del estilo "*Renis, cómo uso el BioEdit?*" o mis ñoñeses como "*Renis, cuál es la diferencia entre la recombinación homóloga y no homóloga?*". Gracias por soportar mis ratos de estrés y depresión (es decir, mis

ataques EMOs). Gracias por haber leído y comentado mi tesis, aunque te hayas quedado dormido y me la hayas regresado toda babeada. Y, claro está, muchas gracias por todo el apoyo emocional que me has brindado en los últimos meses. Te adoro.

Quiero agradecer afectuosamente a mis compañeros de carrera con los que viví, lo que ha sido hasta ahora, la mejor etapa de mi vida. A Alex (bofite) que me molestaba diciéndome que nunca me iba a titular, a Celes que me sonsacaba para hacer actividades divertidas (como la práctica a Metztitlán o las “piyamadas”), a Román (chiquito) que siempre me alegraba el rato con sus pláticas y chismes, a Pamela que fue un apoyo incondicional a todo lo largo de la carrera y a todos los demás (Paola, Betsi, Alfredo, Carlitos,...).

Agradezco a mis amigos de toda la vida, Luis Sandoval y Daniel Keil. Son casi unos hermano para mí y los quiero mucho. También quiero agradecer a mis otros amigos que conozco desde hace mucho y desde hace no tanto. En orden cronológico: Ximena, Emilia, Claudia, Ale Q, Rocío, Lorenzo, Rudi y Ángel. Y por último agradezco a Valentín. Vale, muchas gracias por todo lo que vivimos juntos. No me arrepiento de nada, ni cambiaría nada.

Casi para concluir, un agradecimiento gigante a mi familia. A mis padres sin los cuáles esta tesis no hubiera sido posible. Muchas gracias por sus enseñanzas, su apoyo y su amor incondicional. A mis hermanos adorados: Francisco, Sofía, Miguel Ángel y Alejandro. A Julieta (madre secundaria) esperando que se mejore pronto. A mi naná y a mi abuelita Martha. Y a todos los demás tíos y primos a los que quiero mucho.

Ya para acabar, muchas gracias a todos los amigos y profesores que en algún momento me apoyaron, guiaron e inspiraron en mi formación académica y personal.

DEDICADA A:

Mis padres, Leticia Verdugo y Víctor Rodríguez

y a **mi hermanito** Francisco Rodríguez.

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Origen y mantenimiento de la diversidad	6
a) Diversidad y heterogeneidad ambiental.....	7
b) Fluctuaciones temporales del ambiente y mantenimiento de la diversidad.....	10
1.2. EXPLICACIONES GENÉTICAS DE LA DIVERSIDAD.....	11
a) Estructura genética de las poblaciones bacterianas.....	11
b) Fuentes de innovación bacteriana y mantenimiento de la variación.....	12
1.3. JUSTIFICACIÓN.....	14
2. OBJETIVOS	15
3. HIPÓTESIS	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1. Zona de estudio.....	17
4.2. Género de estudio.....	20
4.3. Muestreo.....	21
A. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Pseudomonas</i>	21
a) Siembra y extracción de ADN.....	21
b) Huellas genéticas BOX-PCR.....	22
c) Identificación de las especies bacterianas.....	23
B. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE <i>Pseudomonas</i>	25
a) Diversidad de especies.....	25
b) Diversidad genotípica.....	25
c) Diversidad fenotípica.....	26
d) Correlación de métodos.....	27
C. GENÉTICA DE POBLACIONES.....	28
a) Diversidad genética.....	28
b) Desequilibrio de ligamiento.....	28
c) Estructuración espacial y temporal.....	29

5. RESULTADOS.....	31
5.1. DIVERSIDAD TEMPORAL <i>Pseudomonas</i>	31
a) Diversidad de especies.....	31
b) Diversidad genotípica	35
c) Diversidad fenotípica.....	37
5.2. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE <i>P. otitidis</i> , <i>P. mendocina</i> y <i>P.</i> <i>psychrotolerans</i>	37
a) Diversidad genética.....	39
b) Desequilibrio de ligamiento.....	40
c) Comparación de la estructura genética espacial y temporal	41
6. DISCUSIÓN.....	43
6.1. DIVERSIDAD TEMPORAL DE <i>Pseudomonas</i>	43
a) Factores estacionales que afectan a las comunidades bacterianas...43	
b) Métodos para establecer patrones estacionales de diversidad.....43	
c) Fluctuaciones acopladas de dos especies.....45	
6.2. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE <i>P. otitidis</i> , <i>P. mendocina</i> y <i>P.</i> <i>psychrotolerans</i>	48
a) Estructura poblacional en ambientes heterogéneos y fluctuantes...48	
b) Diferenciación temporal y divergencia de las poblaciones.....50	
6.3. MODELO DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE <i>P. otitidis</i> y <i>P. mendocina</i>	52
7. CONCLUSIONES.....	55
8. PERSPECTIVAS.....	57
APÉNDICE.....	58
LITERATURA CITADA.....	59

RESUMEN

Rodríguez-Verdugo, A. 2008. Variación estacional en la diversidad de *Pseudomonas* asociadas a un sistema acuático fluctuante. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 66 pp.

La estacionalidad es una de las manifestaciones más evidentes de heterogeneidad ambiental y tiene un alto impacto en la estructura, distribución y abundancia de los microorganismos. Debido a que existen pocos trabajos que describan la estructura genética de las poblaciones bacterianas a través de las estaciones, estudiamos durante dos años (dos veranos y dos inviernos) a varias especies cultivables del género *Pseudomonas* en una laguna de desecación del sistema acuático de Churince, ubicado en Cuatro Ciénegas, Coahuila. Se emplearon tres métodos para relacionar la diversidad genotípica, fenotípica y de especies con las fluctuaciones estacionales del ambiente. De las 70 cepas aisladas se identificaron 39 genotipos únicos empleando el elemento BOX de las secuencias repetitivas del genoma (BOX-PCR). La diversidad de genotipos fue mayor durante el verano ($G/N = 0.73$ en agosto 2003 y $G/N = 1$ en agosto 2005) que durante el invierno ($G/N = 0.29$ en enero 2004 y $G/N = 0.58$ en enero 2005). Las pruebas bioquímicas revelan que las cepas se agrupan parcialmente por ocasión de muestreo. Las dos especies dominantes de *Pseudomonas*, de acuerdo al gen 16S rRNA, se encontraron desfasadas en el tiempo: *P. otitidis* se recuperó exclusivamente en el verano, mientras que *P. mendocina* se recuperó únicamente en el invierno. Aunque se observó una recurrencia de ribotipos de ambas especies a lo largo de las estaciones, los genotipos no se repiten en diferentes ocasiones de muestreo. La diversidad genotípica promedio de los linajes de verano fue significativamente más elevada ($H = 0.96$ en *P. otitidis*) que la diversidad genotípica promedio de los linajes de invierno ($H = 0.44$ en *P. mendocina* y $H = 0$ en *P. psychrotolerans*). El índice de asociación estandarizado (I_A^S) de los linajes fue significativamente diferente de cero ($\hat{I}_A^S = 0.0657$ en *P. otitidis* y $\hat{I}_A^S = 0.313$ en *P. mendocina*) lo que sugiere una estructura clonal en donde los eventos de recombinación no son lo suficientemente frecuentes para romper el desequilibrio de ligamiento. Estos resultados indican que la comunidad de *Pseudomonas* está representada por linajes clonales que se estructuran temporalmente, lo que podría contribuir al mantenimiento de la diversidad de especies bacterianas del lugar.

ABSTRACT

Rodríguez-Verdugo, A. 2008. Seasonal variation in *Pseudomonas* diversity within a fluctuating aquatic system. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 66 pp.

Seasonality is an example of environmental heterogeneity and has a high impact on the structure, distribution and abundance of microbial populations. Since the impact of seasonal variation in the genetic structure of few natural populations of bacteria have been investigated, we studied during two years (two summers and two winters) the cultivable fraction of the genus *Pseudomonas* in a desiccation lagoon in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. We used three methods to explore the relationship between the genotypic and phenotypic diversity with seasonal fluctuation. We identified 39 unique genotypes with BOX-PCR fingerprinting analysis out of 70 isolates. The genotypic diversity was higher in summer ($G/N = 0.73$ in august 2003 and $G/N = 1$ in august 2005) than in winter ($G/N = 0.29$ in january 2004 and $G/N = 0.58$ in january 2005). The cluster analysis based on the substrate utilization patterns revealed that strains are group in sampling occasion clusters. Tree predominant populations of *Pseudomonas* were identified by group-specific 16S rRNA gen. *P. otitidis* was recovered only in summer and *P. mendocina* was recovered only in winter. A seasonal pattern of ribotype reoccurrence was observed although the genotypes occurred only once in time. The mean genotypic diversity was higher in summer lineages ($H = 0.96$ in *P. otitidis*) than in winter lineages ($H = 0.44$ in *P. mendocina* and $H = 0$ in *P. psychrotolerans*). The values of index of association standardized (I_A^S) differed significantly from zero ($\hat{I}_A^S = 0.0657$ in *P. otitidis* and $\hat{I}_A^S = 0.313$ in *P. mendocina*) suggesting that recombination is not frequent enough to break up associations between loci and lineages are basically clonal. The observations made in this study suggests that *Pseudomonas* community of Laguna Grande is represented by highly clonal specialised lineages whose relative abundances are probably determined by the prevailing environmental conditions. More studies are needed to elucidate the role of seasonality in the maintenance of local species diversity.

INTRODUCCIÓN

La evolución biológica ha originado la increíble variedad de formas de vida que habita el planeta. Después de la publicación de *El origen de las especies* de Charles Darwin (1809-1882) en 1859, surgió el interés por estudiar a los organismos en su propio ambiente y analizar las presiones de selección que producen los cambios evolutivos. En este marco histórico apareció la ecología, definida por primera vez por el alemán Ernst Haeckel (1834-1919) en 1866. El campo de la biología evolutiva busca proveer explicaciones sobre el cambio de los organismos durante la historia de la vida en la Tierra y los mecanismos que subyacen estos cambios, mientras que la ecología estudia la interacción de los organismos con el medio ambiente y busca proveer explicaciones sobre los patrones de diversidad que se presentan en la naturaleza. Aunque constituyan dos campos separados de la biología, la ecología y la evolución comparten muchas preguntas. Una de ellas se relaciona con el surgimiento y mantenimiento de la diversidad. La Ecología Evolutiva es la disciplina sintética que une ambos campos y espera responder este tipo de preguntas (Fox *et al.*, 2001).

En los últimos años se han acrecentado los estudios empíricos y experimentales que buscan dilucidar los procesos ecológicos y las fuerzas evolutivas que originan y mantienen la diversidad en las comunidades y poblaciones bacterianas (Rainey *et al.*, 2000; Kassen & Rainey, 2004). En este trabajo nos enfocaremos primordialmente al estudio de las poblaciones bacterianas de vida libre.

1.1. ORIGEN Y MANTENIMIENTO DE LA DIVERSIDAD

Durante mucho tiempo los ecólogos de comunidades (interesados en la diversidad de especies en una comunidad) y genetistas de poblaciones (interesados en la variedad de genotipos dentro de las poblaciones) han sospechado que la estructura del ambiente se relaciona con el mantenimiento de la diversidad (Kassen, 2002). En teoría, un ambiente uniforme carente de estructura espacial y temporal, proveería uno o unos pocos nichos¹ ocupados por un limitado número de especies (Begon *et al.*, 1999). A su vez, la selección natural² mantendría únicamente los genotipos con mayor adecuación³ lo que nos llevaría a una pérdida de diversidad (Kassen & Rainey, 2004). En cambio, en un ambiente heterogéneo que presentara distintos nichos, se favorecerían diferentes genotipos en cada nicho y la diversidad se mantendría.

A mediados del siglo XX, se observó experimentalmente que las poblaciones bacterianas propagadas en ambientes homogéneos evolucionaban por una serie de recambios de clonas lo que llevó al establecimiento del modelo de selección periódica⁴. Este modelo, originalmente propuesto por Atwood *et al.* (1951) y retomado por Levin (1981), parte de la existencia de una población asexual (con ausencia de recombinación intraespecífica), en donde existen mutaciones adaptativas que confieren una mayor adecuación a los individuos que las portan. Cuando surge un

¹ **Nicho:** Hipervolumen de n -dimensiones (conjunto de condiciones y recursos) dentro de cual las poblaciones pueden mantener una tasa de crecimiento positiva (de acuerdo a la definición de G. E. Hutchinson, 1957).

² **Selección natural:** Proceso dado por diferencias en la reproducción y/o supervivencia entre alelos o genotipos.

³ **Adecuación:** Medida de la habilidad de un genotipo de pasar sus alelos a las futuras generaciones en relación con otros genotipos.

⁴ **Selección periódica:** Surgimiento de una mutación adaptativa en una población clonal, en donde todos los individuos que no presenten dicha mutación serán eliminados, como producto de la selección periódica.

individuo con una mutación adaptativa, éste se propaga clonalmente y reemplaza a todos los individuos de la población que no presentan dicha mutación. La diversidad genética es entonces purgada de manera cíclica cada vez que surge un nuevo mutante mejor adaptado o más competitivo. En las últimas décadas se ha demostrado experimentalmente que la diversidad puede surgir y mantenerse en ambientes homogéneos (Helling *et al.*, 1987; Rosenzweig *et al.*, 1994; Lenski & Travisano, 1994; Elena & Lenski, 1997; Rozen & Lenski, 2000). Sin embargo, estos experimentos han sido realizados en ambientes controlados. Es muy posible que estos modelos no reflejen lo que sucede en las poblaciones de bacterias ambientales debido a que los ambientes naturales tienden a ser más complejos y variar en el tiempo.

a) Diversidad y heterogeneidad ambiental

Un ambiente heterogéneo es aquel que se halla constituido por diferentes ambientes especializados (Begon *et al.*, 1999). La mayoría de los ambientes contienen gradientes de condiciones y de recursos disponibles los cuales pueden ser espaciales o temporales. Ningún medio ambiente es constante a lo largo del tiempo, pero algunos son más constantes que otros, por lo que se reconocen tres categorías principales de cambio temporal: 1) los cambios cíclicos (como los ciclos diarios y estacionales), 2) los cambios direccionales (como la acumulación de un compuesto en un lago), y 3) los cambios erráticos (como las catástrofes naturales).

La heterogeneidad ambiental actúa como fuerza diversificadora porque produce nichos vacantes que pueden ser aprovechados por nuevas variantes (Rainey y Travisano, 1998). Se han realizado diversos experimentos tomando como modelo a

las bacterias para probar los efectos de la oportunidad ecológica⁵ en la emergencia de la diversidad (Rosenzweig *et al.*, 1994; Turner *et al.*, 1996; Rozen *et al.*, 2000). Uno de los experimentos relacionados con este tópico fue realizado por Rainey y Travisano (1998). Al propagar poblaciones de *Pseudomonas fluorescens* en diferentes medios de cultivo, ellos vieron una rápida emergencia de diversidad (en forma de variantes especializadas a diferentes nichos) en ambientes espacialmente heterogéneos y no en ambientes espacialmente homogéneos. La teoría evolutiva predice que en ambientes heterogéneos la selección favorecería la emergencia de especialistas ecológicos (con genotipos adaptados a diferentes nichos), tal y como se pudo observar en el experimento de Rainey y Travisano. Sin embargo, esta especialización no es una condición suficiente para mantener la diversidad en ambientes heterogéneos. Los modelos de selección en ambientes heterogéneos sugieren que, bajo las condiciones correctas, la diversidad puede mantenerse por selección negativa dependiente de la frecuencia⁶ en donde la adecuación de un genotipo es mayor cuando es raro que cuando es común. Este tipo de selección mantiene la variación genética porque evita que los genotipos raros desaparezcan. Aunque la acción de la selección dependiente de la frecuencia en ambientes estacionales sólo ha sido probada en condiciones de laboratorio (Spencer *et al.*, 2007), es muy probable que también actúe en ambientes naturales. En las poblaciones de bacterias ambientales la selección dependiente de la frecuencia podría estar actuando mediante la acción de virus (Thingstad, 2000).

⁵ **Oportunidad ecológica:** Circunstancias en las que la competencia no existe por diversas causas, y por lo tanto quedan disponibles muchos tipos de recursos.

⁶ **Selección negativa dependiente de la frecuencia:** La selección dependiente de la frecuencia implica que la adecuación de un genotipo está en función de la adecuación de otro genotipo de la población. Se dice que este tipo de selección es negativa cuando los genotipos raros (con baja frecuencia) tienen mayor adecuación que los genotipos comunes.

Es difícil saber si las fuerzas que mantienen la diversidad en las poblaciones experimentales de laboratorio operan en poblaciones de bacterias ambientales, sin embargo, existen algunos estudios empíricos que relacionan la diversidad genética con variabilidad del hábitat. McArthur *et al.* (1988) mostraron que la diversidad genética de una población de *Pseudomonas cepacia* estaba directamente correlacionada con la variabilidad espacial del hábitat, (la cual fue estimada como la suma de los coeficientes de variación de cinco variables ambientales: porcentaje de materia orgánica del suelo, carbono orgánico disuelto, Mg, Fe y NO₃ en el suelo). En contraste con los estudios de variación espacial, existen pocos trabajos que reportan una relación entre la diversidad genética y las variaciones temporales del ambiente. No se sabe si los pocos casos reportados de interacciones genotipo×ambiente⁷ relacionados con heterogeneidad temporal se deban a que es más difícil mantener un polimorfismo⁸ estable cuando hay variación temporal (en comparación con la variación espacial) o si es más difícil documentar este tipo de asociación (Hedrick *et al.*, 1976; Hedrick, 1986).

Finalmente, se han propuesto otros factores ecológicos, aparte de la heterogeneidad ambiental, que podrían jugar un papel importante en el origen y mantenimiento de la diversidad en las poblaciones microbianas tales como: la productividad, los disturbios ambientales y el parasitismo por fagos.

⁷ **Interacciones genotipo-ambiente (GxE):** En este tipo de interacciones la adecuación de los genotipos varía en respuesta a los factores abióticos del ambiente.

⁸ **Polimorfismo (genético):** La presencia de más de un alelo en cierto locus de una población.

b) Fluctuaciones temporales del ambiente y mantenimiento de la diversidad

Las fluctuaciones temporales del ambiente pueden tener un alto impacto en la diversidad de especies de una comunidad. Desde hace tiempo se ha notado que las condiciones desfavorables del ambiente pueden reducir las densidades poblacionales y por tanto, reducir la intensidad de la competencia. Existen diferentes modelos en los cuales la coexistencia estable de especies resulta de las fluctuaciones ambientales. Uno de los modelos más simples se relaciona con la idea de que los disturbios (eventos recurrentes de mortalidad) promueven la coexistencia estable debido a que las reducciones en las densidades poblacionales disminuyen la intensidad de la competencia (Wootton, 1998). Estos modelos simplistas han sido desplazados por modelos más elaborados que incorporan diversos factores bióticos y abióticos (Chesson, 2000). El modelo de efecto de almacenaje (*storage effect*) de Chesson (2000), propone que las especies pueden coexistir gracias a que sus tamaños poblacionales fluctúan de modo que en ciertas condiciones una de las poblaciones prolifera mientras que la otra se encuentra reducida o en latencia, esperando las condiciones ambientales para su proliferación (desplazamiento temporal de nicho). Las tres condiciones para que esto suceda son: 1) que haya una respuesta diferencial de las especies a las variaciones ambientales, 2) que haya covarianza entre el ambiente y la competencia, es decir que las respuestas al ambiente modifiquen la competencia y 3) que el crecimiento de las poblaciones no favorecidas esté amortiguado, por ejemplo mediante estructuras de resistencia.

Este modelo ha sido propuesto como una de las posibles explicaciones al mantenimiento de la diversidad de especies bacterianas en una comunidad (McArthur, 2006). Lamentablemente el concepto de especie en procariontes es muy controversial. Aunque se han propuesto diversos conceptos (fenético, evolutivo, biológico, genético,

ecológico, filogenético y cohesivo), el criterio que más se utiliza para delimitar especies procariontes es el concepto genético de especies (Ravin, 1963). Este último se define como un grupo de individuos con capacidad de intercambiar información genética por medio de la conjugación⁹, transducción¹⁰ o transformación¹¹. El marcador molecular más ampliamente utilizado para delimitar especies bacterianas bajo este criterio es el gen que codifica para la subunidad pequeña del ribosoma que tiene 1540 pb (16S rRNA). Cuando se compara la secuencia de este gen de dos individuos y el porcentaje de similitud entre las secuencias es mayor al 97% se plantea que los individuos pertenecen a la misma especie (Stackebrandt & Goebel, 1994). El análisis de genes del 16S rRNA (ribotipos) es una de las aproximaciones más comunes para acceder a la biodiversidad de las comunidades de bacterias ambientales (Giovannoni & Stingl, 2005).

1.2. EXPLICACIONES GENÉTICAS DE LA DIVERSIDAD

a) Estructura genética de las poblaciones bacterianas

La genética de poblaciones es una herramienta indispensable para estudiar la variación en las poblaciones bacterianas y las fuerzas evolutivas que moldean dicha variación. Los primeros estudios de genética de poblaciones bacterianas fueron hechos en bacterias patógenas y comensales de animales como *Escherichia coli* (Whittam *et al.*, 1983). La mayoría de estos estudios, realizados con electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), sugieren que las poblaciones bacterianas son básicamente clonales. La recombinación¹² no parece ser lo suficientemente frecuente

⁹ **Conjugación:** Transferencia directa de ADN de una célula a otra.

¹⁰ **Transducción:** Transferencia de fragmentos de ADN de una célula a otra por virus.

¹¹ **Transformación:** Se refiere a la adquisición de ADN desnudo del ambiente y su incorporación en el genoma (cromosomal o extracromosomal).

¹² **Recombinación:** Intercambio de material genético entre genomas diferentes.

para romper el desequilibrio de ligamiento (asociación no aleatoria de los alelos en diferentes loci de una población). Estas observaciones han reforzado durante décadas el paradigma clonal de las bacterias. Sin embargo, no todas las bacterias parecen seguir este paradigma. Estudios con MLEE sugieren que hay diferentes niveles de clonalidad en las poblaciones bacterianas (Maynard-Smith *et al.*, 1993). Las poblaciones bacterianas pueden ser panmícticas y presentar una asociación aleatoria entre loci (como es el caso de *Neisseria gonorrhoeae*; Maynard-Smith *et al.*, 1993) o ser completamente clonales y presentar una asociación no aleatoria entre loci (como es el caso de *Salmonella enterica*; Maynard-Smith *et al.*, 1993). También se han reportado poblaciones con una estructura poblacional intermedia entre la panmixia y la clonalidad. Las poblaciones con estructura poblacional epidémica (como es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*) son básicamente sexuales, aunque ocasionalmente surge un mutante altamente exitoso que se propaga clonalmente (Pirnay *et al.*, 2002). Istock *et al.* (1992) estudiaron poblaciones de *Bacillus subtilis* del suelo aislado de un sitio en el desierto de Arizona y vieron que las poblaciones presentaban un ligero desequilibrio de ligamiento. Los trabajos de Souza *et al.* (1992) realizados en *Rhizobium leguminosarum* sugieren que la recombinación en bacterias es más común de lo que se pensaba. Las poblaciones lólicas de *Burkholderia cepacia* presentan a su vez una limitada asociación entre alelos (Wise *et al.*, 1995).

b) Fuentes de innovación bacteriana y mantenimiento de la variación

La fuerza evolutiva que origina variación en las poblaciones es la mutación¹³. La recombinación homóloga¹⁴ redistribuye dicha variación y genera nuevas

¹³ **Mutación:** En sentido amplio se refiere a cambios en el material genético.

¹⁴ **Recombinación homóloga:** Rearreglo de fragmentos de DNA existentes.

combinaciones alélicas. Asimismo, otras fuentes importantes de innovación en procariontes son la migración y la recombinación no homóloga¹⁵. Los eventos de transferencia horizontal¹⁶, que pueden llevarse a cabo mediante procesos de transducción, transformación y conjugación, permiten la adquisición de nuevos genes que podrían brindar una ventaja selectiva (Ochman *et al.*, 2000). Finalmente, la selección es la única fuerza evolutiva capaz de mantener la variación en los caracteres adaptativos. En la mayoría de los eucariontes, la variación genética se mantiene por selección balanceadora (ventaja de los heterocigotos) mientras que en los procariontes la variación se mantiene, principalmente, por selección negativa dependiente de la frecuencia o por selección periódica (Rainey *et al.*, 2000).

1.3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios de genética de poblaciones en bacterias de vida libre en ambientes heterogéneos y fluctuantes apenas se está desarrollando. Aunque los estudios experimentales de laboratorio pueden proveernos de datos interesantes, no reflejan los procesos y las interacciones en la naturaleza. En los últimos años se han empleado diversas técnicas moleculares, como el análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP-PCR), electroforesis de enzimas multilocus (MLEE), análisis de DNA del gen 16S ribosomal y PCR de elementos repetitivos palindrómicos extragénicos (rep-PCR) para caracterizar las poblaciones microbianas sujetas a variaciones estacionales del ambiente. Recientemente, se han propuesto estudios que combinan el uso de marcadores moleculares con caracteres fenotípicos

¹⁵ **Recombinación no homóloga:** Introducción de nuevos fragmentos de ADN al genoma.

¹⁶ **Transferencia horizontal:** Movimiento de información genética entre células que no necesariamente comparten un ancestro reciente.

para describir la diversidad (fenotípica y genética) de especies bacterianas a través del tiempo (Jaspers *et al.*, 2001; Jaspers & Overmann, 2004).

Para estudiar el efecto de las variaciones estacionales en las poblaciones bacterianas ambientales elegimos un grupo que fuera fácil de aislar e identificar en un medio selectivo, que presentara una alta diversidad de especies (Spiers *et al.*, 2000) y cuyos representantes fueran en su mayoría organismos mesófilos de vida libre. Por ello escogimos al género *Pseudomonas* como grupo focal de estudio.

OBJETIVOS

El objetivo general fue evaluar la relación entre las fluctuaciones estacionales del ambiente con la estructura poblacional y la diversidad (fenotípica y genotípica) de *Pseudomonas* cultivables en una laguna de desecación del sistema acuático Churince, Cuatro Ciénegas, Coahuila.

Por otro lado, los objetivos particulares, derivados del anterior son los siguientes:

1. Describir la diversidad de especies cultivables del género *Pseudomonas* en dos veranos y dos inviernos.
2. Conocer la variación genotípica y determinar si una única poza génica de *Pseudomonas* se mantiene a lo largo de las estaciones.
3. Observar la variación fenotípica de los individuos y ver si ésta se relaciona con las estaciones.
4. Comparar tres métodos para evaluar la diversidad con diferentes aproximaciones (ribotipos, genotipos y fenotipos) para determinar si existen congruencias o disparidades entre ellos.
5. Hacer un análisis de genética de poblaciones para establecer la estructura genética temporal de las poblaciones de *P. mendocina*, *P. otitidis* y *P. psychrotolerans* mediante estimaciones de diversidad genética y de desequilibrio de ligamiento.
6. Evaluar si las poblaciones de *P. otitidis* exhiben mayor variabilidad entre sitios a lo largo del gradiente espacial, o si exhiben mayor variabilidad en un mismo sitio a través del tiempo (mayor estructuración temporal que espacial).

I. ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD TEMPORAL DEL GÉNERO *Pseudomonas*.

H₀: Las fluctuaciones ambientales estacionales no se relacionan con la diversidad de las poblaciones de *Pseudomonas*, por lo tanto no esperamos ver cambios: 1) ni en la composición y diversidad de especies, 2) ni en la diversidad fenotípica, 3) ni en la diversidad genotípica, de una estación a otra.

H_A: Las fluctuaciones ambientales estacionales sí influyen en la diversidad de las poblaciones de *Pseudomonas* y esperamos ver cambios en por lo menos alguno de los parámetros para estimar diversidad (fenotípica, genotípica y de ribotipos), de una estación a otra.

II. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE LAS ESPECIES DOMINANTES DE *Pseudomonas*.

H₀: Si los eventos de recombinación fueran frecuentes (estructura panmíctica), las poblaciones de *Pseudomonas* podrían estar creando continuamente combinaciones exitosas de genes para adaptarse a las condiciones fluctuantes del ambiente.

H_A: Si los eventos de recombinación fueran raros (estructura clonal), las poblaciones de *Pseudomonas* estarían dominadas por unas cuantas cepas altamente adaptadas las condiciones ambientales del momento.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Zona de estudio

El sistema de Churince se localiza en el valle de Cuatro Ciénegas, ubicado en el estado de Coahuila (Fig. 1). El valle de aproximadamente 150,000 hectáreas, está rodeado por montañas que se elevan hasta 3000 metros sobre el nivel del mar. El clima de la región es árido; las temperaturas son extremas, excediendo 44 °C en el verano y bajando a 0 °C durante el invierno y la precipitación promedio anual es menor a 200 mm (Minckley, 1969). Pocas veces al año llueve (entre mayo y octubre) aunque las escasas lluvias suelen ser torrenciales. A pesar de la baja precipitación, en el valle abunda el agua subterránea que emerge a la superficie, formando pozas, ríos y lagunas donde habita una gran variedad de organismos acuáticos. Las aguas subterráneas tienen una alta concentración en sales de sulfato, donde domina el sulfato de calcio, mientras que el cloruro de sodio está en bajas concentraciones, pero son extremadamente oligotróficas, con concentraciones de PO_4 menores a 1 μmol (Elser *et al.*, 2005). Los hábitats acuáticos del valle soportan una gran variedad de especies endémicas (Contreras-Balderas & Lozano-Vilano, 1996; Contreras-Aquieta, 1998). Los estromatolitos, que son considerados globalmente raros, crecen en varias de las pozas y ríos. Debido al elevado número de endemismos, el gobierno federal declaró en 1984 a Cuatro Ciénegas Coahuila como Área Natural Protegida en la categoría de Zona de protección de Flora y Fauna y fue recategorizada en el 2007 a Área de Protección de Recursos Naturales.



Fig. 1. Ubicación del valle de Cuatro Ciénegas y del sistema Churince en el norte de la República Mexicana. El esquema muestra los diez puntos de muestreo.

En el valle de Cuatro Ciénegas existen siete sistemas hidrológicos: 1) Churince, 2) la Becerra/Garabatal, 3) Río Mezquites, 4) Río Puente Chiquito, 5) Tío Cándido/Escobeda, 6) Santa Tecla y 7) Río Nadadores (Río Grande) (Minckley, 1969). El sistema hidrológico Churince, consiste en tres zonas principales conectadas por estrechos cauces de agua: el Manantial (M), la Laguna Intermedia (LI) y Laguna Grande (LG) (Fig. 1). El sistema mide alrededor de 3 Km de recorrido y se caracteriza por un marcado gradiente de salinidad, temperatura, pH y oxígeno disuelto. Los valores de pH y oxígeno disuelto incrementan del Manantial a la Laguna Grande de 8.3 a 10.0 y de 6.0 a 9.6, respectivamente. En cambio, la temperatura incrementa de la Laguna Grande al Manantial de 23 a 31 °C, respectivamente (Tabla 1; Cerritos *et al.*, en revisión). El agua de la Laguna Grande (laguna de desecación) no excede el metro de profundidad y su temperatura fluctúa entre 10 y 30°C, a diferencia del Manantial que se mantiene relativamente constante (Fig. 2).

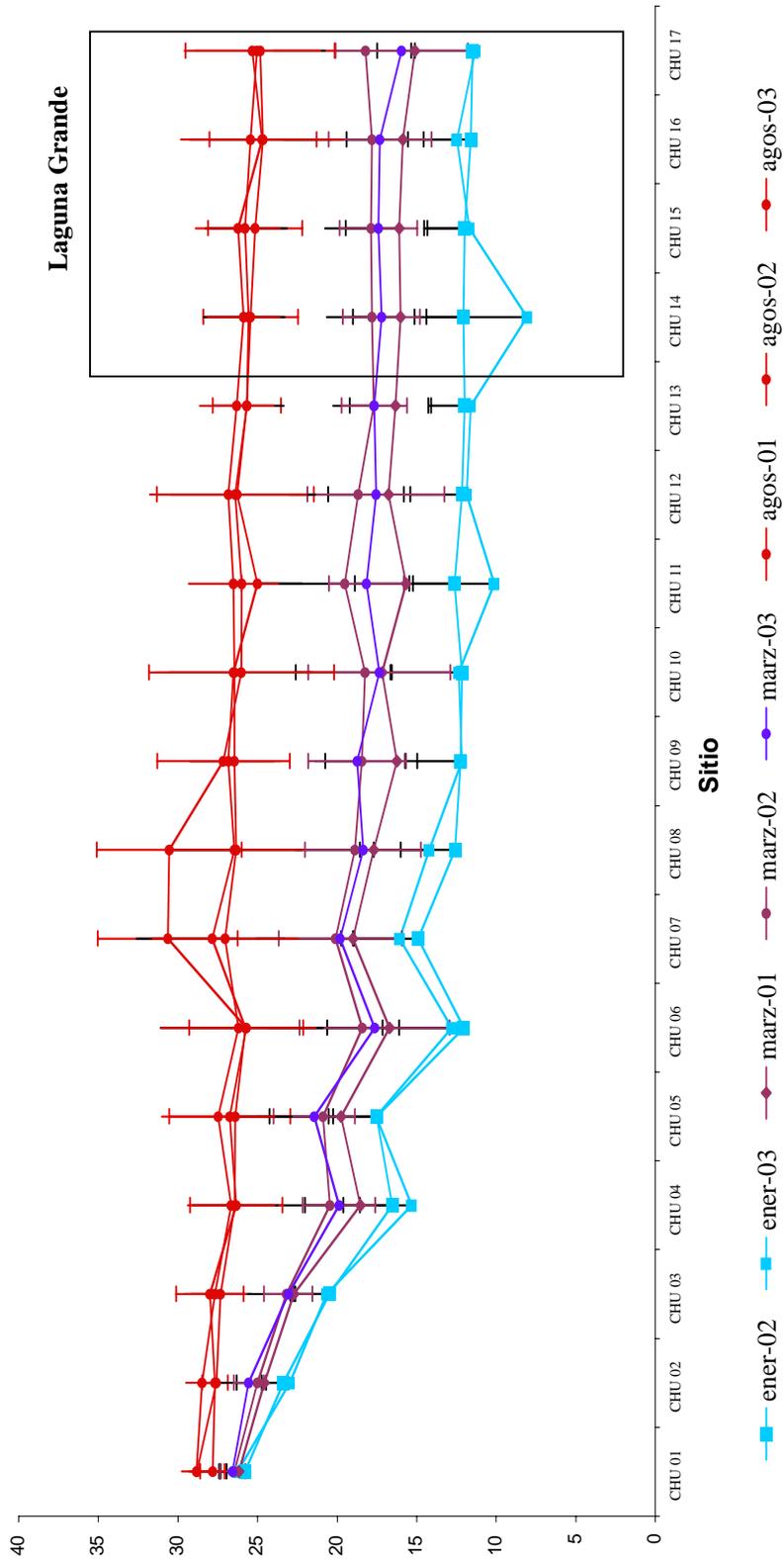


Fig. 2. Fluctuaciones en la temperatura del agua a lo largo del Sistema de Churince, comenzando por el Manantial y concluyendo en la Laguna Grande. Las medidas fueron tomadas en enero, marzo y agosto durante tres años consecutivos (Carson, 2005). Para estudiar el efecto de las fluctuaciones estacionales en las poblaciones de *Pseudomonas* se tomaron muestras de Laguna Grande que presenta amplias variaciones de temperatura a lo largo del año.

Tabla 1. Medidas ambientales tomadas en los diferentes puntos de muestreo del Sistema Churince.

Muestra	Latitud	Longitud	pH	Oxígeno disuelto	Conductividad (μmhos)x1000	T ($^{\circ}\text{C}$)
LG m1	26°50.830'N	102°09.335'E	10.0	9.6	4.2	23.0
LG m2	26°51.199'N	102°09.009'E	9.8	9.5	4.2	24.5
LG m3	26°51.146'N	102°08.964'E	9.7	9.5	4.2	25.0
LG m4	26°51.222'N	102°09.040'E	9.6	9.0	3.2	25.5
LI m5	26°51.021'N	102°08.644'E	9.5	8.5	3.2	25.5
LI m6	26°50.927'N	102°08.539'E	9.3	8.2	2.0	26.0
LI m7	26°50.910'N	102°08.438'E	9.3	8.0	2.0	26.0
LI m8	26°50.897'N	102°08.558'E	9.3	8.0	1.8	26.0
M m9	26°50.717'N	102°08.295'E	8.9	7.5	1.6	29.5
M m10	26°50.421'N	102°08.047'E	8.3	6.0	1.4	31.0

4.2. Género de estudio

El conjunto de bacterias Gram-negativas conocidas como *Pseudomonas sensu lato* está dividido en cinco grupos de rRNA en base a un estudio de hibridación rRNA-DNA realizado por Palleroni *et al.* (1973). Las especies del género *Pseudomonas sensu stricto* pertenecientes al grupo I de rRNA, son γ -Proteobacterias (Kerstens *et al.*, 1996) de forma bacilar con uno o más flagelos polares. Oxidan compuestos orgánicos (quimioorganótrofos) y crecen a pH neutro en un intervalo mesofílico de temperatura (28-40°C). Aunque son aerobias estrictas, algunas especies desnitrificantes pueden utilizar nitrato como aceptor de electrones en anaerobiosis. Poseen diversas rutas metabólicas que les permiten utilizar un amplio espectro de compuestos orgánicos, y ocupan una importante posición ecológica en el ciclo del carbono y del nitrógeno. Los miembros del género se encuentran en una amplia gama de ambientes naturales (terrestres, dulceacuícolas y marinos) y forman asociaciones íntimas con plantas y animales (muchas veces como patógenos oportunistas). Esta amplia distribución sugiere un elevado grado de adaptación fisiológica y genética al medio (Spiers *et al.*, 2000).

Trabajos previos empleando métodos dependientes de cultivos, sugieren que *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos representativos en la fracción de cultivables del sistema acuático de Churince (Souza *et al.*, 2006; Escalante *et al.*, en proceso).

4.3. Muestreo

Se tomaron muestras en cuatro puntos (m1, m2, m3, m4) de Laguna Grande (Fig. 1) en agosto del 2003, enero del 2004, enero del 2005 y agosto del 2005 (dos veranos y dos inviernos). En cada uno de los puntos de muestreo se tomaron 15 ml de agua de la superficie en tubos Falcon estériles. Por sitio se tomaron tres réplicas independientes. Para el análisis de la estructura espacial se tomaron en agosto 2003 muestras de agua superficial de 10 sitios del sistema de Churince: dos sitios de colecta localizados dentro del Manantial (m9 y m10), cuatro en Laguna Intermedia (m5, m6, m7 y m8) y cuatro en Laguna Grande (m1, m2, m3, m4).

A. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomonas*.

a) Siembra y extracción de DNA

Para aislar las cepas del género *Pseudomonas*, se sembraron en campo 200 µl de cada muestra en un medio de cultivo agar GSP¹ selectivo para *Pseudomonas-Aeromonas* según Kielwein (1969, 1971). Debido a que la mayoría de los microorganismos acompañantes no pueden metabolizar ni el glutamato ni el almidón (únicos nutrientes del medio), en principio sólo las especies de los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas* pueden crecer en el medio agar GSP. Al degradar el

¹ Composición del medio agar GSP: 10 g/L de L(+) Glutamato de sodio, 20 g/L de Almidón hidrosoluble, 2 g/L de Fosfato de potasio dihidrogenado, 0.5 g/L de Sulfato de magnesio, 0.36 g/l de Rojo fenol y 12 g/l de agar; ajustado a un pH final de 7.3 ± 0.2)

almidón las *Aeromonas* producen ácido tornando el color naranja del medio a amarillo (Stanier *et. al.*, 1966). En cambio, las colonias de *Pseudomonas* coloran el medio de color rojo o violeta, propiedad gracias a la cual pudieron ser diferenciadas. Los aislados fueron guardados a -80 °C en 5% de medio de GSP con 15% (vol/vol) de glicerol. Se extrajo DNA de las colonias con un kit de extracción DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) siguiendo las instrucciones del fabricante.

b) Huellas genéticas BOX-PCR

Los elementos repetitivos que se utilizan en la técnica rep-PCR se encuentran repartidos en todo el genoma bacteriano y pueden estar presentes en ambas orientaciones (Fig. 3). Se han identificado tres familias de secuencias repetitivas: los palíndromes extragénicos repetitivos (REP) de 35-40 pb, las secuencias repetitivas intergénicas consenso de las enterobacterias (ERIC) de 124 a 127 pb y el elemento BOX de 154 pb (Versalovic *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1991). A partir de la amplificación selectiva de estas secuencias se puede hacer un análisis tipo “fingerprint” o huella genómica con alta reproducibilidad que permite distinguir individuos o clonas (De Bruijn *et al.*, 1996).

Desde que se reportó la existencia de elementos repetitivos en los genomas de *Pseudomonas* (Louws, 1994), la técnica ha sido empleada en estudios de biogeografía y ecología de este género (Fulthorpe, 1998; Cho & Tiedje, 2000). En este estudio se empleó el primer BOX-A1R originalmente reportado en el género *Bacillus* (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG- 3') del elemento BOX (Versalovic, 1991). Cada reacción de PCR de 25 µl estaba compuesta por 2µM del primer BOX A1R, 1µl de DNA, 50mM de MgCl₂, 1mM de cada uno de los cuatro dNTPs y una unidades de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems). El PCR de amplificación se realizó en un

termociclador (MJ Research) con el siguiente programa: un ciclo de 95°C por 2 min seguido de 30 ciclos de 93°C por 45 s, 50°C por 1 min, 65°C por 8 min y un ciclo de 65°C por 8 min. El producto fue corrido en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE (Tris acetato EDTA) 0.5X a 180 mV por 5 h. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y fotografiados. Se guardaron las fotografías en formato TIFF para su posterior análisis.

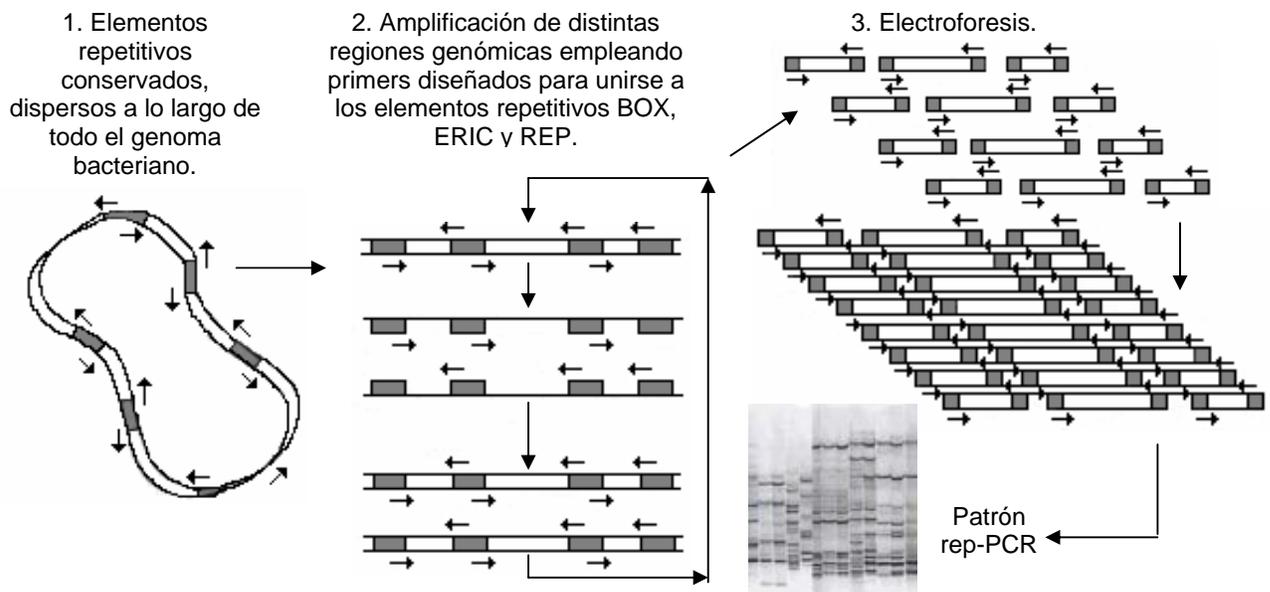


Fig. 3. Principio de las huellas genéticas rep-PCR. (Modificado del Persing *et al.*, 2004)

c) Identificación de las especies bacterianas

Se amplificó el gen 16S rRNA de los genotipos únicos. Se emplearon los primers universales para la mayoría de las eubacterias, conocidos como 27F y 1492R (Lane, 1991). Cada reacción de PCR contenía buffer para PCR al 1X, 2 mM de MgCl₂, 0.8 mM de una mezcla de dNTP, 0.3 μM de cada primer, una unidad de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems) y 2 μl de DNA. Todas las reacciones se realizaron en un

termociclador (MJ Research) con el siguiente programa: un ciclo de 94°C por 4 min seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min y 71°C por 3 min. El producto de PCR fue purificado en un gel de agarosa al 2% utilizando el protocolo del kit QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden). Se emplearon siete primers (8F, 357R, 530R, 530F, 790F, 981R y 1492R) para obtener la secuencia completa (\approx 1450 pb) del 16S rRNA (Tabla 2) (Sacchi *et al.*, 2002). La reacción de secuenciación se realizó en un volumen total de 15 μ l, el cual contenía 2 μ l de Big Dye Terminator Sequencing kit (Applied BioSystems), 1.6 μ M de primers y 5 μ l del producto amplificado. Las condiciones de secuenciación fueron: 1 ciclo de 5 min a 95°C, 45 ciclos de 10 s a 95°C, 10 a 50°C y 4 min a 60°C. La secuenciación se hizo en un secuenciador de capilar (ABI-Avant 100). Se ensamblaron las secuencias con los programas BioEdit y Consed. Finalmente se identificaron las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* comparando las secuencias con la base de datos del Ribosomal Database Project II (RDB; Maidak *et al.*, 1994).

Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación y la secuenciación del gen 16S rRNA.

Primers usados para amplificar el gen 16S rRNA	
27F	5'-AGAGTTTGATCCCTCAG- 3'
1492R	5'-ACCTTGTTACGACTT- 3
Primers usados para secuenciar el gen 16S rRNA completo	
8F	5'-AGTTGATCCTGGCTCAG- 3
357R	5'-CTGCTGCCTCCCGTA- 3
530R	5'-GTATTACCGCGGCTGCTG- 3
530F	5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC- 3
790F	5'-ATTAGATACCCTGGTAG- 3
981R	5'-GGGTTGCGCTCGTTGCGGG- 3

B. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD DE *Pseudomonas*

a) Diversidad de especies

Se alinearon las secuencias del gen 16S rRNA usando el programa de cómputo ClustalX (Thompson, 1994) junto con secuencias previamente registradas del RDB. La reconstrucción filogenética se llevo a cabo mediante el método de Neighbor-joining usando un modelo de sustitución Kimura 2-parámetros con el programa de cómputo MEGA versión 3.0 (Kumar *et al.*, 2004). Para delimitar especies se escogió un criterio de similitud mayor o igual al 97% en la secuencia del gen 16S rRNA.

Se utilizaron los índices de Simpson y Shannon-Wiener para calcular la diversidad de especies bacterianas en las estaciones. El índice de Simpson equivale al inverso del grado de dominancia que hay en una comunidad:

$$H = 1 / \left(\sum_{i=1}^S p_i^2 \right)$$

en donde p_i es la proporción de individuos que corresponde a cada especie (i).

Para estimar la diversidad en relación al tamaño de la muestra se uso el índice de Shannon-Wiener:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \log p_i$$

Entre más grande es su valor, mayor es la diversidad de una comunidad.

b) Diversidad genotípica

Se construyó una matriz binaria de presencia/ausencia de banda en las distintas posiciones (la presencia o ausencia de banda fue codificada como 1 o 0, respectivamente). Para conocer la similitud entre los genotipos se realizó un análisis

de UPGMA utilizando una distancia genética de Nei (1987) con el programa “Tool For Population Genetic Analysis” (TFPGA) versión 1.3 (Miller, 1997). Los genotipos idénticos fueron definidos en base a la distancia genética: una distancia genética de 0 entre los genotipos equivale a una sola clona.

La proporción de genotipos distinguibles es una medida de clonalidad que ha sido ampliamente utilizada en estudios con plantas (Ellstrand & Roose, 1987; Clark-Tapia *et al.*, 2005). Originalmente fue definida como G/N en donde G es el número de genotipos y N es el número total de individuos (ramets) muestreados. Esta medida también puede ser empleada como índice de diversidad genotípica utilizando las huellas genéticas BOX-PCR (Cerritos *et al.*, en revisión). El índice se calcula como G/N en donde G es el número de genotipos únicos y N es el número total de cepas aisladas. Cuando el valor es de 1 significa que cada cepa está representada por un único genotipo; cuando el valor tiende a 0, la población es clonal.

c) Diversidad fenotípica

Se hicieron pruebas de crecimiento de todas las cepas en diferentes medios de cultivo (diferentes fuentes de carbono, diferentes pH). Se probaron 20 fuentes de carbono: ramnosa, salicina, manitol, fumarato, ácido málico, trealosa, fructosa, dulcitol, *D-L* alanina, *D*-aspártico, manosa, rafinosa, glucosa, arabinosa, citrato, *L*-glutámico, sorbitol, glicerol, xilosa y lactosa. Cada medio de cultivo estaba compuesto por un medio mínimo GSP (sin glutamato ni almidón) y 4 g/l de la fuente de carbono. También se hicieron pruebas de crecimiento en medios ácidos (pH 4.5) y básicos (pH 9). El crecimiento de las cepas fue registrado de forma cualitativa (+, crecen; - no crecen). Con las pruebas bioquímicas efectuadas se elaboró una matriz con datos discretos. Cuando la cepa presentaba crecimiento en determinada prueba

bioquímica se le asignaba el valor de 1; cuando no crecía en esa prueba bioquímica se le asignaba el valor de 0. Esta matriz fue sometida a un análisis de agrupamiento de datos mediante el método de UPGMA usando el programa TFPGA (versión 1.3).

d) Correlación de métodos

A partir de los resultados obtenidos de los análisis filogenéticos, genotípicos y fenotípicos se elaboraron matrices de distancia. En todos los casos se emplearon distancias genéticas de Nei (D ; Nei & Li, 1979) que se estimaron de la siguiente manera:

$$D = \hat{\pi}_{12} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{k'} x_{1i} x_{2j} \delta_{ij}$$

$$D_A = \hat{\pi}_{12} - \frac{\hat{\pi}_1 + \hat{\pi}_2}{2}$$

donde D = distancia de Nei no corregida, D_A = distancia de Nei corregida, k = número de haplotipos distintos en la población 1, k' = número de haplotipos distintos en la población 2, x_{1i} = frecuencia del haplotipo i en la población 1, x_{2j} = frecuencia del haplotipo j en la población 2, δ_{ij} = número de diferencias entre el haplotipo i y j . Los valores de distancia genética utilizados fueron los de D_A .

Se hicieron correlaciones entre las distancias de los fenotipos (definidos por las pruebas bioquímicas) y de los genotipos (definidos con BOX-PCR), entre las distancias de los fenotipos y de los genotipos (definidos con el gen 16S rRNA) y entre las distancias de los genotipos, definidos con BOX-PCR y con el gen 16S rRNA. En los tres casos se realizó una prueba de Mantel (Mantel, 1967; Smouse *et al.*, 1986) para verificar que las matrices de valores de distancias genéticas estuvieran correlacionadas. El análisis de datos se realizó con el programa TFPGA (versión 1.3). El estadístico fue probado usando 1000 permutaciones ($\alpha = 0.05$).

C. GENÉTICA DE POBLACIONES

Para analizar la genética de poblaciones de *P. otitidis*, *P. mendocina* y *P. psychrotolerans* se empleó una matriz binaria de presencia/ausencia de banda de las huellas genéticas BOX-PCR. Se usó el programa Arlequín versión 2.0 (Schneider *et al.*, 2000) para calcular los índices de diversidad genética.

a) Diversidad genética: La diversidad de genotipos mide la probabilidad de que dos genotipos escogidos al azar sean diferentes en la muestra y fue estimada usando el índice de Nei y Tajima (Nei & Tajima, 1981):

$$H = [n/(n - 1)](1 - \sum p_i^2)$$

en donde n es el número de copias de genes en la muestra, k es el número de genotipos y p_i es la frecuencia en la muestra del haplotipo i -th.

Su varianza fue calculada como:

$$V(H) = \{2/[n(n - 1)]\{2(n - 2)[\sum p_i^3 - (\sum p_i^2)^2] + \sum p_i^2 - (\sum p_i^2)^2\}$$

b) Desequilibrio de ligamiento: Para estimar el desequilibrio de ligamiento se calculó el índice de asociación estandarizado (I_A^S) con el programa LIAN versión 3.5 (Haubold y Hudson, 2000). El índice de asociación estandarizado (I_A^S) es una modificación al índice de asociación (I_A) de Maynard-Smith *et al.* (1993) y se calcula como:

$$I_A^S = [1/(l - 1)] [(V_O/V_E) - 1]$$

en dónde l es el número de loci (Haubold y Hudson, 2000). Si hay desequilibrio de ligamiento, el valor esperado del índice de asociación (I_A^S) es cero y los eventos de recombinación ocurren frecuentemente. Si el valor de I_A^S difiere significativamente de cero ($P < 0.05$), la recombinación es rara.

c) **Estructuración espacial y temporal:** Se hizo un estudio comparativo entre la estructuración genética espacial y temporal de las poblaciones de *P. otitidis*. Para estudiar la estructura espacial de *P. otitidis* se definieron tres poblaciones del Sistema de Churince: la población 1 correspondiente a la Laguna Grande, la población 2 correspondiente a la Laguna Intermedia y la población 3 correspondiente al Manantial. Para estudiar la estructura temporal de *P. otitidis* se definieron dos poblaciones: la población de agosto de 2003 y la población de agosto de 2005.

La estructura genética de las poblaciones fue investigada por un análisis molecular de la varianza (AMOVA) como ha sido definida por Cockerham (1969, 1973) y extendido por otros autores (Weir & Cockerham, 1984; Long, 1986). El parámetro F_{ST} de Weir y Cockerham (1984) provee una medida de estructuración genética poblacional basada en la varianza de la diversidad genética dentro y entre los grupos estudiados.

Los componentes de covarianza (σ_i^2) se usan para calcular los índices de fijación, definidos originalmente por Wright (1951, 1965) en términos de coeficientes de autocruza. En el caso haploide se asume que el vector de la frecuencia del haplotipo i de la población j en el grupo k es una ecuación lineal de la forma:

$$x_{ijk} = x + a_k + b_{jk} + c_{ijk}$$

El vector x es el valor esperado y desconocido de x_{ijk} , los efectos son a para el grupo, b para las poblaciones y c para los haplotipos dentro de una población, dentro de un grupo, los cuales se asumen aditivos, al azar, independientes y con elementos de covarianza asociados: σ_a^2 , σ_b^2 , σ_c^2 respectivamente.

La varianza molecular total (σ_T^2) es la suma de las covarianzas:

$$\sigma_T^2 = \sigma_a^2 + \sigma_b^2 + \sigma_c^2$$

En el caso de una estructura genética jerárquica simple (individuos haploides, un grupo de poblaciones), el parámetro F_{ST} que se obtiene es:

$$F_{ST} = \sigma_a^2 / \sigma_T^2$$

Uno de los resultados que surge del análisis de AMOVA es una matriz de F_{ST} por pares de poblaciones que refleja las diferencias entre poblaciones a partir de las diferencias entre haplotipos. La distribución nula de los valores pareados de F_{ST} bajo la hipótesis de que no hay diferencias entre poblaciones se obtiene permutando los haplotipos entre poblaciones. El valor de P de la prueba es la proporción de permutaciones que conducen a valores de F_{ST} mayores o iguales al valor de F_{ST} observado.

Se calculó el estadístico F_{ST} promedio de comparaciones pareadas, tanto en el espacio como en el tiempo con el programa Arlequín 2.0 (Schneider *et al.*, 2000).

RESULTADOS

En total se aislaron 97 cepas en los cuatro puntos de muestreo de Laguna Grande de las cuales se identificaron 55 genotipos únicos mediante las huellas genéticas BOX-PCR. Se secuenció el gen 16S rRNA completo para conocer la identidad de los genotipos representantes. De las cepas asignadas al grupo de las γ -Proteobacterias, 70 pertenecieron al género *Pseudomonas*, una al género *Marinomonas*, nueve a la familia Enterobacteriaceae y dos al género *Acinetobacter*. También se aislaron 15 cepas pertenecientes al género *Flavobacterium* (Apéndice 1). En este estudio sólo se trabajaron las cepas del género *Pseudomonas*.

5.1.. DIVERSIDAD TEMPORAL DE *Pseudomonas*

a) Diversidad de especies

Todas las *Pseudomonas* identificadas en este estudio usando el gen 16S rRNA forman parte del grupo I de similitud de *Pseudomonas* (*sensu lato*) conocidas colectivamente como *Pseudomonas* (*sensu stricto*) (Palleroni *et al.*, 1973). Las 70 cepas fueron relacionadas con ocho especies de *Pseudomonas* con base en el porcentaje de similitud con las secuencias del 16S rRNA del RDB (Tabla 2, Fig. 4). Las tres especies más abundantes en la comunidad de *Pseudomonas* fueron: *P. mendocina* con 26 individuos, *P. otitidis* con 21 individuos y *P. psychrotolerans* con 11 individuos. Las dos poblaciones más abundantes de *Pseudomonas* estuvieron desfasadas en el tiempo: *P. otitidis* fue registrada exclusivamente en el verano (agosto de 2003 y agosto de 2005), mientras que *P. mendocina* fue registrada exclusivamente en el invierno (enero de 2004 y enero de 2005). Aunque tres especies de la comunidad de *Pseudomonas* siguen un patrón estacional, cinco especies no siguen un patrón estacional, ya sea porque fueron

aisladas en una única ocasión de muestreo (como es el caso de *P. psychrotolerans*) o porque fueron aislados en diferentes estaciones (como es el caso de *P. putida* y *P. alcaligenes*). Por otro lado, los índices de diversidad de Simpson y Shannon-Weiner no muestran que haya mayor diversidad de especies en invierno o en verano.

Tabla 2. Número de cepas aisladas de cada especie en base a la homología entre las secuencias de 16S rRNA y las secuencias tipo del Ribosomal Database Project II. Las especies fueron definidas como un grupo de genotipos que comparten más de 97% de similitud con las secuencias del 16S rRNA (≈ 1450 pb).

Especie No. de acceso en el GenBank	Promedio del porcentaje de similitud de las secuencias	Número de cepas aisladas				Total
		Agosto 2003	Enero 2004	Enero 2005	Agosto 2005	
<i>Pseudomonas mendocina</i> DQ178219	99.2 %	0	17	9	0	26
<i>Pseudomonas otitidis</i> AY953147 ^T	98.8 %	14	0	0	7	21
<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> AJ575816 ^T	98.8 %	0	11	0	0	11
<i>Pseudomonas alcaligenes</i> AJ006110	97.4 %	0	1	0	3	4
<i>Pseudomonas putida</i> D37923 ^T	98.6 %	1	0	1	2	4
<i>Pseudomonas koreensis</i> AF468452 ^T	98.2 %	0	1	1	0	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> CP000076	99.9 %	0	0	1	0	1
<i>Pseudomonas</i> sp. DQ910409	97.7 %	0	1	0	0	1
Número total de individuos		15	31	12	12	70
Número total de especies		2	5	4	3	
Índices de diversidad de Simpson (S)		1.142	2.327	1.714	2.322	
Índices de diversidad de Shannon (H)		0.106	0.447	0.363	0.417	

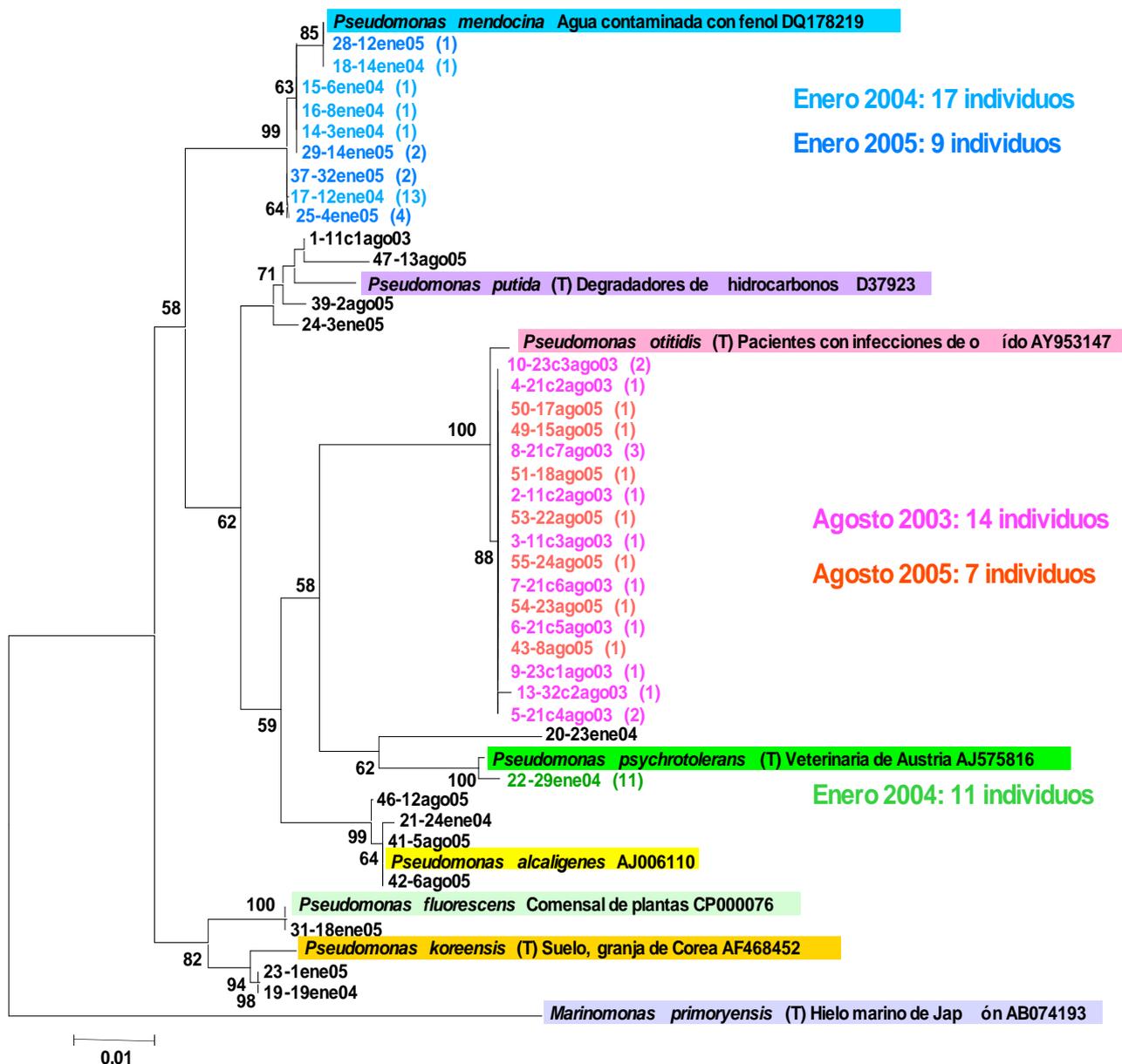
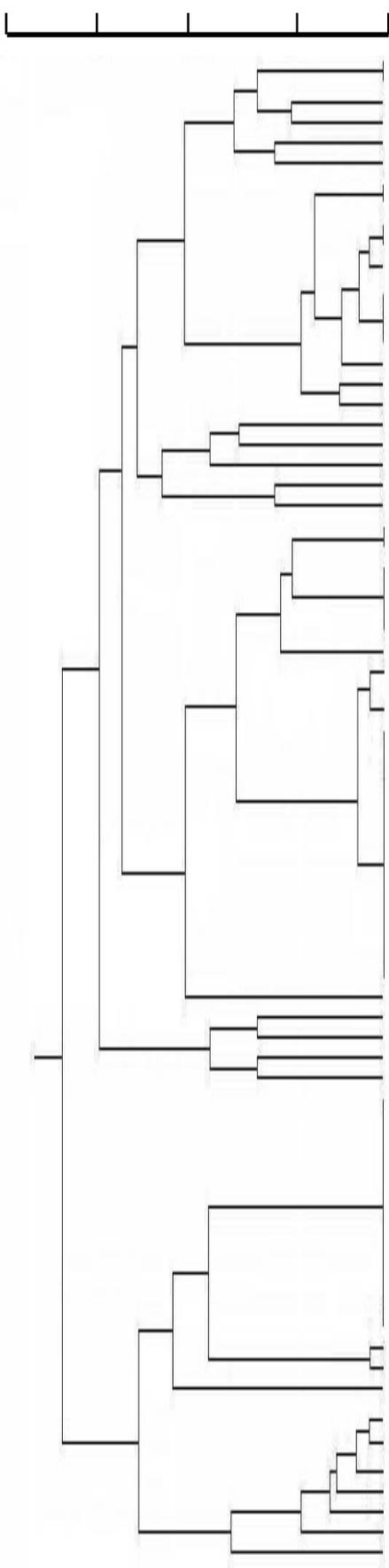
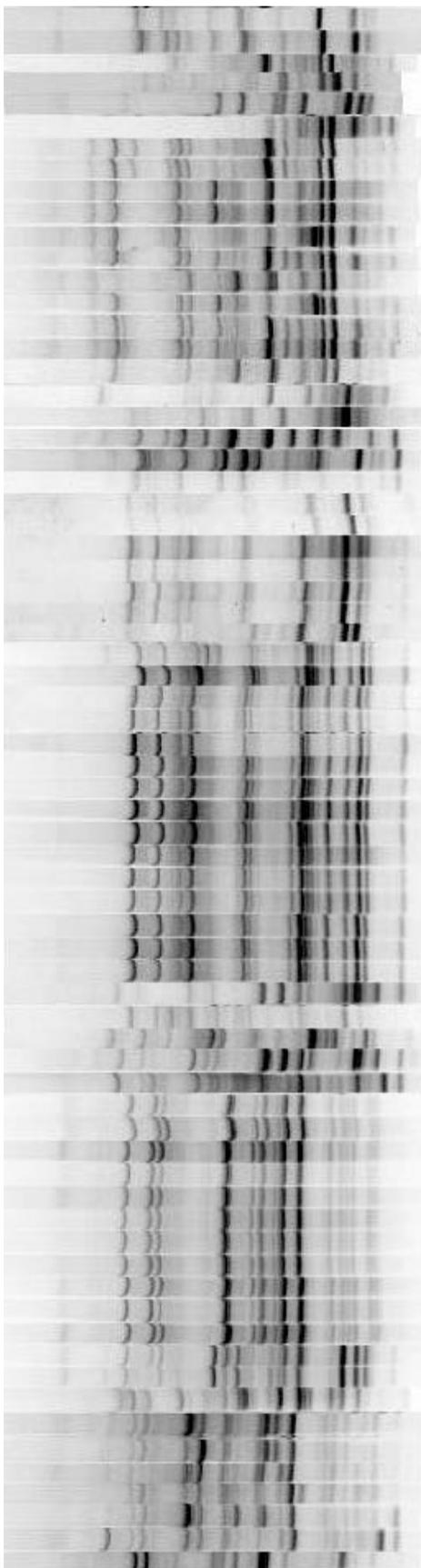


Fig. 4. Relación filogenética de 70 cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* aisladas de Laguna Grande, Churince basada en las secuencias del gen 16S rRNA completo (\approx 1450 pb). El árbol fue construido con el método Neighbor-joining usando un modelo de sustitución Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980). La escala de la distancia genética representa 0.01 sustituciones por sitio. El número junto a cada nodo indica los porcentajes de los valores de bootstrap para 1500 replicas que exceden el 50%. Las cepas de referencia están señaladas con cuadros de colores (en algunos casos se indica el lugar de dónde fueron aisladas las muestras): en el extremo derecho está la clave de acceso al GenBank. Los paréntesis indican el número de individuos aislados de cada representante.

0.70 0.52 0.35 0.17 0.00



Genotipo Cepa Localidad Colecta



Genotipo	Cepa	Localidad	Colecta	Especie
37	13	Rio (4)	ene 05	●
	32	Rio (4)	ene 05	●
6	2_1c_5	LG	ago 03	▲
39	2	LG (1)	ago 05	◆
41	5	LG (1)	ago 05	●
4	2_1c_2	LG	ago 03	▲
10	2_3c_3	LG	ago 03	▲
	2_3c_4	LG	ago 03	▲
5	2_1c_3	LG	ago 03	▲
	2_1c_4	LG	ago 03	▲
3	1_1c_3	LG	ago 03	▲
	2_1c_8	LG	ago 03	▲
8	2_3c_2	LG	ago 03	▲
	2_1c_7	LG	ago 03	▲
2	1_1c_2	LG	ago 03	▲
9	2_3c_1	LG	ago 03	▲
13	3_2c_2	LG	ago 03	▲
28	12	Rio (4)	ene 05	●
24	3	Rio (4)	ene 05	◆
7	2_1c_6	LG	ago 03	▲
46	12	LG (1)	ago 05	●
42	6	LG (1)	ago 05	●
29	15	Rio (4)	ene 05	●
	14	Rio (4)	ene 05	●
	4	Rio (4)	ene 05	●
25	5	Rio (4)	ene 05	●
	19	Rio (4)	ene 05	●
	17	Rio (4)	ene 05	●
31	18	Rio (4)	ene 05	◆
14	3	LG (2)	ene 04	●
15	6	LG (2)	ene 04	●
	17	LG (3)	ene 04	●
	18	LG (3)	ene 04	●
	2	LG (2)	ene 04	●
	9	LG (2)	ene 04	●
	1	LG (2)	ene 04	●
	4	LG (2)	ene 04	●
17	5	LG (2)	ene 04	●
	10	LG (2)	ene 04	●
	11	LG (2)	ene 04	●
	12	LG (2)	ene 04	●
	13	LG (2)	ene 04	●
	15	LG (2)	ene 04	●
	16	LG (3)	ene 04	●
23	1	Rio (4)	ene 05	■
16	8	LG (4)	ene 04	●
18	14	LG (2)	ene 04	●
19	19	LG (3)	ene 04	■
43	8	LG (1)	ago 05	▲
	31	LG (3)	ene 04	●
	32	LG (3)	ene 04	●
	25	LG (3)	ene 04	●
	30	LG (3)	ene 04	●
22	29	LG (3)	ene 04	●
	26	LG (3)	ene 04	◆
	27	LG (3)	ene 04	●
	28	LG (3)	ene 04	●
	21	LG (3)	ene 04	●
	22	LG (3)	ene 04	●
	20	LG (3)	ene 04	●
20	23	LG (3)	ene 04	▲
21	24	LG (3)	ene 04	●
1	1_1c_1	LG	ago 03	◆
49	15	LG (2)	ago 05	▲
54	23	LG (2)	ago 05	▲
51	18	LG (2)	ago 05	▲
50	17	LG (2)	ago 05	▲
55	24	LG (2)	ago 05	▲
53	22	LG (2)	ago 05	▲
47	13	LG (1)	ago 05	◆

Especie en base al gen 16S rRNA: ● *P. mendocina* ◆ *P. putida* ◆ *P. fluorescens* ◆ *P. psychrotolerans* ■ *P. korensis*
 ▲ *P. otitidis* ● *P. alcaligenes* ▲ *Pseudomonas* sp.

Fig. 5. Análisis de cluster con UPGMA utilizando una distancia genética de Nei (1987) de las huellas genéticas BOX-PCR. La escala de distancia genética está representada en la esquina superior izquierda. Las clonas idénticas tienen una distancia genética de 0 en base a la presencia/ausencia de bandas en cada locus. El símbolo junto a cada cepa corresponde a su identidad con el gen 16S rRNA.

b) Diversidad genotípica

Del total de las 70 cepas aisladas de *Pseudomonas*, se identificaron 39 genotipos únicos con los patrones de bandeo BOX-PCR (Fig. 5). El genotipo más común fue encontrado en enero de 2004 con una frecuencia de 18.8% (13 genotipos de 70 cepas aisladas). No se observa una recurrencia de los genotipos a lo largo de las estaciones (un mismo genotipo no se repite en diferentes ocasiones de muestreo). Un análisis más detallado revela que hay más clonalidad durante el invierno que durante el verano (Fig. 6). En agosto de 2005 el índice de diversidad genotípica es de 1, es decir que cada cepa está representada por un genotipo único. En cambio en enero de 2004 el índice de diversidad genotípica es de 0.29, lo que sugiere altos niveles de clonalidad durante el invierno.

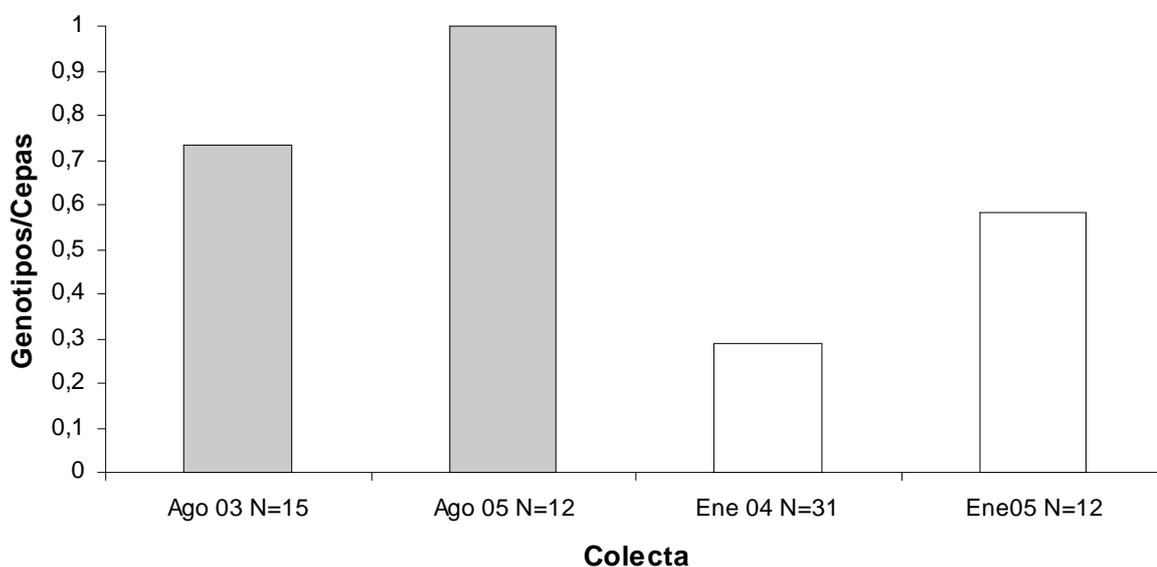


Fig. 6. Índice de clonalidad de las poblaciones del género *Pseudomonas* establecido a partir de las huellas genéticas BOX-PCR. Las colectas de verano (agosto 2003, agosto 2005) están representadas en gris mientras que las colectas de invierno están representadas en blanco (enero 2004, enero 2005).

c) Diversidad fenotípica

Se realizaron pruebas bioquímicas de los genotipos representantes con dos propósitos: por un lado para determinar si existe una relación entre el fenotipo y las estaciones y por otro lado para comparar la diversidad fenotípica con la diversidad genotípica. Del total de 39 cepas con genotipos representantes, sólo 29 permanecieron viables y pudieron ser crecidas en medio GSP. De acuerdo al análisis con UPGMA de las pruebas bioquímicas, las cepas no se agrupan ni por similitud en la secuencia del gen 16S rRNA ni por estaciones (Fig. 7).

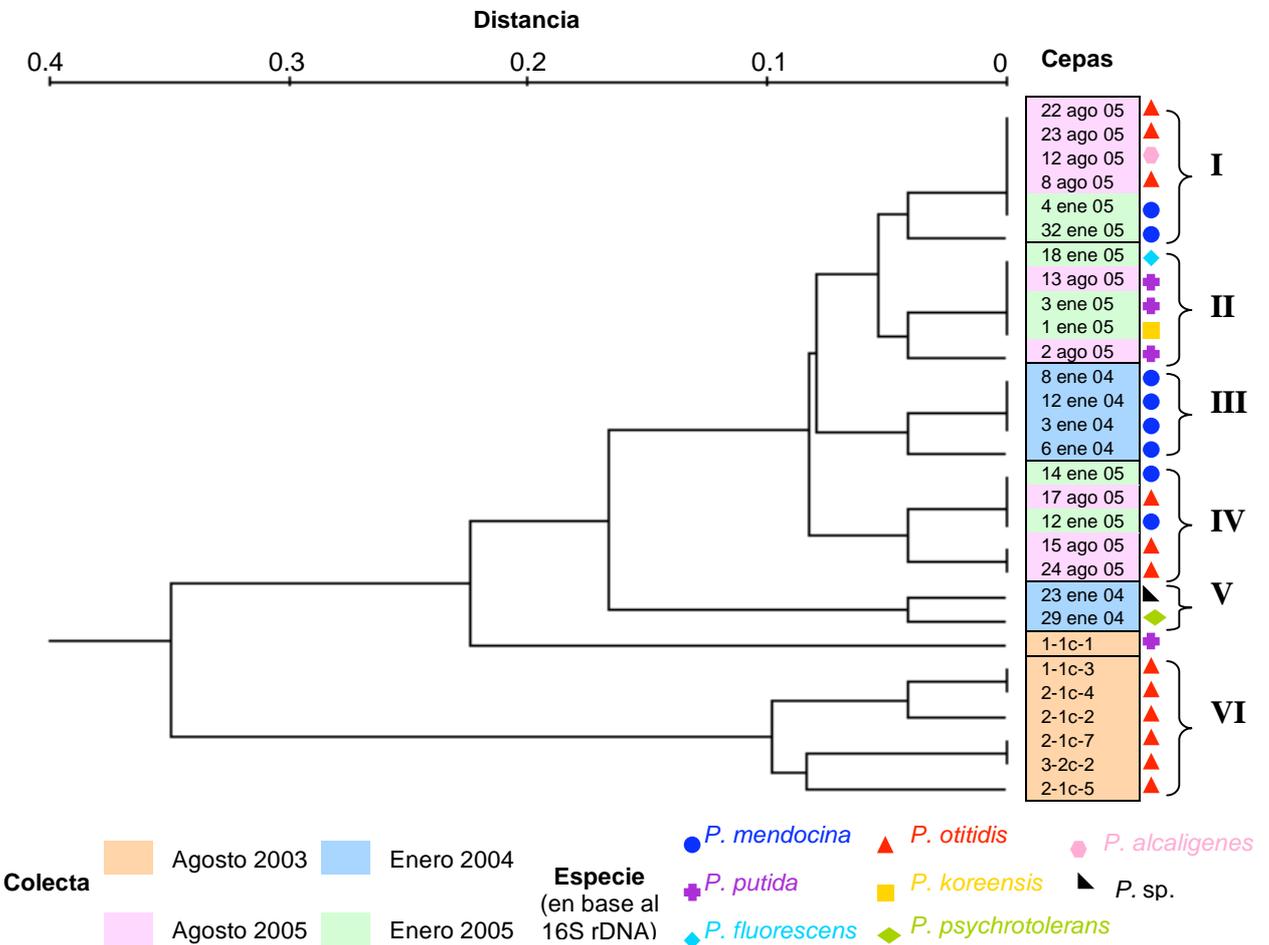


Fig. 7. Análisis de cluster con UPGMA de las diferentes pruebas bioquímicas (crecimiento en diferentes sustratos de carbono, crecimiento en diferente pH). La escala de distancia está representada en la parte superior. Las colectas de verano corresponden al amarillo y al rosa; las colectas de invierno corresponden al verde y al azul. El símbolo junto a cada cepa corresponde a su identidad con el 16S rRNA. Al definir los seis grupos vemos que las cepas se agrupan parcialmente por ocasión de muestreo.

Con base en el fenograma se definieron seis grupos. Cuando hacemos estas agrupaciones observamos que algunas cepas se agrupan por ocasión de muestreo. Las cepas del grupo VI fueron aisladas en la primera colecta (agosto de 2003) mientras que las cepas de los grupos III y V fueron aisladas en la segunda colecta (enero de 2004). Las cepas de los grupos I, II y IV fueron aisladas las colectas de 2005, aunque no se agrupan por estaciones. Si ubicamos las cepas que utilizamos para las pruebas bioquímicas en el árbol del gen 16S rRNA vemos que muchas de ellas no se agrupan en los grupos que se habían definido. Lo mismo sucede cuando ubicamos las cepas en el UPGMA de las huellas genéticas. Las cepas del grupo VI son la excepción ya que quedan juntas en el árbol de 16S rRNA. Cabe señalar que las cepas son idénticas de acuerdo al 16S rRNA; sin embargo, las pruebas bioquímicas muestran que existen diferencias fenotípicas entre ellas.

Se aplicó la prueba de Mantel para probar la correlación entre los datos bioquímicos, genotípicos y genéticos. El coeficiente de correlación entre las matrices de bioquímica y de distancia genética con BOX-PCR fue de 0.2537 ($P < 0.05$) con 1000 permutaciones y el coeficiente de correlación entre las matrices de distancia genética con BOX-PCR y de distancia genética con el gen 16S rRNA fue de 0.1398 ($P < 0.05$). El coeficiente de correlación entre las matrices de bioquímica y de distancia genética con el gen 16S rRNA fue de 0.0982 ($P > 0.05$).

5.2. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *P. otitidis*, *P. mendocina* y *P. psychrotolerans*.

Las tres especies con mayor número de representantes en la comunidad de acuerdo con el 16S rRNA fueron *P. otitidis*, *P. mendocina* y *P. psychrotolerans* (Tabla 2, Figura 4). Estos tres linajes numéricamente dominantes habían sido previamente identificados en

un estudio en el que se utilizaron los mismos aislados y se secuenciaron cuatro genes del genoma central (*rpoD*, *gyrB*, *acnB* y *recA*; Escalante *et al.*, en proceso).

Como se había mencionado, *P. otitidis* fue aislada exclusivamente en el verano (14 individuos en agosto de 2003 y siete individuos en agosto de 2005), mientras que *P. mendocina* fue aislada exclusivamente en el invierno (17 individuos en enero de 2004 y nueve individuos en enero de 2005). Un análisis con BOX-PCR revela que los genotipos no se repiten en diferentes ocasiones de muestreo (Fig. 8). Por ejemplo, los patrones de bandeo de las cepas de *P. otitidis* en el verano 2003 forman un grupo genotípico totalmente diferente al grupo genotípico formado por los patrones de bandeo de las cepas de *P. otitidis* en el verano de 2005 (Fig. 5).

Para precisar el comportamiento temporal de los linajes dominantes de *Pseudomonas*, se recurrió a un análisis de genética de poblaciones.

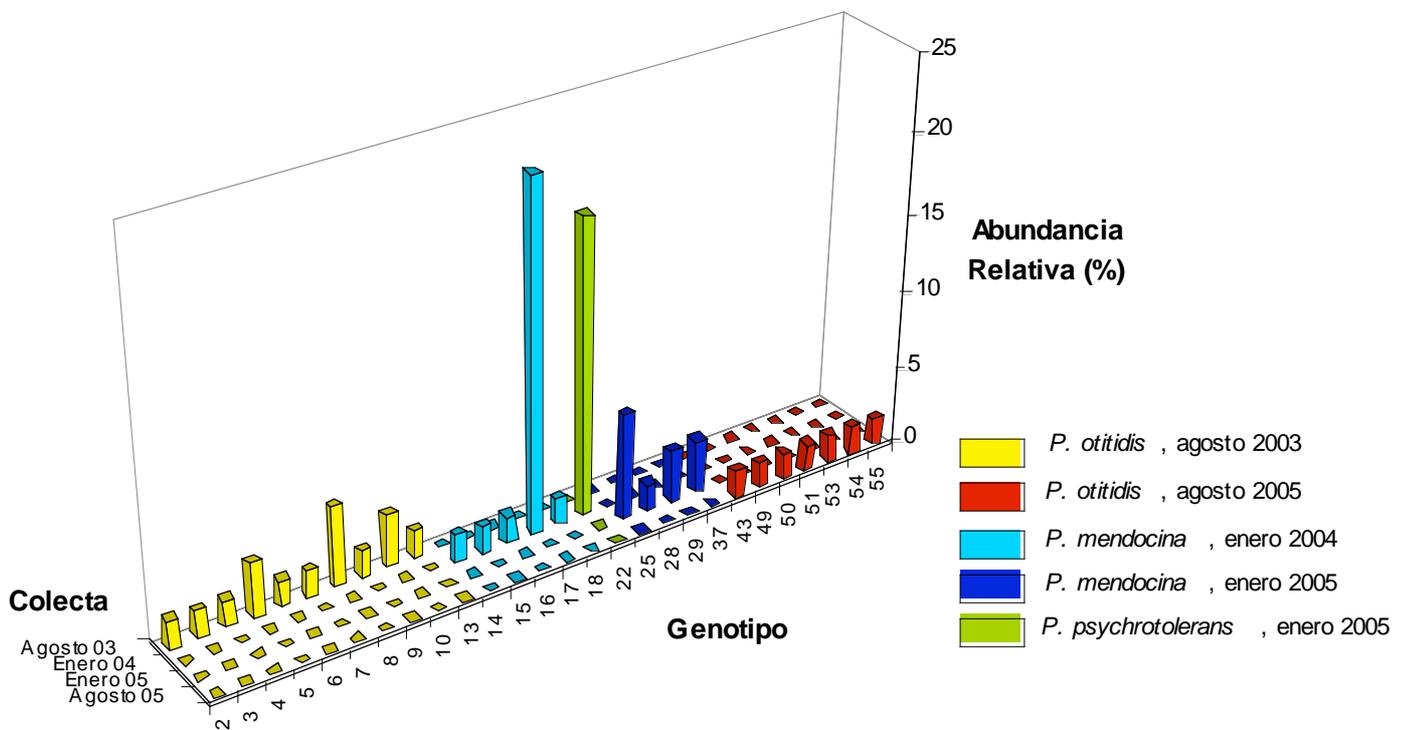


Fig. 8. Distribución temporal de los genotipos de las especies más abundantes. No se observa una recurrencia de genotipos a lo largo de las estaciones.

a) Diversidad genética

La diversidad genética de los linajes de verano es más elevada que la diversidad genética de los linajes de invierno (Tabla 4, Fig. 9). La diversidad genética promedio de los linajes de *P. otitidis* es de $H = 0.96$. En agosto de 2005 se registró la mayor diversidad y se aislaron siete individuos con genotipos únicos ($G/N = 1$). La diversidad genética promedio de los linajes de *P. mendocina* fue de 0.44, mientras que la diversidad genética del linaje de *P. psychrotolerans* fue de 0. En enero de 2004 se registró la menor diversidad: de los 17 individuos aislados de *P. mendocina* se identificaron cinco genotipos únicos ($G/N = 0.29$) mientras que los 11 individuos aislados de *P. psychrotolerans* pertenecieron a la misma clona ($G/N = 0.09$).

Los índices de clonalidad parecen mantener la hipótesis de que los linajes de invierno son más clonales que los linajes de verano. Sin embargo, es necesario hacer un análisis de desequilibrio de ligamiento para precisar dicha observación.

Tabla 4. Diversidad genética de *P. otitidis*, *P. mendocina* y *P. psychrotolerans* estimada con BOX-PCR.

Especie	Colecta	No. de cepas aisladas	No. de loci examinados	No. de sitios polimórficos	Proporción de loci polimórficos	No. de genotipos únicos	Frecuencia (%) de la clona más común	Diversidad genética (H)
<i>P. otitidis</i>	Agosto 2003	14	32	23	71.87	10	21.4	0.9345 ± 0.0451
<i>P. otitidis</i>	Agosto 2005	7	32	12	37.5	7	14.3	1.0000 ± 0.0764
<i>P. mendocina</i>	Enero 2004	17	23	12	52.17	5	76.5	0.4265 ± 0.1468
<i>P. mendocina</i>	Enero 2005	9	23	19	82.61	4	44.4	0.7778 ± 0.1100
<i>P. psychrotolerans</i>	Enero 2004	11	16	0	0	1	100	0.0000 ± 0.0000

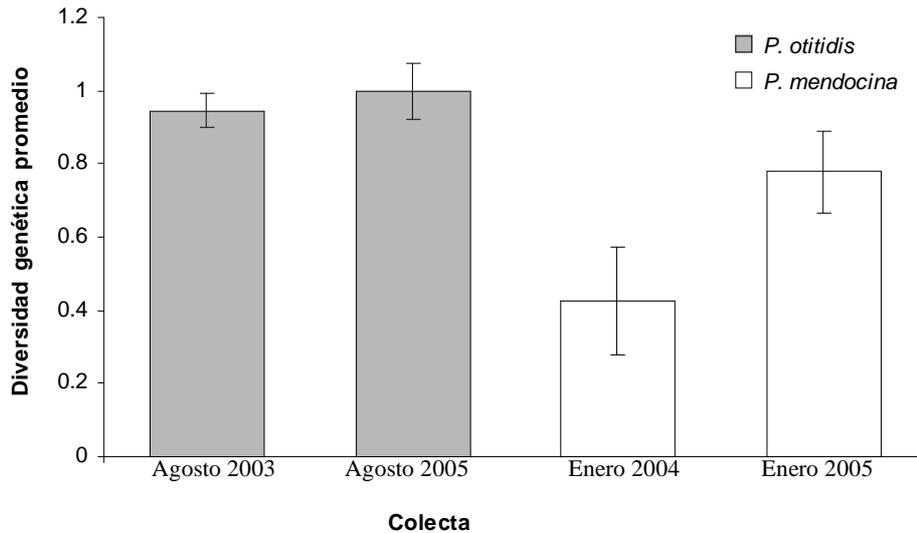


Fig. 9. Diversidad genética promedio de *P. otitidis* (en gris) y *P. mendocina* (en blanco) en verano (agosto 2003, agosto 2005) y en invierno (enero 2004, enero 2005), respectivamente. La diversidad genética de *P. otitidis* fue significativamente más elevada que la de *P. mendocina*.

b) Desequilibrio de ligamiento

El índice de asociación estandarizado (I_A^S) es una variación del índice de asociación de Maynard-Smith *et al.* (1993) que calcula la varianza de las diferencias pareadas sin asumir una distribución normal y que elimina su dependencia al tamaño de la muestra (Haubold *et al.*, 1998; Haubold y Hudson, 2000). Los valores del índice de asociación estandarizado encontrados para los linajes de *P. otitidis* y *P. mendocina* se presentan en la tabla 5. El procedimiento de Monte Carlo indicó que los valores observados y los valores esperados fueron significativamente diferentes en los cuatro linajes, por lo que se rechaza estadísticamente la hipótesis nula de equilibrio de ligamiento. Esto sugiere que los linajes de *P. otitidis* y *P. mendocina* son clonales y los eventos de recombinación no son lo suficientemente frecuentes para romper el desequilibrio de ligamiento. Aunque todas los linajes presentan desequilibrio de ligamiento, los linajes de *P. mendocina* parecen ser más clonales que los linajes de *P. otitidis*, ya que presentan un índice de asociación más elevado.

Tabla 5. Análisis de desequilibrio de ligamiento de *P. otitidis* y *P. mendocina*

Población	V_o	V_E	I_A^S	P_{MC}^1	P_{para}^2
<i>P. otitidis</i> , agosto 2003	13.3810	4.7943	0.0716	<0.01	2.51×10^{-27}
<i>P. otitidis</i> , agosto 2005	6.0476	2.7528	0.0598	0.01	8.15×10^{-07}
<i>P. mendocina</i> , enero 2004	34.600	4.3537	0.3656	<0.01	3.60×10^{-173}
<i>P. mendocina</i> , enero 2005	5.0095	1.0211	0.2604	<0.01	2.10×10^{-68}

La hipótesis nula de equilibrio de ligamiento ($H_0: V_o = V_E$) es puesta a prueba con una simulación de Monte Carlo¹ (P_{MC} , 100 muestreos) y con el método paramétrico² (P_{para})

c) Comparación entre la estructura genética espacial y temporal

P. otitidis no sólo fue aislada en agosto de 2003 y en agosto de 2005 sino que también estuvo presente a todo lo largo del sistema de Churince por lo que se pudo hacer un análisis de genética de poblaciones espacial de *P. otitidis* en agosto de 2003. Se aislaron 14 cepas en Laguna Grande, 21 cepas en la Laguna Intermedia y 11 cepas en el Manantial. Del total de las 44 cepas aisladas, se identificaron 25 genotipos únicos con las huellas genéticas BOX-PCR. La clona más común (genotipo 8) fue encontrada a una frecuencia de 15.9% (siete de 44 cepas aisladas) y se presentó tanto en Laguna Grande como en Laguna Intermedia. A diferencia del análisis de distribución temporal de los genotipos (Fig. 8), se observa una recurrencia de genotipos a lo largo del Sistema Churince (Fig. 10). Por ejemplo, el genotipo 5 se encontró en Laguna Grande y en el Manantial, que son los sitios más alejados el uno del otro en el Sistema Churince.

Se calculó el parámetro F_{ST} con la finalidad de evaluar si existe una mayor estructuración de las poblaciones de *P. otitidis* a lo largo del gradiente espacial, o si existe una mayor estructuración de las poblaciones a lo largo de las estaciones. La comparación entre poblaciones a lo largo del Sistema de Churince (Laguna Grande, Laguna Intermedia y el Manantial) resulta en valores de F_{ST} significativos (Tabla 6). Estos valores indican que el nivel de diferenciación genética entre poblaciones es bajo pero significativo, evidenciando una estructuración genética espacial. El valor de F_{ST} ,

cuando se comparan las poblaciones de 2003 y de 2005 es notablemente mayor que los valores de F_{ST} para el análisis de estructuración espacial. El nivel de diferenciación genética temporal es entonces mucho mayor que el nivel de diferenciación genética espacial.

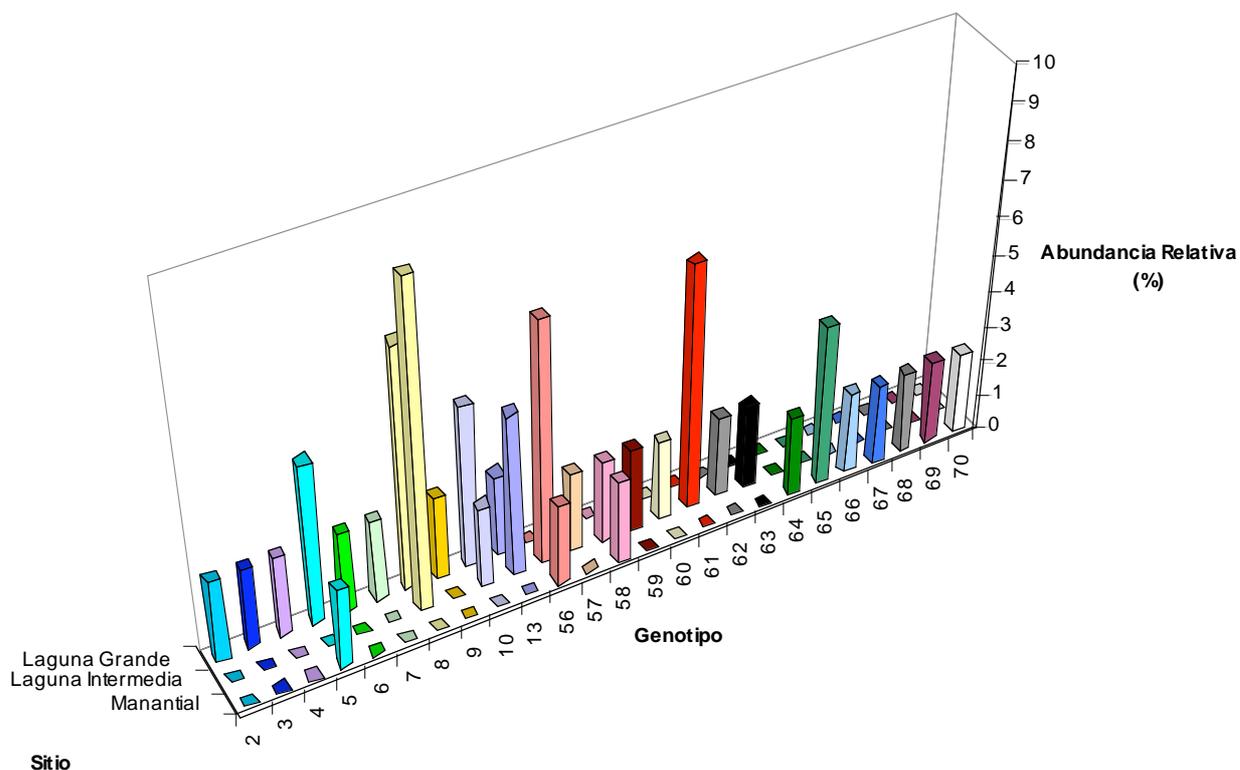


Fig. 10. Distribución espacial de la abundancia relativa de los genotipos de *P. otitidis*. En el eje x tenemos los sitios de colecta (3 poblaciones del sistema de Churince); en el eje y tenemos los genotipos; en el eje z tenemos la abundancia relativa en porcentaje de los genotipos. A diferencia del estudio temporal, se observa una recurrencia de genotipos a lo largo del Sistema Churince. Los genotipo 5, 8, 10, 13, 56 y 59 están presentes en varios sitios del sistema.

Tabla 6. Estructuración genética espacial y temporal de las poblaciones de *P. otitidis*.

Estudio	Poblaciones comparadas	F_{ST}	Valores de P^1
Espacial	Laguna Grande – Laguna Intermedia (1–2)	0.06102	<0.05
	Laguna Intermedia – Manantial (2–3)	0.04382	<0.05
	Laguna Grande – Manantial (1–3)	0.03701	<0.05
Temporal	Agosto 2003 – Agosto 2005 (1-2)	0.59892	<0.05

¹Valores de P obtenidos con 3000 permutaciones. Todos los valores fueron significativamente diferentes de cero ($P < 0.05$).

I. DIVERSIDAD TEMPORAL DE *Pseudomonas*

a) Factores estacionales que impactan las comunidades bacterianas

Existen varios factores ambientales que fluctúan estacionalmente en los sistemas acuáticos y que afectan la composición de las comunidades bacterianas (Kent *et al.*, 2004). Algunos ejemplos de factores físicos que varían estacionalmente en los sistemas acuáticos son: la temperatura, la radiación solar y el viento. Los factores químicos que pueden variar estacionalmente son: la concentración de nutrientes orgánicos e inorgánicos, la concentración de oxígeno disuelto, la concentración de sales y el pH. Los factores bióticos (como la depredación) también pueden fluctuar estacionalmente e impactar las comunidades bacterianas (Pace & Cole, 1994). Es muy común que los cambios estacionales en la composición de especies bacterianas en una comunidad estén explicados por más de uno de los factores ambientales mencionados anteriormente, como por ejemplo la temperatura y el carbón orgánico disuelto (Hullar *et al.*, 2006). Aunque en este trabajo no medimos las variables ambientales que fluctúan estacionalmente en el sistema Churince sería deseable realizar un análisis multivariado para determinar los factores estacionales que expliquen las variaciones estacionales en la comunidad de *Pseudomonas*.

b) Métodos para establecer patrones estacionales de diversidad

Se emplearon tres métodos para explorar los niveles de diversidad (fenotípica y genotípica) de *Pseudomonas* cultivables y su relación con las fluctuaciones estacionales.

Aunque se pudo observar un patrón estacional recurrente de ribotipos (16S rRNA) en tres especies (*P. otitidis*, *P. mendocina* y *P. koreensis*), existen varias especies en la comunidad de *Pseudomonas* cultivables que no siguen un patrón estacional. Desafortunadamente, debido al limitado número de cepas aisladas, no podemos saber si dichas especies responden o no a los cambios estacionales del ambiente.

No hubo una correspondencia entre las especies identificadas con las pruebas bioquímicas y las especies identificadas con el gen 16S rRNA. Observamos que las especies más emparentadas filogenéticamente presentan características fenotípicas muy diferentes. Esto puede deberse a que los caracteres fenotípicos están expuestos a experimentar convergencias evolutivas (Cerritos, 2007). Incluso hay cepas que son idénticas de acuerdo al gen 16S rRNA y sin embargo presentan diferencias fenotípicas. Como bien se sabe, un carácter fenotípico no sólo es producto de la información genética, sino de la interacción entre los genes y el ambiente. Puede ser que las diferencias encontradas a nivel fenotípico no existan a nivel genético y lo que se observe sea simplemente producto de plasticidad fenotípica. Por su lado, el 16S rRNA es un gen altamente conservado que se encuentra bajo selección purificadora.

De acuerdo con las pruebas bioquímicas, las cepas se agrupan parcialmente por estación en base a sus características fenotípicas. Esta observación podría relacionarse con la parte flexible del genoma que consiste en genes que varían entre cepas y especies y que codifican para proteínas responsables de la adaptación a diferentes nichos específicos del ambiente o de un hospedero (Hacker & Carniel, 2001).

A nivel de la estructura del genoma (huellas genéticas BOX-PCR) se observa mayor diversidad durante el verano que durante el invierno. También se observa que un mismo genotipo no se repite en diferentes ocasiones de muestreo. Por lo tanto, las

huellas genéticas BOX-PCR no sólo pueden ser una buena herramienta para describir patrones biogeográficos en bacterias (Fulthorpe *et al.*, 1998; Cho & Tiedje, 2000), sino que también pueden ser útiles para describir patrones temporales (en este caso estacionales) de las poblaciones bacterianas.

Esta última observación no implica que se deba de emplear preferencialmente un método para buscar patrones estacionales de diversidad. En este estudio mostramos que los tres métodos empleados arrojan resultados diferentes en función a las escalas de diversidad, enriqueciéndonos con información biológica a todos los niveles.

c) Fluctuaciones acopladas de dos especies

Observamos un patrón en la abundancia de las dos especies dominantes: *P. otitidis* fue aislada exclusivamente en el verano mientras que *P. mendocina* fue aislada únicamente en el invierno. Nunca antes se había reportado la “desaparición” recurrente de una especie del género *Pseudomonas* durante cierta época del año que coincidiera con la “aparición” de otra especie de *Pseudomonas*.

Revisaremos las posibles causas que podrían explicar este patrón de diversidad.

- i) Los patrones cíclicos de *P. otitidis* y *P. mendocina* podrían ser explicados por diferencias en su fisiología. Algunas especies bacterianas aisladas del ambiente en un periodo frío pueden experimentar un choque cuando son sembradas e incubadas a temperaturas relativamente elevadas, lo que podría prevenir su crecimiento. En cambio una misma especie podría crecer muy bien en placas de agar si es aislada del ambiente en periodos cálidos (Smit *et al.*, 2001). Xu *et al.* (1982) describieron por primera vez el estado viable pero no cultivable (VBNC) de una bacteria, en el

cual las células van perdiendo progresivamente su habilidad para formar colonias en un medio sólido pero permanecen viables. Este estado ha sido propuesto como una estrategia de supervivencia de algunas bacterias bajo condiciones ambientales adversas. McDougald *et al.* (1998) proponen que las células que entran en un estado de células viables pero no cultivables sufren algunos cambios fisiológicos que les permiten persistir en ambientes desfavorables durante largos periodos de tiempo sin perder su viabilidad; cuando las condiciones ambientales vuelven a ser propicias las células proliferan nuevamente. Los mismos autores reportan el estado VBNC en cuatro especies del género *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida* y *P. syringae*). Caruso *et al.* (2005) lograron aislar, mediante un protocolo de enriquecimiento, *Ralstonia solanacearum* durante el invierno en dónde casi no existían reportes de su presencia en los sistemas acuáticos, demostrando la existencia de un estado VBNC de las células causado por las bajas temperaturas.

ii) La aparente desaparición de *P. otitidis* en el invierno y de *P. mendocina* en el verano podría estar relacionada con disminuciones en los tamaños poblacionales en ciertas épocas del año, lo que dificulta su cultivo en placas de agar GSP. Existen varios trabajos que reportan fluctuaciones estacionales en la abundancia de las poblaciones bacterianas (Kirschner y Velimirov, 1997; Halda-Alija *et al.*, 2001; Brümmer *et al.*, 2004). En dichos estudios la abundancia de bacterias, estimada por cuenta directa con microscopía de epifluorescencia, es significativamente mayor en verano que en invierno. Diversos factores pueden explicar las disminuciones en la abundancia de individuos en cada estación. Odum *et al.* (1995) explican las oscilaciones cíclicas en la abundancia de las poblaciones por una combinación de factores bióticos intrínsecos (*i. e.* ciclos depredador-presa) y de factores abióticos extrínsecos (*i. e.* cambios de temperatura a lo largo de las estaciones). Los fagos son

muchos más abundantes en los sistemas acuáticos de los que se había pensado y son uno de los principales agentes de mortalidad en las poblaciones bacterianas (Weinbauer *et al.*, 2007). Por ejemplo, se ha visto que el fago UT1 juega un papel importante en el control de la densidad poblacional de *P. aeruginosa* en un ambiente lacustre (Ogunseitan *et al.*, 1990). Por otro lado, existe evidencia de que la abundancia de virus que controlan la producción bacteriana varía estacionalmente en un ambiente lótico. Se piensa que los fagos (cuya abundancia podría variar estacionalmente) podrían ejercer un importante control demográfico por depredación en las poblaciones bacterianas de Laguna Grande.

iii) Aunque se pudiera probar que hay una reducción en los tamaños poblacionales de *P. mendocina* en verano y de *P. otitidis* en invierno, las fluctuaciones en las densidades poblacionales no serían suficientes para explicar una coexistencia estable de las especies a través del tiempo. Las tres condiciones para que se mantenga la diversidad de especies de acuerdo con el modelo de efecto de almacenaje (Chesson, 2000) son: 1) que haya una respuesta diferencial de las especies a las variaciones ambientales, 2) que la intensidad de la competencia interespecífica sea menor cuando las poblaciones no están favorecidas por las condiciones ambientales, y 3) que el crecimiento de las poblaciones no favorecidas esté amortiguado. Si *P. otitidis* estuviera más adaptada a las condiciones ambientales del verano y *P. mendocina* estuviera más adaptada a las condiciones ambientales del invierno y las poblaciones tuvieran una respuesta competitiva diferencial en función de las condiciones ambientales prevalentes, se cumplirían las dos primeras condiciones para que haya una coexistencia estable. Finalmente, como lo dice su nombre, en el modelo de efecto de almacenaje el crecimiento de las poblaciones no favorecidas debe estar amortiguado. Aunque las especies del género *Pseudomonas* no forman esporas u

otras estructuras de resistencia (con excepción de los biofilms que requieren altas densidades poblacionales), el estado VBNC podría ser considerado una estrategia de supervivencia en el que las poblaciones sometidas a condiciones ambientales desfavorables podrían mantener una tasa de crecimiento baja sin llegar a extinguirse.

En conclusión, es muy posible que la falta de detección de *P. otitidis* en el invierno y de *P. mendocina* en el verano sea resultado de una combinación de factores y procesos como pueden ser: i) limitaciones en los métodos de cultivo (estado VBNC), ii) respuestas demográficas a los cambios ambientales e iii) interacciones competitivas acopladas con las fluctuaciones ambientales.

6.2. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *P. otitidis*, *P. mendocina* y *P. psychrotolerans*.

a) Estructura poblacional en ambientes heterogéneos y fluctuantes

La proporción de genotipos distinguibles (G/N) nos da un estimado de la clonalidad que existe en una población. De acuerdo al índice G/N , las especies dominantes de invierno, *P. mendocina* y *P. psychrotolerans*, son más clonales que *P. otitidis*, la especie dominante de verano. Tenemos dos casos extremos en donde todos los genotipos de *P. otitidis* en agosto de 2005 son distintos ($G/N= 1$), mientras G/N tiende a cero en el caso de *P. psychrotolerans* ($G/N= 0.09$); esta relación de clonalidad se ve reflejada en la diversidad genética que va de 1 a 0, respectivamente. A partir de estas observaciones estaríamos tentados a establecer una relación entre los niveles de clonalidad (o recombinación) y las condiciones ambientales. La recombinación en ambientes heterogéneos y cambiantes sería considerada como una ventaja selectiva. Las poblaciones de bacterias que pudieran provenir de una sola poza génica común

podrían desarrollar combinaciones genotípicas exitosas para soportar las presiones selectivas impuestas por la variabilidad del hábitat (Wise *et al.*, 1996). Aunque se rechazó estadísticamente la hipótesis nula de equilibrio de ligamiento, los eventos de recombinación en las poblaciones de *P. otitidis* parecen ser más frecuentes que en las poblaciones de *P. mendocina*. El índice de asociación estandarizado (I_A^S) de las poblaciones de *P. otitidis* es bajo (0.0716 en agosto de 2003 y 0.0598 en agosto de 2005) en comparación con el I_A^S de poblaciones clonales: 0.762 en *Vibrio cholerae* (Farfán *et al.*, 2002) y 0.2898 en *Staphylococcus epidermis* (Miragaia *et al.*, 2007). Una de las desventajas de emplear un marcador de tipo “fingerprinting genómico” para estimar disequilibrio de ligamiento es que podríamos estar subestimando la frecuencia de los eventos de recombinación ya que el intercambio entre fragmentos parecidos no es detectable. En estos casos, las secuencias de nucleótidos nos podrían dar un mejor estimado de los eventos de recombinación.

Aunque las poblaciones de *Pseudomonas* de Laguna Grande parecen tener una estructura clonal, se ha visto que una sola especie bacteriana puede exhibir diferentes tipos de estructuras poblacionales dependiendo de las condiciones ambientales. Durante los periodos de estrés, la selección natural favorecería la combinación de genes y en mejores condiciones esos genotipos serían capaces de propagarse de manera clonal (estructura poblacional epidémica). De este modo, los individuos adaptados a ciertas condiciones no estarían obligados a romper su combinación exitosa de genes por recombinación (Wise *et al.*, 1995). Para rastrear eventos de recombinación durante los momentos de estrés ambiental en Laguna Grande tendríamos que conocer en detalle la fisiología de las especies en estudio, aumentar la frecuencia del muestreo y utilizar marcadores moleculares más precisos para estimar eventos de recombinación.

Nuestros datos revelan una recurrencia de ribotipos de las dos especies más abundantes de *Pseudomonas* a lo largo de las estaciones. En un trabajo realizado por Ellis *et al.* (1999) se aislaron *Pseudomonas* fluorescentes de las hojas del betabel cada 30-40 días durante tres años. Con los datos de ácidos grasos y de RFLPs, se encontró un patrón estacional recurrente de las poblaciones. Las observaciones sugieren que las poblaciones de *Pseudomonas* están representadas por ribotipos altamente especializados (cuya abundancia está determinada por las condiciones ambientales que prevalecen en la superficie de las hojas) que se mantienen durante largos periodos de tiempo. Con base en el estudio de Ellis *et al.*, podríamos suponer que las poblaciones de *Pseudomonas* de Laguna Grande están dominadas por dos especies (*P. otitidis* y *P. mendocina*) que están adaptadas a las condiciones ambientales de modo que observamos una recurrencia de ribotipos de ambas especies a lo largo del tiempo.

Con las huellas genéticas BOX-PCR no observamos una recurrencia de genotipos a lo largo del tiempo y los grupos genotípicos de una estación a otra son totalmente diferentes. En teoría, si los genotipos estuvieran mantenidos por selección negativa dependiente de la frecuencia esperaríamos ver una recurrencia de genotipos ya que, aunque un genotipo se encontrara en condiciones desfavorables y disminuyera su proporción, sería mantenido por el hecho de ser raro. Estos cambios estacionales en la proporción de ecotipos y genotipos de acuerdo con las condiciones ambientales han sido observados tanto en el laboratorio (Spencer *et al.*, 2007) como en ambientes naturales (Warner & Oliver, 2008). Sin embargo, el comportamiento de las poblaciones de *Pseudomonas* de Laguna Grande se asemeja más a un caso de selección periódica en donde surge uno o más grupos clonales con el mismo genotipo que son remplazados de una estación a otra. Los ciclos de purga genética explicarían

que no observemos recurrencia de genotipos, aunque no podemos excluir la posibilidad de que no observemos una recurrencia de genotipos debido al submuestreo de la diversidad genotípica. Para resolver estas interrogantes tendríamos que muestrear por periodos de tiempo más largos (*i. e.*, 4 años).

c) Diferenciación temporal y divergencia de las poblaciones

Los análisis de estructuración genética indican que el nivel de diferenciación genética entre poblaciones en el tiempo es mucho mayor que el nivel de diferenciación genética entre poblaciones en el espacio. Wise *et al.* (1995, 1996) analizaron con isoenzimas (MLEE) la estructura genética y los patrones temporales de diversidad genética de las poblaciones lóxicas de *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. El estudio realizado a lo largo de 32 días revela que los electrotipos se repiten en diferentes ocasiones de muestreo, mientras que los electrotipos sólo aparecen en un sitio a lo largo del río (mayor diferenciación espacial que temporal). Esto sugiere una estabilidad relativa de los electrotipos en periodos de tiempo cortos. Nuestro estudio sugiere que en periodos de tiempo largos (2 años) observamos una estructuración genética mucho más marcada en comparación a la estructuración genética espacial.

No solo no observamos una recurrencia de genotipos con BOX-PCR a lo largo de las estaciones sino que los grupos genotípicos de una estación a otra son totalmente diferentes. Suponemos que de una estación a otra, los individuos divergen lo suficiente para crear nuevos grupos genotípicos previamente no observados. Pero, ¿cómo surgen estos nuevos genotipos? Las huellas genómicas basadas en PCR, como son los polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPDs) o las huellas de BOX-PCR y REP-PCR cambian como resultado de movimientos de elementos móviles, inserción de nuevo material genético o por rearrreglos del genoma (Whitaker, 2006).

Debido a que los cambios en las huellas BOX-PCR se dan en grandes regiones del genoma, es poco probable que los nuevos grupos genotípicos observados sean resultado de mutación o recombinación homóloga, sino que surjan por eventos de transferencia horizontal de genes o por deriva génica. Los nuevos grupos genotípicos también podrían provenir de la llegada de nuevos migrantes de una fuente externa.

6.3. MODELO HIPOTÉTICO DE LA DINÁMICA POBLACIONAL DE *P. otitidis* y *P. mendocina*.

A partir de los datos presentados y de la revisión bibliográfica obtenida proponemos el siguiente modelo hipotético de la dinámica poblacional de *P. otitidis* y *P. mendocina* en Laguna Grande (Fig. 11).

“Modelo de la dinámica poblacional de dos especies a lo largo dos años en un ambiente con estacionalidad marcada.”

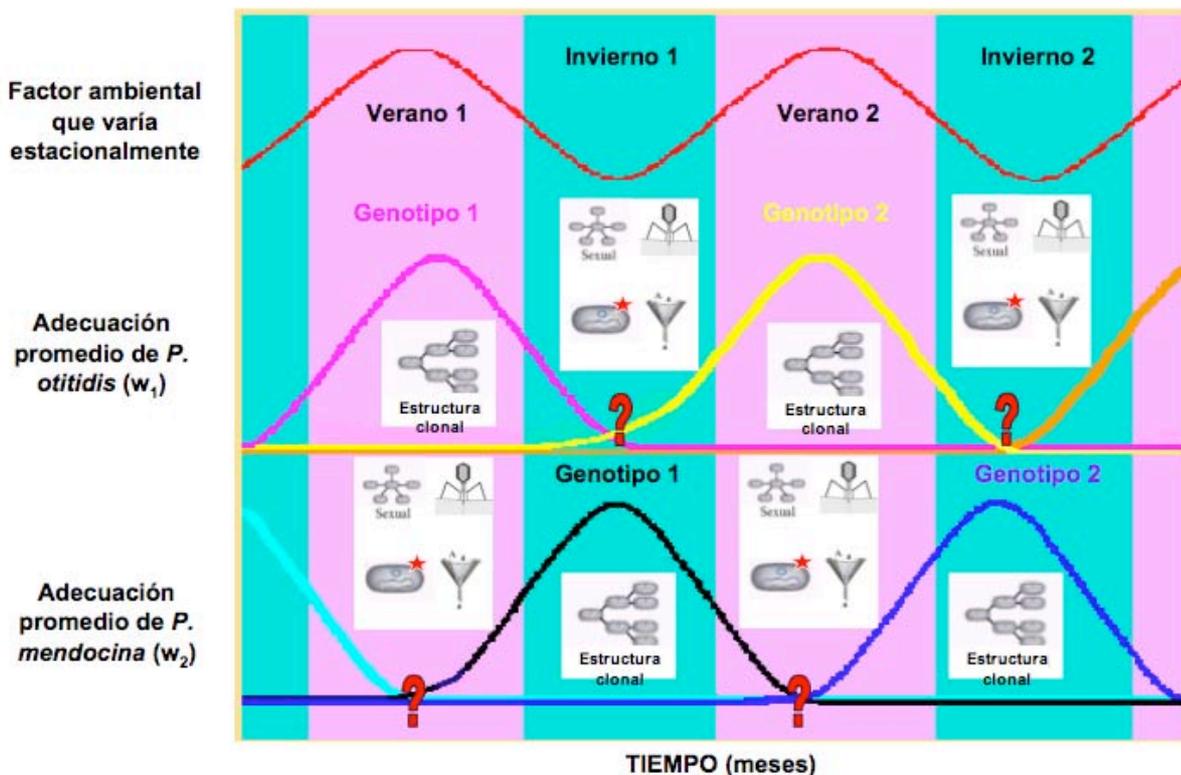


Fig. 11. Modelo hipotético de la dinámica poblacional local de dos especies del género *Pseudomonas* a lo largo de dos años en un ambiente con estacionalidad marcada. En la primera gráfica tenemos las fluctuaciones estacionales de algún factor ambiental a lo largo de dos años (tiempo en el eje de las abscisas medido en meses). Las dos siguientes gráficas representan las adecuación promedio de los individuos de *P. otitidis* y *P. mendocina* a través del tiempo.

La Laguna Grande está sujeta a fluctuaciones estacionales de uno o varios factores ambientales. Supongamos que tenemos dos especies que están localmente adaptadas a las condiciones ambientales prevalentes en cierta estación: por ejemplo, *P. otitidis* está mejor adaptada a las condiciones ambientales del verano por lo que su adecuación promedio (w_1) es mayor en esa época del año. En cambio *P. mendocina* está mejor adaptada a las condiciones ambientales del invierno por lo que su adecuación promedio (w_2) es mayor en esa época del año. Tanto el tamaño poblacional de *P. otitidis* como su respuesta competitiva, son entonces mayores en verano, mientras que el tamaño poblacional de *P. mendocina* y su respuesta competitiva son mayores en invierno. Este desplazamiento temporal de *P. otitidis* y *P. mendocina* permite que se mantenga la diversidad de especies del género *Pseudomonas* en las comunidades bacterianas de Laguna Grande (modelo de efecto de almacenaje). Si analizamos el comportamiento de *P. otitidis* a una escala más fina, tenemos que el genotipo 1 empieza a aumentar su adecuación en el verano 1. Este genotipo se propaga clonalmente y reemplaza los otros genotipos de la población que no tienen la ventaja adaptativa que tiene el genotipo 1. Cuando las condiciones ambientales empiezan a cambiar (condiciones desfavorables), todos los individuos de la población bajan su adecuación y el tamaño poblacional se ve reducido. En el siguiente verano (verano 2), las condiciones ambientales son de nuevo favorables por lo que surge un genotipo 2 con ventaja adaptativa que se propaga clonalmente (selección periódica). No sabemos cómo surge este nuevo genotipo. Las posibles explicaciones son: que 1) haya eventos de recombinación homóloga durante los momentos de estrés ambiental que den origen a una combinación de genes exitosa; 2) existan eventos de transferencia horizontal de genes como la transducción mediante la cuál se adquieren nuevo material genético; 3) surja espontáneamente una mutación

adaptativa; 4) la reducción estacional de los tamaños poblacionales ocasiona eventos de cuello de botella en los que la deriva génica actúa modificando las frecuencias alélicas por azar. Estos eventos de “selección periódica” ocasionan ciclos en los niveles de diversidad genética de cada especie. De acuerdo al modelo de “ecotipos” propuesto por Cohan (2001), si surgiera un genotipo que pudiera evitar los eventos de purga de diversidad genética y que fuera ecológicamente divergente podría presentarse un proceso de especiación. Por lo tanto, la gran diversidad de especies bacterianas en Laguna Grande no sólo se mantendría por la combinación de factores ecológicos y genéticos, sino que se generaría continuamente por eventos de especiación.

CONCLUSIONES

- Existe una estructuración temporal de las poblaciones de *Pseudomonas* que se relaciona con las fluctuaciones estacionales del ambiente. Esto se determinó ya que: 1) la composición de las especies bacterianas cambia de una estación a otra, 2) las cepas tienden a agruparse fenotípicamente por ocasión de muestreo, 3) se observa más diversidad de genotipos durante el verano que durante el invierno.
- Las dos poblaciones más abundantes de *Pseudomonas* se encuentran desfasadas en el tiempo: *P. otitidis* se recuperó exclusivamente en el verano mientras que *P. mendocina* se recuperó exclusivamente en el invierno. Este desplazamiento temporal acoplado con las fluctuaciones ambientales podría determinar la coexistencia entre las especies.
- Las poblaciones dominantes de *Pseudomonas* muestran una estructura clonal con bajo grado de recombinación y con posibles adaptaciones epidémicas a las condiciones ambientales del momento.
- No se observa una recurrencia de genotipos a lo largo de las estaciones lo que nos podría sugerir que la diversidad genética se mantiene por selección periódica más que por selección dependiente de la frecuencia.

Es muy posible que las fluctuaciones ambientales estacionales de Laguna Grande no sólo permitan la coexistencia entre las numerosas especies bacterianas sino que juegan un papel central en el origen y mantenimiento de la diversidad fenotípica y genotípica. Cuatro Ciénegas, Coahuila es entonces un laboratorio natural que podría brindarnos la posibilidad de ampliar nuestro conocimiento sobre los procesos que originan y mantienen la diversidad en procariontes, siempre y cuando se tomen las medidas adecuadas para su conservación.

Los trabajos con bacterias cultivables nos abren la posibilidad de ampliar nuestro conocimiento sobre el impacto de las fluctuaciones estacionales en el origen y mantenimiento de la diversidad bacteriana. Se pueden hacer estudios de tipo ecofisiológicos o de evolución experimental para determinar las condiciones ambientales que influyen en los patrones de distribución observados. En nuestro caso particular podríamos determinar el intervalo de tolerancia a la temperatura de *P. otitidis* y *P. mendocina* y podríamos hacer experimentos de competencia a diferentes temperaturas para determinar si la adecuación de los organismos cambia en función de la temperatura.

También se puede determinar cuál o cuáles de las variables ambientales explican las variaciones estacionales observadas en la estructura de las poblaciones de *Pseudomonas*. Esto sería posible teniendo las medidas de temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, concentración de nutrientes en las diferentes estaciones y haciendo un análisis de correlación múltiple.

Para entender la dinámica poblacional de la *Pseudomonas* con mayor detalle, sería indispensable ampliar el periodo de muestreo (*i. e.*, 4 años) así como su frecuencia (*i. e.*, muestrear todos los meses). También sería interesante tomar muestras del sedimento de Laguna Grande para determinar si están presentes ahí las especies que no aparecen en la columna de agua.

Finalmente, para hacer un análisis fino de genética de poblaciones se deberían de emplear secuencias de DNA, como podrían ser los genes *acnB*, *gyrB*, *recA* y *rpoD* (Escalante *et al.*, en proceso) para estimar diversos parámetros de genética de poblaciones como: el número de sitios polimórficos (P), el número de haplotipos por

especie (H), la diversidad nucleotídica promedio por sitio (π) y la variación esperada por sitio bajo el supuesto de evolución neutral (θ). También se podrían estimar tasas de recombinación y mutación así como realizar estudios de coalescencia para determinar tamaños efectivos y rastrear eventos de cuello de botella.

APÉNDICE. Similitud entre las secuencias del gen 16S rDNA de las cepas aisladas de Laguna Grande (Sistema de Churince) y las secuencias del Ribosomal Database Project II más parecidas. Todas las secuencias bajadas del RDB provienen de cepas aisladas; la “T” indica las secuencias tipo.

Clave	Cepa	Colecta	Tamaño (pb)	Secuencia del RDB más relacionada	No. de acceso	% de similitud
1	1-1c-1	Ago 03	1430	<i>Pseudomonas putida</i> (T)	D37923	98.9
2	1-1c-2	Ago 03	1425	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	99.5
3	1-1c-3	Ago 03	1419	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	99.0
4	2-1c-2	Ago 03	1459	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	99.2
5	2-1c-4	Ago 03	1330	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	97.8
6	2-1c-5	Ago 03	1407	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	99.2
7	2-1c-6	Ago 03	1475	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	97.1
8	2-1c-7	Ago 03	1260	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	98.8
9	2-3c-1	Ago 03	1466	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	99.3
10	2-3c-3	Ago 03	1391	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	99.1
11	2-3c-5	Ago 03	1439	<i>Enterobacter asburiae</i>	EF059886	98.1
12	3-2c-1	Ago 03	1430	<i>Enterobacter</i> sp.	EF030722	99.6
13	3-2c-2	Ago 03	1438	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	98.9
14	3	Ene 04	1426	<i>Pseudomonas mendocina</i>	DQ178219	99.4
15	6	Ene 04	1469	<i>Pseudomonas mendocina</i>	DQ178219	99.3
16	8	Ene 04	1419	<i>Pseudomonas mendocina</i>	DQ178219	98.6
17	12	Ene 04	1018	<i>Pseudomonas mendocina</i>	DQ178219	98.2
18	14	Ene 04	1486	<i>Pseudomonas mendocina</i>	DQ178219	99.9
19	19	Ene 04	1428	<i>Pseudomonas koreensis</i> (T).	AF468452	97.6
20	23	Ene 04	1411	<i>Pseudomonas</i> sp.	DQ910409	97.7
21	24	Ene 04	1424	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	AJ006110	97.0
22	29	Ene 04	1462	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> .(T)	AJ575816	98.8
23	1	Ene 05	1468	<i>Pseudomonas koreensis</i> (T).	AF468452	98.7
24	3	Ene 05	1480	<i>Pseudomonas putida</i> (T)	D37923	99.1
25	4	Ene 05	1361	<i>Pseudomonas mendocina</i>	DQ178219	99.1
26	8	Ene 05	1472	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	AB272352	99.5
27	10	Ene 05	1194	<i>Flavobacterium</i> sp.	AF493656	95.5
28	12	Ene 05	1341	<i>Pseudomonas mendocina</i>	DQ178219	99.6
29	14	Ene 05	1031	<i>Pseudomonas mendocina</i>	DQ178219	99.6
30	16	Ene 05	1388	<i>Flavobacterium</i> sp.	AF493656	96.3
31	18	Ene 05	1428	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CP000076	99.9
32	20	Ene 05	1380	<i>Flavobacterium</i> sp.	DQ628944	80.8
33	21	Ene 05	1390	<i>Flavobacterium</i> sp.	AF493656	96.5
34	22	Ene 05	1071	<i>Flavobacterium</i> sp.	AF493656	96.5
35	23	Ene 05	1400	<i>Marinomonas</i> sp.	DQ537515	99.4
36	29	Ene 05	1363	<i>Flavobacterium</i> sp.	AM167556	89.4
37	32	Ene 05	1450	<i>Pseudomonas mendocina</i>	DQ178219	99.0
38	1	Ago 05	1467	<i>Acinetobacter</i> sp. phenon 7 (T)	AJ626712	99.3
39	2	Ago 05	1108	<i>Pseudomonas putida</i>	D37923	98.0
40	4	Ago 05	1440	<i>Klebsiella oxytoca</i>	AY292871	98.9
41	5	Ago 05	1423	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	AJ006110	97.3
42	6	Ago 05	1460	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	AJ006110	97.6
43	8	Ago 05	1469	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	98.2
44	9	Ago 05	1333	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (T)	ATCC13883T	93.3
45	10	Ago 05	1472	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	AB272352	99.3
46	12	Ago 05	1379	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	AJ006110	97.7
47	13	Ago 05	1451	<i>Pseudomonas putida</i> .	D37923	98.5
48	14	Ago 05	1331	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (T)	ATCC13883T	98.2
49	15	Ago 05	1467	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	98.4
50	17	Ago 05	1482	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	99.0
51	18	Ago 05	1369	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	99.1
52	19	Ago 05	1468	<i>Acinetobacter junii</i>	EF178436	99.5
53	22	Ago 05	1475	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	98.6
54	23	Ago 05	1472	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	98.7
55	24	Ago 05	1471	<i>Pseudomonas otitidis</i> (T)	AY953147	99.4

LITERATURA CITADA

- Atwood, K. C., L. K. Schneider & F. J. Ryan.** 1951. Periodic selection in *Escherichia coli*. *Proceeding of the National Academy (PNAS)* **37**: 146-155.
- Begon, M., J. L. Harper & C. R. Townsend.** 1999. Ecología. Individuos, poblaciones y comunidades. 3ª Ed. Omega 1148pp.
- Boucher, D., L. Jardillier & D. Debroyas.** 2006. Sucesion of bacterial community composition over two consecutive years in two aquatic systems: a natural lake and a lake-reservoir. *FEMS Microbiology Ecology* **55**: 79-97.
- Brümmer, I. H. M., A. D. M. Felske & I. Wagner-Döbler.** 2004. Diversity and seasonal changes of uncultured *Planctomycetales* in river biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5094-5101.
- Carson, E. W.** 2005. Hybridization between *Cyprinodon atrorus* and *C. bifasciatus*: history, patterns, and dynamics. Unpubl. Ph.D. diss. Arizona State University, Tempe.
- Caruso, P., J. L. Palomo, E. Bertolini, B. Álvarez, M. M. López & E. G. Biosca.** 2005. Seasonal variation of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 populations in a Spanish river: recovery of stressed cells at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 140-148.
- Cerritos, R.** 2007. La especie como unidad evolutiva: uso de marcadores moleculares para su reconocimiento y delimitación, con especial énfasis en microorganismos. En: Eguiarte, L. E., V. Souza y X. Aguirre (eds) *Ecología molecular*. SEMARNAT, INE, México. 592 pp.
- Cerritos, R., L. E. Eguiarte, M. Avitia, J. Siefert & V. Souza.** High diversity of previously unknown cultivable species in an oasis of biodiversity in Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. En revisión.
- Chesson, P.** 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **31**: 343-366.
- Cho, J. & J. M. Tiedje.** 2000. Biogeography and Degree of Endemicity of Fluorescent *Pseudomonas* Strains in Soil. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:5448-5456.
- Clark-Tapia, R., C. Alonso-Corrado, L. E. Eguiarte & F. Molina-Freaner.** 2005. Clonal diversity and distribution in *Stenocereus eruca* (Cactaceae), a narrow endemic cactuc of the Sonoran Desert. *American Journal of Botany*. **92**: 272-278.
- Cockerham, C. C.** 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution* **23**: 72-83.
- Cockerham, C. C.** 1973. Analysis of gene frequencies. *Genetics* **74**: 679-700.

- Cohan, F. M.** 2001. Bacterial species and speciation. *Systematic Biology*. **50**: 513-524.
- Contreras-Aquieta, A.** 1998. New records of the snail *Melanoides tuberculata* (Müller, 1774) (Gastropoda: Thiaridae) in the Cuatro Ciénegas basin, and its distribution in the state of Coahuila, México. *The Southwestern Naturalist*. **43**: 283-286.
- Contreras-Balderas, S. & M. L. Lozano-Vilano.** 1996. Extinction of the most Sandia and Potosí valleys (Nuevo León, México) endemic pupfishes crayfishes and snail. *Ichthyological exploration of freshwaters*. **7**: 33-44.
- Druijn, F. J., J. Rademaker, M. Schneider.** 1996. Rep-PCR Genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer assisted phylogenetic analyses. In: Biology of plant-microbe interaction; *Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions* (G. Stacey, B. Mullin and P. Gresshoff, Eds.) APS Press, 497-502.
- Elena S. F. & R. E. Lenski.** 1997. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli* VII: mechanisms maintaining genetic variability within populations. *Evolution*. **51**: 1058-1067.
- Ellis, R. J., L. P. Thompson, M. J. Bailey.** 1999. Temporal fluctuation in the pseudomonad population associated with sugar beet leaves. *Microbial Ecology* **28**: 345-356.
- Ellstrand, N. C. & M. L. Roose.** 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany*. **74**: 123-131.
- Elser, J. J., J. H. Schambel, M. Kyle, J. Watts, E. W. Carson, T. E. Dowling, C. Tang & P. D. Roopnarine.** 2005. Response of grazing snails to phosphorus enrichment of modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater Biology* **50**: 1808-1825.
- Escalante, A. E., L. E. Eguiarte & V. Souza.** *Pseudomonas* sp. from the environment: evidence of clonality and lineage differentiation within a small water system in Mexico. *En proceso*.
- Farfán, M., D. Miñana-Galbis, M. C. Fusté & J. G. Lorén.** 2002. Allelic diversity and population structure in *Vibrio cholerae* O139 bengal based on nucleotide sequence analysis. *Journal of Bacteriology* **184**: 1304-1313.
- Fox, C. H., D. A. Roff & D.J. Fairbairn.** 2001. "Evolutionary Ecology. Concepts and case studies." Oxford University Press. 424 pp.
- Fulthorpe, R. R., A. N. Rhodes & M. Tiedje.** 1998. High levels of endemism of 3-chlorobenzoate-degrading soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 1620-1627.

- Giovannoni, S. J. & U. Stingl.** 2005. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437: 343-348.
- Hacker, J. & E. Carniel.** 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: a Darwin view of the evolution of microbes. *The EMBO Journal* 2: 376-381.
- Halda-Alija L., S. P. Hendricks, T. C. Johnston.** 2001. Spatial and temporal variation of *Enterobacter* genotypes in sediments and the underlying hyporheic zone of an agricultural stream. *Microbial Ecology* 42: 286-294.
- Haubold, H., Hudson, R. R.** 2000. LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* 16: 847-848.
<http://adenine.biz.fhweihenstephan.de/cgi-bin/lian.cgi.pl>
- Hedrick, P. W., M. E. Ginevan, E. P. Ewing.** 1976. Genetic Polymorphism in heterogeneous Environments. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 7: 1-32.
- Hedrick, P. W.** 1986. Genetic Polymorphism in heterogeneous Environments: A Decade Later. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 17: 535-566.
- Helling, R. B., C. Vargas & J. Adams.** 1987. Evolution of *Escherichia coli* during growth in a constant environment. *Genetics* 116: 349-358.
- Hullar, M. A. J., L. A. Kaplan & D. A. Stahl.** Recurring seasonal dynamic of microbial communities in stream habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 713-722.
- Hutchinson, G. E.** 1957. Concluding remarks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 22: 415-427.
- Jaspers, E., K. Nauhaus, H. Cypionka & J. Overmann.** 2001. Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 153-164.
- Jaspers, E. & J. Overmann.** 2004. Ecological significance of microdiversity: identical 16S rRNA gene sequence can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysiologicals. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4831-4839.
- Istock, C. A., K. E. Duncan, N. Ferguson & X. Zhou.** 1992. Sexuality in a natural population of bacteria –*Bacillus subtilis* challenge the clonal paradigm. *Molecular Ecology* 1: 95-103.
- Kassen, R.** 2002. The experimental evolution of specialists, generalists, and the maintenance of diversity. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 173-190.
- Kassen, R. & Rainey, P. B.** 2004. The ecology and genetics of microbial diversity. *Annual Review Microbiology* 58: 207-231.

- Kent, A. D., S. E. Jones, A. C. Yannarell, J. M. Graham, G. H. Lauster, T.K. Kratz & E. W. Triplett.** Annual patterns in bacterioplankton community variability in a humic lake. *Microbial Ecology* **48**: 550-560.
- Kerstens, K., W. Ludwig, M. Vancanneyt, P. De Vos, M. Gillis & K. H. Schleifer.** 1996. Recent changes in the classification of the pseudomonads: an overview. *Systematic and Applied Microbiology* **19**: 465-477.
- Kirschner, A. K. T., B. Velimirov.** 1997. A seasonal study of bacterial community succession in a temperate backwater system, indicated by variation in morphotype numbers, biomass, and secondary production. *Microbial Ecology* **34**: 27-38.
- Kumar, S., K. Tamura & M. Nei.** 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* **5**: 150-163.
- Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M., editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons. pp. 115-175.
- Lenski R. & M. Travisano.** 1994. Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* **91**: 6808-6814.
- Levin, B. R.** 1981. Periodic selection, infectious gene exchange and the genetic structure of *Escherichia coli* populations. *Genetics* **99**: 1-23.
- Long, J. C.** 1986. The allelic correlation structure of Gainji and Kalam speaking people. I. The estimation and interpretation of Wright's F-statistics. *Genetics* **112**: 629-647.
- Louws, F. J., D. W. Fulbright, C. Taylor & F. J. De Bruijn.** 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 2286-2295.
- Maidak B. L., N. Larsen, M. J. McCaughey, R. Overbeek, G. J. Olsen, K. Fogel, J. Blandy & C. R. Woese.** 1994. The ribosomal database project. *Nucleic Acid Research* **22**: 3485-3487. <http://rdp.cme.msu.edu/>
- Mantel, N.** 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* **27**: 209-220.
- Martin, B., O. Humbert, M. Camara, E. Guenzi, J. Malker, T. Mitchell, P. Andrew, M. Prudhomme,, G. Alloing, R. Hakenbeck, D. A. Morrison, G. J. Boulnois & J. Claverys.** 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acid Research* **20**: 3479-3483.

- Maynard Smith, J., N. H. Smith, M. O'Rourke & B. G. Spratt.** 1993. How clonal are bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* **90**: 4384-4388.
- McArthur, J. V., D. A. Kovacic & M. H. Smith.** 1988. Genetic diversity in natural populations of a soil bacterium across a landscape gradient. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* **85**: 9621-9624.
- McArthur, J. V.** 2006. *Microbial ecology: an evolutionary approach*. Academic press. Elsevier. 416 pp.
- McDougald, D., S. A. Rice, D. Weichart & Kjelleberg.** 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* **25**: 1-9.
- Miller, M. P.** 1997. Tools For Population Genetic Analyses (TFGPA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Minckley W. L.** 1969. Environments of the Bolsón of Cuatro Ciénegas, Coahuila, México. Texas Western Press, Science Series, N 2, 65 pp.
- Miragaia, M., J. C. Thomas, I. Couto, M. C. Enright & H. de Lencastre.** 2007. Inferring a population structure for *Staphylococcus epidermidis* from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology*. **189**: 2540-2552.
- Nei, M., & W. H. Li.** 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the National Academy of Sciences (PNAS)* **76**: 5269-5273.
- Nei, M., and F. Tajima.** 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* **97**:145-163.
- Nei, M.** 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Ochman, H., J. G. Lawrence & E. A. Groisman.** 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* **405**: 299-304.
- Odum, W. E., E. P. Odum & H. T. Odum.** 1995. Nature's pulsing paradigm. *Estuaries and Coasts*. **18**: 1559-2723.
- Ogunseitán, O. A., G. S. Sayler & R. V. Miller.** 1990. Dynamic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and bacteriophages in lake water. *Microbial Ecology* **19**: 171-185.
- Pace M. L. & J. J. Cole.** 1994. Comparative and experimental approaches to top-down and bottom-up regulation of bacteria. *Microbial Ecology* **28**: 181-193.

- Palleroni, N. J., R. Kunisawa, R. Contopoulou & M. Doudoroff.** 1973. Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **23**: 333-339.
- Persing D. H., F. C. Tenover, J. Versalovic, Y. Tang, E. R. Unger, D. A. Relman, T. J. White.** 2004. *Molecular Microbiology. Diagnostic Principles and Practice*. ASM Press Washington, D. C. 724 pp.
- Pirnay, J.P., D. De Vos, C. Cochez, F. Bilocq, A. Vanderkelen, M. Zizi, B. Ghysels & P. Cornelis.** 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays an epidemic population structure. *Environmental Microbiology* **4**: 898-911.
- Rainey, P. B. & M. Travisano.** 1998. Adaptative radiation in a heterogeneous environment. *Nature* **394**: 69-72.
- Rainey, P. B., A. Buckling, R. Kassen & M. Travisano.** 2000. The emergence and maintenance of diversity: insights from experimental bacterial populations. *Trends in Ecology and Evolution* **15**: 243-247.
- Ravin, A. W.** 1963. Experimental approaches to the study of bacterial phylogeny. *American Naturalist* **97**: 307-318.
- Rhodes, O. E., Chesser, R. K. & Smith, M. H.** 1996. *Population Dynamics in Ecological Space and Time*. The University of Chicago Press 388 pp.
- Rosenzweig, R. F., Sharp, R. R., Treves, D. S. & Adams, J.** 1994. Microbial evolution in a simple unstructured environment - genetic differentiation in *Escherichia coli*. *Genetics* **137**: 903-917.
- Rozen, D. E. & Lenski, R. E.** 2000. Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*: dynamics of a balanced polymorphism. *The American Naturalist* **155**: 24-35.
- Sacchi, C. T., A. M. Whitney, L. W. Mayer, R. Morey, A. Steigerwalt, A. Boras, R. S. Weyant & T. Popovic.** 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases*. **8**: 1117-1123.
- Schneider, S., J. M. Kruffer, D. Roessli, & L. Excoffier.** 2000. Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. <http://lgb.unige.ch/arlequin/>
- Smouse, P. E., J. C. Long and R. R. Sokal.** 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel Test of matrix correspondence. *Systematic Zoology* **35**: 627-632.
- Smit E., P. Leeflang, S. Gommans, J. van den Broek, S. Van Mil & K. Wernars.** 2001. Diversity and Seasonal Fluctuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2284-2291.

- Souza, V., T. T. Nguyen, R. R. Hudson, D. Piñero, R. E. Lenski.** 1992. Hierarchical analysis of linkage disequilibrium in *Rhizobium* populations: evidence for sex? *Proceeding of the National Academy of Sciences (PNAS)* **89**: 8389-8393.
- Souza, V., L. Espinoza-Asuar, A. E. Escalante, L. E. Eguiarte, J. Farmer, L. Forney, L. Lloret, J. M. Rodríguez-Martínez, J. Soberon, R. Dirzo & J.J. Elser.** 2006. An endangered oasis of aquatic microbial diversity in the Chihuahuan desert. *Proceeding of the National Academy of Sciences* **17**: 6565-6570.
- Spiers, A. J., A. Buckling & P. B. Rainey.** 2000. The cause of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* **146**: 2345-2350.
- Spencer, C. C., G. Saxer, M. Travisano & M. Doebeli.** 2007. Seasonal resource oscillations maintain diversity in bacterial microcosms. *Evolutionary Ecology Research* **9**: 775-787.
- Stackebrandt, E. & B. M. Goebel.** 1994. Taxonomic note: a place for DNA:DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846-849.
- Stanier, R. Y., N. J. Palleroni & M. Doudoroff.** 1966. The aerobic *Pseudomonas* – a taxonomic study. *Journal of General Microbiology* **42**: 159-271.
- Thingstad, T. F.** 2000. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnology and Oceanography* **45**: 1320-1328.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin & D. G. Higgins.** 1997. The ClustalX Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research* **24**: 4876-4882.
- Turner, P. E., Souza, V. & Lenski, R. E.** 1996. Test of ecological mechanisms promoting the stable coexistence of two bacterial genotypes. *Ecology* **77**: 2119-2129.
- Versalovic, J., K. Thearith & J. R. Lupski.** 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* **24**:6823-6831.
- Warner, E. & J. D. Oliver.** 2008. Population structures of two genotypes of *Vibrio vulnificus* in oysters (*Crassostrea virginica*) and seawater. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 80-85.
- Weinbauer, M. G., M. Agis, O. Bonilla-Findji, A. Malits & C. Winter.** Bacteriophage in the environment. En: McGrath, S. & D. van Sinderen. 2007. Bacteriophage: Genetics and Molecular Biology. *Horizon Scientific Press*. 343 pp.
- Weir, B.S. & C. C. Cockerham.** 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370.

- Whitaker, R. J.** 2006. Allopatric origins of microbial species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* **361**: 1975-1984.
- Whittam, T. S., H. Ochman & R. K. Selander.** 1983. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proceeding of the National Academy of Sciences (PNAS)* **80**: 1751-1755.
- Wise, M. G., L. J. Shimkets & J. V. McArthur.** 1995. Genetic structure of a lotic population of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 1791-1798.
- Wise, M. G., J. V. McArthur, C. Wheat & L. J. Shimkets.** 1996. Temporal variation in genetic diversity and structure of a lotic population of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 1558-1562.
- Wootton J. T.** 1998. Effects of disturbance on species diversity: a multitrophic perspective. *The American Naturalist* **152**: 801-825.
- Wright, S.** 1951. The genetical structure of populations. *Ann.Eugen.* **15**: 323-354.
- Wright, S.** 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* **19**: 395-420.
- Xu, H., N. Roberts, F. Singleton, R. Atwell, D. Grimes & R. Colwell.** 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *FEMS Microbial Ecology* **8**: 313-323.