

Aislamiento y caracterización de cianobiontes de diversas Zamias en Puerto Rico

Por

Ana M. Argüello López

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRA EN CIENCIA
EN
BIOLOGÍA

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO DE MAYAGÜEZ
2007

Aprobado por:

Lucy Bunkley Williams, PhD
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Eduardo C. Schröder, PhD
Miembro, Comité Graduado

Fecha

Carlos Ríos Velázquez, PhD
Presidente, Comité Graduado

Fecha

Roberto Vargas Ayala, PhD
Representante de Estudios Graduados

Fecha

Lucy Bunkley Williams, PhD
Directora del Departamento

Fecha

ABSTRACT

For the first time in Puerto Rico, the cultivable cyanobionts of three species of *Zamia* have been isolated from sub-tropical forest areas. These cyanobionts were morphologically identified and characterized by molecular techniques. Of the three species of *Zamia*, 25 cyanobionts were isolated, cultured and then grouped by Amplified ribosomal DNA Restriction Analysis (ArDRA) and Hip1-PCR. Results showed that: (1) specificity between the isolated cyanobionts and selected *Zamias* was not observed; (2) different coralloid roots of the same *Zamia* plant can host the same cyanobiont as well as different species of *Zamia* present the same cyanobiont according to the Hip1-PCR (3) the isolated cyanobionts belong to the Sub-Group IV of the Nostocales, which are characterized by filamentous cyanobacteria with nitrogen fixation capacity; (4) six partial sequences may be unknown genera or species; (5) for the first time the *Tolypothrix* was identified as a cyanobacteria capable of form symbiosis and it was found in three coralloid roots of *Z. amblyphyllidia* D. W. Stevenson.

RESUMEN

Por primera vez en Puerto Rico se aislaron e identificaron cianobiontes cultivables de tres especies de *Zamia* en diferentes áreas de bosques sub-tropicales de Puerto Rico. Éstos cianobiontes fueron identificados morfológicamente y caracterizados por medio de métodos moleculares. De las tres especies de *Zamia* se aislaron y cultivaron 25 cianobiontes los cuales fueron segregados por medio de análisis de restricción del DNA ribosómico amplificado (ARDRA) y de Hip1-PCR. Los resultados muestran que : (1) no se observó especificidad entre los cianobiontes aislados y las *Zamias* seleccionadas no existe especificidad, (2) raíces coraloideas en una misma planta de *Zamia* puede albergarse el mismo cianobionte como también diferentes especies de *Zamia* comparten el mismo cianobionte, (3) según las secuencias del 16S rDNA, los cianobiontes aislados pertenecen al Sub-grupo IV de los Nostacales en la cual se encuentran las cianobacterias filamentosas y fijadoras de nitrógeno, (4) seis secuencias parciales de cianobiontes posiblemente son géneros o especies desconocidas, (5) por primera vez se identifica el género *Tolypothrix* como una cianobacteria capaz de formar simbiosis la cual fue encontrada en tres raíces coraloideas de la especie *Z. amblyphyllidia* D.W. Stevenson.

DEDICATORIA

Esta investigación se la dedico a mi Señor Jesús Cristo, quien con su creativa ingeniosidad me llevó a establecer simbiosis mutualista con muchos compañeros y profesores del Departamento de Biología del Colegio de Mayagüez. Gracias Señor por todos esos Ángeles que pusiste en mi camino.

También le dedico esta tesis a mis dos grandes amores a mi hija Sofía Victoria por ser la motivación principal para culminar esta investigación. A mi esposo Luís Calmeiro por su amor incondicional y por motivarme a través de la distancia.

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Eva N. Dávila de la Universidad Metropolitana de San Juan por darme la oportunidad de haber sido estudiante investigadora en sus estudios con las Zamias en Puerto Rico durante mis años de bachillerato, por apasionarme con estos seres primitivos y por permitirme utilizar sus poblaciones de Zamias para realizar esta investigación. También por ser la responsable de que me haya lanzado a continuar estudios graduados.

Al Dr. Carlos Ríos Velázquez a quien le debo la culminación de esta investigación, por ser mimaestro, mentor y mí guía.

Al Dr. Eduardo Schröder por ayudarme a establecer las bases de esta investigación y por tener fe en mí.

A los miembros del comité; Dra. Lucy Williams y Dr. Roberto Vargas Ayala por toda su ayuda y consejos para la culminación de esta investigación

Al Dr. Carlos Muñoz por aceptarme en el 2001 como su estudiante graduada y por su gran ayuda para la culminación de esta tesis.

Un profundo agradecimiento a la Asociación de Tías y Abuelas de Sofía Victoria. Gracias por amar y tomar cuenta de mi hija Sofía durante el verano del 2004 y durante las largas noches y fines de semana que invertí en el laboratorio. A mi mamá Myrna Y. López, Tirtsa Porrata-Doria Rivera, María F. Rojas Durán, Militza Rosas, Ana Trujillo, Elisa y Enrique Miró, Luís Calmeiro, Idaris, Alina de la Mota, Omaira Rivera y Luis Bosques.

A los compañeros que ayudaron en la colección de raíces coraloides. Tirtsa Porrata-Doria Luís Bosques, Francisco Class y Katherine Carrero.

A esas maestras por guiarme en el tenebroso mundo de lo molecular: Profa. Gladys Toro, Silvia Ara, Omaira Rivera, Militza Rosas, María F. Rojas, Dra. Nannette Diffoot y Enid M. Rodríguez Martínez.

A la Profa. Gladys Toro por su ayuda incondicional en el laboratorio y por tolerar mis frustraciones.

Al Dr. Betancourt por ayudarme en la limpieza de los cianobiontes para obtener cultivos puros.

A mi compañeros del laboratorio 266 del Dr. Carlos Ríos Velázquez. Gracias por su amistad y toda su ayuda durante mi breve estadía en el laboratorio: Vanesa Cardona, Josué Malavé, Roger Valle Molinares, Yaliz Loperena, Claudia Acevedo y Jonathan González.

A la oficial de asuntos estudiantiles del Departamento de Biología María Méndez por su gran ayuda, por desenredar mis entuertos y resolver mis despistes.

A la señora Magaly Zapata por permitirme trabajar en su laboratorio de microbiología y por suplirme con materiales.

Al Dr. Arturo Massol Deyá por suplir materiales y espacio para trabajar en su laboratorio durante la primera fase de esta investigación.

A las secretarias del Departamento de Biología: Alicia Collazo, Brenda Soto, Maibe Ríos y Damaris Román.

Al personal de mantenimiento del Departamento de Biología los señores Luís, Domingo y Humberto.

© Ana M. Argüello-López, 2007, Tesis MS, UPR/RUM.

A Katherine Buitrago y a Tirtsa Porrata-Doria por su ayuda en la parte de microscopía.

Al Sr. Noel Cardona Soto por su gestión en la prestación del vehículo oficial del Colegio para ir a buscar las muestras.

Al Departamento de Recursos Naturales y Ambientales (DRNA) por la autorización DRNA 06-IC-049 para la colecta de las raíces coraloides en los Bosques Estatales de Susúa, Cambalache, Guánica y del Sector Cerro las Cuevas.

TABLA DE CONTENIDOS

ABSTRACT.....	II
RESUMEN	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
LISTA DE TABLAS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
LAS CICADÁCEAS.....	4
LAS CIANOBACTERIAS.....	8
CLASIFICACIÓN DE LAS CIANOBACTERIAS.....	9
LOS CIANOBIONTES	10
EFECTOS DE SIMBIOSIS EN LA FOTOSÍNTESIS Y FIJACIÓN DE NITRÓGENO EN EL CIANOBIONTE.....	11
ESPECIFICIDAD DE CIANOBIONTES	11
CARACTERIZACIÓN DE CIANOBIONTES.....	12
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CIANOBIONTES	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
COLECCIÓN DE RAÍCES CORALOIDES.....	17
ESTERILIZACIÓN DE RAÍCES CORALOIDES Y EXTRACCIÓN DE CIANOBIONTES	19
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS CIANOBIONTES.....	20
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA.....	20
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE DNA (SEGUNDA VERSIÓN).....	21
SEGREGACIÓN DE CEPAS POR ARDRA.....	22
SEGREGACIÓN DE CEPAS POR HIP-PCR.....	23
SECUENCIACIÓN DEL 16S rDNA	24
RESULTADOS.....	25
COLECCIÓN DE RAÍCES CORALOIDES.....	25
EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE CIANOBIONTES	25
IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE CIANOBIONTES	27
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS CIANOBIONTES	31
SEGREGACIÓN DE GRUPOS CIANOBIONTES POR ARDRA.....	32
CARACTERIZACIÓN POR HIP1-PCR.....	36
ANÁLISIS DE “NEIGHBOR-JOIN BOOTSTRAP TREE”	39
DISCUSIÓN.....	41
COLECCIÓN DE RAÍCES CORALOIDES.....	41

EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE CIANOBIONTES	41
CARACTERIZACIÓN MORFO LÓGICA DE LOS CIANOBIONTES	42
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	43
ANÁLISIS DE “NEIGHBOR-JOIN BOOTSTRAP TREE”	45
CONCLUSIÓN	47
RECOMENDACIONES	49
REFERENCIAS.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Total de cianobiontes aislados de las <i>Zamias</i> y cultivos obtenidos	26
Tabla 2. Lugar de procedencia y lista de cianobiontes aislados por especie de <i>Zamia</i>	27
Tabla 3. Secuencias del 16S rDNA.	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Raíces coraloides de <i>Zamia portoricensis</i> en el Bosque de Susúa.....	6
Figura 2. Raíces pre-coraloides de <i>Z. portoricensis</i>	7
Figura 3. Raíces coraloides de <i>Z. portoricensis</i> planta 38.	7
Figura 4. Corte transversal de raíz coraloide.	8
Figura 5. Corte transversal de raíz coraloide.	8
Figura 6. <i>Zamia pumila</i> L. en suelo calizo mármolizado en Cerro Las Cuevas.....	17
Figura 7. Cerro Las Cuevas, Bo. Guayabal, Juana Díaz.....	17
Figura 8. <i>Zamia amblyphyllidia</i> D.W. Stevenson.	18
Figura 9. Quebrada Peces del Bosque de Susúa.	18
Figura 10. Estróbilo hembra de <i>Zamia portoricensis</i> Urban.	18
Figura 11. <i>Zamia portoricensis</i> Urban del Bosque Seco de Guánica.	18
Figura 12. Cultivos de cianobiontes con cinco días de incubación.	26
Figura 13. Características morfológicas de algunos cianobiontes aislados y cultivados en medio Jansen (Jansen, 1997) bajo microscopio de campo claro con una magnificación de 100X.	28
Figura 14. Cianobionte similares a <i>Nostoc</i> aislados y cultivados en medio Jansen (Jansen, 1997) bajo microscopio de campo claro con una magnificación de 100X.....	29
Figura 15. Cianobiontes similares a <i>Nostoc</i> aislados y cultivados en BG-11 ⁰	30
Figura 16. Gel de agarosa al 1% con el 16S rDNA de once cianobiontes.	31
Figura 17. Gel de agarosa al 2% con patrones de restricción del 16S rDNA obtenidos con <i>HaeIII</i> de 17 cianobiontes.....	33
Figura 18. Gel de agarosa al 2% con patrones de restricción del 16S rDNA obtenidos con <i>HinfI</i> de 18 cianobiontes.....	34
Figura 19. Gel de agarosa al 2% con patrones de restricción del 16S rDNA obtenidos con <i>RsaI</i> de 19 cianobiontes.	35

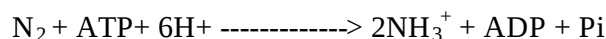
Figura 20. Gel de agarosa al 2% con patrones de bandas de los elementos repetitivos Hip de 23 cianobiontes.. 37

Figura 21. “NJ- Bootstrap rooted Tree” de las secuencias parciales del 16S rDNA de 15 cianobiontes y de otras cianobacterias obtenidas del *Blastn* 40

INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la vida las asociaciones entre organismos no han representado la excepción sino la regla. (Rai et al., 2000). La más peculiar de estas asociaciones es la simbiosis entre un descendiente de los primeros procariontes que transformaron la atmósfera del planeta para dar paso a la vida aerobia y un fósil viviente representante de las más antiguas gimnospermas, las Cicadáceas. Estas plantas gimnospermas llevan en el planeta alrededor de 300 millones de años dominando la vegetación del planeta durante el periodo Jurásico (Lindblad y Costa, 2002). Sin embargo al presente, se encuentran limitadas a las regiones tropicales y subtropicales en ambos hemisferios. De los once géneros de Cicadáceas existentes, tres géneros se encuentran en Puerto Rico: (1) *Dioon* (Dávila, com. per), (2) *Cycas* (*C. revoluta*, *C. circinalis*) y, (3) *Zamia* (*Z. pumila* L., *Z. amblyphyllidia* D. W. Stevenson, *Z. integrifolia* Willdenow, *Z. furfuracea* L.F. Aiton y la *Zamia* endémica de Puerto Rico *Z. portoricensis* Urban), según Stevenson (1987) y Jones (1993). Las especies de *Zamia* en Puerto Rico se encuentran en diferentes tipos de bosque con diferentes tipos de suelo. Por ejemplo *Zamia pumila* se encuentra en un área húmeda subtropical con formación de roca caliza mármolizada en el Cerro Las Cuevas, Juana Díaz. *Z. amblyphyllidia* se encuentra en un bosque húmedo subtropical de suelo calizo en Arecibo y *Z. portoricensis* se encuentra en dos tipos de bosque, el primero es un bosque húmedo subtropical de suelo de serpentinita en Sábana Grande y en el segundo bosque seco subtropical de suelo calizo en Guánica.

En climas tropicales y subtropicales, la materia orgánica es rápidamente consumida limitando el almacenaje de nutrientes, entre ellos el nitrógeno. Como mecanismo de adaptación las cicadáceas producen “deliberadamente” raíces especializadas para establecer una relación simbiótica con cianobacterias las cuales por medio de la fijación de nitrógeno disponen una fuente continua de nitrógeno a la planta. El nitrógeno es un elemento esencial para la estructura y funciones bioquímicas en los organismos. En las plantas, el nitrógeno es utilizado para la composición de aminoácidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos, coenzimas, así como la producción de clorofila, esencial para fotosíntesis. Aunque el nitrógeno es vital para los procesos biológicos, son pocos los organismos capaces de utilizar el nitrógeno molecular (N₂) y reducirlo en amoníaco (NH₃).



Los microorganismos capaces de reducir N_2 se les denominan diazótrofos o fijadores de nitrógeno. Los diazótrofos poseen una enzima llamada nitrogenasa la cual transforma una molécula de dinitrógeno (N_2) en dos moléculas de amoníaco (NH_3). Algunas cianobacterias son diazótrofes y aunque éstas en su mayoría tienen una vida independiente, otras forman asociaciones simbióticas con diferentes organismos (Rai et al., 2000).

OBJETIVOS

Los estudios sobre cianobiontes y su relación simbiótica con Cicadáceas son mayormente de muestras procedentes de Jardines Botánicos y no de poblaciones naturales. Puerto Rico posee una diversidad de bosques con una variedad de condiciones edáficas y de fácil acceso que permiten realizar estudios con poblaciones de Zamias en su hábitat natural. Sin embargo, los estudios disponibles con estas gimnospermas en Puerto Rico están mayormente enfocados a resolver su taxonomía la cual por muchos años ha sido controversial. Como consecuencia los estudios para conocer su historia natural son limitados y hasta el presente no se ha publicado ningún trabajo sobre los cianobiontes de las Zamias en Puerto Rico. Por lo tanto para esta investigación se fijaron como propósitos:

- Aislar y caracterizar los cianobiontes cultivables asociados a las Zamias de Puerto Rico.
- Evaluar de forma general la diversidad de los cianobiontes en las raíces coraloides.
- Determinar el grado de especificidad de los cianobiontes y su planta hospedera.

REVISIÓN DE LITERATURA

La revisión de literatura esta organizada por temas y sub-temas. En el primer tema se describe las Cicadáceas y su sistema de raíces coraloides en donde habitan los cianobiontes. El segundo tema presenta una descripción general de las Cianobacterias seguido de la clasificación mas reciente según descrito en el Manual de Bergey en el 2001. A partir del tema de las Cianobacterias, se desprenden dos sub-temas comenzando con la definición y descripción de los cianobiontes y culminando con los efectos causados por la simbiosis en la fotosíntesis y en la fijación de nitrógeno. Luego se presentan los primeros estudios relacionados con la especificidad de los cianobiontes con sus hospederos culminando con dos sub-temas en los cuales se presentan los hallazgos de estudios previos a esta investigación. Aquí se describen los primeros intentos para identificar y caracterizar los cianobiontes por métodos estrictamente morfológicos y sus limitaciones. Para sobrepasar estas limitaciones en el último sub-tema se presenta la evolución de los distintos métodos moleculares diseñados para intentar caracterizar e identificar los cianobiontes.

Las Cicadáceas

Las Cicadáceas son un grupo de plantas antiguas con 300 millones de años de existencia (Lindblad y Costa, 2002). Aunque fueron la vegetación dominante durante el Jurásico hoy día su distribución está limitada a los trópicos y regiones sub-trópicas de ambos hemisferios (Medeiros y Stevenson, 2000). Son plantas muy populares dentro de los horticultores por sus elegantes hojas pinadas (hojas compuestas por hojuelas en pares) y por sus conos gigantes. En apariencia parecen palmas y por ello se les nombra equívocamente como “palmitas”. En general las Cicadáceas morfológicamente se distinguen por tener un tallo columnar, hojas pinadas, son dioicas y producen semillas desnudas. Las *Zamias* son uno de los géneros pertenecientes a las Cicadáceas caracterizadas por tallos subterráneos (con la excepción de *Z. pseudoparasitica*). Las *Zamias* por lo general son terrestres o raramente epifitas con un tallo tipo tubérculo y cilíndrico, puede estar solitario o formar conjuntos (Jones, 1993). Al igual que el resto de las Cicadáceas, las *Zamias* son dioicas y muestran dimorfismos sexual donde la planta macho produce pequeños conos o estróbilos cilíndricos y erectos (Jones, 1993). Por el contrario las plantas hembras producen grandes conos o estróbilos ovoides en forma de

barril (Jones, 1993). Las semillas son ovoides a sub-globosas con una sarcotesta que puede variar en color dependiendo de la especie, estas pueden ser amarillas, marrones, naranja o rojas (Jones, 1993).

Las Cicadáceas son las únicas plantas que producen un sistema de raíces especializadas, llamadas coraloideas, las cuales funcionan como micro-hábitat para albergar cianobiontes (Rai et al., 2000). Estas raíces proveen un ambiente estable y fuente de carbono para el cianobionte, mientras que la planta al inducir la producción de heterocistos en el cianobionte obtiene el nitrógeno que éstas fijan (Rai et al., 2000). Las raíces morfológicamente se diferencian del resto del sistema radical por tener un crecimiento apogeotrópico con formaciones semejantes a corales (Figura 1. Pág. 6), lo cual permite que se les encuentre cerca de la superficie del suelo (Figura 2 Pág. 7). En estudios sobre el desarrollo de las raíces coraloideas, muestran que la raíz coraloide comienza como una raíz adventicia, papilosa llamada pre-coraloides por no ser invadida por cianobacterias simbióticas o cianobiontes (Ahern, y Staff, 1994). Luego continúa su desarrollo con las fases de maduración, invasión de la cianobacteria y finalmente la formación morfológica coraloide (Figura 3 Pág. 7). Esta formación se debe a que el cianobionte induce modificaciones irreversibles a las células de la zona cortical formando un anillo verde llamado zona de cianobionte (ZC) (Figura 4. Pág. 8), (Lindblad et al., 1985.) Estas células se alargan radialmente para interconectar las dos capas corticales adyacentes facilitando así la transferencia de metabolitos entre ambos organismos (Figura 5. Pág. 8) (Lindblad et al., 1985.)



Figura 1. Raíces coraloides de *Zamia portoricensis* en el Bosque de Susúa. Las raíces coraloides (RC) se observan en la superficie del suelo cerca de dos plántulas de *Z. portoricensis* (P).



Figura 2. Raíces pre-coraloides de *Z. portoricensis*. En el círculo se observan raíces pre-coraloides creciendo en la superficie cerca de la hojarasca.

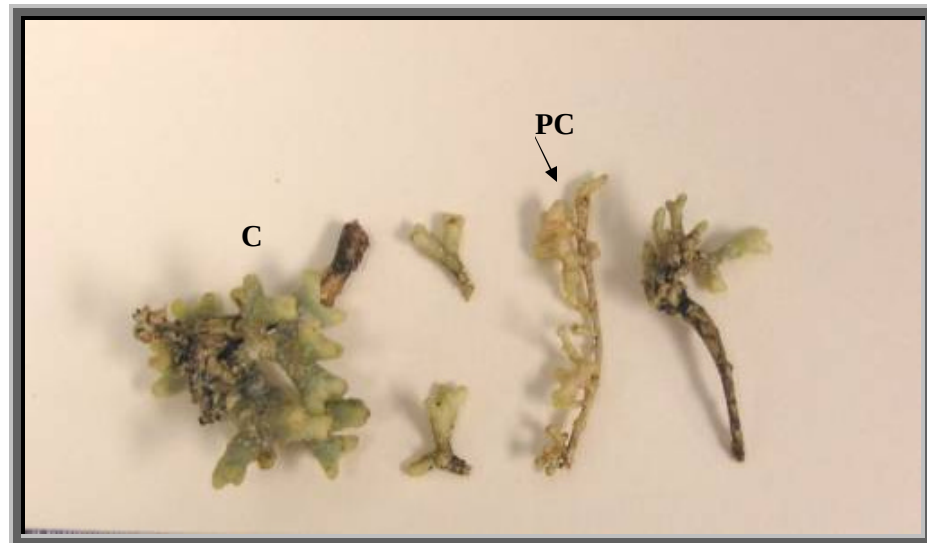


Figura 3. Raíces coraloides de *Z. portoricensis* planta 38. Raíces coraloides verdosas (C), color indicativo de la presencia de cianobiontes. Raíces pré-coraloides (PC) de menor tamaño y sin coloración, indicativo de ausencia de cianobiontes.



Figura 4. Corte transversal de raíz coraloide. Bajo el microscopio de disección se observa la zona de cianobionte (ZC) que se distingue por un anillo verde

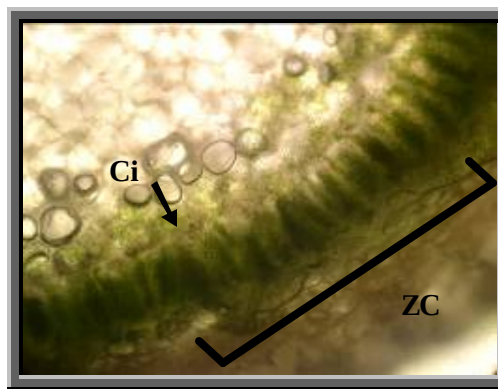


Figura 5. Corte transversal de raíz coraloide. Se observan cianobiontes (Ci) dentro de las células de la Zona de cianobionte (ZC) bajo el microscopio de disección.

Las Cianobacterias

Las cianobacterias son un grupo antiguo de microorganismos cuya existencia data aproximadamente de unos 3,500 millones de años según (Schopf. 1993; Golubic. 1999; Schopf, 2000; Svenning. et al, 2005). Son un grupo grande y diverso de procariontes gram-negativos que llevan a cabo fotosíntesis oxigénica y al igual que las plantas las cianobacterias poseen dos fotosistemas, FSI y FSII (Castenholz, 2001). Todas las cianobacterias pueden ser fotoautótrofas derivando ATP y NADPH esenciales para la fijación de CO_2 por medio de la fotosíntesis. Otras pueden ser fotoheterótrofas, obteniendo energía de la luz, del carbono y de la reducción de compuestos orgánicos. Además de llevar a cabo fotosíntesis, algunas cianobacterias tienen la capacidad de reducir el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_4^+) y por lo tanto se les denominan cianobacterias diazótrofes o fijadoras de nitrógeno. La enzima utilizada para fijar nitrógeno se llama nitrogenasa y esta enzima es muy sensible a la presencia del oxígeno, razón por la cual ambos, la fijación de nitrógeno y la fotosíntesis no pueden ocurrir simultáneamente. Para que las cianobacterias realicen ambos procesos, éstas han desarrollado diferentes sistemas. Por ejemplo, algunas poblaciones como *Gleotheca* separan ambos procesos llevando a cabo la fotosíntesis durante el día y la fijación de nitrógeno durante la noche (Millineaux et al., 1981; Flores y Herrera, 1994 y Costa, 2004). *Trichodesmium* lleva a cabo la fijación de nitrógeno en un subconjunto de células en el filamento (Lin et al., 1998; Costa, 2004). Por último, para poder realizar ambos procesos simultáneamente, algunas cianobacterias aíslan el proceso de fijación de nitrógeno en una

célula especializada conocida como heterocisto (*Nostoc* y *Anabaena*). Esta célula modificada se diferencia estructural y fisiológicamente del resto de las células por ser una célula carente del fotosistema II y una pared celular adicional para impedir la entrada del oxígeno.

Morfológicamente las cianobacterias son muy diversas, existen cianobacterias unicelulares tales como (*Cyanosistis*); filamentosas (*Nostoc* y *Anabaena*) y filamentos ramificados (*Stigonema*). Las cianobacterias filamentosas presentan diferenciación celular como heterocistos para la fijación de nitrógeno, aquínetos para supervivencia en condiciones adversas y hormogonios para su desplazamiento (Rai et al., 2000). La posición de los heteroquistos (por ejemplo si son terminales y/o intercalados), la producción y posición de los aquínetos y la presencia de hormogonios diferenciados y móviles se utilizan como criterios taxonómicos.

Clasificación de las cianobacterias

Según Rippka et al., (1979) y Rippka (1988), las cianobacterias se dividen en cinco sub-secciones basándose en características fenéticas. En la segunda edición del Manual Sistemático de Bergey, Castenholz (2001), también divide a las cianobacterias en las siguientes cinco sub-secciones:

- Unicelulares

Estas a su vez se dividen en dos sub-secciones basadas en su reproducción. En la Sub-sección I se encuentran aquellas cianobacterias unicelulares donde su reproducción se basa en la fisión binaria o por gemación y en la Sub-sección II se encuentran aquellas cianobacterias unicelulares donde su reproducción ocurre por fisión múltiple e interna o por fisión múltiple seguida por fisión binaria.

- Filamentosas

Estas se dividen en tres sub-secciones basadas en su mecanismo de reproducción y en la diferenciación celular. En la Sub-sección III se encuentran aquellas cianobacterias filamentosas que tienen una reproducción por fisión binaria en un solo plano y no ocurre diferenciación celular. En la Sub-sección IV se encuentran aquellas cianobacterias filamentosas donde la reproducción ocurre por fisión binaria en un solo plano y sí presentan

diferenciación celular de heterocistos y aquínetos. Finalmente, en la Sub-sección V se encuentran aquellas cianobacterias filamentosas que se reproducen por fisión binaria en más de un plano, presentan diferenciación celular y también forman filamentos ramificados.

Los Cianobiontes

Las cianobacterias capaces de establecer relaciones simbióticas se les denominan cianobiontes. Tanto en vida libre como en simbiosis, éstas habitan en ambientes terrestres y acuáticos. Estos cianobiontes se asocian con una amplia diversidad de organismos. En ambientes marinos se encuentran asociadas con diatomeas, esponjas y dinoflagelados (Carpenter y Foster, 2002; Janson, 2002; Svenning et al., 2005). En ambientes terrestres establecen simbiosis con hongos (*Geosiphon pyriformis* (Kütz.) v. Wettstein), líquenes (*Leptogium puberulum* Hue), Hepáticas (*Blasia pusilla* L.), Antocerotes (*Anthoceros punctatus* L.), helechos acuáticos (*Azolla*), Gimnospermas (Cicadáceas) y Angiospermas (*Gunnera manicata* L.) (Rai et al., 2000).

El cianobionte predominante en casi todas las asociaciones descritas es *Nostoc* (Rai et al., 2000). En el caso de la asociación con plantas estas poseen estructuras que facilitan el albergue del cianobionte las cuales no son inducidas por el cianobionte (Meek y Elhai, 2002), como ocurre con *Rhizobium* y las leguminosas.

En las cicadáceas los cianobiontes se encuentran dentro de la zona cianobionte (ZC) el cual es un ambiente mucilaginoso y microaeróbico (Lindblad et al., 1985). Algunos autores indican que estos cianobiontes se encuentran intracelularmente (Nathanielsz y Staff, 1975; Obukowicz et al., 1981). *Nostoc* es el género dominante en los ambientes terrestres y en la asociación simbiótica con plantas. Se encuentra clasificado en la sub-sección IV junto con algunos géneros como *Anabaenopsis*, *Cyanospira*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*, *Cylindrospermopsis* y *Scytonema* (Willmotte y Herdman, 2001).

Efectos de simbiosis en la fotosíntesis y fijación de nitrógeno en el cianobionte

Tan pronto la cianobacteria infecta la raíz de la Cicadáceas se establece una simbiosis mutualista donde el cianobionte detiene su metabolismo fotoautótrofo pasando a ser funcionalmente no fotosintético, aunque retiene sus pigmentos fotosintéticos (Peters y Meeks, 1989; Rai et al., 1989; Rai, 1990; Bergman, et al., 1992, Rai et al., 2000). Esto se debe a que en la raíz coraloide no llega luz solar por lo tanto no pueden llevar a cabo fotosíntesis ni fijación de CO₂. A consecuencia de la simbiosis, el cianobionte sufre modificaciones morfológicas y bioquímicas promovidas por su hospedero como por ejemplo aumento en cantidad de heterocistos en los filamentos dejando de ser una bacteria filamentosa para ser unicelular (Rai et al., 2000). Otros cambios también incluyen el aumento en tamaño de las células del filamento, la ausencia de gránulos de polifosfatos, menos carboxisomas, pared celular más gruesa y en algunos casos alteración en el arreglo de los filacoides (Stewart et al., 1983; Bergman y Rai, 1989 y Rai et al., 2000). Estas modificaciones son producidas por la planta siendo el cianobionte un simbionte pasivo en todas las asociaciones con plantas (Meeks y Elhai, 2002). La planta controla la cianobacteria induciendo la movilidad y conduciéndola hacia la cavidad simbiótica, una vez dentro la planta controla el crecimiento, la diferenciación celular y el metabolismo del cianobionte para la obtención de NH₄⁺ (Meeks y Elhai, 2002).

Especificidad de cianobiontes

Según estudios previos, con diferentes especies de Cicadáceas indican que los cianobiontes son facultativos de baja especificidad (Costa et al., 1999; Ow et al., 1999; Medeiros y Stevenson, 2000). Por otro lado, estudios sobre la diversidad de los cianobiontes en las raíces coraloides de Cicadáceas muestran que en una misma planta interaccionan diferentes cepas de un mismo género de cianobionte (Costa et al., 1999; Rai et al., 2000).

La mayoría de los estudios sobre los cianobiontes en las Cicadáceas se realizaron en países donde el clima no es favorable para la subsistencia de las Cicadáceas, por lo tanto para estudiar los cianobiontes se requirió obtener muestras de raíces coraloides de plantas procedentes de jardines botánicos. Esto presenta una limitación porque la procedencia de

estos cianobiontes pudiera ser del suelo provisto en los jardines botánicos y no necesariamente del hábitat original de la planta. Utilizar muestras de cianobiontes extraídos de plantas en su hábitat natural podría permitir identificar y conocer con certeza los cianobiontes que naturalmente están asociados a las Cicadáceas. Puerto Rico, es una isla que tiene una diversidad geológica, climática y edáfica, que hacen de nuestra isla un lugar ideal para el estudio de cianobiontes con diferentes especies de *Zamia*. Estas condiciones permiten que esta tesis presente la primera identificación de los cianobiontes que habitan las raíces coraloides de estas Cicadáceas bajo una variedad de condiciones ambientales.

Actualmente se conocen tres géneros de cianobiontes asociados a las Cicadáceas. Estos son: (1) *Nostoc* para los géneros de Cicadáceas: *Bowenia*, *Cycas*, *Dioon*, *Encephalartos*, *Macrozamia*, *Stangeria* y *Zamia*; (2) *Anabaena* sólo en la especie de Cicadáceas *Cycas resoluta*; y, (3) *Calothrix* en la especie de Cicadácea *Encephalartos hildebrandtii* (Jones, 1993).

Caracterización de cianobiontes

Los primeros estudios sobre la simbiosis entre cianobiontes y sus hospederos están basados en características estrictamente morfológicas. La taxonomía de los cianobiontes ha sido muy controversial por dos razones: (1) Las cianobacterias muestran variación morfológica cuando pasan de vida libre a ser cianobiontes haciendo muy difícil su identificación (Parslud et al., 1998; Rasmussen y Nilsson, 2002). Estos cambios morfológicos en los cianobiontes se debe a que la planta por medio de señales bioquímicas influyen la formación de hormogonio y la diferenciación de heterocistos (Meeks y Elhai, 2002). (2) Las condiciones inadecuadas del cultivo causa la pérdida de características morfológicas (Castenholz. y Waterbury, 1989). Por ejemplo *Anabaena* y *Nostoc* en presencia de fuentes de nitrógeno como el amonio (NH_4^+) o el nitrato (NO_3^-), presentan sólo filamentos formados de células vegetativas impidiendo así distinguir un género del otro (Meeks y Elhai, 2002). Aunque morfológicamente exhiben características similares se utiliza la presencia de hormogonios móviles y diferenciados de los tricomas maduros como criterio para diferenciar el género *Nostoc* de *Anabaena*. Sin embargo la formación de hormogonios móviles y diferenciados no es un criterio taxonómico confiable (Rippka, 1988) ya que su formación depende de las condiciones de crecimiento (Wright et al., 2001). La falta de una característica confiable que permita diferenciar estos géneros conlleva la identificación

errónea de especies y de cepas en colecciones cultivadas (Wilmotte, 1994; Nübel et al., 1997).

Para efectos de esta tesis se utilizó la guía del Manual de Bergey (2001) para diferenciar entre el género *Anabaena* y *Nostoc* escrita por Richard W. Castenholz para la identificación morfológica de los cianobiontes aislados. Según el autor las especies pertenecientes al género *Anabaena* se identifican según la morfología de las células y la movilidad de los tricomas. La diferenciación celular en de los aquínets y heterocistos y su posición dentro del tricoma. La ausencia de vaina y la producción de mucílago como también el no producir hormogonios diferenciados y móviles. Para las especies pertenecientes al género *Nostoc* Castenholz los identifica según la producción de homogonios diferenciados de los tricomas maduros y su movilidad con heterocistos terminales. La morfología de las células vegetativas de los tricomas maduros los cuales se enrollan entre si. La diferenciación celular de los aquínets, heterocistos su la posición dentro del tricoma y la producción de vesículas de gas.

Caracterización molecular de cianobiontes

Para poder identificar de una forma precisa a los cianobiontes, el método más utilizado es el análisis de la secuencia de los genes que codifican para la sub-unidad pequeña del ribosoma, conocido como el 16S rDNA, el cuales un gen que consta de aproximadamente 1500 pb. Éste gen es utilizado como criterio para determinar relaciones entre grupos relacionados como géneros o especie (Weisburg et al., 1991; Svenning, 2005). Su distribución es universal y conservada y hoy día se encuentra disponible secuencias del 16S rDNA de procariontes en los bancos de datos tales como (GenBank, EMBL, DDBJ y RDP) (Svenning et al., 2005). No depende de las condiciones de crecimiento, del tipo de cultivo y puede obtenerse también de muestras ambientales a partir de una pequeña cantidad de DNA, utilizando la técnica de PCR (Giovannoni, 1991; Nübel et al., 1997). Sin embargo, los cianobiontes cohabitan con otras bacterias por lo que antes de obtener su 16S rDNA es imprescindible obtener cultivos puros o axénicos. La purificación de los cultivos de cianobiontes es un procedimiento oneroso y difícil, en la mayoría de los casos los cianobiontes requieren de otras bacterias para crecer (Castenholz y Waterbury, 1989; Fitzsimons et al., 1984; Nübel et al., 1997). Esto implica que al utilizar iniciadores

universales para amplificar el 16S rDNA se amplificaría éste gen tanto de los cianobiontes como el de las otras bacterias.

Se han diseñado diferentes métodos para amplificar el 16S rDNA de cultivos no axénicos utilizando iniciadores universales. Por ejemplo, obtener cultivos puros por medio de antibióticos para suprimir el crecimiento de otras bacterias (Willmote et al., 1992), limpieza de la cianobacteria por micro-manipulación (García et al., 1996), clonación molecular (Weller et al., 1991; Neilssen et al., 1996) y lavados en suspensión salina seguido de estriados. El más reciente método para amplificar del 16S rDNA de cianobacterias provenientes de cultivos no axénicos fue la creación de iniciadores específicos llamados CYA106F y CYA781R (Nübel et al., 1997). Su diseño está basado en el alineamiento de todas las secuencias de cianobacterias disponibles en el "Ribosomal Database Project" (RDP) y el "GenBank". Estos iniciadores sólo amplifican una región específica del 16S rDNA perteneciente a la mayoría de las cianobacterias y que consta de alrededor de 700 pb (Nübel et al., 1997).

Experimentos de reconstitución con plantas hospederas de cianobacterias tales como Hepáticas, *Antocerotes*, *Gunnera* y *Cycas* crecidas axénicamente han demostrado que el cianobionte predominante pertenece al género *Nostoc*. Estos experimentos realizados con dichas plantas hospederas, revelaron que tanto las cianobacterias de vida libre como las simbióticas aisladas de sus hospederos pueden establecer simbiosis (Costa, 2004). Para determinar la diversidad y/o especificidad entre los cianobiontes y sus hospederos se requiere de técnicas moleculares.

Algunas de éstas técnicas son utilización de análisis inmunológicos, otros como la identificación de lugares de restricción por medio de endonucleasas o enzimas de restricción conocido como "Restriction Fragment Length Polymorphism" (RFLP). Este método detecta diferencias en pequeños segmentos presentes en el genoma de un gen en particular. Un ejemplo de RFLP es el "Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis" (ArDRA) el cual es un procedimiento rápido de selección utilizado comúnmente en estudios ambientales. Es una herramienta útil porque permite segregar en grupos comparando los perfiles o patrones de restricción creados por enzimas las cuales generan unos cortes específicos en los enlaces

fosfodiéster de una secuencia reconocida del 16S rDNA. Otro método es el empleo de la reacción en cadena de polimerasa (PCR) para demostrar diferencias entre especies, amplificando secuencias repetitivas presentes en el DNA bacteriano. Ejemplo de éstas técnicas son: el ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Interspersed Consense) y REP-PCR (Repetitive Extragenic Palindrome). Según Mazel y colaboradores (1990), las cianobacterias filamentosas que forman heterocistos contienen secuencias repetitivas llamadas Short Tandemly Repetitive Repeat (STRR), mientras Rouhiainen y colaboradores (1995) encontraron la presencia de secuencias repetitivas conocidas como Long Tandemly Repetitive Repeat (LTRR). Los patrones o perfiles de estas secuencias pueden mostrar diferencias genotípicas entre las cianobacterias.

En la década del 90 se descubrió otro tipo de secuencia repetitiva y palindrómica compuesta de 8 pb y que se encuentra esparcida en el genoma de cianobacterias, estas secuencias se conocen como Hip1 (Highly iterated palindromic) (Smith et al., 1998). La secuencia Hip1 fue descubierta en el mutante *Synechococcus* PCC 630, esta secuencia se coloca cada vez que ocurre una delección terminal en el gen *smtB*, el cual codifica para el represor de matalotioneína (Gupta et al., 1993). En 1998 Smith y colaboradores demostraron que la secuencia Hip1 puede utilizarse como iniciador para amplificar elementos repetitivos generando patrones de bandas distintivas que permiten segregar a las cianobacterias en diferentes especies y cepas. En 1995, Robinson y colaboradores diseñaron iniciadores a partir de la secuencia Hip1 5'GCGATCGC 3' logrando desarrollar 16 iniciadores añadiendo dos bases adicionales en el terminal 3' y en su investigación seleccionaron cuatro iniciadores arbitrariamente. Según Robinson, con cualquiera de los cuatro iniciadores se puede generar patrones distintivos que facilitan la diferenciación de cianobacterias a nivel de cepa.

Los métodos moleculares, utilizados hasta el presente para caracterizar y estudiar la diversidad de los cianobiontes también presentan limitaciones. Por ejemplo, los métodos de RFLP, "Fingerprinting", DGGE entre otros generan patrones difíciles de comparar (Zheng et al., 2002 y Costa, 2004). Para resolver este problema se comenzó a utilizar el intrón tRNA^{Leu} (UAA) descubierto en 1990 por Xu y colaboradores. El intrón tRNA^{Leu} (UAA) es capaz de catalizar su propia escisión y que no requiere de la presencia de "splisosome" (Cech, 1990; Costa, 2004). Este se encuentra en los genes del tRNA de las bacterias (Costa, 2004). En

1998, Per Paulsrud y Peter Lindblad diseñaron un protocolo para utilizar el intrón tRNA^{Leu} (UAA) como un marcador genético para analizar la diversidad genética y especificidad de cianobiontes en líquenes. Este nuevo método también permitió estudios de sistemas simbióticos en las Cicadáceas, *Cycas circinalis* L., *C. Rumphii* Miq. , *Encephalartos lebomboensis* I. Verd., *E. villosus* Lem y *Zamia pumila* L (Costa et al., 1999 y Costa. 2004). Gracias a esta técnica se encontraron diferentes intrones en los cianobiontes de dichas Cicadáceas, demostrando que existe una diversidad de cianobiontes asociadas a sus raíces coraloides. Este método demostró que no hay especificidad entre los cianobiontes y las Cicadáceas estudiadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colección de raíces coraloides

La colección de las raíces coraloides se llevo acabo durante la temporada de lluvia en el mes de Junio. Las raíces coraloides fueron colectadas de cinco individuos representantes de las tres especies de *Zamia* en las siguientes localidades: *Zamia pumila* L. en suelo calizo marmolizado en el Sector Cerro las Cuevas en el Bo. Guayabal, Juana Díaz (Figuras 6 y 7). *Zamia amblyphyllidia* D.W. Stevenson. (Figura 8 Pág. 18) en suelo calizo en el Bosque de Cambalache en Arecibo y *Zamia portoricensis* Urban. en dos áreas del Bosque Susúa, en suelo de serpentinita creciendo en los taludes a orillas de la Quebrada Peces (Figura 9 Pág. 18) y dentro de las facilidades de acampar en el bosque (Figura 10. Pág. 18) y una tercera población de *Z. portoricensis* (Figura 11. Pág. 18) localizada en la vereda Las Cobanas en el Bosque Seco de Guánica, en suelo calizo. Cada muestra fue colocada en bolsas plásticas individuales con la información del área de muestreo y fueron transportadas a temperatura ambiente.



Figura 6. *Zamia pumila* en suelo calizo mármolizado en Cerro Las Cuevas. Dentro del círculo se observan las hojas pinadas (hoja compuesta por hojuelas en pares) de la *Zamia*.



Figura 7. Cerro Las Cuevas, Bo. Guayabal, Juana Díaz. Se observan las rocas blancas de formación caliza y marmolizadas.



Figura 8. *Zamia amblyphyllidia* En el círculo se observa una *Zamia* con hojas pinadas (compuestas por hojuelas anchas.)



Figura 9. Quebrada Peces del Bosque de Susúa.



Figura 10. Estróbilo hembra de *Zamia portoricensis* del Bosque Estatal de Susúa, en Sabana Grande.



Figura 11. *Zamia portoricensis* del Bosque Seco de Guánica. Las flechas señalan dos plantas entre las rocas calizas llamadas "dientes de perro".

Esterilización de raíces coraloideas y extracción de cianobiontes

Para la extracción de los cianobiontes se realizó una esterilización externa de la raíz coraloide según Ow *et al.*, (1999) añadiendo un paso de limpieza en donde las raíces fueron sumergidas en peróxido de hidrógeno comercial por 2 minutos. Debido a que los cianobiontes no se mantienen en refrigeración, el proceso de la esterilización de la raíz y la extracción del cianobionte fueron realizadas el mismo día de su colección. En el laboratorio las raíces fueron lavadas con agua corriente para remover partículas del suelo. Una vez limpias, se desinfectaron externamente en un baño de peróxido de oxígeno comercial por 2 minutos y luego fueron sumergidas en una solución de Tritón® X-100 (Sigma-Aldrich) y de hipoclorito de sodio (NaClO) comercial al 10% por cinco minutos en un “shaker” (agitador orbital). Luego las raíces fueron enjuagadas tres veces con etanol al 100% y tres veces más con agua destilada y estéril. Una vez concluido la esterilización, se cortaron las raíces transversalmente utilizando un escalpelo estéril. Con palillos de dientes, previamente esterilizados se removieron los cianobiontes y se colocaron en cultivos líquidos de BG-11 (Rippka *et al.*, 1979). Una vez obtenidas las colonias de cianobacterias, se procedió a realizar lavados con solución salina, dispersados por medio de estriados, luego fueron transferidas a otro medio de cultivo para cianobacterias llamado BG-11⁰. El exponente “o” significa ausencia de NH_4 ni NO_3 como fuente de nitrógeno. Se eliminó las fuentes de nitrógeno al medio BG-11 para estimular el desarrollo de heterocistos. Los cultivos fueron mantenidos a la intemperie con luz natural no directa. El cultivar los cianobiontes según esta metodología presentó un tiempo de crecimiento de un mes y causó pérdidas de cultivos por lo tanto se modificó el método de la siguiente manera:

Los cianobiontes cultivados en medio BG-11 fueron transferidos a otro medio de cultivo líquido más eficiente, llamado Jansen o Medio J, de Jansen Parker D.L (1997) y se cultivaron a una temperatura constante de 27° C en una incubadora con tapa transparente y con termómetro integrado. Para proveer una fuente de luz uniforme, las paredes de la incubadora fueron forradas con espejos para aumentar el área de iluminación dejando libre la parte superior de la incubadora en la cual se colocó una lámpara de 75 Watts para iluminar desde arriba a los cultivos. También dentro de la incubadora se colocaron dos lámparas de 75 Watts para iluminar los cultivos por los lados, y un abanico para dispersar el calor generado por las dos lámparas interiores y así evitar que aumentara la temperatura.

Identificación morfológica de los cianobiontes

La identificación morfológica se realizó utilizando la guía para cianobacterias de Castenholz (2001). Las muestras se visualizaron y se describieron utilizando un microscopio de campo claro, una de ellas fue observada y descrita antes y después de ser cultivada, para su comparación. Para diferenciar los géneros de *Anabaena* y *Nostoc* se tomó en cuenta la presencia de hormogonios móviles y diferenciados de los tricomas maduros, la presencia y posición de los heterocistos y la formación de aquínets.

Extracción y purificación de DNA

La extracción y purificación del DNA genómico se realizó según el protocolo establecido por Wu y colaboradores (2000) con las siguientes modificaciones. Los cianobiontes se suspendieron en 200 µl del amortiguador A (100 mM tris, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8). Después de un periodo de incubación de 12 horas a 65°C, se añadió 4.0 µl de Sarkosyl (50%) se incubó a 4°C con un vórtice continuo de 90 minutos. Luego se añadió 200 µl del amortiguador de lisis B (Tris 1.5 M, EDTA 0.5 M, Tritón X 100, Lisosimas, H₂O destilada) para finalizar con una incubación a 37°C durante la noche. Una vez concluido la incubación, se le añadió 20 µl de proteinasa K y amortiguador AL ambos provistos por el “DNAeasy TM Tissue Kit de QIAGEN®” y se incubó a 55°C por 60 minutos. Concluido la incubación se dejó enfriar las muestras de cianobiontes a temperatura ambiente para luego añadirle RNase A provista por el “DNAeasy TM Tissue Kit de QIAGEN®” y después se incubaron a 70°C por 60 minutos. Se añadió un volumen de cloroformo para luego ser centrifugado a (16000 X g) por 10 minutos. El sobre-nadante se transfirió a un micro-tubo estéril de 1.5 mL en el cual se le añadieron dos volúmenes de ETOH 100% para luego incubar las muestras a -20°C por 12 horas. Las muestras se descongelaron en hielo y el DNA precipitado fue centrifugado por 5 minutos a (16000 X g) y se descartó el sobre-nadante. Las trazas de etanol fueron evaporadas al vacío en un “SpeedVac” (Termo Savant SPD 1010 Speed Vac) por 15 minutos a 43°C y finalmente se resuspendió en 30 µl de TE 1X y se almacenó a -20°C. A este método de extracción y purificación del DNA genómico de las cianobacterias nuevamente se le realizaron más modificaciones con el fin de acortar el tiempo de extracción y purificaron de 4 días a 2 días. Las modificaciones fueron las siguientes:

Extracción y purificación de DNA (segunda versión)

DIA 1

I Proceso de Lisis:

Se extrajo de cada cultivo, 1.0 mL, cuyo “pellet” (sedimento) registró un peso de 50 mg-60 mg. Luego fueron centrifugados a máxima velocidad (16000 X g) por 15 minutos. El sobre nadante fue descartado, y se resuspendió el sedimento “pellet” en 200 µL de amortiguador A. Para separar las células del “pellet” las muestras fueron pasadas por vórtice, luego se les añadió 4.0 µL de Sarkosyl (50%) y se incubaron a 65°C por aproximadamente 12 horas.

DIA 2

II Continuación del proceso de Lisis y purificación de DNA:

Una vez concluido el proceso de incubación, las muestras fueron centrifugadas a máxima velocidad (16000 X g) por 15 minutos. Luego las células fueron separadas usando un vórtice. A las muestras se le añadió 200 µL del amortiguador B, y como resultado de la reacción se observó un precipitado blanco. Posteriormente fueron incubadas por cinco horas a 37°C y una vez terminado el proceso de incubación se añadió a cada muestra 20 µL de Proteinasa K (20 mg/mL). Nuevamente fueron incubadas a 55°C por 1 hora para luego dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente. Se le añadió a cada muestra unos 6 µL de RNase A se mezcló por medio de vórtice y se dejaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego se incubaron a 70°C por 30 minutos.

Después del proceso de incubación a cada muestra se le añadió un volumen de Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico (25:24:1) y se mezclaron por medio de vórtice. Por una hora fueron incubadas las muestras a 4°C y una vez terminada la fase de incubación fueron centrifugadas a máxima velocidad por 10 minutos. Se les extrajo la fase acuosa y la misma fue vertida en otro micro-tubo estéril. Se les añadió un volumen de Cloroformo y alcohol Isoamílico (24:1), se mezcló por medio de vórtice y se centrifugaron a máxima velocidad por 15 minutos. La fase acuosa fue transferida a otro micro-tubo estéril y se le añadió un volumen de Isopropanol y se incubaron a -20°C por una hora. Nuevamente fueron centrifugadas a máxima velocidad por 30 minutos. Se descartó el Isopropanol y se resuspendió el “pellet”

(sedimento) en 1.0 mL de Etanol al 70% para luego mezclarse por medio de vórtice. Se centrifugó a máxima velocidad por 30 minutos y se secó completamente a 60°C. Finalmente fueron resuspendidas en 25 µL de TE 1X estéril.

Terminada la extracción y purificación del DNA genómico de los cianobiontes, se evaluó la calidad y concentración del mismo mediante electroforesis en una gel de agarosa al 0.8%. Para comparar la cantidad de DNA extraído se utilizó como escalera Lambda *Hind III*. Como tinte se utilizó 2 µl de 6X de “Loading Dye” (Promega®, G 1881) y se corrió un gel de agarosa al 1% en amortiguador Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE 1X) a 60 voltios de 2 horas. Para la visualización de las bandas de DNA se tiñó la gel en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) por 30 minutos para finalmente colocarla en el trans-iluminador (UVP UV Transiluminator 250V) de radiación ultra violeta y luego se fotografió. Para determinar la concentración de DNA se añadió en una cubeta de cuarzo de 1 mL, una alícuota de 2 µl del DNA genómico de los cianobiontes en 998 µl de la solución amortiguadora Tris -EDTA (TE) 1X. La solución amortiguadora fue utilizada como blanco. Las absorbancias fueron obtenidas a 260 nm con el espectrofotómetro “Genesys II de Thermo-Spectronic”®.

Segregación de cepas por ArDRA

Para la amplificación del 16S rDNA se utilizó por cada cultivo 12.5 µl GoTaq® Green master mix 1X (Promega®), 40 pmol de los iniciadores creados por Nübel y colaboradores (1997). CYA106F (CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTGA) y una mezcla equimolar del iniciador CYA781Ra (GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T) con el iniciador CYA781Rb (GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CT T), ambos iniciadores están compuestos por secuencias iguales con algunas bases modificadas las cuales están subrayadas. 10 ng de DNA genómico y agua libre de nucleasa provista por el kit de “GoTaq® Green master mix”, para completar un volumen de reacción de 50 µl.

La amplificación se realizó con un programa de 5 minutos de desnaturalización a 94°C, 35 ciclos de (94°C de 1 minuto, de 60°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto y una extensión final de 72 °C de 1 minuto). La visualización del fragmento amplificado de 700 pb fue realizada mediante electroforesis en una gel de agarosa al 1 % y teñida con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). Como marcador se utilizó la escalera 100 pb (New England Biolabs® inc.) el cual se compone de 12 bandas que va desde los 1,517pb a los 100pb. El 16S rDNA de cada

muestra fueron digeridas por separado con las endonucleasas *HaeIII*, *HinfI* y *RsaI* (Promega®). Para cada digestión se transfirieron 15 µl del 16S rDNA amplificado, 2.5 de amortiguador enzimático (10X), 0.8 µl de enzima de restricción (20 U) y agua destilada, estéril y deionizada para un volumen final de 25 µl. Esta solución fue incubada a 37°C por 3 horas. Finalizado el proceso de incubación se separaron los fragmentos de digestión por medio de electroforesis en una gel de agarosa al 2.0 % en Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE 1X) con 1 µl de bromuro de etidio. El gel se corrió inicialmente a 60 voltios por 10 minutos y luego se aumentó a 120 voltios para finalizar una corrida en 2 horas. Para comparar los tamaños de los patrones de bandas se utilizó como escalera el marcador 100 pb (New England Biolabs® inc.). Los patrones de bandas generados fueron visualizados en el transiluminador (UVP UV Transiluminator 250V) de rayos ultra violeta y finalmente fotografiados.

Segregación de cepas por Hip-PCR

La amplificación y tipificación de las secuencias repetitivas Hip1 de las cianobacterias se obtuvo reaccionando en cada muestra 12.5 µl GoTaq® Green master mix 1X (Promega®), 40 pmol de los iniciadores HipCA (GCGATCGCCA) y HipTG (GCGATCGCTG) (Smith et al., 1998), 10 ng de DNA genómico y agua libre de nucleasa provista en el kit de GoTaq® Green master mix para un volumen final de 25 µl. La amplificación se realizó con un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 con un programa de un periodo inicial de desnaturalización por 5 minutos a 95°C, 30 ciclos a (desnaturalización a 95 °C por 30 segundos, 30 segundos de hibridización a 30 °C, y extensión a 72 °C por 60 segundos) seguidos de una extensión final de 72 °C por 5 minutos. La visualización se hizo en una gel de agarosa al 2.0 % en Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE 1X). Como marcador se utilizó el marcador 100 pb (New England Biolabs® inc.) El gel se corrió inicialmente a 60 voltios por 10 minutos y luego se aumentó a 120 voltios para finalizar una corrida en 3 horas. Los patrones de bandas generados fueron visualizados en el trans-iluminador (UVP UV Transiluminator 250V) de rayos ultra violetas y fotografiados.

Secuenciación del 16S rDNA

Quince muestras del 16S rDNA de cianobiontes fueron secuenciadas por RTSF (Research Technology Support Facility) de la Universidad del estado de Michigan (MSU), EUA. Previo al envío, las muestras del 16S rDNA fueron separadas por electroforesis en una gel de agarosa 1% en Tris-Ácido Acético-EDTA (TAE 1X) y luego teñidas en bromuro de etidio (0.5 µg/ml). La banda correspondiente a 700 pb fue extraída y purificada con “QIA quick PCR purification kit” de Qiagen® y se prepararon según el protocolo establecido por el RTSF.

A las secuencias de los 15 cianobiontes se les hizo un alineamiento simple con otras secuencias del 16S rDNA de bacterias disponibles en “Basic local alignment search tool: Nucleotide-nucleotide (*BLASTn*)”. Luego se seleccionaron 16 secuencias de bacterias que en el alineamiento simple presentaron un “bit score” mayor y un “E-value” menor. Después se hizo un alineamiento múltiple con las secuencias de los 15 cianobiontes, las 16 secuencias seleccionadas en *BLASTn* y el grupo externo “Out group”. Como “Out group” se seleccionó la secuencia de una cianobacteria filamentosa no fijadora de nitrógeno llamada *Oscillatoria willei* BDU 130481, dando un total de 33 secuencias para el alineamiento múltiple. El alineamiento múltiple se realizó utilizando el programa *Clustal W*, luego con el resultado del alineamiento múltiple se procedió a crear un árbol filogenético utilizando el método de distancia “Neighbor Joining” y como método de fidelidad un “Bootstrapping” de 2,000 repeticiones y 6500 semillas.

El *BLASTn* (Altschul et al., 1990), el *Clustal W* (Thompson, J.D. et al., 1994) y el “Neighbor Joining-Bootstrap” del “Phylogeny inference package” *PHYLIP* (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>), todos pertenecen a un conjunto de análisis filogenéticos, evolutivos y moleculares provistos en un solo programa llamado “Molecular evolutionary genetic analyses” *MEGA* versión 3.1 (Kumar et al., 2004).

RESULTADOS

Colección de raíces coraloides

Luego de realizar la búsqueda de las especies de *Zamias* en Puerto Rico se localizaron tres especies distribuidas en distintas localidades en diversos bosques de Puerto Rico. De las mismas se escogieron los 5 individuos representantes de cada *Zamia* sp. Éstos mostraron tener raíces coraloides en la superficie del suelo y cercanas a la planta. Para la especie endémica, *Z. portoricensis* fueron seleccionadas tres poblaciones de dos Bosques de Puerto Rico. La primera se encuentra en el área destinada para acampar en el Bosque Estatal de Susúa en Sábana Grande (18°04.241 N y 66°54.605 E). El suelo de esta población es de origen volcánico conocido como serpentinita. La segunda población de *Z. portoricensis* también esta localizada en el Bosque Estatal de Susúa, pero ésta crece en taludes de suelo de serpentinita al margen de la Quebrada Peces (18°04.241 N y 66°54.605 W) y la tercera población se encuentra localizada en la vereda Las Cóbana, (17°58.891 N y 66°52.540 W), en el Bosque Seco de Guánica. A diferencia de las otras dos poblaciones, la población de Guánica crece en un suelo formado por rocas calizas conocidas como “dientes de perro”. La formación rocosa de este lugar limitó el acceso a las raíces coraloides, y no se obtuvieron cianobiontes de esta última población.

Se coleccionaron raíces coraloides de *Z. pumila* la cual está localizada en el sector del Cerro Las Cuevas en el Barrio Guayabal, frente a la cantera de Mármol “Atlantic Marble” en Juana Díaz (18°04.540 N y 66°27.771 W). Los individuos de esta población crecen en bolsillos de suelo dispersos entre las formaciones rocosas de caliza marmolizada. Finalmente en el Bosque Estatal de Cambalache en Arecibo (18°27.140 N y 66° 35.842 W), se encontró la especie *Zamia amblyphyllidia* creciendo en suelo calizo.

Extracción y cultivo de cianobiontes

De las tres especies de *Zamias* se obtuvo un total de 64 cultivos de cianobiontes (Tabla 1.). Estos fueron primeramente cultivados en BG-11 (Rippka et al., 1979) según el primer método de cultivo descrito en esta tesis, en donde los cultivos fueron expuestos a la intemperie con luz natural indirecta. Pasado un mes, se obtuvo crecimiento en solo 25

cultivos (Tabla 2 Pág. 27), lo cuales fueron transferidos al medio de cultivo Jansen (Jansen 1997) e incubados con luz artificial por medio de bombillas de 75 Watts y a 27 ° C. Con esta nueva metodología se logró disminuir el tiempo de un mes a 7 días aproximadamente (Figura 12).

Tabla 1. Total de cianobiontes aislados de las Zamias y cultivos obtenidos.

Cultivos	Total de cianobiontes aislados	Total de cultivos en BG-11	Total de cultivos en Jansen
*ZAC	23	15	15
*ZPS	18	3	3
*ZPQP	15	2	2
*ZPJD	8	5	5
TOTAL DE CULTIVOS	64	25	25

*ZAC: *Z. amblyphyllidia*, Cambalache; ZPS: *Z. portoricensis*, Susúa; ZPQP: *Z. portoricensis*, Quebrada Peces; ZPJD: *Z. pumila*, Juana Dáz.

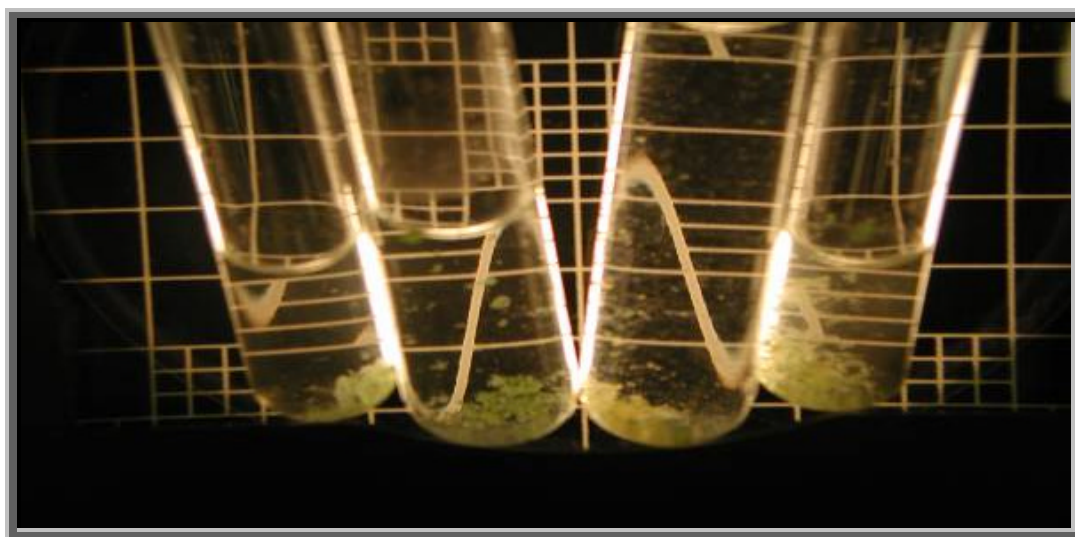


Figura 12. Cultivos de cianobiontes con cinco días de incubación. Estos cuatro cultivos de cianobiontes fueron inoculados en medio Jansen (Jansen, 1997) e incubados con fuente de luz artificial con bombillas de 75 Watts y a una temperatura constante de 27°C.

Tabla 2. Lugar de procedencia y lista de cianobiontes aislados por especie de *Zamia*.

Especie de <i>Zamia</i>	Localidad	Cultivos	Total de cultivos obtenidos
<i>Z. amblyphyllidia</i>	Bosque Estatal de Cambalache, Barceloneta	ZAC 1E, ZAC 1F, ZAC 2A, ZAC 2B, ZAC 2D, ZAC 2E, ZAC 3B, ZAC 3C, ZAC 4A, ZAC 4B, ZAC 4C, ZAC 4D, ZAC 4F, ZAC 4G, ZAC 5B,	15
<i>Z. portoricensis</i>	Bosque Estatal Susúa, Sábana Grande	ZPS 38A, ZPS 38B, ZPS 38C	3
<i>Z. portoricensis</i>	Quebrada Peces, Susúa, Sábana Grande	ZPQP 39B, ZPQP 42D	2
<i>Z. pumila</i>	Cerro Las Cuevas, Juana Díaz	ZPJD 1A, ZPJD 1C, ZPJD 2A, ZPJD 2B, ZPJD 4A	5

Identificación morfológica de cianobiontes

Los cianobiontes aislados fueron identificados según los fenotipos morfológicos como *Nostoc* sp. y *Tolypothrix* sp. En 20 cultivos se observaron fenotipos similares a las características del género *Nostoc* (Figura 13, A-B. Pág. 28 y Figura 14. Pág. 29). Las características observadas en los 20 cultivos, para su identificación fueron: la presencia de hormogonios móviles diferenciados de los tricomas maduros, como también la presencia de células diferenciadas como heterocistos intercalados, de aquínets y la agrupación de filamentos envueltos, formando sacos. Por otro lado, cinco cultivos presentaron fenotipos morfológicos similares al género *Tolypothrix*, (Figura 13 C-D. Pág. 28). Éstos fueron obtenidos de los individuos #2 y #4 de la especie *Z. amblyphyllidia*, localizada en el Bosque Estatal de Cambalache (ZAC 2A, ZAC 4A, ZAC4B, ZAC 4C, Y ZAC 4D). Los fenotipos morfológicos observados en estos cianobiontes similares a *Tolypothrix* sp., fueron: Tricomas maduros con una disminución en su forma cilíndrica hasta culminar con un heterocisto apical y cónico. Estos cianobacterias forman ramificaciones falsas ligadas por un heterocisto “basal”. Los tricomas están cubiertos por una envoltura, los hormogonios son móviles y

originan tricomas nuevos diferenciados por un solo heterocisto terminal. En los 25 cultivos no se observaron fenotipos morfológicos característicos del género *Anabaena* sp.

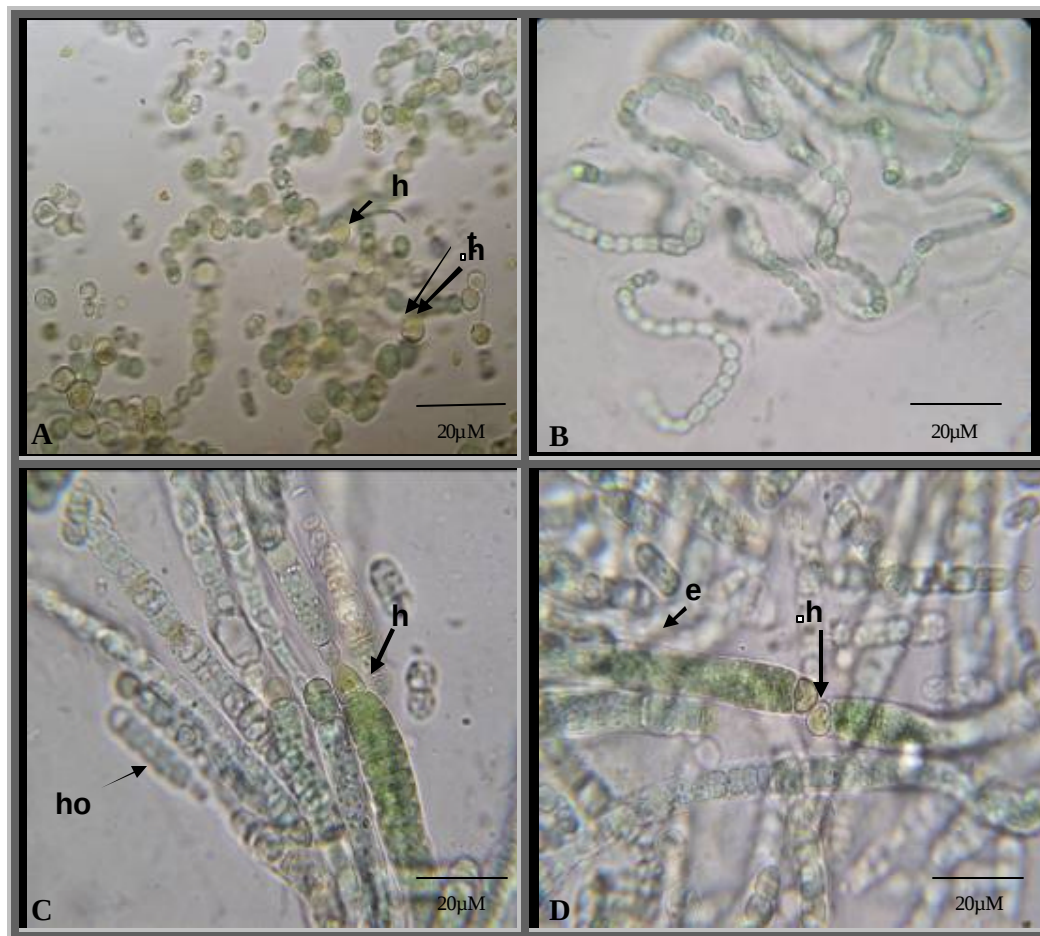


Figura 13. Características morfológicas de algunos cianobiontes aislados y cultivados en medio Jansen (Jansen, 1997) bajo microscopio de campo claro con una magnificación de 100X. A. se muestra el cianobionte aislado de la raíz coraloide B del individuo 38 de *Zamia portoricensis* del Bosque de Susúa (ZPS 38B), después de su extracción con heterocistos (h). B. Cianobionte ZPS 38B cultivado por cuatro semanas sin heterocistos. C. Se observa el cianobionte D del individuo 4 de *Zamia amblyphyllidia* del Bosque Cambalache (ZAC 4D), con hormogonios y tricomas maduros (t) con un heterocisto (h) apical. D. Cianobionte ZAC 4D con dos tricomas maduros, ambos con heterocistos apicales (h), cubiertos por una envoltura (e).

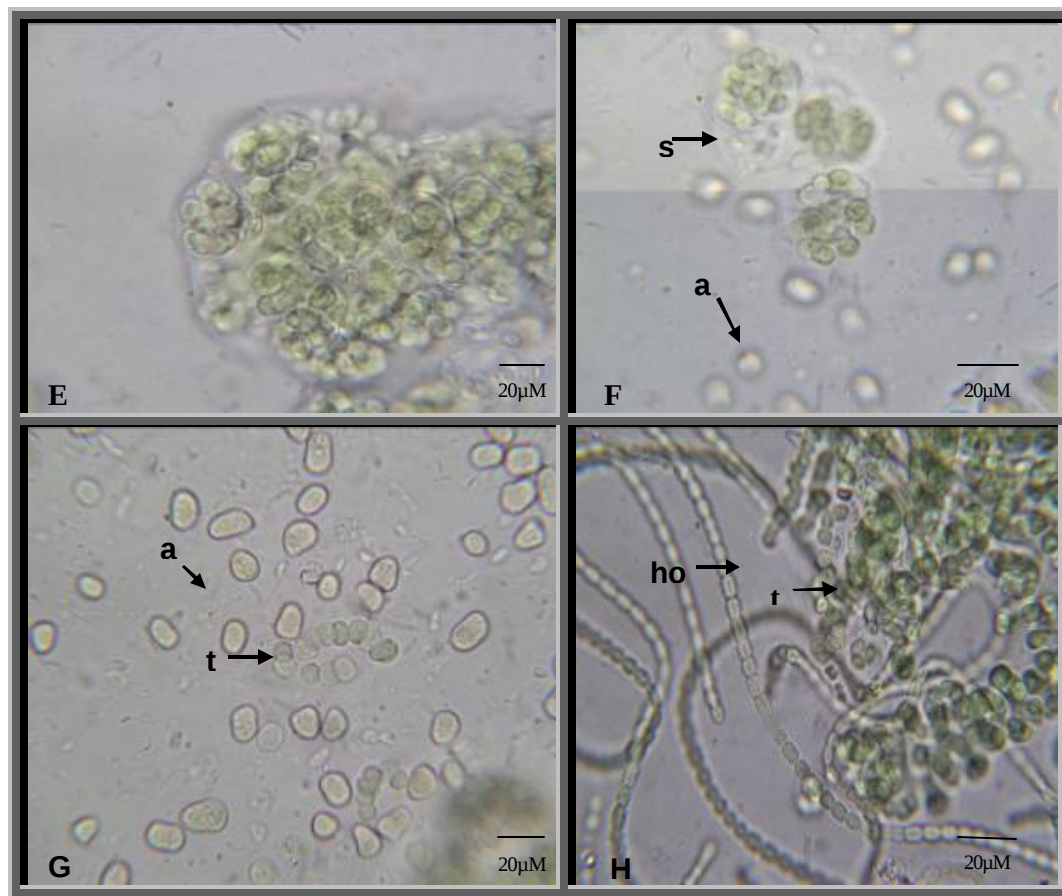


Figura 14. Cianobionte aislado y cultivado en medio Jansen (Jansen, 1997) bajo microscopio de campo claro con una magnificación de 100X. E-G. Cianobionte A del individuo 4 de *Zamia pumila* de Juana Dáz (ZPJD 4A), con sacos (s) compuestos por tricomas y aquínetos. H. Tricomas maduros enroscados entre si y hormogonios (ho) diferenciados de los tricomas maduros formando largas cadenas de células vegetativas.



Figura 15. Cianobiontes aislados y cultivados en BG-11⁰. I–J. de cianobiontes cultivados en BG-11 sin fuente de nitrógeno. I. Cianobionte aislado de *Z. pumila*. de la población Juana Díaz con un tricoma maduro compuesto por células ovoides con 2 heterocistos (h) terminales y 4 intercalados. Los heterocistos se localizan aproximadamente entre cada 16 a 22 células vegetativas. Además se observa un hormogonio (ho), el cual mostró motilidad y está compuesto por células vegetativas cilíndricas. J. Cianobionte aislado de *Z. portoricensis* de la población de Quebrada Peces en Susúa con tricomas compuestos de aquínetos (a).

Caracterización molecular de los cianobiontes

Luego de la extracción del DNA genómico total de los 25 cianobiontes aislados, se amplificó una porción del gen que codifica para el 16S rDNA con un tamaño esperado de 700 pb (Figura 16).

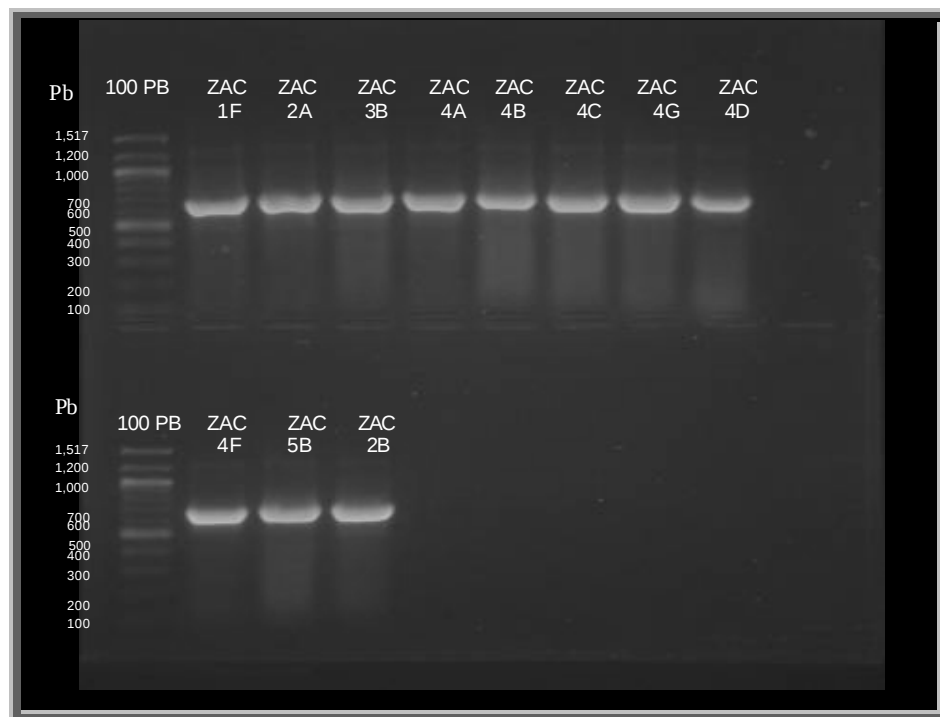


Figura 16. Gel de agarosa al 1% con el 16S rDNA de once cianobiontes aislados de *Zamia amblyphyllidia* del Bosque Cambalache. En el margen izquierdo del gel se muestra el tamaño en pb de las bandas correspondientes al marcador de peso molecular de 100 pb (New England Biolabs® inc). Este marcador está formado por 12 bandas en un intervalo descendente con valores de 1,517 pb a 100 pb. Las bandas obtenidas del 16S rDNA se localizan en la sexta y séptima banda, correspondiente a un tamaño de 700 pb. La gel fue corrida en TAE 1X a (60v/2h). ZAC = *Zamia amblyphyllidia* del Bosque de Cambalache.

Segregación de grupos cianobiontes por ArDRA

La digestión enzimática con las tres enzimas de restricción *HaeIII*, *HinfI* y *RsaI* generó patrones de bandas distintivas para la segregación de grupos de los cianobiontes aislados. Estos patrones pueden observarse en las figuras 17 a la 19. En el cuadro A y B (Figura 17. Pág. 33) se observa los patrones de restricción generados por la enzima *HaeIII*. En ambos cuadros se observan los patrones compuestos por 3 bandas de 50pb, 200pb y 400pb en todos los cianobiontes. La suma de las tres bandas por cada cianobionte es de 650 pb. En los cuadros A y B (Figura 18. Pág. 34) se observan los patrones de restricción generados con la enzima *HinfI*. En el cuadro A (Figura 18) se identifican dos grupos de cianobiontes, en el primero se encuentran los cianobiontes (ZAC 1F, ZAC1E, ZAC 3B, ZAC 4G, ZAC 4F y ZAC 5B) con patrones compuestos por tres bandas de aproximadamente 350 pb, 200 pb y 150 pb, cuya suma es de 700 pb. El segundo grupo se encuentran los cianobiontes (ZAC 2A, ZAC 4B, ZAC 4C, ZAC 4D) con patrones de restricción compuestos por dos bandas de 500 pb y 200 pb, cuya suma genera un total de 700 pb. En el cuadro B (figura 18. Pág. 34), se observan cianobiontes con los mismos patrones de restricción formado de tres bandas de aproximadamente 350 pb, 200 pb y 150, agrupándolos con los cianobiontes del primer grupo del cuadro A, y solo el cianobionte ZAC 2D presenta el mismo patrón compuesto por dos bandas de 500 pb y 200 pb iguales al de los cianobiontes pertenecientes al segundo grupo observados en el cuadro A (Figura 18. Pág. 34). Finalmente, los patrones de restricción obtenidos con la enzima *RsaI*, se forman nuevamente los dos grupos (Figura 19. Pág. 42). En los cuadros A y B (Figura 19) el primer grupo está compuesto por aquellos cianobiontes que presentaron solo una banda de aproximadamente 325 pb, pero esta vez se incluyen en el primer grupo a los dos cianobiontes ZAC 2A y ZAC 2D. El segundo grupo lo componen los restantes tres cianobiontes (ZAC 4B, ZAC 4C, ZAC 4D) del cuadro A (Figura 19. Pág. 35) por tener un patrón de restricción compuesto por dos bandas de aproximadamente 325 pb y 200pb y cuya suma genera un total de 525 pb.

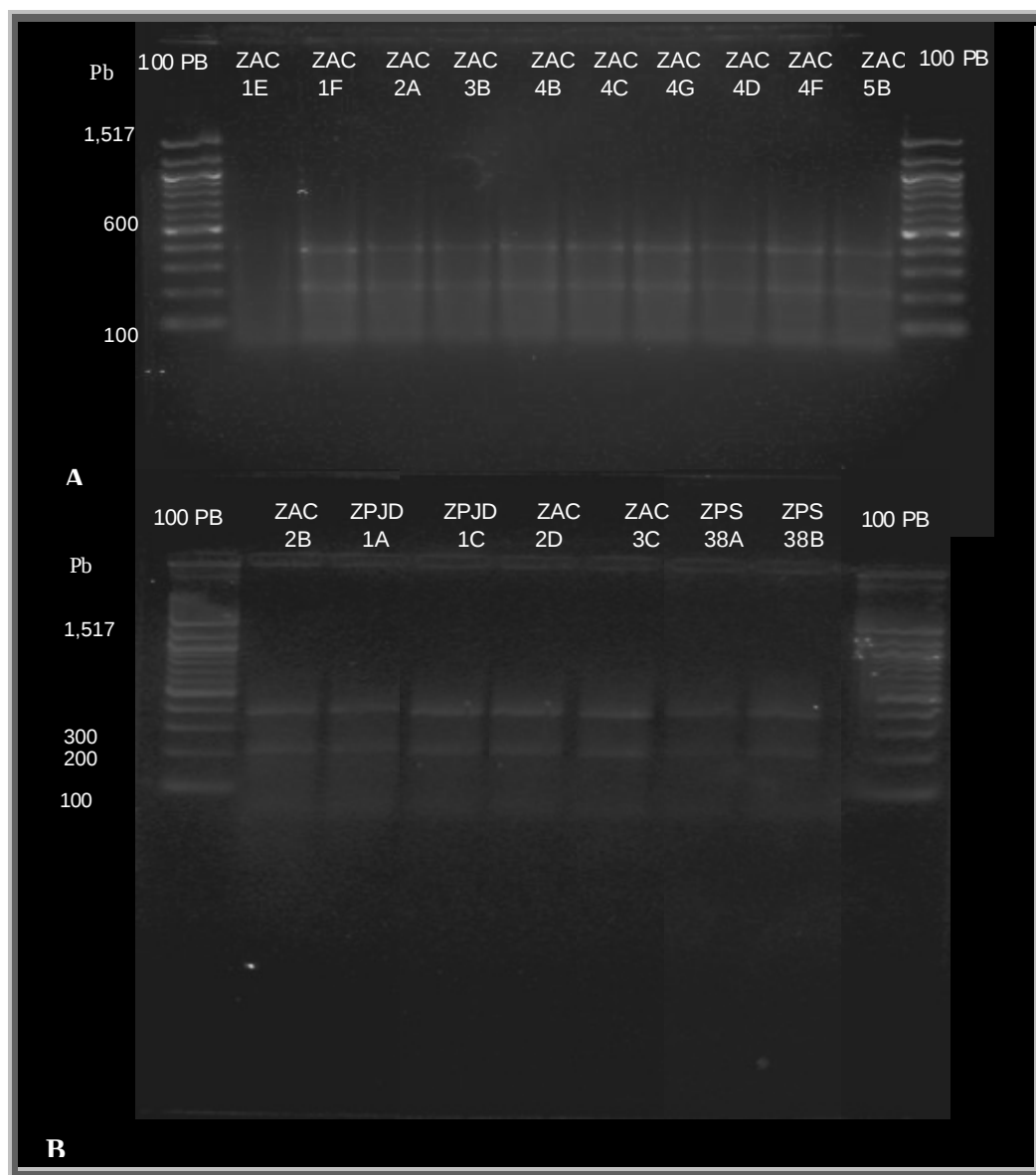


Figura 17. Gel de agarosa al 2% con patrones de restricción del 16S rDNA obtenidos con *HaeIII* de 17 cianobiontes. En los márgenes izquierdo y derecho de la gel se muestra la escalera 100 pb (New England Biolabs® inc). La gel fue corrida en TAE 1X a (60v/10m-120v/3h). ZAC = *Zamia amblyphyllidia* del Bosque de Cambalache; ZPJD = *Z. pumila* de Juana Díaz; ZPS = *Z. portoricensis* del Bosque de Susúa.

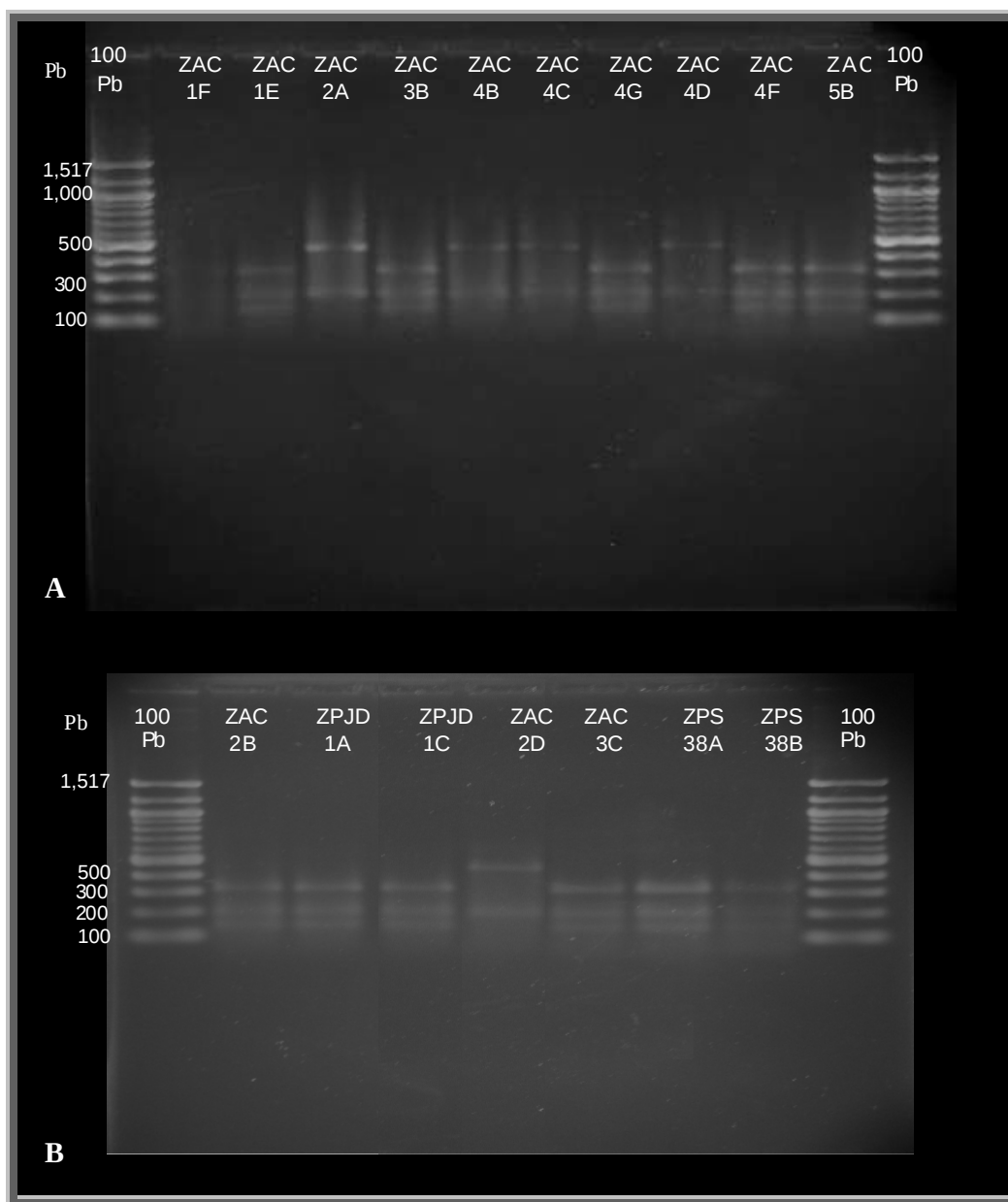


Figura 18. Gel de agarosa al 2% con patrones de restricción del 16S rDNA obtenidos con *Hinf*I de 17 cianobiontes. En los márgenes izquierdo y derecho de la gel se muestra la escalera 100 pb (New England Biolabs® inc). La gel fue corrida en TAE 1X a (60v/10m-120v/3h). ZAC = *Zamia amblyphyllidia* del Bosque de Cambalache; ZPJD = *Z. pumila* de Juana Díaz; ZPS = *Z. portoricensis* del Bosque de Susúa.

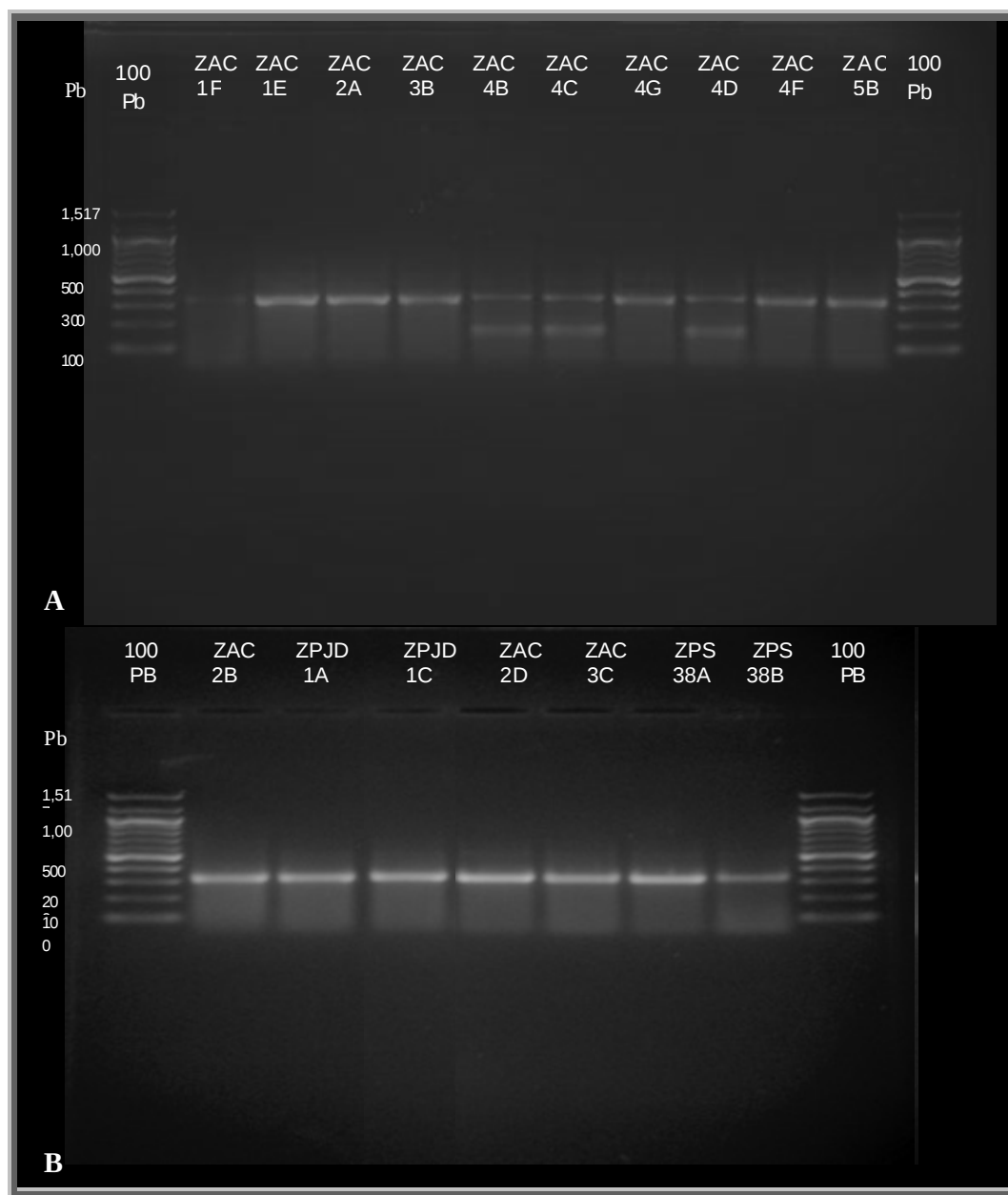


Figura 19. Gel de agarosa al 2% con patrones de restricción del 16S rDNA obtenidos con *Rsa* I de 17 cianobiontes. En los márgenes izquierdo y derecho de la gel se muestra la escalera 100 pb (New England Biolabs® inc). La gel fue corrida en TAE 1X a (60v/10m-120v/3h). ZAC = *Zamia amblyphyllidia* del Bosque de Cambalache; ZPJD = *Z. pumila* de Juana Díaz; ZPS = *Z. portoricensis* del Bosque de Susúa.

Caracterización por Hip1–PCR

Se obtuvieron patrones de bandas generados por la amplificación de los elementos repetitivos Hip1 en los 25 cultivos de cianobiontes. Este análisis permitió segregar los cianobiontes en diferentes genotipos por compartir los mismos patrones. (Figura 20. Pág. 37). Por ejemplo, en el cuadro A (Figura 20) se observan 9 genotipos con diferentes patrones de bandas y un solo genotipo compuesto por los cianobiontes con el mismo patrón de bandas (ZAC 4B, ZAC 4C, ZAC 4G y ZAC 4F) este genotipo fue identificado como genotipo G5. Por otro lado, en el cuadro B de la misma figura se observan 7 genotipos con diferentes patrones de bandas y dos genotipos compuesto por cianobiontes que comparten un mismo patrón de bandas (ZAC 2D y ZAC 2E) identificados como genotipo G12, y (ZPS 38A, ZPS 38C, ZAC 2A y ZPQP 42D) identificados como genotipo G14. Con los resultados obtenidos de este análisis se escogieron 15 cianobiontes para secuenciar su 16S rDNA. Se obtuvieron 15 amplicones cuyas secuencias son de 328pb a 746pb. El análisis *in silico* de estas secuencias se realizó comparando las mismas con secuencias de 16S rDNA de cianobacterias depositadas en el banco de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), (Tabla 3. Pág. 38).

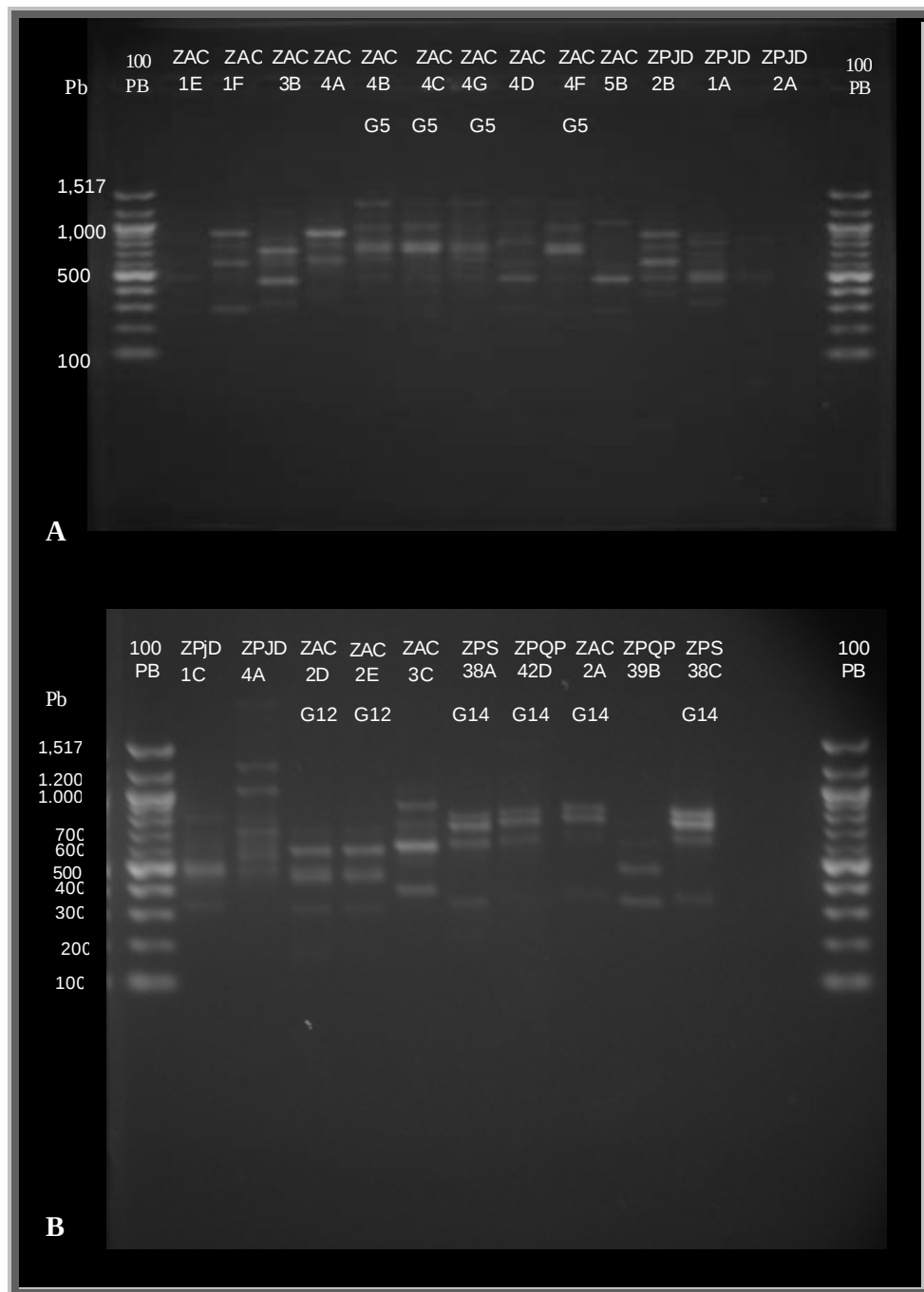


Figura 20. Gel de agarosa al 2% con patrones de bandas de los elementos repetitivos Hip de 23 cianobiontes. En los márgenes izquierdo y derecho de la gel se muestra la escala 100 pb (New England Biolabs® inc). En los genotipos G5, G12 y G14 se agrupan los cianobiontes con patrones de bandas iguales. ZAC = *Zamia amblyphyllidia* del Bosque de Cambalache; ZPJD = *Z. pumila* de Juana Diaz; ZPS = *Z. portoricensis* del Bosque de Susúa; ZPQP = *Z. portoricensis* de Quebrada Peces en el Bosque de Susúa.

Tabla 3. Resultados obtenidos del alineamiento de las secuencias del 16S rDNA de los 15 cianobiontes con algunas cianobacterias del *Blastn*.

Cianobionte	Número de acceso de los cianobiontes	Pares de bases	Resultado de <i>Blastn</i>	Valor E
ZAC 1E	EF424121	522	<i>Nostocales cyanobacterium</i> IL-8.1	2e-151
ZAC 2D	EF424122	328	<i>Nostoc</i> sp. Mollenhauer 1:1088	7e-125
ZAC 3B	EF424123	492	<i>Anabaena flos-aquae</i> Strain UTEX	0
ZAC 3C	EF424124	540	<i>Anabaena flos-aquae</i> Strain UTEX	0.0
ZAC 4A	EF424125	746	<i>Tolypothrix</i> sp. IAM- 259	1e-148
ZAC 4C	EF424126	789	<i>Tolypothrix</i> sp. IAM- 259	0
ZAC 4D	EF424127	482	<i>Tolypothrix</i> sp. IAM- 259	0
ZAC 5B	EF424128	524	<i>Nostoc</i> . Sp. CCG3	0
ZPJD 1A	EF424129	489	<i>Anabaena flos-aquae</i> Strain UTEX	0
ZPJD 1C	EF424130	326	<i>Anabaena flos-aquae</i> Strain UTEX	1e-157
ZPJD 2B	EF424131	671	<i>Nostoc linckia</i>	0
ZPQP 39B	EF424132	677	<i>Nostoc</i> . Sp. Mollenhauer 1:1-067	0
ZPQP 42D	EF424133	656	<i>Pseudoanabaena</i> sp. MBIC10772	0
ZPS 38A	EF424134	474	<i>Pseudoanabaena</i> sp. MBIC10772	0
ZPS 38C	EF424135	540	<i>Pseudoanabaena</i> sp. MBIC10772	0

El valor de 0 indica un pareo perfecto entra la secuencia del cianobionte y la secuencia de la cianobacteria obtenida de “BLASTn.”

Análisis de “Neighbor-Join Bootstrap tree”

Según el alineamiento y el análisis de “NJ-Bootstrap” de las secuencias de los 15 cianobiontes con las secuencias diferentes de cianobacterias se construyó un árbol filogenético (Figura 21. Pág. 40). El árbol filogenético está compuesto por 33 taxones incluyendo el grupo externo de la cianobacteria filamentosa no fijadora de nitrógeno *Oscillatoria willei* BDU 130481. Algunos taxones están distribuidos en 14 ramas (*Anabena variabilis* KCTC AG10059, **ZAC 1E**, *Nostoc* sp. ‘Mollenhauer’ 1:1-088, *N.* sp. ‘*Fuscopannaria leucophea*’ cianobionte, *Cylindrospermum* sp. A1345, *Pseudoanabaena* sp. MBIC10772, *A. sigmoidea* 9BU29S1, *Trichormus variabilis* 9CH37S2, **ZPQP 39B**, *Tolypothrix* sp. PCC 7415, **ZAC 2D**, *N. commune* SO-42, *Calothrix membranacea*, *Oscillatoria willei* BDU 130481) y los restantes se agrupan formando 7 nodos: El nodo A, muestra una politomía de 10 taxones (**ZPJD 1C**, *N.* sp. CCG3, **ZPJD 2B**, *A. flos-aquae* UTEX LB 2391, **ZAC 5B**, **ZAC 3B**, **ZPJD 1A**, **ZAC 3C**, *N. entophytum* IAM M-267, *N.* sp. PCC 9231). El nodo B forma una bifurcación con dos taxones (*N. linckia* IAM M-251 y *N. cyanobacterium* IL-8.1); el nodo C forma bifurcación con (**ZPS 38C** y **ZPS 38A**) junto con el taxón **ZPQP 42D** forman otra bifurcación, creando otro nodo indicado con la letra D. El nodo E forma una bifurcación con (**ZPS 38C** y **ZPS 38A**) y junto con el taxón **ZPQP 42D** se crea otra bifurcación, formando el nodo F. Finalmente el nodo G es una politomía compuesta por los cinco taxones (**ZAC 4D**, **ZAC 4C**, **ZAC 4A** y *Tolypothrix* sp. IAM M-259).

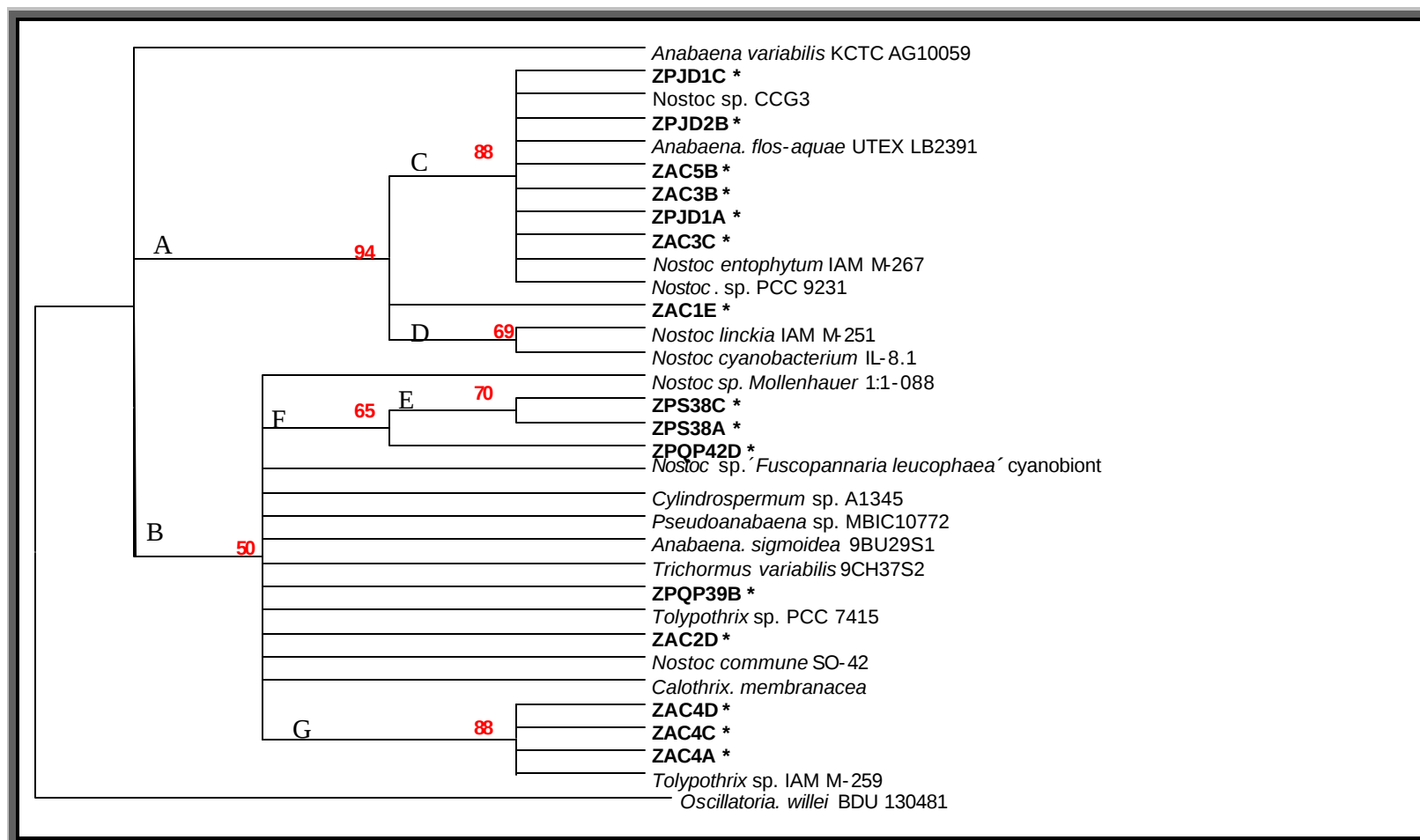


Figura 21. “NJ- Bootstrap rooted Tree” de las secuencias parciales del 16S rDNA de 15 cianobiontes y de otras cianobacterias obtenidas del *Blastn*. Las letras mayúsculas indican los nodos formados. Los números en rojo de 50% a 94% son los valores del “bootstrap”. *ZAC : *Z. amblyphyllidia*, Cambalache; ZPS: *Z. portoricensis*, Susúa; ZPQP: *Z. portoricensis*, Quebrada Peces; ZPJD: *Z. pumila*, Juana Díaz.

DISCUSIÓN

Colección de raíces coraloideas

De la especie de *Z. portoricensis* fueron seleccionadas tres poblaciones en diferentes condiciones por ejemplo la primera población crece en un área de acampado dentro del Bosque de Susúa, la segunda completamente aislada cerca de un cuerpo de agua a las orillas de la Quebrada Peces dentro del Bosque de Susúa y la tercera en un Bosque Seco, de suelo rocoso. Solo en esta última población de *Z. portoricensis* no se encontró raíces coraloideas, posiblemente esto se deba a que sus individuos de esta *Zamia* crecen en fisuras o huecos entre las rocas que impidieron el acceso a las raíces. A diferencia de *Z. portoricensis* Urban y *Z. amblyphyllidia* las cuales se encuentran en bosques destinados a la conservación de su flora y fauna, la especie *Z. pumila* en el Cerro Las Cuevas del Bo. Guayabal en Juana Díaz esta expuesta a los efectos de la industria de extracción de mármol, al ganado y a la quema. A pesar de esta zona haber sido quemada la población de *Z. pumila* aun persiste.

Extracción y cultivo de cianobiontes

De las tres especies de *Zamia* se extrajeron un total de 64 cianobiontes, sin embargo solo crecieron 25 de los cuales 15 fueron secuenciados. Entre los factores que pudieron haber afectado el crecimiento de los cianobiontes, uno de ellos pudiera ser la esterilización de las raíces coraloideas, la cual requiere del uso de varios químicos tales como (hipoclorito de sodio NaClO, Tritón® X-100 y etanol) como también pudo haber afectado la concentración de estos químicos y/o el tiempo de exposición. Otras causas podrían ser por el primer método de incubación descrito en esta tesis no fue efectiva para cultivar los cianobiontes por varias razones, la primera fue el uso del medio de cultivo BG-11 (Rippka, 1979) el cual mostró ser poco eficiente a pesar de ser comúnmente utilizado para el crecimiento de cianobacterias en esta investigación. También el exponer los cianobiontes a la intemperie en donde no hubo control de luz ni de temperatura pudo ser el factor determinante. Por lo tanto, el modificar el método de incubación con la sustitución del medio de cultivo BG-11 (Rippka 1979) por Jansen (Jansen, 1997), que en comparación con el primero contiene más nutrientes y en mayor concentración y proveer una fuente de luz constante con control de temperatura no tan

solo ayudó a disminuir el tiempo de crecimiento si no también evitó la pérdida de los restantes cultivos.

Caracterización morfológica de los cianobiontes

En los primeros estudios sobre la caracterización de los cianobiontes de las Cicadáceas se basaron en caracteres morfológicos y bioquímicos los cuales requerían la obtención de cultivos puros o axénicos lo cual solo limitó la identificación de aquellos cianobiontes cultivables en condiciones axénicas. Sin embargo, obtener cultivos puros es difícil debido a que los cianobiontes crecen mejor en presencia de otras bacterias (Costa, 2004).

Según Meeks y Elhai, (2002) la planta induce la diferenciación celular y controla el metabolismo del cianobionte para poder obtener NH_4^+ . Por esta razón las cianobacterias muestran variación morfológica cuando pasan de vida libre a ser cianobiontes haciendo difícil su identificación (Parslud et al., 1998; Rasmussen y Nilsson, 2002). También las características morfológicas de las cianobacterias están influenciadas por el medio de cultivo y su modo de cultivo (Rippka., 1988, Wright. et al., 2001 y Svenning. et al., 2005). Por lo tanto antes de cultivar los cianobiontes, éstos fueron observados bajo un microscopio de campo claro y comparados después de ser cultivados demostrando diferencias morfológicas. Por ejemplo en la figura 13 de la Página 35 en los cuadros A y B se observa el cambio morfológico del cianobionte ZPS 38B, en donde los heterocistos son abundantes y no se observa un patrón de intercalado de los heterocisto por cantidad de células vegetativas. Una vez cultivados en el medio de cultivo Jansen (Jansen, 1997) con fuente de nitrógeno se observa en el cuadro B la ausencia de los heterocistos. Teniendo en cuenta que los cambios morfológicos de los cianobiontes impide una identificación precisa de los mismos, para propósitos de esta tesis la identificación de los cianobiontes se limitó a relacionarlos con un posible género de cianobacteria. Por tanto se identificaron preliminarmente 20 cianobiontes con características similares al género *Nostoc* y cinco cianobiontes con características similares al género *Tolypothrix*. Este último pertenece, al igual que *Nostoc* y *Anabaena* a la Sub-sección IV de los Nostacales por ser una cianobacteria filamentosa, la cual produce heterocistos clasificándola como una cianobacteria diazótrofa. Según Castenholz (2001) las especies de *Tolypothrix* descritas hasta el presente solo han sido localizadas en suelo y en

agua dulce. Generalmente se caracterizan por formar falsas ramificaciones, en donde las mismas se encuentran unidas por un heterocisto “basal”, sus tricomas maduros exhiben una disminución de tamaño a medida que se acerca al ápice, culminando con un heterocisto (Castenholz, 2001). Al presente *Tolypothrix* solo se ha encontrado en vida libre y aunque es un organismo fijador de nitrógeno no se le conoce como una cianobacteria capaz de formar simbiosis o como cianobionte. Por tanto sería reportado por primera vez como cianobionte en *Zamia*.

Caracterización molecular

La caracterización molecular fue utilizada en este estudio para poder identificar los 25 cianobiontes comenzando con la segregación de estos en grupos según sus patrones de restricción obtenidos en la prueba de ArDRA. Comenzando con la enzima restricción *HaeIII* (Figura 17. Pág. 33) no se observó ningún patrón que permitiera segregar los cianobiontes. Por lo tanto esta enzima no fue efectiva para la segregación de los cianobiontes. Ahora con la enzima *HinfI* (Figura 18. Pág. 34) los dos grupos segregados son en si dos géneros de cianobiontes en donde el segundo género se encuentran cinco cianobiontes aislados de dos plantas de *Zamia amblyphyllidia* del Bosque Estatal Cambalache (ZAC 2A, ZAC 4B, ZAC 4C, ZAC 4D y ZAC 2D) y solo tres de ellos (ZAC 4B, ZAC 4C, ZAC 4D) son confirmados por los patrones distintivos que estos tres cianobiontes presentaron con la enzima *RsaI* (Figura 19. Pág. 35). Ahora los cianobiontes ZAC 2A y ZAC 2D que presentaron patrones iguales con los cianobiontes (ZAC 4B, ZAC 4C, ZAC 4D) con la enzima *HinfI*, son agrupados con el resto de los cianobiontes por los patrones generados con la enzima *RsaI*, esto indica que aunque ambos son similares a los cianobiontes (ZAC 4B, ZAC 4C y ZAC 4D) éstos no pertenecen al mismo género.

El análisis de elementos Hip1 mediante iniciadores específicos para cianobacterias es una herramienta que permite distinguir entre especies y cepas. Los resultados muestran patrones de bandas o perfiles distintivos que permitió identificar diversos genotipos entre las tres especies de *Zamia*, como también dentro de individuos de una especie de *Zamia*. Por ejemplo, en el cuadro A (figura 20. Pág. 37) se observan 10 genotipos de los cuales 9 son diferentes y solo 1 es un genotipo compuesto por los cianobiontes (ZAC 4B, ZAC 4C, ZAC

4G y ZAC 4F) este genotipo fue identificado como genotipo 5 (G5). Esto indica que en la planta 4 de *Z. amblyphyllidia* localizada en el Bosque Estatal de Cambalache se encontró la misma cepa de cianobionte en diferentes raíces coraloides. Por otro lado en el cuadro B de la misma figura se observan 10 genotipos de los cuales 8 son diferentes cepas de cianobiontes y los genotipos (G12 y G14). El genotipo 12 (G12) está compuesto por los cianobiontes (ZAC 2D y ZAC 2E) y G14 compuesto por (ZPS 38A, ZPS 38C, ZPJD 1A y ZPQP 42D). En G12 el individuo 2 de *Z. amblyphyllidia* del Bosque Estatal de Cambalache comparte el mismo cianobionte en dos de sus raíces coraloides. Por otro lado, en G14 la misma cepa de cianobionte es compartido en dos raíces coraloides de la misma planta de *Z. portoricensis* localizada en el área de acampado del Bosque Estatal de Susúa como también una raíz de una planta de *Z. portoricensis* localizada en la Quebrada Peces y finalmente en una raíz del individuo 1 de *Z. pumila* localizada en el Cerro Las Cuevas, Juana Díaz. Estos resultados concuerdan con otros estudios que han señalado que no existe especificidad de cianobiontes por especies de Cicadáceas y que en una misma planta puede albergarse distintas cepas de cianobiontes (Costa et al., 1999; Ow et al., 1999; Medeiro y Stevenson, 2000; Rai et al., 2000; Zheng et al., 2002 y Costa, 2004).

El utilizar iniciadores específicos dio la ventaja de poder obtener el 16S rDNA de los cianobiontes sin amplificar el 16S rDNA de las otras bacterias presentes en los cultivos. Una vez secuenciados y realizado el alineamiento simple con otras cianobacterias se confirma que los iniciadores utilizados en esta tesis si son específicos para cianobacterias.

Según los resultados del alineamiento simple con BLASTn, el 16S rDNA de los 15 cianobiontes éstos se agrupan bajo dos géneros (*Nostoc* y *Tolypothrix*), confirmando los resultados obtenidos en el análisis de ArDRA en el cual, según los patrones de restricción los cianobiontes están segregados en dos grupos o géneros. También los resultados confirman la identificación morfológica preliminar con la cual se identificó a los cianobiontes aislados de las tres especies de Zamias en Puerto Rico como los géneros *Nostoc* y *Tolypothrix*. Sin embargo el amplificar solo una porción del 16S rDNA limita la identificación de los cianobiontes a nivel de género. Para identificar los cianobiontes de las Zamias de Puerto Rico a nivel de especie se requiere de realizar otros análisis como por ejemplo la hibridización DNA-DNA.

Análisis de “Neighbor-Join Bootstrap tree”

Según el árbol obtenido con el análisis de *NJ-Bootstrap*, los cianobiontes aislados de las Zamias en Puerto Rico están relacionados a los géneros *Nostoc* y *Tolypothrix* (Figura 21, Pág. 40). Según la posición que ocupa cada cianobionte dentro del árbol filogenético con relación a las otras cianobacterias se observa lo siguiente: Los cianobiontes (**ZAC 1E, ZPQP 39B, ZAC 2D**) al formar ramas independientes sugiere que los tres cianobiontes son géneros o especies desconocidas dentro de los Nostocales. Por otro lado los cianobiontes (**ZPJD 1A, ZPJD 1C, ZPJD 2B, ZAC 3B, ZAC 3C, ZAC 5B**) al formar el nodo C, junto con tres cianobacterias del género *Nostoc* indica que los 6 cianobiontes pertenecen género *Nostoc*. En cuanto a la cianobacteria de *Anabaena flos-aquae* UTEX LB2391, en vez de colocarse junto a la cianobacteria *Anabaena variabilis* KCTC AG10059 como se hubiera esperado, forma parte del nodo C. Esto sugiere que la cianobacteria *A. flosaquae* UTEX LB2391 pertenece al género *Nostoc* y no al género *Anabaena*.

Las dos cianobacterias (*N. linckia* IAM M-251 y *N. cyanobacterium* IL-8.1) forman una bifurcación creando el nodo D lo cual sugiere que ambas cianobacterias son iguales. De igual forma se observa una bifurcación en el nodo E compuesto por dos cianobiontes aislados de un mismo individuo de *Zamia portoricensis* de la población localizada en el área de acampado del Bosque Estatal de Susúa (**ZPS 38C y ZPS 38A**). Esto indica que en la misma planta pero en raíces diferentes se encontró el mismo cianobionte. A su vez los cianobiontes (**ZPS 38C y ZPS 38A**) en conjunto con el cianobionte **ZPQP 42D** forman otra bifurcación, creando el nodo F. Esto indica que el en la raíz D del individuo 42 de *Z. portoricensis* perteneciente a la población Quebrada Peces del Bosque de Susúa tiene un cianobionte similar al que se encontró en el individuo 38 de la misma especie de *Zamia* pero de la población localizada en el área de acampado del Bosque de Susúa. Por lo tanto los tres cianobiontes (**ZPS 38C, ZPS 38A y ZPQP 42D**) al formar los nodos E y F sin tener una cianobacteria representante de los Nostocales, sugiere que los tres cianobiontes (**ZPS 38C, ZPS 38A y ZPQD 42D**) también son géneros o especies desconocidas dentro de los Nostocales. Finalmente el nodo G está compuesto por 3 cianobiontes y una cianobacteria representante de los Nostocales, (**ZAC 4D, ZAC 4C, ZAC 4A** y *Tolypothrix* sp. IAM M-

259) los cuales forman una politomía. Esto indica que en diferentes raíces coraloides del individuo 4 de *Z. amblyphyllidia* del Bosque Estatal Cambalache, comparten el mismo cianobionte perteneciente al género *Tolypothrix*.

CONCLUSIÓN

Los objetivos propuestos para esta investigación fueron alcanzados. Se pudo aislar, cultivar y caracterizar morfológica y molecularmente algunos cianobiontes de las tres especies de *Zamia* (*Z. amblyphyllidia*, D.W. Stevenson. *Z. portoricensis* Urban. y *Z. pumila* L.) en distintos bosques sub-tropicales de Puerto Rico. Los cianobiontes observados bajo microscopio de campo claro presentaron morfologías similares a las cianobacterias del género *Nostoc* y *Tolypothrix*. Para poder identificar y caracterizar los cianobiontes aislados se optimizaron métodos moleculares cuyos resultados sugieren lo siguiente:

- (1) Según los patrones de restricción obtenidos con ArDRA los cianobiontes están segregados en dos géneros.
- (2) El uso de los iniciadores HipTG y HipCA permitieron obtener perfiles para segregar cepas de cianobiontes y se confirma que entre las tres especies de *Zamia* y sus cianobiontes no existe especificidad.
- (3) En una misma planta pueden encontrarse el mismo cianobionte en diferentes raíces coraloides como también diferentes especies de *Zamia* comparten el mismo cianobionte en sus raíces.
- (4) Los 15 cianobiontes pertenecen al Sub-Grupo IV de los Nostacales, grupo caracterizado por cianobacterias filamentosas y diazótrofes.
- (5) Según las secuencias parciales obtenidas y analizadas por medio del “N-J Bootstrap análisis” 6 de los 15 cianobiontes sugieren la posibilidad de ser géneros o especies nuevas.
- (6) Los resultados obtenidos en la caracterización morfológica y molecular coinciden en identificar a *Nostoc* y *Tolypothrix*, como los géneros de los cianobiontes aislados de las *Zamias* de Puerto Rico. El género predominante es *Nostoc*.

- (7) Se presenta un nuevo record con el género *Tolypothrix* como cianobionte en un individuo de la *Zamia amblyphyllidia* D.W. Stevenson.

RECOMENDACIONES

La caracterización de algunos cianobiontes aislados de las tres especies de *Zamias* localizadas en diferentes tipos de bosques en Puerto Rico es un estudio que sienta las bases para las siguientes investigaciones:

- (1) Completar el proceso de identificación de los cianobiontes aislados y determinar si representan nuevos géneros o especies de cianobacterias.
- (2) Conocer si existe competencia entre las cianobacterias cercanas a las raíces coraloides e identificar las características del cianobionte que lo hacen favorable para establecer simbiosis.
- (3) Caracterizar las bacterias que habitan en las raíces coraloides junto a los cianobiontes.
- (4) Identificar (si alguna) la función de las bacterias, dentro de las raíces coraloides.
- (5) Caracterizar las cianobacterias del suelo cercano a la *Zamia* y hacer un estudio de reconstitución para determinar si las cianobacterias aisladas del suelo pueden establecer simbiosis.
- (6) Identificar si la simbiosis mutualista entre los cianobiontes y las *Zamias* varía según el sexo de la planta y/o durante la temporada de reproducción.
- (7) Diseñar un método no destructivo para coleccionar raíces coraloides de la población *Zamia portoricensis* Urban. en el Bosque Seco de Guánica.

REFERENCIAS

Ahern, C.P. y I.A. Staff. 1994. Symbiosis and Cycads. The origin and development of coralloid roots in *Macrozamia communis* (Cycadaceae). *Am. J. Bot.* 81:1559-1570.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

Bergman, B. y Rai, A. 1989. The *Nostoc-Nephroma* symbiosis: Localization, distribution pattern and levels of key proteins involved in nitrogen and carbon metabolism of the cyanobiont. *Physiol. Plantarum.* 77: 216-224.

Bergman, B., Rai, A.N., Johansson, C., Söderback, E. 1992. Cyanobacterial-plant symbioses. *Symbiosis.* 14: 61-81.

Carpenter, E. y Foster, R. 2002. Marine cyanobacteria symbiosis. En ; A.N. Rai, B. Bergman, U. Rasmussen (eds.). *Cyanobacteria in symbiosis*, pp. 11-19. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.

Castenholz, R.W. y Waterbury, J.B. 1989. Oxygenic photosynthetic bacteria group I. Cyanobacteria. En: J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig y J.G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 1710-1728. Williams & Wilkins CO, Baltimore, U.S.A.

Castenholz, R.W. 2001. Phylum BX. Cyanobacteria: Oxygenic photosynthetic bacteria Cyanobacteria. En: J.T. Staley, M.P. Bryant, N. Pfennig y J.G. Holt (eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 473-583. Williams & Wilkins CO., Baltimore, U.S.A.

Cech, T.R. 1990. Self-splicing of group I intron. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 543-568.

Costa, J.L., Paulsrud, P., Lindblad, P. 1999. Cyanobiont diversity within coralloid roots of selected cycad species. *FEMS. Micro. Ecol.* 28: 85-91.

Costa, J. L. 2004. The tRNA (UAA) Intron of cyanobacteria. Towards understanding a genetic marker. Tesis PhD. Universidad Uppsala, Suecia. 50 pp.
<http://www.diva-portal.org/diva/getDocument?urn=nbn:se:uu:diva-4537-1fulltext.pdf>.

Flores, E. y Herrera, A. 1994. Assimilatory nitrogen metabolism and its regulation, En: D.A. Bryant (ed.). The molecular biology of cyanobacteria, pp 487-517. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Fitzsimons, A.G., y Smith, R.V. 1984. The isolation and growth of axenic culture of planktonic blue-green algae. Br. Phycol. J. 19:156-162

Garcia, F., Prufer, L. y Muyzer, G. 1996. Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. Appl. Environ. Microb. 62: 3284-3291.

Giovannoni, S. 1991. The polymerase chain reaction. En: E. Stackebrandt y M. Goodfellow (eds.). Nucleic acid techniques in bacterial systematics, pp. 178-203 John Wiley and Sons, Chichester, England.

Gupta, A., Morby, A.P., Turner, J.S., Whitton, B.A. y Robinson, N.J. 1993. Selection within the Metallothionein locus of a cadmium tolerant *Synechococcus* PCC6301 involving a highly iterated palindrome (Hip 1). Mol. Microbiol. 7: 189-195.

Golubic, S. 1999. Early cyanobacterial fossil record: Preservation, palaeo-environments and identification. Eur. J. Phycol. 34:339-348.

Jansen-Parker, D. L. 1997. J medium: Modification of Parker's J (or, Jansen) medium for *Microcystis*.

<http://www.bio.utexas.edu/research/utex/media/recipes/j.html>

Janson, S. 2002. Cyanobacteria in symbiosis with diatoms. En: Rai, A.N., Bergman, B., Rasmussen, U (eds.). Cyanobacteria in symbioses, pp. 1-10. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.

Jones, David. 1993. Cycads of the world. The New York Botanical Gardens Smithsonian Institution press. U.S.A., 312 pp.

Kumar, S., Tamura, K. y Nei, M. 2004. *MEGA 3.1* integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief. Bioinform. 5: 150-163.

<http://www.megasoftware.net/>

Lindblad, P., Bergman, B., Hofsten, A., Hallbom, L. y Nylund, J. 1985. The cyanobacterium-*Zamia* symbiosis: An ultrastructural study. New Phytol. 101:707-716.

Lindblad, P. y Costa, J.L. 2002. Cyanobacteria in symbiosis with cycads. En: Rai, A.N., Bergman, B., and Rasmussen, U (eds.). Cyanobacteria in Symbiosis, pp.195-205. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Lin, S., Henze, S., Lundgren, P., Bergman, B. y Carpenter, E. 1998. Whole-cell immunolocalization of nitrogenase in marine diazotrophic cyanobacteria *Trichodesmium* spp. Appl. Environ. Microb. 64: 3052-3058.

Mazel, D., Houmard, J., Castets, M., y Tandeau de Marsac, M. 1990. Highly repetitive DNA sequences in Cyanobacterial genomes. J. Bacteriol. 172: 2755-2761.

Medeiros, J. y Stevenson, D. 2000. The Cycad pages. <http://plantnet.rbgsyd.gov.au/PlantNet/cycad/nitrogen/nfixintro.html>

Meeks, J.C. y Elhai, J. 2002. Regulation of cellular differentiation in filamentous cyanobacteria in free living and plant-associated symbiotic growth states. Microbiol. Mol. Biol. R. March. 2002. 66(1): 94-121.

Millièneaux, P., Gallon, J., Chaplin, A. 1981. Acetylene reduction (nitrogen fixation) by cyanobacteria grown under alternating light dark cycles. FEMS. Micro. Lett. 10: 245-247.

Nathanielsz, C. y Staff, I. 1975. A mode of entry of blue-green algae into the apogeotropic roots of *Microzamia communis*. Am. J. Bot. 62: 232-235.

Nelissen, B., Baere, R., Willmotte, A. y Wachter, R. 1996. Phylogenetic relationships of nonaxenic filamentous cyanobacterial strains based on 16S rDNA sequence analysis. J. Mol. Evol. 42: 194-200.

Nübel, U., García, F. y Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rDNA genes from Cyanobacteria. Appl. Environ. Microb. : Aug. 63 (8) 3327-3332.

Obukowicz, M., Schaller, M. y Kenedy, G. 1981. Ultrastructure and phenolic histochemistry of the *Cyca revolute*-*Anabaena* symbiosis. *New. Phytol.* 87:751-760.

Ow, M., Gantar, M., Elhai, J. 1999. Reconstitution of Cycad-cyanobacterial association. *Symbiosis.* 27:125-134.

Paulsrud, P., Lindblad, P. 1998. Sequence variation of the tRNA^{Leu} intron as a marker for genetic diversity and specificity of symbiotic cyanobacteria in some Lichens. *Appl. Environ. Microb.* 64 (1): 310-315.

Peter, G.A., Meeks, J.C. 1989. The *Azolla*-*Anabaena* Symbiosis: Basic Biology *Annu. Rev. Plant. Phys. Mol. Biology.* 40: 193-210.

Rai, A., Borthakur, M., Singh, J y Bergman, B. 1989. Oxygenase in the cyanobiont and cultured (free-living) isolate *Nostoc* 7801. *J. Gen. Microbiol.* 135: 385-395.

Rai, A. 1990. Handbook of symbiotic cyanobacteria, CRC Press. Boca Raton, FL, U.S. A., 9-41 pp.

Rai, A., Söderback, E., Bergman, B. 2000. Cyanobacterium-plant symbioses. *New. Phytol.* 147: 449-481.

Rasmussen, U. y Nilsson, M. 2002. Cyanobacterial diversity and specificity in plant symbioses. A. Rai., B Bergman y U. Rasmussen (eds.). *Cyanobacteria in Symbiosis*, pp. 313-328. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.

Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J.B., Herdman, M. y Stanier, RY. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure culture of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111: 1-61.

Rippka, R. 1988. Recognition and identification of cyanobacteria. *Method. Enzymol* 167: 28-67.

Robinson, N.J., Robinson, P.J. Gupta, A., Bleasby, A.J. Whitton y Morby, A.P. 1995. Singular overrepresentation of an octameric palindrome, Hip 1, in DNA from many cyanobacteria. *Nucleic. Acids. Res.* 23: 729-735.

Rouhiainen, L., Sivonen, K., Buikema, W.J., Haselkorn, R. 1995. Characterization of toxin-producing cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer. *J. Bacteriol.* 177: 6021-6026.

Schopf J.W. 1993. Microfossil of the early Archean apex chert: new evidence of antiquity of life. *Science.* 260: 640-646.

Shopf, J.W. 2000. The fossil record: tracing the roots of the cyanobacterial lineage. En: Whitton BA, Potts M (eds.). *The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space*, pp.13-35. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.

Smith, J.K., Parry, J.D., Day, J.G. y Smith, R.J. 1998. A PCR technique based on the Hip 1 interspersed repetitive sequence distinguishes Cyanobacterial species and strains. *Microbiology.* 144: 2791-2801.

Stewart, W., Rowell, P., Rai, A. 1983. Cyanobacteria -eukaryotic plant symbioses. *Ann. Inst. Pasteur- Microbiologie.* 134B: 205-228.

Stevenson, D. W. 1987. Again the West Indian *Zamia*. *Fairchild Tropical Garden Bulletin.* July: 23-27.

Svenning, M., Erikson, T., Rassmussen, U. 2005. Phylogeny of symbiotic cyanobacteria within the genus *Nostoc* based on 16S rDNA sequence analyses. *Arch. Microbiol.* 183: 19-26.

Thompson, J.D., Higgins, D.G y Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.* 22: 4673-4680.

Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D., Lane, D. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173:697-703.

Weller, R., Walesh-weller, J. y Ward O.M. 1991. 16S RDNA sequences of un cultivated hot spring cyanobacterial mat inhabitants retrieved as randomly primed cDNA. *Appl. Environ. Microb.* 57: 1146-1151.

Willmote, A., Turner, J., Vand de Peer, Y. y Pace, N.R. 1992. Taxonomic study of marine oscillatoriacean strains (Cyanobacteria) with narrow trichomes II. Nucleotide sequence analysis of the 16S ribosomal RNA. *J. Phycol.* 28: 828-838.

Willmotte, A.. 1994. Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacterium. D.A. Bryant (ed.). The molecular biology of cyanobacteria, pp 1-25. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Willmotte, A. y Herdman, M. 2001. Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. En: Boone, D., Castenholz, R., Garrity, G (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, pp 487-514. Springer, Berlin Heidelberg, New York, U.S.A.

Wright, D., Prickett, T., Helm, R.F., Potts, M. 2001. Form species *Nostoc commune* (Cyanobacteria). Int. J. Syst. Evol. Micr. 51:1839-1852

Wu, X., Zarka, A. y Boussiba, S. 2000. A simplified protocol for preparing DNA from filamentous cyanobacteria. Plant. Mol. Biol. Rep. 18: 385-392.

Xu, M., Kahte, S., Goodrich, H., Blair, S., Nierzwicki, B. Y Shub, D. 1990. Bacterial origin of a chloroplast intron: consumed self-splicing group I intron in cyanobacteria. Science. 250: 1566-1570.

Zheng, W., Song, T., Bao, X., Bergman, B. y Rassmussen, U. 2002. High cyanobacterial diversity in coralloid roots of cycads revealed by PCR fingerprinting. FEMS. Microbiol. Ecol. 40: 215-222