

Programa de Estudios de Posgrado

**CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS
RIBOSOMALES 16s (ADNr) DE CIANOBACTERIAS
ASOCIADAS A EVENTOS DE TOXICIDAD**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Jesús Pérez Linares

La Paz, B.C.S. Mayo de 2003

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las **08:00** horas del día **30** del Mes de **Marzo** de 2003, se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., para revisar la Tesis de Grado titulada:

"Caracterización de las secuencias ribosomales 16s (ADNr) de cianobacterias asociadas a eventos de toxicidad "

Presentada por el alumno:

Jesús Pérez Linares

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecnología**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

DRA. NORMA Y. HERNÁNDEZ SAAVEDRA
DIRECTOR DE TESIS

DR. GOPAL MURUGAN
CO-TUTOR

M. en C. ROBERTO CORTES ALTAMIRANO
CO-TUTOR

DRA. THELMA ROSA CASTELLANOS CERVANTES,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESUMEN

La proliferación de cianobacterias en reservorios de agua es un fenómeno muy común que representa un peligro potencial para el medio, para los organismos que lo habitan e incluso para el humano, debido a que la mayoría de estos afloramientos son tóxicos. Se han utilizado muchas técnicas para la identificación oportuna de especies de cianobacterias tóxicas, sin embargo, la mayoría resultan costosas, prolongadas y poco confiables. El objetivo de este trabajo fue caracterizar parcialmente la subunidad ribosomal 16s (ADNr) de cianobacterias para determinar su utilidad en la discriminación de especies y cepas tóxicas, por medio de sus fragmentos variables. Se utilizaron cultivos de cianobacterias provenientes de cepas comerciales de la Universidad de Texas y de aislamientos silvestres de México, asociados a intoxicación y muerte de varios animales silvestres y cultivados, e incluso irritación en humanos. Se probaron varios métodos de disrupción celular y extracción de ADN genómico (ADNg). Para la obtención de los fragmentos de ADNr se utilizó el protocolo reportado por Nübel y colaboradores en 1997, en el cual se amplifica ADNg mediante PCR con iniciadores específicos para la subunidad 16s de cianobacterias. Se obtuvieron 19 secuencias, 11 de las cuales provenían de cepas comerciales y 8 de aislamientos silvestres. El análisis BLAST demostró porcentajes de homologías del 92 al 99% de las secuencias con las especies más cercanas, así como las proporciones de identidad y coincidencias, corroborando las especies de referencia (cepas de la UTEX) e identificando las especies silvestres. Mediante el paquete DNAMAN[®] se obtuvo la secuencia consenso, el alineamiento y un dendograma de homologías de todas las secuencias, donde se observan fragmentos variables y conservados, confirmando que existen segmentos útiles para la discriminación de géneros, especies e incluso cepas.

Mediante análisis de homología, las especies filamentosas se asociaron en 4 grupos diferentes, correspondientes a los géneros *Schizothrix*, *Anabaena*, *Nodularia* y *Geitlerinema*. La única especie unicelular (*Synechococcus*) se encontró aislada de los demás grupos, compartiendo un 86% de homología. El género *Schizothrix* no había sido reportado en el GenBank, por lo que las secuencias obtenidas son las primeras, debido a que se cuenta con 2 cepas de referencia de la UTEX y una cepa de origen silvestre, reportada como tóxica en la localidad de muestreo. Dentro del género *Anabaena* se identificaron 2 especies diferentes, *A. flos-aquae* y *A. variabilis*, reafirmando la utilidad de las herramientas moleculares para discriminar no sólo géneros, sino también especies de cianobacterias. Cabe mencionar que 3 cultivos de origen silvestre, asociados a eventos tóxicos (*A. Variabilis* CIBNOR 23, *Synechococcus sp* CIBNOR 42 y *Geitlerinema sp* CIBNOR 29) que no habían sido identificados correctamente con técnicas clásicas (microscopía y morfometría), presentaron diversos fragmentos variables al confrontarlas cada una con sus homólogas de referencia, por lo que se concluye que con esta técnica es posible identificar especies de una manera más confiable e incluso diferenciar cepas dentro de una misma especie. Finalmente se concluye que este trabajo marca la pauta para establecer planes de monitoreo de especies de cianobacterias tóxicas en reservorios de agua, de una manera más confiable y rápida con la posible creación en el futuro de sondas genéticas especie-específicas y mapas biogeográficos de dichas especies.

Palabras clave: cianobacterias, 16s, ADNr.

ABSTRACT

Cyanobacterial blooms in water reservoirs are a very common phenomenon and represent potential danger to the environment, many organisms, and even to human health because more than 50% of those blooms are toxic. There are many techniques for identifying toxic cyanobacteria. Most of them are expensive, time consuming, and frequently not reliable. The purpose of this study was the partial characterization of the ribosomal subunit 16S (rDNA) of cyanobacteria to prove its efficacy for identifying toxic genera and species of cyanobacteria with the variable fragments. Toxic strains of cyanobacteria obtained from the University of Texas (UTEX) and wild isolates from Mexico, associated with intoxication and death of some organisms and human diseases, were cultured until single alga cultures were obtained. Several methods that cause cell disruption and genomic DNA extraction (gDNA) were assayed. The protocol reported in Nübel *et al.* (1997) was followed to get the rDNA fragments, in which gDNA was amplified through the polymerase chain reaction (PCR) and specific cyanobacteria primers. The PCR products were purified using a commercial kit (Concert, GIBCO-BRL[®]) and sequenced at the Molecular Biology Laboratory at CIBNOR. Nineteen sequences were obtained, eleven from commercial strains (UTEX) and eight from wild specimens. BLAST analysis shows the homology percentage (92% to 99%) between the sequences with the closest species in the GenBank database, their identities proportion, and the number of matches, which corroborated the reference species (UTEX) and identified the wild ones. DNAMAN[®] software helped to get the consensus sequence and align all sequences, which showed the variable and conservative fragments, thereby confirming the hypothesis that there are several fractions on rDNA useful for identifying genera, species and even strains of cyanobacteria. The

filamentous species were grouped in 4 different placed on the homology tree, corresponding to the genera *Schizothrix*, *Anabaena*, *Nodularia*, and *Geitlerinema*. Unicellular species (*Synechococcus*) was located in a different group, sharing 86% of the homology with the other species. The genus *Schizothrix* had not been reported in the GenBank database. The sequences obtained here, are the first report. In this study, two reference strains (UTEX) and one wild strain were used. The last one is associated to disease and death in several aquatic species in the sampling locality. Two different species were identified within the genera *Anabaena* (*A. flos-aquae* and *A. variabilis*), confirming that this technique is suitable to discriminate between cyanobacteria species. Three wild strains (CIBNOR 23A, *A. variabilis*, CIBNOR 42, *Synechococcus sp.* and CIBNOR 29A, *Geitlerinema sp.*), associated with toxic events and incorrectly identified by classic techniques (microscopy and morphometry), showed several variable fragments when compared with the respective homologues in the GenBank database and reference strains. This technique is useful for reliable identification on strains of the same species. Finally, this study proposes novel techniques in monitoring programs for the opportune, faster, and more reliable identification of toxic cyanobacteria in water reservoirs and the chance to eventually design species-specific genetic probes and biogeographic maps.

Key words: cyanobacteria, 16s, rDNA.

Dra. Norma Y. Hernández Saavedra

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo estuvo financiado por el Proyecto RP-1 (CIBNOR), cuya responsable es la Dra. Norma Y. Hernández Saavedra; por el CONACYT, mediante la beca otorgada para la realización de la Maestría (No. de registro 158418) y por el Programa de Posgrado del CIBNOR.

Agradezco al Dr. Murugan Gopal (COBNOR) y al M. en C. Roberto Cortés Altamirano (ICMyL, UNAM) por su valiosa colaboración, revisiones y asesorías en el desarrollo de la tesis.

Especialmente agradezco a la Dra. Norma Hernández Saavedra y a Arturo Sierra Beltrán por todo el apoyo que me brindaron a lo largo de mi maestría, por su amistad, confianza y paciencia. Por todo lo que me enseñaron con la convivencia diaria durante estos años, no sólo en el ámbito profesional si no también en el personal. ¡Muchas Gracias!

Finalmente extiendo el agradecimiento a mis compañeros y amigos de los Laboratorios de Genética Molecular (L4), de Biología Molecular y de la Unidad de Patología Marina por facilitarme material, equipo, reactivos e instalaciones, además de toda su ayuda, asesorías y complicidad.

¡Gracias a todos!

jpl-MMIII

CONTENIDO

Acta de Revisión de Tesis	i
Resumen	ii
Abstract	iv
Agradecimientos	vi
Contenido	vii
Lista de Tablas	x
Lista de Figuras	xi
1. Introducción	1
1.1 Generalidades	1
1.2 Taxonomía	1
1.3 Ecología, fisiología y reproducción	3
1.4 Proliferaciones dañinas (HAB's)	4
1.5 Cianotoxinas	6
1.6 Estrategias de mitigación	9
1.7 Detección de toxinas y técnicas analíticas	10
1.7.1 Bioensayos en ratón, crustáceos y células	10
1.7.2 Análisis enzimáticos y técnicas inmunológicas	11
1.7.3 Análisis cromatográficos y espectrometría de masas	12
1.8 Técnicas de identificación y detección de especies tóxicas	13
2. Antecedentes	14
3. Justificación	18

4. Hipótesis	19
5. Objetivo General	20
5.1 Objetivos específicos	20
6. Materiales y Métodos	21
6.1 Organismos utilizados	21
6.2 Técnicas de cultivo	21
6.3 Bacterias	22
6.4 Lisis y extracción de ADN genómico	24
6.5 Amplificación por PCR	24
6.6 Purificación de productos de PCR para secuenciación	26
6.7 Secuenciación	26
6.8 Análisis de secuencias	27
7. Resultados	27
7.1 Cultivos	27
7.2 Bacterias	28
7.3 Extracción de ADN genómico	29
7.3.1 Extracción de ADN genómico de cianobacterias	29
7.3.2 Extracción de ADN genómico de bacterias	31
7.4 Amplificación por PCR	32
7.4.1 Amplificación de ADN de cianobacterias	32
7.4.2 Amplificación de ADN de bacterias	33
7.5 Secuenciación	33
7.6 Análisis de las secuencias	35

8. Discusión	38
9. Conclusiones	49
10. Literatura Citada	50
Apéndice I. Secuencias finales obtenidas para cada uno de las especies caracterizadas	63
Apéndice II. Alineamiento de las 19 secuencias obtenidas de las especies de cianobacterias estudiadas	73

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Clasificación del Phylum Cyanobacteria (División Cyanophyta)	3
Tabla II. Eventos tóxicos más sobresalientes en todo el mundo relacionados con proliferaciones de cianobacterias	17
Tabla III. Cultivos de cianobacterias del Laboratorio de Genética Molecular, CIBNOR	23
Tabla IV. Características generales de los primers específicos para cianobacterias	25
Tabla V. Programa utilizado para la amplificación de fragmentos de ADNr de cianobacterias mediante PCR	25
Tabla VI. Cultivos monoalgales de cianobacterias del Laboratorio de Genética Molecular, CIBNOR, utilizados para la amplificación del 16s ADNr	30
Tabla VII. Resultados del análisis de homología BLAST de las secuencias de nucleótidos obtenidas de las especies consideradas en este estudio	34
Tabla VIII. Algunos ejemplos de sitios en las secuencias de la subunidad ribosomal 16s (ADNr) de cianobacterias tóxicas donde se encuentran fragmentos variables que distinguen a los 5 géneros estudiados	35
Tabla IX. Algunos ejemplos de sitios en las secuencias de la subunidad ribosomal 16s (ADNr) de las especies <i>Anabaena variabilis</i> y <i>Geitlerinema sp</i> donde se encuentran fragmentos variables que pueden ayudar a la discriminación de cepas, dentro de una misma especie	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proliferación de cianobacterias tóxicas (HAB's)	5
Figura 2. Estructura química de algunas cianotoxinas	8
Figura 3. Micrografías (40X) de algunos de los cultivos monoalgales de cianobacterias del Laboratorio de Genética Molecular, CIBNOR	28
Figura 4. Gel agarosa-TBE al 0.8% mostrando bandas de ADN genómico de cianobacterias	30
Figura 5. Gel agarosa-TBE al 0.8% donde se observan algunas muestras de ADNg parcialmente degradado	31
Figura 6. Gel agarosa-TBE al 0.8% mostrando bandas de ADN genómico de bacterias asociadas a los cultivos de cianobacterias	31
Figura 7. Geles de agarosa-TBE al 1% para observar el rendimiento y calidad de los amplicones obtenidos mediante PCR	32
Figura 8. Gel de agarosa-TBE al 1% donde se confirma que los oligos diseñados para amplificar ADN de cianobacterias no amplifican ADN de bacterias	33
Figura 9. Árbol de homologías entre las 19 especies de cianobacterias cultivadas en el Laboratorio de Genética Molecular, CIBNOR	37

1. Introducción

1.1 Generalidades

Las cianobacterias conforman un grupo muy heterogéneo de organismos fotosintéticos procariontes, que incluyen especies autótrofas, heterótrofas facultativas, unicelulares, coloniales, filamentosas, terrestres, acuáticas, planctónicas, bentónicas, halotolerantes y termofilicas (Rheineimer, 1980; Dawes, 1981; Whitton y Potts, 2000). Además de sintetizar clorofila *a*, las cianobacterias producen el fotopigmento ficocianina (que les confiere su peculiar color), por lo que también son denominadas algas verde-azules (Whitton y Potts, 2000). Dado que la única limitante para el crecimiento de las cianobacterias es la humedad, pueden habitar tanto en ambientes terrestres y acuáticos, así como en ambientes extremos hipersalinos, ventanas hidrotermales, geisers, hielo y aunque su abundancia y diversidad es mayor en medios alcalinos, se han encontrado especies en lugares con un pH de 4.0 (Dawes, 1981; Whitton y Potts, 2000).

El grupo surgió en la Era Proterozóica (2500-579 Ma), hace aproximadamente 2500 Ma; este período es conocido por muchos geólogos y geoquímicos como la “Era de las Cianobacterias” teniendo en cuenta que son los organismos más abundantes en el registro fósil (Whitton y Potts, 2000). Las estructuras conocidas como “Estromatolitos” datan de esa Era y fueron formadas por especies de cianobacterias filamentosas que persisten aún hasta nuestros días (Dawes, 1981; Whitton y Potts, 2000).

1.2 Taxonomía

A lo largo de los años se han suscitado muchas controversias relacionadas con la correcta clasificación de las cianobacterias. Desde principios del siglo XIX, cuando se empezó a desarrollar el Sistema Taxonómico, las cianobacterias fueron consideradas parte de la “flora” u organismos “vegetales”, clasificándolas principalmente por sus características

morfológicas, logrando así crear manuales muy completos y detallados que incluyen cerca de 2000 especies diferentes (Dawes, 1981; Whitton y Potts, 2000). En la década de los 70's el grupo de R.Y. Stanier propuso clasificarlas bajo el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (CINB), que además de la morfología considera características bioquímicas y de estructura celular (Stanier *et al*, 1978). A pesar de los esfuerzos hechos para unificar criterios, aún en nuestros días existen discrepancias entre botánicos, bacteriólogos y ecólogos (Dawes, 1981; Whitton y Potts, 2000). Existen sinonimias, omisión de géneros y dudas en algunas especies, dependiendo de la clave taxonómica que se consulte. En la Tabla I se presenta un resumen de los órdenes, familias y algunos géneros del phylum Cyanobacteria (incluidos en el presente estudio), de acuerdo a la clasificación presentada por el National Center of Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>), a excepción del Género *Schizothrix*, que se tomó de Premazzi y Volterra (1993), Skulberg *et al.* (1993) y Carpenter y Carmichael (1995). Estos autores incluyen a *Schizothrix* dentro del orden Nostocales, en la familia Oscillatorieacea, mientras que la clasificación de la NCBI considera a la familia Oscillatoreacea como un orden aparte y éste género no está incluido. Cabe mencionar que a pesar de la pugna de los bacteriólogos por separar a las cianobacterias del Reino Plantae y colocarlas en el Reino Monera, el método de identificación y clasificación de los botánicos sigue siendo importante y muy utilizado para muestras en campo o de origen silvestre, debido a que muchos criterios utilizados el CINB requieren del cultivo de las especies, y las cianobacterias son difíciles de cultivar, además de que pueden cambiar algunas de sus características morfométricas si se logran mantener en laboratorio (Dawes, 1981; Whitton y Potts, 2000).

Tabla I. Clasificación del Phylum Cyanobacteria (División Cyanophyta).

Orden/Familia	Género	Orden/Familia	Género	
Chroococcales	<i>Aphanocapsa</i>	Oscillatoriales	<i>Schizothrix</i> *	
	<i>Aphanotece</i>		<i>Geitlerinema</i>	
	<i>Chamaesiphon</i>		<i>Oscillatoria</i>	
	<i>Chroococcus</i>		<i>Planktothrix</i>	
	<i>Cyanobacterium</i>		<i>Pseudoanabaena</i>	
	<i>Cyanobium</i>		<i>Spirulina</i>	
	<i>Cyanothece</i>		Pleurocapsales	<i>Chroococidiopsis</i>
	<i>Dactylococcopsis</i>			<i>Dermocapsa</i>
	<i>Gloeobacter</i>			Prochlorophytes
	<i>Gloeocapsa</i>			
	<i>Gloeothece</i>		Prochloraceae	
	<i>Halothece</i>		Prochlorococcaceae	
	<i>Merispormedia</i>		Prochlorothrichaceae	
	<i>Microcystis</i>		Stigonematales	
<i>Synechococcus</i>	<i>Fischerella</i>			
<i>Synechocystis</i>	<i>Hapalosiphon</i>			
<i>Thermosynechococcus</i>	<i>Mastigocladus</i>			
Nostocales			<i>Umezakia</i>	
Microchaetaceae				
Nostocaceae	<i>Anabaena</i>			
	<i>Nodularia</i>			
	<i>Nostoc</i>			
Rivulariaceae	<i>Calothrix</i>			
	<i>Gloeotrichia</i>			
Scytonemataceae	<i>Scytonema</i>			

Tomado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

* Tomado de Premazzi y Volterra, 1993; Skulberg *et al.*, 1993; Carpenter y Carmichael, 1995
 Ordenes en negritas

1.3 Ecología, fisiología y reproducción

Por ser un grupo ubicuo y cosmopolita, las cianobacterias presentan una gran variedad de roles ecológicos que van desde la producción de O₂ y transformación de energía en material orgánico por la fotosíntesis (y por lo tanto la conformación del primer nivel de la cadena trófica), hasta roles específicos clave en ambientes muy variados como la fijación de nitrógeno, simbiosis con hongos, plantas y animales, formación de sedimentos y microhábitats, enriquecimiento de suelos, formación de crecimientos masivos o “blooms”,

que pueden ser tóxicos, inhibitorios o producir alteraciones nocivas en el ambiente (Prescott, 1968; Rheinheimer, 1980; Dawes, 1981).

Uno de los aspectos fisiológicos más interesantes de algunas especies de cianobacterias, es la habilidad para fijar nitrógeno atmosférico, ya que además de las bacterias, no existe otro grupo con esta capacidad (Dawes, 1981; Whitton y Potts, 2000); lo anterior es especialmente importante en cianobacterias terrestres, ya que incrementan la producción de plantas y enriquecen los suelos. La función de fijación de nitrógeno se lleva a cabo en células especializadas llamadas heterocistos, las cuales se distinguen de las demás por poseer una pared celular gruesa y nódulos protéicos (cianoficina) que las conectan con las células adyacentes. Este evento puede llevarse a cabo en medios oxigenados, sin embargo, se desarrolla mas ampliamente en ambientes micro-oxigénicos, confiriendo a las cianobacterias ventajas para colonizar y sobrevivir en ambientes donde para muchos organismos es imposible (Prescott, 1968; Dawes, 1981; Whitton y Potts, 2000).

La reproducción de las cianobacterias puede suceder de varias maneras, ya sea por simple fragmentación (derivado de un filamento o separación de una colonia), por división celular (fisión binaria), intercalar o apical (en el caso de los filamentos), o por la producción de células especializadas (endosporas, exosporas, acinetos). En este último caso, las esporas pueden formar “quistes” muy resistentes que permiten la sobrevivencia de las cianobacterias a pesar de cambios repentinos en el medio o en ambientes hostiles (Prescott, 1968; Dawes, 1981; Whitton y Potts, 2000).

1.4 Proliferaciones Dañinas (HAB's)

Las proliferaciones dañinas (también llamadas HAB's por sus siglas en inglés: Harmful Algal Blooms) son poblaciones densas de microalgas (Figura 1) que pueden estar

conformadas por una sola especie o una mezcla de varias (Figura 1A). Algunas veces las especies son capaces de producir sustancias tóxicas y provocar intoxicaciones severas o muerte. Sin embargo, aunque las especies formadoras del blooms no produzcan toxinas, la mayoría de las veces provocan daños indirectos en el medio y en los organismos que lo habitan, ya sea por la biomasa o por características inherentes a su morfología (estructuras ornamentales de diatomeas y dinoflagelados, capas gruesas de filamentos o mucílago de cianobacterias, Figuras 1B y 1C), por lo que en los últimos años el interés científico en estos eventos se ha incrementado alrededor del mundo.



Figura 1. Proliferación de cianobacterias tóxicas (HAB's). **A)** micrografía de un bloom de *Microcystis*, *Anabaena* y *Synechococcus* en Tlahuac, México (aumento 400 veces); **B)** crecimiento de *Anabaenopsis* en el Lago Bedetti, Santa Fe, Argentina; **C)** crecimiento de cianobacterias en un estanque de agua potable en Dundee, Escocia. Foto de W.W. Carmichael, Wright State University (**B** y **C** tomadas de <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu>).

La proliferación de cianobacterias en cuerpos de agua naturales y artificiales, generalmente eutrofizados, es un fenómeno común (Rouhiainen *et al.*, 1995; Willame y Hoffmann, 1999) y representa un peligro potencial para organismos silvestres, domésticos, cultivados e incluso para el humano (Carmichael y Falconer, 1993; Carmichael, 1995; Hallegraef *et al.*, 1995; Rouhiainen *et al.*, 1995; Codd, 1998; Rudi *et al.*, 1998; Druvietis y Rodinov, 2001), debido a que más del 50% de estas proliferaciones son tóxicas (Whitten y Potts, 2000;

Roset *et al.*, 2001). Aunado a lo anterior, puede mencionarse que muchas de las proliferaciones de cianobacterias no tóxicas producen un impacto significativo en los ambientes acuáticos, especialmente de agua dulce, debido a que afectan la calidad del agua (olor, sabor y apariencia) y, en muchas ocasiones, producen daños en los organismos (moluscos, crustáceos y peces) al adherirse a sus branquias impidiendo el intercambio de O₂ (Whitten y Potts, 2000).

1.5 Cianotoxinas

Muchas especies de cianobacterias producen toxinas muy potentes tales como las hepatotoxinas, neurotoxinas y citotoxinas (Carmichael y Falconer, 1993; Carmichael, 1995; Hallegraef *et al.*, 1995; Rouhiainen *et al.*, 1995; Codd, 1998; Rudi *et al.*, 1998; Roset *et al.*, 2001). En la mayoría de los casos las toxinas de cianobacterias son metabolitos secundarios relacionados con la formación de fotopigmentos, crecimiento, reproducción o metabolismo básico, los cuales se van acumulando en el citoplasma, por lo que la cantidad de toxina producida es directamente proporcional a la biomasa (Carmichael, 1995; Neilan *et al.*, 2000; Robillot *et al.*, 2000). Cuando las condiciones ambientales son desfavorables las cianobacterias mueren, razón por la cual se puede producir lisis celular y por lo tanto liberar las toxinas al medio (Roset *et al.*, 2001). De este modo, el peligro potencial de intoxicación se prolonga más allá de la duración del bloom.

Las cianotoxinas, por su naturaleza tan heterogénea, pueden tener un efecto inmediato en muchos organismos bajo exposiciones agudas, desde irritación de la piel hasta alteraciones a nivel neuromuscular, bloqueo de los canales de sodio e inhibición enzimática y de síntesis protéica (Anderson *et al.*, 1993; Gosh *et al.*, 1995; MacKintosh *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1996; Kotak *et al.*, 1996; Zambrano *et al.*, 1996; Roset *et al.*, 2001). Adicionalmente se han

reportado anomalías por exposición crónica, tal como daños a nivel gastrointestinal, inmunosupresión y promoción de tumores (Gosh *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1996; Bury *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 1998; Landsberg, 1996; Landsberg y Shumway, 1998; Pérez-Linares, 2001; Pérez-Linares *et al.*, 2003). Las cianotoxinas más importantes por el tiempo de acción, por los daños que causan y por su toxicidad son las hepatotoxinas *microcistina* y *nodularina*, y las neurotoxinas *anatoxina* y *saxitoxina*.

Las hepatotoxinas son péptidos cíclicos (Figura 2A y 2B) que dañan la composición celular del hígado provocando hemorragias internas severas, además de deterioro en el sistema gastrointestinal (Carmichael, 1995; Gosh *et al.*, 1995; MacKintosh *et al.*, 1995; Khan *et al.*, 1996; Pérez-Linares *et al.*, 2003), llegando a producir tumores bajo exposición crónica (Fernández *et al.*, 1998; Landsberg, 1996). Los géneros que han sido reportados como productores de hepatotoxinas son: *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Cilindrospermopsis*, *Oscillatoria* y *Aphanizomenon* (Carmichael, 1995; Whitton y Potts, 2000; Roset *et al.*, 2001). Por otro lado, las anatoxinas son químicamente aminas secundarias, análogas a la cocaína y a la acetilcolina (Figura 2C). La acetilcolina es degradada por la enzima acetilcolinesterasa para evitar una sobre estimulación, sin embargo, como esta enzima no puede degradar las neurotoxinas, éstas bloquean la transmisión post-sináptica, provocando fatiga, parálisis, convulsiones y paro respiratorio (Carmichael, 1995; Whitton y Potts, 2000). Los géneros que producen neurotoxinas son: *Anabaena*, *Aphanizomenon* y *Oscillatoria* (Carmichael, 1995; Whitton y Potts, 2000; Roset *et al.*, 2001). El otro grupo de neurotoxinas producidas por las cianobacterias es el de las saxitoxinas (Figura 2D), también llamadas PSP (de sus siglas en inglés Paralytic Shellfish Poisons), y son una familia de alcaloides de la que se han descrito más de 19 análogos. Estas toxinas tienen la

capacidad de bloquear específicamente el canal de sodio en las membranas celulares, dando como resultado la despolarización de las células y, por consiguiente, impidiendo la transmisión del impulso nervioso. Entre los géneros productores de saxitoxina están *Anabaena* y *Lyngbya* (Carmichael, 2001; Legrand *et al.*, 2001).

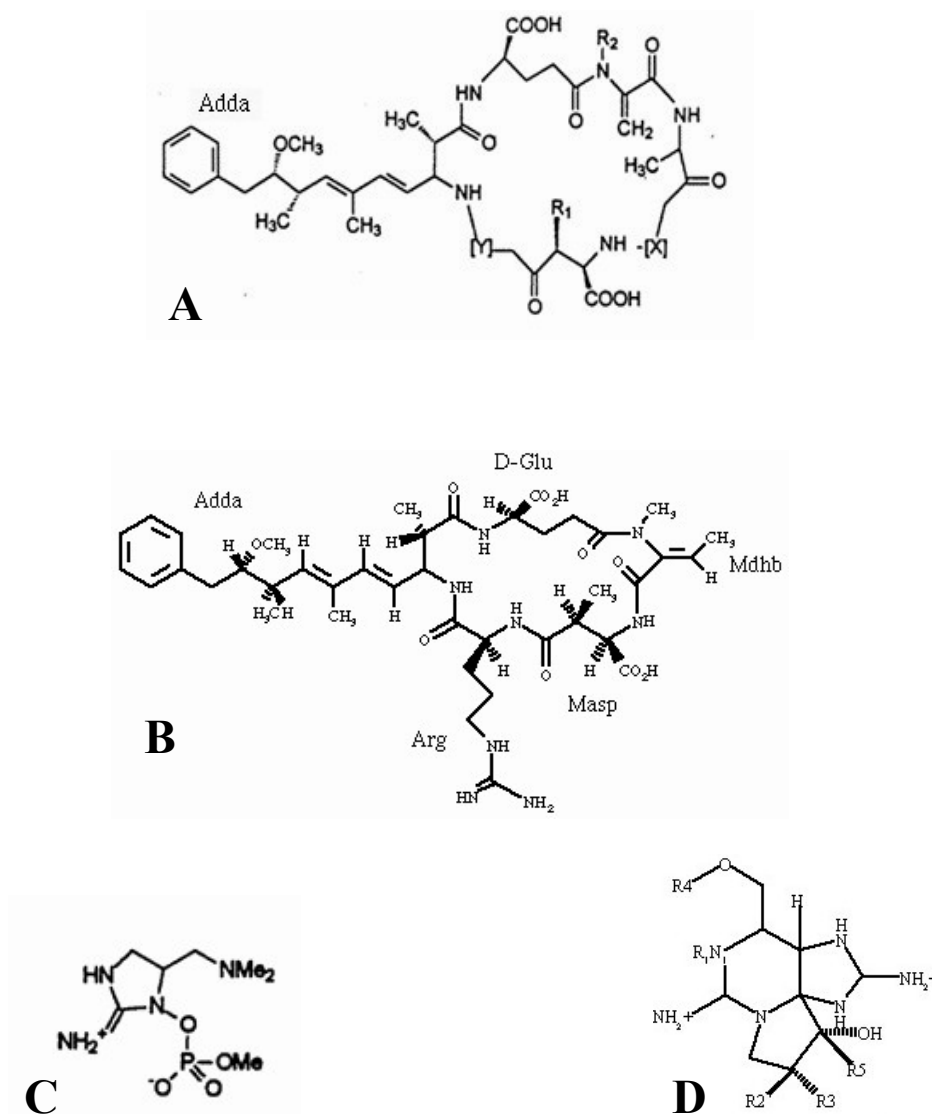


Figura 2. Estructura química de algunas cianotoxinas. **A)** la microcistina es un heptapéptido cíclico en donde X y Y representan el aminoácido L variable en las posiciones 2 y 4 de la molécula; **B)** la nodularina es un pentapéptido cíclico. En ambas hepatotoxinas el Adda es el componente clave para la toxicidad; **C)** la anatoxina- α es un amina alcalina secundaria análoga a la acetilcolina; **D)** la saxitoxina es un alcaloide conocido también como PSP (de sus siglas en inglés Paralytic Shellfish Poisons).

Existen otros tipos de cianotoxinas llamadas citotoxinas, las cuales no son altamente letales pero pueden causar daños significativos en la integridad celular, en la piel, en el sistema respiratorio y en los ojos (Lightner *et al.*, 1978; Carmichael, 1995; Cortés-Altamirano y Licea-Durán, 1999; Whitton y Potts, 2000). Entre los géneros que producen citotoxinas están: *Lyngbya*, *Schizothrix* y *Scytonema* (Nagle y Paul, 1999; Whitton y Potts, 2000).

1.6 Estrategias de mitigación

En los últimos años las proliferaciones de cianobacterias se han observado con más frecuencia, y algunos investigadores sugieren que este hecho está relacionado con fenómenos climáticos como el calentamiento global, ENSO (El Niño/Southern Oscillation), estacionalidades, etc., que proporcionan los factores ideales para su crecimiento (temperatura, pH, nutrimentos, luminosidad, etc.), o bien debido a impactos antropogénicos como transporte de especies por redes, barcos o desarrollos urbanos que cambian la geografía original del paisaje, exceso de desagüe causando un incremento de desechos orgánicos, o una combinación de ambos (Hallegraeff, 1993; Williams *et al.*, 1997a; Landsberg y Shumway, 1998; Druvietis y Rodinov, 2001; Garnett *et al.*, 2000; Jones, 2000; Pereira *et al.*, 2001). Para mitigar y/o evitar el crecimiento de cianobacterias e intoxicaciones por cianotoxinas se han diseñado muchas estrategias (tratamientos químicos como cloro y ozono, cuarentenas, desecación, filtros, aireación, empaquetamiento al vacío, exposición a rayos U.V., etc.), sin embargo, las cianobacterias pueden resistir estos tratamientos en forma de quistes o tapetes gruesos.

Además, algunos de estos tratamientos resultan muy costosos al ser aplicados indiscriminadamente, otros requieren de largos períodos de tiempo o bien afectan las características organolépticas del agua o de los organismos para consumo humano, por lo

que resultan ineficaces y poco rentables (Falconer, 1993; Hallegraeff *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1997a; Amorim y Vasconcelos, 1999; Jones, 2000).

1.7 Detección de toxinas y técnicas analíticas

Es imposible determinar cuando un bloom de cianobacterias es tóxico solo por su apariencia (Whitton y Potts, 2000), y aún identificando las especies no se puede tener la certeza de su toxicidad debido a que hay cepas, dentro de una misma especie, que no son tóxicas (Rouhiainen *et al.*, 1995; Nübel *et al.*, 1997; Fergusson *et al.*, 2001; Roset *et al.*, 2001). Por lo anterior se han diseñado varios métodos para diagnosticar la presencia de toxinas en los blooms, el tipo de toxinas, su tiempo de acción, los daños que puede causar y la dosis letal. Uno de los primeros métodos implementados fue la correlación con la concentración de Clorofila *a* por medio de espectrofotometría y el recuento microscópico (Roset *et al.*, 2001), ya que son fáciles y rápidos, sin embargo, no precisan la naturaleza tóxica del bloom (Quilliam *et al.*, 2001).

1.7.1 Bioensayos en ratón, crustáceos y células

A la fecha el bioensayo en ratón es el método estándar para establecer la dosis letal (LD₅₀), síntomas y efectos de florecimientos algales en cuerpos de agua (Premazzi y Volterra, 1993; Ramírez, 1998; Whitton y Potts, 2000). En ésta técnica normalmente se utilizan ratones albinos machos, a los cuales intraperitonealmente se le inyectan dosis de 0.1-1 mL de la solución de ensayo, la cual se prepara con agua o solución fisiológica partiendo de un lisado de las células problema o un extracto de la muestra. Los organismos se mantienen en vigilancia, tomando el tiempo que tardan en presentar un comportamiento anormal como convulsiones, ptialismo, disnea, diarrea, aletargamiento, etc., hasta su muerte, en caso de suceder. La dosis utilizada en la que mueren la mitad de los organismos bajo estudio se le

conoce como Dosis Letal 50 (LD₅₀) y en algunos casos ocurre de 10-15 minutos después de haber inyectado a los ratones (Ramírez, 1998; Whitton y Potts, 2000; Roset *et al.*, 2001). Generalmente se realizan necropsias para observar daños evidentes en órganos blanco como el hígado, intestinos, cerebro, riñón, bazo y pulmones. Adicionalmente se pueden realizar estudios de acumulación de las toxinas en el organismo, y generalmente se utilizan el hígado, el riñón y los intestinos (Ramírez, 1998; Saker y Eaglesham, 1999; Roset *et al.*, 2001). Por otra parte, también se han montado ensayos con *Artemia*, *Daphnia* y otros organismos del zooplancton (Smith, 1996; Williams *et al.*, 1997b), sometiéndolos a exposiciones directas con diferentes diluciones de la muestra y, aunque son rápidos y más baratos, han mostrado ser menos confiables debido a que no es posible detectar el órgano blanco y en algunas ocasiones los daños causados (Whitton y Potts, 2000; Roset *et al.*, 2001). Los ensayos en hepatocitos de rata y fibroblastos han presentado una buena correlación con el bioensayo en ratón, sin embargo, pueden resultar en falsos positivos o falsos negativos, lo cual enmascara los verdaderos resultados (Khan *et al.*, 1996; Roset *et al.*, 2001). A través de los métodos mencionados anteriormente se puede conocer la naturaleza tóxica de la muestra, sin embargo, no es posible discriminar entre los diferentes tipos de toxinas considerando únicamente los signos y daños causados, con excepción de los métodos que utilizan cultivos de células que, de manera gruesa, pueden discriminar entre algunas de las toxinas.

1.7.2 Análisis enzimáticos y técnicas inmunológicas

La utilización de técnicas enzimáticas ha permitido demostrar los efectos tóxicos de las hepatotoxinas, debido a que inhiben específicamente la actividad de las protein-fosfatasas 1 y 2A. Aunque en años recientes estas técnicas han sido mejoradas con procedimientos

colorimétricos y marcaje radiactivo (la sensibilidad es muy grande, detectan nanogramos de toxina), su uso no se ha generalizado debido a que solo pueden aplicarse al grupo de toxinas que inhiben las enzimas y, por otro lado, no discriminan entre los distintos tipos de cianotoxinas (Gosh *et al.*, 1995; MacKintosh *et al.*, 1995; Robillot *et al.*, 2000; Roset *et al.*, 2001; Quilliam *et al.*, 2001). El efecto de las anatoxinas en la enzima acetilcolinesterasa ya ha sido mencionado con anterioridad, y esto ha permitido el desarrollo de métodos con bases similares a las descritas para las hepatotoxinas (Whitton y Potts, 2000).

Finalmente, con el desarrollo de los inmunoensayos (ELISA), los anticuerpos (monoclonales y/o policlonales) contra algunas cianotoxinas, han proporcionado ensayos sensibles y exitosos para la identificación de nodularinas y microcistinas (LR, RR, YR); estos anticuerpos no han mostrado tener reacciones cruzadas con extractos de péptidos tóxicos de otras cianobacterias (Whitton y Potts, 2000; Roset *et al.*, 2001).

1.7.3 Análisis cromatográficos y espectrometría de masas

La cromatografía ha sido utilizada para aislar, caracterizar y cuantificar toxinas. Inicialmente la cromatografía en capa fina se utilizó para purificar hepatotoxinas, sin embargo, carece de sensibilidad y especificidad (Nagle y Paul, 1999; Whitton y Potts, 2000). Actualmente, uno de los procedimientos más sensibles para la identificación de toxinas es la cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (Pereira *et al.*, 2001; Whitton y Potts, 2000; Roset *et al.*, 2001), que consiste básicamente en una bomba de flujo, un sistema de inyección, una columna de cromatografía (con una matriz), el sistema de detección (UV o fluorescencia) y un programa que permite el análisis de los resultados. Este sistema ha proporcionado mejores resultados mediante la integración de detectores de espectro de masas y de espectro de masas por aspersion y bombardeo de iones (Ochoa y

Sierra, 1998; Quilliam *et al.*, 2001), lo que ha permitido el desarrollo de análisis más rápidos, fáciles y sensibles, para corroborar de manera indirecta la presencia de cianobacterias en la biomasa, mediante la determinación de sus toxinas (Robillot *et al.*, 2000; Whitton y Potts, 2000; Li *et al.*, 2001; Quilliam *et al.*, 2001).

1.8 Técnicas de identificación y detección de especies tóxicas

Continuamente se han tratado de identificar las especies de cianobacterias tóxicas de manera oportuna y así evitar crecimientos exagerados. Sin embargo, las técnicas clásicas comúnmente utilizadas, tienen serias limitantes debido a que se basan principalmente en características morfométricas (como ramificaciones y tamaño de tricomas, tamaño y forma de células, presencia, forma y tamaño de heterocistos y/o acinetos, etc.) que pueden variar dependiendo de muchos factores del medio como son la luz, temperatura, pH, salinidad, nutrientes, oxígeno disuelto, etc (Pomati *et al.*, 2000; García-Pichel *et al.*, 2001).

Por otro lado, la mayoría de las especies de cianobacterias son difíciles o virtualmente imposibles de crecer en el laboratorio, por lo que se estima que menos del 5% de las especies de cianobacterias están actualmente disponibles (González-Gil *et al.*, 1999), lo que es fundamental para realizar pruebas de toxicidad (Rouhiainen *et al.*, 1995; Barker *et al.*, 2000). Algunas veces se han reportado cambios significativos en las especies que se han cultivado bajo condiciones inadecuadas o durante ciertos estadios de desarrollo, y consisten básicamente en modificaciones en algunas características morfológicas importantes para su identificación (Nübel *et al.*, 1997; González-Gil *et al.*, 1999; Whitton y Potts, 2000). Por ejemplo, las especies formadoras de heterocistos deben cultivarse en medios con niveles bajos o ausentes de nitrógeno, y algunas otras especies que desarrollan ramificaciones falsas o pelos multicelulares requieren de niveles de fósforo considerablemente más altos

que los que se registran en campo (Whitton y Potts, 2000). Adicionalmente, las técnicas clásicas no permiten diferenciar cepas tóxicas de las que no lo son (Rouhiainen *et al.*, 1995; Nübel *et al.*, 1997; Fergusson *et al.*, 2001; Roset *et al.*, 2001).

Recientemente se han diseñado métodos reproducibles y más confiables para el monitoreo de cianobacterias en cuerpos de agua (basados en herramientas moleculares como la caracterización de ácidos nucleicos, hibridación, PCR, secuenciación, etc.) para la identificación de especies e incluso de cepas tóxicas, proporcionando resultados más precisos y específicos (Neilan *et al.*, 1994; Rouhiainen *et al.*, 1995; Medlin, 1997; Nübel *et al.*, 1997; Rudi *et al.*, 1998; Pomati *et al.*, 2000; Whitton y Potts, 2000; Roset *et al.*, 2001).

2. Antecedentes

En las últimas dos décadas se han reportado en muchos países, intoxicaciones y muerte de organismos de importancia comercial (moluscos, crustáceos, peces, ganado), relacionados con proliferaciones de cianobacterias. Algunos de estos reportes incluyen problemas asociados a la salud pública y pérdidas humanas (Lightner *et al.*, 1978; Lightner, 1983; Lambert *et al.*, 1994; Karunasagar *et al.*, 1997; Codd, 1998; Lirås *et al.*, 1998; Cortés-Altamirano y Licea-Durán, 1999; Saker y Eaglesham, 1999; Willame y Hoffmann, 1999; Li *et al.*, 2001).

En México no existen muchos reportes donde se vinculen problemas directos con proliferaciones de cianobacterias (ver Tabla II). Sin embargo, en los últimos años se ha puesto mayor atención a este hecho, asociando anomalías reproductivas y fisiológicas, intoxicación y muerte de camarones cultivados (Cortés-Altamirano *et al.*, 1997; Cortés-Altamirano y Licea-Durán, 1999; Pérez-Linares, 2001; Pérez-Linares *et al.*, 2003; Alonso-

Rodríguez y Páez-Osuna, 2003), intoxicación y muerte de aves (Sierra-Beltrán *et al.*, 2000) e incluso irritación de vías respiratorias y piel de personas que estuvieron en contacto con el bloom o con organismos expuestos a la proliferación de cianobacterias (Cortés-Altamirano y Licea-Durán, 1999; Alonso-Rodríguez y Páez-Osuna, 2003). Cabe mencionar que el esfuerzo realizado por López-Cortés y colaboradores (1990 y 1999) ha permitido conocer la sucesión de especies, crecimiento, identificación y existencia de géneros potencialmente dañinos en estanques de cultivo de camarón y en sedimentos intermareales en Baja California Sur, además de estudios morfológicos y bioquímicos importantes para la identificación y caracterización de especies de cianobacterias en la Península de Baja California (López-Cortés y Tovar, 1992; Maya *et al.*, 2002). Estos trabajos han dado pauta para conocer la necesidad de métodos más modernos para la identificación de cianobacterias en el noroeste mexicano (López-Cortés *et al.*, 2001) y dado que los problemas con cianobacterias tóxicas están tomando interés en todo el mundo por su impacto económico, ecológico y en salud pública, es necesario tomar medidas rápidas y confiables para su prevención.

En varios países como Australia, Italia, Irlanda y Tailandia, debido al constante crecimiento de cianobacterias tóxicas como *Anabaena circinalis*, *Microcystis aeruginosa*, *Planktothrix sp* y *Cylindrospermopsis raciborskii*, asociadas a problemas de salud humana y animal (ver Tabla II), se han aplicado con éxito sondas especie-específicas para discriminar especies y cepas tóxicas en aislamientos poliespecíficos (Fergusson *et al.*, 2001; Baker *et al.*, 2001; Beltrán y Neilan, 2000; Pomati *et al.*, 2000; Saint *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2001).

También se han utilizado sondas moleculares para relacionar las variaciones morfológicas y toxicológicas de *Nodularia*, *Aphanizomenon* y *Anabaena* en cuerpos de agua de varios

países, encontrando diferencias genéticas significativas, además de diferencias morfológicas y de producción de toxinas (Bolch *et al.*, 1999; Barker *et al.*, 2000; Beltrán y Neilan, 2000). Baker y colaboradores (2001) demostraron que, mediante las secuencias de ADN de cianobacterias, se pueden evidenciar cepas genotípicamente diferentes de un solo morfotipo provenientes del mismo bloom, facilitando la tarea en estudios de campo.

Con respecto a marcadores moleculares, la caracterización de algunas regiones de la subunidad ribosomal 16s (ADNr) ha resultado ser una herramienta muy versátil para identificar cianobacterias (Nübel *et al.*, 1999; Pomati, *et al.*, 2000), debido a que presenta una gran cantidad de fragmentos variables que permiten discriminar entre especies e incluso cepas (Van de Peer *et al.*, 1996; Nübel *et al.*, 1997). Esto ha permitido conocer las relaciones evolutivas de varios grupos (Neilan *et al.*, 2000; García-Pichel *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2001; Litvaitis, 2002), identificar oportunamente la presencia de especies tóxicas formadoras de blooms (Rudi *et al.*, 1998; Dyble y Paerl, 2000; Fergusson *et al.*, 2001), y diferenciar cepas con roles ecológicos diferentes como el hábitat, formación de sedimentos, fijación de nitrógeno y la capacidad de producir toxinas (Beltrán y Neilan, 2000; Dyble y Paerl, 2000; García-Pichel *et al.*, 2001; Moffit *et al.*, 2001; Turner *et al.*, 2001).

En México las herramientas moleculares han sido utilizadas para caracterizar comunidades de cianobacterias desde un punto de vista ecológico, estudiando la riqueza específica, identificando los diferentes morfotipos y conociendo sus relaciones filogenéticas (Nübel *et al.*, 1999; López-Cortés *et al.*, 2001). Sin embargo, debido a que es reciente el interés por el impacto de las proliferaciones de cianobacterias tóxicas, aún no existen suficientes trabajos relacionados con técnicas moleculares y la toxicidad de ciertas especies de cianobacterias.

Tabla II. Eventos tóxicos más sobresalientes en todo el mundo relacionados con proliferaciones de cianobacterias y sus toxinas. Se incluye el año en que suscitó el evento, una breve descripción de los daños causados, la localidad, las especies involucradas y la referencia.

Evento (año)	Localidad	Especies	Referencia
Envenenamiento en humanos (1980)	Palm Island, Australia	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Saker y Eaglesham, 1999
Intoxicación y muerte de animales domésticos e intoxicación en humanos (1989-1990)	Varios lagos en Inglaterra y Escocia	<i>Microcystis aeruginosa</i> y <i>Oscillatoria</i>	Codd y Beattie, 1991 en Whitton y Potts, 2000
Variación en talla y peso, estrés y muerte en camarones cultivados. Irritación en piel y vías respiratorias en humanos (1991)	Sinaloa, México	<i>S. calcicola</i> , <i>A. elenkenii</i> , <i>O. lemnitica</i> y <i>A. aequalis</i>	Cortés-Altamirano y Licea-Duran, 1999
Cambios en olor, sabor y aspecto del agua e intoxicaciones en ganado (1995)	San Roque Dam, Argentina	<i>M. aeruginosa</i> , <i>A. flos-aquae</i> y <i>A. circinalis</i>	Scarafia <i>et al.</i> , 1995
126 personas intoxicadas y 55 muertos por presencia de microcistina en hemodiálisis (1996)	Caruaru, Brasil	<i>M. aeruginosa</i>	Codd, 1998 Harada y Tsuji, 1998 Li <i>et al.</i> , 2001
Intoxicaciones en humanos y muerte en organismos cultivados (1997)	India	<i>Schzothrix sp.</i> , <i>Lingbya sp</i> y <i>Synechococcus sp</i>	Williams <i>et al.</i> , 1997b Karunasagar <i>et al.</i> , 1997
Hemorragias y promoción de tumores en hígado de animales silvestres (1990-1999)	Lagunas de Australia, Nueva Zelanda, Alemania y E.U.A.	<i>Nodularia sp</i>	Moffit <i>et al.</i> , 2001
Intoxicación y muerte aves (1999)	Tlahuac, México	<i>M. aeruginosa</i> , y <i>A. variabilis</i>	Sierra-Beltrán <i>et al.</i> , 2000

3. Justificación

A pesar de que se han establecido criterios para la identificación de cianobacterias, éstos aún son inconsistentes y presentan problemas, debido a que mediante ellos, no se puede conocer la estabilidad morfológica de las comunidades silvestres, dando como resultado identificaciones erróneas, sinonimias y confusiones (Medlin; 1997; González-Gil *et al.*, 1999). Por eso, el uso de herramientas moleculares como la caracterización de ácidos nucleicos, provee resultados más sensibles y específicos (Neilan *et al.*, 1994; Rouhiainen *et al.*, 1995; Medlin; 1997; Nübel *et al.*, 1997; Rudi *et al.*, 1998), permitiendo la detección oportuna e identificación precisa de especies dañinas para monitorear la distribución y la expansión de especies potencialmente formadoras de blooms (Rudi *et al.*, 1998; Dyble y Paerl, 2000; Fergusson *et al.*, 2001), así como la discriminación entre cepas tóxicas de las no tóxicas, dentro de una misma especie (Van de Peer *et al.*, 1996; Nübel *et al.*, 1997; Roset *et al.*, 2001). Estas técnicas además de ser más confiables son rápidas ya que, dentro de una muestra polialgal, se pueden identificar las especies tóxicas, permitiendo actuar de inmediato, durante e incluso antes de la proliferación de un bloom tóxico (Baker *et al.*, 2001).

Por otro lado, desde 1997 la Organización Mundial de la Salud estableció como valor provisional de referencia 1 µg/litro como nivel máximo aceptable de microcistina-LR en agua potable (WHO, 1998). En la Unión Europea existen criterios para conocer el “estado ecológico” del agua potable, entre ellos se considera el conocer los taxa de fitoplancton presentes (Roset *et al.*, 2001). En países como Gran Bretaña existen leyes que regulan la cantidad máxima permisible de ficotoxinas, incluyendo las cianotoxinas en el agua para consumo humano (UK Environment Agency, 1998), y en otros como Australia, Irlanda,

Italia y Finlandia se regula la presencia de cianotoxinas en organismos para consumo humano (Scoging, 1998; Jones, 2000). En México aún no se han establecido los niveles máximos de cianotoxinas permitidos en agua potable y productos de exportación e importación. Debido al contexto político-social que está viviendo el país, es necesario comenzar esta tarea, no sólo para evitar intoxicación y muerte de organismos silvestres y cultivados (además de los impactos en la salud pública), si no también para poder competir económicamente con países que ya tienen leyes sobre este rubro como la Unión Europea y los Estados Unidos de América.

Mediante el uso de herramientas moleculares será más confiable, rápida y fácil la determinación de especies de cianobacterias tóxicas y potencialmente tóxicas en cuerpos de agua naturales y artificiales, antes de que se presente una proliferación dañina. Además, se podrán diseñar mapas biogeográficos de especies de cianobacterias tóxicas y sus relaciones con el medio, de tal forma que, mediante programas de monitoreo constante, se podrá predecir su crecimiento.

4. Hipótesis

La subunidad ribosomal 16s (ADNr) de cianobacterias presenta algunos fragmentos variables que permiten su diferenciación a nivel género, así como la discriminación de especies y/o cepas.

5. Objetivo General

Caracterizar secuencias parciales de la subunidad ribosomal 16s (ADNr) de algunas cepas de cianobacterias tóxicas y de especies silvestres asociadas a eventos tóxicos, para buscar fragmentos variables que puedan utilizarse en la discriminación entre géneros, especies y cepas.

5.1 Objetivos Específicos

1. Aislar especies de cianobacterias provenientes de cultivos polialgales silvestres asociados a eventos tóxicos, hasta obtener cultivos monoalgales.
2. Estandarizar métodos de lisis celular y extracción de ADN genómico (ADNg) para cianobacterias.
3. Amplificar fragmentos de la subunidad ribosomal 16s (ADNr) de cianobacterias mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR), utilizando iniciadores (oligos o primers) específicos.
4. Obtener las secuencias parciales de la subunidad ribosomal 16s de especies de cianobacterias tóxicas de colección y de especies silvestres provenientes de aislamientos naturales asociados a eventos tóxicos.
5. Analizar las secuencias obtenidas mediante los paquetes DNAMAN[®] y BLAST (NCBI) para detectar los fragmentos variables y conservados de las secuencias parciales del gen 16s para conocer el porcentaje de homología con otras especies.

6. Materiales y Métodos

6.1 Organismos utilizados

Se utilizaron 38 cultivos de cianobacterias: 14 monoalgales y 24 polialgales, 11 de origen marino y 27 de agua dulce (Tabla III). Los cultivos de referencia fueron obtenidos de la Colección del Laboratorio de Botánica de la Universidad de Texas (UTEX). Estas cepas fueron consideradas tóxicas después de haber realizado bioensayos en ratón. Otros cultivos fueron aislados de eventos naturales, reportándose intoxicación, diferentes daños y muerte en camarones cultivados, peces y aves migratorias (Cortés-Altamirano *et al.*, 1997; Sierra-Beltrán y Cortés-Altamirano, 2000; Sierra-Beltrán *et al.*, 2000; Pérez-Linares, 2001; Pérez-Linares *et al.*, 2003) además de irritación en la piel en humanos (Cortés-Altamirano y Licea-Durán, 1999).

6.2 Técnica de Cultivo

Para el cultivo de las cianobacterias se preparó medio ASN I (Sigma-Aldrich, Co.), agregando 20 mL del concentrado del medio mas 12 µL de vitamina B₁₂ en 1000 mL de agua de mar filtrada (35 ‰, filtros de diatomita y expuesta a rayos UV) y esterilizada en un autoclave (120°C, 60 lb, 20 min) para las especies marinas, y para las especies de agua dulce se utilizó agua destilada estéril. Posteriormente se inocularon 25 mL de medio con 5 mL de cada aislamiento o cepa y se mantuvieron a 21°C, iluminados por una lámpara de halógeno (62.5 µEi, 3200 lux) con un filtro verde-azul de papel celofán (para evitar el blanqueamiento) con ciclos de luz/oscuridad 12/12. Después de 6 a 8 semanas del cultivo (dependiendo de su tasa de crecimiento), las células se cosecharon, y se inocularon nuevamente en medio fresco para mantener los stocks. La cosecha se realizó mediante centrifugación (4000xg/20 min/4°C), y la biomasa se mantuvo congelada a -20°C hasta su

uso. Los aislamientos polialgales fueron sembrados en placas con medio ASN I sólido (1.5% agar) para aislar las distintas especies que conformaban los cultivos y conseguir aislamientos monoalgales, siguiendo el protocolo de cultivo antes mencionado.

6.3 Bacterias

Para conocer la carga bacteriana de los cultivos de cianobacterias se prepararon placas con medio LB sólido utilizando 20 g de LB deshidratado (Sigma-Aldrich Co.) y 15 gr de agar (GIBCO-BRL[®]) por cada 1000 mL de agua destilada. El medio se esterilizó en autoclave vaciándose 15 mL en cada placa. Una vez que el medio se solidificó se sembró 1 mL de cada cultivo de cianobacterias en dos placas: la primera se incubó a 37°C y la segunda a 21°C durante 24 h. En ambos casos y en todos los procedimientos subsecuentes las incubaciones de los cultivos bacterianos se realizaron en ausencia de luz.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación las bacterias se clasificaron de acuerdo a su morfología colonial (color, textura, forma, etc.), sembrándose por separado en placas con medio LB, incubándose a 37°C durante 24 h. Posteriormente, de cada cultivo bacteriano se pico una colonia aislada que se transfirió a un tubo estéril de 15 mL con 5 mL de medio LB líquido, dejándolos incubar en agitación (225 rpm) a 37°C durante 24 h.

Tabla III. Cultivos de cianobacterias del Laboratorio de Genética Molecular, CIBNOR.

No.	Fecha	Procedencia	Especie (s)	Origen *	Tipo de Cultivo **	Tóxico
1	1999	UTEX 1935	<i>Schizothrix calcicola</i>	FW	M	+
2	1999	UTEX 1444	<i>Anabaena flos-aquae</i>	FW	M	+
3	1999	UTEX 2092	<i>Nodularia spumigena</i>	FW	M	+
4	1999	UTEX 1935	<i>S. calcicola</i>	FW	M	+
5	1999	UTEX 2092	<i>N. spumigena</i>	FW	M	+
6	1999	UTEX 1813	<i>S. calcicola</i>	FW	M	+
7	1999	UTEX 2383	<i>A. flos-aquae</i>	FW	M	+
8	1999	UTEX 1444	<i>A. flos-aquae</i>	FW	M	+
9	1999	UTEX 2383	<i>A. flos-aquae</i>	FW	M	+
10	1999	UTEX 2092	<i>N. spumigena</i>	FW	M	+
11	1999	UTEX 1444	<i>A. flos-aquae</i>	FW	M	+
12	1999	UTEX 1936	<i>S. calcicola</i>	FW	M	+
13	1999	UTEX 1444	<i>A. flos-aquae</i>	FW	M	+
14	1999	UTEX 1936	<i>S. calcicola</i>	FW	M	+
15	2000	Mazatlán (hotel)	<i>M. aeruginosa/S. calcicola (?)</i>	M	P	+
16	1999	UTEX 2383	<i>A. flos-aquae</i>	FW	M	+
17	1999	UTEX 2388	<i>M. aeruginosa</i>	FW	M	+
18	2000	Tlahuac centro 4	<i>M. aeruginosa/filamentos/Spyrulina</i>	FW	P	+
19	2000	Tahuac periferia 3	<i>Anabaena sp/filamentos</i>	FW	P	+
20	2000	Tlahuac centro 2	<i>M. aeruginosa/filamentos/Spyrulina</i>	FW	P	+
21	2000	Tlahuac centro	<i>M. aeruginosa/S. calcicola/filamentos</i>	FW	P	+
22	2000	Tlahuac centro	<i>M. aeruginosa/S. calcicola/filamentos</i>	FW	P	+
23	2000	Tlahuac periferia	<i>A. negroviridis (?)/ filamentos</i>	FW	P	+
24	2000	Tlahuac periferia 4	<i>Schizothrix sp/filamentos</i>	FW	P	+
25	2000	Mazatlán (estero)	Especies filamentosas	M	P	+
26	2000	CIBNOR	Especies filamentosas	M	P	
27	2000	CIBNOR	Especies filamentosas	M	P	
28	2000	CIBNOR	Especies filamentosas	M	P	
29	2000	Mazatlán (estero)	<i>S. calcicola (?)/filamentos</i>	M	P	+
30	2000	CIBNOR	Especies filamentosas	M	P	
31	2000	CIBNOR	Especies filamentosas	M	P	
32	2000	CIBNOR	Especies filamentosas	M	P	
34	1996	Cabo San Lucas	<i>Planktothrix agardii (?)</i>	M	M	+
38	1996	Nayarit	Especies filamentosas	FW	P	
39	1996	Nayarit	Especies filamentosas	FW	P	
40	1996	Nayarit	Especies filamentosas	FW	P	
41	2000	Mazatlán (hotel)	<i>M. aeruginosa</i>	M	M	+
42	2000	Mazatlán (hotel)	<i>M. aeruginosa</i>	FW	M	+

* Origen FW= Agua Dulce, M= Marinos

**Tipo de Cultivo M= Monoalgales, P= Polialgales.

(?) especies sin corroborar

6.4 Lisis y Extracción de ADN genómico

Se ensayaron varios métodos para causar lisis y extraer ADN genómico (ADNg) de cianobacterias: 1) shock térmico (ciclos de congelamiento-descongelamiento con nitrógeno líquido y baño a 42°C), 2) disrupción mecánica con perlas de vidrio, 3) agente comercial DNAzol (GIBCO-BRL[®]), 4) fenol-cloroformo y 5) una combinación de ellos. En el caso de las bacterias se utilizó el protocolo de fenol-cloroformo; en todos los ensayos se realizaron electroforesis (70V, 1.5h) en geles de agarosa-TBE (TBE 10X Tris 108 gr./ H₃BO₃ 55 gr./EDTA 0.5 M pH 8.0 20 mL en 1000 mL de agua destilada) al 0.8% para observar el rendimiento y la calidad del ADN extraído. La concentración y pureza de los extractos de ADN se determinó mediante espectrofotometría (Spectrophotometer Beckman, DU 640[®]) leyendo la absorbancia a 260 y 280 nm. Finalmente se prepararon soluciones madre (stocks) de ADNg de 100 ng/μL; las muestras se preservaron en alícuotas de 1 μL a -20°C hasta su utilización.

6.5 Amplificación por PCR

Para las reacciones de amplificación de fragmentos de ADNr a partir de ADNg, tanto de cianobacterias como de bacterias, se siguió el protocolo recomendado por Neilan *et al.* (1994) y Nübel *et al.* (1997), en el cual, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) e iniciadores (oligos o primers) específicos para cianobacterias, se amplifican fragmentos de ~400 y ~700 pb provenientes de la subunidad ribosomal 16s. Los primers se sintetizaron en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (<http://www.ibt.unam.mx/sintesis>). En la Tabla IV se resumen las características generales de los primers utilizados.

Tabla IV. Características generales de los primers específicos para cianobacterias.

Primer ^a	Secuencia	Sitio blanco ^b
CYA106F	5'-CGG-ACG-GGT-GAG-TAA-CGC-GTG-A-3'	106-127
CYA359F	5'-GGG-GAA-TYT-TCC-GCA-ATG-GG-3' ^c	359-378
CYA781R-I	5'-GAC-TAC-TGG-GGT-ATC-TAA-TCC-CAT-T-3'	781-805
CYA781R-II	5'-GAC-TAC-AGG-GGT-ATC-TAA-TCC-CTT-T-3'	781-805

^aClave del oligo donde la orientación F(forward) y R (reverse) está en relación al ARNr.

^bNumerados de acuerdo a los nucleótidos del ARNr de *E. coli*.

^cY= degeneración de nucleótidos C/T

Brevemente, la mezcla de reacción contenía 1 μL de ADNg [100 ng/ μL], 2 μL de una mezclas de primer forward y reverse [0.1 nmol/ μL cada uno], 5 μL de buffer PCR 10X, 1 μL de dNTP's (10 mM), 40.8 μL de agua milli-Q estéril y 1U de Taq Polimerasa (0.2 μL); al final se adicionaron $\sim 20\mu\text{L}$ de aceite mineral. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Techne (Cyclogene[®]) de acuerdo al programa citado en la Tabla V. Para observar el rendimiento, el tamaño y calidad de los amplicones obtenidos se realizaron electroforesis (70V, 2h) en geles de agarosa-TBE al 1%.

Tabla V. Programa utilizado para la amplificación de fragmentos de ADNr de cianobacterias mediante PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Pre-Desnaturalización	95°C	5 min	1
Desnaturalización	94°C	1 min	
Alineamiento	50°C	1 min	30
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

6.6 Purificación de Productos de PCR para secuenciación

Los productos de PCR obtenidos se purificaron con el Kit comercial Concert (GIBCO-BRL[®]) para eliminar dNTP's y otras moléculas que interfirieron en el proceso de secuenciación. Brevemente, a las reacciones de amplificación se les adicionó solución de ligación en una proporción 4:1 (v/v solución de ligación:reacción de PCR) y se mezcló suavemente con la pipeta. Esta mezcla se pasó a un cartucho preparado con una matriz de sílica que se introdujo en un tubo colector. El sistema se centrifugó durante 1 minuto a 12,000xg desechándose el filtrado. Posteriormente se adicionaron 700 µL de buffer de lavado (NaCl, EDTA, Tris-HCl y etanol) y se centrifugó durante 1 minuto a 12,000xg, se desechó el filtrado y se centrifugó nuevamente para remover todos los remanentes de buffer. Finalmente se colocó el cartucho en un tubo colector nuevo de 1.5 mL y se adicionaron 50 µL de buffer TE (10 mM Tris pH 7.6, 1 mM EDTA, pH 8.0) previamente calentado a 65-70°C. Se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000xg durante 2 minutos. La muestra se mantuvo a -20°C hasta su uso.

6.7 Secuenciación

Los productos de PCR purificados (fragmentos de ~700 pb) fueron secuenciados en el Laboratorio de Biología Molecular del CIBNOR. Las muestras se prepararon en tubos de 200 µL, conteniendo ~70 ng de templado (~10 ng por cada 100pb), 3.5 pmol/µL del oligo (forward o reverse, Tabla IV), aforando a un volumen final de 12 µL con H₂O milli-Q estéril. Brevemente, el proceso de secuenciación consiste básicamente de tres partes. Durante la primera parte las muestras se someten a una amplificación por PCR utilizando el reactivo Big Dye V2[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA) que consiste fundamentalmente de bases marcadas con fluorescencia. Durante la segunda fase los

productos de amplificación se purifican mediante columnas Centri-Sep[®] (Appl. Biosys.), en buffer TSR[®] (Appl. Biosys.) para mantener la cadena de ADN abierta. Finalmente las muestras marcadas, purificadas y preparadas para secuenciar se cargan en un equipo ABI 310 PRISM Genetic Analyzer[®] (Appl. Biosys.), que consiste en un sistema de electroforesis en una columna capilar, un detector de fluorescencia y un sistema de registro en el que se almacenan los datos en forma de cromatogramas o archivos de texto.

6.8 Análisis de secuencias

Para visualizar los cromatogramas se utilizó el programa Chromas, con el cual se verificaron las posibles lecturas erróneas y omisiones. Las secuencias crudas se analizaron mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>) para su comparación con secuencias publicadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), verificando su identidad así como las especies más relacionadas, su porcentaje de homología, cantidad de bases similares, etc.

Una vez que se confirmaron las secuencias, se utilizó el programa DNAMAN[®] para obtener la secuencia consenso, ensamblando las secuencias “forward” y “reverse”, para el análisis de alineamiento y determinar, de esta forma, las regiones conservadas y variables, además de la construcción de un dendograma de homologías de las especies analizadas.

7. Resultados

7.1 Cultivos

La Figura 3 muestra algunas de las especies de cianobacterias estudiadas. Las micrografías se tomaron con un aumento de 40X con un microscopio óptico (Nikon Optiphot-2[®] con ocular 10X) y el software Snappy Photo Delux[®]. De los cultivos de origen silvestre se

obtuvieron 8 cultivos monoalgales (Tabla VI), debido a que solo una o dos especies dominaban el cultivo sólido mientras que las demás morían, de esta forma se aisló una sola especie por placa. Por otro lado, para especies de Chroococcales, como *Microcystis*, no se obtuvo un crecimiento exitoso en medio sólido, por lo que en la mayoría de las placas no fue posible recuperar esas especies.

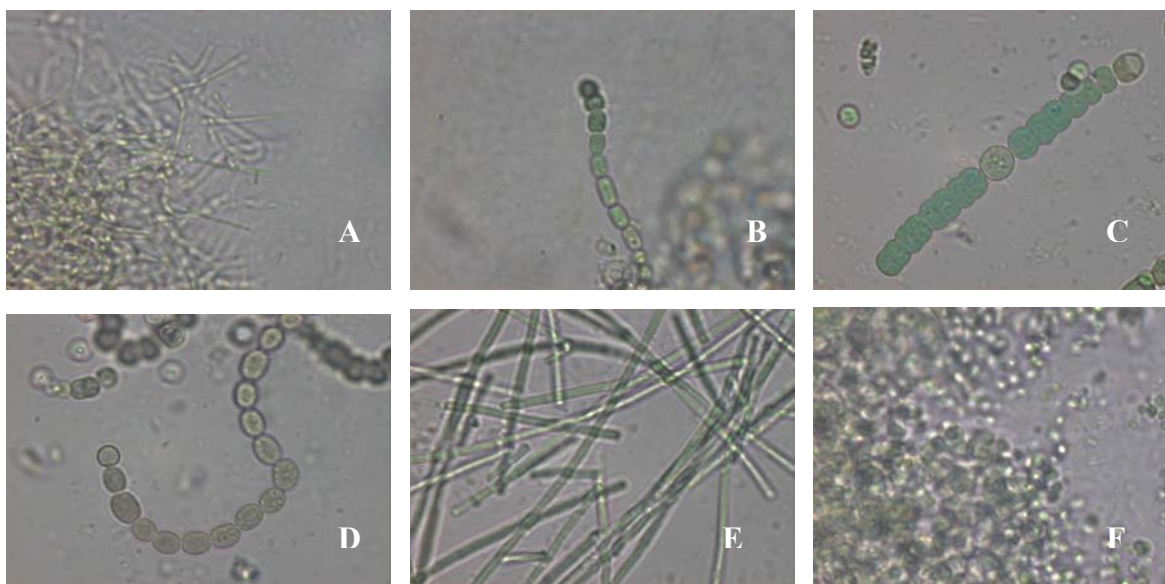


Figura 3. Micrografías (40X) de algunos de los cultivos monoalgales de cianobacterias del Laboratorio de Genética Molecular, CIBNOR y de la UTEX. A) Cultivo 1 *Schizothrix calcicola* (UTEX 1935); B) Cultivo 2 *Anabaena flos-aquae* (UTEX 1444); C) Cultivo 3 *Nodularia spumigena* (UTEX 2092); D) Cultivo 23 *Anabaena variabilis* (Tlahuac); E) Cultivo 25 *Geitlerinema sp.* (CIBNOR); F) Cultivo 42 *Synechococcus sp.* (Mazatlán).

7.2 Bacterias

Las placas sembradas con cultivos de cianobacterias que se incubaron a 21°C (temperatura en la que se mantienen los cultivos de cianobacterias) no presentaron crecimiento bacteriano, mientras que las que se incubaron a 37°C presentaron de cero hasta un máximo de 2 colonias bacterianas diferentes por placa. Se aislaron un total de 41 colonias

bacterianas provenientes de los cultivos de cianobacterias, sin embargo, sólo se presentaron en total 7 morfotipos diferentes en total.

7.3 Extracción de ADN genómico

7.3.1 ADN genómico de cianobacterias

Con la mayoría de las técnicas utilizadas para causar lisis y extraer ADNg se obtuvieron bajos rendimientos de ADN y baja calidad, sin embargo, con el protocolo estándar de fenol-cloroformo, usando perlas de vidrio para provocar lisis, se obtuvo el mejor rendimiento y calidad de ADN (Figura 4), por lo que se optó por el uso de éste método. Cabe mencionar que al parecer el ADNg de cianobacterias (en especial de las especies *S. calcicola* y *M. aeruginosa*) es muy frágil y puede degradarse después de cierto tiempo si se mantiene resuspendido en buffer TE a -20°C (Figura 5), además de que las lecturas en el espectrofotómetro presentan baja pureza, a pesar de tener altos rendimientos. Por lo anterior las muestras de ADNg se mantuvieron precipitadas en etanol absoluto a -20°C hasta su utilización, además de resuspenderlas posteriormente en agua milli-Q en lugar de TE, para evitar su degradación temprana e interferencia de sustancias en la lectura en el espectrofotómetro. Se extrajo ADNg de 25 cultivos monoalgales de cianobacterias, tanto comerciales como de origen natural, algunas provenientes de agua dulce y otras de agua salobre o marina. Sin embargo, mediante PCR, solo fue posible amplificar 19 (Tabla VI).

Tabla VI. Cultivos monoalgales de cianobacterias del Laboratorio de Genética Molecular, CIBNOR, utilizados para la amplificación del 16s ADNr.

No. de Cultivo	Procedencia	Especie aislada
1	UTEX 1935	<i>Schizothrix calcicola</i>
2	UTEX 1444	<i>Anabaena flos-aquae</i>
3	UTEX 2092	<i>Nodularia spumigena</i>
4	UTEX 1935	<i>S. calcicola</i>
5	UTEX 2092	<i>N. spumigena</i>
7	UTEX 2383	<i>A. flos-aquae</i>
8	UTEX 1444	<i>A. flos-aquae</i>
9	UTEX 2383	<i>A. flos-aquae</i>
10	UTEX 2092	<i>N. spumigena</i>
11	UTEX 1444	<i>A. flos-aquae</i>
13	UTEX 1444	<i>A. flos-aquae</i>
15-A	Mazatlán (hotel)	<i>S. calcicola</i> ?
23-A	Tlahuac periferia	<i>A. negroviridis</i> ?
25-A	Mazatlán (estero)	Especie filamentosa ?
29-A	Mazatlán (estero)	<i>S. calcicola</i> ?
30-A	CIBNOR	Especie filamentosa ?
31-A	CIBNOR	Especie filamentosa ?
34	Cabo San Lucas	<i>Planktothrix agardii</i> ?
42	Mazatlán (hotel)	<i>M. aeruginosa</i> ?

(?) especies sin corroborar

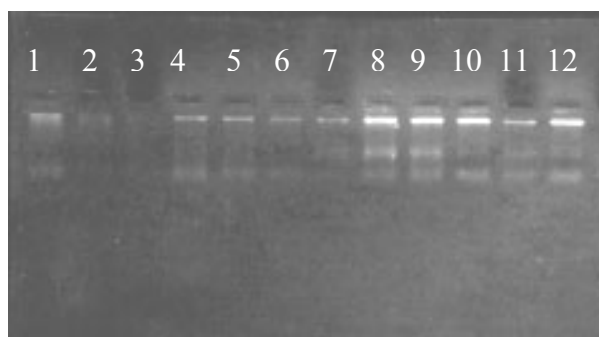


Figura 4. Gel agarosa-TBE al 0.8% mostrando bandas de ADN genómico de cianobacterias (carriles 1, 4-12) obtenido con el protocolo estándar de fenol-cloroformo y perlas de vidrio. En los carriles 2 y 3 la extracción fue en baja cantidad (tinción Et-Br).

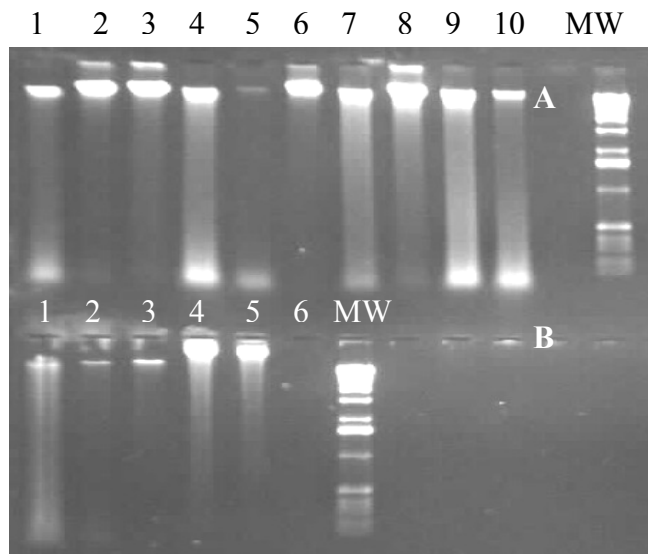


Figura 5. Gel agarosa-TBE al 0.8% donde se observan algunas muestras de ADNg parcialmente degradado principalmente de *S. calcicola* (carriles 1, 4, 7, 9 y 10 gel **A** y 1 gel **B**) y *Synechococcus sp.* (4 y 5 gel **B**). Los demás carriles corresponden a ADNg de *N. spumigena* (3 y 8 gel **A**) y *Anabaena flos-aquae* (2, 5 y 6, gel **A**). WM = marcador molecular 1Kb (Life Technologies). Técnica de tinción Et-Br.

7.3.2 ADN genómico de bacterias

Mediante el protocolo de fenol-cloroformo y causando la disrupción celular con perlas de vidrio se obtuvo ADNg de buena calidad y en cantidad, a partir de las colonias bacterianas aisladas de los cultivos de cianobacterias (Figura 6).

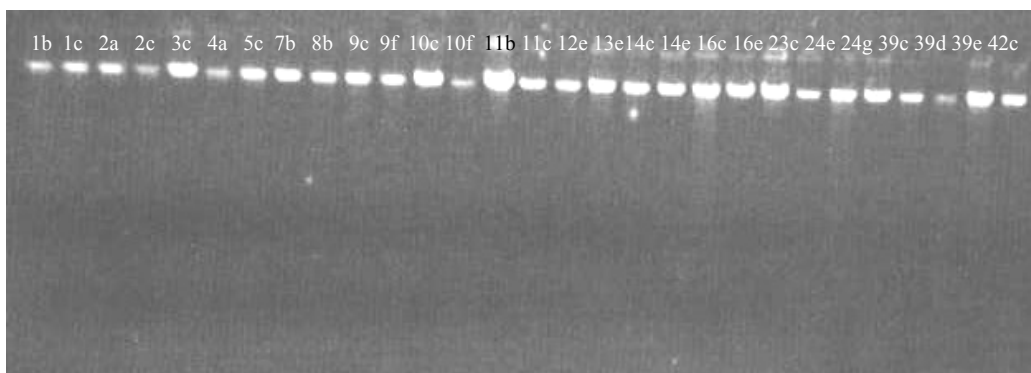


Figura 6. Gel agarosa-TBE al 0.8% mostrando bandas de ADN genómico de bacterias asociadas a los cultivos de cianobacterias. El ADN fue obtenido mediante el protocolo estándar de fenol-cloroformo y perlas de vidrio. Número = cultivo de cianobacteria y Letra = tipo de colonia bacteriana. Técnica de tinción Et-Br.

7.4 Amplificación por PCR

7.4.1 Amplificación de ADN de cianobacterias

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa se observó que con las dos mezclas de los oligos CYA106F/CYA781R-I y CYA106F/CYA781R-II (Tabla IV), que amplifican fragmentos de ~700 pb se logran mejores resultados ya que los amplicones obtenidos presentaron alta calidad y cantidad en todas las especies ensayadas, en especial con la primera mezcla (Figura 7A). Por otro lado, con la mezcla de los oligos CYA359F/CYA781R-I (que amplifican fragmentos de ~400 pb) se obtuvieron amplicones de baja calidad (Figura 7B, carriles inferiores), o bien no hubo amplificación al utilizar la mezcla de los oligos CYA359F/CYA781R-II (Figura 7B carriles superiores). Por lo que solo se utilizaron los oligos CYA106F/CYA781R-I.

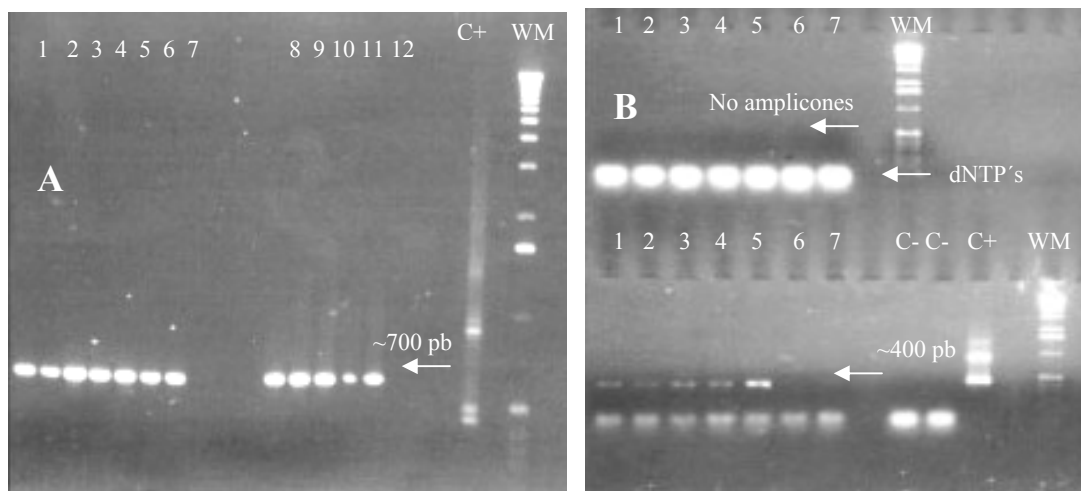


Figura 7. Geles agarosa-TBE al 1% para observar el rendimiento y calidad de los amplicones obtenidos mediante PCR. **A)** Utilizando las mezclas de los oligos CYA106F/CYA701R-I (carriles 1-7) y CYA106F/CYA701R-II (carriles 8-12), que amplifican fragmentos de ~700 pb; **B)** Utilizando los oligos que amplifican fragmentos de ~400 pb, con la mezcla CYA359F/CYA701R-II no se obtuvieron amplicones (parte superior, carriles 1-7) y con la mezcla CYA359F/CYA701R-I se obtuvieron amplicones de baja calidad y cantidad (parte inferior, carriles 1-7). WM = marcador 1Kb (Life Technologies). Técnica de tinción Et-Br.

7.4.2 Amplificación de ADN de bacterias

Dada la dificultad de eliminar la carga bacteriana de los cultivos de cianobacterias, ya que tratamientos con antibióticos pueden repercutir en la integridad de las cianobacterias y probablemente sea una relación simbiótica, se optó por eliminar la posibilidad de interferencia de la carga genética bacteriana al probar los oligos diseñados para amplificar regiones específicas del ADN de cianobacterias (gen 16s) usando como templado ADNg bacteriano. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8, en donde se confirma que los oligos utilizados no amplifican ADN de bacterias bajo las mismas condiciones de ensayo que en cianobacterias.

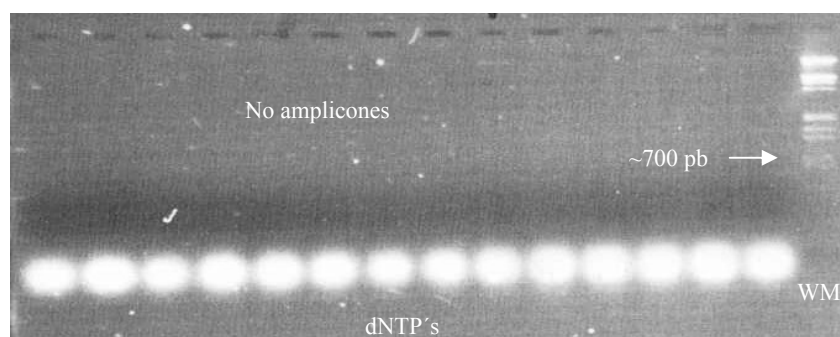


Figura 8. Gel de agarosa-TBE al 1% donde se confirma que los oligos diseñados para amplificar ADN de cianobacterias no amplifican ADN de las bacterias asociadas a los cultivos. WM = marcador molecular 1 Kb (Life Techonlogies). Técnica de tinción Et-Br.

7.5 Secuenciación

Se secuenciaron productos de PCR de 19 cultivos de cianobacterias en ambas direcciones (forward y reverse) usando los primers CYA106F y CYA781R-I, obteniéndose secuencias entre 557 pb y 616 pb con lectura confiable (ver Apéndice I), después de haberse analizado detalladamente con el programa Chromas. Estas secuencias se confrontaron con las reportadas previamente en las bases de datos mundiales a través del programa BLAST

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), disponible en línea. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla VII, donde se presentan las 19 especies analizadas, la especie más cercana a cada una (de acuerdo al análisis BLAST), así como el porcentaje de homología encontrado, el número de bases que coinciden y la clave de acceso en el GenBank del organismo correspondiente.

Tabla VII. Resultados del análisis de homología BLAST de las secuencias de nucleótidos obtenidas de las especies consideradas en este estudio.

No. ^a	Procedencia	Especie	Especie más cercana	No.Acc. ^b	ID ^c	Hom. ^d
1	UTEX 1935	<i>Schizothrix calcicola</i>	LPP-group MBIC10087 gene for	AB058225	576/585	98%
4	UTEX 1935	<i>S. calcicola</i>	16s rRNA, partial			
15	Mazatlán	<i>S. calcicola</i> (?)	sequence			
2	UTEX 1444	<i>Anabaena flos-aquae</i>	<i>Anabaena variabilis</i>			
8	UTEX 1444	<i>A. flos-aquae</i>	strain NIES23 16s	AF247593	577/584	98%
11	UTEX 1444	<i>A. flos-aquae</i>	ribosomal RNA gene,			
13	UTEX 1444	<i>A. flos-aquae</i>	partial sequence			
3	UTEX 2092	<i>Nodularia spumigena</i>	<i>Nodularia spumigena</i>			
5	UTEX 2092	<i>N. spumigena</i>	strain UTEX-B2092	AF268022	578/587	98%
10	UTEX 2092	<i>N. spumigena</i>	16s ribosomal RNA			
			gene, partial			
			sequence			
7	UTEX 2383	<i>A. flos-aquae</i>	<i>Anabaena flos-aquae</i>			
9	UTEX 2383	<i>A. flos-aquae</i>	strain NIER-10002	AY074799	563/568	99%
			16s ribosomal RNA			
			gene, partial sequence			
23	Tlahuac per.	<i>A. negroviridis</i> (?)	<i>Anabaena variabilis</i>			
			NIES23 16s	AF247593	582/612	95%
			ribosomal RNA gene,			
			partial sequence			
25	Mazatlán	Especie filamentosa	<i>Geitlerinema</i> sp. PCC			
30	CIBNOR	Especie filamentosa	7105 small subunit	AF132780	592/595	99%
31	CIBNOR	Especie filamentosa	ribosomal RNA gene,			
34	C. S. Lucas	<i>P. agardiia</i> (?)	partial sequence			
29	Mazatlán	<i>S. calcicola</i> (?)	<i>Geitlerinema</i> sp.			
			PCC9452 16s	MSU96442	496/508	97%
			ribosomal RNA gene,			
			partial sequence			
42	Mazatlán	<i>M. aeruginosa</i> (?)	<i>Synechococcus</i> sp.			
			IR11 16s ribosomal	AF448079	552/599	92%
			RNA gene, partial			
			sequence			

^a Número clave de los cultivos de cianobacterias del Laboratorio de Genética Molecular, CIBNOR.

^b Número de Acceso de la información de la especie en el GenBank.

^c Proporción de identidades encontradas en el BLAST solicitada/base de datos.

^d Porcentaje de homología de acuerdo a la proporción encontrada.

Las 19 muestras se agruparon en 6 especies diferentes dentro de 5 géneros, con un porcentaje de homologías entre el 92 y 99%. La mayoría tuvo pocas no coincidencias (mismatches) con las secuencias reportadas con anterioridad y coincidieron en la mayor parte de la secuencia (% de identidad). Solamente 6 especies presentaron un número de mismatches sensiblemente mayor (Cultivos 1, 4, 15, 23, 29 y 42).

7.6 Análisis de secuencias

Después de haber ensamblado ambas secuencias (forward y reverse) de cada una de las 19 muestras, usando el programa DNAMAN[®], se obtuvo el alineamiento de las secuencias consenso y se pudieron observar los fragmentos conservados y los variables (Tablas VIII y IX) entre las especies analizadas. En el Anexo II se muestran los alineamientos, sombreado con diferentes tonos, el porcentaje de homología entre las secuencias (negro 100%, gris 75% y blanco <50%). Se pueden observar algunas zonas variables que diferencian los distintos géneros estudiados, otras las especies e incluso en el caso de las especies de *Anabaena variabilis* y *Geitlerinema sp* (cultivos CIBNOR 23 y CIBNOR 29 respectivamente), se pueden observar fragmentos que discriminan cepas dentro de la misma especie. Las Tablas VIII y IX muestran algunos ejemplos de sitios en la secuencia de las especies estudiadas, donde se pueden observar diferencias importantes que distinguen los 5 géneros caracterizados y algunos fragmentos para discriminar especies e incluso cepas.

Tabla VIII. Algunos ejemplos de sitios en las secuencias de la subunidad ribosomal 16s (ADNr) de cianobacterias tóxicas donde se encuentran fragmentos variables que distinguen a los 5 géneros estudiados.

Género	Secuencia	Sitio blanco*	Secuencia	Sitio blanco*
<i>Schizothrix</i>	TTTATC		ACTGCA	
<i>Anabaena</i>	CACTGT		AGCAAG	
<i>Nodularia</i>	CTATGT	~405	AACCTA	~428
<i>Geitlerinema</i>	CATTTC		GCCGAG	
<i>Synechococcus</i>	CGATTC		TCCAGG	

*Basado en la numeración obtenida por el alineamiento (Apéndice II)

Tabla IX. Algunos ejemplos de sitios en las secuencias de la subunidad ribosomal 16s (ADNr) de las especies *Anabaena variabilis* y *Geitlerinema sp* donde se encuentran fragmentos variables que pueden ayudar a la discriminación de cepas, dentro de una misma especie.

Especies	Secuencia	Sitio blanco*	Secuencia	Sitio blanco*
<i>A. variabilis</i> (2, 8, 11 y 13)	ATTTATTGCCTAGAG	~50	TGTGGTAAGAGCG	~93
<i>A. variabilis</i> (23)	GCTTGCCGCCTGAGA		GGGTGTAAGAGAC	
<i>Geitlerinema sp</i> (25, 30, 31 y 34)	AAACTGCT	~10	TCGGAAA	~440
<i>Geitlerinema sp</i> (29)	GGGCGGTT		GTGGACC	

*Basado en la numeración obtenida por el alineamiento (Apéndice II)

En la Figura 7 se muestra el dendograma de homologías obtenido del análisis de las secuencias, observándose que las especies filamentosas se dividieron en 4 grupos diferentes pertenecientes a los géneros *Schizothrix*, *Anabaena*, *Nodularia* y *Geitlerinema*. Por otro lado, el único género unicelular (*Synechococcus*) se agrupó aparte de las anteriores, compartiendo un 86% con las demás.

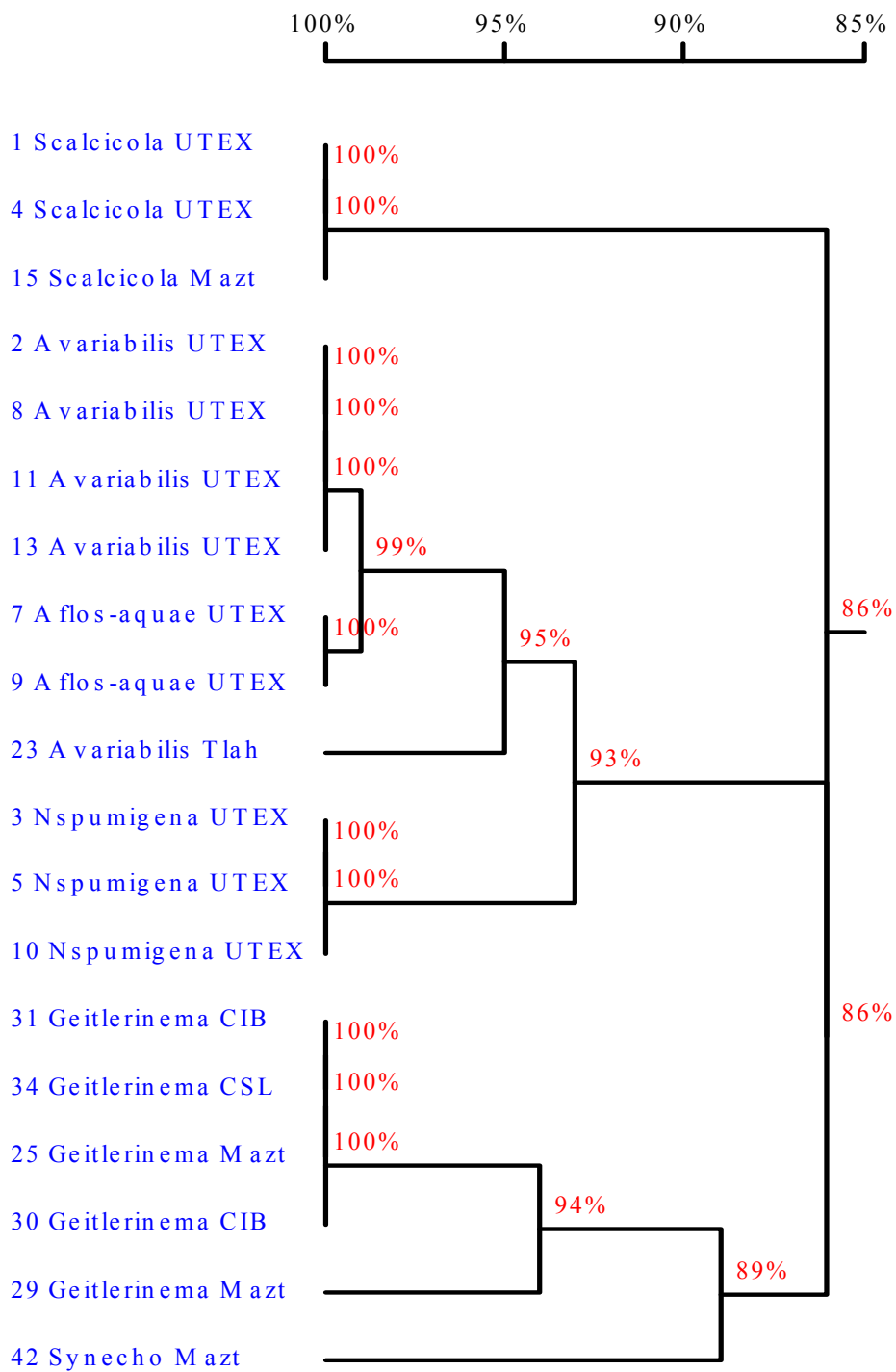


Figura 9. Dendrograma de homología entre las 19 especies de cianobacterias cultivadas en el Laboratorio de Genética Molecular, CIBNOR. Con una línea de corte a un nivel de homología al 94% se observan 5 grupos principales, representados por los géneros *Schizothrix*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Gleiterinema* y *Synechococcus*.

8. Discusión

En los últimos años se ha tomado mayor interés en las proliferaciones de cianobacterias, las cuales han sido más frecuentes debido a cambios importantes en el medio (Hallegraeff, 1993; Landsberg y Shumway, 1998) favoreciendo su crecimiento excesivo, tanto de manera uniespecífica como poliespecífica (Whitton y Potts, 2000). En el presente trabajo se pudieron aislar algunas de las especies que se encontraban en cultivos poliespecíficos, provenientes de muestras de eventos naturales (Tabla III). Sin embargo, solamente una de las especies, en cada caso, dominaba y sobrevivía en medio sólido desplazando a las demás y logrando su aislamiento. Como se mencionó en la introducción, las cianobacterias han sido muy difíciles de cultivar, existiendo muy pocos cultivos axénicos disponibles y algunos otros de manera unialgal (González-Gil *et al.*, 1999). Una de las maneras efectivas reportadas para aislar especies de microalgas provenientes de muestras polialgales es la siembra en placa con medio sólido y aunque es lenta (debido a que los organismos crecen a una tasa mas baja), ha demostrado proveer un aislamiento seguro (Allen, 1973; Prescott, 1968; Bolch y Blackburn, 1996). A pesar de lo anterior, en este trabajo se obtuvo un bajo número de especies aisladas (incluyendo las filamentosas), debido a las asociaciones que se forman entre ellas, entrelazando los filamentos embebidos en una matriz mucilaginosa (constituida por mucopolisacáridos y proteínas), dificultando su separación individual (Prescott, 1968; Dawes, 1981; Whitton y Potts, 2000). Además, muy probablemente, dichas especies han desarrollado relaciones simbióticas, como es común, impidiéndoles crecer de manera independiente (Prescott, 1968; Dawes, 1981). Por otra parte, las especies unicelulares morían a los pocos días de haberse sembrado en medio sólido, aún formando colonias, mientras que las filamentosas crecieron exitosamente. Lo anterior se debe a la

gruesa funda que recubre los tricomas, debido a que esta les confiere tolerancia a ambientes variados y extremos, a la exposición a rayos U.V., abrasión por erosión, así como la resistencia a desecación (Prescott, 1968; García-Pichel *et al.*, 2001), mientras que las especies unicelulares se protegen y se mantienen unidas con una secreción extracelular de mucoproteínas la cual, aparentemente, es menos resistente a la desecación que la funda de las filamentosas, provocando que las especies unicelulares no pudieran sobrevivir y/o separarse de las otras especies del cultivo. Otra posible explicación al bajo rendimiento obtenido en el aislamiento de las especies de cianobacterias, es la simbiosis puede existir entre algunas especies con varios organismos (bacterias, hongos, microalgas, otras cianobacterias, etc.) cuya supervivencia y crecimiento exitoso dependen de la coexistencia de ambos en el medio y sus interacciones metabólicas (Prescott, 1968; Nübel *et al.*, 1997; Whitton y Potts, 2000). Lo anterior dificulta su aislamiento individual, es un procedimiento que consume mucho tiempo e impide su crecimiento monoalgal exitoso en laboratorio (Fitzsimons y Smith, 1984 en Nübel *et al.*, 1997; Whitton y Potts, 2000). Adicionalmente las concentraciones de nutrientes en el medio sólido se mantuvieron estables y como se describió anteriormente, el exceso o falta de algún nutriente puede resultar en condiciones inhibitorias en cultivos monoalgales de cianobacterias (Pomati *et al.*, 2000; Whitton y Potts, 2000; García-Pichel *et al.*, 2001). Por todo lo anterior, es recomendable seguir realizando ensayos que nos permitan conocer los requerimientos básicos necesarios para el mantenimiento de cianobacterias en laboratorio y estandarizar algunas técnicas para su crecimiento exitoso, tanto en medios líquidos como sólidos, ya que de ello depende la cantidad de biomasa obtenida para eventuales investigaciones como

toxicidad (bioensayos en ratón, extracción de toxinas, etc), producción de pigmentos, O₂, polisacáridos, y caracterización de ácidos nucleicos (extracción de ADNg), entre otros.

Por otro lado la mayoría de los cultivos presentaron bacterias asociadas (incluyendo las cepas de origen comercial), ya que se ha comprobado que muchas cianobacterias requieren de estos organismos para un mejor crecimiento, debido a que utilizan algunos nutrientes y metabolitos secundarios que proveen las bacterias (Nübel *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997; Whitton y Potts, 2000). De cualquier modo se comprobó que éstas bacterias no crecen a la temperatura en que se mantuvieron los cultivos de cianobacterias (21°C) por lo que no se incrementa su biomasa en el medio; además se corroboró que los primers utilizados no amplifican ADNg bacteriano (Fig. 8). Otro punto importante de aclarar es que Yin *et al.* (1997) ya habían demostrado que no existe correlación entre la toxicidad o la producción de toxinas en cianobacterias con la carga bacteriana presente en los cultivos, ya que durante algunos años se atribuyó esta capacidad en las cianobacterias a la presencia obligada de bacterias en blooms tóxicos.

Con respecto a la extracción de ADN genómico, a pesar de ensayar varios métodos, probados con anterioridad en células vegetales, animales, e incluso con resultados exitosos en algunas cianobacterias (Nübel *et al.*, 1997), en este caso no fueron eficientes, debido a lo difícil que resulta la eliminación de la funda gruesa en las especies filamentosas, o bien la disgregación del mucus que rodea a las especies unicelulares. Estos recubrimientos extracelulares dificultan la disrupción mecánica de las células y la extracción de ácidos nucleicos (García-Pichel *et al.*, 2001). Para obtener mejores resultados en la extracción de ADN de cianobacterias es recomendable usar métodos no muy agresivos de disrupción celular, debido a que el ADN puede sufrir daños que reducen la calidad y cantidad de ADN

obtenido. Además es conveniente diseñar tratamientos previos para eliminar al máximo la funda o mucus que recubre las células (Nübel *et al.*, 1997; Whitton y Potts, 2000; Wu *et al.*, 2000; García-Pichel *et al.*, 2001). Estos tratamientos pueden ser físicos, como exposición del material biológico a temperaturas altas ($\sim 70^{\circ}\text{C}$) en baño maría durante algunos minutos para provocar la desnaturalización de los mucopolisacáridos, o bien químicos como exposición a algunos solventes y altas concentraciones de sales (cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 24:1; isopropanol, NaCl, KCl), los cuales eliminan en su mayor parte la funda o la matriz de mucílago y otros contaminantes, sin alterar la integridad de las células y/o ácidos nucleicos (Doyle y Doyle, 1987; Wu *et al.*, 2000).

Otra observación importante de mencionar es que el ADNg una vez extraído, presenta inestabilidad en períodos de tiempo cortos (días), percibiéndose su degradación si se mantenía en buffer TE o agua milli-Q a una temperatura de -20°C (Fig. 5), por lo que es recomendable mantenerlo precipitado en etanol absoluto y conservarlo a una temperatura de -20°C hasta su utilización. Con esta medida se consiguió en este estudio la estabilidad del ADNg por un tiempo prolongado, así como un mejor rendimiento en la amplificación.

Los primers utilizados fueron diseñados para amplificar regiones de la subunidad ribosomal 16s de cianobacterias, alineando todas las secuencias de cianobacterias reportadas hasta esa fecha en el Proyecto de Base de datos Ribosomales o RDP de sus siglas en inglés (Maidak *et al.*, 1997), tomando como referencia la secuencia completa de la subunidad ribosomal 16s de *Escherichia coli* (Brosius *et al.*, 1981) debido a que se han reportado altas tasas de sustitución de nucleótidos y, por consiguiente, variabilidad en esa zona del genoma (Van der Peer *et al.*, 1996). En general, los genes de ARNr se consideran mas conservados en función y estructura que los genes que codifican proteínas (Tamarin, 1996; Twyman, 1999;

Nübel *et al.*, 1997; Neilan, 2002), además de que presentan una gran tasa de sustitución atribuida a diferencias locales en necesidades funcionales y estructurales (Van de Peer *et al.*, 1996). La variabilidad o conservación de nucleótidos en una secuencia tiene implicaciones importantes. Los fragmentos variables sirven, entre otras cosas, como una herramienta para discriminar especies mediante el desarrollo de sondas especie-específicas o primers específicos para PCR (Van de Peer *et al.*, 1996; Nübel *et al.*, 1997). Por otro lado, las regiones conservadas en los genes por lo general están relacionados con funciones específicas en el organismo (Twyman,1999) y pueden ayudar al desarrollo de oligonucleótidos para usarse como iniciadores en la amplificación del mismo gen en otros organismos (Van de Peer *et al.*, 1996; Bolch *et al.*, 1999) y/o conocer sus relaciones y origen filogenéticos (Barker *et al.*, 2000; López-Cortés *et al.*, 2001; Litvaitis, 2002; Neilan, 2002). En varios estudios se ha corroborado que algunas regiones de la subunidad ribosomal 16s (ARNr) de cianobacterias son herramientas muy versátiles para identificar y discriminar especies y cepas del mismo aislamiento u origen (Nübel *et al.*, 1997; Nübel *et al.*, 1999; Pomati, *et al.*, 2000), además de que estas secuencias son independientes de condiciones de crecimiento o de cultivo, y pueden ser recuperadas de pequeñas cantidades de ADNg extraído de cultivos de laboratorio o de muestras silvestres (Neilan *et al.*, 1994; Nübel *et al.*, 1997; Twyman,1999).

Nübel y sus colaboradores en 1997, diseñaron algunos oligos para amplificar esta región del genoma, mencionando que el primer CYA106F coincidió con varios reportes hechos en el GenBank, relacionados con la subunidad ribosomal 16s de procariontes no relacionados con el Phylum Cyanobacteria, muchos de esos datos no contenían el sitio blanco del primer reverso (CYA781R-I y II, Tabla IV), además de que no coincidían en muchos de los

nucleótidos (un error de cada tres nucleótidos), concluyendo que no recomendaban este primer para análisis de comunidades microbianas. Sin embargo, en este trabajo se observaron diferentes resultados, en gran medida debido al avance que se ha suscitado desde entonces, en materia de herramientas moleculares y por consiguiente al crecimiento de la base de datos del GenBank y del RDP. El uso del primer CYA106F junto con el CYA781-I mostraron coincidencias muy precisas en las secuencias de las especies estudiadas comparándolas con las de referencia y las que se habían reportado anteriormente (Figura 9), con pocos emparejamientos erróneos e incluso coincidiendo con la misma cepa, como es el caso de *Nodularia spumigena* de UTEX B2092 (Tabla VII). Al construir el dendograma de homologías (Figura 9) se corroboró la confiabilidad de los resultados, agrupándose las especies filamentosas en 4 grupos pertenecientes a los géneros *Schizothrix*, *Anabaena*, *Nodularia* y *Geitlerinema*, separadas de la única especie unicelular *Synechococcus*, la cual compartía solo el 86% de homología con el resto. Estos resultados son coherentes con las relaciones filogenéticas reportadas previamente, utilizando secuencias de ADNr 16s (López-Cortés *et al.*, 2001; Litvaitis, 2002; Neilan, 2002). Por otro lado, se pudieron diferenciar dos especies del género *Anabaena* (*A. variabilis* y *A. flos-aquae*, Tabla VII), distinguiendo inclusive una cepa silvestre de las otras especies de referencia (CIBNOR 23A. *A. variabilis*, Tlahuac), la cual no había sido identificada correctamente (*A. negroviridis*, Tabla III) utilizando técnicas clásicas (microscopía y morfometría). Esta cepa fue reportada como asociada a intoxicación y muerte de aves migratorias, dentro de un bloom polialgal (Sierra-Beltrán *et al.*, 2000). Aunado a lo anterior, probablemente existen dos especies diferentes dentro del género *Geitlerinema*, ya que la cepa CIBNOR 29A (Tabla VI), que proveniente de un estero en Mazatlán, presenta

muchas regiones variables al compararla con los otros 4 cultivos del mismo género, 3 de ellas de diferentes localidades (cepas CIBNOR 30A, 31A y 34) pero una del mismo origen (cepa CIBNOR 25A, Mazatlán estero). Todas las cepas del género comparten un porcentaje de homología y coincidencias de nucleótidos muy altos (Tabla VII y Apéndice II). Algo que es importante mencionar es que este género no había sido previamente relacionado con eventos tóxicos y, en este trabajo se cuenta con un cultivo (cepa CIBNOR 34) relacionado con intoxicación y muerte de peces en Cabo San Lucas, México (reporte no publicado). Lo anterior no significa que la especie sea tóxica *per se*, sin embargo, es importante tomar en cuenta la relación ecológica que puede vincular esta especie con otras especies tóxicas formadoras de blooms. Adicionalmente, se han reportado varios eventos dañinos causados por cianobacterias no tóxicas, los cuales al crecer de manera desmedida, y formar en la superficie una gruesa capa constituida por millones de filamentos o por una espesa matriz mucilaginosa, obstruyen el paso de la luz en los cuerpos de agua, causando alteraciones y muerte en los organismos que lo habitan (Whitton y Potts, 2000). También se ha reportado muerte de zooplancton al perder motilidad, muerte en crustáceos y peces por la obstrucción de branquias dificultando el intercambio de O_2 , y daños en órganos filtradores de muchos organismos debido a la adherencia de los filamentos o el mucus a éstos órganos (Carmichael y Falconer, 1993; Zambrano y Canelo, 1996; Karunasagar y Karunasagar, 1997; Codd, 1998; Whitton y Potts, 2000). Es importante mencionar lo anterior debido a que las proliferaciones de cianobacterias pueden impactar de muchas formas la salud del ecosistema sin estar necesariamente relacionadas con producción de toxinas (Whitton y Potts, 2000).

En el caso de las secuencias de *Schizothrix calcicola*, las coincidencias de nucleótidos y la proporción de identidades fueron menores (Tabla VII) debido a que no existen reportes previos de este género en el GenBank. Sin embargo, tanto las especies de referencia de agua dulce, como la silvestre del estero en Mazatlán (cepas CIBNOR 1, 4 y 15A, Tabla III), tuvieron un porcentaje de homología muy alto entre sí (Apéndice II) coincidiendo en parte con una especie filamentosa perteneciente al Orden Oscillatoriales (Tabla VII). Estas secuencias son los primeros reportes del género en el GenBank para este género. Además, no hubo diferencias entre las especies de agua dulce y la cepa salobre; esta especie ha sido reportada como tóxica (Lighner *et al.*, 1978; Lighner, 1983; Premazzi y Volterra, 1993; Whitton y Potts, 2000) y ha sido asociada a intoxicación y muerte de camarones cultivados e irritación en humanos en afloramientos poliespecíficos, en la misma región donde fue colectada la muestra silvestre (Cortés-Altamirano y Licea-Durán, 1999). Finalmente, el bloom del que se aisló la cepa CIBNOR 15 fue vinculada con muerte en peces (datos no publicados).

El género *Synechococcus* (única especie unicelular incluida en los resultados) presentó la más baja proporción de identidades con la cepa de referencia del GenBank (Tabla VII), pero por su origen silvestre, el número de fragmentos variables que presenta (Apéndice II), haberse reportado como tóxica en la misma región donde se colectó (Cortés-Altamirano y Licea-Durán, 1999) y haber sido aislada de un bloom donde se reportó muerte en peces (datos no publicados), representa un resultado importante ya que también había sido identificada de manera errónea mediante técnicas clásicas (Tabla III) y nos proporciona información valiosa para el diseño eventual de sondas especie-específicas y la creación de mapas biogeográficos de especies de cianobacterias tóxicas de la región Noroeste de

México. Con todo lo anterior, se puede concluir que el primer CYA106F junto con el CYA781R-I es efectivo para identificar de manera confiable especies de cianobacterias y discriminarlas a nivel género, especie e incluso cepas, tanto de origen marino como de agua dulce.

Por otro lado, el primer CYA359F reportado por Nübel y sus colaboradores (1997) como el más adecuado para la discriminación a nivel género, especie y cepas en cianobacterias, además de estudios de microbiota en comunidades polialgales, resultó en amplificaciones con bajo rendimiento y en la mayoría de los casos no hubo amplificación. Este primer contiene una degeneración de nucleótidos C/T, además de que los primers CYA781R-I y II presentan algunas sustituciones en nucleótidos entre sí, que proveen de una mayor probabilidad de amplificar el genotipo en cianobacterias (Nübel *et al.*, 1997). Debido a estas características que distinguen ambos primers forward, probablemente tengan diferentes requerimientos para una amplificación más efectiva, como por ejemplo, el aumento de la temperatura de alineamiento en el PCR, para proveer un mejor apareamiento de las bases del primer con el fragmento blanco del templado o bien evitar un alineamiento no específico del primer con fragmentos no deseados del ADNg. Adicionalmente se han reportado algunos cambios y pasos extra en la amplificación por PCR para cianobacterias, como un paso intermedio de 1 minuto a 80°C entre la primera desnaturalización (5 min a 94°C, Tabla V) y los 30 ciclos subsiguientes (Nübel *et al.*, 1997; López-Cortés *et al.*, 2001), variaciones en el tiempo y la temperatura de alineamiento, así como el número de ciclos (Neilan *et al.*, 1994; Rudi *et al.*, 1998; Moffitt *et al.*, 2001), todo esto para mejorar la especificidad de los primers durante la amplificación. Estas alternativas podrían dar como resultado la obtención de amplicones de mejor calidad en las muestras estudiadas. Por otro

lado, es interesante mencionar que todas las secuencias obtenidas en este estudio poseían la sustitución T en el fragmento correspondiente al primer CYA359F (Tabla IV), no encontrando ni una sola con sustitución C. Nübel y colaboradores (1997) mencionan que aproximadamente el 50% de los genotipos de cianobacterias poseen la sustitución T y el otro 50% la C. Lo anterior puede dar indicios de la futura utilización de esta herramienta para crear mapas biogeográficos debido a que, hasta la fecha, solo se han reportado secuencias con sustitución T para esta región, comparando estos resultados con los datos obtenidos por López-Cortés y colaboradores (2001).

Haciendo el alineamiento de las secuencias obtenidas con la secuencia completa del ADNr 16s de *E. coli* (Brosius *et al.*, 1981) se pudo identificar el fragmento amplificado, que inicia aproximadamente del nucleótido 1664 hasta el 2290 (datos no presentados). Basándose en la numeración anterior y con el análisis de alineamiento en el DNAMAN[®] es posible identificar fragmentos variables para el diseño de sondas género-específicas y especie-específicas. En la Tabla VIII se muestran algunos ejemplos, donde a partir de los nucleótidos 2069 y 2092 (~405 y 428, Apéndice II) existen fragmentos variables que distinguen a los 5 géneros caracterizados: *Schizothrix*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Geitlerinema* y *Synechococcus*. Con estas variaciones en la secuencia del 16s ADNr se podrán diseñar primers específicos o sondas género-específicas que ayudarán a la discriminación de estos géneros. Por otro lado, para el diseño de sondas especie-específicas se pueden dar dos ejemplos con varios fragmentos útiles (Tabla IX). En la secuencia de la muestra silvestre de *Geitlerinema* (Cultivo 29) hay fragmentos que comienzan a partir de los nucleótidos 1674 y 1704 (~10 y 40, Tabla IX y Apéndice II) los cuales distinguen esta especie de los otros géneros e incluso de las otras especies de *Geitlerinema*, además de que entre los

nucleótidos 2092 y 2139 (~427-475, Apéndice II), hay fragmentos particulares de esta cepa. El segundo ejemplo es el de *Anabaena variabilis* (CIBNOR 23A) en el que, a partir de los nucleótidos 1714 y 1757 (~50 y 93, Tabla IX y Apéndice II) existen varias sustituciones de nucleótidos y fragmentos que la distinguen de las demás cepas de *A. variabilis*. Este último ejemplo así como el de *Synechococcus sp.* y *Schizothrix calcicola* (de origen silvestre) pueden interpretarse como herramientas que ayudarán a la identificación confiable de cepas de cianobacterias tóxicas o asociadas a eventos de toxicidad. Aunque esta región del ADNr 16s no ha sido relacionada con la capacidad tóxica de las cianobacterias, las fracciones variables que distinguen cepas tóxicas de las que no lo son proveen una herramienta muy útil en este aspecto.

A pesar de que los resultados obtenidos presentan avances hacia la discriminación de géneros, especies y cepas de cianobacterias, este método aún resulta costoso para aplicarlo a los monitoreos rutinarios en cuerpos de agua naturales y artificiales, para un posible diagnóstico de la presencia de cianobacterias tóxicas. Es importante tomar medidas más concretas a futuro, como el diseño de sondas especie-específicas y primers específicos para PCR. Sin embargo, estos datos pueden ser el comienzo de la creación de mapas biogeográficos de especies de cianobacterias tóxicas en el Noroeste de México. Es importante tomar en cuenta que las especies de cianobacterias cambian muchas características morfológicas al someterlas a condiciones de laboratorio, lo cual puede interpretarse también al nivel bioquímico, fisiológico y molecular (expresión de algunos genes), no manifestándolas en medios ricos en nutrientes (Whitton y Potts, 2000). Por lo tanto, se debe tener cuidado en la interpretación de los datos obtenidos para aplicarlos en campo, ya que en estas situaciones los organismos están creciendo bajo condiciones

limitantes de nutrientes y con presiones ambientales que no se pueden controlar en laboratorio, lo cual se puede traducir en diferentes resultados a nivel fisiológico comparado con cepas de laboratorio.

Whitton y Potts (2000) mencionan que el uso de herramientas moleculares para la identificación de cianobacterias no solucionará todos los problemas, y cuestionan cuánto podrán ayudar en la confirmación de los taxa reconocidos actualmente. Desafortunadamente los árboles filogenéticos publicados muestran similitudes entre cepas basados en fragmentos particulares del genoma y frecuentemente se han utilizado cepas cuyos nombres genéricos y específicos son dudosos. Esto restringe el valor de tales resultados, comparando relaciones evolutivas con relaciones taxonómicas sugeridas por técnicas clásicas.

9. Conclusiones

Como conclusión del trabajo se puede decir que los oligos CYA106F y CYA781R-I son útiles para la amplificación de fragmentos del ADNr 16s. La secuencia parcial de esta fracción del ADNr presenta variaciones importantes para la discriminación de géneros, especies y cepas de cianobacterias tóxicas y no tóxicas. Además, es una herramienta importante para la identificación confiable de los taxa, provee información para el eventual diseño de sondas género-específicas, especie-específicas y oligos para PCR, los cuales podrán ser utilizados en el futuro para establecer planes de monitoreo de especies de cianobacterias potencialmente dañinas en reservorios de agua.

Estos resultados también marcan la pauta para crear mapas biogeográficos de especies tóxicas para la región Noroeste del país. Finalmente, es importante mencionar que las herramientas moleculares no resolverán todos los problemas que existen en cuanto a la identificación confiable de cianobacterias, pero ayudarán en la unificación de criterios en el futuro.

Es recomendable combinar las ventajas que proporcionan estas técnicas con las metodologías clásicas (microscopía) para un consenso más rápido y sólido, además de los ensayos en ratón, cromatografía, inmunoensayos, etc., para el caso de especies tóxicas, consiguiendo resultados integrales que coadyuven al monitoreo y manejo de cuerpos de agua naturales y artificiales.

10. Literatura Citada

- Alonso-Rodríguez, R.** y Páez-Osuna, F. 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. *Aquaculture*, **219**: 317-336.
- Allen, M.M.** 1973. Methods for Cyanophyceae. En: Stein, J.R.(ed.). Handbook of physiological methods: culture methods and growth measurements. Cambridge University Press. 127-138 pp.
- Amorim, A.** y V. Vasconcelos. 1999. Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Toxicon*, **17**: 1041-1052.
- Anderson, R.J.,** H.A. Luu, D.Z.X. Chen, C.F.B. Holmes, M.L. Kent, L. Leblanc, F.J.R. Taylor y D.E. Williams. 1993. Chemical and biological evidence links microcystins to salmon “netpen liver disease”. *Toxicon*, **31**: 1315-1323.
- Baker, J.,** B.A. Neilan, B. Entsch y D. McKay. 2001. Molecular analysis of cyanobacterial blooms events in one water body. En: Hallegraeff, G.M., S.I. Blackburn, C.J. Bolch y R.J. Lewis (eds.). Harmful Algal Blooms 2002. IOC-UNESCO. Francia, 230-233 pp.

- Barker, G.I., A. Kanopka, B.A. Handley y P.H. Hayes.** 2000. Genetic variation in *Aphanizomenon* (Cyanobacteria) colonies from the Baltic Sea and North America. *J. Phycol.* **36**: 947-950.
- Beltran, E.C. y B.A. Neilan.** 2000. The molecular diversity of *Anabaena circinalis*. Abstracts IX International Conference on Harmful Algal Blooms. Tasmania, Australia, p 84.
- Bolch, C.J. y S.I. Balckburn.** 1996. Isolation and purification of Australian isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kütz. *J. Appl. Phycol.* **8**: 5-13.
- Bolch, C.J., P.T. Orr, G.J. Jones y S.I. Blackburn.** 1999. Genetic, morphological, and toxicological variations among globally distributed strains of *Nodularia* (Cyanobacteria). *J. Phycol.* **35**: 339-355.
- Brosius, J., T. Dull, D.D. Sleeter y H.F. Noller.** 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **148**: 107-127.
- Bury, N.R., A.D. Newlands, F.B. Eddy y G.A. Codd.** 1998. *In vivo* and *in vitro* intestinal transport of ³H-microcystin-LR, a cyanobacterial toxin, in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicol.*, **42**: 139-148.
- Carmichael, W.W. y I.R. Falconer.** 1993. Disease related to freshwater blue-green algal toxins and control measures. En: I.R. Falconer (ed.) *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic Press. Gran Bretaña, 187-209 pp.
- Carmichael, W.W.** 1995. Cyanobacterial toxins. En: Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cembella y H.O. Enevoldsen (eds.). *Manual of Harmful Marine Microalgae*. IOC-UNESCO. Francia, 163-175 pp.

- Carmichael**, W.W. 2001. A mini-review of cyanotoxins; toxins of cyanobacteria (blue-green algae). En: W.J. De Koe, R.A. Samson, H.P. van Egmond, J. Gilbert y M. Sabino (eds.). *Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millenium*. IUPAC & AOAC Int. Wageningen, Holanda, 495-504 pp.
- Carpenter**, E.J. y W.W. Carmichael. 1995. Taxonomy of Cyanobacteria. En: Hallegraeff, G.M., D.M. Anderson, A.D. Cembella y H.O. Enevoldsen (eds.). *Manual of Harmful Marine Microalgae*. IOC-UNESCO. Francia, 373-380 pp.
- Codd**, G.A. 1998. Cyanobacterial blooms and toxins in fresh, brakish and marine waters. En: Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández y T. Wyatt (eds.). *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and IOC-UNESCO. Santiago de Compostela, España, 13-17 pp.
- Cortés-Altamirano**, R., F.A. Manrique y R. Luna-Soria. 1997. Harmful phytoplankton blooms in shrimp farms from Sinaloa, Mexico. En: Abstracts VIII International Conference on Harmful Algae. Vigo, España, p 56.
- Cortés-Altamirano**, R. y S. Licea-Durán. 1999. Florecimientos de microalgas nocivas en estanques de cultivo semi-intensivo de camarón en México. *Rev. Latinoamer. Microbiol.*, **41**:157-166.
- Dawes**, C.J. 1981. *Marine Botany*. John Wiley & Sons. E.U.A., 628 pp.
- Doyle**, J.J., and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation from small amount of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11-15.
- Druvietis**, I. y V. Rodinov. 2001. Cyanobacteria blooms in dammed reservoirs, the Daugava River, Latvia. En: Hallegraeff, G.M., S.I. Blackburn, C.J. Bolch y R.J. Lewis (eds.). *Harmful Algal Blooms 2000*. IOC-UNESCO. Francia, 105-107 pp.

- Dyble, J.** y H.W. Paerl. 2000. Detection of cyanobacterial HAB species using molecular approaches: the utility of NIFH and 16s rRNA characterization and probing studies. Abstracts IX International Conference on Harmful Algal Blooms. Tasmania, Australia, p 113.
- Falconer, I.R.** 1993. Measurement of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs. En: I.R. Falconer (ed.) Algal toxins in seafood and drinking water. Academic Press. E.U.A., 165-176 pp
- Fergusson, K.M,** M.A. Schembri, y C.P. Saint. 2001. The use of molecular techniques to characterize toxic cyanobacteria. En: Hallegraeff, G.M., S.I. Blackburn, C.J. Bolch y R.J. Lewis (eds.). Harmful Algal Blooms 2000. IOC-UNESCO. Francia, 234-237 pp.
- Fernández, M.L.,** A. Míguez, A. Morono, E. Cacho, A. Martínez y J. Blanco. 1998. Detoxification of low polarity toxins (DTX3) from mussels *Mytilus galloprovincialis* in Spain. En: Reguera, B., J. Blanco, M.L. Fernández y T. Wyatt (eds.). Harmful Algae. Xunta de Galicia and IOC-UNESCO. Santiago de Compostela, España, 449-452 pp.
- García-Pichel, F.,** A. López-Cortés y U. Nübel. 2001. Phylogenetic and morphological diversity of cyanobacteria in soil desert crust from the Colorado plateau. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 1902-1910.
- Garnett, C.,** G. Shaw, P. Florian y B. Chiswell. 2000. Preliminary assessment of the effect of climate change on risks from cyanobacterial blooms. En: Abstracts IX International Conference on Harmful Algal Blooms. Tasmania, Australia, p 18.

- González-Gil**, S., Aguilera A, López-Rodas, V. y Costas E. 1999. Characterization of morphospecies and strains of *Pseudoanabaena* (Cyanophyceae) from laboratory cultures using antibodies and lectins. *Eur. J. Phycol.*, **34**: 27-33.
- Gosh**, S., S.A. Khan, M. Wickstrom y V. Beasley. 1995. Effects of microcystin-LR on Actin and the Actin-associated proteins α -Actin and Talin in hepatocytes. *Natural Toxins*, **3**: 405-414.
- Hallegraeff**, G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia.*, **32**: 79-99.
- Hallegraeff**, G.M, D.M. Anderson , A.D. Cembella, H.O. Enevoldsen. 1995. Manual of Harmful Micoralgae. IOC-UNESCO. E.U.A., 556 pp.
- Harada**, K. y K. Tsuji. 1998. Persistence and Decomposition of Hepatotoxic Microcystins produced by Cyanobacteria in Natural Environment. *J. Toxicol. Toxin Review.*, **17**: 385-403.
- Jones**, G. 2000. Cyanobacterial bloom ecology and management. The Australian experience. En: Abstracts IX International Conference on Harmful Algal Blooms. Tasmania, Australia, p 27.
- Karunasagar**, I., S.K. Otta y I. Karunasagar. 1997. Harmful algal blooms in shrimp culture ponds in India. En: Abstracts VIII International Conference on Harmful Algae. IOC-UNESCO. Vigo, España, p 111.
- Khan**, S.A., M.L.Wickstrom, W.M. Haschek, D.J. Schaeffer, S. Gosh y V.R. Beasley. 1996. Microcystin-LR and kinetics of cytoskeletal reorganization in hepatocytes, kidney cells and fibroblasts. *Natural Toxins*, **4**: 206-214

- Kotak, B.G. S. Semalulu, D.L. Fritz, E.E. Prepas, S. E. Hrudey y R.W.Coppock. 1996.** Hepatic and renal pathology of intraperitoneally administrated microcystin-LR in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon*, **34**: 517-525.
- Lambert, T.W., C.F.B. Holemes y S.E. Hrudy. 1994.** Microcystin class of toxins: health effects and safety of drinking water supplies. *Environmental Rev.*, **2**: 167-186.
- Landsberg, J.H. 1996.** Neoplasia and biotoxins in bivalves: is there a connection? *J. of Shellfish Research*. **15**: 203-230
- Landsberg, J.H. y S. Shumway. 1998.** Harmful algal blooms and their effects on marine and estuarine animals. En: III International Symposium on Aquatic Animal Health. E.U.A. 58-63 pp.
- Legrand, A.M., E. Benoit y J. Molgo. 2001.** Toxicology of phycotoxins targeting sodium channels. En: W.J. De Koe, R.A. Samson, H.P. van Egmond, J. Gilbert y M. Sabino (eds.). Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millenium. IUPAC & AOAC Int. Wageningen, Holanda, 455-462 pp.
- Li, R., W.W. Carmichael, S. Brittain, G.K. Ealesham, G.R. Shaw, A. Mahakhant, N. Noparatnaraporn, W. Yongmanitchai, K. Kaya y M.M. Watanabe. 2001.** Isolation and identification of the cyanotoxin cylindrospermopsin and deoxy-cylindrospermopsin from Thailand strain of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria). *Toxicon*, **39**: 973-980.
- Lightner, D.V., D. Danald, R. Redman, C. Brand, B. Salser y J. Reprieta. 1978.** Suspected blue-green algal poisoning in the blue shrimp (*Penaeus stylirostris*). *Proc. Maricul. Soc.* 447 pp.

- Lightner**, D. 1983. Diseases of cultured penaeid shrimp. En: Handbook of mariculture. McVey, J.P. y J.R. Moore (eds). CRC Press. Florida, E.U.A. 289-320 pp.
- Lirás**, V., M. Lindberg, P. Nystrom, H. Annadotter, L. Lawton y B. Graf. 1998. Can ingested cyanobacteria be harmful to the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*)? *Freshwater Biology.*, **39**: 233-242.
- López-Cortés**, A. 1990. Microbial mats in tidal channels at San Carlos, Baja California Sur, México. *J. Geomicrobiology*, **8**: 69-85.
- López-Cortés**, A. y D. Tovar. 1992. Population changes in cyanobacterial mats and role of NaCl on β -carotene production in *Microcoleus* strain SC7B9002-1. *J. Geomicrobiology*, **10**: 115-123.
- López-Cortés**, A. 1999. Population changes of benthic cyanobacteria during a shrimp production operation. *Algological Studies*, **94**: 245-248.
- López-Cortés**, A., F. García-Pichel, U. Nübel y R. Vázquez-Juárez. 2001. Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, México: a polyphasic study. *Int. Microbiol.*, **4**: 227-236.
- Litvaitis**, M.K. 2002. A molecular test of cyanobacterial phylogeny: interferences from constraint analyses. *Hydrobiologia*, **468**: 135-145.
- MacKintosh**, R.W., K.N. Dalby, D. G. Campbell, P.T.W. Cohen, P.Cohen y C. MacKintosh. 1995. The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1. *FEBS Letters*, **37**: 236-240.
- Maidak**, B.L., G.J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M.J. McCaughey y C.R. Woese. 1997. The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*, **25**: 109-110.

- Maya**, Y., A. López-Cortés y A. Soeldner. 2002. Cyanobacterial microbiotic crusts in eroded soils of tropical dry forest in the Baja California Peninsula, México. *J. Geomicrobiology*, **19**: 505-518.
- Medlin**, L.K. 1997. Can molecular techniques help define species limits? *Diatom*, **13**: 19-23.
- Moffitt**, M.C., S.I. Balckburn y B.A. Neilan. 2001. rRNA sequences reflect the ecophysiology and define the toxic cyanobacteria of the genus *Nodularia*. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.*, **51**: 505-512.
- Nagle**, D.G. y V.J. Paul. 1998. Chemical defense of marine cyanobacterial bloom. *J. of Experimental Marine Biology and Ecology*, **225**: 29-38.
- Neilan**, B.A., P.R. Hawkins, P.T. Cox y A.E. Goodman. 1994. Towards a molecular taxonomy for bloom-forming cyanobacteria. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **45**:869-873.
- Neilan**, B.A., M.C. Moffit, D. Tillett, T. Boerner y D.L. Parker. 2000. Cyanobacterial phylogeny and evolution of cyanotoxicity. En: Abstracts IX International Conference on Harmful Algal Blooms. Tasmania, Australia, p 40.
- Nübel**, U., F. García-Pichel y G. Muyzer. 1997. PCR primers to amplify 16s rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 3327-3332.
- Nübel**, U., F. García-Pichel, M. Kühl y G. Muyzer. 1999. Spatial scale and diversity of benthic cyanobacteria and diatoms in a salina. *Hidrobiología.*, **401**: 199-206.
- Ochoa**, J.L. y A.P. Sierra-Beltrán. 1998. Evaluación de las toxinas por métodos de cromatografía líquida de alta resolución. En: Cortes-Altamirano, R. (ed.). Las Mareas Rojas. AGT Edit. Ciudad de México, 107-128 pp

- Paerl**, H.W. y D.F. Millie. 1996. Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia*, **35**: 160-167.
- Pereira**, P., H. Onodera, D. Andrinolo, S. Franca, F. Araujo, N. Lagos y Y. Oshima. 2001. Co-ocurrence of PSP toxins and microcystins in Montargil freshwater reservoir, Portugal. En: Hallegraeff, G.M., S.I. Blackburn, C.J. Bolch y R.J. Lewis (eds.). Harmful Algal Blooms 2000. ICO-UNESCO. Francia, 108-111 pp.
- Pérez-Linares**, J. 2001. Histopatología de postlarvas de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (= *Penaeus vannamei*) expuestas a la cyanobacteria *Schizothrix calcicola*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México, 57 pp.
- Pérez-Linares**, J., M. Cadena, C. Rangel, M.L. Unzueta-Bustamante y J.L. Ochoa. 2003. Effect of *Schizothrix calcicola* on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (*Penaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture*, **218**: 55-65.
- Pomati**, F., S. Sacchi, C. Rosetti y S. Giovannardi. 2000. The freshwater cyanobacterium *Planktothrix* sp FP1: Molecular identification and detection of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Phycol.*, **36**: 553-562.
- Premazzi**, G. y L. Volterra. 1993. Microphyte toxins. Joint Research Center. Italy, 336 pp.
- Prescott**, G.W. 1968. The Algae: a review. Houghton Mifflin Company. E.U.A., 436 pp.
- Quilliam**, M.A., P. Hess y C. Dell'Aversano. 2001. Recent developments in the análisis of phycotoxins by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. En: W.J. De Koe, R.A. Samson, H.P. van Egmond, J. Gilbert y M. Sabino (eds.). Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the millenium. IUPAC & AOAC Int. Wageningen, Holanda, 383-391 pp.

- Ramírez, C.** 1998. Evaluación de biotoxinas por el método de bioensayo en ratón. En: Las Mareas Rojas. Cortes-Altamirano, R. (ed.). AGT Edit. México. 95-106 pp.
- Rheinheimer, G.** 1980. Aquatic microbiology. John Wiley & Sons. Alemania, 235 pp.
- Robillot, C., J. Winh, S. Puiseus-Dao y M.C. Hennion.** 2000. Hepatotoxic production kinetic of cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC-Mass Spectrometry and protein phosphatase assay. *Environ. Sci. Technol.*, **34**: 3372-3378.
- Roset, J., S. Aguayo y M.J. Muñoz.** 2001. Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión. *Rev. Toxicol.*, **18**: 65-71.
- Rouhiainen, L., K. Sivonen, W.J. Buikema y R. Haselkorn.** 1995. Characterization of toxin-producing cyanobacteria by using an oligonucleotide probe containing a tandemly repeated heptamer. *J. Bacteriol.*, **177**: 6021-6026.
- Rudi, K., O.M. Skulberg, F. Larsen y K.S. Jacobsen.** 1998. Quantification of toxic cyanobacteria in water by use of competitive PCR followed by sequence-specific labeling oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 2639-2643.
- Saker, M.L. y G.K. Eaglesham.** 1999. The accumulation of cylindrospermopsin from the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* in tissue of Redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Toxicon*, **37**: 1065-1077.
- Saint, C.P., K.M. Wilson, M.A. Schembri, S.J. Baker y B.A. Neilan.** 2000. The use of molecular techniques to characterize toxic cyanobacteria. En: Abstracts IX International Conference on Harmful Algal Blooms. Tasmania, Australia, p 52.
- Scarafia, M.E., A.M. Agnese y J.L. Cabrera.** 1995. *Microcystis aeruginosa*: behaviour and toxic features in San Roque Dam (Argentina). *Natural Toxins*, **3**: 75-77.

- Scoging**, A.C. 1998. Marine Biotoxins. *J. App. Microbiol. Symposium Supplement*, **84**: 41-50.
- Skulberg**, O. M., W.W. Carmichael, G.A. Codd y R. Skulberg. 1993. Taxonomy of toxic cyanophyceae (cyanobacteria). En: I.R. Falconer (ed.) *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic Press. E.U.A., 145-164 pp.
- Smith**, P. 1996. Toxic effects of blooms of marine species of Oscillatoriales on farmed prawns (*Penaeus monodon*, *Penaeus japonicus*) and brine shrimp (*Artemia salina*). *Toxicon*, **34**(8): 857-869.
- Sierra-Beltrán**, A. y R. Cortés-Altamirano. 2000. Toxicity of cyanobacterial isolates from blooming events in Mexico. En: XIIIth World Congress of the International Society on Toxinology (IST). París, Francia. p 45.
- Sierra-Beltrán**, A., J. Pérez-Linares, I. Leyva-Valencia, A. Cordero-Tapia y J. Cerecero-Gutiérrez. 2000. Mortandad de aves originada por un afloramiento de cianobacterias en una Laguna-Humedal en la ciudad de México. En: E. Ríos-Jara, E. Juárez-Carrillo, M. Pérez-Peña, E. López-Urriarte, E.G. Robles-Jarero, D.U. Hernández-Becerril y M. Silva-Briano (eds.). *Estudios sobre plancton en México y el Caribe. Sociedad Mexicana de Planctología y Universidad de Guadalajara*. Guadalajara, México, 140-141 pp.
- Stanier**, R.Y., W.R. Sistrom, T.A., Hansen, B.A. Whitton, R.W. Castenholz, N. Pfenning, V.N. Gorlenko, E.M.N. Kondratieva, K.E. Eimhjellen, R. Whittenbury, R.L. Gherna y H.G. Trüper. 1978. Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **28**: 335-336.

- Tamarin**, R.H. 1996. Principios de Genética. Reverté, S.A. Barcelona, España, 607 pp.
- Turner**, S., T.C. Huang y S.M. Chaw. 2001. Molecular phylogeny of nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, **42**: 181-186.
- Twyman**, R.M. 1999. Advanced Molecular Biology. BIOS Scientific Publishers. Reino Unido, 499.
- UK Environment Agency**. 1998. The determination of microcystin algal toxins in raw and treated waters by high performance liquid chromatography. En: Methods for the examination of waters and associated materials. Environment Agency. Reino Unido. 13 pp.
- Van de Peer**, Y. S. Chapelle y R. De Wachter. 1996. A quantitative map of nucleotide substitution rates in bacterial rRNA. *Nucleic Acids Research*, **24**: 3381-3391.
- Whitton**, B.A. y M. Potts. 2000. The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers. Países Bajos, 631 pp.
- Willame**, R. y L. Hoffmann. 1999. Bloom-forming blue-green algae in Belgium and Luxembourg. En: Morphology, Taxonomy, Ecology. Cyanobacteria/Cyanophyta. 14th Symposium of the IAC. Komárek, J., P. Eloranta y O. Lhotsky. (eds). IAC. Stuttgart, Alemania, 328 pp.
- Williams**, D.E., S.C. Dawe, M.L. Kent, R.J. Andersen, M. Craig y C.F. Holmes. 1997a. Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis* and *in vivo* evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues. *Toxicon*, **35**: 1617-1625.

- Williams**, D.E., M. Craig , S.C. Dawe, M.L. Kent, C.F. Holmes y R.J. Andersen. 1997b. Evidence for a covalently bound form of microcystin-LR in salmon liver and dungeness crab larvae. *Toxicon*, **10**: 463-469.
- WHO**, (World Health Organisation). 1998. Guidelines for drinking-water quality. En: Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Génova, Suiza, 281-283 pp.
- Wu**, X., A. Zarka y S. Boussiba. 2000. A simplified protocol for preparing DNA from filamentous cyanobacteria. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **18**: 385-392.
- Yin**, Q., W.W. Carmichael y W.R. Evans. 1997. Factors influencing growth and toxin production by cultures of the freshwater cyanobacterium *Lyngbya wollei* Farlow ex Gomont. *J. Appl. Phycol.*, **9**: 55-63.
- Zambrano**, F. y E. Canelo. 1996. Effects of microcystin-LR on the partial reactions of the Na⁺-K⁺ pump of the gill of carp (*Cyprinus carpio* Linneo). *Toxicon*, **34**: 451-458.

APÉNDICE I

Secuencias finales obtenidas para cada uno de las especies caracterizadas.

Secuencia: 1Scal UTEX 1935

No. de Registro: AY271841

Especie: *Schizothrix calcicola*

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 1. UTEX 1935

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 599

Orientación: (-)

```

1      GACAACCGTT GGAAACGACG GCTAATACCG CATATGGCGA GAGCTAAAAG CTTAATGTGC
61     CTGAGGATGA ACTCGCGTCT GATTAGCTAG TTGGTGAAGT AAAGGTTTAC CAAGGCGACG
121    ATCAGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC
181    CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATTTTCCG CAATGGGGGC AACCCCTGACG GAGCAACGCC
241    GCGTGGGGGA GGAATGTCTG TGGATTGTAA ACCCCTTTTC TCAGGGAAGA AGATCTGACG
301    GTACCTGAGG AATCAGCATC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAG ACGGAGGATG
361    CAAGCGTTAT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA GCGTCCGTAG GCGGTTTATC AAGTCTGTCTG
421    TTAAAGACTG CAGCTTAACT GTGGGCGAGC GGTGGAAACT GATTAAGTAG AGTGTGGTAG
481    GGGTAGAGGG AATTCCCAGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA TATTGGGAAG AACACCAGTG
541    GCGAAGGCGC TCTACTGGGC CACAACCTGAC GCTGAGGGAC GAAAGCTAGG GGAGCTTGC

```

Secuencia: 2Avar UTEX 1444

Especie: *Anabaena variabilis*

No. de Registro: AY271842

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 2. UTEX 1444

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 615

Orientación: (-)

```

1      GAATCTAGCT CTAGGTCGGG GACAACCACT GGAAACGGTG GCTAATACCG GATGTGCCGA
61     AAGGTGAAAAG ATTTATTGCC TAGAGATGAG CTCGCGTCTG ATTAGCTAGT TGGTGTGGTA
121    AGAGCGCACC AAGGCGACGA TCAGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC AACTGGGAC
181    TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATTTTCCGC AATGGGCGAA
241    AGCCTGACGG AGCAATACCG CGTGAGGGAG GAAGGCTCTT GGGTTGTAAA CCTCTTTTCT
301    CAGGGAATAA GAAAGTGAAG GTACCTGAGG AATAAGCATC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG
361    CCGCGGTAAT ACGGAGGATG CAAGCGTTAT CCGGAATGAT TGGGCGTAAA GCGTCCGCAG
421    GTGGCACTGT AAGTCTGCTG TTAAAGAGCA AGGCTCAACC TTGTAAAGGC AGTGGAAACT
481    ACAGAGCTAG AGTACGTTTC GGGCAGAGGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA
541    GATCAGGAAG AACACCGGTG GCGAAAGCGC TCTGCTAGGC CGTAACTGAC ACTGAGGGAC
601    GAAAGCTAGG GGAGC

```

Secuencia: 3Nspu UTEX B2092

Especie: *Nondularia spumigena*

No. de Registro: AY271843

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 3. UTEX B2092

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 615

Orientación: (-)

```

1      GAATCTGGCT TCAGGTCGGG GACAACCACT GGAAACGGTG GCTAATACCG GATATGCCGA
61     GAGGTGAAAG GCTTGCTGCC TGAAGATGAG CTCGCGTCTG ATTAGCTAGT AGGTGTGGTA
121    AAAGCGCACC TAGGCGACGA TCAGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC AACTGGGAC
181    TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATTTTCCGC AATGGGCGAA
241    AGCCTGACGG AGCAATACCG CGTGAGGGAG GAAGGCTCTT GGGTTGTAAA CCTCTTTTCT
301    CAGGGAAGAA AAAAATGACG GTACCTGAGG AATAAGCATC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG
361    CCGCGGTAAT ACGGAGGATG CAAGCGTTAT CCGGAATGAT TGGGCGTAAA GGGTCCGCAG
421    GTGGCTATGT AAGTCTGCTG TTAAAGAACC TAGCTTAACT AGGTAAAAGC AGTGGAAACT
481    ACAAGGCTAG AGTGCGTTCG GGGTAGAGGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA
541    TATCAGGAAG AACACCAGTG GCGAAGGCGC TCTACTAGGC CGCAACTGAC ACTGAGGGAC
601    GAAAGCTAGG GGAGC

```

Secuencia: 4Scal UTEX 1935

Especie: *Schizothrix calcicola*

No. de Registro: AY271841

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 4. UTEX 1935

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 599

Orientación: (-)

```

1      GACAACCGTT GGAAACGACG GCTAATACCG CATATGGCGA GAGCTAAAAG CTTAATGTGC
61     CTGAGGATGA ACTCGCGTCT GATTAGCTAG TTGGTGAAGT AAAGGTTTAC CAAGGCGACG
121    ATCAGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACTGTTGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC
181    CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATTTTCCG CAATGGGGGC AACCCTGACG GAGCAACGCC
241    GCGTGGGGGA GGAATGTCTG TGGATTGTAA ACCCCTTTTC TCAGGGAAGA AGATCTGACG
301    GTACCTGAGG AATCAGCATC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAG ACGGAGGATG
361    CAAGCGTTAT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA GCGTCCGTAG GCGGTTTATC AAGTCTGTCG
421    TTAAAGACTG CAGCTTAACT GTGGGCGAGC GGTGGAAACT GATTAAGTAG AGTGTGGTAG
481    GGGTAGAGGG AATTCCAGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA TATTGGGAAG AACACCAGTG
541    GCGAAGGCGC TCTACTGGGC CACAAGTAC GCTGAGGGAC GAAAGCTAGG GGAGCTTGC

```

Secuencia: 5Nspu UTEX B2092

Especie: *Nondularia spumigena*

No. de Registro: AY271843

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 5. UTEX B2092

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 615

Orientación: (-)

```

1      GAATCTGGCT TCAGGTCGGG GACAACCACT GGAAACGGTG GCTAATACCG GATATGCCGA
61     GAGGTGAAAG GCTTGCTGCC TGAAGATGAG CTCGCGTCTG ATTAGCTAGT AGGTGTGGTA
121    AAAGCGCACC TAGGCGACGA TCAGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC AACTGGGGAC
181    TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATTTTCCGC AATGGGCGAA
241    AGCCTGACGG AGCAATACCG CGTGAGGGAG GAAGGCTCTT GGGTTGTAAA CCTCTTTTCT
301    CAGGGAAGAA AAAAATGACG GTACCTGAGG AATAAGCATC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG
361    CCGCGGTAAT ACGGAGGATG CAAGCGTTAT CCGGAATGAT TGGGCGTAAA GGGTCCGCAG
421    GTGGCTATGT AAGTCTGCTG TTAAAGAACC TAGCTTAACT AGGTAAAAGC AGTGAAACT
481    ACAAGGCTAG AGTGCGTTCG GGGTAGAGGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA
541    TATCAGGAAG AACACCAGTG GCGAAGGCGC TCTACTAGGC CGCAACTGAC ACTGAGGGAC
601    GAAAGCTAGG GGAGC

```

Secuencia: 7Aflos UTEX 2383

Especie: *Anabaena flos-aquae*

No. de Registro: AY271844

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 7. UTEX 2388

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 612

Orientación: (-)

```

1      GATCTAGCTC TAGGTCGGGG ACACCCTGGA AACGGTGGCT AATACCGGAT GTGCCGAAAG
61     GTGAAAGATT TATTGCCTAG AGATGAGCTC GCGTCTGATT AGCTAGTTGG TGTGGTAAGA
121    GCGCACCAAG GCGACGATCA GTAGTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA CTGGGACTGA
181    GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGAAT TTTCCGCAAT GGGCGAAAGC
241    CTGACGGAGC AATACCGCGT GAGGGAGGAA GGCTCTTGGG TTGTAAACCT CTTTTCTCAG
301    GGAATAAGAA AGTGAAGGTA CCTGAGGAAT AAGCATCGGC TAACTCCGTG CCAGCAGCCG
361    CGGTAATACG GAGGATGCAA GCGTTATCCG GAATGATTGG GCGTAAAGCG TCCGAGGTG
421    GCACTGTAAG TCTGCTGTTA AAGAGCAAGG CTCAACCTTG TAAAGGCAGT GGAAACTACA
481    GAGCTAGAGT ACGTTCGGGG CAGAGGGAAT TCCTGGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT
541    CAGGAAGAAC ACCGGTGGCG AAAGCGCTCT GCTAGGCCGT AACTGACACT GAGGGACGAA
601    AGCTAGGGGA GC

```

Secuencia: 8Avari UTEX 1444

Especie: *Anabaena variabilis*

No. de Registro: AY271842

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 8. UTEX 1444

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 615

Orientación: (-)

```

1      GAATCTAACT TTAGGTCGGG GACAACCACT GGAAACGGTG GCTAATACCG GATGTGCCGA
61     AAGGTGAAAG ATTTATTGCC TAGAGATGAG CTCGCGTCTG ATTAGCTAGT TGGTGTGGTA
121    AGAGCGCACC AAGGCGACGA TCAGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC AACTGGGAC
181    TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATTTTCCGC AATGGGCGAA
241    AGCCTGACGG AGCAATACCG CGTGAGGGAG GAAGGCTCTT GGGTTGTAAA CCTCTTTTCT
301    CAGGGAATAA GAAAGTGAAG GTACCTGAGG AATAAGCATC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG
361    CCGCGGTAAT ACGGAGGATG CAAGCGTTAT CCGGAATGAT TGGGCGTAAA GCGTCCGCAG
421    GTGGCACTGT AAGTCTGCTG TTAAAGAGCA AGGCTCAACC TTGTAAAGGC AGTGGAAACT
481    ACAGAGCTAG AGTACGTTTC GGGCAGAGGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA
541    GATCAGGAAG AACACCGGTG GCGAAAGCGC TCTGCTAGGC CGTAACTGAC ACTGAGGGAC
601    GAAAGCTAGG GGAGC

```

Secuencia: 9Aflos UTEX 2383

Especie: *Anabaena flos-aquae*

No. de Registro: AY271844

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 9. UTEX 2388

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 612

Orientación: (-)

```

1      GATCTAGCTC TAGGTCGGGG ACACCCTGGA AACGGTGGCT AATACCGGAT GTGCCGAAAG
61     GTGAAAGATT TATTGCCTAG AGATGAGCTC GCGTCTGATT AGCTAGTTGG TGTGGTAAGA
121    GCGCACCAAG GCGACGATCA GTAGCTGGTC TGAGAGGATG ATCAGCCACA CTGGGACTGA
181    GACACGGCCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT TTTCCGCAAT GGGCGAAAGC
241    CTGACGGGAGC AATACCGCGT GAGGGAGGAA GGCTCTTGGG TTGTAAACCT CTTTTCTCAG
301    GGAATAAGAA AGTGAAGGTA CCTGAGGAAT AAGCATCGGC TAACTCCGTG CCAGCAGCCG
361    CGGTAATACG GAGGATGCAA GCGTTATCCG GAATGATTGG GCGTAAAGCG TCCGCAGGTG
421    GCACTGTAAG TCTGCTGTTA AAGAGCAAGG CTCAACCTTG TAAAGGCAGT GGAAACTACA
481    GAGCTAGAGT ACGTTCGGGG CAGAGGGAAT TCCTGGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT
541    CAGGAAGAAC ACCGGTGGCG AAAGCGCTCT GCTAGGCCGT AACTGACACT GAGGGACGAA
601    AGCTAGGGGA GC

```

Secuencia: 10Nspu UTEX B2092

Especie: *Nondularia spumigena*

No. de Registro: AY271843

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 10. UTEX B2092

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 615

Orientación: (-)

```

1      GAATCTGGCT TCAGGTCGGG GACAACCACT GGAAACGGTG GCTAATACCG GATATGCCGA
61     GAGGTGAAAG GCTTGCTGCC TGAAGATGAG CTCGCGTCTG ATTAGCTAGT AGGTGTGGTA
121    AAAGCGCACC TAGGCGACGA TCAGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC AACTGGGAC
181    TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATTTTCCGC AATGGGCGAA
241    AGCCTGACGG AGCAATACCG CGTGAGGGAG GAAGGCTCTT GGGTTGTAAA CCTCTTTTCT
301    CAGGGAAGAA AAAAATGACG GTACCTGAGG AATAAGCATC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG
361    CCGCGGTAAT ACGGAGGATG CAAGCGTTAT CCGGAATGAT TGGGCGTAAA GGGTCCGCAG
421    GTGGCTATGT AAGTCTGCTG TTAAAGAACC TAGCTTAACT AGGTAAAAGC AGTGAAACT
481    ACAAGGCTAG AGTGCCTTCG GGGTAGAGGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA
541    TATCAGGAAG AACACCAGTG GCGAAGGCGC TCTACTAGGC CGCAACTGAC ACTGAGGGAC
601    GAAAGCTAGG GGAGC

```

Secuencia: 11Avari UTEX 1444

Especie: *Anabaena variabilis*

No. de Registro: AY271842

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 11. UTEX 1444

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 615

Orientación: (-)

```

1      GAATCTAGCT CTAGGTCGGG GACAACCACT GGAAACGGTG GCTAATACCG GATGTGCCGA
61     AAGGTGAAAG ATTTATTGCC TAGAGATGAG CTCGCGTCTG ATTAGCTAGT TGGTGTGGTA
121    AGAGCGCACC AAGGCGACGA TCAGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC AACTGGGAC
181    TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATTTTCCGC AATGGGCGAA
241    AGCCTGACGG AGCAATACCG CGTGAGGGAG GAAGGCTCTT GGGTTGTAAA CCTCTTTTCT
301    CAGGGAATAA GAAAGTGAAG GTACCTGAGG AATAAGCATC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG
361    CCGCGGTAAT ACGGAGGATG CAAGCGTTAT CCGGAATGAT TGGGCGTAAA GCGTCCGCAG
421    GTGGCACTGT AAGTCTGCTG TTAAAGAGCA AGGCTCAACC TTGTAAAGGC AGTGAAACT
481    ACAGAGCTAG AGTACGTTTCG GGGCAGAGGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA
541    GATCAGGAAG AACACCGGTG GCGAAAGCGC TCTGCTAGGC CGTAACTGAC ACTGAGGGAC
601    GAAAGCTAGG GGAGC

```

Secuencia: 13Avari UTEX 1444

Especie: *Anabaena variabilis*

No. de Registro: AY271842

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 13. UTEX 1444

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 615

Orientación: (-)

```

1      GAATCTAGCT CTAGGTCGGG GACAACCACT GGAAACGGTG GCTAATACCG GATGTGCCGA
61     AAGGTGAAAG ATTTATTGCC TAGAGATGAG CTCGCGTCTG ATTAGCTAGT TGGTGTGGTA
121    AGAGCGCACC AAGGCGACGA TCAGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC AACTGGGAC
181    TGAGACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC AGCAGTGGGG AATTTTCCGC AATGGGCGAA
241    AGCCTGACGG AGCAATACCG CGTGAGGGAG GAAGGCTCTT GGGTTGTAAA CCTCTTTTCT
301    CAGGGAATAA GAAAGTGAAG GTACCTGAGG AATAAGCATC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG
361    CCGCGGTAAT ACGGAGGATG CAAGCGTTAT CCGGAATGAT TGGGCGTAAA GCGTCCGCAG
421    GTGGCACTGT AAGTCTGCTG TTAAAGAGCA AGGCTCAACC TTGTAAAGGC AGTGGAAACT
481    ACAGAGCTAG AGTACGTTTC GGGCAGAGGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA
541    GATCAGGAAG AACACCGGTG GCGAAAGCGC TCTGCTAGGC CGTAACTGAC ACTGAGGGAC
601    GAAAGCTAGG GGAGC

```

Secuencia: 15Scal Mazt

Especie: *Schizothrix calcicola*, CIBNOR 15

No. de Registro: AY274615

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 15. Estero en Mazatlán, Sinaloa (México), 1999.

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 599

Orientación: (-)

```

1      GACAACCGTT GGAAACGACG GCTAATACCG CATATGGCGA GAGCTAAAAG CTTAATGTGC
61     CTGAGGATGA ACTCGCGTCT GATTAGCTAG TTGGTGAAGT AAAGGTTTAC CAAGGCGACG
121    ATCAGTAGCT GGTCTGAGAG GATGATCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC
181    CTACGGGAGG CAGCAGTGGG GAATTTTCCG CAATGGGGGC AACCCCTGACG GAGCAACGCC
241    GCGTGGGGGA GGAATGTCTG TGGATTGTAA ACCCCTTTTC TCAGGGAAGA AGATCTGACG
301    GTACCTGAGG AATCAGCATC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAG ACGGAGGATG
361    CAAGCGTTAT CCGGAATTAT TGGGCGTAAA GCGTCCGTAG GCGGTTTATC AAGTCTGTCG
421    TTAAAGACTG CAGCTTAACT GTGGGCGAGC GGTGGAAACT GATTAAGTAG AGTGTGGTAG
481    GGGTAGAGGG AATTCAGAGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA TATTGGGAAG AACACCAGTG
541    GCGAAGGCGC TCTACTGGGC CACAAGTAC GCTGAGGGAC GAAAGCTAGG GGAGCTTGC

```


Secuencia: 23Avari Tlah

Especie: *Anabaena variabilis*, CIBNOR 23

No. de Registro: AY274616

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 23. Laguna de Tlahuac, Ciudad de México. 1999.

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 615

Orientación: (-)

```

1      GAATCTACAT TCAGGTCGGG GACAACCACT GGAAACGGTG GCTAATACCG GATGTGCCGA
61     GAGGTGAAAG GCTTGCCGCC TGAGAATGAG CTCGCGTCTG ATTAGCTAGT TGGGGGTGTA
121    AGAGACCACC AAGGCGACGA TCAGTAGCTG GTCTGAGAGG ATGATCAGCC AACTGGGAC
181    TGACACACGG CCCAGACTCC TACGGGAGGC ACCAGCGGGG AATTTTCCGC AATGGGCGAA
241    AGCCTGACGG AGCAATACCG CGTGAGGGAG GAAGGCTCTT GGGTTGTAAA CCTCTTTTCT
301    CAGGGAACAA GAAAGTGACG GTACCTGAGG AATAAGCATC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG
361    CCGCGGTAAT ACGGAGGATG CAAGCGTTAT CCGGAATGAT TGGGCGTAAA GGGTCCGCAG
421    GTGGCACTGT AAGTCTGCTG TCAAAGAGCA AGGCTCAACC TTGTAAAGGC AGTGAAACT
481    ACAGAGCTAG AGTACGTTTC GGCATAAGG AATTCCTGGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA
541    GATCAGGAAG AACACCGGTG GCGAAAGCGT TCTGCTAGGC CTGTACTGAC ACTGAGGGAC
601    GAAAGCTAGG GG

```

Secuencia: 25Geit Mazt

Especie: *Geitlerinema sp.*, CIBNOR 25A

No. de Registro: AY274617

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 25-A. Estanque en hotel en Mazatlán, Sinaloa (México). 1999.

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 609

Orientación: (-)

```

1      CTGCCTCGAG AGGGGGATAA CAGCGGGAAA CTGCTGCTAA TACCCCATAT GCCGAAAGGT
61     GAAAAGAAAT TTGCCTTGAG AGGGGCTCGC GTCCGATTAG CTAGTTGGTG AGGTAAGAGC
121    TTACCAAGGC GACGATCGGT AGCTGGTCTG AGAGGATGAG CAGCCACACT GGGACTGAGA
181    CACGGCCCAG ACTCCTACGG GAGGCAGCAG TGGGGAATTT TCCGCAATGG GCGAAAGCCT
241    GACGGAGCAA CGCCCGTGG GGGGAAGAAG CCTTTGGGTT GTAAACTCCT TTTCTCAGGG
301    AAGAAGAACT GACGGTACCT GAGGAATCAG CCTCGGCTAA CTCCGTGCCA GCAGCCGCGG
361    TAATACGGAG GAGGCAAGCG TTATCCGGAA TTATTGGGCG TAAAGCGTTC GTAGGCGGCG
421    TTTCAAGTCT GCTGTCAAAG GCCGAGGCTC AACTTCGGAA AGGCAGTGGA AACTGAAAAG
481    CTAGAGGTCG GTAGGGGCAG AGGGAATTCC CAGTGTAGCG GTGAAATGCG TAGATATTGG
541    GAAGAACACC GGTGGCGAAA GCGCTCTGCT GGGCCGAACC TGACGCTGAC GGACGAAAGT
601    AGGGGCTCC

```

Secuencia: 29Geit Mazt

Especie: *Geitlerinema sp.*, CIBNOR 29A

No. de Registro: AY274618

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 29-A. Estanque de hotel en Mazatlán, Sinaloa (México). 1999.

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 577

Orientación: (-)

```

1      GGGGGGCGGT TGCTAATACC CCATATGCCG AAAGGCGAAA AGAAATTTGC CTTGAGAGGG
61     GCTCGCGTCC GATTAGCTAG TTGGTGAGGT AAGAGCTTAC CAAGGCGACG ATCGGTAGCT
121    GGTCTGAGAG GATGAGCAGC CACACTGGGA CTGAGACACG GCCCAGACTC CTACGGGAGG
181    CAGCAGTGGG GAATTTTCCG CAATGGGCGA AAGCCTGACG GAGCAACGCC GCGTGGGGGA
241    AGAAGGCCTT TGGGTTGTAA ACTCCTTTTC TCAGGGAAGA AGCACTGACG GTACCTGAGG
301    AATCAGCCTC GGCTAACTCC GTGCCAGCAG CCGCGGTAAT ACGGAGGAGG CAAGCGTTAT
361    CCGGAATTAT TGGGCGTAAA GCGTTCGTAG GCGGCATTTT AAGTCTGCTG TCAAAGGCCG
421    CGGCTCAACT GTGGACCGGC AGTGGAAACT GGTGAGCTGG AGGTTCGGTAG GGGCAGAGGG
481    AATTCCCAGT GTAGCGGTGA AATGCGTAGA TGTTGGGACG CCCCCCGGTA ACGAAGGCGC
541    TCTACTGCC  CCCCCCT

```

Secuencia: 30Geit CIB

Especie: *Geitlerinema sp.*, CIBNOR 30A

No. de Registro: AY274619

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 30-A. Estanque de cultivo supralitoral en el CIBNOR, La Paz, B.C.S. (México). 1999.

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 586

Orientación: (-)

```

1      CGGGAAACTG CTGCTAATAC CCCATATGCC GAAAGGTGAA AAGAAATTTG CCTTGAGAGG
61     GGCTCGCGTC CGATTAGCTA GTTGGTGAGG TAAGAGCTTA CCAAGGCGAC GATCGGTAGC
121    TGGTCTGAGA GGATGAGCAG CCACACTGGG ACTGAGACAC GGCCAGACTC CCTACGGGAG
181    GCAGCAGTGG GGAATTTTCC GCAATGGGCG AAAGCCTGAC GGAGCAACGC CGCGTGGGGG
241    AAGAAGGCCT TTGGGTTGTA AACTCCTTTT CTCAGGGAAG AAGAAGTGC GGTACCTGAG
301    GAATCAGCCT CGGCTAATC CGTGCCAGCA GCCGCGGTAA TACGGAGGAG GCAAGCGTTA
361    TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGCGTTCGTA GCGGCGGTTT CAAGTCTGCT GTCAAAGGCC
421    GAGGCTCAAC TTCGAAAAGG CAGTGGAAAC TGAAAAGCTA GAGGTTCGGTA GGGCAGAGG
481    GAATTCCCAG TGTAGCGGTG AAATGCGTAG ATATTGGGAA GAACACCGGT GGCGAAAAGC
541    CTCTGCTGGG CCGAACCTGA CGCTGACGGA CGAAAAGTAG GGCTCC

```

Secuencia: 31Geit CIB

Especie: *Geitlerinema sp.*, CIBNOR 31A

No. de Registro: AY274620

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 31-A. Estanque de cultivo supralitoral en el CIBNOR, La Paz, B.C.S. (México). 1999.

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 610

Orientación: (-)

```

1      CTGCCTCGAG GAGGGGGATA ACAGCGGGAA ACTGCTGCTA ATACCCATA TGCCGAAAGG
61     TGAAAAGAAA TTTGCCTTGA GAGGGGCTCG CGTCCGATTA GCTAGTTGGT GAGGTAAGAG
121    CTTACCAAGG CGACGATCGG TAGCTGGTCT GAGAGGATGA GCAGCCACAC TGGGACTGAG
181    ACACGGCCCA GACTCCTACG GGAGGCAGCA GTGGGGAATT TTCCGCAATG GGCGAAAGCC
241    TGACGGAGCA ACGCCGCGTG GGGGAAGAAG GCCTTTGGGT TGTAAACTCC TTTTCTCAGG
301    GAAGAAGAAC TGACGGTACC TGAGGAATCA GCCTCGGCTA ACTCCGTGCC AGCAGCCGCG
361    GTAATACGGA GGAGGCAAGC GTTATCCGGA ATTATTGGGC GTAAAGCGTT CGTAGGCCGGC
421    GTTTCAAGTC TGCTGTCAAA GGCCGAGGCT CAACTTCGGA AAGGCAGTGG AAACTGAAAA
481    GCTAGAGGTC GGTAGGGGCA GAGGGAATTC CCAGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGATATTG
541    GGAAGAACAC CGGTGGCGAA AGCGCTCTGC TGGGCCGAAC CTGACGCTGA CGGACGAAAG
601    TAGGGGCTCC

```

Secuencia: 34Geit CSL

Especie: *Geitlerinema sp.*, CIBNOR 34

No. de Registro: AY274621

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 34. Estero en Cabo San Lucas, B.C.S. (México). 1996.

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 613

Orientación: (-)

```

1      GACCTGCCTC GAGGAGGGGG ATAACAGCGG GAAACTGCTG CTAATACCCC ATATGCCGAA
61     AGGTGAAAAG AAATTTGCCT TGAGAGGGGC TCGCGTCCGA TTAGCTAGTT GGTGAGGTAA
121    GAGCTTACCA AGGCGACGAT CGGTAGCTGG TCTGAGAGGA TGAGCAGCCA CACTGGGACT
181    GAGACACGGC CCAGACTCCT ACGGGAGGCA GCAGTGGGGA ATTTCCGCA ATGGGCGAAA
241    GCCTGACGGA GCAACGCCGC GTGGGGGAAG AAGGCCTTTG GGTTGTAAAC TCCTTTTCTC
301    AGGGAAGAAG AACTGACGGT ACCTGAGGAA TCAGCCTCGG CTAACCTCGT GCCAGCAGCC
361    GCGGTAATAC GGAGGAGGCA AGCGTTATCC GGAATTATTG GGCGTAAAGC GTTCGTAGGC
421    GGCGTTTCAA GTCTGCTGTC AAAGGCCGAG GCTCAACTTC GGAAAGGCAG TGGAAACTGA
481    AAAGCTAGAG GTCGGTAGGG GCAGAGGGAA TTCCAGTGT AGCGGTGAAA TGCGTAGATA
541    TTGGGAAGAA CACCGGTGGC GAAAGCGCTC TGCTGGGCCG AACCTGACGC TGACGGACGA
601    AAGTAGGGGC TCC

```

Secuencia: 42Synech Mazt

Especie: *Synechococcus sp.*, CIBNOR 42

No. de Registro: AY274622

Región: 16s ADNr

Lugar y fecha de colecta: Cultivo 42. Estero en Mazatlán, Sinaloa (México). 1999.

No. de Organismos: 1

Lugar y fecha de secuenciación: Laboratorio de Biología Molecular, CIBNOR. La Paz, B.C.S. Enero, 2003.

No. de bases: 616

Orientación: (-)

```

1      GATCTAGCTT TAGGAGGGGG ATAACAGTGG GAAACTGCTG CTAATACCCC ATATGCCTAC
61     GGGTGAAATG GTTTATTCCG CCTAAAGATG AGCTCGCGTC TGATTAGCTA GTTGGTGAGG
121    TAAGAGCTCA CCAAGGCAAC GATCAGTAAC TGGTCTGAGA GGATGACCAG TCACACTGGG
181    ACTGAGACAC GGCCCAGACT CCTACGGGAG GCAGCAGTGG GGAATTTTCC GCAATGGGCG
241    AAAGCCTGAC GGAGCAATAC CGCGTGCGGG AGGAAGCCCT TTGGGGTGTA AACCGCTTTT
301    GTGAGGGAAG AAGATCTGAC GGTACCTCAC GAATCAGCCT CGGCTAACTC CGTGCCAGCA
361    GCCGCGGTAA GACGGAGGAG GCAAGCGTTA TCCGGAATTA TTGGGCGTAA AGCGTCCGCA
421    GGTGGCGATT CAAGTCTGCT GTCAAAGTCC AGGGCTCAAC TCTGGGAAGG CAGTGGAAAC
481    TGGATTGCTA GAGTACGGTA GGGGCAGAGG GAATTCCCGG TGTAGCGGTG AAATGCGTAG
541    ATATCGGGAA GAACACCAGT GGCGAAGGCG CTCTGCTGGG CCGTAACTGA CACTCATGGA
601    CGAAAGCTAG GGGAGC

```

APÉNDICE II.

Alineamiento de las 19 secuencias obtenidas de las especies de cianobacterias estudiadas.

1_Scalcicola_UTEX	GACAACCGTTGGAAACGACGGCTAATACCGCATATGGCGA	40
2_Avariabilis_UTEX	GACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGA	40
3_Nspumigena_UTEX	GACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATATGCCGA	40
4_Scalcicola_UTEX	GACAACCGTTGGAAACGACGGCTAATACCGCATATGGCGA	40
5_Nspumigena_UTEX	GACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATATGCCGA	40
7_Aflos-aquae_UTEX	..GAACCCCTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGA	38
8_Avariabilis_UTEX	GACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGA	40
9_Aflos-aquae_UTEX	..GACACCCTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGA	38
10_Nspumigena_UTEX	GACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATATGCCGA	40
11_Avariabilis_UTEX	GACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGA	40
13_Avariabilis_UTEX	GACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGA	40
15_Scalcicola_Mazt	GACAACCGTTGGAAACGACGGCTAATACCGCATATGGCGA	40
23_Avariabilis_Tlah	GACAACCACTGGAAACGGTGGCTAATACCGGATGTGCCGA	40
25_Geitlerinema_Mazt	GATAACAGCGGGAAACTGCTGCTAATACCCCATATGCCGA	40
29_Geitlerinema_MaztGGGGGGCGTTGCTAATACCCCATATGCCGA	31
30_Geitlerinema_CIB	GATAACAGCGGGAAACTGCTGCTAATACCCCATATGCCGA	40
31_Geitlerinema_CIB	GATAACAGCGGGAAACTGCTGCTAATACCCCATATGCCGA	40
34_Geitlerinema_CSL	GATAACAGCGGGAAACTGCTGCTAATACCCCATATGCCGA	40
42_Synecho_Mazt	GATAACAGTGGGAAACTGCTGCTAATACCCCATATGCCTA	40
Consensus	gg c gctaataacc at tg c a	

1_Scalcicola_UTEX	GAGCTAAAAGCTTAATGT...GCCTGAGGATGAACTCGCG	77
2_Avariabilis_UTEX	AAGGTGAAAGATTTAT.T...GCCTAGAGATGAGCTCGCG	76
3_Nspumigena_UTEX	GAGGTGAAAGGCTTGC.T...GCCTGAAGATGAGCTCGCG	76
4_Scalcicola_UTEX	GAGCTAAAAGCTTAATGT...GCCTGAGGATGAACTCGCG	77
5_Nspumigena_UTEX	GAGGTGAAAGGCTTGC.T...GCCTGAAGATGAGCTCGCG	76
7_Aflos-aquae_UTEX	AAGGTGAAAGATTTAT.T...GCCTAGAGATGAGCTCGCG	74
8_Avariabilis_UTEX	AAGGTGAAAGATTTAT.T...GCCTAGAGATGAGCTCGCG	76
9_Aflos-aquae_UTEX	AAGGTGAAAGATTTAT.T...GCCTAGAGATGAGCTCGCG	74
10_Nspumigena_UTEX	GAGGTGAAAGGCTTGC.T...GCCTGAAGATGAGCTCGCG	76
11_Avariabilis_UTEX	AAGGTGAAAGATTTAT.T...GCCTAGAGATGAGCTCGCG	76
13_Avariabilis_UTEX	AAGGTGAAAGATTTAT.T...GCCTAGAGATGAGCTCGCG	76
15_Scalcicola_Mazt	GAGCTAAAAGCTTAATGT...GCCTGAGGATGAACTCGCG	77
23_Avariabilis_Tlah	GAGGTGAAAGGCTTGC.C...GCCTGAGAATGAGCTCGCG	76
25_Geitlerinema_Mazt	AAGGTGAAAAGAAATT.T...GCCTTGAGAGGGGCTCGCG	76
29_Geitlerinema_Mazt	AAGGCGAAAAGAAATT.T...GCCTTGAGAGGGGCTCGCG	67
30_Geitlerinema_CIB	AAGGTGAAAAGAAATT.T...GCCTTGAGAGGGGCTCGCG	76
31_Geitlerinema_CIB	AAGGTGAAAAGAAATT.T...GCCTTGAGAGGGGCTCGCG	76
34_Geitlerinema_CSL	AAGGTGAAAAGAAATT.T...GCCTTGAGAGGGGCTCGCG	76
42_Synecho_Mazt	CGGTTGAAATGGTTTA.TTCCGCCTAAAGATGAGCTCGCG	79
Consensus	g aaa gcct a g ctcgcg	

1_Scalpicola_UTEX	TCTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGTTTACCAAGGCG	117
2_Avariabilis_UTEX	TCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCG	116
3_Nspumigena_UTEX	TCTGATTAGCTAGTAGGTGTGGTAAAAGCGCACCTAGGCG	116
4_Scalpicola_UTEX	TCTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGTTTACCAAGGCG	117
5_Nspumigena_UTEX	TCTGATTAGCTAGTAGGTGTGGTAAAAGCGCACCTAGGCG	116
7_Aflos-aquae_UTEX	TCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCG	114
8_Avariabilis_UTEX	TCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCG	116
9_Aflos-aquae_UTEX	TCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCG	114
10_Nspumigena_UTEX	TCTGATTAGCTAGTAGGTGTGGTAAAAGCGCACCTAGGCG	116
11_Avariabilis_UTEX	TCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCG	116
13_Avariabilis_UTEX	TCTGATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAGAGCGCACCAAGGCG	116
15_Scalpicola_Mazt	TCTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAAGGTTTACCAAGGCG	117
23_Avariabilis_Tlah	TCTGATTAGCTAGTTGGGGTGTAAAGAGACCACCAAGGCG	116
25_Geitlerinema_Mazt	TCCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAGAGCTTACCAAGGCG	116
29_Geitlerinema_Mazt	TCCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAGAGCTTACCAAGGCG	107
30_Geitlerinema_CIB	TCCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAGAGCTTACCAAGGCG	116
31_Geitlerinema_CIB	TCCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAGAGCTTACCAAGGCG	116
34_Geitlerinema_CSL	TCCGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAGAGCTTACCAAGGCG	116
42_Synecho_Mazt	TCTGATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAGAGCTCACCAAGGCA	119
Consensus	tc gattagctagt gg g gtaa g acc aggc	

1_Scalpicola_UTEX	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	157
2_Avariabilis_UTEX	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	156
3_Nspumigena_UTEX	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	156
4_Scalpicola_UTEX	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	157
5_Nspumigena_UTEX	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	156
7_Aflos-aquae_UTEX	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	154
8_Avariabilis_UTEX	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	156
9_Aflos-aquae_UTEX	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	154
10_Nspumigena_UTEX	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	156
11_Avariabilis_UTEX	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	156
13_Avariabilis_UTEX	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	156
15_Scalpicola_Mazt	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	157
23_Avariabilis_Tlah	ACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCCACTG	156
25_Geitlerinema_Mazt	ACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCCACTG	156
29_Geitlerinema_Mazt	ACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCCACTG	147
30_Geitlerinema_CIB	ACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCCACTG	156
31_Geitlerinema_CIB	ACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCCACTG	156
34_Geitlerinema_CSL	ACGATCGGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCCACTG	156
42_Synecho_Mazt	ACGATCAGTAACTGGTCTGAGAGGATGACCAGTCACTG	159
Consensus	acgatc gta ctggctctgagaggatga cag cacactg	

1_Scalpicola_UTEX	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	197
2_Avariabilis_UTEX	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	196
3_Nspumigena_UTEX	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	196
4_Scalpicola_UTEX	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	197
5_Nspumigena_UTEX	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	196
7_Aflos-aquae_UTEX	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	194
8_Avariabilis_UTEX	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	196
9_Aflos-aquae_UTEX	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	194
10_Nspumigena_UTEX	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	196
11_Avariabilis_UTEX	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	196
13_Avariabilis_UTEX	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	196
15_Scalpicola_Mazt	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	197
23_Avariabilis_Tlah	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGC	196
25_Geitlerinema_Mazt	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	196
29_Geitlerinema_Mazt	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	187
30_Geitlerinema_CIB	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	196
31_Geitlerinema_CIB	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	196
34_Geitlerinema_CSL	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	196
42_Synecho_Mazt	GGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT	199
Consensus	ggactga acacggcccagactcctacgggaggca cag	

1_Scalpicola_UTEX	GGGGAATTTTCCGCAATGGG G C A A C C C T G A C G G A G C A A C	237
2_Avariabilis_UTEX	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A T	236
3_Nspumigena_UTEX	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A T	236
4_Scalpicola_UTEX	GGGGAATTTTCCGCAATGGG G C A A C C C T G A C G G A G C A A C	237
5_Nspumigena_UTEX	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A T	236
7_Aflos-aquae_UTEX	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A T	234
8_Avariabilis_UTEX	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A T	236
9_Aflos-aquae_UTEX	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A T	234
10_Nspumigena_UTEX	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A T	236
11_Avariabilis_UTEX	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A T	236
13_Avariabilis_UTEX	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A T	236
15_Scalpicola_Mazt	GGGGAATTTTCCGCAATGGG G C A A C C C T G A C G G A G C A A C	237
23_Avariabilis_Tlah	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A T	236
25_Geitlerinema_Mazt	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A C	236
29_Geitlerinema_Mazt	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A C	227
30_Geitlerinema_CIB	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A C	236
31_Geitlerinema_CIB	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A C	236
34_Geitlerinema_CSL	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A C	236
42_Synecho_Mazt	GGGGAATTTTCCGCAATGGG C G A A G C C T G A C G G A G C A A T	239
Consensus	ggggaatTTTccgcaatggg g aa cctgacggagcaa	

1_Scalpicola_UTEX	GCCGCGTGGGGAGGAATGTCTGTGGATTGTAAACCCCTT	277
2_Avariabilis_UTEX	ACCGCGTAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTT	276
3_Nspumigena_UTEX	ACCGCGTAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTT	276
4_Scalpicola_UTEX	GCCGCGTGGGGAGGAATGTCTGTGGATTGTAAACCCCTT	277
5_Nspumigena_UTEX	ACCGCGTAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTT	276
7_Aflos-aquae_UTEX	ACCGCGTAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTT	274
8_Avariabilis_UTEX	ACCGCGTAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTT	276
9_Aflos-aquae_UTEX	ACCGCGTAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTT	274
10_Nspumigena_UTEX	ACCGCGTAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTT	276
11_Avariabilis_UTEX	ACCGCGTAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTT	276
13_Avariabilis_UTEX	ACCGCGTAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTT	276
15_Scalpicola_Mazt	GCCGCGTGGGGAGGAATGTCTGTGGATTGTAAACCCCTT	277
23_Avariabilis_Tlah	ACCGCGTAGGGAGGAAGGCTCTTGGGTTGTAAACCTCTT	276
25_Geitlerinema_Mazt	GCCGCGTGGGGAGAAGGCCTTGGGTTGTAAACTCCTT	276
29_Geitlerinema_Mazt	GCCGCGTGGGGAGAAGGCCTTGGGTTGTAAACTCCTT	267
30_Geitlerinema_CIB	GCCGCGTGGGGAGAAGGCCTTGGGTTGTAAACTCCTT	276
31_Geitlerinema_CIB	GCCGCGTGGGGAGAAGGCCTTGGGTTGTAAACTCCTT	276
34_Geitlerinema_CSL	GCCGCGTGGGGAGAAGGCCTTGGGTTGTAAACTCCTT	276
42_Synecho_Mazt	ACCGCGTGC GGGAGGAAGCCTTGGGGTGTAAACCGCTT	279
Consensus	ccgcgctg gggga gaa tgg tgtaaac ctt	

1_Scalpicola_UTEX	TTCTCAGGGAAGAAGATC.TGACGGTACCTGAGGAATCAG	316
2_Avariabilis_UTEX	TTCTCAGGGAATAAGAAAGTGAAGGTACCTGAGGAATAAG	316
3_Nspumigena_UTEX	TTCTCAGGGAAGAAAATAATGACGGTACCTGAGGAATAAG	316
4_Scalpicola_UTEX	TTCTCAGGGAAGAAGATC.TGACGGTACCTGAGGAATCAG	316
5_Nspumigena_UTEX	TTCTCAGGGAAGAAAATAATGACGGTACCTGAGGAATAAG	316
7_Aflos-aquae_UTEX	TTCTCAGGGAATAAGAAAGTGAAGGTACCTGAGGAATAAG	314
8_Avariabilis_UTEX	TTCTCAGGGAATAAGAAAGTGAAGGTACCTGAGGAATAAG	316
9_Aflos-aquae_UTEX	TTCTCAGGGAATAAGAAAGTGAAGGTACCTGAGGAATAAG	314
10_Nspumigena_UTEX	TTCTCAGGGAAGAAAATAATGACGGTACCTGAGGAATAAG	316
11_Avariabilis_UTEX	TTCTCAGGGAATAAGAAAGTGAAGGTACCTGAGGAATAAG	316
13_Avariabilis_UTEX	TTCTCAGGGAATAAGAAAGTGAAGGTACCTGAGGAATAAG	316
15_Scalpicola_Mazt	TTCTCAGGGAAGAAGATC.TGACGGTACCTGAGGAATCAG	316
23_Avariabilis_Tlah	TTCTCAGGGAACAAGAAAGTGAAGGTACCTGAGGAATAAG	316
25_Geitlerinema_Mazt	TTCTCAGGGAAGAAGAAC.TGACGGTACCTGAGGAATCAG	315
29_Geitlerinema_Mazt	TTCTCAGGGAAGAAGCAC.TGACGGTACCTGAGGAATCAG	306
30_Geitlerinema_CIB	TTCTCAGGGAAGAAGAAC.TGACGGTACCTGAGGAATCAG	315
31_Geitlerinema_CIB	TTCTCAGGGAAGAAGAAC.TGACGGTACCTGAGGAATCAG	315
34_Geitlerinema_CSL	TTCTCAGGGAAGAAGAAC.TGACGGTACCTGAGGAATCAG	315
42_Synecho_Mazt	TTGTGAGGGAAGAAGATC.TGACGGTACCTCACGAATCAG	318
Consensus	tt t agggaa aa tga ggtacct a gaat ag	

1_Scalcicola_UTEX	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAG	356
2_Avariabilis_UTEX	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	356
3_Nspumigena_UTEX	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	356
4_Scalcicola_UTEX	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAG	356
5_Nspumigena_UTEX	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	356
7_Aflos-aquae_UTEX	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	354
8_Avariabilis_UTEX	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	356
9_Aflos-aquae_UTEX	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	354
10_Nspumigena_UTEX	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	356
11_Avariabilis_UTEX	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	356
13_Avariabilis_UTEX	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	356
15_Scalcicola_Mazt	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAG	356
23_Avariabilis_Tlah	CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	356
25_Geitlerinema_Mazt	CCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	355
29_Geitlerinema_Mazt	CCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	346
30_Geitlerinema_CIB	CCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	355
31_Geitlerinema_CIB	CCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	355
34_Geitlerinema_CSL	CCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG	355
42_Synecho_Mazt	CCTCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAAGACGGAG	358
Consensus	c tcggctaactccgtgccagcagccgcggtaa acggag	

1_Scalcicola_UTEX	GATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCC	396
2_Avariabilis_UTEX	GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCC	396
3_Nspumigena_UTEX	GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCC	396
4_Scalcicola_UTEX	GATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCC	396
5_Nspumigena_UTEX	GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCC	396
7_Aflos-aquae_UTEX	GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCC	394
8_Avariabilis_UTEX	GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCC	396
9_Aflos-aquae_UTEX	GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCC	394
10_Nspumigena_UTEX	GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCC	396
11_Avariabilis_UTEX	GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCC	396
13_Avariabilis_UTEX	GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCC	396
15_Scalcicola_Mazt	GATGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCC	396
23_Avariabilis_Tlah	GATGCAAGCGTTATCCGGAATGATTGGGCGTAAAGCGTCC	396
25_Geitlerinema_Mazt	GAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTTC	395
29_Geitlerinema_Mazt	GAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTTC	386
30_Geitlerinema_CIB	GAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTTC	395
31_Geitlerinema_CIB	GAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTTC	395
34_Geitlerinema_CSL	GAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTTC	395
42_Synecho_Mazt	GAGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCC	398
Consensus	ga gcaagcgttatccggaat attgggcgtaaag gt c	

1_Scalpicola_UTEX	GTAGGCGGTTTATCAAGTCTGTCGTTAAAGACTGCAGCTT	436
2_Avariabilis_UTEX	GCAGGTGGCACTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGCAAGGCTC	436
3_Nspumigena_UTEX	GCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAACCCTAGCTT	436
4_Scalpicola_UTEX	GTAGGCGGTTTATCAAGTCTGTCGTTAAAGACTGCAGCTT	436
5_Nspumigena_UTEX	GCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAACCCTAGCTT	436
7_Aflos-aquae_UTEX	GCAGGTGGCACTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGCAAGGCTC	434
8_Avariabilis_UTEX	GCAGGTGGCACTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGCAAGGCTC	436
9_Aflos-aquae_UTEX	GCAGGTGGCACTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGCAAGGCTC	434
10_Nspumigena_UTEX	GCAGGTGGCTATGTAAGTCTGCTGTTAAAGAACCCTAGCTT	436
11_Avariabilis_UTEX	GCAGGTGGCACTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGCAAGGCTC	436
13_Avariabilis_UTEX	GCAGGTGGCACTGTAAGTCTGCTGTTAAAGAGCAAGGCTC	436
15_Scalpicola_Mazt	GTAGGCGGTTTATCAAGTCTGTCGTTAAAGACTGCAGCTT	436
23_Avariabilis_Tlah	GCAGGTGGCACTGTAAGTCTGCTGTCAAAGAGCAAGGCTC	436
25_Geitlerinema_Mazt	GTAGGCGGCGTTTCAAGTCTGCTGTCAAAGGCCGAGGCTC	435
29_Geitlerinema_Mazt	GTAGGCGGCATTTC AAGTCTGCTGTCAAAGGCCGCGGCTC	426
30_Geitlerinema_CIB	GTAGGCGGCGTTTCAAGTCTGCTGTCAAAGGCCGAGGCTC	435
31_Geitlerinema_CIB	GTAGGCGGCGTTTCAAGTCTGCTGTCAAAGGCCGAGGCTC	435
34_Geitlerinema_CSL	GTAGGCGGCGTTTCAAGTCTGCTGTCAAAGGCCGAGGCTC	435
42_Synecho_Mazt	GCAGGTGGCGATTCAAGTCTGCTGTCAAAGTCCAGGGCTC	438
Consensus	g agg gg aagtctg gt aaag gct	

1_Scalpicola_UTEX	AACTGTGGGCGAGCGGTGGAAACTGATTAACTAGAGTGTG	476
2_Avariabilis_UTEX	AACCTTGTAAGGCAGTGGAAACTACAGAGCTAGAGTACG	476
3_Nspumigena_UTEX	AACTAGGTAAAA GCAGTGGAAACTACAAGGCTAGAGTGCG	476
4_Scalpicola_UTEX	AACTGTGGGCGAGCGGTGGAAACTGATTAACTAGAGTGTG	476
5_Nspumigena_UTEX	AACTAGGTAAAA GCAGTGGAAACTACAAGGCTAGAGTGCG	476
7_Aflos-aquae_UTEX	AACCTTGTAAGGCAGTGGAAACTACAGAGCTAGAGTACG	474
8_Avariabilis_UTEX	AACCTTGTAAGGCAGTGGAAACTACAGAGCTAGAGTACG	476
9_Aflos-aquae_UTEX	AACCTTGTAAGGCAGTGGAAACTACAGAGCTAGAGTACG	474
10_Nspumigena_UTEX	AACTAGGTAAAA GCAGTGGAAACTACAAGGCTAGAGTGCG	476
11_Avariabilis_UTEX	AACCTTGTAAGGCAGTGGAAACTACAGAGCTAGAGTACG	476
13_Avariabilis_UTEX	AACCTTGTAAGGCAGTGGAAACTACAGAGCTAGAGTACG	476
15_Scalpicola_Mazt	AACTGTGGGCGAGCGGTGGAAACTGATTAACTAGAGTGTG	476
23_Avariabilis_Tlah	AACCTTGTAAGGCAGTGGAAACTACAGAGCTAGAGTACG	476
25_Geitlerinema_Mazt	AACTTCGGAAGGCAGTGGAAACTGAAAAGCTAGAGGTCTG	475
29_Geitlerinema_Mazt	AACTGTGGACCGGCAGTGGAAACTGGTGAGCTCGAGGTCTG	466
30_Geitlerinema_CIB	AACTTCGGAAGGCAGTGGAAACTGAAAAGCTAGAGGTCTG	475
31_Geitlerinema_CIB	AACTTCGGAAGGCAGTGGAAACTGAAAAGCTAGAGGTCTG	475
34_Geitlerinema_CSL	AACTTCGGAAGGCAGTGGAAACTGAAAAGCTAGAGGTCTG	475
42_Synecho_Mazt	AACTCTGGGAAGGCAGTGGAAACTGGATTGCTAGAGTACG	478
Consensus	aac g gc gtggaaact ct gag g	

1_Scalcicola_UTEX	GTAGGGGTAGAGGGAATTCCCA	GTGTAGCGGTGAAATGCG	516
2_Avariabilis_UTEX	TTCGGGGCAGAGGGAATTCC	TGTGTAGCGGTGAAATGCG	516
3_Nspumigena_UTEX	TTCGGGGTAGAGGGAATTCC	TGTGTAGCGGTGAAATGCG	516
4_Scalcicola_UTEX	GTAGGGGTAGAGGGAATTCCCA	GTGTAGCGGTGAAATGCG	516
5_Nspumigena_UTEX	TTCGGGGTAGAGGGAATTCC	TGTGTAGCGGTGAAATGCG	516
7_Aflos-aquae_UTEX	TTCGGGGCAGAGGGAATTCC	TGTGTAGCGGTGAAATGCG	514
8_Avariabilis_UTEX	TTCGGGGCAGAGGGAATTCC	TGTGTAGCGGTGAAATGCG	516
9_Aflos-aquae_UTEX	TTCGGGGCAGAGGGAATTCC	TGTGTAGCGGTGAAATGCG	514
10_Nspumigena_UTEX	TTCGGGGTAGAGGGAATTCC	TGTGTAGCGGTGAAATGCG	516
11_Avariabilis_UTEX	TTCGGGGCAGAGGGAATTCC	TGTGTAGCGGTGAAATGCG	516
13_Avariabilis_UTEX	TTCGGGGCAGAGGGAATTCC	TGTGTAGCGGTGAAATGCG	516
15_Scalcicola_Mazt	GTAGGGGTAGAGGGAATTCCCA	GTGTAGCGGTGAAATGCG	516
23_Avariabilis_Tlah	TTCGGGGCATAAGGAATTCC	TGTGTAGCGGTGAAATGCG	516
25_Geitlerinema_Mazt	GTAGGGGCAGAGGGAATTCC	CA GTGTAGCGGTGAAATGCG	515
29_Geitlerinema_Mazt	GTAGGGGCAGAGGGAATTCC	CA GTGTAGCGGTGAAATGCG	506
30_Geitlerinema_CIB	GTAGGGGCAGAGGGAATTCC	CA GTGTAGCGGTGAAATGCG	515
31_Geitlerinema_CIB	GTAGGGGCAGAGGGAATTCC	CA GTGTAGCGGTGAAATGCG	515
34_Geitlerinema_CSL	GTAGGGGCAGAGGGAATTCC	CA GTGTAGCGGTGAAATGCG	515
42_Synecho_Mazt	GTAGGGGCAGAGGGAATTCC	CG GTGTAGCGGTGAAATGCG	518
Consensus	t gggg a a ggaattcc	gtgtagcgggtgaaatgcg	

1_Scalcicola_UTEX	TAGATATTGGGAAGAACCACCA	GTGGCGAAGGCGCTCTACT	556
2_Avariabilis_UTEX	TAGAGATCAGGAAGAACCACCG	GTGGCGAAAAGCGCTCTGCT	556
3_Nspumigena_UTEX	TAGATATCAGGAAGAACCACCA	GTGGCGAAGGCGCTCTACT	556
4_Scalcicola_UTEX	TAGATATTGGGAAGAACCACCA	GTGGCGAAGGCGCTCTACT	556
5_Nspumigena_UTEX	TAGATATCAGGAAGAACCACCA	GTGGCGAAGGCGCTCTACT	556
7_Aflos-aquae_UTEX	TAGAGATCAGGAAGAACCACCG	GTGGCGAAAAGCGCTCTGCT	554
8_Avariabilis_UTEX	TAGAGATCAGGAAGAACCACCG	GTGGCGAAAAGCGCTCTGCT	556
9_Aflos-aquae_UTEX	TAGAGATCAGGAAGAACCACCG	GTGGCGAAAAGCGCTCTGCT	554
10_Nspumigena_UTEX	TAGATATCAGGAAGAACCACCA	GTGGCGAAGGCGCTCTACT	556
11_Avariabilis_UTEX	TAGAGATCAGGAAGAACCACCG	GTGGCGAAAAGCGCTCTGCT	556
13_Avariabilis_UTEX	TAGAGATCAGGAAGAACCACCG	GTGGCGAAAAGCGCTCTGCT	556
15_Scalcicola_Mazt	TAGATATTGGGAAGAACCACCA	GTGGCGAAGGCGCTCTACT	556
23_Avariabilis_Tlah	TAGAGATCAGGAAGAACCACCG	GTGGCGAAAAGCGTCTGCT	556
25_Geitlerinema_Mazt	TAGATATTGGGAAGAACCACCG	GTGGCGAAAAGCGCTCTGCT	555
29_Geitlerinema_Mazt	TAGATGTTGGGACCCCCCGGTA	ACGAAGGCGCTCTACT	546
30_Geitlerinema_CIB	TAGATATTGGGAAGAACCACCG	GTGGCGAAAAGCGCTCTGCT	555
31_Geitlerinema_CIB	TAGATATTGGGAAGAACCACCG	GTGGCGAAAAGCGCTCTGCT	555
34_Geitlerinema_CSL	TAGATATTGGGAAGAACCACCG	GTGGCGAAAAGCGCTCTGCT	555
42_Synecho_Mazt	TAGATATCGGGAAGAACCACCA	GTGGCGAAGGCGCTCTGCT	558
Consensus	taga t gga g c cc gt	cgaa gcg tct ct	

1_Scalcicola_UTEX	GGGCCACAACTGACGCTGAGGGACGAAAGC..	586
2_Avariabilis_UTEX	AGGCCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAGC..	586
3_Nspumigena_UTEX	AGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGC..	586
4_Scalcicola_UTEX	GGGCCACAACTGACGCTGAGGGACGAAAGC..	586
5_Nspumigena_UTEX	AGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGC..	586
7_Aflos-aquae_UTEX	AGGCCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTA	586
8_Avariabilis_UTEX	AGGCCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAGC..	586
9_Aflos-aquae_UTEX	AGGCCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAGCTA	586
10_Nspumigena_UTEX	AGGCCGCAACTGACACTGAGGGACGAAAGC..	586
11_Avariabilis_UTEX	AGGCCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAGC..	586
13_Avariabilis_UTEX	AGGCCGTAACTGACACTGAGGGACGAAAGC..	586
15_Scalcicola_Mazt	GGGCCACAACTGACGCTGAGGGACGAAAGC..	586
23_Avariabilis_Tlah	AGGCCTGTACTGACACTGAGGGACGAAAGC..	586
25_Geitlerinema_Mazt	GGGCCGAACCTGACGCTGACGGACGAAAGTA.	586
29_Geitlerinema_Mazt	GCCCCCCCCCT.....	557
30_Geitlerinema_CIB	GGGCCGAACCTGACGCTGATGGACGAAAGTA.	586
31_Geitlerinema_CIB	GGGCCGAACCTGACGCTGACGGACGAAAGTA.	586
34_Geitlerinema_CSL	GGGCCGAACCTGACGCTGACGGACGAAAGTA.	586
42_Synecho_Mazt	GGGCCGTAACTGACACTCATGGACGAAA....	586
Consensus	cc ct	