



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Estudio de la diversidad de organismos
fotosintéticos en biocostras de suelos desérticos
de San Luis Potosí**

Tesis que presenta

Nohemí Vanesa Torres Bárcenas

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Guillermo Pastor Palacios

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga

San Luis Potosí, S. L. P., 12 de Marzo de 2021



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Estudio de la diversidad de organismos fotosintéticos en biocostras de suelos desérticos de San Luis Potosí**” presentada para obtener el Grado de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Nohemí Vanesa Torres Bárcenas** y aprobada el **25 de Febrero de 2021** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Guillermo Pastor Palacios
Codirector de la tesis

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Codirector de la tesis

Dra. Elisabeth Huber-Sannwald

Miembro del Comité Tutorial

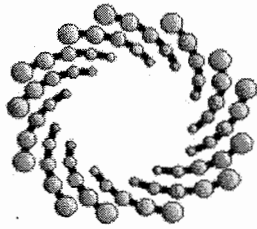


Créditos institucionales

Esta tesis fue elaborada en el laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales del Consorcio de Investigación, Innovación y Desarrollo para las Zonas Áridas (CIIDZA), así como en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas y el laboratorio de Procesamiento de Muestras Biológicas, del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la codirección del Dr. Guillermo Pastor Palacios y Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, número de registro 931769, y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Trabajo de tesis financiado por proyecto FORDECYT No.296354



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 215 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de marzo del año 2021, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Elisabeth Huber- Sannwald	Presidenta	IPICYT
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Secretario	IPICYT
Dr. Guillermo Pastor Palacios	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Nohemí Vanesa Torres Bárcenas

sobre la Tesis intitulada:

Estudio de la diversidad de organismos fotosintéticos en biocostras de suelos desérticos de San Luis Potosí

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Dr. Guillermo Pastor Palacios

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 17:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 12 días del mes de marzo de 2021.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

En algún lugar algo increíble está esperando ser descubierto.

-Carl Sagan.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número
931769

Al Instituto Potosino de investigación Científica y Tecnológica, IPICYT.

Al Dr. Guillermo Pastor Palacios por la dedicación, el apoyo, la paciencia, por enseñarme siempre a cuestionarme y motivarme a generar nuevas ideas. Gracias por inspirarme a seguir haciendo ciencia.

Al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga por su apoyo durante todo mi programa de maestría, por la dedicación y el apoyo en la realización de la tesis.

A la Dra. Elisabeth Huber-Sannwald, por su dedicación en el trabajo de tesis, la comprensión y sus consejos.

Al Dr. Alejandro López – Cortés del CIBNOR (Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste) por la donación del ADN de cianobacteria no cultivable para la realización de los estudios moleculares.

A la Dra. O. Araceli Patrón Soberano por su asesoría y apoyo en la realización de los cortes criogénicos y la observación microscópica.

Al LANBAMA del IPICYT por el apoyo técnico y los servicios otorgados.

Al biólogo Salvador Ambriz por su ayuda, paciencia y amistad.

A mi familia del laboratorio Gus, Ari, Ana (reina), Yadi y Jenny.

A mis papás, a Cris y Paw, mi amor y mi agradecimiento siempre para ustedes

A mis amigos, gracias por su paciencia y comprensión, cada uno de ustedes me ha inspirado, los llevo en el corazón.

Contenido

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	II
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	III
DEDICATORIAS	V
AGRADECIMIENTOS	VI
LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
ANEXOS	X
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
I- INTRODUCCIÓN	14
1.1 Definición, estructura y distribución de las Biocostras	14
1.2 Función ecológica de las biocostras en los ecosistemas	16
1.3 Componentes biológicos de las biocostras	19
1.3.1 Cianobacterias	19
1.3.2 Microalgas	21
1.3.3 Musgos	24
1.3.4 Líquenes	22
1.4 Herramientas para la identificación de microorganismos presentes en CBS	24
II- OBJETIVO GENERAL	28
2.1 Objetivos específicos	28
III- MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Sitios de estudio	29
3.2 Muestreo en campo	31
3.3 Caracterización morfológica de líquenes y cianobacterias	31
3.4 Extracción de ADN total de líquenes y biocostras	¡Error! Marcador no definido.
3.5 Amplificación por PCR de la región 16S-23S (ITS) rRNA de cianobacterias	32
3.6 Corte con enzimas de restricción de los fragmentos amplificados	34
3.7 Clonación de productos de PCR.	34
3.8 Transformación de células competentes	34
IV-RESULTADOS	36
4.1 Identificación de líquenes mediante técnicas de microscopía.	36
4.2 Identificación de cianobacterias asociadas a biocostras de suelos desérticos	39
4.3 Estandarización del protocolo de extracción de ADN total de líquenes y biocostras	41
4.4 Amplificación por PCR de la región 16S-23S (ITS) rRNA de cianobacterias	43
4.5 Resultados de secuenciación y análisis de datos de microscopía	46
V- DISCUSIÓN	54
IV-RESUMEN Y CONCLUSIONES	58
V-PERSPECTIVAS	58
VI-REFERENCIAS	59

Lista de tablas

Tabla 1: Algunos oligonucleótidos empleados en la identificación de cianobacterias y clorofitas.

Tabla 2: Muestras colectadas.

Tabla 3: Ensamble cadena forward y reverse, muestra 6, (Armadillo).

Tabla 4: Ensamble cadena forward y reverse, clona 7A, (Armadillo).

Tabla 5: Ensamble cadena forward y reverse, clona 7B, (Armadillo).

Tabla 6: Ensamble cadena forward y reverse, clona 7C, (Armadillo).

Tabla 7: Ensamble cadena forward y reverse, clona 7D, (Armadillo).

Tabla 8: Ensamble cadena forward y reverse, clona 4G, (Guadalcázar).

Lista de figuras

- Figura 1. Etapas de establecimiento de las biocostras.
- Figura 2. Cobertura estimada de las biocostras a nivel mundial.
- Figura 3. Funciones ecosistémicas de las biocostras de suelos desérticos.
- Figura 4. Organización estructural de los líquenes.
- Figura 5. Mapa de localización de los sitios del estudio.
- Figura 6. Oligonucleótidos utilizados en este proyecto y mapa del operón 16-23S rRNA
- Figura 7. Identificación microscópica de líquenes.
- Figura 8. Observación de cianobacterias de vida libre realizadas mediante microscopía.
- Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de ADN genómico total extraído con kit comercial.
- Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de ADN genómico total extraído de las muestras.
- Figura 11. Mapa del operón 16-23S rRNA y sitios blanco de los oligonucleótidos utilizados.
- Figura 12. Amplificación por PCR de la región 16S-23S (ITS) rRNA de cianobacterias.
- Figura 13. Observación de la morfología, muestra 6.
- Figura 14. Observación de la morfología, muestra 7.

Anexos

Anexo 1: Protocolo detallado de pruebas químicas para la identificación de líquenes

Anexo 2: Protocolo modificado para extracción de ADN de biocostras

Anexo 3: Limpieza de muestras de ADN con PVP al 5%

Anexo 4: Micrografías de líquenes colectados en Armadillo de los Infante

Anexo 5: Micrografías de líquenes colectados en Guadalcázar

Abreviaturas

CBS	Costras biológicas del suelo
Km²	Kilómetros cuadrados
mm	Milímetros
EPS	Exopolisacáridos
EMC	Matriz extracelular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
NGS	Tecnologías de Secuenciación de Nueva Generación
DGGE	Electroforesis de gel en gradiente desnaturalizante
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
16S	Componente de la subunidad menor ribosomal
23S	Componente de la subunidad mayor ribosomal
ITS	Espaciador interno transcrito
N	Norte
W	Oeste
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
° C	Grados centígrados
INEGI	Instituto Nacional De Estadística y Geografía
<i>Spp</i>	Especies pertenecientes a un género
m²	Metros cuadrados
PVP	Polivinilpirrolidona
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
µl	Microlitros
MgCl₂	Cloruro de Magnesio
T_m	Temperatura de Fusión
Min	Minutos
Seg	Segundos
AFLPs	Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado
KaOH	Hidróxido de Potasio
NaClO	Hipoclorito de sodio
UV	Ultravioleta

Resumen

Estudio de la diversidad de organismos fotosintéticos en biocostras de suelos desérticos de San Luis Potosí.

Las biocostras son comunidades compuestas por microorganismos como cianobacterias, bacterias heteróforas, clorofitas, hongos y organismos macroscópicos como líquenes, briofitas y microartrópodos. Se distribuyen mayoritariamente en los ecosistemas desérticos.

El conocimiento de organismos fotosintéticos en biocostras presentes en el estado de San Luis Potosí es limitado. Por esa razón el presente trabajo está dirigido a la identificación de organismos y microorganismos fotosintéticos presentes en biocostras de suelos desérticos en los alrededores de Armadillo de los Infante y Guadalcázar. La metodología en este estudio incluyó técnicas de biología molecular, así como de microscopía. En este sentido, se registró la diversidad de líquenes en los sitios de estudio, donde se identificaron *Psora ictérica*, *Psora crenata*, y los géneros *Diploschistes sp.* y *Placidium sp.* En cuanto a la presencia de clorofitas, se identificaron los géneros *Myrmecia sp.* y *Trebouxia sp.*, como fotobiontes de líquenes. En el caso del género *Trebouxia sp.*, también se observó como una clorofita de vida libre. Otros microorganismos de vida libre observados en muestras de suelo asociado a las biocostras, fueron las cianobacterias heterocísticas de los géneros *Scytonema sp.*, *Nostoc sp.*, y *Stigonema sp.*, así como las cianobacterias no heterocísticas de los géneros *Phormidium sp.* y *Oscillatoria sp.* Por lo tanto, en el presente estudio se logró identificar especies de líquenes, microalgas y cianobacterias de suelo, similares a las reportadas en otros estudios de biocostras realizados en México y otras partes del mundo. Las especies identificadas en este estudio corresponden con aquellas presentes en ambientes áridos y semiáridos, de acuerdo con lo reportado por diversos autores.

PALABRAS CLAVE: Biocostras; Ecosistemas Desérticos; Biología Molecular y Microscopía; Líquenes; cianobacterias.

Abstract

Study of the diversity of photosynthetic organisms in biocrusts of desert soils of San Luis Potosí

The biocrusts are communities composed by microorganisms such as cyanobacteria, heterotrophic bacteria, chlorophytes, fungi, and macroscopic organisms like lichens, bryophytes, and microarthropods. They are mainly distributed in desert ecosystems.

In the state of San Luis Potosí, the knowledge of photosynthetic organisms in biocrusts is rather limited. For this reason, the present work aimed at the identification of photosynthetic organisms and microorganisms present in biocrust of desert soils in the surroundings of two the localities Armadillo de los Infante and Guadalcázar. The methodologies in this study included molecular biology techniques, as well as microscopy. In this context, the diversity of lichens was recorded in the study sites, where *Psora icterica*, *Psora crenata*, and the genera *Diploschistes sp.* and *Placidium sp.*, were found. Furthermore, the presence of chlorophytes, some microorganisms of the genera *Myrmecia sp.* and *Trebouxia sp.*, the latter of these was also observed as a free-living chlorophyte. Finally, other microorganisms observed in soil samples associated with the biocrusts were the heterocystic cyanobacteria of the genera *Scytonema sp.*, *Nostoc sp.*, and *Stigonema sp.*, as well as the non-heterocystic cyanobacteria of the genera *Phormidium sp.*, and *Oscillatoria sp.* Therefore, in the present study it was possible to identify species of lichens, microalgae and soil cyanobacteria, similar to those reported in other biocrusts studies carried out in Mexico and other parts of the world. The species identified in the study locations correspond to common species in arid and semi-arid environments, according to various authors.

KEYWORDS:

Biocrust; Desert Ecosystems; Diversity; Molecular Biology and Microscopy; Lichens; cyanobacteria.

I- Introducción

1.1 Definición, estructura y distribución de las Biocostras

Las costras biológicas del suelo (CBS) o biocostras, son comunidades compuestas por cianobacterias, bacterias heterótrofas, clorofitas, hongos, líquenes, briofitas y microartrópodos (García-Pichel, 2002; Belnap y Lange, 2003; Bowker *et al.*, 2016). Se establecen en la superficie de los suelos y pueden alcanzar espesores de hasta 10mm, gracias a la íntima asociación que forman con las partículas del suelo (López-Cortés *et al.*, 2001; Bowker *et al.*, 2011).

El establecimiento de las biocostras en los suelos es descrito como un proceso que ocurre por etapas (Figura 1). Inicialmente, un evento que causa perturbación en el ambiente, de origen natural o por actividad humana, deja los suelos desnudos, como los incendios forestales, el derretimiento de los glaciares, el deslizamiento de la tierra, o la pérdida de la vegetación por deforestación (Belnap y Lange, 2001; Dojani *et al.*, 2011; Frey *et al.*, 2013; Chilton *et al.*, 2018). En esta etapa se asume que las cianobacterias y clorofitas son los primeros organismos en colonizar los suelos gracias a su capacidad fotosintética, y la producción de mucílagos que les permiten adherirse a las partículas del suelo, proporcionando condiciones para que líquenes y briofitas se establezcan posteriormente (Belnap, 2006; Dojani *et al.* 2011; Weber *et al.*, 2016). Finalmente, las plantas vasculares como los pastos y arbustos pueden ocupar los espacios donde se establecieron las biocostras, pero esto depende de cada región biogeográfica y diversos factores bióticos y abióticos (Lange *et al.*, 1997, Belnap 2006).

Las biocostras son consideradas la piel viva de la tierra (Belnap *et al.*, 2001, Büdel *et al.*, 2016), y se estima que cubren el 12% de la superficie terrestre (Figura 2) (Rodríguez-Caballero *et al.*, 2018). Tienen la capacidad de tolerar condiciones extremas de temperatura, pH, salinidad y déficit de agua, por lo que su distribución no se limita a ningún hábitat específico (Bowker *et al.*, 2017), aunque es cierto que se desarrollan principalmente en suelos de zonas áridas y semiáridas, donde cubren los interespacios, es decir, espacios no ocupados por vegetación vascular, lo que

les permite abarcar una cobertura de hasta el 70% de estos interespacios (Belnap y Lange, 2003).

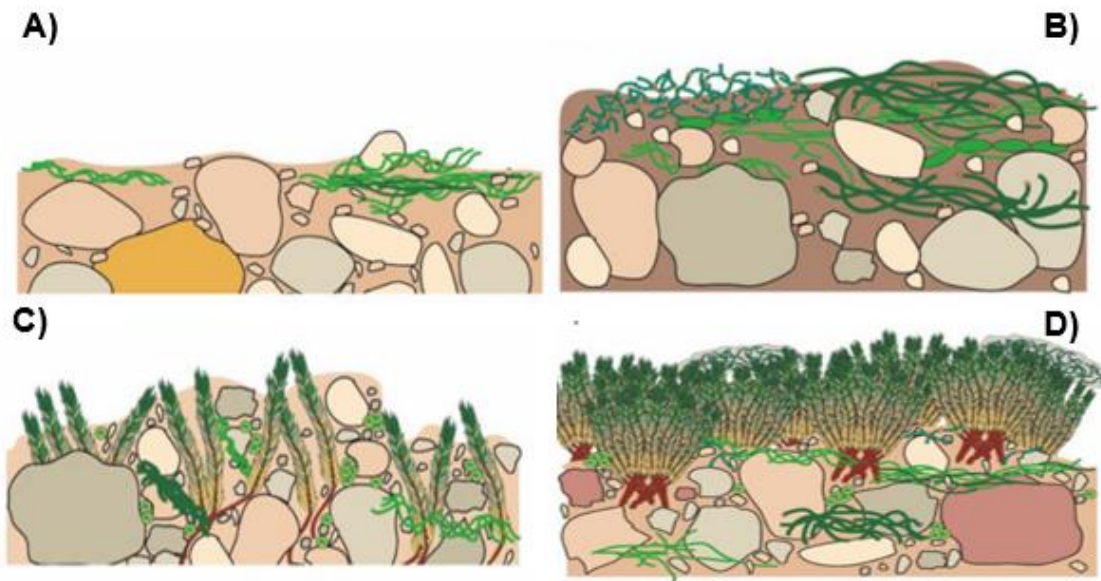


Figura 1. Etapas de establecimiento de las biocostras

(A) Un evento que causa perturbación en el ambiente deja los suelos desnudos, y permite el establecimiento de biocostras. (B) los primeros microorganismos en colonizar los suelos son las cianobacterias filamentosas y las clorofitas. (C) en etapas tardías se incorporan líquenes y briofitas. (D) Finalmente, la asociación de los microorganismos que componen las biocostras crean condiciones que facilitan, en algunos casos, la germinación de semillas y, por tanto, el desarrollo de plantas vasculares. Tomado de Belnap y Lange, 2003.

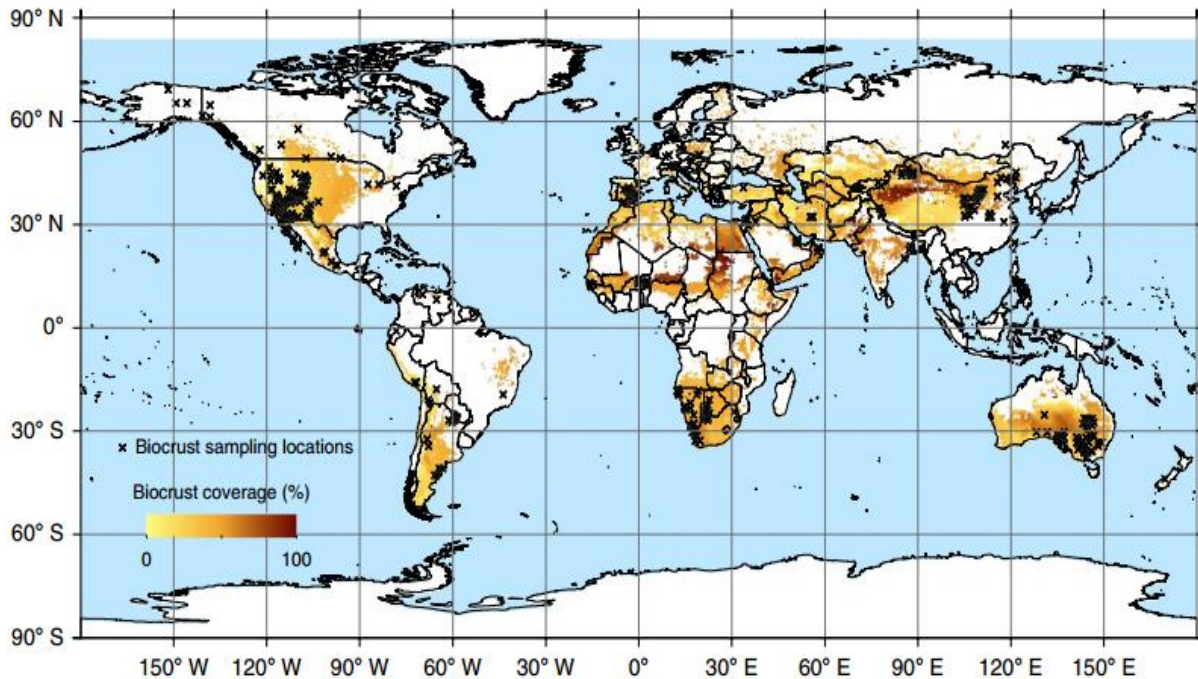


Figura 2. Cobertura estimada de las biocostras a nivel mundial

Las biocostras cubren un área total de 17.9 millones de km² lo que corresponde al 12.2% de la superficie terrestre. Tomado de Rodríguez-Caballero *et al.*, 2018.

1.2 Función ecológica de las biocostras en los ecosistemas

Las biocostras tienen un papel fundamental en los procesos clave para el funcionamiento de los ecosistemas desérticos (Figura 3). De manera general, los microorganismos del suelo intervienen en 3 aspectos importantes del sustrato: 1) estructura, 2) hidrología y 3) composición de nutrientes, (Castillo-Monroy *et al.*, 2011, Maestre *et al.*, 2011, Veste *et al.*, 2011). Respecto a la estructura de los suelos, las biocostras tienen la capacidad de mantener la cohesión de las partículas del suelo, protegiéndolos de esta manera de la acción erosiva del viento y la lluvia (Chamizo *et al.*, 2019). En este proceso, participan cianobacterias filamentosas y algunas clorofitas, las cuales secretan exopolisacáridos (EPS) que mantienen unidas las partículas del suelo (Belnap *et al.* 2001; Chamizo *et al.*, 2019). Por otro lado, los líquenes también aportan estabilidad a los suelos a través de sus rizinas, disminuyendo la erosión (Bowker *et al.*; 2016; Rosentreter, 2016).

Otro proceso importante en el que intervienen las biocostras es en el ciclo hidrológico de los suelos (Lévesque, 2008; Belnap *et al.*, 2016), que depende principalmente de la disponibilidad de agua en el ecosistema, así como la intensidad de la lluvia, la temperatura y la textura de los suelos (Eldridge *et al.*, 2010; Chamizo *et al.*, 2012., Tighe M. *et al.*, 2012). Las estructuras filamentosas formadas por las cianobacterias, clorofitas y líquenes, incrementan la porosidad de los suelos (Colesie *et al.*, 2016, Seppelt *et al.*, 2016) favoreciendo la infiltración del agua (Belnap, 2006). Por otro lado, los polisacáridos extracelulares pueden absorber el agua y de esta manera incrementar la retención de la misma (Belnap, 2006).

Una de las funciones que se investiga de las biocostras en los ecosistemas es su contribución en la fijación de carbono y nitrógeno en los suelos (Elbert *et al.*, 2012). En este sentido es de gran importancia conocer la capacidad fotosintética y la actividad fijadora de nitrógeno de las cianobacterias de vida libre del suelo, y de las cianobacterias que se encuentran en relación simbiótica formando líquenes, pues al incrementar la cantidad de nitrógeno y carbono en los suelos, promueven la fertilidad de los suelos (Belnap, 2003; Ghiloufi *et al.*, 2016).

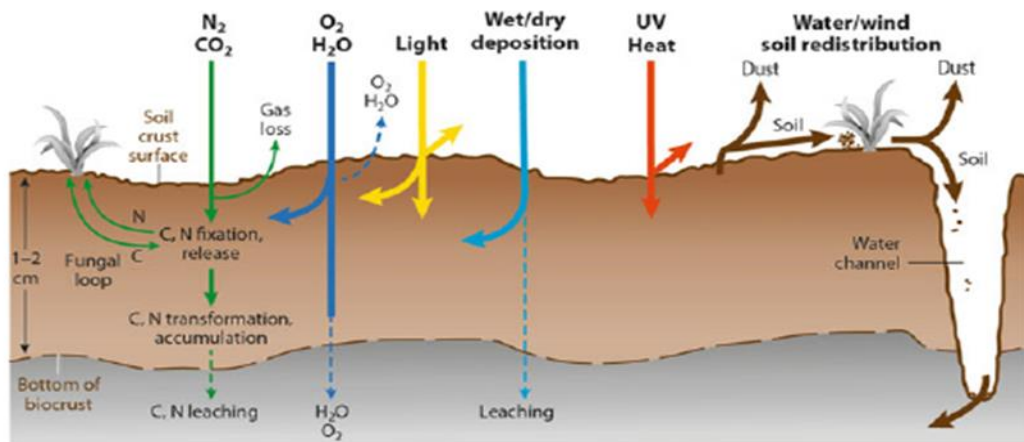


Figura 3. Funciones ecosistémicas de las biocostras de suelos desérticos.

Las cianobacterias y las bacterias heterótrofas presentes en las biocostras, realizan la fijación y la reducción del nitrógeno atmosférico (N_2) a moléculas de amonio (NH_4^+), para que este elemento esté disponible para las plantas vasculares. Sin embargo, este proceso depende de la humedad del ambiente y por lo tanto de la temperatura, es por eso que la punta de las flechas amarillas, verdes y azules se encuentran apuntando a la misma dirección. Del mismo modo y tal como se muestra en la imagen, la fijación del carbono atmosférico también depende de la humedad del ambiente, pues se ha demostrado que pequeños pulsos de agua activan la fotosíntesis de las cianobacterias. Estos microorganismos, a través de procesos de lixiviación y descomposición, dejan el carbono disponible en el suelo, lo que ayuda a mantener la fertilidad de los suelos, y proporciona el alimento para otros organismos. Las flechas color café muestran la capacidad de las biocostras para formar una trampa de polvo rico en nutrientes, que posteriormente se redistribuyen en el suelo. Las biocostras forman una manta horizontal que tiene la capacidad de agregar y adherir las partículas y así disminuir la erosión causada por el aire y el viento. Respecto a los procesos hidrológicos, las biocostras participan en procesos de redistribución de agua, ya sea favoreciendo la infiltración o permitiendo la escorrentía, lo cual depende principalmente de características del suelo como textura y estructura. Tomado de Büdel *et al.*, 2016.

1.3 Componentes biológicos de las biocostras y métodos para su identificación.

Las biocostras tienen componentes macro y microscópicos, entre los que se incluyen cianobacterias, clorofitas, hongos, líquenes, briofitas y microartrópodos (Bowker *et al.*, 2016). La apariencia de las biocostras, la biomasa de las mismas, así como la diversidad de los organismos que las componen, dependen de factores geológicos y climáticos como la altitud, la latitud, la temperatura promedio, el nivel de precipitación, la textura, la topografía, la elevación y la fisicoquímica de los suelos, así como el tipo de vegetación asociada a la región biogeográfica considerada (Castillo-Monroy *et al.*, 2015). Se ha reportado que la actividad humana como el pastoreo intensivo y el cambio de uso de suelo, interfieren con el establecimiento y supervivencia de estas comunidades (Maestre *et al.*, 2002). A continuación, se describen algunas características y métodos utilizados para la identificación de los organismos que componen las biocostras.

1.3.1 Cianobacterias

Las cianobacterias forman un grupo único de procariontes capaces de llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica (Stal, 1995). A partir de su aparición hace 3500 millones de años (Schopf, 1993), cambiaron las condiciones biogeoquímicas de la tierra, pues dieron lugar a una atmósfera rica en oxígeno proporcionando las condiciones ambientales para el desarrollo de la respiración aerobia (Whitton y Potts, 2000). Actualmente, se reconocen cerca de 2700 especies de cianobacterias distribuidas en 170 géneros (Hitzfeld *et al.*, 2000), de los cuales, se han reportado 70 formando parte de biocostras (Büdel *et al.*, 2016).

Las cianobacterias de las biocostras se pueden dividir en tres grupos, de acuerdo con la función que realizan. En el primer grupo se encuentran cianobacterias filamentosas, principalmente de los grupos, Oscillatoriales, Nostocales y Stigonematales. Estas cianobacterias excretan EPS formando una matriz extracelular (EMC) que mantiene la estabilidad del suelo, incluso después de que las cianobacterias mueren. Además, estos polisacáridos también representan un aporte de carbono importante a los suelos. Se considera que estas cianobacterias son las más abundantes y los principales elementos

en la formación inicial de las biocostras (García-Pichel *et al.*, 2001; Büdel *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2016). El segundo grupo incluye a cianobacterias que potencian las funciones ecológicas de las biocostras, a través de su contribución en los ciclos del carbono y el nitrógeno (Weber *et al.*, 2016). Incluye cianobacterias con heterocistos, los cuáles son células especializadas con capacidad fijadora de nitrógeno molecular en condiciones anaerobias (Scheidegger *et al.*, 1995; López-Cortés *et al.*, 2001). Las cianobacterias heterocísticas pertenecen a los géneros, *Anabaena*, *Nostoc*, *Stigonema*, *Aulosira*, *Calothrix* y *Gloeotrichia* (Belnap, 2006), entre otros. Por último, en el tercer grupo se agrupan cianobacterias de vida libre que no son exclusivas de biocostras, pues es posible encontrarlas en hábitats acuáticos, o bien, en relación simbiótica formando líquenes, como el caso de cianobacterias de los géneros *Chroococcus*, *Gleocapsa*, *Gleocapsopsis*, *Cylindrospermum*, *Tolypothrix* y *Phormidium* (Root, 2013; Weber *et al.*, 2016).

La clasificación taxonómica de las cianobacterias se ha hecho siguiendo dos enfoques, el enfoque botánico tradicional y el bacteriológico (Geitler L., 1932; Komárek y Anagnostidis, 2005), el primero está basado en las características morfológicas de las colonias y las células, requiere como referencia taxonómica muestras fijadas y preservadas, como muestras de herbarios (Palinska *et al.*, 2006), mientras que el enfoque bacteriológico (Lapage y *et al.*, 1992), a diferencia del primero, toma en cuenta propiedades fisiológicas, citológicas y bioquímicas de cultivos axénicos de especies aisladas. Requiere como referencia una muestra viva (Wilmotte, 1994).

Dadas las diferencias observadas entre ambos sistemas de clasificación, y por los errores que se observaron en la clasificación de cianobacterias, fue necesario la introducción de una herramienta que permitiera la integración de la información genotípica, fenotípica y filogenética (Vandamme *et al.*, 1991; June, 2007). Por lo que en la década de los 90's surgió el enfoque "polifásico", que ha resultado ser una herramienta valiosa para el estudio de la diversidad de cianobacterias en diferentes ecosistemas (Lehtimaki *et al.*, 2000; Taton *et al.*, 2003; Casamatta *et al.*, 2005; Willame *et al.*, 2006; Yeager *et al.*, 2007).

El conocimiento de la distribución de las cianobacterias del suelo y de su abundancia, a nivel mundial, es de particular interés, y de gran importancia en los ecosistemas

desérticos, pues el estudio de estos microorganismos nos ayudaría a comprender la dinámica funcional en estos ecosistemas (Büdel *et al.*, 2016).

1.3.2 Microalgas

Las algas constituyen un grupo amplio y filogenéticamente muy diverso de organismos eucariontes fotosintéticos. Hasta el 2012 se tenía reporte de 72 500 especies de hábitat acuático y terrestre, aunque se estima que este número es mucho más grande en realidad (Büdel *et al.*, 2016). Si bien no hay géneros de algas exclusivos de biocostras, sí hay especies representativas de algunos géneros con diferentes niveles de especialización ecológica (Büdel *et al.*, 2016). Las microalgas presentes en las biocostras pertenecen a los phylum Chlorophyta y Streptophyta, distribuidas en las familias Xanthophyceae, Eustigmatophyceae y Diatomea (Leliaert *et al.*, 2012).

De acuerdo con el papel que juegan en las biocostras, se pueden agrupar de diferente manera. Por ejemplo, algas formadoras de costras, en este grupo se encuentran clorofitas filamentosas y clorofitas con capacidad de producir y secretar mucílago, lo que les permite atrapar las partículas del suelo y de esta manera potenciar la cohesión del mismo. Algunos ejemplos son las clorofitas de los géneros *Klebsormidium* y *Zygonium*. Un segundo grupo incluye microalgas unidas a las partículas del suelo, algunos ejemplos son las clorofitas de los géneros *Spongiochloris*, *Neochlorosarcina* y diatomeas. A diferencia del primer grupo se encuentran presentes en menor abundancia. El tercer grupo está compuesto por microalgas que habitan como simbiontes de líquenes, y microalgas de vida libre. Por último, el cuarto grupo está compuesto por microalgas dulceacuícolas (Büdel *et al.*, 2009; Fucíková y Lewis, 2012; Weber *et al.*, 2016)

Algo importante de resaltar es que de los organismos fotosintéticos componentes de las biocostras, posiblemente las algas son las menos estudiadas (Weber *et al.*, 2016). Esto se debe principalmente a dos factores, el primero es que, a diferencia de las cianobacterias, la abundancia de microalgas en biocostras es muy baja. Y el segundo, es debido a las dificultades que se presentan en el proceso de identificación de especies, pues algunas características distintivas de su morfología

solo se pueden observar en cultivos unialgales, ya que haciendo microscopia directa es difícil detectar microalgas no filamentosas. Además, algunos géneros de algas presentan estado de dormancia, principalmente cuando la biocostra está seca, dificultando su identificación (Büdel *et al.*, 2016).

Una opción para enfrentar esta problemática en la identificación de especies ha sido integrar la información de la observación microscópica con los datos moleculares, y de esta manera, se ha determinado que el phylum Chlorophyta es el que se encuentra en mayor frecuencia, con 21 especies correspondientes principalmente a las clases Chlorophyceae, Trebouxiophyceae y Ulvophyceae (Wang *et al.*, 2016).

1.3.3 Líquenes

Los líquenes son organismos formados por la asociación simbiótica entre un hongo, llamado micobionte, que usualmente pertenece al phylum Ascomycota y en algunos casos al phylum Basidiomycota; y uno o más organismos fotosintéticos, a los que se les denomina fotobionte. Estos últimos, pueden ser algas verdes y/o cianobacterias. A los fotobiontes eucariontes se les denomina “ficobiontes”, mientras que a las cianobacterias se les denomina “cianobiontes” (Root, 2013). Alrededor del 86% de especies líquénicas están formadas por algas, 10% por cianobacterias, y alrededor del 4% por una mezcla de ambos fotobiontes (Rosentreter *et al.*, 2016). Los géneros de cianobacterias más comunes, por orden de frecuencia son *Nostoc*, *Scytonema*, *Stigonema*, *Gleocapsa* y *Calothrix*. Por otra parte, las algas verdes más comunes son: *Trebouxia*, *Trentepohlia*, *Coccomyxa* y *Myrmecia* (Bowker *et al.*, 2016).

Dada la capacidad de los líquenes de resistir condiciones adversas como la desecación, irradiación solar y temperaturas extremas, pueden adaptarse perfectamente a las condiciones ambientales tan variadas en las que se desarrollan las biocostras (Bowker *et al.*, 2011). Por tal motivo, no es de sorprender que, en ambientes con recursos limitados y escasa vegetación, como las regiones polares, alta montaña, la estepa, zonas áridas y semi-áridas, los líquenes sean los organismos dominantes de las biocostras (Poelt y Grube 1993; Eversman, 1995).

Los líquenes tienen funciones ecológicas importantes para el establecimiento de costras biológicas, tales como la modificación de las propiedades fisicoquímicas del suelo, al potenciar su estabilidad, alterando el flujo del agua, interviniendo en el proceso de retención e infiltración. Además, incrementan la fertilidad de los suelos a través de la fijación del nitrógeno y el secuestro del carbono, reducen o aumentan, la superficie de albedo, y son el hábitat y alimento para algunos invertebrados (Elbert *et al.*, 2012; Maestre *et al.*, 2012; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2013).

Respecto a la clasificación taxonómica de los líquenes, esta se refiere siempre al micobionte, rigiéndose por las normas del código internacional de nomenclatura botánica. En este sentido, se reconocen más de 14 000 especies de líquenes, de los cuales 553 están presentes en biocostras (Honegger, 1991; Nash, 2008).

La apariencia del talo o cuerpo vegetativo de los líquenes está determinada principalmente por el micobionte, aunque hay algunos casos donde el fotobionte influye en mayor medida (Nash, 2008). Tomando en cuenta la morfología del talo, los líquenes se dividen tradicionalmente en costrosos, foliosos y fructiculosos. (Eldridge y Rosentreter, 1999). En una clasificación más extensa se incluyen los líquenes escumulosos, dimórficos y los gelatinosos, en estos últimos el fotobionte siempre es una cianobacteria (Berreno y Ortega, 2003).

Por otro lado, la anatomía de los talos (Figura 4) se puede dividir en dos grupos: talos homómeros, en los que el micobionte y el fotobionte están distribuidos uniformemente, generalmente ocurre en los cianolíquenes, es decir, líquenes cuyo fotobionte es una cianobacteria (Brodo *et al.*, 2001). Esta organización estructural les permite absorber gran cantidad de agua rápidamente, promueve la anoxia y favorece la fijación de nitrógeno (Asplund y Wardle, 2017). El segundo grupo de talo, son los talos heterómeros cuya estructura (Figura 4B) se caracteriza por una organización o estratificación en capas claramente ordenadas designadas como córtex superior, capa de fotobionte, médula y córtex inferior (Anderson *et al.*, 1982). La ventaja que confiere esta organización es la protección del fotobionte por una capa fúngica donde se acumulan sustancias como el ácido úsnico, la atranorina o la parietina, así como cristales de oxalato que permiten proteger el aparato fotosintético del fotobionte (Root, 2013). La mayoría de los líquenes conocidos se

encuentran en este grupo, cuyo fotobionte es una clorofita y son denominados clorolíquenes (Berreno y Ortega, 2003).

En general, la distribución de los líquenes es muy amplia. Sin embargo, hay especies que tienen una distribución geográfica limitada y hasta la fecha solo se tienen reporte de su presencia en los lugares donde fueron descritos por primera vez.

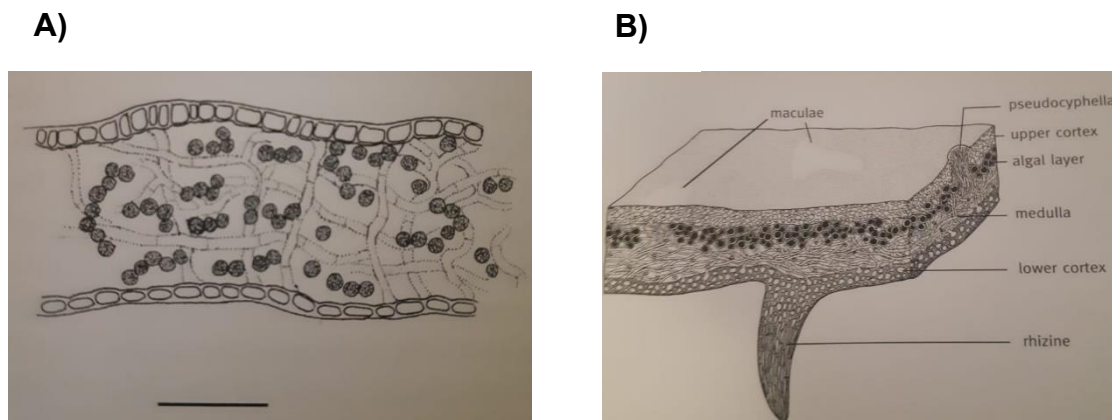


Figura 4. Organización estructural de los líquenes.

(A) Representación de la estructura interna del talo homómero de un cianolíquene. B) representación de la estructura interna del talo heterómero de un clorolíquene. Tomado de *Lichens of North America*, chapter 1. Brodo *et al.*, 2001.

1.3.4 Briofitas y otros componentes biológicos

Las briofitas son plantas generalmente pequeñas que incluyen a tres grupos principales: Hepáticas, Antocerotes y Musgos; su distribución va desde los ambientes árticos, tropicales y desérticos (Delgadillo and Cárdenas, 1990). Se desarrollan principalmente en sitios húmedos, pues requieren agua líquida para su reproducción. Aunque, dadas sus características fisiológicas, también pueden tolerar condiciones ambientales extremas, como las que se presentan en los ecosistemas desérticos (Stark y Whittemore 2000). En estos ecosistemas las briofitas modifican el substrato y dan lugar a condiciones favorables para la colonización por otras plantas (Delgadillo and Cárdenas, 1990).

De los tres grupos de briofitas antes mencionadas, los musgos son los que se encuentran con mayor frecuencia, como componentes fotosintéticos de las biocostras (Hu et al., 2014).

Las biocostras dominadas por musgos se desarrollan en climas semiáridos con precipitaciones anuales de 250-500mm (Hu et al., 2014). Algunos investigadores argumentan, que son los musgos junto con otras especies criptogámicas, como clorofitas y líquenes, los responsables de combatir la desertificación, a través de la estabilización de los suelos y retención del agua (Pando-Moreno *et al.*, 2014). Los dos tipos de musgo encontrados en biocostras son: cortos anuales como *Pterygoneurum ovatum*; y musgos altos perianuales como *Bryum argentum* (Kidron *et al.*, 2002). Su identificación se ha realizado mediante observaciones microscópicas y claves taxonómicas (Stark y Whittemore 2000), y se han reportado aproximadamente 320 especies presentes en biocostras (Brinda *et al.* 2007).

1.4 Herramientas moleculares para la identificación de microorganismos presentes en CBS

La diversidad de microalgas y cianobacterias presentes en biocostras se ha evaluado a través de técnicas moleculares por medio de dos enfoques. El primero es denominado enfoque dependiente de cultivo, el cual consiste en primer lugar en aislar y cultivar en medio los microorganismos presentes en la muestra. Y, una vez aislados los microorganismos, se procede a extraer y purificar el ADN a partir de estos cultivos. El segundo enfoque es denominado independiente de cultivo, y consiste en hacer la extracción y purificación de ADN directamente de las muestras colectadas del suelo. En este caso, el ADN obtenido proviene de los diferentes microorganismos presentes en la muestra.

En ambos casos, posterior a la obtención del material genético, se lleva a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos para regiones genómicas tanto de cianobacterias como de microalgas (Tabla 1). Los productos de amplificación son clonados y finalmente secuenciados mediante tecnologías estándar o tecnologías de secuenciación de nueva generación (Becerra-Absalón *et al.*, 2019).

En el caso específico de las microalgas, la mayoría de los análisis moleculares reportados se han llevado a cabo con el aislamiento y cultivos unialgales obtenidos a partir de muestras de biocostras. Recientemente, mediante un enfoque independiente de cultivo, se amplificó y secuenció un segmento de la región conservada del operón 16S-23S rRNA, con los oligonucleótidos nuITS1 y nuITS2 (Maestre *et al.* 2006; Lin y Wu 2014). La información obtenida de los datos de secuenciación fue comparada con aquellas secuencias reportadas en bases de datos. Posteriormente, el resultado fue corroborado con la información obtenida del análisis morfológico de los microorganismos por microscopía y con las claves taxonómicas para su identificación (Komarek, 2015).

En México, la identificación de microorganismos que conforman las biocostras se ha llevado a cabo principalmente mediante el análisis microscópico (Maya *et al.*, 2002; Rivera-Aguilar *et al.*, 2006; López-Cortés *et al.*, 2010), así como por análisis de “clusters” de patrones de bandeo de secuencias del 16S rRNA, obtenidos por electroforesis de gel en gradiente desnaturante (DGGE), para determinar diferencias en la estructura de las comunidades de cianobacterias estudiadas (López-Cortés *et al.*, 2010). Con el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas, en 2018 se analizó la estructura secundaria de los dominios conservados de la región 16S-23S ITS de doce aislados de cianobacterias colectadas en la región central de México. Con esta herramienta, se logró la identificación de dos especies del género *Chroakolemma* que inicialmente habían sido clasificadas dentro del género *Leptolyngbya* (Becerra-Absalón *et al.*, 2018). Posteriormente, se comenzaron a aplicar tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS), combinado con el análisis microscópico, para la identificación de especies de cianobacterias endémicas en el centro del país (Becerra-Absalón *et al.*, 2019). En este estudio se encontraron cianobacterias reportadas en otros estudios como cosmopolitas y nuevos filotipos, correspondientes al género *Schizothrix sp.*, no reportados previamente en el desierto Chihuahuense, por lo que propusieron esos filotipos como posiblemente endémicos de la región estudiada.

Actualmente los científicos que abordan la investigación sobre la composición de microorganismos presentes en biocostras, concuerdan en que es necesario

combinar las herramientas informáticas y moleculares con los datos de microscopia, además de considerar la ecología de estas comunidades.

En este sentido, el presente trabajo está dirigido en el uso de herramientas moleculares para la identificación de microorganismos fotosintéticos presentes en biocostras de suelos desérticos de San Luis Potosí, específicamente en los alrededores de Armadillo de los Infante y Guadalcázar. Con la finalidad de conocer las especies presentes en los sitios de estudio y comparar con aquellas identificadas y reportadas en otros sitios geográficos, principalmente en sistemas áridos y semi áridos.

Tabla 1. Algunos oligonucleótidos empleados en la identificación de cianobacterias y clorofitas.

CIANOBACTERIAS		
Nombre	Secuencia	Referencia
CYA106F ^C	5'-CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTG A-3'	Nübel <i>et al.</i> , 1997
CYA359F ^C	5'-GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG-3'	Nübel <i>et al.</i> , 1997
CYA781R(a) CYA781R(b)	5'-GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T-3' 5'-GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T-3'	Nübel <i>et al.</i> , 1997
27F	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	Wilmotte <i>et al.</i> , 1993
B23SR	5'-CTT CGC CTC TGT GTG CCT AGG T-3'	Lepère <i>et al.</i> , 2000
CLOROFITAS		
Nr-SSU-1780 (Oligo FW)	5'-CTGCGGAAGGATCATTGATTC-3'	Piercy-Nomore y DePriest, 2001
ITS1 Trebouxia (Oligo RV)	5'-GGAAGGATCATTGAATCTATCGT-3'	Kroken y Taylor, 2000
ITS4 (Oligo RV)	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White <i>et al.</i> , 1990
20F	5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'	De Long, 1992
CH1750R	5'-CTTCCTCTARTTGGGAGG-3'	Hallmann <i>et al.</i> , 2013
nuITS1	5'-TGGTTGATCCTGCCAGTAG-3'	Shoup and Lewis, 2003
nuITS2	5'-TGATCCTTCCGCAGGTTTAC-3'	Shoup and Lewis, 2003

II- Objetivo general

Identificar microorganismos fotosintéticos presentes en biocostras dominadas por líquenes, en dos regiones semidesérticas de San Luis Potosí, mediante marcadores moleculares y otras técnicas.

2.1 Objetivos específicos

1. Identificar líquenes mediante técnicas de microscopía.
2. Identificar microorganismos fotosintéticos presentes en biocostras dominadas por líquenes y en el suelo asociado a estas, mediante técnicas de microscopía
3. Identificar cianobacterias mediante el uso de oligonucleótidos específicos de la región 16S-23S (ITS) del rRNA.

III- Materiales y métodos

3.1 Sitios de estudio

Las muestras fueron colectadas en suelos de ecosistemas desérticos en los alrededores de Armadillo de los Infante y Guadalcázar, municipios localizados en la zona centro y norte del estado de San Luis Potosí, México.

El primer sitio de colecta corresponde a Armadillo de los Infante, 22° 13' 33.1" N, y 100° 39' 31.3" W, 1641m.s.n.m (Carta Topográfica 1: 1 000 000 INEGI, 2009) (Figura 5A). El tipo de vegetación predominante es el matorral desértico micrófilo, dominado por *Prosopis spp.* El clima predominante es semiseco templado, con lluvias en verano y con temperatura media anual de 18° C. La precipitación total anual varía entre 300 – 700 mm. La topografía se caracteriza por sierras plegadas con llanuras desérticas. Los suelos son leptosoles de origen sedimentario, de textura franco-arcillosa a franca. Su uso es ganadero y agrícola (INEGI, 2009).

El segundo sitio de colecta corresponde a Guadalcázar, 22° 37' 9.6" N, y 100° 29' 23.3" W, 1640 m.s.n.m (Carta Topográfica 1: 2 500 000 INEGI, 2009) (Figura 5B). El tipo de vegetación predominante es el matorral desértico rosetófilo, donde es posible encontrar nopal, izotal y cardonal. El clima predominante es seco semicálido, con lluvias en verano y con temperatura media anual de 18.1° C. La precipitación total anual varía entre 300–800 mm (INEGI, 2009). Cuenta con suelos de origen sedimentario, derivándose de rocas calcáreas, lutitas y areniscas; su topografía es variable, pues existen áreas planas y otras como las laderas, además de cerros con pendientes mayores y relieve ondulado (INEGI, 2009).

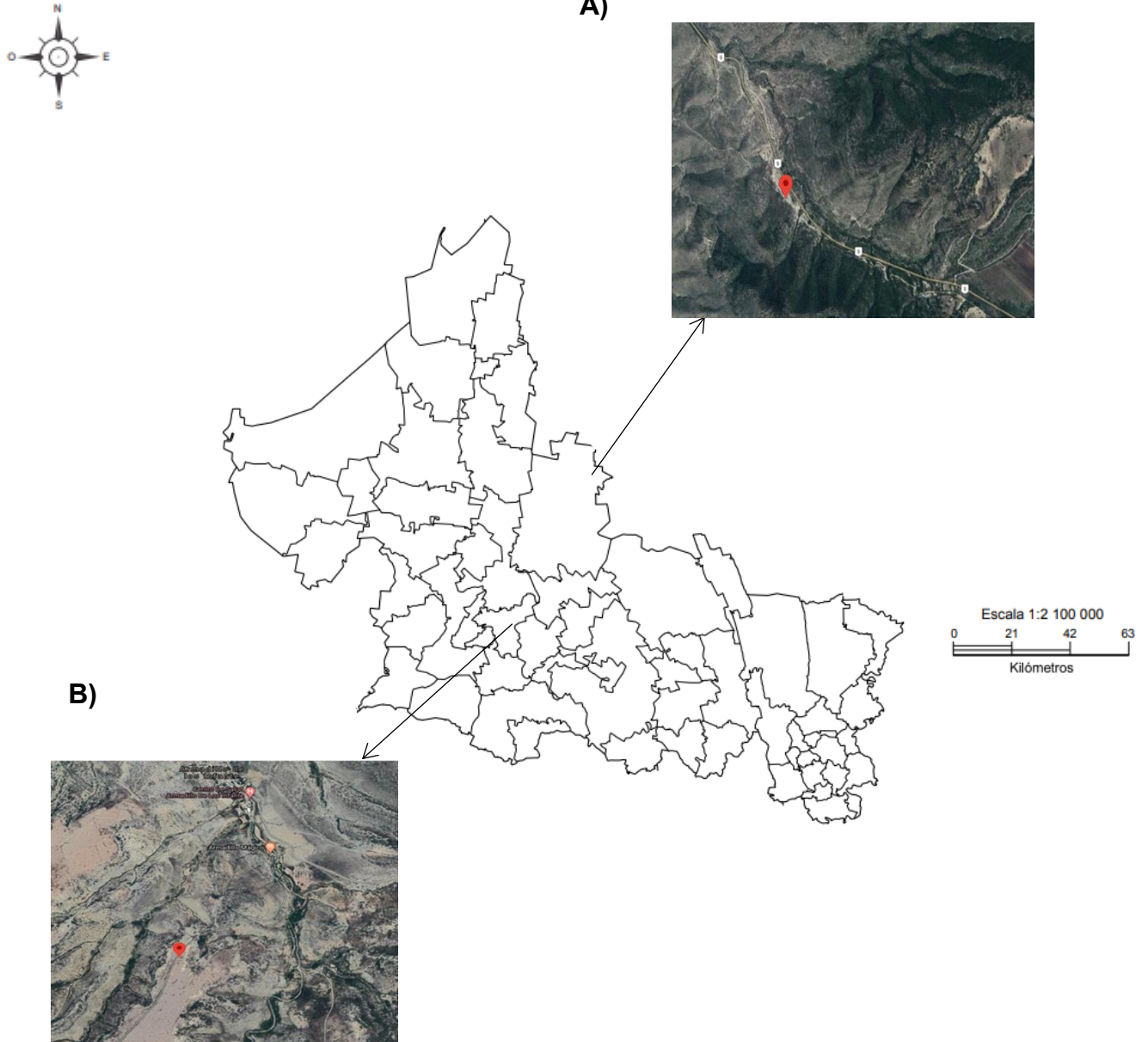


Figura 5. Mapa de localización de los sitios del estudio

(A) Guadalcázar, (B) Armadillo de los Infante, San Luis Potosí, México. Los puntos rojos señalados en las fotografías corresponden a los sitios de muestreo. Imagen de Google Earth 2020. Mapa tomado de INEGI, Marco geoestadístico, diciembre 2018.

3.2 Muestreo en campo

Las muestras fueron colectadas durante el mes de agosto de 2019, siguiendo el procedimiento descrito por García-Pichel *et al.* (2013) y Muñoz-Martín *et al.* (2019). En ambos sitios de colecta, se consideró un área de 25 a 50 m², que previamente fue inspeccionada para elegir lugares con abundancia de biocostra. En total en Armadillo se colectaron 8 muestras, y en Guadalcázar se colectaron 6 muestras (tabla 2). Las muestras fueron biocostras dominadas por líquenes. Para la extracción del talo del liquen se utilizó una espátula, y cajas Petri de 60 mm, para tomar una profundidad de suelo de aproximadamente 1cm, tratando de no perturbar la capa superior del suelo. Las muestras se colocaron cuidadosamente en bolsas de papel etiquetadas y se almacenaron en una hielera para su traslado al Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales en el IPICYT. En el laboratorio, las muestras fueron conservadas a 4°C.

3.3 Caracterización morfológica de líquenes

La identificación de las especies de líquenes de las muestras colectadas se realizó mediante microscopia en el Laboratorio de Procesamiento de Muestras Biológicas, con la asesoría de la Dra. Olga Araceli Patrón. Para ello, se hicieron cortes criogénicos de 15, 20 y 40 µm a -25°C. Posteriormente se observaron en un microscopio óptico Zeiss con módulo apotome, utilizando una amplificación de 100, 200 y 400 aumentos. Adicionalmente, se hizo un test químico con KOH, NaClO, y Solución Steiner, el procedimiento se describe en el Anexo 1. Para la identificación de las especies de líquenes se utilizaron las guías taxonómicas Nash II y Nash III (Nash *et al.*, 2002; Nash *et al.*, 2008).

3.4 Caracterización morfológica de cianobacterias

La identificación de las cianobacterias de vida libre asociadas al suelo de las muestras colectadas se realizó primero con la hidratación de las muestras, posteriormente se tomó una sección de suelo y con ayuda de unas pinzas de disección se realizó un frotis. Las muestras fueron observadas en el Laboratorio de Procesamiento de Muestras Biológicas, con el apoyo de la Dra. Olga Araceli Patrón Soberano, se utilizó un microscopio óptico Zeiss con módulo apotome, con

amplificaciones de 100, 200 y 400 aumentos. Para la identificación de especies de cianobacterias observadas se utilizaron las guías taxonómicas de Komáreck (Komárek y Anagnostidis, 1998; Komárek y Anagnostidis, 2005; Komárek, 2013). Algunas de las características que se tomaron en cuenta para la identificación de los géneros encontrados fueron las siguientes: la forma de las células, presencia y posición de los heterocistos, tipo de ramificación del tricoma, presencia de estructuras de reproducción, coloración y grosor de la vaina.

3.5 Extracción de ADN total de líquenes y biocostras

La extracción de ADN genómico de 14 muestras colectadas, 8 muestras de Armadillo y 6 de Guadalcázar, se hizo a partir de 100 mg de muestra y de acuerdo con el protocolo de extracción con fenol-cloroformo reportado por Sagova-Mareckova *et al.*, 2008.

Adicionalmente, se realizaron las siguientes modificaciones al protocolo original: menor cantidad de muestra, mayor tiempo de agitación para lisis celular, se implementó el uso de perlas de vidrio de 0.1mm y 1mm de diámetro, así como el uso de un agitador vórtex para la lisis mecánica. En el Anexo 2 se describe en detalle el protocolo de extracción utilizado en este trabajo. Por otro lado, la eliminación de inhibidores de la enzima ADN polimerasa presentes en la muestra, como ácidos húmicos y fúlvicos, se realizó mediante la adición de un paso de lavado con polivinilpirrolidona (PVP) al 5%. En el Anexo 3 se describe detalladamente este procedimiento.

3.6 Amplificación por PCR de la región 16S-23S (ITS) rRNA de cianobacterias

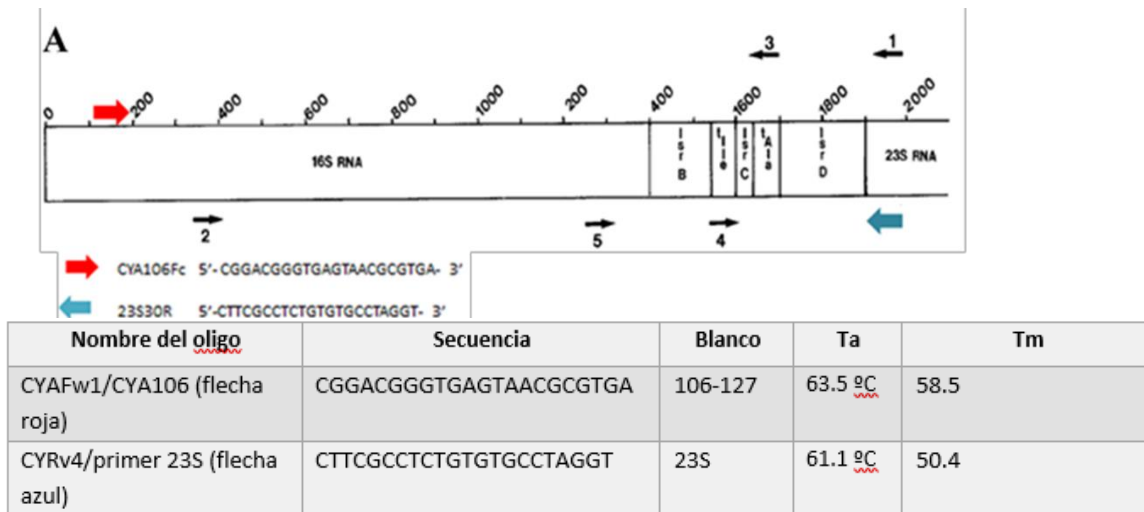
Los oligonucleótidos específicos para la región 16-23S rRNA de cianobacterias fueron seleccionados considerando la información de trabajos publicados por Nübel y colaboradores (Nübel *et al.*, 1997), así como de Boyer y colaboradores (Boyer *et al.*, 2001). En la figura 6 se indican los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

La composición de la mezcla de reacción para PCR (volumen total 50 µl) consistió en: Buffer Taq DNA polimerasa 1X, MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.2mM, oligonucleótidos 1 µl, Taq polimerasa 2 UT, DNA 100ng. Inicialmente se realizó un gradiente de temperatura para determinar las condiciones óptimas para la amplificación de los

fragmentos esperados, considerando la temperatura de fusión (T_m) de ambos oligonucleótidos. Las condiciones finales para PCR fueron: desnaturalización inicial a $94^{\circ}\text{C}/3\text{min}$, y 30 ciclos conformados por $95^{\circ}\text{C}/1\text{min}$, $68^{\circ}\text{C}/30\text{seg}$, $72^{\circ}/2\text{min}$, con una extensión final de $72^{\circ}\text{C}/5\text{min}$. Los productos amplificados fueron analizados por movilidad electroforética en geles de agarosa al 1%.

Cabe mencionar que las condiciones de PCR fueron establecidas utilizando una muestra de ADN obtenida de un cultivo de cianobacteria filamentosa, donada por el Dr. Alejandro López Cortés, del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR). Al momento de proporcionar la muestra, la identificación de la cianobacteria estaba en proceso.

Figura 6. Oligonucleótidos utilizados en este proyecto y mapa del operón 16-23S rRNA



3.7 Corte con enzimas de restricción de los fragmentos amplificados

Los productos de PCR fueron purificados por columna, y cortados con enzimas de restricción para comparar los productos de esta reacción. Para ello, se realizó una búsqueda, en la base de datos del GenBank, de secuencias nucleotídicas correspondientes a la región ITS reportadas para cianobacterias presentes en biocostras. Estas secuencias se analizaron con el programa NEBcutter2.0 para buscar sitios de corte para enzimas de restricción. Con los datos de este análisis, se seleccionaron las enzimas *Pst*I y *Kpn*I las cuales solo tienen un sitio de corte en las secuencias. Los productos de PCR obtenidos a partir de nuestras muestras, fueron sometidos a la reacción de corte y analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las enzimas utilizadas fueron de New England BioLabs.

3.8 Clonación de productos de PCR.

Los productos de PCR obtenidos con los oligonucleótidos CYA106F/23S30R fueron clonados en el vector pGEM-T easy. Previo a la clonación, los productos de amplificación fueron purificados con el “PCR purification Kit” de Jena Bioscience, siguiendo las indicaciones del proveedor. La reacción de ligación de los productos de PCR y el vector se llevó a cabo en un volumen de 10 µl, una relación molar vector–inserto de 3:1, 1 unidad de enzima T4 ADN ligasa (1 unidad/ µl), y 2 µl del buffer 5X. La reacción se dejó incubando durante toda la noche a 16°C y al día siguiente se utilizó para la transformación de células competentes de *Escherichia coli* Top 10.

3.9 Transformación de células competentes de *Escherichia coli* Top 10.

Las células competentes fueron descongeladas y se les adicionó 5 µl de la reacción de ligación, se mezcló rápidamente e incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, se dio un choque térmico a 42°C durante 45 seg, seguido de incubación en hielo por 3 min. Se les adicionó 300 µl de medio LB líquido, y se incubaron a 37°C durante 90 min. Una vez transcurrido este tiempo, se sembraron 200 µl del cultivo en cajas Petri con medio LB agar suplementado con ampicilina a una concentración de 100µg/mL, y se incubaron a 37°C. Al día siguiente, se seleccionaron colonias para inocular 3ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina y se dejó crecer a 37°C durante

toda la noche; al día siguiente se llevó a cabo la extracción de ADN plasmídico (miniprep) con el método de Birnboim–Doly (Sambrook y Rusell, 2001). Las clonas seleccionadas fueron secuenciadas con los oligonucleótidos CYA106FW y M13, usando el método de secuenciación por dideoxinucleótidos (SANGER), en el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental, LANBAMA. Las secuencias nucleotídicas de ambas cadenas obtenidas por secuenciación fueron comparadas con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank, utilizando BLAST y la base de datos SILVA.

IV-Resultados

4.1 Identificación de líquenes mediante técnicas de microscopía.

En Armadillo de los Infante se colectaron 8 muestras y en Guadalcázar se colectaron 6 muestras de biocostras (tabla 2).

Tabla 2. Muestras colectadas.

	Armadillo de los Infante	Guadalcázar
Número de muestras colectadas	8	6
Muestras a las cuales se les hizo extracción de ADN	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8	G2, G3, G4, G5, G6
Muestras de las cuales se obtuvo producto PCR	3, 4, 5, 6, 7	G2, G3, G4, G5, G6
Identificación de líquenes	Muestra 1: <i>Psora ictérica</i>	Muestra G1: <i>Psora crenata</i> Muestra G2: <i>Placidium sp.</i> Muestra G4: <i>Diploschistes sp</i>

En una de las muestras colectadas en Armadillo de los Infante, (muestra 1), se identificó la especie *Psora ictérica* (Figura 7A). En esta misma muestra, se observó la presencia de una cianobacteria que no se encuentra integrada en la capa del fotobionte, sino que al parecer se localiza en el exterior del córtex inferior (Figura 7B y 7C). Para determinar si correspondía a un fotobionte, y no a una interferencia de

las partículas de suelo adheridas a la muestra, se expuso el corte a una longitud de onda de 400 nm, esta longitud de onda es capaz de excitar la clorofila presente en las cianobacterias. El resultado observado fue una señal de fluorescencia en la muestra como se ilustra en la Figura 7D. Estos resultados sugieren que posiblemente se trate de una cianobacteria epífita de este líquen. Sin embargo, es necesario corroborar esta información con la observación a mayor detalle, y examinando otros cortes de dicha muestra. Así como de obtener datos adicionales mediante análisis molecular.

En otra muestra, (muestra 4), colectada en este mismo sitio, se encontró un posible cianolíquen (Figura 7K), el cual no se logró identificar debido al estado físico de la muestra, ya que en el transporte y almacenamiento se deterioró. Esto no permitió identificar de manera precisa la morfología externa del líquen. Sin embargo, en parte de la muestra se observó que su fotobionte corresponde a la cianobacteria del género *Nostoc sp.* (Figura 7K).

Por otro lado, en las muestras colectadas en Guadalcázar, en la muestra G1 se identificó la especie *Psora crenata*, (Figura 7E), en tanto que en la muestra G4 se identificó el género *Diploschistes sp.*, (Figura 7I), y en la muestra G2 se encontró el género *Placidium sp.* (Figura 7J). Respecto a las especies de fotobiontes encontrados en estos líquenes, en el caso de *Psora ictérica*, *Psora crenata*, y el género *Placidium sp.*, observamos el fotobionte correspondiente a la clorofita del género *Myrmecia sp.* como se ha reportado previamente (Figura 7A, 7E y 7J); en el caso del género *Diploschistes sp.*, se observó el fotobionte correspondiente a la clorofita del género *Trebouxia sp.* (Figura 7I).

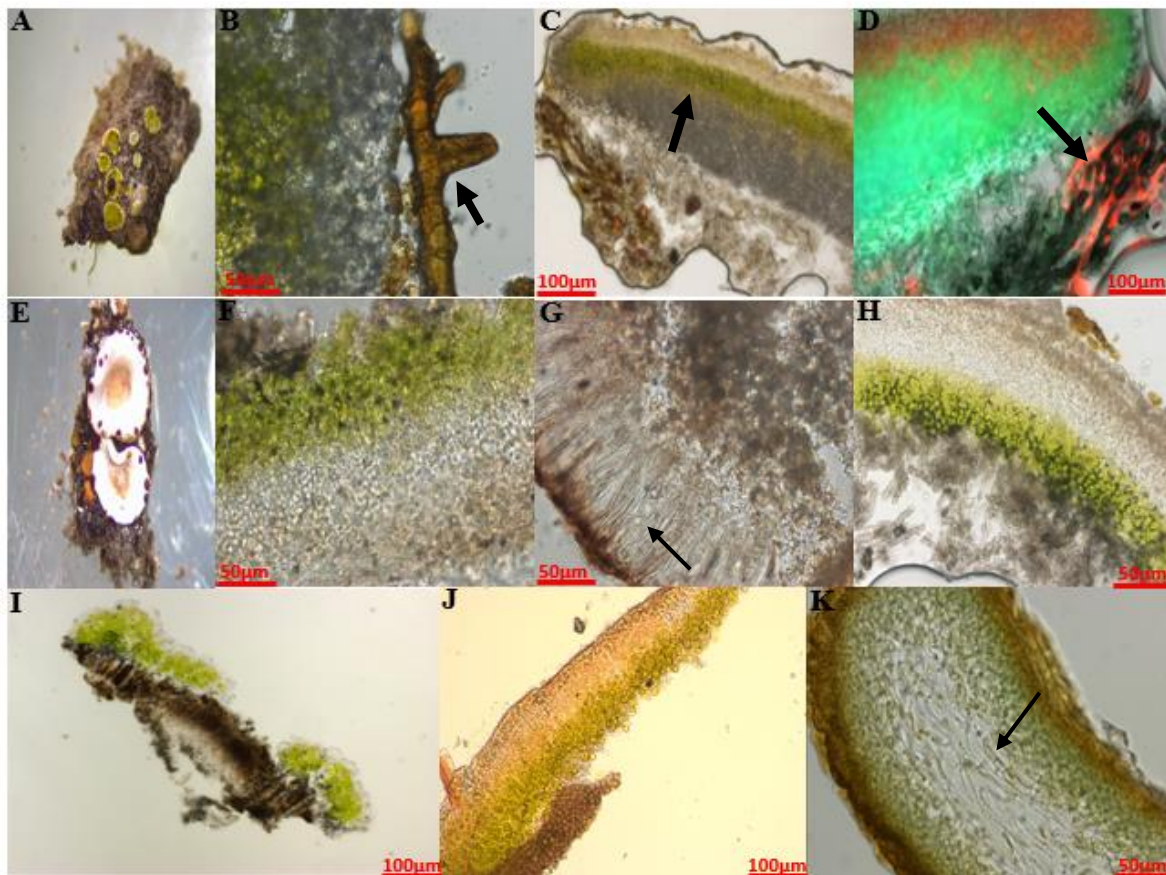


Figura 7. Identificación microscópica de líquenes.

Diversidad de líquenes presentes en las biocostras de Armadillo de los Infante y Guadalcázar, (A) Muestra1, *Psora ictérica*. (B) En la imagen se puede observar una posible cianobacteria epífita del liquen (señalada con flecha) que, de acuerdo con las características morfológicas, es posible que corresponda al género *Scytonema sp.* (C) Corte transversal del talo, la flecha señala el fotobionte, que corresponde a la clorofita del género *Myrmecia sp.* (D) la flecha indica la señal de fluorescencia que se observó en la zona de la presunta cianobacteria. (E) Muestra G1 *Psora crenata*, (G) La flecha señala las esporas de *Psora crenata*, algunas de las características que se observaron incluyeron, su coloración hialina y forma esférica. (H) corte transversal de *Psora crenata* donde es posible distinguir la estructura típica de un liquen, (I) muestra G4, corte transversal de *Diploschistes sp.* (J) muestra G2, corte transversal de *Placidium sp.* (K) Corte transversal de un cianolíquen con *Nostoc sp.* como fotobionte, señalado con una flecha.

4.2 Identificación de cianobacterias asociadas a biocostras de suelos desérticos

En Armadillo de los Infante se analizaron cuatro muestras (muestra 1, 4, 6 y 7), en Guadalcázar se analizó la muestra G4.

Se observaron cianobacterias de vida libre con presencia de heterocistos, y sin heterocistos (Figura 8). Respecto a las cianobacterias con heterocistos, las características morfológicas sugieren que pertenecen a los géneros *Scytonema sp.* (Figura 8A), *Nostoc sp.* (Figura 8B), y *Stigonema sp.* (Figura 8C).

En cuanto a las cianobacterias sin heterocistos, se observó la presencia de cianobacterias que posiblemente pertenecen a los géneros *Phormidium sp.* (Figura 8D), y *Oscillatoria sp.* (Figura 8E).

Adicionalmente, en la muestra G4 colectada en Guadalcázar se encontró la presencia de clorofitas correspondientes al género *Trebouxia sp.* (Figura 8F).

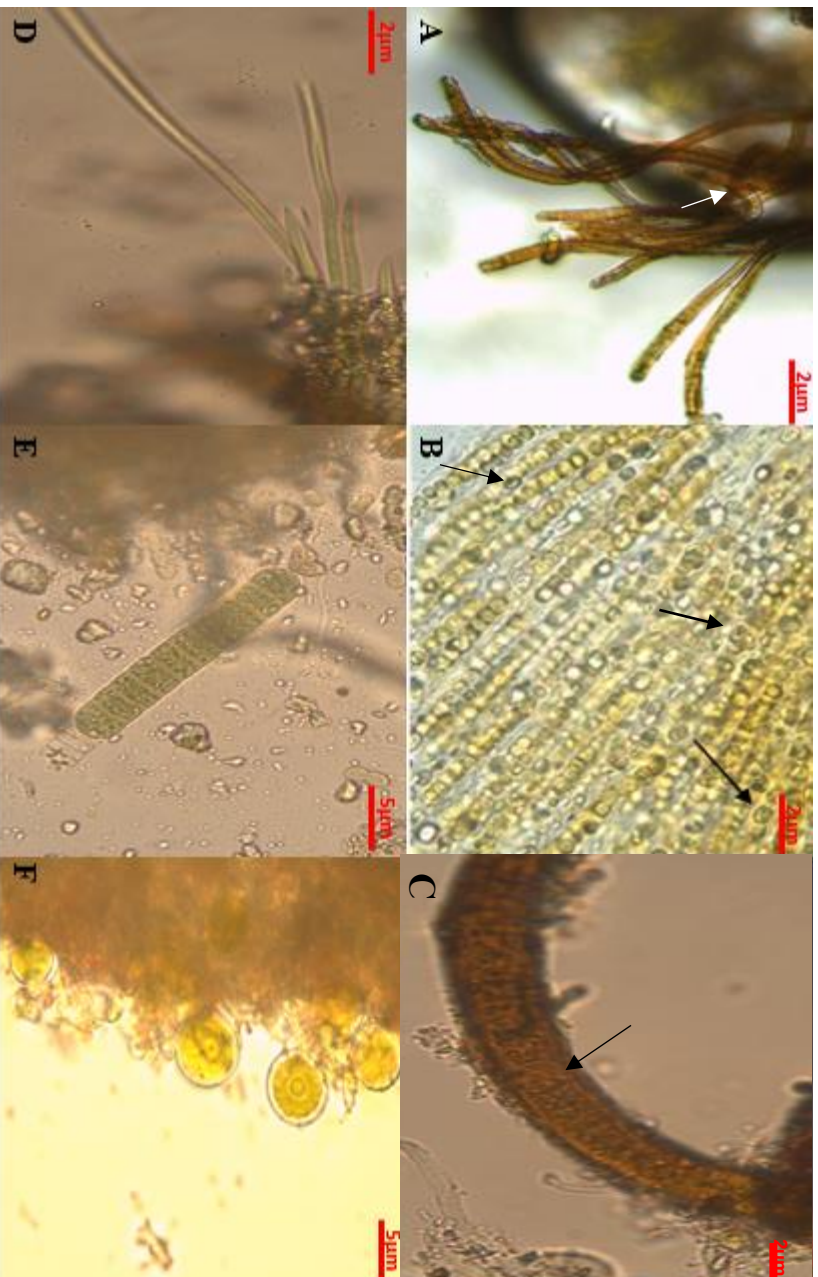


Figura 8. Observación de cianobacterias de vida libre realizadas mediante microscopía

(A) *Scytonema sp.*, (muestra 1) la flecha señala la presencia de una falsa ramificación, característica típica de este género. (B) *Nostoc sp.*, (muestra 4), las flechas muestran la presencia de heterocistos a lo largo del tricoma. (C) *Stigonema sp.*, (muestra 6), la flecha señala la presencia de un heterocisto; (D) Cianobacteria identificada en muestra 6 colectada en Armadillo de los Infante, posiblemente corresponde al género *Phormidium sp.* (E) *Oscillatoria sp.*, encontrada en la muestra 7 colectada en Armadillo de los Infante (F) Clorofita perteneciente al género *Trebouxia spp.* encontrada en la muestra G4, el suelo asociado a las biocostras de Guadalcañar.

4.3 Estandarización del protocolo de extracción de ADN total de líquenes y biocostras.

Tomando en cuenta que en las muestras colectadas se identificó la presencia de cianobacterias asociadas al suelo o que viven como fotobiontes de los líquenes, se procedió a realizar una búsqueda bibliográfica sobre métodos de extracción de biocostras del suelo, por lo que inicialmente la extracción de ADN total de muestras colectadas en Armadillo de los Infante se realizó con PowerSoil DNA isolation Kit (MO BIO laboratories). Sin embargo, el ADN obtenido no fue de buena calidad (Figura 8) y en la PCR no se obtuvieron productos de amplificación. Por tanto, se decidió seguir el protocolo de extracción de ADN de Miller y colaboradores (1999), así como algunas modificaciones a este, hechas por Sagova–Mareckova (Sagova–Mareckova, *et al.*, 2008). Con este protocolo modificado fue posible obtener ADN de buena calidad de las muestras colectadas en Armadillo de los Infante (Figura 9A). Sin embargo, en las muestras colectadas en Guadalcázar no se obtuvo el mismo resultado (Figura 9B), y no se observaron productos de amplificación. Por esta razón fue necesario realizar modificaciones al protocolo, que consistieron en el incremento del tiempo de lisis mecánica en el vórtex, se añadieron nanopartículas de plata como un paso adicional a la lisis química. Sin embargo, al ver que a pesar de estos cambios no se obtenían productos de amplificación, se optó por añadir un paso de lavado con polivinilpirrolidona (PVP) al 5%. Esto mejoró la calidad de ADN en las muestras de ambos sitios (Figura 9A y 9C), y fue posible obtener productos de amplificación. Por lo que concluimos que se deben considerar las características fisicoquímicas del suelo, para poder seleccionar el mejor protocolo de extracción de ADN que permita tener una buena calidad y concentración de ADN genómico total y así llevar a cabo análisis moleculares posteriores.

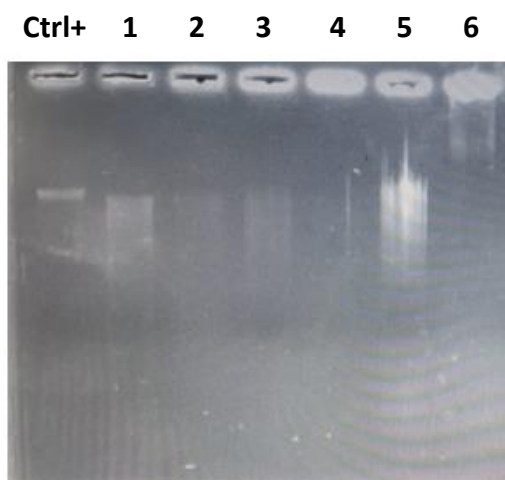


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de ADN genómico total extraído con kit comercial.

Muestras colectadas en Armadillo de los Infante, la muestra tomada como referencia (ctrl+) corresponde a ADN genómico de cianobacteria donada por el Dr. Alejandro López Cortés del CIBNOR. Carril 1 al 6, muestras 1 a 6.

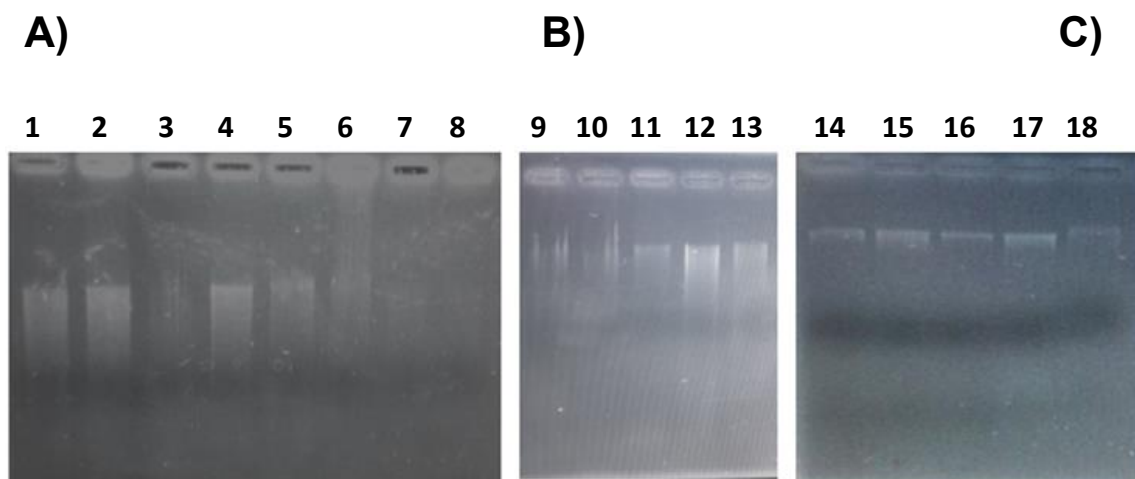


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de ADN genómico total extraído de las muestras.

(A) Muestras colectadas en Armadillo de los Infante, carril 1 – 8, muestras 1 – 8. (B) muestras colectadas en Guadalcázar, carril 9 – 13, muestras G2 – G6 (ver tabla 2). El ADN obtenido de estas muestras resultó ser de mala calidad, ya que no fue posible obtener producto de amplificación en ningún caso. (C) Muestras tratadas con PVP al 5% durante la extracción. Carril 14 – 18, muestras G2 – G6.

4.4 Amplificación por PCR de la región 16S-23S (ITS) rRNA de cianobacterias

Los oligonucleótidos específicos para cianobacterias fueron seleccionados considerando trabajos publicados previamente. Los oligos CYA106F y 23S30R, fueron usados para la amplificación por PCR de la región 16-23S rRNA, (Figura 11).



Figura 11. Mapa del operón 16-23S rRNA y sitios blanco de los oligonucleótidos utilizados por Boyer *et al.* (2001).

Los oligonucleótidos señalados con las flechas rojas corresponden al par de iniciadores utilizados en este trabajo. En el caso del oligonucleótido CYAFW1, el sitio blanco se encuentra entre las posiciones 106 y 127 (pb) y para el oligonucleótido CYARV4 el sitio blanco se encuentra alrededor de los 2000 (pb).

Las condiciones óptimas para la PCR debieron ser establecidas en primer término, para lo cual se realizó un gradiente de temperatura a fin de determinar las condiciones óptimas de amplificación de los fragmentos esperados. Considerando la temperatura de fusión (T_m) de ambos oligonucleótidos, se decidió iniciar con temperaturas de alineamiento de 54° a 60°C. Sin embargo, a estas temperaturas se observaron más de una banda (datos no mostrados), por lo que se decidió incrementar el rango de temperaturas del gradiente de 60 a 70°C, con lo que se logró observar una banda única a los 68°C (Figura 12A).

Con esta temperatura de alineamiento, se obtuvieron productos de PCR de 6 muestras de Armadillo de los Infante y 5 de Guadalcázar (Figura 12B). Los productos de PCR fueron purificados por columna y se procedió a realizar un análisis de polimorfismos mediante el uso de enzimas de restricción. Para esto, las secuencias nucleotídicas de la región ITS reportados para cianobacterias fueron analizadas para la búsqueda de enzimas de restricción de corte único. Con los datos obtenidos se eligieron las enzimas *PstI* y *KpnI*. De las muestras analizadas, se observó un patrón de bandeo distinto en las muestras 6, 7 y G4 (Figura 12C). Este resultado sugiere la posibilidad de que exista más de un genoma de cianobacteria

en estas muestras de ADN. Por lo tanto, se decidió clonar los productos de PCR de las muestras 6, 7 (Armadillo de los Infante) y G4 (Guadalcázar) en el vector pGEM easy T, y se secuenciaron bidireccionalmente como se describe en materiales y métodos.

Como resultado de la secuenciación obtuvimos secuencias de aproximadamente 1150 pb. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas utilizando el software BioEdit 7.2. Posteriormente, fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch). Se tomaron en cuenta las asignaciones con porcentajes de identidad mayores al 90% y con una cobertura mayor del 95%. Enseguida, se hizo un alineamiento múltiple de secuencias, utilizando la función ClustalW multiple alignment (Thompson *et al.*, 1994), los alineamientos fueron visualizados y corregidos posteriormente utilizando el software BioEdit 7.2.

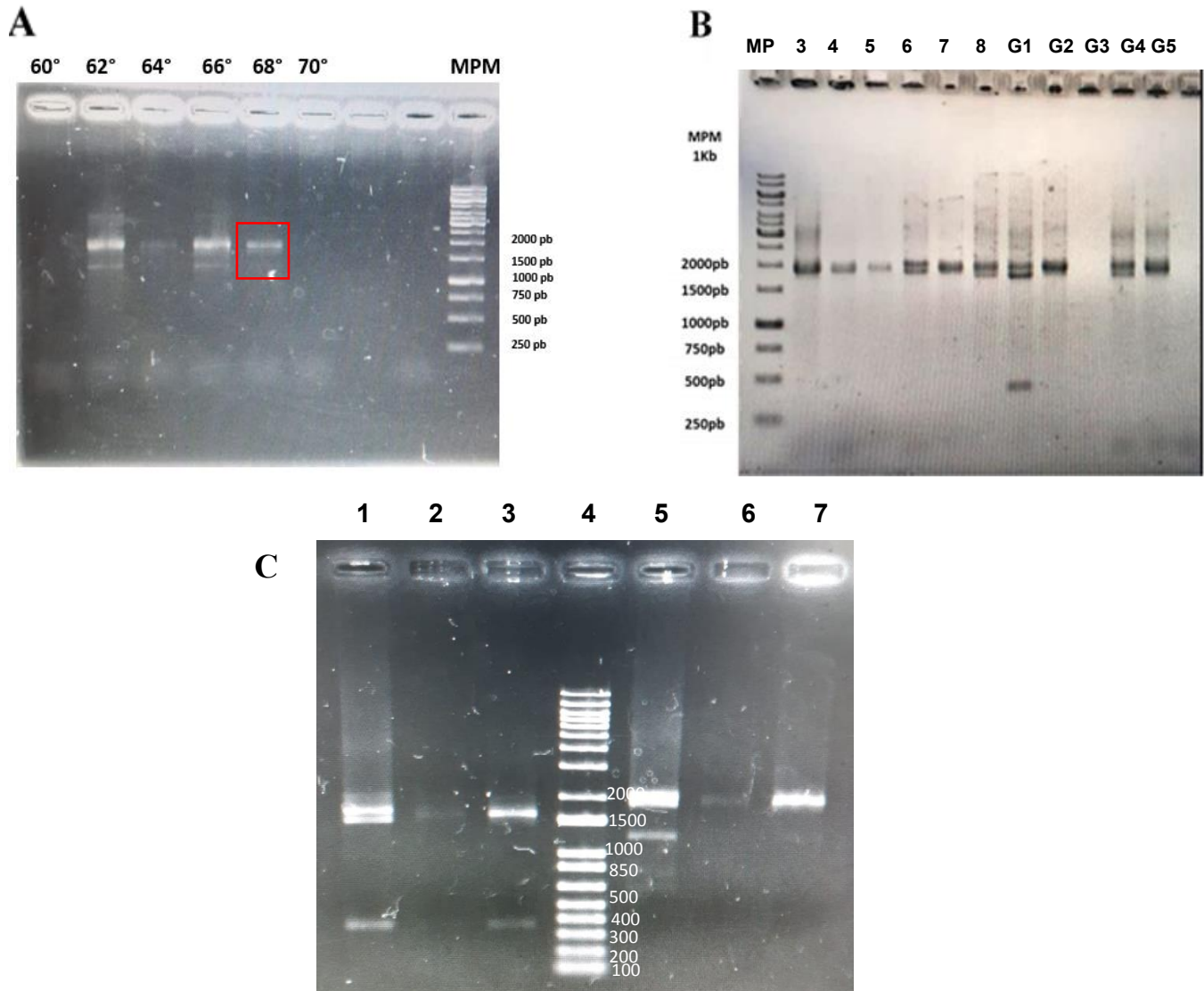


Figura 12. Amplificación por PCR de la región 16S-23S (ITS) rRNA de cianobacterias

(A) Gradiente de temperaturas para determinar la temperatura óptima de fusión, en el cuadro rojo se señala que a los 68°C se obtuvo una banda única. (B) Productos de amplificación por PCR, las muestras 3, 4, 5, 6, 7 y 8 corresponden a biocostras colectadas en Armadillo de los Infante, las muestras G1, G2, G3, G4 y G5 corresponden a biocostras colectadas en Guadalcázar, en algunas muestras como la 6 y G4 se observó más de una banda, por lo que se hizo un ensayo de AFLP (C), utilizando las enzimas de restricción *Pst*I y *Kpn*I observando un patrón de bandeado diferente entre las muestras, lo que sugiere la presencia de más de un genoma en la muestra. El carril 1 corresponde a la muestra 6; carril 2, muestra 7; carril 3, muestra G4; carril 4, marcador de peso molecular; carril 5, muestra 6; carril 6, muestra 7; y carril 7, muestra G4 (ver tabla 2).

4.5 Resultados de secuenciación y análisis de datos de microscopia

Para lograr una identificación más precisa de las muestras 6 y 7 colectadas en Armadillo de los Infante, aunado al análisis molecular, se llevó a cabo la observación microscópica de las cianobacterias presentes en estas muestras (Figura 13 y 14).

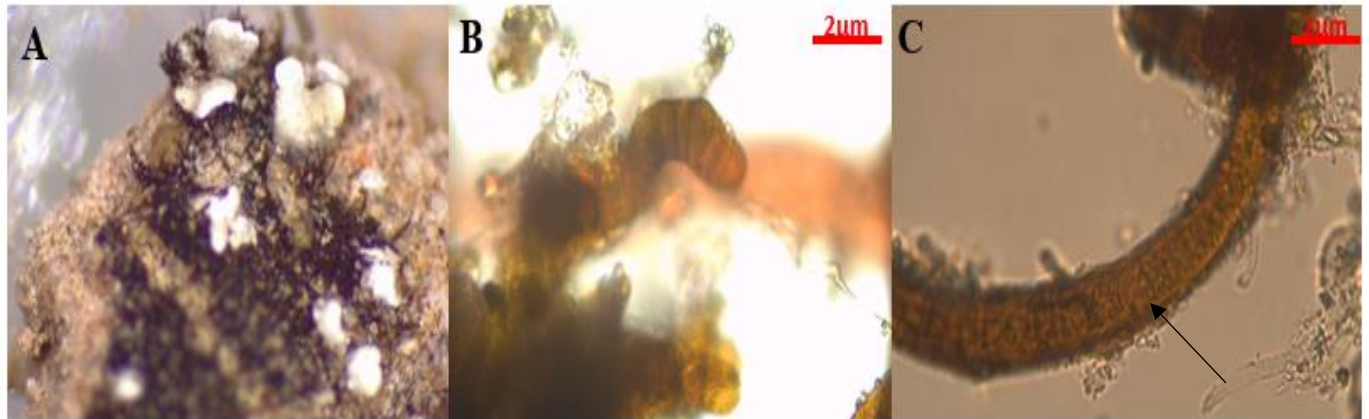


Figura 13. Observación de la morfología, muestra 6

(A) Observación macroscópica de la muestra 6. (B) La observación de la forma irregular de las células y C) la presencia de un heterocisto intercalar, señalado con la flecha, fueron características que nos permitieron determinar que correspondía al género *Stigonema* sp.



Figura 14. Observación de la morfología de la muestra 7

(A) Observación macroscópica de la muestra 7. B). presencia de un heterocisto, señalado con una flecha. C) forma de las células, tricomas unidos fuertemente al sustrato

Las secuencias obtenidas de la muestra 6, se analizaron mediante BLAST, y el análisis arrojó una similitud elevada con secuencias correspondientes al género *Stigonema sp.*, (Tabla 2) lo que correspondió con las características morfológicas observadas mediante microscopía (Figura 13B y 13C).

Tabla 3. Ensamble cadena forward y reverse, muestra 6 (Armadillo).

Muestra 6	Oligonucleótido	Organismo	Número de Acceso GenBank	% de Cobertura ^a	% de Identidad ^b
CONTIG 1	CYA106F/M13RV	<i>Stigonema anomalum</i> H55-2	KT867165.1	100%	98.52%
CONTIG 2	CYA106F/M13RV	<i>Stigonema sp.</i> LS12-6	KT867189.1	100%	98.10%
CONTIG 3	CYA106F/M13RV	<i>Stigonema sp.</i> H7-5	KT867183.1	100%	98.11%
CONTIG 4	M13FW/M13RV	<i>Stigonema sp.</i> LS01-1	KT867198.1	66%	89.78%
CONTIG	M13FW/M13RV	<i>Stigonema sp.</i> H7-8	KT867184.1	66%	89.78%
CONTIG	M13FW/M13RV	<i>Stigonema sp.</i> H7-5	KT867183.1	66%	89.78%

a: Número de nucleótidos de la secuencia de interés que se alinearon con las secuencias depositadas en la base de datos.

b: Número de nucleótidos de la secuencia de interés que en el alineamiento tuvieron coincidencias respecto a las secuencias depositadas en la base de datos.

Respecto a la muestra 7, de acuerdo con las bandas observadas en el ensayo de AFLPs, parecía corresponder a secuencias de cianobacterias, por lo que las cuatro clonas obtenidas fueron analizadas mediante BLAST, a continuación, se describen los resultados obtenidos.

Los resultados de secuenciación y el análisis posterior de la secuencia obtenida de la clona 7A mostró similitudes con regiones ITS de cianobacterias de los géneros *Microcoleus sp.* y *Pycnacronema sp.* (Tabla 4).

Tabla 4. Ensamble cadena forward y reverse, clona 7A (Armadillo).

Muestra	Oligonucleótido	Organismo	Número de Acceso GenBank	% de Cobertura	% de Identidad
7A	CONTIG CYA106F/M13RV	Microcoleus sp. CENA344	KT731160.1	100%	95.24%
7A	CONTIG CYA106F/M13RV	Uncultured cyanobacterium clone BktYyy_00 Pycnaronema marmorum 42PC	KC463364.1	100%	95.23%
7A	CONTIG CYA106F/M13RV	Pycnaronema marmorum 42PC	MF581658.1	100%	95.12%
7A	CONTIG M13FW/M13RV	Microcoleus sp. DAI	EF654029.1	99%	94.89%
7A	CONTIG M13FW/M13RV	Microcoleus sp. CENA344	KT731160.1	99%	94.62%
7A	CONTIG M13FW/M13RV	Uncultured bacterium clone abscm03.0.660	JX255262.1	99%	94.61%

a: Número de nucleótidos de la secuencia de interés que se alinearon con las secuencias depositadas en la base de datos.

b: Número de nucleótidos de la secuencia de interés que en el alineamiento tuvieron coincidencias respecto a las secuencias depositadas en la base de datos.

Respecto a la clona 7B el ensamble de las secuencias obtenidas por secuenciación en ambos sentidos y el análisis de esta, resultó similar a secuencias de cepas de cianobacterias no cultivables (Tabla 5).

Tabla 5. Ensamble cadena forward y reverse, clona 7B (Armadillo).

Muestra	Contig	Oligonucleótido	Organismo	Número de Acceso GenBank	% de Cobertura	% de Identidad
7B	CONTIG	CYA106F/M13RV	Uncultured bacterium clone abscom03.0.660	JX255262.1	88%	83.85%
7B	CONTIG	CYA106F/M13RV	Uncultured cyanobacterium clone BkTyyy_00	KC463364.1	85%	84.15%
7B	CONTIG	CYA106F/M13RV	Uncultured Oscillatoriales cyanobacterium clone MC89	KJ191929.1	85%	84.17%
7B	CONTIG	M13FW/M13RV	Uncultured cyanobacterium clone 16L6	EU409863.1	100%	98.09%
7B	CONTIG	M13FW/M13RV	Uncultured cyanobacterium clone 16L3	EU409851.1	100%	98.09%
7B	CONTIG	M13FW/M13RV	Uncultured cyanobacterium gene for 16S rRNA	AB636061.1	91%	97.63%

a: Número de nucleótidos de la secuencia de interés que se alinearon con las secuencias depositadas en la base de datos.

b: Número de nucleótidos de la secuencia de interés que en el alineamiento tuvieron coincidencias respecto a las secuencias depositadas en la base de datos.

En el caso de la clona 7C, los resultados de secuenciación y el análisis posterior de la secuencia obtenida, fueron muy similares a los resultados de la clona 7A, dado que las asignaciones obtenidas correspondieron con regiones ITS de cianobacterias del género *Microcoleus* sp. (Tabla 6).

Tabla 6. Ensemble cadena forward y reverse, clona 7C (Armadillo).

Muestra	Oligonucleótido	Organismo	Número de Acceso GenBank	% de Cobertura	% de Identidad	
7C	CONTIG	CYA106F/M13RV	Microcoleus sp. CENA344	KT731160.1	100%	94.71%
7C	CONTIG	CYA106F/M13RV	Microcoleus sp. DAI	EF654029.1	96%	95.39%
7C	CONTIG	CYA106F/M13RV	Uncultured cyanobacterium clone	KC463677.1	100%	94.32%
7C	CONTIG	M13FW/M13RV	BkTyy_200	EF072731.1	83%	84.22%
7C	CONTIG	M13FW/M13RV	Uncultured Family bacterium clone	EF072722.1	83%	84.22%
7C	CONTIG	M13FW/M13RV	GASP- WAA2S3_C07			
7C	CONTIG	M13FW/M13RV	Uncultured Family bacterium clone			
7C	CONTIG	M13FW/M13RV	GASP- WAA2S3_B09			

a: Número de nucleótidos de la secuencia de interés que se alinearon con las secuencias depositadas en la base de datos.

b: Número de nucleótidos de la secuencia de interés que en el alineamiento tuvieron coincidencias respecto a las secuencias depositadas en la base de datos.

Por último, la clona 7D, al igual que la clona 7A y 7C, mostró mayor similitud con secuencias de cianobacterias del género *Microcoleus* sp. (Tabla 7).

Tabla 7. Ensamble cadena forward y reverse, clona 7D (Armadillo).

Muestra	Oligonucleótido	Organismo	Número de Acceso GenBank	% de Cobertura	% de Identidad
7D	CONTIG CYA106F/M13RV	Uncultured bacterium clone nbu113d03c1	GQ016905.1	99%	90.96%
7D	CONTIG CYA106F/M13RV	Uncultured bacterium clone HF803 16S	KF037298.1	99%	90.96%
7D	CONTIG CYA106F/M13RV	Microcoleus steenstrupii SON59	KC999631.1	99%	90.82%
7D	CONTIG M13FW/M13RV	Uncultured bacterium clone HF803 16S	KF037298.1	99%	80%
7D	CONTIG M13FW/M13RV	Uncultured bacterium clone nbu113d03c1	GQ016905.1	99%	80%
7D	CONTIG M13FW/M13RV	Microcoleus steenstrupii SON59	KC999631.1	99%	80%

a: Número de nucleótidos de la secuencia de interés que se alinearon con las secuencias depositadas en la base de datos.

b: Número de nucleótidos de la secuencia de interés que en el alineamiento tuvieron coincidencias respecto a las secuencias depositadas en la base de datos.

Los resultados obtenidos sugieren que las secuencias corresponden a las regiones ITS de los géneros de cianobacterias indicados. Sin embargo, consideramos que es necesario llevar a cabo otra ronda de secuenciación de las clonas 7A, 7C y 7D, para corroborar los resultados obtenidos y llegar a una identificación más precisa. Dado que en la observación microscópica que se hizo de la muestra 7, no se identificaron cianobacterias del género *Microcoleus sp.*, por lo que es pertinente realizar nuevas preparaciones y repetir el análisis microscópico para corroborar la información obtenida del análisis de secuencias.

En el caso de la muestra G4, colectada en Guadalcazar, no fue posible tener un indicio del género de cianobacteria presente en la muestra, debido a que el porcentaje de cobertura fue menor del 90% (Tabla 8). Por lo que es necesario repetir la secuenciación bidireccional de esta clona.

Tabla 8. Ensamble cadena forward y reverse, muestra G4 (Guadalcazar).

Cadena Muestra G4	Oligonucleótido	Organismo	Número de Acceso GenBank	% de Cobertura	% de Identidad
CONTIG	M13FW/M13RV	Oculatella ucrainica KZ-5-4-1	MG652620.1	86%	95.20%
CONTIG	M13FW/M13RV	Oculatella ucrainica KZ-7-1-4	MG652619.1	86%	95.20%
CONTIG	M13FW/M13RV	Oculatella ucrainica Vin-4-4-1	MG652618.1	86%	95.20%

a: Número de nucleótidos de la secuencia de interés que se alinearon con las secuencias depositadas en la base de datos.

b: Número de nucleótidos de la secuencia de interés que en el alineamiento tuvieron coincidencias respecto a las secuencias depositadas en la base de datos.

La integración de los datos que se obtuvieron de microscopia y del análisis de secuencias, nos permitieron determinar que los oligonucleótidos seleccionados sí son específicos de cianobacterias, y que es posible encontrar cianobacterias identificadas en biocostras de sitios estudiados por otros autores, en nuestras muestras, ya que la mayoría de las secuencias seleccionadas de NCBI corresponden a muestras de cianobacterias colectadas en suelo.

V- Discusión

Los estudios sobre la distribución y la abundancia de especies de microorganismos presentes en biocostras han tenido como objetivo principal comprender la dinámica entre estas comunidades, su entorno y las funciones dentro del ecosistema (Büdel *et al.*, 2016). El uso de herramientas moleculares para identificar las especies que forman parte de estas comunidades no es nuevo. Sin embargo, el uso de tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) y la secuenciación de bibliotecas genómicas a partir de material genómico de muestras colectadas directamente de los sitios de estudio, o de cepas cultivadas en el laboratorio, han permitido un mayor conocimiento de organismos presentes en biocostras (Becerra-Absalón *et al.*, 2019). Esta información se verifica con la observación microscópica e identificación a través del análisis morfológico de los microorganismos. Mediante estos estudios se ha encontrado que la diversidad de los microorganismos del suelo es influenciada por las condiciones ambientales de cada región geográfica (Komárek, 2015).

En México, la identificación de organismos que conforman las biocostras se han enfocado principalmente en cianobacterias (Maya *et al.*, 2002; López-Cortés *et al.*, 2010; Becerra-Absalón *et al.*, 2018; Becerra-Absalón *et al.*, 2019), microalgas (Flechtner *et al.*, 1998), y en menor medida, musgos y líquenes (Rivera-Aguilar *et al.*, 2006; Concostrina-Zubiri *et al.*, 2014). Estos estudios se han realizado en las cuatro regiones áridas más grandes del país, que comprenden el Desierto de Sonora (Ball y Alvarez-Guevara, 2015), la península de Baja California (López-Cortés *et al.*, 2010), el Desierto Chihuahuense (Becerra-Absalón *et al.*, 2019), la región árida Tamaulipeca, y el valle de Tehuacán-Cuicatlán, en los estados de Puebla y Oaxaca (Rivera-Aguilar *et al.*, 2006). En estos trabajos, se ha encontrado que la riqueza de líquenes y briofitas incrementa a lo largo de un gradiente altitudinal (Austrheim, 2002; Bruun, *et al.*, 2006). La familia de líquenes con mayor diversidad de especies presentes en biocostras corresponden a la familia Verrucariaceae, con 96 especies diferentes. El género *Placidium sp.*, se considera uno de los más

frecuentes en las biocostras de México (Molina-Guerra, *et al.*, 2014, Mendoza–Aguilar, 2014), pues su distribución abarca desde la Península de Baja California (Büdel, *et al.*, 2013) hasta el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Rivera-Aguilar *et al.*, 2006).

En el presente trabajo se analizaron muestras colectadas en suelos desérticos localizados en los alrededores de Armadillo de los Infante y Guadalcázar. Mediante técnicas de microscopía se identificó un líquen correspondiente al género *Placidium sp.*; dos especies del género *Psora sp.*: *Psora ictérica* y *Psora crenata.*; uno más correspondiente al género *Diploschistes sp.* Los dos primeros se han registrado en estudios realizados en el Valle de Tehuacán y en el semidesierto Queretano (Becerra-Absalón *et al.*, 2019). Mientras que el género *Diploschistes sp.* ha sido reportado en el desierto Chihuahuense (Becerra-Absalón *et al.*, 2019). Adicionalmente, se encontró un cianolíquen cuyo fotobionte es una cianobacteria del género *Nostoc sp.* Sin embargo, no fue posible determinar la identidad de este líquen, debido a que no se logró diferenciar las características morfológicas necesarias para su identificación, como son las estructuras reproductivas (Figura 7k). Por lo que consideramos necesario repetir el análisis microscópico con preparaciones de otras secciones del ejemplar.

Un dato interesante es que, en una de las muestras colectadas correspondientes a *Psora ictérica*, observamos la presencia de una posible cianobacteria epífita. Esto nos llamó la atención debido a que hasta ahora no se ha reportado este tipo de interacción. Sin embargo, en este trabajo no logramos obtener una muestra de ADN que nos permitirá amplificar la región ITS e identificar por análisis molecular la posible cianobacteria. De corroborar esto, se aportaría información sobre la dinámica que hay entre los líquenes y los microorganismos asociados a las partículas del suelo.

Con respecto al estudio de la diversidad de especies de cianobacterias, se ha encontrado que los principales ordenes de cianobacterias presentes en biocostras de los cuatro sistemas desérticos del país son: Chroococcales, Chroococciopsidales, Nostocales, Oscillatoriales, Pleurocapsales y Synechococcales. Los ordenes Nostocales y Oscillatoriales, particularmente los

géneros *Scytonema sp.* y *Nostoc sp.*, son los que se han reportado en prácticamente todos los sitios estudiados (Rivera – Aguilar *et al.*, 2006; Maya *et al.*, 2002; Mendoza-Aguilar, 2014; Becerra-Absalón *et al.*, 2019). *Nostoc sp.* y *Scytonema sp.* se establecen bajo condiciones extremas de temperatura, desecación e intensidad de luz solar, esto último debido a que presentan mayor cantidad de pigmentos fotosintéticos que otras especies. Adicionalmente, poseen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en el suelo y, en consecuencia, dejarlo disponible para las plantas vasculares (Kumar *et al.* 2009; Maya *et al.* 2002). Estas cualidades les permiten establecerse en sitios con altas temperaturas en el día durante el verano, bajas temperaturas en las noches durante el invierno, alta radiación UV y baja precipitación (Hu *et al.*, 2014).

Respecto a las especies de cianobacterias identificadas en el presente trabajo, observamos que *Nostoc sp.* y *Scytonema sp.*, están presentes en muestras de suelo asociado a las biocostras, así como en líquenes colectados en ambos sitios. Mediante el análisis molecular, en una muestra colectada en Armadillo de los Infante (Figura 13, Tabla 3), se identificó una cianobacteria del género *Stigonema sp.* Este género de cianobacterias ha sido reportado en estudios realizados en Baja California y en el desierto Chihuahuense (Maya *et al.*, 2002; López-Cortés *et al.*, 2010; Becerra-Absalón *et al.*, 2019). Las cianobacterias de este género pertenecen al grupo de cianobacterias filamentosas formadoras de biocostras (Büdel, 2013), que debido a su metabolismo y a la asociación con otras cianobacterias participan en los ciclos del carbono y el nitrógeno en el suelo, por lo que son fundamentales para el establecimiento y desarrollo de biocostras. En este sentido, los resultados del análisis molecular obtenidos con una muestra (muestra 7), revelan que mediante esta estrategia es posible identificar la asociación entre cianobacterias presentes en suelo. Dado que los datos de secuenciación, así como el patrón diferencial de corte por enzimas de restricción, de la región ITS amplificada a partir de ADN extraído de la muestra, sugieren la presencia de más de una especie de cianobacterias. Al respecto, los resultados del análisis de secuencias de las cuatro clonas obtenidas a partir de la muestra 7 fueron diferentes. Dos clonas (7A y 7C) mostraron una similitud (aunque relativamente baja) a secuencias de cianobacterias del género

Microcoleus sp. Este último es considerado como un género cosmopolita, pues se ha reportado en todos los sitios geográficos donde se ha analizado la composición de biocostras (Rivera-Aguilar *et al.*, 2006; Garcia-Pichel *et al.*, 2013; Dojani *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2016; Muñoz-Martín *et al.*, 2019). Sin embargo, en el análisis microscópico no se observaron cianobacterias de este género, por lo que sería conveniente repetir la observación microscópica haciendo nuevas preparaciones de la muestra. De igual manera, consideramos secuenciar nuevamente las clonas obtenidas para corroborar las secuencias obtenidas y una posible identificación de las cianobacterias presentes en esa muestra.

Por otro lado, el análisis microscópico de los líquenes y las muestras de suelo colectadas nos permitió identificar clorofitas de los géneros *Trebouxia sp.* y *Myrmecia sp.* Este último género se ha reportado con mayor frecuencia en el semidesierto Queretano (Becerra-Absalón *et al.*, 2019). Algo pendiente en este trabajo fue el uso de los marcadores moleculares nuITS1 y nuITS2, utilizados en otros estudios (Piercey – Normore y DePriest, 2001; Sámed *et al.*, 2016), para confirmar la identidad de estas clorofitas.

En este estudio se llevó a cabo un análisis preliminar de la riqueza de organismos presentes en dos sitios correspondientes a zonas desérticas del estado de San Luis Potosí, mediante el uso de una combinación de oligonucleótidos específicos de la región ITS de cianobacterias que no había sido utilizada previamente. Esto nos permitió analizar toda la región genómica ITS a diferencia de los trabajos publicados en los cuales sólo reportan una parte de esta región genómica. La comparación de la región ITS completa, puede permitir un mejor análisis de polimorfismos y una identificación más precisa de cianobacterias. La información obtenida del análisis molecular se corroboró con el análisis microscópico de las muestras, a esto se le denomina enfoque polifásico, el cual es el enfoque principal para el estudio de estas comunidades a nivel mundial.

IV-Resumen y Conclusiones

1. Los líquenes identificados en las localidades examinadas corresponden a los géneros, *Psora sp.*, *Placidium sp.*, y *Displochistes sp.*, comunes en ambientes áridos y semiáridos, de acuerdo con diversos autores.
2. Las modificaciones realizadas al protocolo de extracción de ADN de las biocostras nos permitieron obtener material genético de buena calidad para el análisis molecular.
3. La observación de características morfológicas y estructurales de las cianofíceas, así como su correlación con los datos moleculares, permitieron la identificación de cianobacterias del género *Stigonema sp.*
4. El fotobionte que se encontró con mayor frecuencia en las muestras de líquenes analizadas mediante microscopía fue la clorofita del género *Myrmecia sp.*

V-Perspectivas

1. Llevar a cabo el estudio microscópico y molecular de otras muestras de los sitios de estudio para complementar los datos obtenidos en este proyecto.
2. Realizar el estudio molecular para la identificación de clorofitas en las muestras colectadas.
3. Explorar alternativas para identificar la posible cianobacteria epífita observada en *Psora ictérica*, y corroborar esta probable interacción.

VI-Referencias

- Asplund, J., and Wardle, D. A. (2016). How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biological Reviews*, 92(3), 1720-1738.
- Austrheim, Gunnar. (2002). Plant diversity patterns in semi-natural grasslands along an elevational gradient in southern Norway. *Plant Ecology*. 161. 193-205.
- Ball, B. and Alvarez Guevara, J. (2020). The Nutrient Plasticity Of Moss-Dominated Crust In The Urbanized Sonoran Desert. *Plant and Soil*. 389.
- Barberousse, H., Tell, G., Yéprémian, C. and Couté, A. (2006). Diversity Of Algae And Cyanobacteria Growing On Building Facades In France. *Algological Studies*, 120(1), 81–105.
- Barreno Rodríguez, E. and Pérez-Ortega, S. (2003). Líquenes De La Reserva Natural Integral De Muniellos, Asturias. Oviedo: KRK, 458-520.
- Becerra-Absalón, I., Johansen, J., Muñoz-Martín, M. and Montejano, G. (2018). *Chroakolemma* Gen. Nov. (Leptolyngbyaceae, Cyanobacteria) From Soil Biocrusts In The Semi-Desert Central Region Of Mexico. *Phytotaxa*. 367. 201.
- Becerra-Absalón, I., Muñoz-Martín, M., Montejano, G. and Mateo, P. (2019). Differences In The Cyanobacterial Community Composition Of Biocrusts From The Drylands Of Central Mexico. Are There Endemic Species?. *Frontiers in Microbiology*.
- Belnap, J., Prasse, R. and Harper, K. (2001). Influence Of Biological Soil Crusts On Soil Environments And Vascular Plants. *Ecological Studies*. 150. 281-300.
- Belnap, Jayne and Lange, Otto. (2003). Biological soil crusts: structure, function, and management.
- Belnap, Jayne. (2006). The potential roles of biological soil crusts in dryland hydrologic cycles. *Hydrological Processes*. 20. 3159-3178.
- Bowker, M., Mau, R., Maestre, F., Escolar, C. and Castillo-Monroy, A. (2011). Functional Profiles Reveal Unique Ecological Roles Of Various Biological Soil Crust Organisms in Spain. *Functional Ecology*. 25. 787 - 795.
- Breen, K. and Lévesque, E., (2008). The influence of biological soil crusts on soil characteristics along a high arctic glacier foreland, Nunavut, Canada. *Arctic Antarctic and Alpine Research - Arct antarct alp res*. 40. 287-297.
- Brinda JC, Stark LR, Shevock JR, Spence JR. (2007). An annotated checklist of the bryophytes of Nevada, with notes on collecting history in the state. *Bryologist* 110(4):673–705.

- Brodo, I. M., Sharnoff, & Laurie-Bourque, S., & Raven, P. (2001). *Lichens of north America*. Yale University Press.
- Bruun, H., Moen, J., Virtanen, R., Grytnes, J., Oksanen, L. and Angerbjörn, A. (2006). Effects Of Altitude And Topography On Species Richness Of Vascular Plants, Bryophytes And Lichens In Alpine Communities. *Journal of Vegetation Science*. 17. 37 - 46
- Büdel B, Darienko T, Deutschewitz K, Dojani S, Friedl T, Mohr KI, Salish M, Reisser W, Weber B. (2009) Southern African biological soil crusts are ubiquitous and highly diverse in drylands, being restricted by rainfall frequency. *Microb Ecol* 57:229–247.
- Büdel, S. Scheu C. Colesie, MJ. Lechowicz SA. Dudley, M. Veste A. (2013). “Lichen Species Dominance and the Resulting Photosynthetic Behavior of Sonoran Desert Soil Crust Types (Baja California, Mexico).” *Ecological Processes*. SpringerOpen, January 1,
- Boyer, S., Flechtner, V., and Johansen, J. (2001). Is the 16S–23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in cyanobacteria. *Molecular biology and evolution*. 18. 1057-69.
- Boyer, S., Flechtner, V., and Johansen, J. (2001). Boyer, Sarah & Johansen, Jeffrey & Flechtner, Valerie & Howard, Gwyn. (2002). Phylogeny and genetic variance in terrestrial *Microcoleus* (Cyanophyceae) species based on sequence analysis of the 16S rRNA gene and associated 16S-23S ITS region. *Journal of Phycology*. 38. 1222 - 1235.
- Castillo-Monroy, A., Bowker, M., Maestre, F., Rodríguez-Echeverría, S., Martínez, I., Barraza-Zepeda, C., and Escolar, C. (2011). Relationships between biological soil crusts, bacterial diversity and abundance, and ecosystem functioning: Insights from a semi-arid Mediterranean environment. *Journal of Vegetation Science*. 22. 165 - 174.
- Castillo-Monroy, P., Benítez, C. and Angel, C. (2015). Abundance patterns and components richness of biological soil crust in a dry shrubland in southern Ecuador. *Avances en ciencias e ingenierías*. 7. B88 - B97.
- Casamatta, D., Johansen, J., Vis, M. and Broadwater, S. (2005). Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains with the *Oscillatoriales* (Cyanobacteria). *Journal of Phycology*. 41. 421 - 438.
- Chamizo, S., Cantón, M., I. and Domingo, F. (2012). Biological soil crust development affects physicochemical characteristics of soil surface in semiarid ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Chamizo, S., Adessi, A., Mugnai, G., Simiani, A. and De Philippis, R. (2018). Soil type and cyanobacteria species influence the macromolecular and chemical characteristics of the polysaccharidic matrix in induced biocrusts. *Microbial Ecology*. 78.

- Chilton, A., Neilan, B., Eldridge, D. (2017). Biocrust morphology is linked to marked differences in microbial community composition. *Plant and Soil*.
- Colesie, Claudia. (2013). Biological soil crusts in continental Antarctica: Garwood Valley, southern Victoria Land, and Diamond Hill, Darwin Mountains region. *Antarctic Science*. 26. 115-123.
- Concostrina-Zubiri, L., Huber-Sannwald, E., Martínez, I., Flores, J. and Escudero, A. (2013). Biological soil crusts greatly contribute to small-scale soil heterogeneity along a grazing gradient. *Soil Biology and Biochemistry*. 64. 28–36.
- Cram, S., Cotler, H., Morales, L., Sommer, I. and Carmona, E. (2008). Identificación de los servicios ambientales potenciales de los suelos en el paisaje urbano del Distrito Federal. *Investigaciones geográficas*, (66), 81-104.
- Delgadillo, M. and Cárdenas S. (1990). Manual de Briofitas. Cuadernos del Instituto de Biología; 8. Distrito Federal, México: Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. 13-26.
- Dojani, S., Büdel, B., Deutscheiwtz., W., Bettina. (2011). Rapid succession of biological soil crusts after experimental disturbance in the succulent Karoo, South Africa. *Applied Soil Ecology*.
- Elbert, W., Weber, B., Burrows, S., Steinkamp, J., Büdel, B., Andreae, M. and Pöschl, U. (2012). Impact of cryptogamic covers on the global cycles of carbon and nitrogen. *Nature Geoscience*. 5. 459-462.
- Eldridge, D. and Rosentreter, R.R. (1999). Morphological groups: A framework for monitoring microphytic crusts in arid landscapes. *Journal of Arid Environments - J ARID ENVIRON*. 41. 11-25.
- Frey, S., Six, J. and Elliott, E.T. (2003). Reciprocal transfer of carbon and nitrogen by decomposer fungi at the soil-litter interface. *Soil Biology and Biochemistry*. 35.
- Flechtner, V., Johansen, J. and Clark, W. (1998). Algal composition of microbiotic crusts from the Central Desert of Baja California, Mexico. *The Great Basin Naturalist*. 58. 295-311. Friedl, T. and Rybalka, N. (2012). Systematics of the green algae: a brief introduction to the current status.
- Fucíková K, Lewis LA. (2012). Revision of the genus *Bracteacoccus* Tereg (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on a phylogenetic approach. *Nova Hedwigia*. 96:15–59.
- Geitler, L. (1932). Cyanophyceae. In: *kryptogamen-flora von deutschland, Österreich*. In. Ed. 2. (Rabenhorst, L. Eds) Vol. 14, pp. 673-1196, i-[vi]. Leipzig: Akademische Verlagsgesellschaft.
- Honegger, R. (1991). Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42(1), 553–578.

- Fucíková K, Lewis LA. (2012). Revision of the genus *Bracteacoccus* Tereg (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on a phylogenetic approach. *Nova Hedwigia*. 96:15–59.
- Geitler, L. (1932). Cyanophyceae. In: *kryptogamen-flora von deutschland, Österreich*. In. Ed. 2. (Rabenhorst, L. Eds) Vol. 14, 673-1196,
- Garcia-Pichel, F., Loza, V., Marusenko, Y., Mateo, P. and Potrafka, R. (2013). Temperature drives the continental-scale distribution of key microbes in topsoil communities. *Science (New York, N.Y.)*. 340. 1574-7.
- Hadi, S., Santana, H., Brunale, P., Gomes, T., Oliveira, M., Matthiensen, A., Oliveira, M., Silva, F., Brasil, B. (2016). DNA barcoding green microalgae isolated from neotropical in land Waters. *PLOS ONE*. 11. e0149284. 10.1371/journal.pone.0149284.
- Hitzfeld, B., Höger, S., Dietrich, D. (2000). Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environmental health perspectives*. 108 Suppl 1. 113-22.
- Honegger, R. (1991). Functional aspects of the lichen symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 42(1), 553–578.
- Hu, R., Wang, X., Ping, P., Yan-Xia, Z., Yafeng and Zhang, H. (2014). The response mechanisms of soil N mineralization under biological soil crusts to temperature and moisture in temperate desert regions. *European Journal of Soil Biology*. 62.
- INEGI 2009. Síntesis de Información Geográfica del Estado de San Luis Potosí.
- Jung, P., Briegel-Williams, L., Schermer, M. and Büdel, B. (2018). Strong in combination: polyphasic approach enhances arguments for cold-assigned cyanobacterial endemism. *MicrobiologyOpen*.
- Komárek, J. (2003). Filamentous cyanobacteria. K. Jiří Komárek, *Freshwater Algae of North America* (págs. 117-196). John D. Wehr, Robert G. Sheath.
- Komárek, J., and Anagnostidis, K. (2005). Cyanoprokaryota. 2. Oscillatoriales. Büdel, L. Krienitz, G. Gärtner, & M. Schagerl. Eds. *Süßwasserflora von Mitteleuropa* 19/2, p. 759. Heidelberg: Elsevier/Spektrum.
- Komárek, Jiří. (2015). About endemism of cyanobacteria in freshwater habitats of maritime Antarctica. *Algological Studies*. 148. 15-32.
- Kumar K, Mella-Herrera, R. and Golden J. (2009) Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*:2.
- Lange, O., Belnap, J., Reichenberger, H., and Meyer, A. (1997). Photosynthesis of green algal soil crust lichens from arid lands in southern Utah, USA: Role of water content on light and temperature responses of CO₂ exchange. *Flora*. 192. 1-15.

- Lapage, S., Clark, W., Lessel, E., Seeliger, H. and Sneath, P. (1973). Proposed revision of the international code of nomenclature of bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 23. 83-108.
- Leliaert, F., Smith, D., Moreau, H., Herron, M., Verbruggen, H., Delwiche, C. and Clerck, O. (2012). Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 30. 1-46.
- Lepère, C., Wilmotte, A. and Meyer, B. (2000). Molecular diversity of microcystis strains (Cyanophyceae, Chroococcales) based on 16S rDNA sequences. *Systematics and Geography of Plants*, v.70, 275-283 (2000). 70. 10.2307/3668646.
- Lewis, L. and Mccourt, R. (2004). Green algae and the origin of land plants. *American journal of botany*. 91. 1535-56. 10.3732/ajb.91.10.1535.
- López-Cortés, A., García-Pichel, F., Nübel, U. and Vázquez-Juárez, R. (2002). Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: A polyphasic study. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*. 4. 227-36. 10.1007/s10123-001-0042.
- López-Cortés, A., Maya, Y. and García-Maldonado, J. (2010). Diversidad filogenética de especies de *Microcoleus* de costras biológicas de suelo de la península de Baja California, México. *Revista mexicana de biodiversidad*. 81. 1-7. 10.22201/ib.20078706e.2010.001.204.
- Maestre, F., Huesca, M., Zaady, E., Bautista, S. and Cortina, J. (2002). Infiltration, penetration resistance and microphytic crust composition in contrasted microsites within a Mediterranean semi-arid steppe. *Soil Biology and Biochemistry*. 34. 895-898. 10.1016/S0038-0717(02)00021-4.
- Maestre, F.T. (2011). Ecology and functional roles of bio-logical soil crusts in semi-arid ecosystems of Spain. *Journal of Arid Environ-ments* 75, 1282-1291.
- Margulis, L. (1993) *Symbiosis in cell evolution: microbial communities in the Archaean and proterozoic eons* (Freeman Co., New York).
- Margulis, L. (1993) *Symbiosis in cell evolution: microbial communities in the Archaean and proterozoic eons* (Freeman Co., New York).
- Mendoza, D. (2014). *Costras biológicas del suelo en ecosistemas semiáridos: composición, rendimiento fisiológico y efecto en la germinación de plantas*. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Molina-Guerra, V., Pando-Moreno, M., Marmolejo, J. and Rodríguez, E. (2014). Diversidad de costras biológicas del suelo en pastizales halófilos del norte de México. *Revista Iberoamericana de ciencias*. 1. 83-91.

- Mostaert, A., Giordani, C., Crockett, R., Karsten, U., Schumann, R. and Jarvis, S. (2009). Characterisation of amyloid nanostructures in the natural adhesive of unicellular subaerial algae. *Journal of Adhesion*, 85. 465-483.
- Muñoz-Martín, M., Becerra-Absalón, I., Perona, E., Fernández-Valbuena, L., García-Pichel, F. and Mateo, P. (2018). Cyanobacterial biocrust diversity in Mediterranean ecosystems along a latitudinal and climatic gradient. *New Phytologist*. 221.
- Mareckova, M., Cermak, L., Novotna, J., Plhackova, K., Forstova, J. and Kopecky, J. (2008). Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Applied and environmental microbiology*. 74. 2902-7. 10.1128/AEM.02161-07.
- Muñoz-Martín, M.Á., Becerra-Absalón, I., Perona, E., Fernández-Valbuena, L., García-Pichel, F. and Mateo, P. (2019). Cyanobacterial biocrust diversity in Mediterranean ecosystems along a latitudinal and climatic gradient. *New Phytol*, 221: 123-141. doi:10.1111/nph.15355.
- Miller, D., Bryant, J., Madsen, E., Ghiorse, W. (1999). Miller DN, Bryant JE, Madsen EL, Ghiorse WC. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl Environ Microbiol* 65: 4715-4724. *Applied and environmental microbiology*. 65. 4715-24. 10.1128/AEM.65.11.4715-4724.1999.
- Nash, T. R. (2004). *Lichen flora of the greater Sonoran Desert region, vol.2*. Lichens Unlimited, Arizona State University.
- Nash, III, T. H. (ed.) (2008) *Lichen Biology*. 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press. doi: 10.1017/CBO9780511790478.
- Palinska, K., Thomasius, C. and Marquardt, J. (2006). Phylogenetic evaluation of cyanobacteria preserved as historic herbarium exsiccata. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 56. 2253-63. 10.1099/ijs.0.64417-0.
- Piercey-Normore, M. and DePriest, P. (2001). Algal switching among lichen symbioses. *American journal of botany*. 88. 1490-8. 10.2307/3558457.
- Rivera-Aguilar, V., Montejano, G., Zaragoza, S. and Durán-Díaz, A. (2006). Distribution and composition of cyanobacteria, mosses and lichens of the biological soil crusts of the Tehuacán Valley, Puebla, México. *Journal of Arid Environments*. 67. 208-225. 10.1016/j.jaridenv.2006.02.013.
- Rodríguez-Caballero., B., Jayne, B., Burkhard & Crutzen, Paul. Andreae, M. and Pöschl, U. and Weber, B. (2018). Dryland photoautotrophic soil surface communities endangered by global change. *Nature Geoscience*. 11. 10.1038/s41561-018-0072-1.

- Rosentreter, R., Eldridge, D., Westberg, M., Briegel-Williams, L. and Grube, M. (2016). Structure, composition, and function of biocrust lichen communities.
- Root, H. (2013). A field guide to biological soil crusts of western U.S. drylands. *The Bryologist*. 116. 224-225.
- Sambrook J. and Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sancho, L., Belnap, J., Colesie, C., Raggio. And Bettina. (2016). Carbon budgets of biological soil crusts at micro-, meso-, and global scales.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Staal, M., Lintel-Hekkert, S., Harren, F. and Stal, L. (2001). Nitrogenase activity in cyanobacteria measured by the acetylene reduction assay: A comparison between batch incubation and on-line monitoring. *Environmental Microbiology*. 3. 343 - 351.
- Stark, L., & Whittimore, A. (2000). Bryophytes from the Northern Mojave Desert. *The Southwestern Naturalist*, 45(2).
- Scheidegger, O., Schroeter, B., Frey, B. (1995). Structural and functional processes during water vapour uptake and desiccation in selected lichens with green algal photobionts. *Planta* 197, 399-409.
- Schopf, J. (1993). Microfossils of the early archaean apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science (New York, N.Y.)*. 260. 640-6.
- Scott, T., Bates, T. and Garcia-Pichel. (2012). Patterns of diversity for fungal assemblages of biological soil crusts from the southwestern United States, *Mycologia*. 104:2, 353-361.
- Taton, A., Grubisic, S., Brambilla, E., De Witt, R. and Wilmette, A. (2003). Cyanobacterial diversity in natural and artificial microbial mats of Lake Fryxell (McMurdo Dry Valleys, Antarctica): a morphological and molecular approach. *Appl Environ Microbiol* 69:5157–5169.
- U.Nübel, F. G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 3327-3332.
- Ullmann I., Büdel B. (2001). Ecological determinants of species composition of biological soil crusts on a landscape scale. In: Belnap J., Lange O.L. (eds) *Biological Soil Crusts: Structure, Function, and Management*. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), vol 150. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological reviews*. 60. 407-38. 10.1128/MMBR.60.2.407-438.1996.

- Veste, M., Breckle, S., Eggert, K. and Littmann, T. (2011). Vegetation pattern in arid sand dunes controlled by biological soil crusts along a climatic gradient in the Northern Negev desert. *Basic and Applied Dryland Research*. 5. 1-16.
- Weber, B., Büdel, B. and Belnap, J. (2016). Biological soil crusts: an organizing principle in drylands.
- Wilmotte, Annick. (2006). Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria.
- Whitton, B. and Potts, M. (2002). The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space. 10.1007/0-306-46855-7.
- Young, K., Grover, H. and Bowker, M. (2016). Altering biocrusts for an altered climate. *The New phytologist*. 210. 18-22. 10.1111/nph.13910.
- Zou, S., Fei, C., Wang, C., Gao, Z., Bao, Y., He, M., and Wang, Ch. (2016). How DNA barcoding can be more effective in microalgae identification: A case of cryptic diversity revelation in *Scenedesmus* (Chlorophyceae). *Scientific Reports*. 6. 36822. 10.1038/srep36822

VII-Anexos

Anexo 1. Protocolo detallado de pruebas químicas para la identificación de líquenes

Los test de coloración se llevan a cabo para detectar sustancias liquénicas características de los géneros de líquenes estudiados. Estas sustancias son detectadas por el cambio en la coloración que adquiere el tejido examinado cuando se pone en contacto con los reactivos químicos que se describen a continuación:

- KOH al 10%: Se debe aplicar con un gotero de 2 a 4 gotas de una solución de KOH al 10% sobre el corte del talo del líquen que debe incluir el cortex y la medula. El hidróxido de potasio reacciona con β -orcinol depsidonas dando coloraciones amarillas y con las antraquinonas y la parietina produce coloraciones rojizas.
- Solución de hipoclorito de sodio concentrado: Se coloca de 1 a 3 gotas de la solución, en el corte del líquen que debe incluir el cortex y la medula. Las coloraciones que produce son rosas con los dépsidos derivados del orcinol, verdes con el ácido úsnico, rojas, naranjas y amarillos. Se utiliza principalmente para detectar los ácidos lecanórico y girofórico.
- Solución Steiner: se debe pesar 1 gr de parafenilendiamina y 10 gr de sulfito de sodio, disolver en 5mL de detergente y añadir 100mL de agua destilada, posteriormente se colocan de 4 a 6 gotas sobre el corte del líquen que debe incluir el cortex y la medula. Reacciona produciendo coloraciones amarillas, naranjas y rojas.
- Solución iodada al 1%: colocar 2 gotas sobre el tejido, en este caso se considera tejido reproductivo (ascas, himenio). Produce coloraciones rojizas, azules y verdosas.

Una vez que se colocó el reactivo en el corte, este se fija a un portaobjetos y se procede a la observación al microscopio.

Literatura: Brodo *et al.*, 2001; Nash III *et al.*, 2002; Nash *et al.*, 2004

Anexo 2. Protocolo modificado para extracción de ADN de biocostras

- 1.- Pesar 100mg de la tierra asociada al talo del liquen y colocar en un tubo de 1.5 mL; pesar 0.25 mg de perlas de vidrio de 0.5mm de diámetro y 0.25 mg de perlas de vidrio de 1 mm de diámetro, estériles
- 2.- Colocar 1 mL de buffer de extracción y llevar a vórtex por 30min, en el refrigerador de 4°C
- 3.-Colocar en la centrifuga durante 2 min a 13 000rpm
- 4.-Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo, agregar 300µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1), mezclar en vórtex hasta obtener una mezcla homogénea y centrifugar durante 8 min a 13 000 rpm
- 5.-Descartar el sobrenadante a tubos nuevos y poner 400 µl de cloroformo-alcohol isoamilico (24: 1), llevar a vórtex y centrifugar a 13 000 rpm durante 5 min
- 6.- Colocar el sobrenadante en tubos nuevos, y colocar NaCl para tener una concentración final de 1.5M y añadir CTAB para tener un porcentaje de 1%. Incubar en termoblock a una temperatura de 65°C durante 10 min. Dejar reposar a temperatura ambiente
- 7.- Agregar un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamilíco (24:1), centrifugar a 13 000 rpm durante 10 min
- 8.- Decantar el sobrenadante y precipitar con 200 µl de isopropanol, dejar enfriar durante 20 min
- 9.-Centrifugar a 13 000 rpm durante 6min
- 10.- Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla con 400 µl de alcohol al 70%
- 11.-Centrifugar 15 min a 13 000 rpm
- 12.- Decantar el sobrenadante y dejar la pastilla secar
- 14.- Una vez que la pastilla de ADN este seca, resuspender con agua 50 µl de agua Mili Q.
- 15.- Llevar a -20°C y conservar ahí.

Soluciones:

Buffer de extracción: 50 mM de buffer de fosfato de Sodio (pH 8), 50Mm NaCl, 500 mM Tris HCl (pH 8), SDS 5%.

Literatura: Sagova-Mareckova *et al.*, 2008.

Anexo 3. Limpieza de muestras de ADN con PVP al 5%

A las muestras obtenidas con el protocolo de extracción previamente descrito.

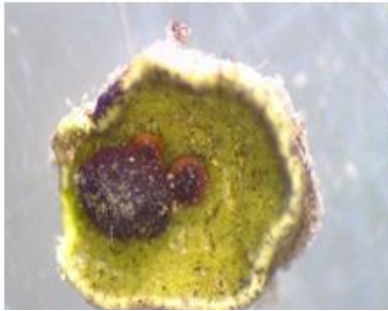
- 1.- Se agregan 50 µl de agua MQ y se adicionan 600 µl de Buffer de extracción con PVP, se mezcla en vórtex, y se añade 650 µl de fenol-cloroformo- alcohol isoamilico (25:24:1).
- 2.- Centrifugar a 13 000 rpm, durante 10 min.
- 3.- Tomar la fase superior y pasar a nuevos tubos.
- 4.- Añadir 500 µl de isopropanol y mezclar.
- 5.- Incubar en hielo durante 15 min
- 6.-Centrifugar 8min a 13 000 rpm.
- 7.- Decantar el sobrenadante y colocar 400 µl de alcohol al 70%.
- 8.- Centrifugar durante 10 min a 13 000 rpm.
- 8.- Decantar el sobrenadante, tratando de dejar la pastilla lo más seca posible. Para ello se puede llevar a termoblock a 60° por no más de 5 min
- 9.- Dejar enfriar a temperatura ambiente y resuspender en un volumen de 50 µl de agua MQ.
- 10.- Llevar a -20 y conservar ahí.

Buffer de extracción con PVP

30mM EDTA, 0.1M Tris pH 8.0, 1.2 NaCl, CTAB 3%, PVP 1.5%

Literatura: Young ,*et al.*, 1993.

Anexo 4: Micrografías de líquenes colectados en Armadillo de los Infante



MUESTRA 1

Psora ictérica



MUESTRA 2

Sin identificar



MUESTRA 3

Sin identificar



MUESTRA 4

Sin identificar



MUESTRA 6

Sin identificar



MUESTRA 7

Placidium sp.

Anexo 5: Micrografías de líquenes colectados en Guadalcázar



MUESTRA G1

Psora crenata



MUESTRA G2

Placidium sp.



MUESTRA G3

Sin identificar



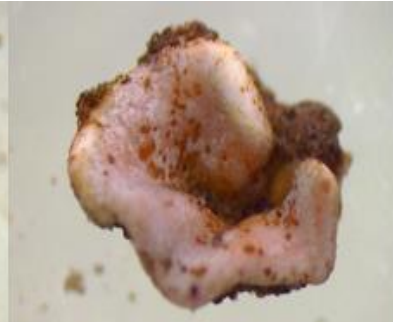
MUESTRA G4

Diploschistes sp.



MUESTRA G5

Sin identificar



MUESTRA G6

Sin identificar