

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**ANÁLISIS GÉNICO Y FILOGENÉTICO DE LA CIANOBACTERIA**

*Cylindrospermopsis raciborskii.*

Memoria de Título  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al Título de  
Ingeniero en Biotecnología Molecular  
por



Karina Susana Stucken Marín

Octubre, 2006  
Santiago-Chile

Director de Memoria de Título: Dra. Mónica Vásquez Pérez

UCH-FC  
Biotecnología  
334  
C.1



## “ANÁLISIS GÉNICO Y FILOGENÉTICO DE LA CIANOBACTERIA *Cylindrospermopsis raciborskii*”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

**KARINA SUSANA STUCKEN MARÍN.**

Dr. Mónica Vásquez Pérez  
**Directora Seminario de Título**

**Comisión de Evaluación de la Memoria de Título**

Dr. Carlos Jerez Guevara  
**Presidente Comisión**

Dr. Nicolás Guiliani  
**Corrector**



Santiago de Chile, Octubre 2006



“Llegué a la Universidad de Chile en 1999, con una sensación de nerviosismo, no sabía a que me iba a enfrentar, cuáles serían los desafíos que se venían, pero siempre mantuve el entusiasmo por aprender. Es así como ahora, al término de mi carrera, tengo el mismo sentimiento, sólo que ahora, estoy preparada para enfrentar una nueva etapa en mi vida.

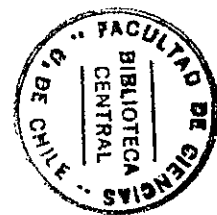
Se dice por ahí que los años en la Universidad son los mejores años de la vida. Sin embargo, en mi paso por la Universidad no sólo viví buenos años, sino que aprendí lecciones de vida. No fue fácil llegar a este día, pero di todo lo que tenía y aquí estoy.”

## DEDICATORIA



*"A todos aquellos que creyeron en mi"*

## AGRADECIMIENTOS



Quiero agradecer de manera especial a mi tutora, la Dra. Mónica Vásquez. Profe, creo que las gracias nunca van a ser suficientes, usted fue más que una tutora para mí. Su mezcla de exigencia y apoyo logró que yo creciera como científica de una manera que nunca imaginé. Pero por sobretodo, quiero agradecerle su apoyo incondicional, no sólo en el ámbito académico, sino también en el personal.

Cuando llegué al laboratorio, fue la primera vez que trabajé en un mesón, no tenía experiencia y estaba muy nerviosa. Éramos Katia y yo quienes empezábamos ese día a trabajar con la profe y nos sentíamos de la misma forma. No puedo decir que todo resultó de maravilla los primeros días, pero con Katia nos complementamos desde el principio, y superamos cada una sus obstáculos, siempre en compañía de la otra. Es por eso que quiero agradecerle. Katia, tu compañía y amistad fueron muy importantes desde ese primer día.

Sólo desde principio de año que todo un grupo de trabajo se unió a nosotras, y desde entonces el laboratorio tiene vida. Isabel, Nathalie, Alejandro, Juanjo y Álvaro, gracias primero que todo por aguantar mis malos días y mi a veces poca paciencia; gracias por esos cafés y golosinas conversadas; gracias por acompañarme en este último proceso de mi carrera. Quiero que sepan que todas las veces me hicieron reír, y que disfruté de todos los momentos que viví con ustedes.

Esta tesis se realizó gracias a los estudios preliminares realizados por Loreto, a quien además agradezco por su ayuda y amistad. También quiero dar gracias al Dr.

Marco Méndez, porque muchos de los análisis realizados no hubieran sido posibles sin su ayuda.

Quiero agradecer también a mis amigos, por todos los momentos que voy a recordar siempre, como las horas de estudio y conversación. Y porque a pesar de que no nos vemos a menudo, cuando los necesité, no dudaron en ayudarme.

Mamá y papá, yo sé que nada de esto hubiera sido posible sin su apoyo. Les agradezco inmensamente todo el amor y todos los esfuerzos que hicieron por mí, porque sé que no fue fácil para ustedes. Pero a pesar de todo, ¡lo logramos!. Los quiero mucho padres míos. Quiero agradecer también a mis hermanas pequeñas: Macarena y Francisca, por darle alegría a la casa todas las noches, y a mi hermana mayor Claudia, porque aún estando lejos, me ha apoyado y se ha preocupado de nosotras; y por supuesto, por tener a esos dos niños hermosos, que son la luz de nuestros ojos: Sebastián y Nicolás.

Mi amorcito, tú eres la persona a quien más quiero agradecer. Todo lo que soy ahora, se debe en gran parte al cambio que sufrí cuando te conocí, tú me hiciste ver en colores de nuevo y siempre creíste en mí. Gracias porque siempre pude contar contigo y porque ahora, en este momento tan importante, estás acá conmigo. Gracias también a tus papás y hermanas porque me recibieron con mucho cariño y me hicieron sentir como una más de la familia.

Este trabajo se realizó gracias a los proyectos FONDECYT 1050433 y Núcleo Milenio en Ecología Microbiana, Microbiología Ambiental y Biotecnología, EMBA P04/007-F.



## ÍNDICE DE CONTENIDO



DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE DE CONTENIDO.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xxi
INTRODUCCIÓN.....	1
Cianobacterias y producción de toxinas.....	3
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> .....	4
Espaciadores ITS entre los genes de 16S y 23S ribosomales.....	12
Análisis del genoma completo mediante PFGE.....	12
HIPÓTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	17
General.....	17
Específicos.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
1. Cepas y condiciones de cultivo.....	18
2. Obtención y chequeo de filamentos de <i>C. raciborskii</i> y <i>Anabaena circinalis</i> con una carga reducida de bacterias heterótrofas.....	20

2.1 Eliminación de las bacterias acompañantes.....	20
2.2 Microscopía de epifluorescencia.....	21
2.2.1 Cuantificación de las bacterias acompañantes mediante microscopía de epifluorescencia.....	21
<b>3. Análisis del operón ribosomal de las cepas de <i>C. raciborskii</i> y ACMB13 de <i>A. circinalis</i>.....</b>	<b>22</b>
3.1 Extracción del ADN genómico.....	22
3.2 Amplificación de los genes de rARN 16S, espaciador ITS entre los genes de rARN 16S y 23S y del gen de rARN 16S asociado a su región espaciadora ITS.....	22
3.2.1 Amplificación del espaciador (ITS) entre los genes de rARN 16S y 23S.....	23
3.2.2 Amplificación del gen de rARN 16S y del gen de rARN 16S asociado a su región espaciadora (ITS) entre los genes de rARN 16S y 23S .....	23
3.3 Análisis ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) del gen de rARN 16S.....	24
3.4 Generación de bibliotecas del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS.....	25
3.4.1 Purificación y ligación del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS.....	25
3.4.2 Transformación de <i>E. coli</i> DH5a electrocompetentes.....	25
3.4.3 Selección de los transformantes.....	26
3.5 Análisis de los transformantes.....	27



3.5.1 Extracción del ADN plasmidial.....	27
3.5.2 Amplificación por PCR directamente desde una colonia.....	27
3.6 Análisis de las secuencias del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS.....	28
3.6.1 Secuenciación.....	28
3.6.2 Alineamientos.....	29
3.7 Análisis Filogenéticos del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS.....	29
3.7.1 Análisis filogenéticos del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS.....	29
3.7.2 Análisis filogenéticos de los espaciadores ITS largos (ITS L).....	29
<b>4. Análisis del genoma completo de las cepas de <i>C. raciborskii</i>.....</b>	<b>30</b>
4.1 Preparación de estándares de PFGE.....	30
4.1.1 Preparación de estándares de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> cepa KX.....	30
4.1.2 Preparación de estándares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> YNN 295.....	32
4.2 Obtención del ADN cromosómico de las cepas de <i>C. raciborskii</i> embebido en moldes de agarosa.....	33
4.2.1 Estimación del crecimiento mediante la cuantificación de clorofila <i>a</i> .....	33
4.2.2 Obtención del ADN cromosómico embebido en moldes de agarosa.....	34
4.2.3 Obtención del ADN cromosómico digerido de las cepas de <i>C. raciborskii</i> .....	34
4.3 Condiciones de corrida de la PFGE del ADN genómico y digerido.....	35



4.5 Cálculo del tamaño genómico de las cepas de <i>C. raciborskii</i> .....	37
4.6 Análisis filogenéticos entre las cepas de <i>C. raciborskii</i> basados en PFGE de digestión.....	37
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>1. Análisis del operón ribosomal de cepas de <i>C. raciborskii</i> y</b>	
<b><i>A. circinalis</i>.....</b>	<b>38</b>
1.1 Eliminación de las bacterias acompañantes.....	38
1.2 Extracción del ADN genómico de las cepas de <i>C. raciborskii</i> y ACMB13 de <i>A. circinalis</i> .....	38
1.3 Análisis de restricción del gen de rARN 16S (ARDRA).....	40
1.4 Amplificación de la región espaciadora (ITS) entre los genes de rARN 16S y 23S.....	41
1.5 Bibliotecas del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS de cepas de <i>C. raciborskii</i> y ACMB13 de <i>A. circinalis</i> .....	43
1.6 Análisis de secuencias.....	47
1.7 Análisis filogenéticos.....	50
<b>2. Análisis del genoma completo mediante PFGE de cepas de <i>C. raciborskii</i>.....</b>	<b>54</b>
2.1 Estimación del tamaño genómico.....	55
2.1.1 Análisis de los macrofragmentos de restricción.....	57
2.1.2 Estimación de los tamaños genómicos mediante análisis de restricción....	62
2.2 Matriz de distancia y relaciones filogenéticas entre cepas de <i>C. raciborskii</i> .....	66
<b>DISCUSION.....</b>	<b>68</b>

CONCLUSIONES.....78  
REFERENCIAS.....79  
ANEXOS.....84



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cianotoxinas y sus géneros o especies productoras.....	4
Tabla 2. Toxicidad, morfología y procedencia de las cepas utilizadas en este estudio...	19
Tabla 3. Secuencias y sitios blanco de los partidores utilizados en el análisis de los operones ribosomales.....	24
Tabla 4. Detalle de las enzimas de restricción y condiciones utilizadas para digerir el ADN cromosómico de las cepas de <i>C. raciborskii</i> .....	35
Tabla 5. Condiciones de corrida electroforética para PFGE de ADN cromosómico digerido y sin digerir.....	36
Tabla 6. Cuantificación de la clorofila <i>a</i> presente en los cultivos de <i>C. raciborskii</i> en el momento previo a la realización de los moldes de agarosa.....	55
Tabla 7. Tamaño de los macrofragmentos de restricción obtenidos en la digestión del ADN genómico de las cepas de <i>C. raciborskii</i> con la enzima de restricción <i>Mlu</i> I...	64
Tabla 8. Tamaño de los macrofragmentos de restricción obtenidos en la digestión del ADN genómico de las cepas de <i>C. raciborskii</i> con la enzima de restricción <i>Xho</i> I...	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopía de epifluorescencia ejemplificando las dos morfologías observadas en <i>C. raciborskii</i> , filamentos curvos y filamentos rectos.....	5
Figura 2. Variaciones morfológicas de <i>C. raciborskii</i> .....	7
Figura 3. Estructura molecular de STX y sus análogos.....	8
Figura 4. Estructura molecular de CYL y sus análogos.....	9
Figura 5. Sistema CHEF. ....	15
Figura 6. Esquematización del proceso de lavado.....	20
Figura 7. Microscopía de epifluorescencia de las cepas de <i>C. raciborskii</i> y ACMB13 de <i>A. circinalis</i> antes y después del protocolo de lavado para eliminación de bacterias acompañantes.....	39
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de la extracción del ADN genómico de las cepas de <i>C. raciborskii</i> y ACMB13 de <i>A. circinalis</i> .....	40
Figura 9. Análisis ARDRA de las cepas de <i>C. raciborskii</i> y ACMB13 de <i>A. circinalis</i> .....	41
Figura 10. Esquema representativo de parte de un operón ribosomal de cianobacteria.....	42
Figura 11. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de PCR de la amplificación con los partidores 322F y 340R de las cepas de <i>C. raciborskii</i> y ACMB13 de <i>A. circinalis</i> .....	43

Figura 12. Electroforesis en gel de poliacrilamida de los productos de PCR de la amplificación con los partidores 27F y 340R de las cepas de <i>C. raciborskii</i> y ACMB13 de <i>A. circinalis</i> .....	44
Figura 13. Visualización de la extracción de ADN plasmidial de los clones seleccionados que poseen ya sea el inserto con la BS o la BI.....	45
Figura 14. Electroforesis en gel de poliacrilamida de la amplificación por PCR de los clones seleccionados que poseen ya sea el inserto con la BS o la BI.....	46
Figura 15. Alineamientos de las secuencias del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS (largo y corto).....	48
Figura 16. Reconstrucción filogenética de los genes de rRNA 16S e ITS.....	50
Figura 17. Reconstrucción filogenética de los espaciadores ITS largos obtenidos en este estudio y descritos por Gugger y col., 2005.....	53
Figura 18. Electroforesis en gel por campo pulsado ADN cromosómico de las cepas de <i>C. raciborskii</i> .....	56
Figura 19. PFGE de ADN cromosómico de las cepas de <i>C. raciborskii</i> digerido con diferentes enzimas de restricción de corte poco frecuente.....	57
Figura 20. PFGE de ADN cromosómico de cepas de <i>C. raciborskii</i> digerido con diferentes enzimas de restricción.....	59
Figura 21. PFGE de ADN cromosómico digerido con <i>Xho</i> I y <i>Mlu</i> I de las cepas de <i>C. raciborskii</i> .....	61
Figura 22. PFGE de ADN cromosómico digerido con <i>Mlu</i> I de la cepa CS-511.....	62
Figura 23. Enumeración de los fragmentos de restricción obtenidos en la digestión con <i>Xho</i> I y con <i>Mlu</i> I.....	63

Figura 24. Árbol filogenético construido a partir de los análisis restricción de PFGE  
con las enzimas *Xho* I y *Mlu* I.....67

|

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

Amp: Ampicilina.

ARDRA: Amplificación y análisis de restricción del gen de rRNA 16S (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis).

ARN: Ácido ribonucleico.

BI: Banda inferior del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS.

BS: Banda superior del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS.

CHEF: Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis.

CTAB: Bromuro de cetil-trimetil amonio.

CYL: Cilindrospermopsina.

dcGTX<sub>2</sub>: decarbamoil gonyautoxina 2

dcGTX<sub>3</sub>: decarbamoil gonyautoxina 3

dcSTX: decarbamoil saxitoxina

D.O.: Densidad Óptica.

do-CYL: deoxicilindrospermopsina.

EDTA: Acido etilendiaminotetracético.

FAN: Florecimientos Algales Nocivos.

g: Aceleración gravitacional (9,8 m\*s<sup>-2</sup>).

GTX<sub>2</sub>: gonyautoxina 2

GTX<sub>3</sub>: gonyautoxina 3.

IC: Índice de consistencia

IR: Índice de retención



ITS: Región espaciadora intergénica (Internal Transcribed Spacer).

ITS L: Región espaciadora intergénica larga.

ITS C: Región espaciadora intergénica corta.

kb: kilo bases.

LMP: Agarosa de bajo punto de fusión (Low Melting Point).

LB: Medio Luria-Bertani.

Mb: mega pares de bases.

NEO: Neosaxitoxina

NJ: Neighbor-Joining.

pb: pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polimerase Chain Reaction).

PFGE: Electroforesis en gel por campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis).

PMSF: Para-Metil-Fenil-Sulfonilo.

rARN: Ácido ribonucleico ribosomal.

RFLPs: Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphisms).

Rpm: revoluciones por minuto.

SDS: Dodecíl sulfato de sodio.

STX: Saxitoxina.

tARN<sup>Ala</sup>: Ácido ribonucleico de transferencia de alanina.

tARN<sup>Glu</sup>: Ácido ribonucleico de transferencia de glutamato.

tARN<sup>Ile</sup>: Ácido ribonucleico de transferencia de isoleucina.

UV: Ultravioleta.

V: Volts.

VPM: Veneno Paralizante de Mariscos.

## RESUMEN

*Cylindrospermopsis raciborskii* es una cianobacteria filamentosa de agua dulce, de estructura multicelular, que presenta células vegetativas (fotosintéticas), células especializadas para la fijación de nitrógeno (heterocistos), y células de resistencia (akinetes). Se han descrito dos morfologías, filamentos curvos y rectos.

*C. raciborskii* es una especie potencialmente tóxica, debido a que existen cepas capaces de producir la hepatotoxina cilindrospermopsina (CYL) que inhibe la síntesis de proteínas, cepas productoras de toxinas del Veneno Paralizante de Mariscos (VPM), que son potentes bloqueadores de canales de sodio voltaje dependientes en células de mamíferos y están conformadas por saxitoxina (STX) y sus análogos; o no producir toxinas. *C. raciborskii* ha sido responsable de florecimientos tóxicos en regiones tan diversas como Australia, Brasil, Estados Unidos y Europa. A pesar de las diferencias en distribución geográfica, morfología y toxicidad, *C. raciborskii* presenta un alto porcentaje de similitud en las secuencias del ARN ribosomal 16S, sobre un 99% de similitud, siendo por lo tanto difícil correlacionar con el fenotipo toxigénico las relaciones filogenéticas establecidas en base a este marcador. En esta tesis se analizó el espaciador polimórfico ITS entre los genes de rARN 16S y 23S de 8 cepas de *C. raciborskii* de distinta toxicidad. Se detectaron mediante PCR dos fragmentos de 430 y 630 pb aproximadamente en las cepas productoras de CYL y en las no productoras de toxinas, mientras que en la cepa productora de STX, los tamaños fueron 600 y 400 pb, aludiendo la presencia de al menos dos operones ribosomales. El análisis de secuencias demostró que los espaciadores poseen dominios conservados en bacterias que sólo han

sido descritos para un número reducido de cianobacterias y que la diferencia en tamaño de los espaciadores se debe a la presencia en el espaciador largo de la secuencia que codifica para los tARN<sup>Ile</sup> y tARN<sup>Ala</sup>. Al asociar estas secuencias a las del gen de rARN 16S, se observó que la variación intragénica es mayor que la variación observada en la misma región entre diferentes cepas.

Para analizar la variabilidad genética en la especie *C. raciborskii* se realizó un análisis de restricción del genoma completo mediante electroforesis en gel por campo pulsado (PFGE). Para esto, se optimizaron protocolos de obtención de un concentrado de cianobacterias con una carga reducida de bacterias heterótrofas y ADN cromosómico intacto embebido en moldes de agarosa. Considerando la alta tasa de metilación presente en el ADN de cianobacterias, se probaron 16 enzimas de restricción de corte frecuente y poco frecuente, de las cuales sólo se obtuvo un patrón de digestión de fragmentos discretos con las enzimas *Xho* I y *Mlu* I. A través de este análisis el tamaño genómico de las cepas de *C. raciborskii* se estimó entre 1,6 y 2,06 Mb para la digestión con *Xho* I y entre 2,12 y 3,05 Mb para la digestión con *Mlu* I.

Se establecieron relaciones filogenéticas entre las cepas de *C. raciborskii* en base a las secuencias del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS correspondientes a cada operón ribosomal, observándose una topología distinta para cada árbol, lo que sugiere una evolución independiente de cada operón. Esta divergencia entre los operones sin embargo, no se correlacionó con la toxicidad de cada cepa, lo que es apoyado por las relaciones filogenéticas estimadas en base a las secuencia del espaciador ITS largo de cepas de *C. raciborskii* de distintas regiones geográficas y toxicidades, donde se observa una agrupación filogeográfica pero no una correlación con la toxicidad y con aquellas

relaciones filogenéticas obtenidas a partir del patrón de restricción de PFGE con las enzimas *Xho* I y *Mlu* I, donde las cepas productoras de toxinas agrupan en conjunto con las cepas no tóxicas. De acuerdo a los resultados obtenidos, se plantea la hipótesis que los genes involucrados en la toxicidad pudieron haber sido adquiridos por procesos de transferencia horizontal en eventos independientes para las cepas Australianas y para la cepa procedente de Brasil.

## ABSTRACT

*Cylindrospermopsis raciborskii* is a filamentous freshwater multicellular cyanobacterium due to the presence of nitrogen fixing specialized cells (heterocystous) and resistance cells (akinetes) besides the photosynthetic cells. Two morphologies have been observed, coiled and straight trichomes.

There are strains of *C. raciborskii* which produce either cylindrospermopsin, (CYL) a hepatotoxin, which inhibits protein synthesis, Paralytic Shellfish Poisoning (PSP) toxins, conformed by saxitoxin (STX) and its derivatives, a class of neurotoxic alkaloids that selectively block voltage-gated Na<sup>+</sup> channels in excitable cells, or strains that do not produce toxins. *C. raciborskii* has been involved in toxic blooms in diverse geographic regions such as Australia, Brazil, United States and Europe. Regardless of the differences in geographic distribution, morphology and toxicity, strains of *C. raciborskii* are very homogeneous in their 16S rRNA sequences; similarities higher than 99% have been reported, being difficult to establish phylogenetic relationships and correlate it with toxigenic phenotype. We analyzed the polymorphic 16S–23S rRNA Internal Transcribed Spacer (ITS) region from eight *C. raciborskii* strains able to produce different toxins. Two ITSs fragments of 430 and 630 bp, were detected by PCR amplification in CYL producers and non-toxic strains, and two spacers of 400 and 600 bp in the PSP toxin-producing strain, indicating the presence of at least two ribosomal operons. Sequence analysis of these regions showed in both spacers the presence of conserved motifs described only in a few species of cyanobacteria. In addition, the size differences between spacers are given by the presence of tRNA<sup>Ile</sup> and tRNA<sup>Ala</sup> in the

longer spacer. Sequence analysis of the 16S rDNA plus ITS showed an intragenic variation higher than the variation between different strains.

In order to analyze genetic variability between *C. raciborskii* strains we performed a complete genome analysis by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). The optimization of protocols for obtaining concentrated *C. raciborskii* cells with a reduction in the proportion of bacteria associated and intact chromosomal DNA agarose embedded was necessary previous to perform PFGE. Considering the high content of methylation in cyanobacterial genomes, 16 frequent and non-frequent cutting restriction enzymes were assayed. Discrete and distinctive restriction patterns were obtained only with *Xho* I and *Mlu* I enzymes. Through this analysis genome size of *C. raciborskii* strains was estimated in the range of 1.6 - 2.06 Mbp for *Xho* I and 2.12 - 3.05 Mbp for *Mlu* I digestions.

The phylogenetic relationships established between *C. raciborskii* strains based on the 16S rDNA plus ITS sequence from each operon, showed different topologies; suggesting an independent evolution of each operon. This divergence nevertheless, did not correlate with the toxicity. This results were supported by the phylogenetic tree created with the longer ITS of *C. raciborskii* strains isolated from different geographic regions and able to produce different toxins that shows a phylogeography that does not correlate with a toxic phenotype. Phylogenetic trees based on the restriction pattern of the complete genome also showed no correlation between the toxic phenotype and a phylogenetic association. Our results support the hypothesis that genes involved in toxicity could have been transferred by independent processes of horizontal transfer for the Australian and Brazilian strains.

## INTRODUCCIÓN

Desde hace más de un siglo que se conocen casos de intoxicación animal debido a la ingesta de agua con alto contenido de cianobacterias tóxicas (Francis, 1878). Sin embargo, intoxicaciones en humanos sólo se han descrito desde hace 20 años. El primer incidente ocurrió en Palm Island (North Queensland) al norte de Australia. En Noviembre de 1979, 100 niños de familias aborígenes cayeron enfermos en el hospital con algunos síntomas de gastroenteritis. La enfermedad no se identificó inmediatamente por lo que fue denominada la enfermedad misteriosa de Palm Island (Palm Island mystery disease) (Griffiths y Saker, 2003). No fue sino hasta 1983 que se estableció la relación entre la enfermedad y un florecimiento de cianobacterias ocurrido en la reserva de agua potable más importante de la isla, Solomon Dam (Bourke y col., 1983). Casos como estos han vuelto a ocurrir, principalmente en Australia y Brasil. En Australia más de 1000 km del río Darling se contaminaron con florecimientos de cepas de *Anabaena circinalis* durante la sequía de 1991 (Bowling y Baker, 1996). En Febrero de 1996 en Caruarú, estado de Pernambuco, Brasil, 52 enfermos fallecieron por fallas hepáticas luego de ser sometidos a tratamiento de hemodiálisis. Se descubrió que agua contaminada con toxinas de cianobacterias fue utilizada en el tratamiento de estos pacientes (Azevedo y col., 2002). Intoxicaciones crónicas en humanos mediante la exposición a toxinas de cianobacterias por el consumo de suplementos alimenticios elaborados de cianobacterias es otro aspecto que no ha sido completamente estudiado. La utilización de cianobacterias cultivadas en su medio natural y por lo tanto no exentas de la presencia de otras cianobacterias tóxicas llevó en 1996 a la contaminación de



suplementos alimenticios con hepatotoxinas (Saker y col., 2005). El consumo periódico de estos suplementos contaminados puede a largo plazo causar cáncer e incluso la muerte (Gilroy, 2000).

Las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos cuya coloración se debe a la presencia de pigmentos fotosintéticos como clorofila *a* y pigmentos accesorios (ficocianinas, ficoeritrinas y ficobilinas). Es posible clasificarlas según su morfología, existiendo cianobacterias unicelulares de forma esférica o cocoides, a veces agregadas en una cápsula mucilaginosa, y cianobacterias filamentosas. Las cianobacterias filamentosas pueden ser consideradas como organismos multicelulares debido a que además de células vegetativas pueden presentar células especializadas para la fijación de nitrógeno (heterocistos) y células de resistencia (akinetes). En algunas ocasiones los filamentos se pueden encontrar envueltos por mucílago.

Debido a que los requerimientos para el crecimiento de las cianobacterias no son estrictos (oxígeno, nitrógeno y fósforo principalmente), la creciente eutroficación de los ambientes acuáticos y las sequías producto de los cambios climáticos, entre otros factores, pueden favorecer la proliferación masiva de cianobacterias. Este aumento en el número de células puede causar efectos negativos en el ambiente, tales como alteraciones en el pH del agua, disminución del oxígeno disuelto y mal olor. Sin embargo, lo más preocupante es la presencia de toxinas en los denominados Florecimientos Algales Nocivos o FANs. La progresiva aparición de FANs de cianobacterias en reservas de agua potable y aguas recreacionales ha despertado el interés científico, ya que se estima que más del 50% de estos florecimientos son tóxicos (Sivonen y col., 1990).

## Cianobacterias y producción de toxinas

Las cianobacterias producen un gran número de metabolitos secundarios, que son compuestos no esenciales para su metabolismo, entre ellos, toxinas. La función natural que cumplen estas toxinas en el medio ambiente se mantiene desconocida, pero de manera interesante, afectan principalmente a los mamíferos terrestres más que a los organismos acuáticos. Según el efecto que producen en el mamífero, las cianotoxinas o toxinas cianobacteriales pueden clasificarse en dermatotoxinas, neurotoxinas y hepatotoxinas; estos últimos dos grupos son capaces de causar la muerte.

Se han descrito al menos 46 especies de cianobacterias productoras de toxinas que afectan a mamíferos (Sivonen y col., 1999) representadas en agua dulce por: *Microcystis* sp., *Synechocystis* sp, *Planktothrix rubescens*, *Synechococcus* sp., *Planktothrix agardhii*, *Gloeotrichia* sp., *Anabaena* sp., *Lyngbya* sp., *Aphanizomenon* sp., *Nostoc* sp., algunas especies de *Oscillatoria*, *Schizothrix* sp. y *Cylindrospermopsis raciborskii*. La gran diversidad de cianotoxinas existentes es producida por diferentes especies de cianobacterias (tabla 1).

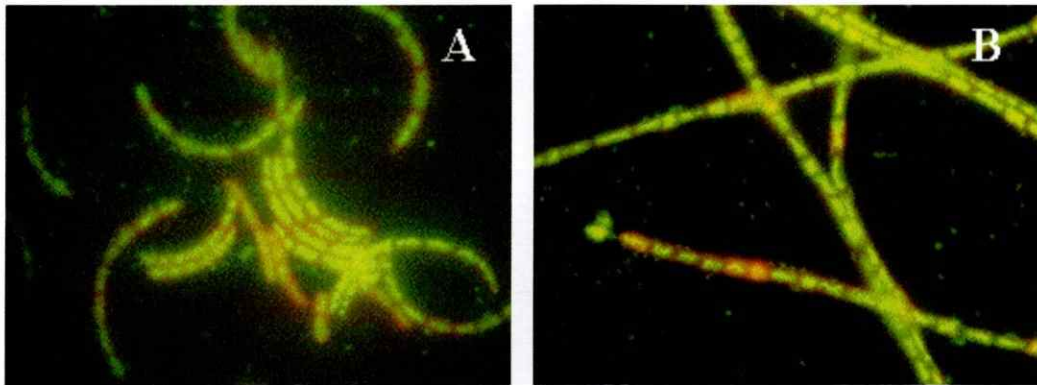
Por otro lado, la producción de toxinas no es una característica de la especie, ya que dentro de una especie existen cepas no productoras y productoras de uno o más grupos de toxinas. Este es el caso de *Cylindrospermopsis raciborskii*, una cianobacteria de agua dulce, potencialmente tóxica, ya que se ha reportado como productora de la hepatotoxina cilindrospermopsina (CYL) (Othani y col., 1992) y de toxinas del veneno paralizante de mariscos (VPM) (Lagos y col., 1999).

**Tabla 1.** Cianotoxinas y sus géneros o especies productoras. Aquellas toxinas en plural poseen análogos estructurales.

Cianotoxina	Género o especie productora
<b>Hepatotoxinas</b>	
CYL	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> , <i>Umezakia natans</i> , <i>Raphidiopsis curvata</i> , <i>Anabaena bregii</i> , <i>lyngbya</i> sp., <i>Microcystis</i> sp.
Microcistinas	<i>Microcystis</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Nostoc</i> , <i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> .
Nodularinas	<i>Nodularia</i> .
<b>Neurotoxinas</b>	
STX y sus análogos	<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> , <i>Anabaena circinalis</i> , <i>Anabaena lemermammii</i> , <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> , <i>Aphanizomenon gracile</i> , <i>Aphanizomenon issatschenkoi</i> , <i>Lyngbya</i> sp., <i>Planktothrix</i> sp.
Anatoxina-a	<i>Anabaena</i> , <i>Planktothrix</i> , <i>Aphanizomenon</i> .
Anatoxina-a (S)	<i>Anabaena</i> .
<b>Dermatotoxinas</b>	
Lyngbyatoxina-a	<i>Lyngbya</i> .
Aplisiatoxinas	<i>Lyngbya</i> , <i>Schizothrix</i> , <i>Planktothrix</i> .

### *Cylindrospermopsis raciborskii*

*C. raciborskii* es una cianobacteria filamentosa de agua dulce perteneciente al género Nostocales. Se caracteriza por la presencia de vacuolas de gas, akinetes, heterocistos y células vegetativas. *C. raciborskii* es extremadamente pequeña en comparación con otras algas, sus filamentos, conocidos como tricomas, son típicamente de 2-3  $\mu\text{m}$  de ancho (Pádisak, 2003) y de largo variable, en el rango de 10-120  $\mu\text{m}$  (Briand y col., 2002), pueden ser curvos o rectos (Fig. 1) y a veces estar envueltos en una capa mucilaginosa.



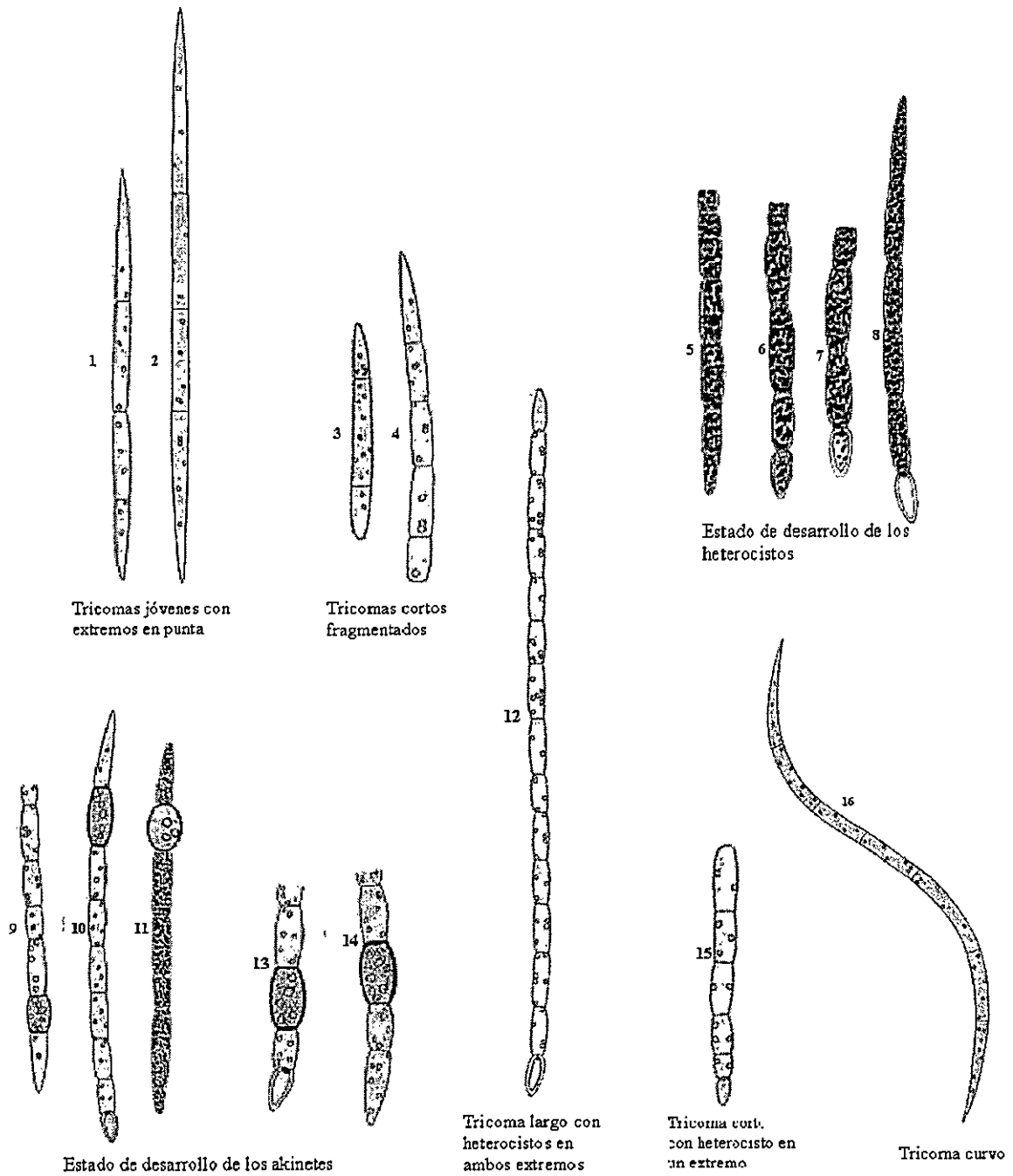
**Figura 1.** Microscopía de epifluorescencia ejemplificando las dos morfologías observadas en *C. raciborskii*. **A.** Filamentos curvos (cepa CS-506). **B.** Filamentos rectos (cepa CS-505).

La presencia de akinetes y heterocistos está determinada por las condiciones ambientales. La fijación de nitrógeno no es un proceso obligatorio, ya que *C. raciborskii* puede utilizar como fuente de nitrógeno tanto urea, nitrato y amonio como nitrógeno atmosférico (Saker y Neilan, 2001). Así mismo, el desarrollo de los akinetes está determinado por condiciones de estrés, principalmente por los cambios en la temperatura (Gorzó, 1987 en Pádisak, 2003). Los akinetes de *C. raciborskii* germinan en un rango de temperatura relativamente alta (22 y 23,5°C) si se compara con la temperatura de germinación de los akinetes de otros miembros del género Nostocales (18-25°C) (Gorzó, 1987 en Pádisak, 2003). *C. raciborskii* se ha descrito como una especie tropical, sin embargo, en los últimos 10 años se ha expandido a regiones de climas templados (Pádisák, 1997) donde sus florecimientos están restringidos al período de verano (Tóth y Pádisák, 1986; Briand, y col., 2002). Las condiciones bajo las que *C. raciborskii* crece en aguas tropicales y templadas parecen ser heterogéneas. Además de las diferencias en la temperatura, se han observado otros factores implicados en el crecimiento de *C. raciborskii*. Es posible encontrar por ejemplo, florecimientos en aguas con alta cantidad

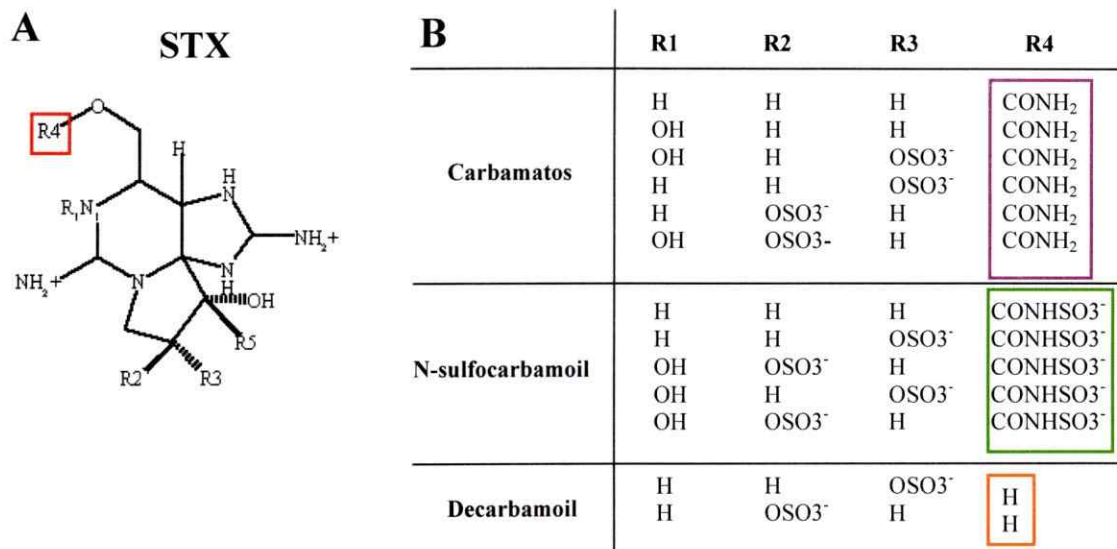
de amonio (donde no presenta heterocistos) (Bouvy y col., 1999), alta concentración de minerales disueltos (sulfato y calcio) (Briand y col., 2002) y baja concentración de fosfato (Itsvánovics y col., 2000).

Las variaciones morfológicas que experimenta *C. raciborskii* fueron descritas por Singh (1962) al observar una población anual. En el esquema de la figura 2 (Padisák, 2003) se pueden observar tricomas en estadios tempranos de desarrollo (Fig. 2: 1-2, 16), tricomas cortos fragmentados (Fig. 2: 3-4), tricomas desarrollados con heterocistos terminales en ambos extremos (Fig. 2: 12), desarrollo de heterocistos (Fig. 2: 5-8) y desarrollo de akinetes (Fig. 2: 9-11, 13-14).

Las cepas de *C. raciborskii* son capaces de producir CYL, toxinas del VPM o no producir toxinas. Las toxinas del VPM están representadas por saxitoxina (STX) y sus análogos. Se han descrito 26 tipos de análogos de STX, los que varían en toxicidad, siendo STX el análogo más potente (Fig. 3). Estas toxinas pueden ser producidas por dinoflagelados marinos, y por cianobacterias de agua dulce. Son potentes bloqueadores de canales de sodio en células de mamíferos voltaje dependientes, lo que afecta la transmisión del impulso nervioso causando la muerte por paro respiratorio a corto plazo.

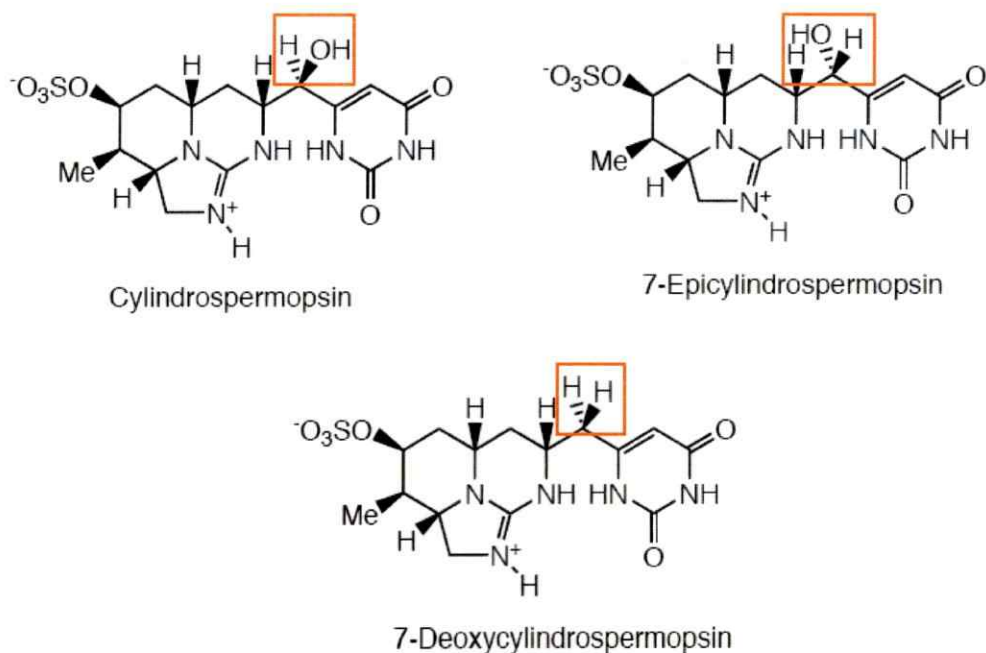


**Figura 2.** Variaciones morfológicas de *Cylindrospermopsis raciborskii* (reproducido de las figuras 1-16 en Singh 1962 y extraído desde Pádisak, 2003). 1-2. tricomas jóvenes con extremos en punta; 3-4. Tricomas cortos fragmentados; 5-8. Desarrollo de los heterocistos; 9-11, 13-14. Desarrollo de los akinetes; 12. Tricoma largo con heterocistos a ambos extremos; 15. Tricoma corto con heterocisto en un extremo; 16. Tricoma curvo.



**Figura 3. A.** Estructura molecular de STX, se designan como R1, R2, R3 y R4 los grupos que varían en los análogos de STX. En el recuadro rojo se indica el grupo R4, que define la clasificación de la toxina como carbamato, N-sulfocarbamoil o decarbamoil. **B.** Tabla que muestra las sustituciones en R1, R2, R3 y R4 que conforman las toxinas del VPM, se destacan los grupos: carbamato en recuadro púrpura, N-sulfocarbamoil en recuadro verde y decarbamoil en recuadro naranja.

Las hepatotoxinas ocasionan el tipo más común de intoxicación relacionada con las cianobacterias, son de acción lenta, causando la muerte en días. Existen dos análogos de la hepatotoxina CYL, 7-epicilindrospermopsina (Banker y col., 2000), un metabolito secundario de *Aphanizomenon ovalisporum*, y el análogo no tóxico 7-desoxicilindrospermopsina (do-CYL) (Norris y col., 1999) (Fig. 4).



**Figura 4.** CYL y sus análogos, en naranja se enmarcan los grupos hidroxilo y H que se modifican para originar los análogos 7-epicilindrospermopsina y 7-desoxicilindrospermopsina.

Se ha demostrado que CYL es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas (Hawkins y col., 1985; Falconer y col., 1999; Griffiths y Saker, 2003), e impide la detoxificación celular (Runnengar y col., 1994, 2002). La estructura de CYL consiste en un esqueleto tricíclico sulfatado, que contiene un grupo guanidinio central unido a un grupo hidroximetiluracilo (Fig. 4). Esta estructura basada en nucleótidos y con grupos potencialmente reactivos como la guanidina y los grupos sulfato, sugiere una interacción entre CYL y ácidos nucleicos. Esta interacción se ha demostrado en estudios en ratón, en que se observó la ruptura de las hebras de ADN (Shaw y col., 2000). En humanos sólo se ha demostrado que la exposición a CYL produce anomalías citogenéticas en células linfoblastoides (Humpage y col., 2000).



Las vías de biosíntesis, tanto de STX y sus análogos como de CYL se desconocen. Estudios en el dinoflagelado *Alexandrium tamarense* y en la cianobacteria *Aphanizomenon flos-aquae* con precursores marcados han demostrado que los precursores de STX en ambos microorganismos son: tres moléculas de arginina, una molécula de metionina y una de acetato (Shimizu, 1986). Esto sugiere que las vías de biosíntesis pueden ser similares, así como también los genes involucrados en la síntesis de STX y sus análogos. Los dinoflagelados son organismos eucariontes, difícilmente axénicos, cuyo tamaño genómico está en el rango de 3.000 a 215.000 Mb (Hackett y col., 2004). En comparación, el tamaño del genoma de diferentes especies de cianobacterias se encuentra entre 1,8 Mb y 13,6 Mb (Strehl y col., 1999). Es por esta razón, que las cianobacterias son consideradas como un buen modelo para el estudio de la biosíntesis de las toxinas del VPM.

Los complejos multienzimáticos modulares tipo péptido sintetasa no ribosomales (Non Ribosomal Peptide Synthetases, NRPSs) y policétido sintasa (Poliketide Synthases, PKSs) son responsables de la síntesis de las hepatotoxinas microcistinas y nodularinas en cianobacterias (Dittmann y col., 1997; Moffitt y Neilan, 2004). Para la síntesis de CYL en la cianobacteria *Aphanizomenon ovalisporum* se han propuesto tres genes putativos que codifican para: una amidinotransferasa (AoaA); un híbrido entre una péptido sintetasa no ribosomal y policétido sintasa (AoaB); y una policétido sintasa (AoaC) (Schembri, y col., 2001; Shalev-Alon, y col., 2002). Kellman y col., (2006) mediante PCR específico contra fragmentos de *aoaA*, el módulo de adenilación (NRPS) de *aoaB* y el módulo cetosintasa (PKS) de *aoaC*, demostraron la presencia de estos genes en cepas de *C. raciborskii* sólo productoras de CYL.

Pese a las diferencias en distribución geográfica, morfología, toxicidad y condiciones de crecimiento, las cepas de *C. raciborskii* presentan un alto porcentaje de similitud en las secuencias del ARN ribosomal de 16S. Neilan y col., (2003) estudiaron la variación genética entre cepas de *C. raciborskii* aisladas de distintos países, como Australia, Brasil, Alemania, Hungría Portugal y Estados Unidos encontrando un 99,1% de similitud. De la misma manera estudios en cepas australianas revelaron un 99,8% de similitud, demostrando así que *C. raciborskii* conforma un taxón bien definido. La relación filogenética establecida a partir de estas secuencias mostró que existe una asociación filogeográfica entre las cepas, aunque no es posible establecer una correlación entre relación filogenética y fenotipo toxigénico. Por el contrario, estudios similares en cepas de *Anabaena circinalis* productoras y no productoras de STX mostraron que la asociación filogenética está en concordancia con la toxicidad (Beltrán y Neilan, 2000). Debido al alto grado de conservación de las secuencias génicas del ARN ribosomal de 16S de *C. raciborskii*, el análisis filogenético de las cepas de esta especie debe considerar secuencias que posean una mayor variabilidad.

Los métodos basados en el estudio del polimorfismo genético, como el análisis de las secuencias espaciadoras entre los genes de 16S y 23S ribosomales (“Internal Transcribed Spacer”, ITS), y el análisis de macrofragmentos de restricción mediante electroforesis en gel en campo pulsado (“Pulsed Field Gel Electrophoresis”, PFGE) cumplen con estos requisitos y por lo tanto son aptos para realizar estudios de variabilidad genética entre cepas de *C. raciborskii*.

### **Espaciadores ITS entre los genes de 16S y 23S ribosomales.**

Los genes ribosomales en bacterias generalmente están organizados en operones en el orden ARN 16S - ARN 23S - ARN 5S, y cada gen está separado por una región espaciadora ITS. La secuencia de estos espaciadores contiene motivos conservados entre todas las bacterias y a menudo contiene un solo ARN de transferencia que puede ser, tARN<sup>Glu</sup> o tARN<sup>Ala</sup> o dos: tARN<sup>Ala</sup> y tARN<sup>Ile</sup>. Las regiones espaciadoras de cianobacterias varían en tamaño en un rango aproximado de 400 y 700 pb y en las cianobacterias filamentosas y fijadoras de nitrógeno se han encontrado múltiples espaciadores (Iteman y col., 2000). Se ha demostrado que la longitud de la secuencia y el grado de variación genética en estos espaciadores es un buen método para la diferenciación de cepas bacterianas (Navarro y col., 1992). Gugger y col. (2005) mediante el análisis de secuencias ITS determinaron la diversidad de 16 cepas de *C. raciborskii* y 2 cepas de *Raphidiopsis* sp. en 4 continentes (América, Oceanía, África y Europa) encontrando agrupaciones intracontinentales con 99% de similitud entre cepas y 91% de similitud entre cepas intercontinentales, demostrando que se puede diferenciar entre cepas. El análisis de estas cepas basado en parte de las secuencias del ARN ribosomal de 16S no mostró diferencias entre las cepas de *C. raciborskii* y *Raphidiopsis* sp.

### **Análisis del genoma completo mediante PFGE**

Los métodos de tipificación se basan en el hecho que las cepas relacionadas de acuerdo a su fenotipo toxigénico derivan de la expansión clonal de un único ancestro y, por lo tanto, comparten características que difieren de aquellas de microorganismos que

no comparten su fenotipo toxigénico. La tipificación fenotípica es ampliamente utilizada, pero debido al predominio de ciertos fenotipos, en la investigación epidemiológica se requieren técnicas que generen patrones de ADN. Entre éstas, las más comunes son la ribotipificación, el análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP's), el análisis del perfil plasmídico y el análisis del polimorfismo de longitud de macrofragmentos de restricción mediante PFGE.

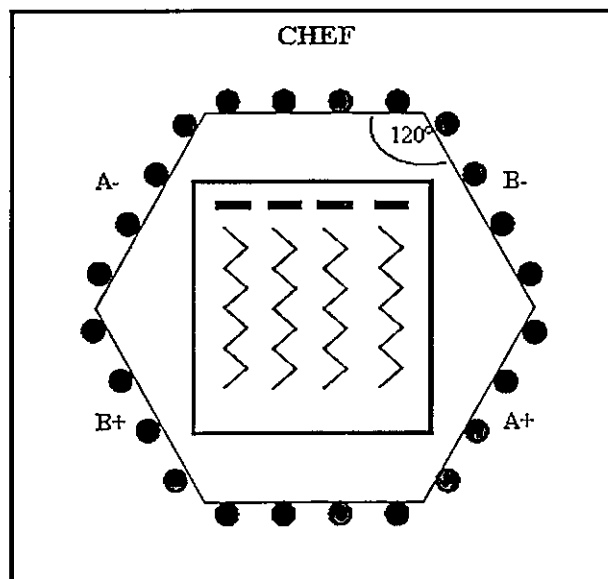
El análisis por PFGE tiene una gran capacidad de diferenciación, ya que es capaz de subdividir cepas o aislados bacterianos que se encuentran estrechamente relacionados genotípicamente. Es por esto que esta técnica es preferida para realizar epidemiología molecular. Esta capacidad puede ser calculada por el índice de discriminación D, que está basado en la probabilidad de que dos cepas, escogidas al azar de una población de cepas no relacionadas sean distinguidas por el método de tipificación (Hunter y Gaston, 1988). Otras herramientas utilizadas para la evaluación de la técnica son: la capacidad de tipificación y la reproducibilidad (Hunter, 1990). La PFGE puede revelar polimorfismos en el análisis de genoma completo, facilitando así los estudios evolutivos y de poblaciones en un sinfín de especies.

La PFGE se utiliza para separar fragmentos de ADN de alto peso molecular, entre aproximadamente 20 kb a 10 Mb, en geles de agarosa. Permite obtener el tamaño de cromosomas completos o de los fragmentos de la digestión de un cromosoma. Como los fragmentos de ADN son muy grandes, les es difícil migrar a través del gel. Para facilitar la migración se aplican campos eléctricos (generalmente dos) alternados sobre el ADN inmovilizado en un molde de agarosa. Cada campo eléctrico es aplicado en

forma de pulsos de voltaje de duración variable y dependiente del tamaño de la molécula. De esta manera, los fragmentos más grandes requieren de pulsos más largos que los fragmentos pequeños. La incidencia del primer campo eléctrico sobre el gel causa un estiramiento y migración de las moléculas de ADN, el segundo campo eléctrico es aplicado formando un ángulo con el primero. El ADN debe entonces cambiar su conformación y reorientarse antes de que pueda migrar en la dirección del segundo campo eléctrico. Este movimiento causa que las moléculas de ADN serpenteen en su camino hacia el fondo del gel (Fig. 5). Las moléculas más grandes toman más tiempo en realinearse después de cambiar el campo que las moléculas más pequeñas. Para prevenir la ruptura de las moléculas de ADN, las células intactas se embeben en bloques de agarosa. La lisis y desproteínización celular se realiza in situ. Así mismo, se puede llevar a cabo la digestión del ADN en el mismo bloque de agarosa.

Además de ser una técnica utilizada en tipificación, la PFGE ha sido ampliamente utilizada para la estimación de tamaños genómicos (Strehl y col., 1999), ya que puede dar un estimado del tamaño de los fragmentos comparando su posición con la del estándar de peso molecular conocido.

Análisis de PFGE en cianobacterias se han realizado para encontrar secuencias de transposones en *Anabaena circinalis* (Fernández-Piñas y col., 1994; Khudyakov y Wolf, 1996), y realizar mapas genéticos en *Synechococcus* sp. (Chen y Widger, 1993) y *Anabaena* sp. (Bancroft y col., 1989). Hasta el momento no hay estudios que involucren el análisis por PFGE en *C. raciborskii*.



**Figura 5.** Sistema CHEF. Se muestra la orientación de los 24 electrodos, y el movimiento de serpenteo que siguen las moléculas de ADN en su migración hacia el fondo del gel.

De acuerdo a lo expuesto hasta el momento, las cepas de *C. raciborskii* presentan diferencias en términos morfológicos y fisiológicos, por lo que es posible esperar una alta variabilidad genética. Los antecedentes demuestran que no es posible la determinación de esta variabilidad por medio del análisis de las secuencias del ARN ribosomal de 16S, por lo tanto, es necesario realizar análisis que involucren regiones variables dentro del genoma o bien, el genoma completo. Dentro de este contexto, nos planteamos la siguiente hipótesis: **“El fenotipo toxigénico en la especie *C. raciborskii* está asociado a un patrón clado-específico, el cual puede ser determinado mediante estudios de variabilidad genética”**.

Por lo tanto, en este trabajo realizamos tanto el estudio de la variabilidad dentro de los espaciadores ITS, como el análisis de restricción de genoma completo mediante PFGE, con el objetivo de establecer relaciones filogenéticas entre cepas productoras de

CYL, toxinas del VPM y no tóxicas y determinar si existe una relación entre la asociación filogenética y el fenotipo toxigénico.

## OBJETIVOS

### General

“Establecer relaciones filogenéticas entre las cepas de *C. raciborskii* productoras de CYL, toxinas del VPM y no tóxicas y determinar si existe una relación entre la asociación filogenética y el fenotipo toxigénico”.

### Específicos

1. Para cepas de *C. raciborskii* de distinta toxicidad, obtener muestras con una carga reducida de bacterias heterótrofas para realizar ya sea extracción de ADN o PFGE.
2. Determinar diferencias entre las secuencias de los genes de rARN 16S asociados a sus respectivos espaciadores (ITS), de las cepas de *C. raciborskii* productoras de CYL, STX y no productoras de toxinas y establecer relaciones filogenéticas entre ellas.
3. Obtener ADN íntegro embebido en moldes de agarosa y definir las enzimas adecuadas para realizar análisis de restricción en PFGE.
4. Establecer relaciones filogenéticas entre las cepas a partir de los patrones de digestión del ADN cromosómico obtenido por PFGE.
5. Determinar la correlación entre la asociación filogenética y el fenotipo toxigénico de acuerdo a los objetivos específicos 2 y 4.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cepas y condiciones de cultivo.

En la tabla 2 se informa acerca de la toxicidad, morfología y procedencia de las cepas utilizadas en este estudio. Las cepas de *C. raciborskii* productoras de CYL y no productoras de toxinas junto con la cepa ACMB13 de *A. circinalis* se obtuvieron del Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO). La cepa D9 productora de toxinas del VPM, corresponde a un cultivo clonal aislado por Loreto Fuenzalida, originado de la cepa SPC 338 que fue aislada en Brasil desde la reserva de Billing (Lagos y col., 1999).

La totalidad de las cepas analizadas se crecieron en matraces de 250 ml con 100 ml de medio de cultivo MLA ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  49,4 mg/l;  $\text{NaNO}_3$  170 mg/l;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  34,8 mg/l;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2,47 mg/l; vitamina  $\text{B}_{12}$  0,05  $\mu\text{g/l}$ ; tiamina HCl 0,1 mg/l; biotina 0,05  $\mu\text{g/l}$ ; NaEDTA 4,36 mg/l;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,58 mg/l;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,01 mg/l;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  22  $\mu\text{g/l}$ ;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,01 mg/l;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,006 mg/l;  $\text{NaHCO}_3$  169 mg/l;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  29,4 mg/l). Los inóculos fueron siempre a una dilución 1/10 a partir de un cultivo en fase exponencial (8-15 días dependiendo de la cepa). Los cultivos se mantuvieron a una temperatura en un rango aproximado de 25-28°C y bajo un fotoperíodo de 12 h/12 h oscuridad/luz blanca a una intensidad de luz de 40  $\mu\text{moles/m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ .

**Tabla 2.** Toxicidad, morfología y procedencia de las cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Toxicidad†	Morfología	Procedencia	Aislada por	Referencia
D9	STX, GTX <sub>2</sub> , GTX <sub>3</sub> dcSTX, dcGTX <sub>2</sub> , dcGTX <sub>3</sub>	Filamentos rectos	Reserva de Billing, Sao Paulo, Brasil	L. Fuenzalida	Fuenzalida, 2005
CS-505 (CR1/SDS)*	CYL, dcCYL	Filamentos rectos	Reservorio de agua potable, Queensland, Australia	M. Saker	Saker y col., 1999
CS-506 (CR2/SDC)*	No Tóxica	Filamentos curvos	Reservorio de agua potable, Queensland, Australia	M. Saker	Saker y col., 1999
CS-507 (CR3/AQS)*	No Tóxica	Filamentos rectos	Estanque de acuicultura, Queensland, Australia	M. Saker	Saker, 2000
CS-508 (CR6/AQC)*	No tóxica	Filamentos rectos	Estanque de acuicultura, Queensland, Australia	M. Saker	Saker, 2000
CS-509 (CR7/LJ)*	No tóxica	Filamentos rectos	Reservorio de agua potable, Queensland, Australia	M. Saker	Saker, 2000
CS-510 (CR5/ANN)*	No tóxica	Filamentos rectos	Presa de la granja McKinlay, Queensland, Australia	M. Saker	—
CS-511 (CR5/MCK)*	CYL, dcCYL	Filamentos rectos	Presa de la granja McKinlay, Queensland, Australia	M. Saker	—
CS-537/13 (ACMB13)*	STX, GTX <sub>2</sub> , GTX <sub>3</sub> , dcSTX, dcGTX <sub>2</sub> , dcGTX <sub>3</sub>	Filamentos curvos	Presa Mt Bold Reservoir, South Australia, Australia	W. Van Dok	—

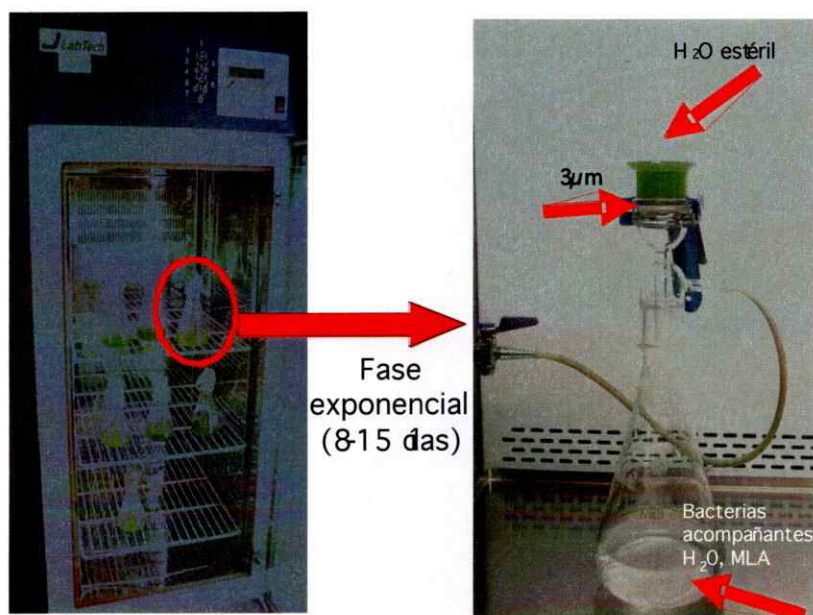
\* Nomenclatura alternativa utilizada por CSIRO y en las referencias.

† Toxicidad confirmada por LC/MS-MS

## 2. Obtención y chequeo de filamentos de *C. raciborskii* y *A. circinalis* con una carga reducida de bacterias heterótrofas.

### 2.1 Eliminación de las bacterias acompañantes.

Debido a que ninguna de las cepas utilizadas en este estudio es axénica, antes de llevar a cabo cualquier experimento que implicase análisis genético, se llevó a cabo un protocolo de lavado. Los cultivos se filtraron al vacío a través de una membrana de nitrocelulosa Millipore® de 3  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro. Para los análisis de PFGE, 100 ml de cultivo en fase exponencial se lavaron con 2 l de agua Milli Q estéril. Para extracción de ADN, 20 ml de cultivo se lavaron con 1 l de agua Milli Q estéril (Fig. 6). Luego de la filtración, las células adheridas al filtro se resuspendieron en 1 ml de agua Milli Q estéril.



**Figura 6.** Esquemmatización del proceso de lavado. Tanto el volumen de cultivo como el volumen de agua empleados en el lavado dependen del proceso al que serán sometidas las células, ya sea extracción de ADN o PFGE.

## 2.2 Microscopía de Epifluorescencia.

10 µl del resuspendido de células obtenido en la etapa de lavado, se resuspendieron en 1 ml de agua Milli Q estéril, se filtraron en una unidad de filtración de vidrio a través de una membrana de policarbonato teñida con Negro de Sudan y se tiñeron con naranja de acridina 0,01 % (p/v) de acuerdo a lo descrito por Hobbie, (1977). La preparación de cianobacterias teñidas con naranja de acridina se observó en un microscopio de epifluorescencia Nikon® con un filtro azul Nikon® G-2A (excitación de 510 a 570 nm y emisión desde los 590 nm hacia el espectro visible) con el objetivo de inmersión 100X. La documentación de imágenes fue realizada con la cámara Olympus C-5060.

### 2.2.1 Cuantificación de las bacterias acompañantes mediante microscopía de epifluorescencia.

La cuantificación de las bacterias heterótrofas acompañantes se realizó mediante un conteo de las bacterias observadas en 9 campos del objetivo 100X. La estimación del número de bacterias por muestra se calculó entre el producto del promedio de bacterias por campo y el siguiente factor de conversión.

$$\text{Factor de conversión} = \text{área filtro} / \text{área foto} = (200 \text{ mm}^2 / 7 \cdot 10^{-3} \text{ mm}^2) = 28 \cdot 10^3$$

### 3. Análisis del operón ribosomal de las cepas de *C. raciborskii* y ACMB13 de *A. circinalis*.

#### 3.1 Extracción del ADN genómico.

La extracción del ADN genómico de todas las cepas de *C. raciborskii* y *A. circinalis* ACMB13 se realizó lavando 20 ml de cultivo en fase exponencial según lo descrito en la sección 2.1. El resuspendido de células se centrifugó a 14000 rpm por 20 min y se eliminó el sobrenadante. Luego se siguió el protocolo del bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) descrito por Ausubel y col., (1985). La verificación de la integridad del ADN genómico extraído se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TBE 1X (89 mM Tris pH 7,89; 89 mM Ácido bórico; 2 mM EDTA), bajo condiciones de corrida electroforética de 80 V por 80 min y tinción con bromuro de etidio 0,5 µg/ml por 15 min. El ADN teñido con bromuro de etidio se visualizó en un transiluminador UV.

#### 3.2 Amplificación de los genes de rARN 16S, espaciador ITS entre los genes de rARN 16S y 23S y del gen de rARN 16S asociado a su región espaciadora (ITS).

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo mediante la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) ya sea en el termociclador TC-312 de TECHNE® o Mastercycler® de Eppendorf® en volúmenes de reacción de 30 µl.

### 3.2.1 Amplificación del espaciador (ITS) entre los genes de rARN 16S y 23S.

1  $\mu$ l de dilución 1/50 del ADN genómico extraído se amplificó mediante PCR utilizando 0,25 U de *Taq* ADN polimerasa Invitrogen®, 3  $\mu$ l de tampón 10X para PCR Invitrogen®, 3 mM de MgCl Invitrogen®, 0,3  $\mu$ M de los partidores 322F y 340R (tabla 2) y 0,2  $\mu$ M de cada desoxinucleótido, con 95°C por 5 min de desnaturalización inicial, 30 ciclos a 95°C por 30 s, 58°C por 30 s y 72°C por 30s; y 72°C por 10 min de extensión final.

### 3.2.2 Amplificación del gen de rARN 16S y del gen de rARN 16S asociado a su región espaciadora (ITS) entre los genes de rARN 16S y 23S.

Para la amplificación del gen de rARN 16S, 1  $\mu$ l de dilución 1/10 del ADN genómico extraído se amplificó mediante PCR utilizando 0,3 U de *Taq* ADN polimerasa Invitrogen®, 3  $\mu$ l de tampón 10X para PCR Invitrogen®, 2,5 mM de MgCl Invitrogen®, 0,2  $\mu$ M de los partidores 27F y 1492R (tabla 3) y 0,46  $\mu$ M de cada desoxinucleótido. La amplificación del gen de rARN 16S asociado a su ITS entre los genes de rARN 16S y 23S se realizó utilizando 0,4  $\mu$ M de los partidores 27F y 340R y 0,93  $\mu$ M de cada desoxinucleótido. El programa de amplificación utilizado para ambas regiones consistió en: un primer ciclo a 95°C por 3 min, 58°C por 6 min y 72°C por 1,5 min; un segundo ciclo a 95°C por 1,5 min, 58°C por 3 min y 72°C por 1,5 min; 28 ciclos a 95°C por 1,5 min, 58°C por 1,5 min y 72°C por 1,5 min; un ciclo final a 95°C por 1,5 min, 58°C por 1,5 min y 72°C 10 min.

**Tabla 3.** Secuencias y sitios blanco de los partidores utilizados en el análisis de los operones ribosomales.

Partidor	Secuencia (5'→3')	Sitio blanco	Referencia
FM13	GACGTTGTA AAAACGACGGCCAG	2956-2972 <sup>d</sup>	Kit pGEM®-T Easy Promega
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	8-27 (16S) <sup>b</sup>	Lane D. J. y col (1985)
CYA106F <sup>a</sup>	CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA	106-127 (16S) <sup>c</sup>	Nübel U. y col (1997)
1055F <sup>a</sup>	ATGGCTGTCGTCAGCT	1055-1070 (16S) <sup>b</sup>	Ferris M. J. y col (1996)
322F	TGTACACACCGCCCGTC	1332-1348 (16S) <sup>c</sup>	Iteman I. y col (2000)
RM13	CACAGGAAACAGCTATGACCATG	176-192 <sup>d</sup>	Kit pGEM®-T Easy Promega
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	1492-1513 (16S) <sup>b</sup>	Lane D. J. y col (1985)
1221R <sup>a</sup>	ATTGTAG(T/C)ACGTGTGTAGCC	1221-1240 (16S) <sup>b</sup>	Neilan B. y col (1997)
340R	CTCTGTGTGCCTAGGTATCC	1999-1979 (23S) <sup>c</sup>	Iteman I. y col (2000)

<sup>a</sup> Partidores utilizados únicamente para secuenciar

<sup>b</sup> Posición del partidor basada en la numeración del ARN ribosomal 16S en *E. coli*

<sup>c</sup> Posición del partidor de acuerdo a la secuencia del operón ribosomal de *Synechocystis* PCC 6803

<sup>d</sup> Posición del partidor de acuerdo a la secuencia del vector pGEM®-T Easy de Promega

### 3.3 Análisis ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) del gen de rARN 16S.

Se amplificó el gen de rARN 16S desde ADN genómico de las cepas de *C. raciborskii* y *A. circinalis* ACMB13 según el protocolo descrito en la sección 3.2.2. 10µl del producto de PCR se digirieron con 6 U de *Eco* RI, a 37°C por 3 h. Los fragmentos de restricción se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (p/v), a 90V por 90 min, en tampón TBE 1X y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio 0,5 µg/ml.

### 3.4 Generación de bibliotecas del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS.

#### 3.4.1 Purificación y ligación del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS.

La región del gen de rARN 16S asociada a su espaciador ITS se amplificó desde el ADN genómico de las cepas de *C. raciborskii* y *A. circinalis* ACMB13 según el protocolo descrito en la sección 3.2.2. El producto de PCR de interés recién amplificado se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (Low Melting Point, LMP) al 0,8 % (p/v) (USBiological), usando TAE 1X (40 mM Tris; 20 mM ácido acético; 1 mM EDTA) como tampón de corrida. El ADN se visualizó usando tinción con bromuro de etidio 0,5 µg/ml por no más de 5 min en un transiluminador UV. La banda se extrajo cortándola con una hoja de bisturí y el ADN se purificó con kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. El producto purificado se ligó al plasmidio pGEM®-T Easy de Promega según las instrucciones del fabricante. La reacción de ligación se realizó toda la noche a 4°C. Para eliminar las sales, el ADN ligado al plasmidio se dializó por 1 h en membrana de nitrocelulosa Millipore® de 0,025 µm de diámetro de poro.

#### 3.4.2 Transformación de *E. coli* DH5α electrocompetentes.

Las células de *E. coli* DH5α se crecieron toda la noche en 5 ml de LB (2% (p/v) triptona; 1% (p/v) extracto de levadura; 1% (p/v) NaCl) a 37°C con agitación, a partir de una colonia. 50 µl de estas células se inocularon en 2 ml de LB y se crecieron hasta una D.O. de 0,5 a 620 nm. Para eliminar el medio LB se tomó 1 ml de cultivo manteniendo las células en hielo y se centrifugó a 10000 rpm por 2 min a 4°C. Se retiró el



sobrenadante y se agregó 500 µl de agua Milli Q estéril, resuspendiendo suavemente 2 veces con micropipeta. Este lavado se repitió tres veces, removiendo en el último paso todo el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 45 µl de agua Milli Q estéril. Se incorporó la mezcla de ligación al resuspendido de células y se agregó cuidadosamente a una cubeta BioRad®. La electroporación se realizó a 1800 V. Las células se recuperaron en Medio S.O.C. (2% (p/v) bacto-triptona, 0,5% (p/v) extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM glucosa, 20 mM Mg<sup>+2</sup>) por 1 h.

#### 3.4.3. Selección de los transformantes.

Con el propósito de obtener un fragmento representativo de la región corta y larga del 16S rARN asociado a su espaciador ITS, se realizó una selección de los transformantes.

Se verificó la presencia del inserto en los clones por selección en placas de agar LB suplementado con ampicilina 100 µg/ml y 20 µl de X-Gal 20 mg/ml. 47 clones positivos para el inserto y 3 clones negativos para cada cepa se crecieron en placas LB/Amp/X-Gal. Se realizó la extracción del ADN plasmidial (sección 3.5.1) y posteriormente se realizó la amplificación con los partidores FM13-RM13 (tabla 3) para la cepa CS-508 de *C. raciborskii* y ACMB13 de *A. circinalis*. También se amplificó por PCR directamente desde una colonia (sección 3.5.2) con los partidores FM13-RM13 para las cepas D9, CS-505, CS-506, CS-507, CS-509, CS-510 y CS-511 de *C. raciborskii*.

### 3.5 Análisis de los transformantes.

#### 3.5.1 Extracción del ADN plasmidial.

Se crecieron 10 clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  de cada librería del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS de la cepa CS-508 de *C. raciborskii* y ACMB13 de *A. circinalis* en 2 ml de LB suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/ml toda la noche a 37°C con agitación. La extracción del ADN plasmidial se realizó según el protocolo descrito por Birnboim y Doly (1979). 5  $\mu$ l del ADN plasmidial extraído se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TBE 1X a un voltaje de 100 V por 1 h 40 min, utilizando como marcador 500  $\mu$ g del ADN del fago  $\lambda$  digerido con *Hind* III. 1  $\mu$ l del ADN plasmidial de 1 clon representativo de la región que contiene el gen de rARN 16S asociado a su espaciador largo (Banda Superior, BS), y 1 clon representativo de la región que contiene el gen de rARN 16S asociado a su espaciador corto (Banda Inferior, BI) de cada cepa, se amplificó con los partidores FM13-RM13 y se purificó según el protocolo descrito en la sección 3.4.1 para su posterior secuenciación.

#### 3.5.2 Amplificación por PCR directamente desde una colonia.

Una colonia de 1 clon de interés se resuspendió en 100  $\mu$ l de agua Milli Q estéril, se hirvió 10 min, se enfrió en hielo y centrifugó para eliminar los restos de células. 1  $\mu$ l del sobrenadante se amplificó con los partidores FM13-RM13 (tabla 3) utilizando las mismas concentraciones de reactivos que para la amplificación del gen de rARN 16S asociado a su ITS, pero con un programa más estricto para disminuir la cantidad de

productos no específicos en la reacción de PCR. El programa es el siguiente: Desnaturación inicial a 95°C por 5 min, 30 ciclos de (95°C por 1 min, 59°C por 1 min y 72°C por 1 min), con una extensión final a 72°C por 10 min.

Los productos de PCR se visualizaron utilizando tinción con plata en electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% (p/v), en tampón TBE 1X, a 170 V por 90 min. Para la secuenciación de los fragmentos de interés, se amplificó en triplicado un clon representante de una BS y un clon representante de una BI del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS de cada cepa de *C. raciborskii* y ACMB13 de *A. circinalis*. Los productos de PCR se purificaron con kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega, según lo descrito en la sección 3.4.1 para su posterior secuenciación.

### 3.6 Análisis de las secuencias del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS.

#### 3.6.1 Secuenciación.

Las reacciones de secuenciación fueron llevadas a cabo en la empresa MacroGen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) utilizando un secuenciador ABI3730XL (Applied Biosystems) Big Dye terminador v3.1 POP7 polymer y en la Pontificia Universidad Católica de Chile utilizando un secuenciador ABI3100 (Applied Biosystems). Los partidores utilizados para la secuenciación correspondieron tanto a los partidores utilizados en las reacciones de amplificación como partidores internos del gen de rARN 16S y espaciador ITS (tabla 3).

### 3.6.2 Alineamientos.

Todos los alineamientos se realizaron utilizando la herramienta Clustal W del programa Bioedit sequence alignment y el programa Vector NTI®. El operón ribosomal *rrsH* de *E. coli* cepa K-12 se utilizó como marcador de la posición 1 del gen de rARN 16S.

### 3.7 Análisis filogenéticos

En todos los análisis se excluyeron las secuencias de los partidores y se utilizaron fragmentos de tamaño equivalente, eliminando las regiones ambiguas observadas en los alineamientos. Los análisis filogenéticos se realizaron con los programas MEGA 3.1 y PAUP 4.0b utilizando los algoritmos de máxima parsimonia y Neighbor-joining (NJ); en este último se aplicó la distancia p. Para evaluar la estabilidad de las agrupaciones se realizaron “bootstrap” de 1000 réplicas.

#### 3.7.1 Análisis filogenéticos del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS.

Los fragmentos de entre 1656 pb y 1840 pb correspondientes al gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS corto y largo respectivamente se analizaron por separado, dependiendo del tamaño del espaciador asociado. La secuencia de *A. circinalis* ACMB13 fue utilizada como grupo externo.

#### 3.7.2 Análisis filogenéticos de los espaciadores ITS largos (ITS L)

La secuencia de los espaciadores ITS L, de 504 pb, de todas las cepas de *C. raciborskii* utilizadas en este estudio se analizó en conjunto con la secuencia de los

espaciadores ITS L de cepas de *C. raciborskii* descritas por Gugger y col., (2005) obtenidas de la base de datos NCBI. Se utilizó como grupo externo la secuencia del espaciador ITS L de las cianobacterias filamentosas, fijadoras de nitrógeno, pertenecientes al orden Nostocales, *Anabaena circinalis* ACMB13, *Aphanizomenon ovalisporum* ILC-146, *Anabaena lemmermanni*, y las cianobacterias unicelulares pertenecientes al orden Chroococcales, *Synechococcus* RCC307 y *Synechococcus* UW 140.

#### **4. Análisis del genoma completo de las cepas de *C. raciborskii*.**

##### 4.1 Preparación de los estándares de PFGE.

##### 4.1.1 Preparación de los estándares de *Vibrio parahaemolyticus* cepa KX.

La cepa KX de *V. parahaemolyticus* se obtuvo del laboratorio de Biotecnología del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile, por gentileza del Dr. Romilio Espejo. El protocolo utilizado consiste en una modificación del protocolo utilizado por Hara-Kudo y col., (2003), con algunas modificaciones. 10 ml de un cultivo procedente de una colonia crecida toda la noche en medio de cultivo LB al 1% (p/v) de NaCl, se incubó a 37°C con agitación suave (200 rpm) hasta una D.O. de 0,2 a 600 nm. Se tomó 1 ml de cultivo con D.O. de aproximadamente 0,5 o una cantidad equivalente a  $1 \cdot 10^8$  células/ml y se centrifugó a 8000 x g por 4 min. Las células centrifugadas se resuspendieron en 0,15 ml de solución tampón (10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 50 mM EDTA pH 8,0) y se les agregó 150 µl de

agarosa LMP al 1,6 % (p/v) precalentada a 45°C, se mezcló con pipeta cuidadosamente sin generar burbujas y se llenaron los moldes, que se dejaron gelificar a 4°C por 10 min. Los moldes sólidos se traspasaron a un tubo de 50 ml que contenía 1 ml por molde de solución de lisis [10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 8,0, 0,2% (p/v) desoxicolato de sodio, 0,5% (p/v) dodecil sulfato de sodio (SDS)] con 1 mg/ml de lisozima y 2 µg/ml de RNAsa agregadas al momento de usar, y se incubaron a 37°C por 3 h. Para eliminar las proteínas, los moldes se incubaron por 14 h a 55°C en 1 ml por molde de tampón ESP (0,5 M EDTA, 1% (p/v) sarkosil) con 1 mg/ml de proteinasa K (Winkler). Para eliminar los restos celulares e inhibir la acción de la proteinasa K, los moldes se incubaron toda la noche a 4°C con 1µl/ml de Para-Metil-Fenil-Sulfonilo (PMSF) 0,1 M en solución de lavado (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0) y luego se lavaron 2 veces por 1 h con solución de lavado a temperatura ambiente. Los moldes se almacenaron a 4°C en TE 1X (10 mM Tris, 1 mM EDTA) hasta el momento de uso. Se utilizó medio molde para la digestión del ADN cromosómico de *V. parahaemolyticus* cepa KX con la enzima de restricción *Not* I (Fermentas), previamente lavado durante 1 h en TE 1X a temperatura ambiente. El molde lavado se equilibró en 200 µl del tampón 1X de la enzima de restricción recomendado por el fabricante por 1 h a temperatura ambiente y la digestión se realizó en 100 µl de tampón 1X fresco de la enzima de restricción con 25 U de *Not* I, por 16 h a 37°C. El molde que contenía ADN cromosómico de *V. parahaemolyticus* cepa KX digerido con *Not* I se utilizó inmediatamente luego de la digestión.

#### 4.1.2 Preparación de los estándares de *Saccharomyces cerevisiae* YNN 295.

*Saccharomyces cerevisiae* YNN 295 fue facilitada gentilmente por el Dr. Víctor Cifuentes, director del laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Para preparar los moldes de agarosa se siguió el protocolo descrito por Schwartz y Cantor (1984), con modificaciones. El protocolo se describe a continuación: 10 ml de la cepa, se cultivaron en medio YPD (Extracto de Levadura 1% (p/v), Peptona 2% (p/v), Glucosa 2% (p/v)), incubando a 30°C con agitación durante 24 h. Para coleccionar las células, los 10 ml se centrifugaron a 7000 rpm por 10 min y las células recuperadas se resuspendieron en 5 ml de EDTA 50 mM pH 8,0. Esta suspensión se centrifugó a 7000 rpm por 10 min y las células obtenidas se resuspendieron en EDTA 50 mM pH 8,0 hasta completar un volumen de 500 µl, luego, a estos 500 µl se le agregaron 2,5 µl de zimoliasa de un stock 2 mg/ml y se mezclaron con 1,5 ml de agarosa LMP al 1% (p/v) en EDTA 125 mM precalentada a 42°C. La mezcla fue rápidamente llevada a moldes, los que se dejaron gelificar a 4°C por 10 min. Una vez listos los moldes, estos se sumergieron en 3 ml de LET (EDTA 0,5 M pH 8,0, Tris 12,4 mM, β-mercaptoetanol 75 ml/l) con 0,4 mg/ml de zimoliasa e incubaron durante 16 h a 37°C. Se retiró el sobrenadante y para inactivar las enzimas que pudiesen degradar al ADN, se agregaron 5 ml de EDTA 50 mM pH 8,0 agitando suavemente. Este paso se repitió una vez más. Luego se eliminó el EDTA y los moldes se incubaron a 50°C por 24 h en 3 ml de tampón NDS (EDTA 0,5 M pH 8,0, Tris 12,4 mM, N-butilsarcosina 1% (p/v)) con 0,5 mg/ml de proteinasa K. A continuación, se realizaron una serie de lavados para eliminar los restos de proteína que quedaron en el bloque: se eliminó la solución de NDS y se lavó dos veces con 5 ml de TE 1X (EDTA 1mM, Tris 10 mM), precalentado a

50°C, incubando a 50°C por 30 min cada vez; luego se agregaron 5 ml de TE 1X precalentado a 50°C, no se incubó, a continuación se incubó dos veces con 5 ml de TE 1X a temperatura ambiente por 30 min cada vez; luego se agregó 5 ml de TE 1X a temperatura ambiente, sin incubar. Finalmente, los moldes se guardaron en 3 ml de EDTA 50 mM a 4°C hasta el momento de usar.

#### 4.2 Obtención del ADN cromosómico de las cepas de *C. raciborskii* embebido en moldes de agarosa.

##### 4.2.1 Estimación del crecimiento mediante cuantificación de clorofila *a*.

Para determinar el crecimiento de las cepas de *C. raciborskii* en el momento de realizar los moldes de agarosa, se realizó cuantificación en base a la determinación espectrofotométrica de clorofila *a*. El protocolo de extracción de clorofila *a* utilizado corresponde al descrito por Yentsch y Menzel (1963), con algunas modificaciones. De cada matraz, se tomó 1 ml de cultivo (resuspendiendo las células en el matraz antes de tomar cada muestra, para lograr homogeneidad) el cual se centrifugó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml a 14000 rpm por 15 min. Se reemplazó 900 µl de sobrenadante por 900 µl de acetona 100% logrando una concentración final de acetona al 90%. Los tubos se incubaron por 19 h a 4°C. Luego se centrifugaron a 14000 rpm por 15 min. La clorofila *a* presente en el sobrenadante se cuantificó en un espectrofotómetro BioMate3 UV-visible (Thermo Electron Corporation), haciendo un barrido desde 600 a 800 nm. Todos los experimentos para cuantificar la clorofila *a* se realizaron en triplicado.



#### 4.2.2 Obtención del ADN cromosómico embebido en moldes de agarosa.

El protocolo utilizado fue derivado de los protocolos descritos por Hess y col. (1999), para *Prochlorococcus* y Alduina y col. (2002), para *Streptomyces*, a los que se les hicieron modificaciones. 100 ml de cultivo de *C. raciborskii* en fase exponencial de crecimiento (8-15 días dependiendo de la cepa) se lavaron como se describió en la sección 3.1, para eliminar las bacterias acompañantes. Las células concentradas en el filtro se resuspendieron en 1 ml de EDTA 50 mM pH 8,0 y se centrifugaron por 20 s a 14000 rpm, se eliminó el sobrenadante, las células centrifugadas se resuspendieron en 500 µl de EDTA 50 mM pH 8,0 y se mezclaron por vortex suave con 500 µl de agarosa LMP al 1,5 % (p/v) precalentada a 42°C, rápidamente se formaron los moldes y se dejaron gelificar a 4°C por 10 min. Los moldes sólidos se incubaron en 5 ml de tampón ESP con 1 mg/ml de proteinasa K a 55°C por 24 h, y otras 48 h con 0,5 mg/ml de proteinasa K, cambiando por tampón fresco a las 24 h. Para inhibir la acción de la proteinasa K, los moldes se incubaron con 1 µl/ml de PMSF 0,1 M en tampón TE25Suc (25 mM EDTA; 25 mM Tris pH 8,0; 0,3 M Sacarosa) a 4°C y luego se lavaron 3 veces durante 1 h con TE25Suc a 4°C. Los moldes se almacenaron a 4°C en EDTA 50 mM pH 8,0 hasta el momento de uso, hasta un máximo de 4 meses.

#### 4.2.3 Obtención del ADN cromosómico digerido de las cepas de *C. raciborskii*.

Para eliminar los restos celulares, los moldes se lavaron tres veces, en lavados de 1 h en TE 1X a temperatura ambiente, y luego se incubaron por 1 h con 200 µl del tampón correspondiente a la enzima de restricción utilizada (recomendado por el

fabricante); la digestión se realizó en un volumen final de 250 µl con las enzimas indicadas en la tabla N° 4. En este paso se probaron 16 enzimas de restricción.

**Tabla 4.** Detalle de las enzimas de restricción y condiciones utilizadas para digerir el ADN cromosómico de las cepas de *C. raciborskii*.

Enzima de Restricción	Secuencia de Reconocimiento y Sitio de Corte	Unidades utilizadas por cada ½ molde de agarosa (U)	Temperatura de incubación (°C)	Fabricante
<i>Not</i> I*	5' GC GGCCGC 3'	40	37	Fermentas
<i>Sgs</i> I *	5' GG CGCGCC 3'	10	37	Fermentas
<i>Pac</i> I*	5' TTAAT TAA 3'	10	37	New England Biolabs
<i>Mlu</i> I	5' A CGCGT 3'	15	37	Fermentas
<i>Xho</i> I	5' C TCGAG 3'	20	37	Fermentas
<i>Apa</i> I	5' G GGCCC 3'	10	37	Fermentas
<i>Bgl</i> II	5' A GATCT 3'	10	37	Roche
<i>Pvu</i> I	5' CGAT CG 3'	10	37	New England Biolabs
<i>Stu</i> I	5' AGG CCT 3'	10	37	New England Biolabs
<i>Rsa</i> I	5' GT AC 3'	10	37	New England Biolabs
<i>Hpa</i> I	5' GTT AAC 3'	10	37	New England Biolabs
<i>Kpn</i> I	5' GGTAC C 3'	10	37	New England Biolabs
<i>Sac</i> I	5' GAGCT C 3'	10	25	New England Biolabs
<i>Sma</i> I	5' CCC GGG 3'	10	30	Fermentas
<i>Bam</i> HI	5' G GATCC 3'	10	37	Fermentas
<i>ICeu</i> I	5' AACTATAACGGTCCTAA GGTAGCGA 3'	10	37	New England Biolabs

\* Enzimas de restricción de corte poco frecuente

#### 4.3 Condiciones de corrida de la PFGE del ADN genómico y digerido.

La PFGE fue llevada a cabo en un sistema CHEF DRII (Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis) (Fig. 5), que es capaz de resolver fragmentos de ADN sobre 7000 kb. Este sistema consta de 24 electrodos equidistantes orientados alrededor de un hexágono y conectados a la fuente de poder a través de resistencias de igual valor, lo que divide el voltaje de forma uniforme en cada uno de ellos, creando campos eléctricos uniformes. El ángulo de reorientación de los campos es de 120°.

Debido a que se utilizaron enzimas de restricción de corte frecuente (*Mlu* I, *Xho* I, *Apa* I, *Bgl* II, *Pvu* I, *Stu* I, *Rsa* I, *Hpa* I, *Kpn* I, *Sac* I, *Sma* I y *Bam* HI) y poco frecuente (*Not* I, *Sgs* I, *Pac* I y *ICeu* I), se experimentaron 4 condiciones de corrida

electroforética (tabla 5), orientadas a separar bandas de mayor o de menor peso molecular. Para la separación del ADN cromosómico de *C. raciborskii* y de los fragmentos de restricción obtenidos en la digestión con las enzimas *Not* I y *Sgs* I se utilizó el protocolo de corrida 1. Para la separación los fragmentos de restricción obtenidos en la digestión con las enzimas *Apa* I, *Kpn* I, *Sac* I, *Sma* I, *Bam* HI, *Stu* I, *Rsa* I, *Pvu* I, *Hpa* I y *Mlu* I se utilizó el protocolo de corrida 2, para la electroforesis de la digestión con las enzimas *Pac* I, *Bgl* II y *ICeu* I se utilizó el protocolo de corrida 3 y para la electroforesis de la digestión con *Xho* I se utilizó el protocolo de corrida 4. Para todos los protocolos de corrida se mantuvo constante: el voltaje a 6 V/cm, la temperatura a 14°C y el tampón TBE 0,5 X suplementado con Tiourea 50 µM. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) por 30 min en un transiluminador UV.

**Tabla 5.** Condiciones de corrida electroforética para PFGE de ADN cromosómico digerido y sin digerir.

Protocolo	Pulso (s)	Tiempo de corrida (h)	Concentración Agarosa (%)
1	50-90	24	0,9
2	1-18/3-80	10/10	1,2
3	1-18/3-80	6/12	1,2
4	0.1-25	21	1,2

#### 4.5 Cálculo del tamaño genómico de las cepas de *C. raciborskii*.

Para la determinación del tamaño genómico de las cepas de *C. raciborskii* se utilizaron como estándar los fragmentos de digestión con *Not* I de la cepa KX secuenciada de *V. parahaemolyticus*. Se generó una curva de calibración asumiendo una migración logarítmica de los fragmentos utilizados como estándar (Anexo F).

Cada fragmento de restricción de las cepas de *C. raciborskii*, obtenido en el gel de PFGE proveniente de la digestión con *Xho* I y con *Mlu* I se enumeró según su migración en el gel y de forma independiente de la cepa de procedencia. Se calculó la migración de cada fragmento enumerado.

#### 4.6 Análisis filogenéticos entre las cepas de *C. raciborskii* basados en PFGE de digestión.

Se obtuvo una matriz de distancia basada en la presencia o ausencia de bandas de cada gel de PFGE, se encontraron 59 bandas características en el gel de PFGE de ADN cromosómico digerido con *Mlu* I y 58 bandas para la PFGE de ADN cromosómico digerido con *Xho* I.

El análisis filogenético se realizó con el programa PAUP 4.0b utilizando los algoritmos de máxima parsimonia y Neighbor-joining (NJ). Para evaluar la estabilidad de las agrupaciones se realizaron "bootstrap" de 1000 réplicas.

## RESULTADOS

### 1. Análisis del operón ribosomal de cepas de *C. raciborskii* y *A. circinalis*.

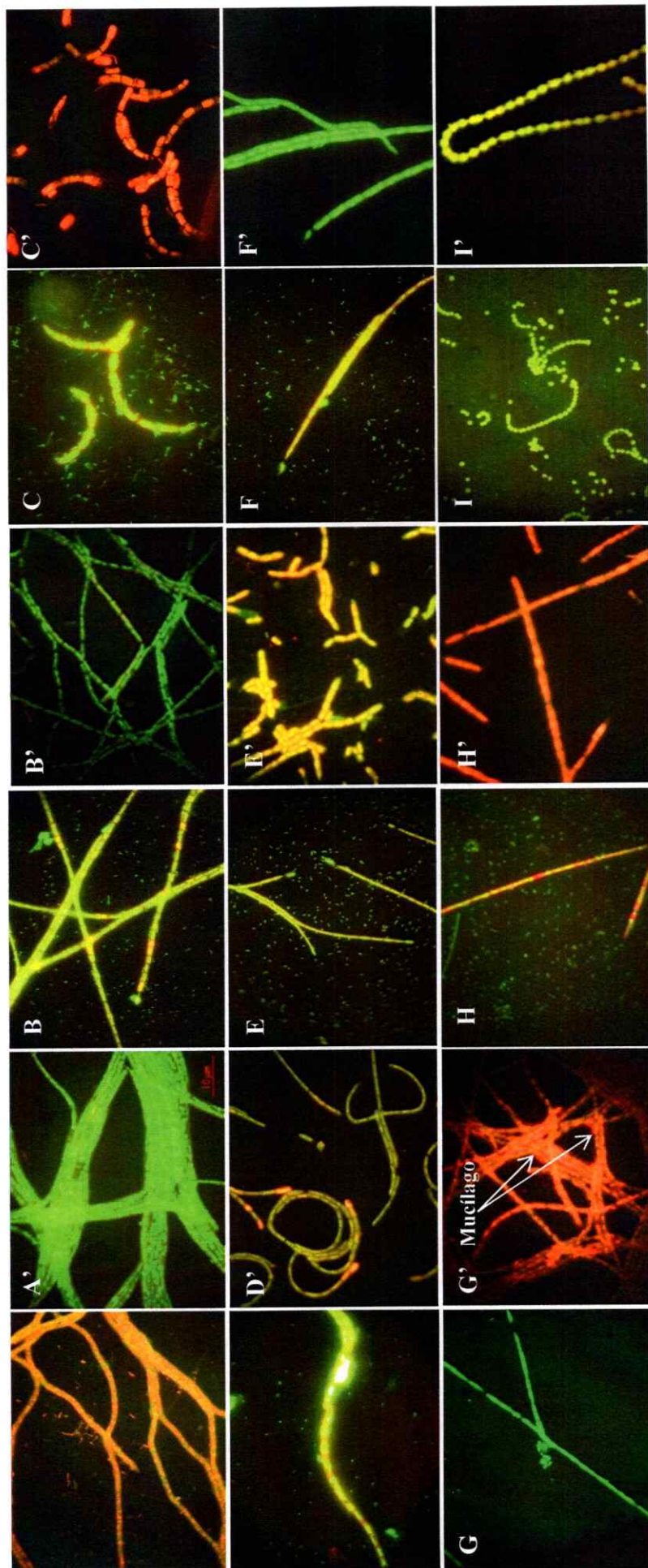
#### 1.1 Eliminación de las bacterias acompañantes.

Previo a los análisis genómicos se realizó un protocolo de lavado para disminuir la carga de las bacterias acompañantes en los cultivos de *C. raciborskii* y *A. circinalis*. En un cultivo de *C. raciborskii* de 8 a 15 días de crecimiento, el número de bacterias acompañantes alcanza aproximadamente a  $3 \cdot 10^6$  bacterias/ml. Mediante el protocolo descrito en materiales y métodos, el número de bacterias heterótrofas acompañantes disminuyó aproximadamente a  $4 \cdot 10^2$  bacterias/ml (Fig. 7).

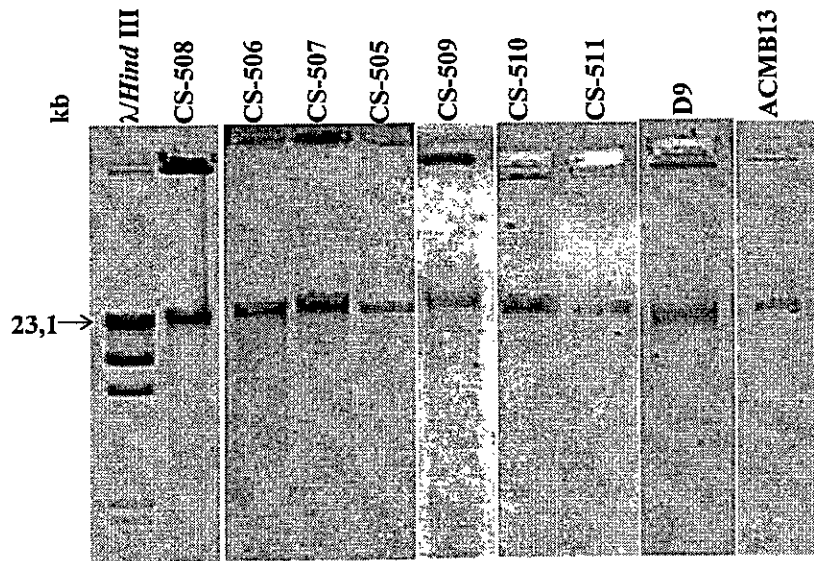
La determinación del número de bacterias contaminantes en este concentrado, se realizó mediante microscopía de epifluorescencia.

#### 1.2 Extracción del ADN genómico de las cepas de *C. raciborskii* y ACMB13 de *A. circinalis*.

Mediante el protocolo del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) se obtuvo ADN de un tamaño aproximado de 23 kb o superior y con un bajo nivel de degradación para todas las cepas de *C. raciborskii* y *A. circinalis* (Fig. 8)



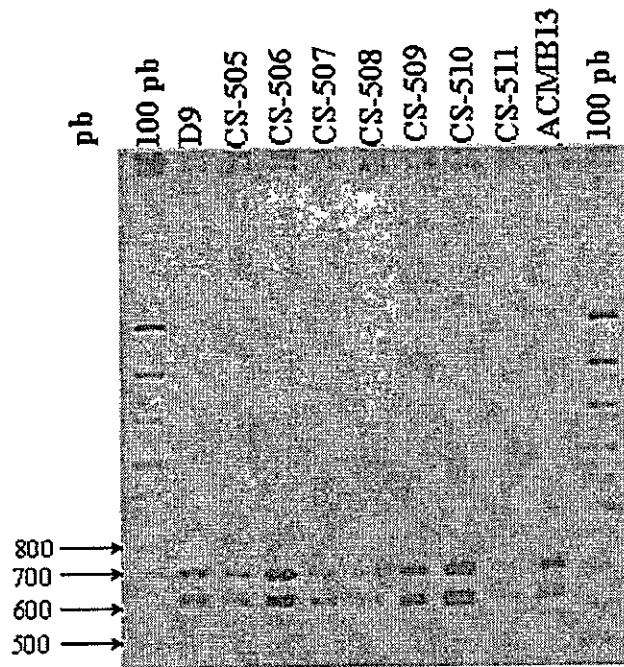
**Figura 7.** Microscopía de epifluorescencia de las cepas de *C. raciborskii* y ACMB13 de *A. circinalis* antes y después del protocolo de lavado para la eliminación de las bacterias acompañantes. A, B, C, D, E, F, G, H e I corresponden respectivamente a las cepas: D9, CS-505, CS-506, CS-507, CS-508, CS-509, CS-510, CS-511 de *C. raciborskii* y ACMB13 antes del protocolo de lavado. A', B', C', D', E', F', G', H' e I' corresponden respectivamente a las mismas cepas después del protocolo de lavado.



**Figura 8.** Análisis de la extracción del ADN genómico de las cepas C-508, CS-506, CS-507, CS-505, CS-509, CS-510, CS-511 y D9 de *C. raciborskii*, y ACMB13 de *A. circinalis* mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Las electroforesis se realizaron a 80V por 80 min. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular de ADN de  $\lambda$  /Hind III de Fermentas®.

### 1.3 Análisis de restricción del gen de rARN 16S (ARDRA).

La presencia de polimorfismos en el gen de rARN 16S de todas las cepas de *C. raciborskii* y *A. circinalis* se evaluó mediante análisis de restricción ARDRA utilizando la enzima de restricción *Eco* RI. Estudios previos demuestran que el análisis ARDRA es útil para discriminar entre cepas. Sin embargo, en el caso de *C. raciborskii*, las cepas analizadas no presentaron diferencias en el patrón de digestión. Tampoco se observó un patrón disímil en la cepa ACMB13 de *A. circinalis*. El análisis ARDRA del gen de rARN 16S produjo dos fragmentos, de 600 y 700 pb aproximadamente (Fig. 9). Este patrón concuerda con el descrito en estudios previos realizados en el laboratorio para el cultivo clonal C10 de *C. raciborskii* (proveniente de la cepa SPC 338, la misma cepa de origen que *C. raciborskii* D9).



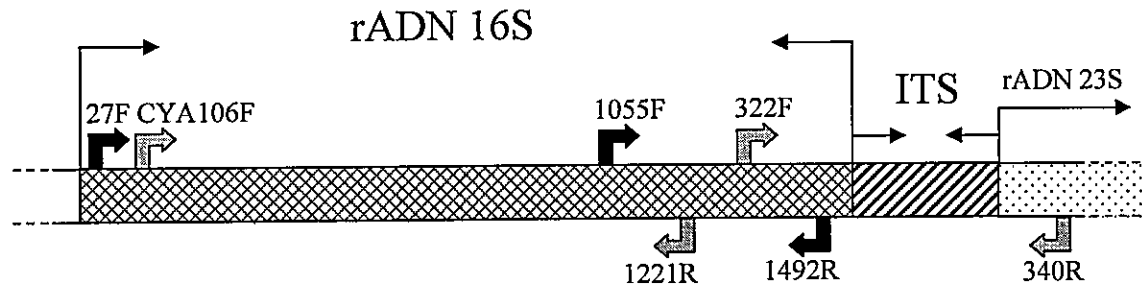
**Figura 9.** Análisis ARDRA de las cepas D9, CS-505, CS-506, CS-507, CS-508, CS-509, CS-510 y CS-511 de *C. raciborskii* y ACMB13 de *A. circinalis* mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. La electroforesis se realizó a 90V por 90 min. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb plus de Fermentas®.

#### 1.4 Amplificación de la región espaciadora (ITS) entre los genes de rARN 16S y 23S.

La amplificación con los partidores 322F-340R (tabla 3) específicos para cianobacterias produce fragmentos del largo del espaciador ITS más un total de 200 pb (150 pb desde el extremo 3' del gen de rARN 16S y 50 pb desde el extremo 5' del gen 23S rARN) (Fig. 10).



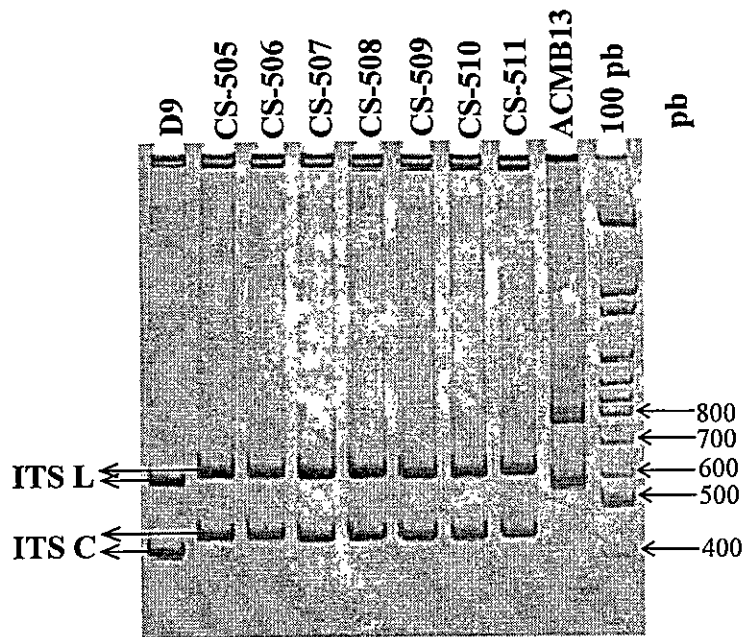
Se observaron dos productos de PCR en las cepas de *C. raciborskii* y tres en *A. circinalis* (Fig. 11), lo que indica la presencia de al menos 2 operones ribosomales en el



caso de *C. raciborskii* y 3 operones ribosomales en el caso de *A. circinalis*, y concuerda con lo descrito para cianobacterias filamentosas fijadoras de nitrógeno (Iteman y col., 2000).

**Figura 10.** Esquema representativo de parte de un operón ribosomal de cianobacteria, donde se muestra el gen de rARN 16S y la región espaciadora ITS, con los partidores utilizados en esta tesis. Las flechas grises indican los partidores específicos para cianobacterias y las flechas negras los partidores para eubacterias. Información acerca de las secuencias y la posición de estos partidores se encuentra disponible en la tabla 3.

La amplificación del ADN de las cepas CS-505, CS-506, CS-507, CS-508, CS-509, CS-510 y CS-511 de *C. raciborskii* produjo fragmentos del mismo tamaño, de 430 y 630 pb aproximadamente, exponiendo una diferencia en tamaño con los productos de PCR de la cepa D9 de *C. raciborskii*, de 400 y 600 pb. Los espaciadores de las cepas de *C. raciborskii*, de 400 y 430 pb se designaron como espaciadores ITS cortos (ITS C) (Fig. 11). De la misma manera, los espaciadores de 600 y 630 pb se designaron como ITS largos (ITS L) (Fig. 11). ACMB13 mostró tres productos de PCR bien definidos de 600, 780 y 800 pb aproximadamente, de tamaño considerablemente diferentes a las cepas de *C. raciborskii* (Fig. 11).

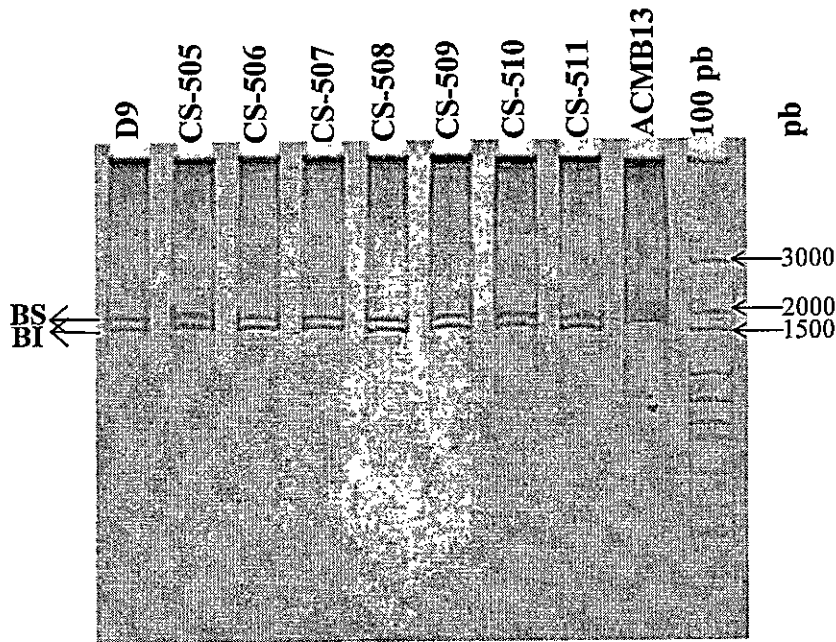


**Figura 11.** Análisis de los productos de PCR de la amplificación con los partidores 322F y 340R de las cepas D9, CS-505, CS-506, CS-507, CS-508, CS-509, CS-510 y CS-511 de *C. raciborskii* y ACMB13 de *A. circinalis* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. La electroforesis se realizó a 150V por 60 min y los productos de PCR se visualizaron por tinción con nitrato de plata. Se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb plus de Fermentas®. ITS L: espaciador ITS largo. ITS C: espaciador ITS corto.

### 1.5 Bibliotecas del gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS de cepas de *C. raciborskii* y ACMB13 de *A. circinalis*.

Al amplificar el gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS con los partidores 27F-340R (tabla 3, Fig. 10), se observaron dos productos de PCR correspondientes a la suma del peso molecular del gen de rARN 16S más el espaciador ITS L o ITS C en todas las cepas de *C. raciborskii*. Estos fragmentos se designaron como banda superior (BS) y banda inferior (BI) respectivamente (Fig. 12). De acuerdo a los tres espaciadores observados en *A. circinalis* ACMB13, se esperó encontrar tres fragmentos al amplificar con los partidores 27F-340R, sin embargo, la resolución de la técnica no permitió observarlos (Fig. 12).

Los productos de PCR se purificaron y clonaron en *E. coli* DH5 $\alpha$  para realizar bibliotecas de todas las cepas de *C. raciborskii* y de *A. circinalis* ACMB13.

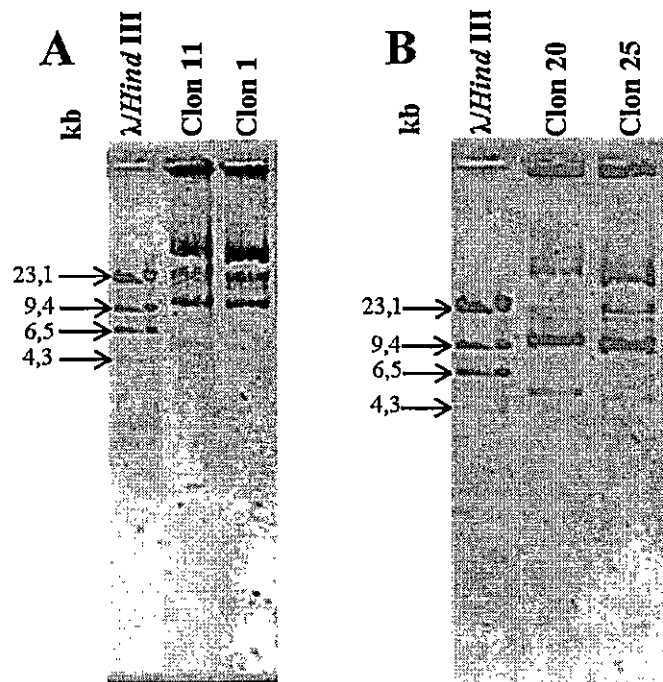


**Figura 12.** Análisis de los productos de PCR de la amplificación con los partidores 27F y 340R de las cepas D9, CS-505, CS-506, CS-507, CS-508, CS-509, CS-510, CS-511 de *C. raciborskii* y ACMB13 de *A. circinalis* mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. La electroforesis se realizó a 150V por 60 min. Los productos de PCR se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata. Se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb plus de Fermentas®. BS: gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS L. BI: gen de rARN 16S asociado a su espaciador ITS C.

Se analizaron 10 clones correspondientes a cada cepa y se escogió un clon que poseyera el inserto del gen de rARN 16S asociado al espaciador ITS L (BS) y un clon que poseyera el inserto del gen de rARN 16S asociado al espaciador ITS C (BI) para su posterior secuenciación.

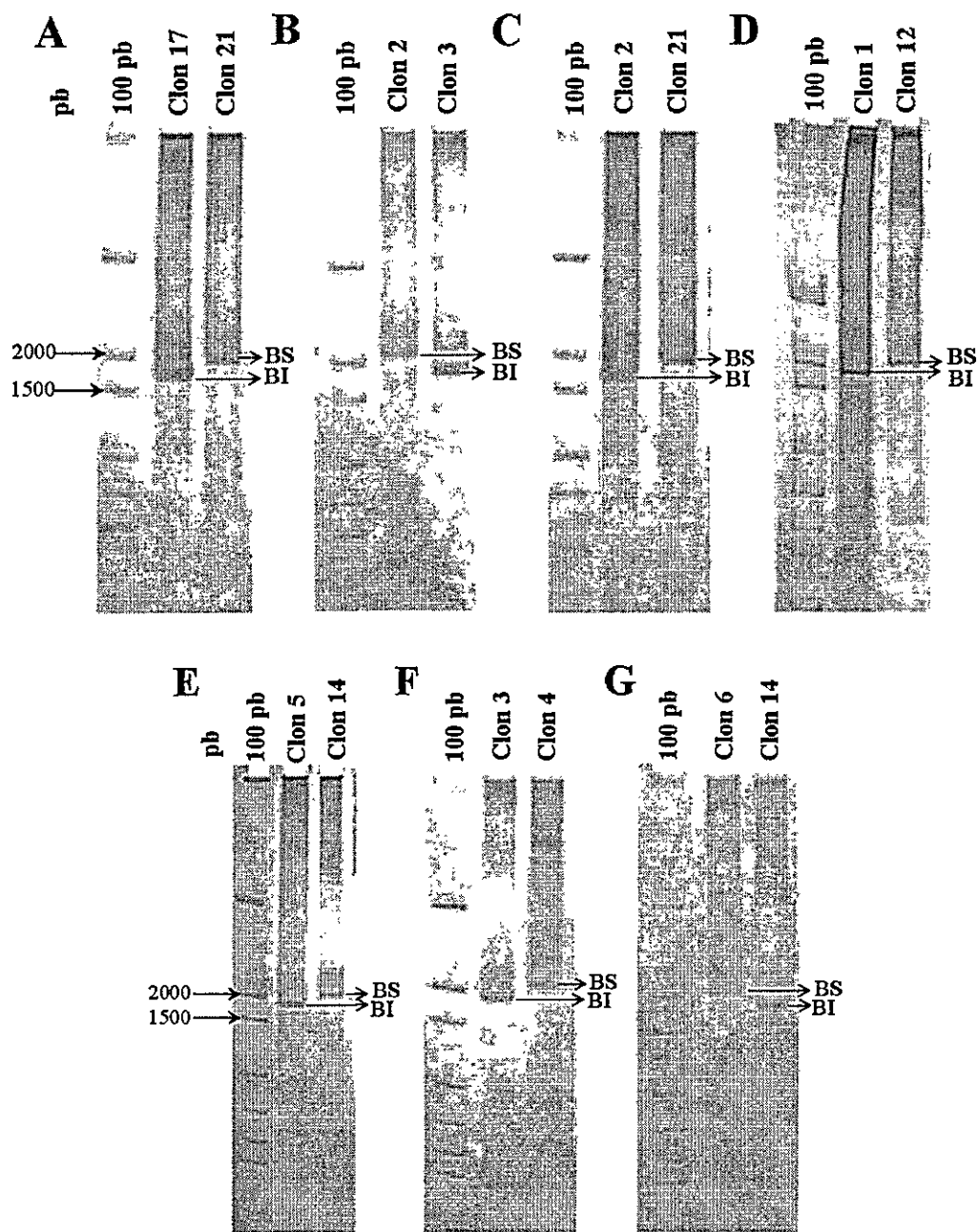
Los clones de las cepas CS-508 de *C. raciborskii* y ACMB13 de *A. circinalis* se analizaron mediante extracción de ADN plasmidial. En ambas extracciones se obtuvo dos bandas de aproximadamente 4,9 kb (clon 1 Fig. 13A y clon 25 Fig. 13B) y de 5,1 kb

(clon 11 Fig. 13A y clon 20 Fig. 13B) correspondientes a la suma del peso molecular del plasmidio (3 kb) más la banda superior (BS) o la banda inferior (BI) respectivamente. Las bandas de tamaño superior corresponden a sobrenrrollamiento del ADN plasmidial (Fig. 13).



**Figura 13.** Análisis de la extracción del ADN plasmidial de los clones seleccionados que poseen ya sea el inserto con el gen de rARN 16S asociado al espaciador ITS L (clones 11 y 20) o al espaciador ITS C (clones 1 y 25) mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Clones de las cepas **A:** ACMB13 y **B:** CS-508. Las electroforesis se realizaron a 100 V por 100 min. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Se utilizó el ADN de  $\lambda$ Hind III como marcador de peso molecular.

Los clones de las cepas de *C. raciborskii* D9, CS-505, CS-506, CS-507, CS-509, CS-510, CS-510 y CS-511 se analizaron mediante amplificación directa desde una colonia con los partidores FM13 y RM13. Se obtuvo una sola banda correspondiente a la BS y una sola banda correspondiente a la BI en todos los clones de las cepas de *C. raciborskii* (Fig. 14).



**Figura 14.** Análisis de la amplificación por PCR directo desde una colonia con los partidores FM13-RM13 de los clones seleccionados que poseen ya sea el inserto con el gen de rARN 16S asociado al espaciador ITS L (BS) o al espaciador ITS C (BI) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8%. Clones de la cepas **A:** CS-505, **B:** CS-506, **C:** CS-507, **D:** D9, **E:** CS-509, **F:** CS-510 y **G:** CS-511. La electroforesis se realizó a 170 V por 90 min. Los amplificados se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata. Se utilizó el marcador de peso molecular 100 pb plus de Fermentas®.

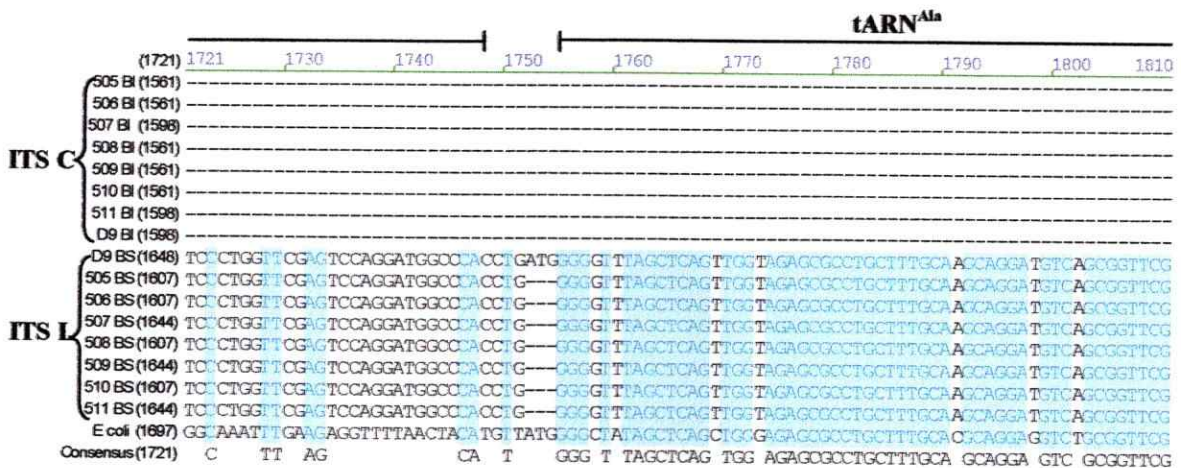
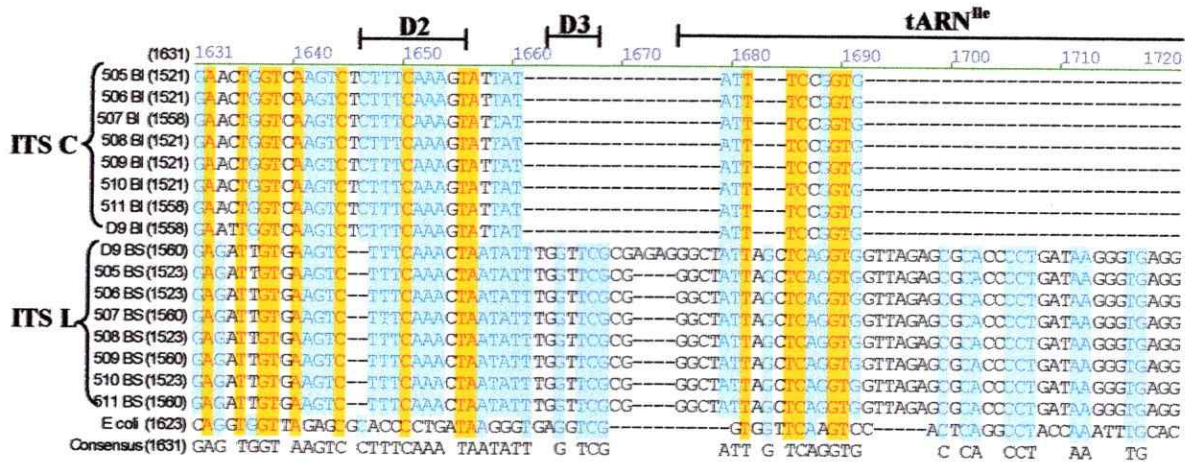
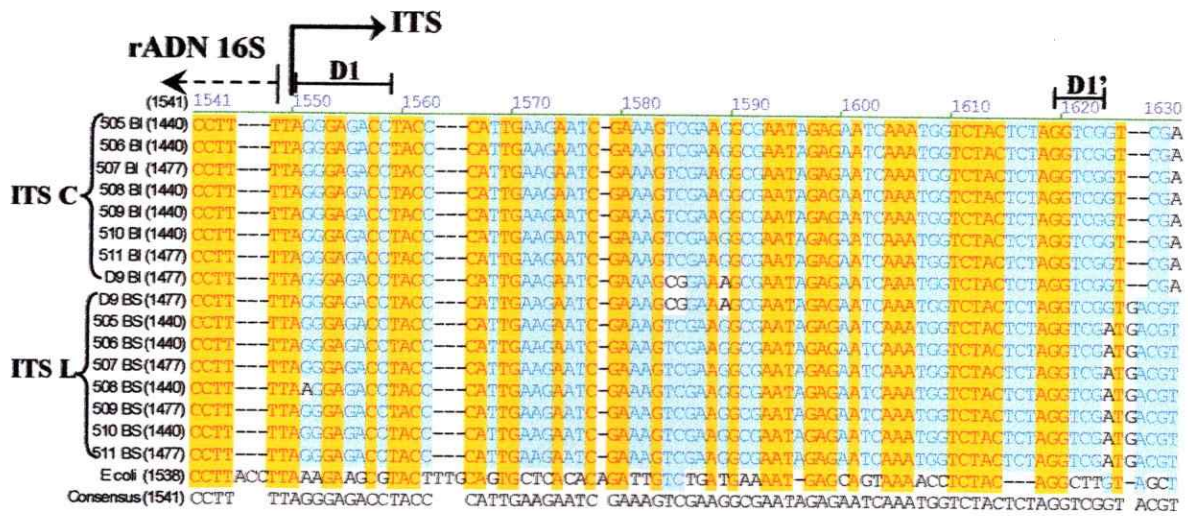
### 1.6 Análisis de secuencias.

Se secuenció el inserto correspondiente a la BS o BI de cada uno de los clones seleccionados y se realizó un alineamiento entre las secuencias obtenidas. Para indicar la posición 1 del gen de rARN 16S se utilizó la secuencia del operón ribosomal *rrsH* de *E. coli* cepa K-12

El alineamiento de las secuencias del gen de rARN 16S correspondientes a ambos operones de las cepas de *C. raciborskii* demostró, como se preveía según los antecedentes, un 99,77% de similitud (Anexos A y B).

Las principales diferencias observadas, se encontraron entre los espaciadores ITS de una misma cepa y fueron mayores a las diferencias observadas entre los espaciadores de cepas distintas (Fig. 15). El alineamiento de las secuencias de los espaciadores ITS L e ITS C entre todas las cepas de *C. raciborskii* reveló la presencia de los dominios conservados en bacterias D1, D1', D2, D3, D4, D5 y V3 y las secuencias antiterminadoras box A y box B. Estos dominios han sido descritos para un número reducido de cianobacterias (Iteman y col., 2000).

En todas las cepas el espaciador largo posee 171 pb de diferencia con el espaciador corto, correspondientes a la presencia del tARN<sup>Ile</sup>, tARN<sup>Ala</sup>, al dominio D3 y a variaciones en el dominio D2 y la región entre el dominio D1' y el dominio D2. En la región comprendida entre el tallo V3 y el dominio D5 de la cepa D9 están ausentes 20 pb en el espaciador ITS L y 27 pb en el espaciador ITS C. La región entre los dominios conservados D1' y D2 es la que presenta mayor variación entre todas las secuencias.



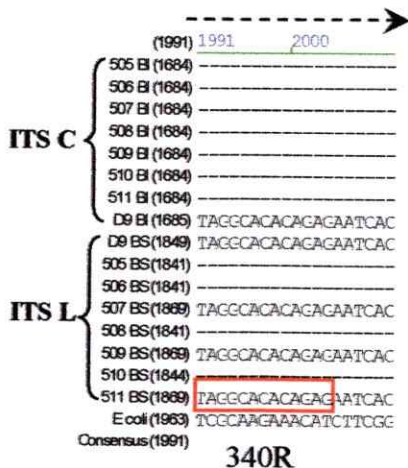
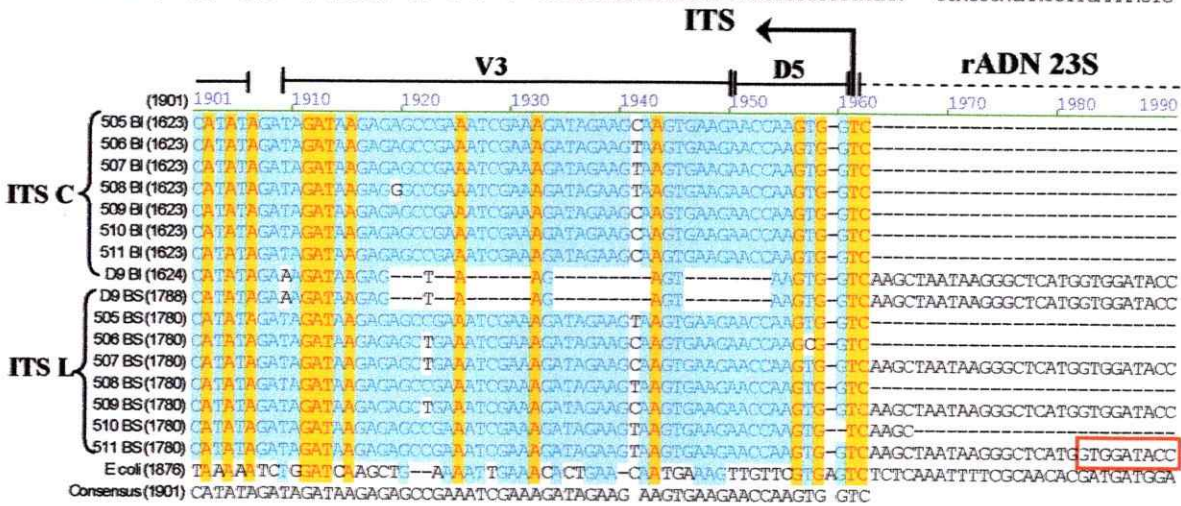
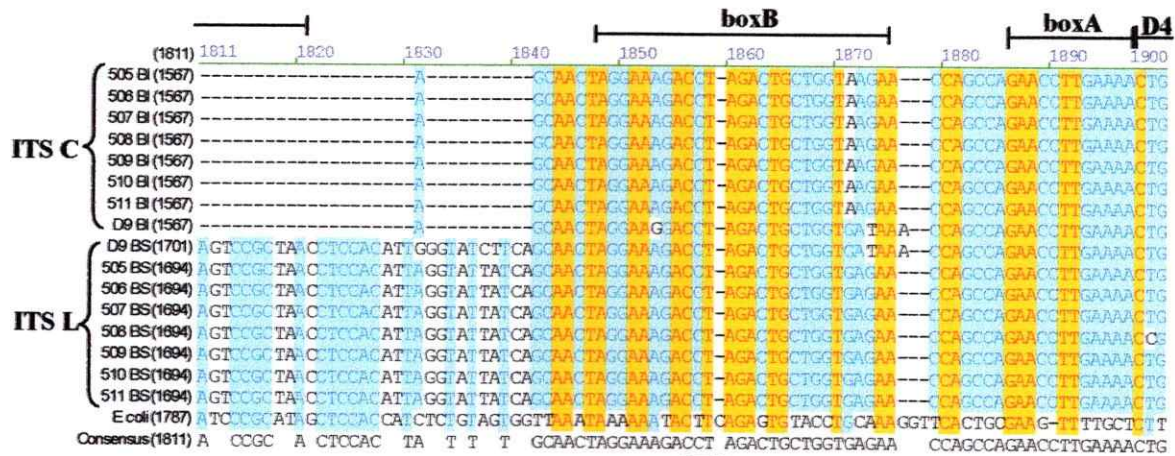
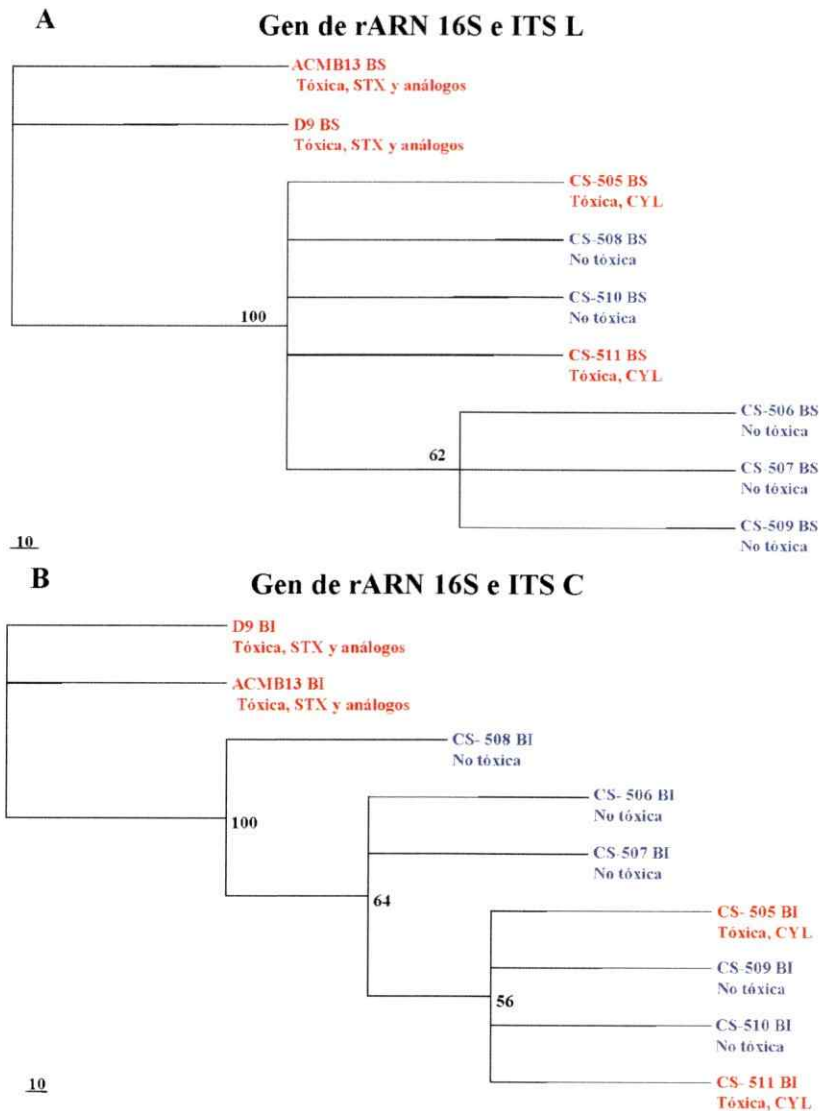


Figura 15. Alineamiento de las secuencias de los espaciadores ITS L e ITS C de las cepas de *C. raciborskii* D9, CS-505, CS-506, CS-507, CS-508, CS-509, CS-510 y CS-511 y cepa K-12 de *E. coli*. Se muestran los dominios conservados D1, D1', D2, D3, D4 y D5, el tallo V3 y los antiterminadores boxA y boxB. El partidor 340R se indica en un recuadro rojo. En amarillo se indican las secuencias idénticas y en azul las secuencias conservadas.



## 1.7 Análisis filogenéticos.

Debido a que la mayor variabilidad del operón ribosomal se encontró en las regiones espaciadoras ITS, se realizó el análisis filogenético del gen de rARN 16S y su región espaciadora asociada. Ambos árboles filogenéticos se muestran en la figura 16.



**Figura 1 6** Relaciones filogenéticas de los genes de rARN 16S e ITS L (A) o ITS C (B) construidos utilizando el algoritmo de máxima parsimonia y búsqueda heurística. **A:** Árbol consenso de los 6 árboles más parsimoniosos (Largo: 63 pasos, IC: 0,9206; IR: 0,9167). **B:** Único árbol más parsimonioso (Largo: 21 pasos, IC: 1; IR: 1). Los valores sobre los nodos corresponden a bootstrap (1000 réplicas).

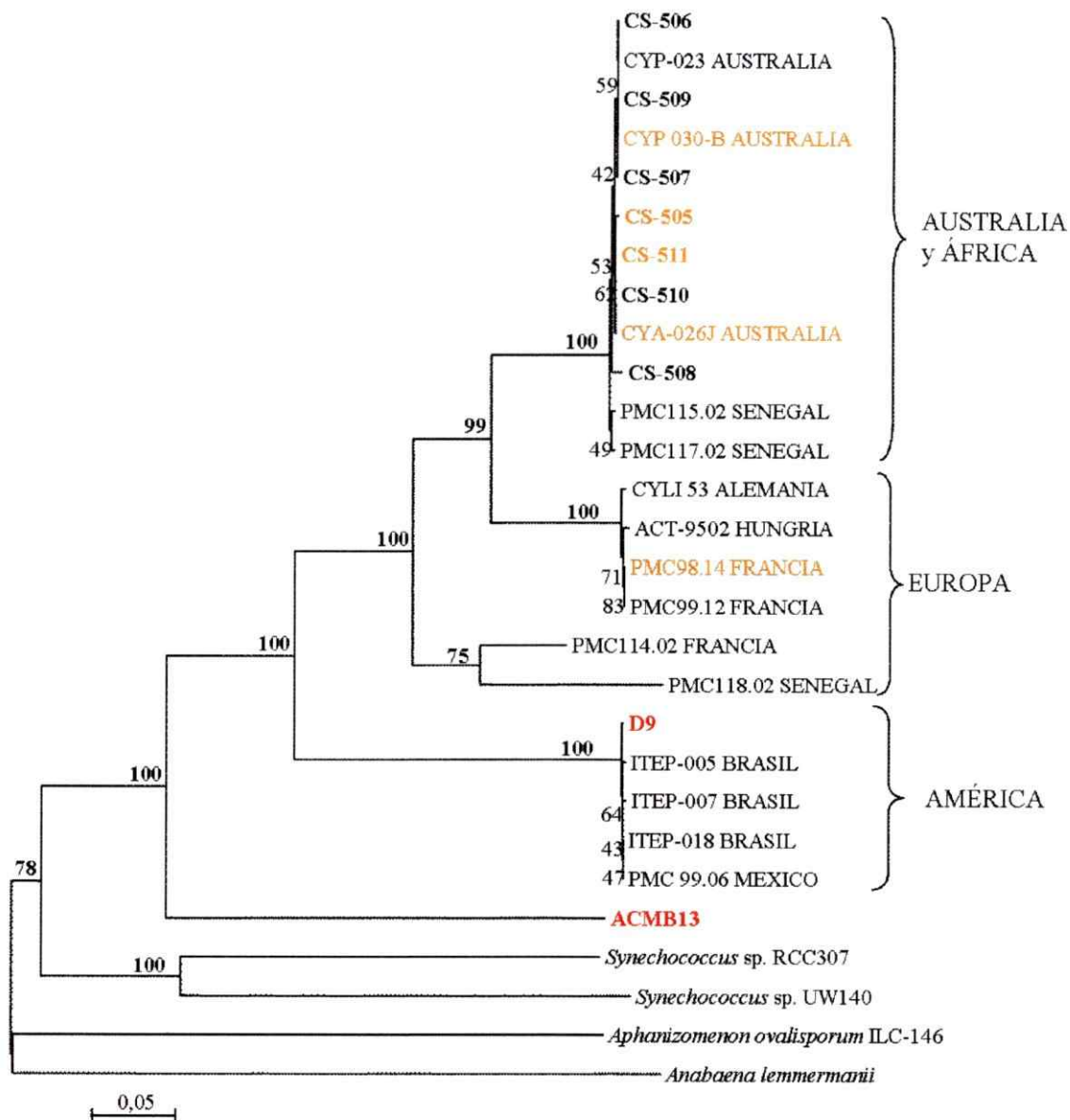
Los árboles presentados se construyeron utilizando el algoritmo de Máxima Parsimonia (MP). El análisis por separado de cada operón mostró una alta similitud entre las cepas, corroborando el resultado encontrado en los alineamientos. A pesar de la similitud encontrada, los árboles presentan una topología distinta. En el análisis del operón correspondiente al gen de rARN 16S asociado al espaciador ITS L (BS) se observaron dos ramas (Fig. 16A). En la primera se encuentran las cepas no tóxicas CS-508 y CS-510 (tabla 2), junto con las cepas productoras de CYL, CS-505 y CS-511. Las cepas no tóxicas CS-506, CS-507 y CS-509 se agrupan formando la segunda rama (“bootstrap” de 62%). En el análisis del operón correspondiente al gen de rARN 16S asociado al espaciador ITS C (BI) por el contrario, se observan tres ramas (Fig. 16B). En la primera se encuentra la cepa no tóxica, CS-508. La segunda rama agrupa a las cepas CS-506 y CS-507, ambas no tóxicas. La tercera rama agrupa a las cepas no tóxicas CS-509 y CS-510 con las cepas productoras de CYL, CS-505 y CS-511. Esta agrupación está apoyada por un valor de “bootstrap” de 56%. En ambos árboles, la cepa D9, productora de toxinas del VPM agrupa lejanamente relacionada al resto de las cepas de *C. raciborskii* y la cepa ACMB13 de *A. circinalis* se muestra como grupo externo.

La topología observada en el árbol filogenético para cada operón nos indica que el fenotipo tóxico de cepas productoras de CYL pudo haberse debido a eventos de transferencia horizontal donde existen dos posibilidades, i) solo las cepas tóxicas (CS-505 y CS-511) recibieron los genes que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de CYL o ii) todas las cepas recibieron dichos genes pero las cepas no tóxicas (CS-506, CS-507, CS-508, CS-509 y CS-510) los perdieron a través de la evolución. Si bien la topología cambia para cada operón, el bajo valor de “bootstrap” (62% para el

operón largo y 64% y 56% para el operón corto) nos hace suponer que las cepas de *C. raciborskii* australianas forman un solo clado y que la cepa D9 es la más distante evolutivamente, aunque esta distancia no se define en los árboles realizados con MP. La divergencia observada en los operones ribosomales sin embargo, no se correlaciona con el fenotipo toxigénico en *C. raciborskii*.

Por otro lado, se realizó un árbol filogenético utilizando solamente la secuencia del espaciador ITS L de todas las cepas de este estudio y de cepas de distintas toxicidades de 4 continentes como África, América, Europa y Oceanía (Australia) (Fig. 17).

En este árbol se observan agrupaciones independientes entre las cepas de *C. raciborskii* dependiendo del continente de procedencia, Australia, África, Europa y América. Las cepas CS-505, CS-506, CS-507, CS-508, CS-509 y CS-510 provenientes de Australia agrupan con las cepas productoras de CYL, CYP-026J, CYP-023 y CYP-030B procedentes de Australia y con las cepas no tóxicas PMC 115.02 y PMC117.02 procedentes de África formando un "cluster". Las cepas no tóxicas CYLI53 y ATC-9502, la cepa productora de CYL PMC98.14, y la cepa de toxicidad desconocida PMC99.12 provenientes de Europa forman un segundo "cluster" separado del "cluster" que conforman las cepas de toxicidad desconocida PMC118.02 (Senegal) y PMC114.02 (Francia). Por último, las cepas provenientes de Brasil: cepa D9, productora de STX, cepas ITEP-005, ITEP-007 e ITEP-A3 no productoras de toxinas y la cepa PMC99.06 no tóxica de México agrupan formando un último "cluster".



**Figura 17.** Reconstrucción filogenética de los espaciadores ITS L obtenidos en este estudio y descritos por Gugger y col., (2005). Se muestra un árbol de NJ, usando la distancia p. Los valores sobre los nodos corresponden a bootstrap (1000 réplicas). En naranja se destacan las cepas productoras de CYL y en rojo las cepas productoras de toxinas del VPM. Las cepas utilizadas en esta tesis se destacan en negrita.

Dentro de las agrupaciones encontradas, no fue posible observar una correlación con el fenotipo toxigénico, ya que las cepas productoras de CYL (aquellas en naranja) y la cepa D9 (en rojo) productora de toxinas del VPM, agrupan junto con cepas no tóxicas.

En este análisis se utilizaron como grupos externos las secuencias del espaciador ITS L de *A. circinalis* ACMB13 (obtenida en esta tesis), *Synechococcus* sp. RCC307, *Synechococcus* sp. UW140, *Anabaena lemmermanni* 262 y *Aphanizomenon ovalisporum* ILC-146.

## **2. Análisis de genoma completo mediante PFGE de cepas de *C. raciborskii*.**

Previo al análisis de PFGE se obtuvo filamentos con una carga reducida de bacterias acompañantes heterótrofas (Fig. 7, p.39), según el protocolo de lavado descrito en materiales y métodos.

Se cuantificó la clorofila *a* presente en los cultivos en el momento antes de realizar los moldes de agarosa, como un estimativo de la biomasa presente. La concentración de clorofila *a* varió en el rango de 1,29 mg/l y 4,24 mg/l para 100 ml de cultivos en fase exponencial y 4,75 mg/l para 200 ml de cultivo de CS-509 (tabla 6).

**Tabla 6.** Cuantificación de la clorofila *a* presente en los cultivos de *C. raciborskii* en el momento previo a la realización de los moldes de agarosa.

Cepa	Clorofila <i>a</i> (mg*l <sup>-1</sup> )
D9	2,72
CS-505	1,87
CS-506	2,08
CS-507	2,58
CS-508	2,10
CS-509	1,29
CS-509*	4,75
CS-510	2,49
CS-511	4,24

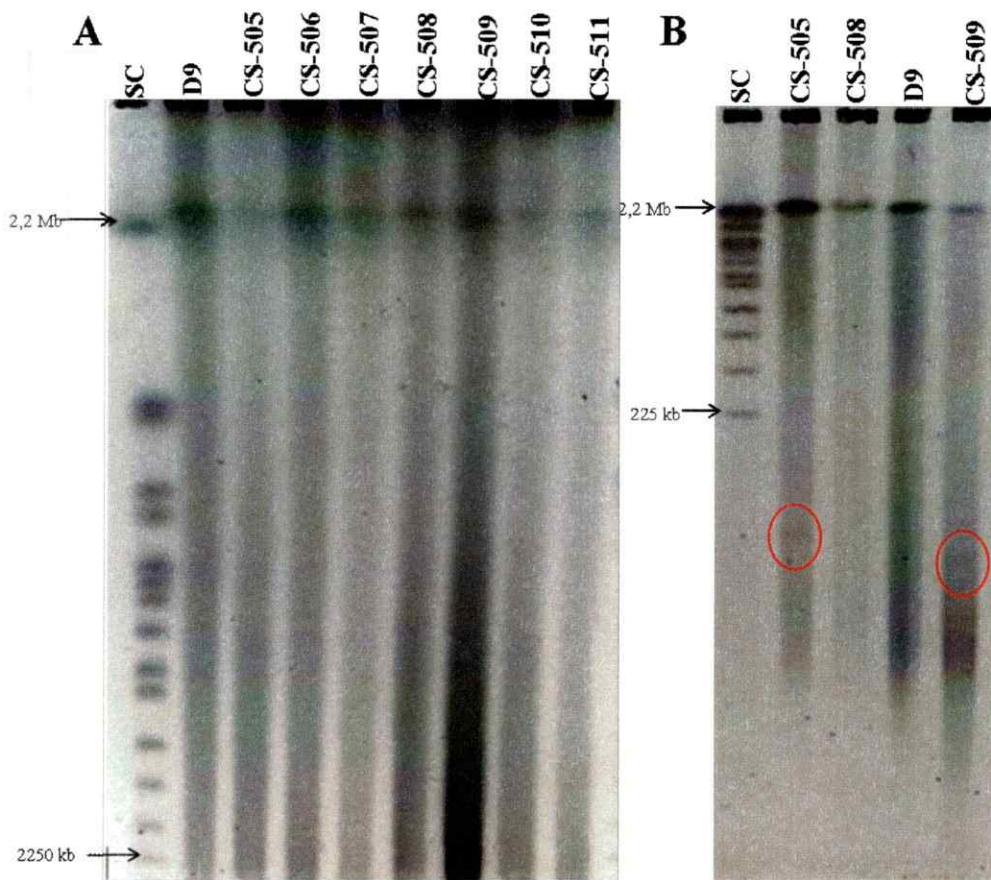
\*: clorofila *a* extraída de 200 ml de cultivo de CS-509.

### 2.1 Estimación del tamaño genómico de las cepas de *C. raciborskii*.

De acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos, se obtuvo ADN genómico intacto embebido en moldes de agarosa de todas las cepas de *C. raciborskii*. Se supuso como único ADN presente el de cianobacteria ya que el protocolo de lavado logró disminuir en gran número a las bacterias heterótrofas; además estudios anteriores realizados en el laboratorio demostraron que utilizando este protocolo de lavado, el ADN presente en los moldes de agarosa no amplifica con partidores específicos para bacterias heterótrofas.

El tamaño del ADN genómico de todas las cepas de *C. raciborskii* se estimó cerca de 2,2 Mb, debido a que migró en conjunto con el cromosoma de 2,2 Mb de *S. cerevisiae*. (Fig. 18A). La separación del ADN cromosómico se realizó utilizando un sistema de pulsos destinados a separar bandas de alto peso molecular (protocolo 1, tabla

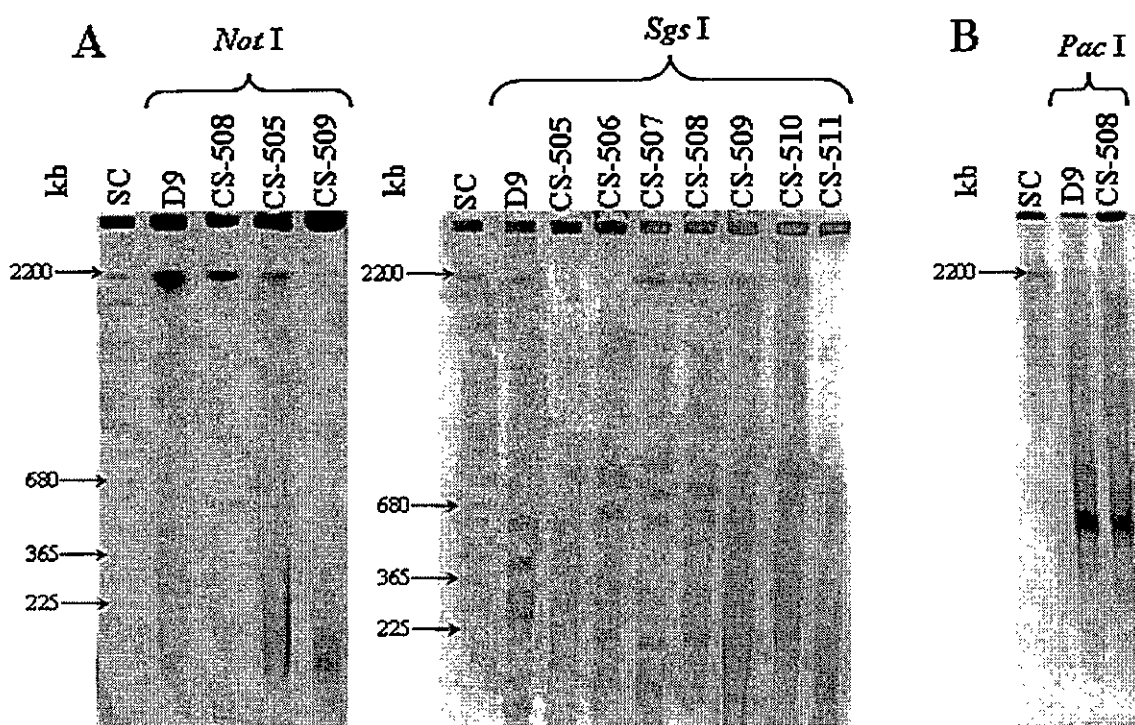
5) por lo que sólo es posible observar la migración de fragmentos de hasta 225 kb (Fig. 18A), la presencia de elementos extracromosómicos de menor peso molecular, por lo tanto, no puede ser observada de esta manera. Utilizando un protocolo de corrida destinado a separar bandas de alto y de bajo peso molecular (protocolo 2, tabla 5) se encontró la presencia de elementos extracromosómicos en las cepas CS-505 y CS-509 de *C. raciborskii* (Fig. 18B).



**Figura 18.** PFGE del ADN cromosómico de las cepas de *C. raciborskii*. **A.** Cepas D9, CS-505, CS-506, CS-507, CS-508, CS-509, CS-510 y CS-511. Las condiciones de corrida electroforética fueron: agarosa al 0,9%, 6 V/cm, pulsos de 50-90 s por 24 h. **B.** Cepas CS-505, D9, CS-508, y CS-509, en círculos se indican los posibles elementos extracromosómicos. Las condiciones de corrida electroforética fueron: agarosa al 1,2%, 6 V/cm con pulsos de 1-18 s por 10 h, y 3-80 s, por 10 h. En ambas PFGEs la temperatura se mantuvo a 14°C, se utilizó TBE 0,5 X como tampón de corrida y la tinción fue con bromuro de etidio. SC: ADN cromosómico de *S. cerevisiae*.

### 2.1.1 Análisis de macrofragmentos de restricción.

Para estimar de una manera más exacta el tamaño del genoma de las cepas de *C. raciborskii*, se realizaron digestiones con las enzimas de restricción *Not* I, *Sgs* I y *Pac* I (tabla 5) de corte poco frecuente, es decir, aquellas que cortan el ADN en fragmentos discretos de alto peso molecular. Sin embargo, estas enzimas produjeron digestión incompleta (Fig. 19A) o fragmentos de bajo peso molecular sin definición (Fig. 19B).



**Figura 19.** PFGE del ADN cromosómico de las cepas de *C. raciborskii* digerido con diferentes enzimas de restricción de corte poco frecuente. A. Digestión con *Not* I y *Sgs* I; las PFGEs se realizaron bajo las condiciones de pulsos de 50-90 s por 24 h. B. Digestión con *Pac* I; la PFGE se realizó bajo la condición de pulsos de 1-18 s por 6 h y 3-80 s por 12 h. En A y B se utilizó un gel de agarosa al 1,2% y la electroforesis se realizó a 6 V/cm, en tampón TBE 0,5 X a 14°C. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. SC: ADN cromosómico de *S. cerevisiae*.

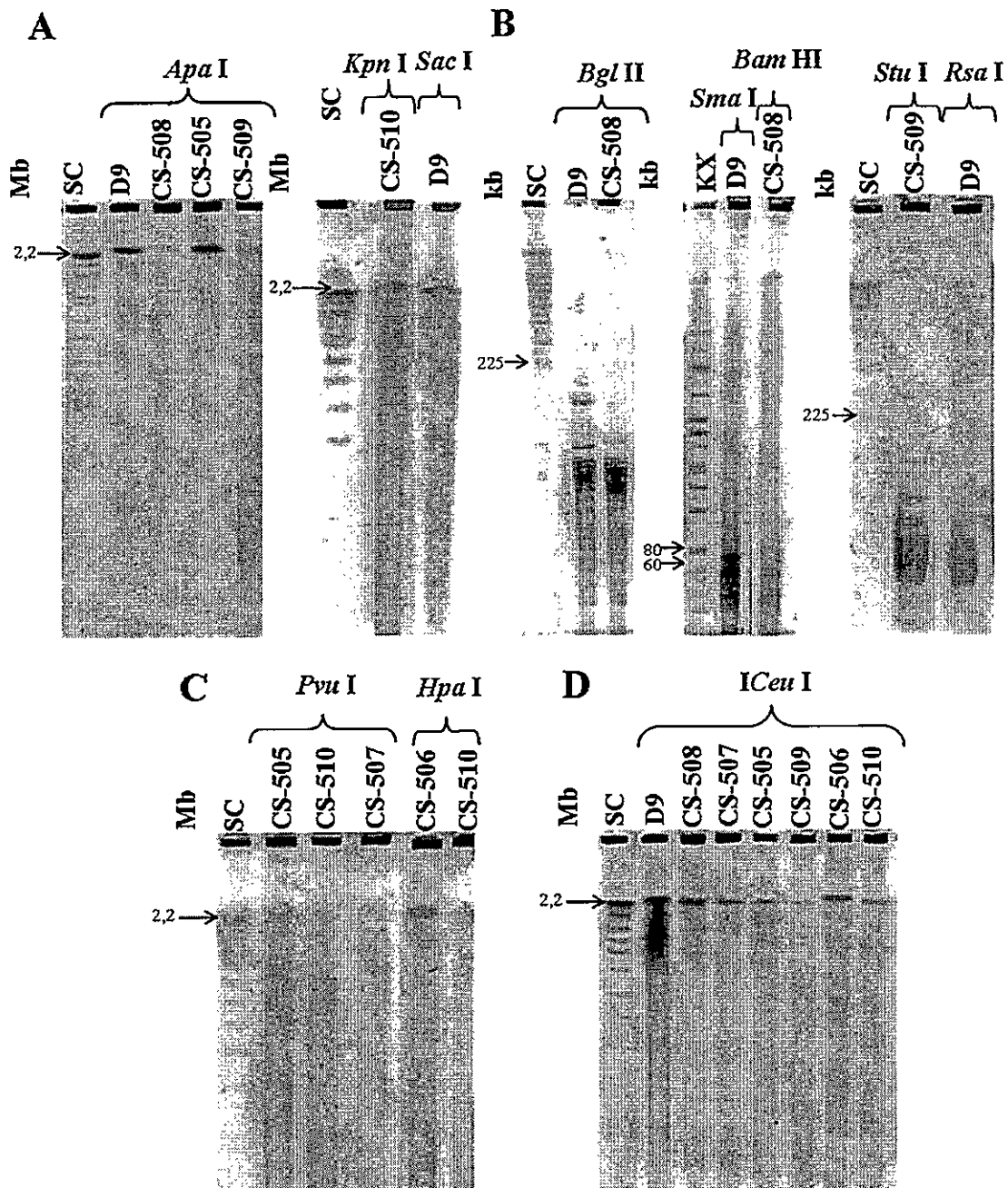


Debido a que no fue posible obtener macrofragmentos de restricción discretos utilizando enzimas de restricción de corte poco frecuente, se utilizaron enzimas de restricción de corte frecuente y no tan frecuente. Los resultados obtenidos fueron similares a la digestión con enzimas de corte poco frecuente.

Las enzimas *Apa* I, *Kpn* I y *Sac* I, no produjeron cortes en el ADN cromosómico de las cepas de *C. raciborskii* (Fig. 20A). Las enzimas *Bgl* II, *Sma* I, *Bam* HI, *Stu* I, y *Rsa* I, produjeron fragmentos de bajo peso molecular sin definición (Fig. 20B) y las enzimas *Pvu* I y *Hpa* I produjeron digestión incompleta (Fig. 20C).

Se utilizó además la enzima de restricción *ICeu* I cuyo sitio de reconocimiento se encuentra dentro del gen de rARN 23S, esta enzima no produjo cortes en el ADN cromosómico de las cepas de *C. raciborskii*, a excepción de D9 donde sólo produjo digestión incompleta (Fig. 20D).

De las enzimas de corte frecuente, sólo *Xho* I logró producir macrofragmentos de restricción discretos en cada una de las cepas de *C. raciborskii*, de hasta 240 kb (Fig. 21A). Para lograr la mayor definición de estos fragmentos, en la corrida electroforética se utilizó un protocolo de corrida dirigido a separar bandas de bajo peso molecular (protocolo 4, tabla 5). La digestión con *Xho* I produjo entre 26 y 33 macrofragmentos de restricción dependiendo de la cepa (Fig. 21A). Las bandas en CS-506, CS-508, CS-509 y CS-510 a la altura de entre 280 y 1080 kb se consideraron como digestión incompleta, debido que en otros PFGE de digestión con esta enzima las bandas no estuvieron presentes (Anexo D).

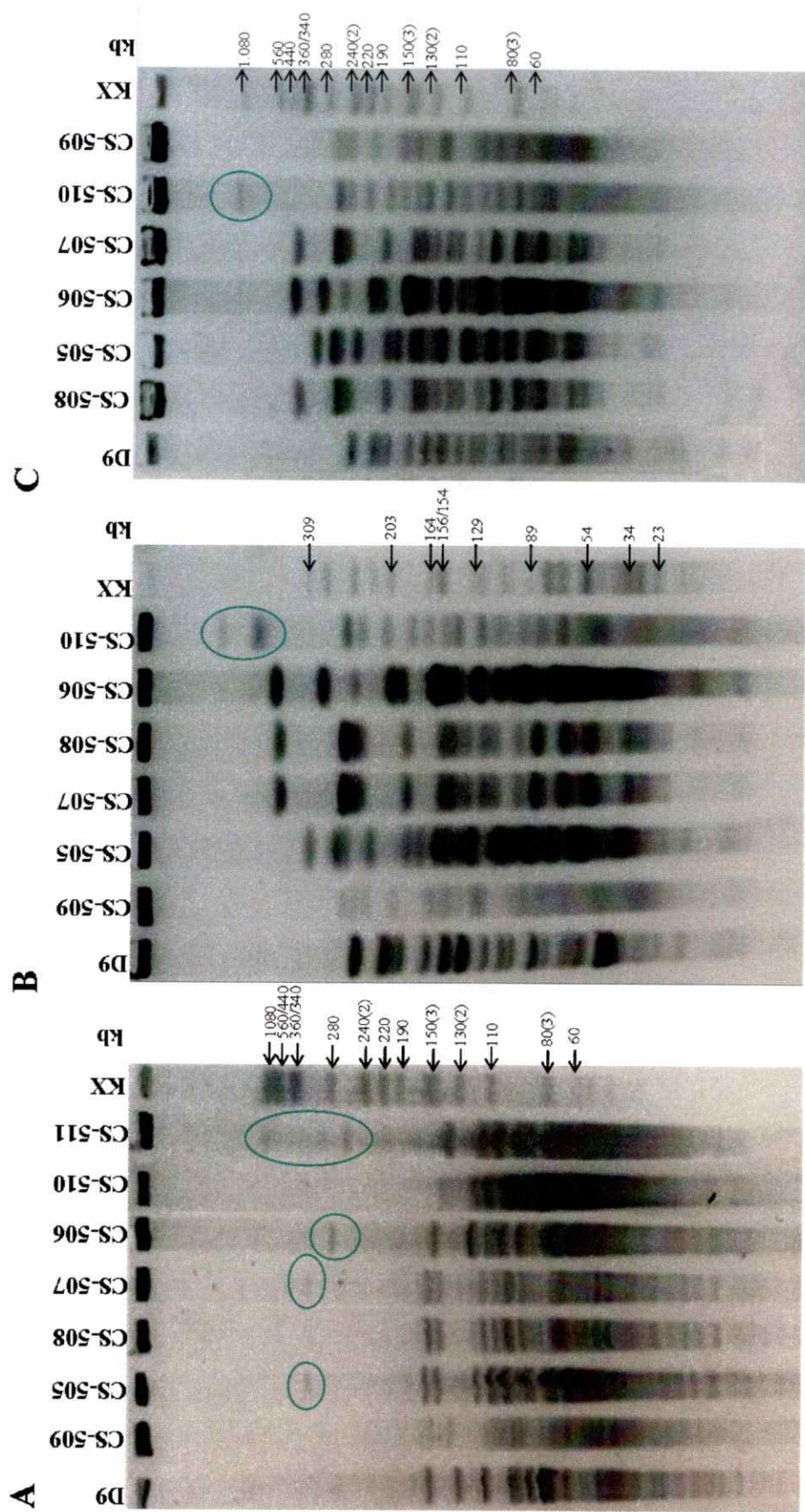


**Figura 20.** PFGE del ADN cromosómico de las cepas de *C. raciborskii* digerido con diferentes enzimas de restricción. **A.** Digestión con *Apa* I, *Kpn* I y *Sac* I; las PFGEs se realizaron bajo las condiciones de pulsos de 1-18 s por 10 h y 3-80 s por 10 h. **B.** Digestión con *Bgl* II, *Sma* I, *Bam* HI, *Stu* I y *Rsa* I; las PFGEs se realizaron bajo las condiciones de pulsos de 1-18 s por 6 h y 3-80 s por 12 h para la digestión con *Bgl* II y pulsos de 1-18 s por 10 h y 3-80 s por 10 h para la digestión con *Sma* I, *Bam* HI, *Stu* I, y *Rsa* I. **C.** Digestión con *Pvu* I y *Hpa* I bajo las condiciones de pulsos de 1-18 s por 10 h y 3-80 s por 10 h. **D.** Digestión con *I Ceu* I bajo la condición de pulsos de 1-18 s por 6 h y 3-80 s por 12 h. En **A**, **B**, **C** y **D** se utilizó un gel de agarosa al 1,2% y la electroforesis se realizó a 6 V/cm, en tampón TBE 0,5 X y a 14°C. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. SC: ADN cromosómico de *S. cerevisiae*. KX: ADN cromosómico de *V. parahaemolyticus* cepa KX digerido con *Not* I.

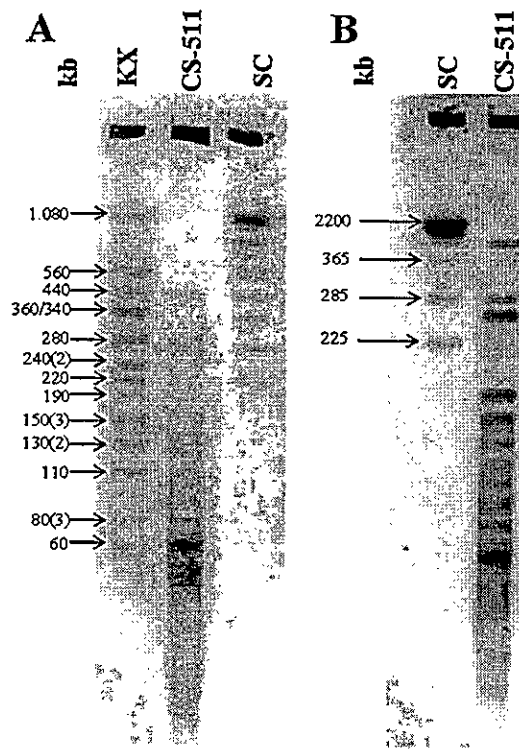
De acuerdo a estudios previos realizados en el laboratorio, la enzima *Mlu* I, produce macrofragmentos discretos, y mediante la digestión con esta enzima, el tamaño del ADN genómico de la cepa D9 de *C. raciborskii* fue estimado en 1,7 Mb. Por lo tanto, se utilizó esta enzima para digerir el ADN cromosómico de todas las cepas de *C. raciborskii*. En la corrida electroforética se utilizó un sistema de dos tipos de pulsos, orientados a separar bandas de alto y bajo peso molecular (protocolo 2, tabla 5). La digestión con *Mlu* I produjo entre 19 y 24 macrofragmentos de restricción dependiendo de la cepa (Fig. 21B). Las bandas en CS-510 a la altura de 1 Mb se consideraron como fragmentos de digestión incompleta ya que en otra PFGE no están presente (Anexo E).

La resolución de los fragmentos fue baja en las cepas CS-505, CS-506 y CS-509 debido o a la gran cantidad de ADN (CS-505 y CS-506) o por el contrario, a la poca cantidad de ADN (CS-509). Para solucionar esto se realizó otra PFGE utilizando la misma condición de corrida electroforética, pero disminuyendo el tamaño del molde de agarosa en el caso de las cepas CS-505 y CS-506 y realizando nuevos moldes con el doble de cultivo (200 ml) de la cepa CS-509 (Fig. 21C), correspondiente a 4,75 mg/l de clorofila *a* (tabla 6).

Si observamos la figura 21, podemos ver que cada cepa posee un patrón de digestión característico, a excepción de las cepas CS-507 y CS-508 que no presentaron diferencias observables. Este patrón se repite en ambas PFGE de la digestión con *Mlu* I y en otras corridas electroforéticas (Anexo E) lo que nos indica la reproducibilidad del método. En el caso de la cepa CS-511, la digestión con *Mlu* I se visualizó en dos PFGEs distintas (Fig. 22).



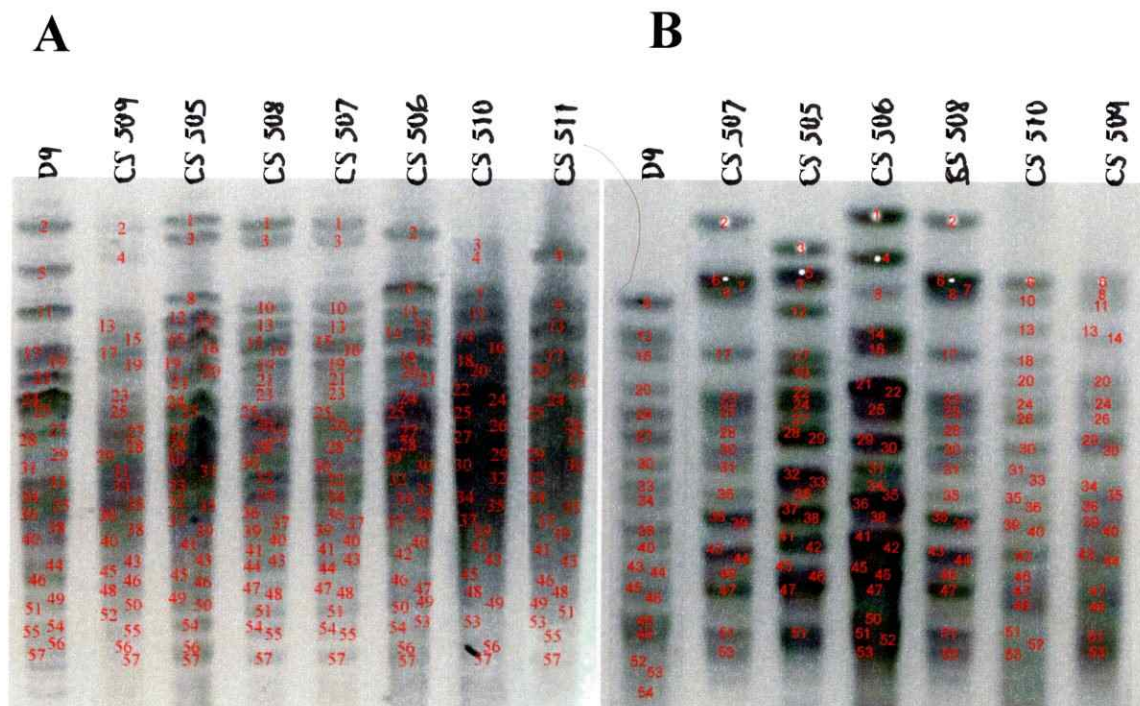
**Figura 21.** PFGE del ADN cromosómico digerido con *Xho* I (**A**) y *Mlu* I (**B** y **C**) de las cepas D9, CS-505, CS-506, CS-507, CS-508, CS-509, CS-510 y CS-511 de *C. raciborskii*. Las PFGEs se realizaron en un gel de agarosa al 1,2 %, bajo las condiciones de pulsos de 0,1-25 s, por 21 h (**A**) y 1-18 s por 10 h y 3-80 s por 10 h (**B** y **C**) a 6 V/cm, en tampón TBE 0,5 X a 14°C. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. KX: ADN cromosómico de *V. parahaemolyticus* cepa KX digerido con *Not* I (**A** y **C**) o con *Apa* I (**B**). Círculos: Fragmentos producidos por digestión incompleta.



**Figura 22.** PFGE del ADN cromosómico de la cepa CS-511 digerido con *Mlu* I. **A:** PFGE bajo la condición de pulsos de 1-18 s por 10 h y 3-80 s por 10 h. **B:** PFGE bajo la condición de pulsos de 0,1-25 s por 21h. En ambas PFGEs se utilizó un gel de agarosa al 1,2 % y se utilizaron las siguientes condiciones de corrida electroforética: 6 V/cm, 14°C, tampón TBE 0,5 X. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. SC: ADN cromosómico de *S. cerevisiae*. KX: ADN cromosómico de *V. parahaemolyticus* cepa KX digerido con *Not* I.

### 2.1.2 Estimación de los tamaños genómicos mediante análisis de restricción.

Para identificar cada fragmento y realizar la genotipificación de las cepas, se enumeró cada fragmento de restricción en los geles de PFGE de las digestiones con *Xho* I y *Mlu* I, según lo descrito en materiales y métodos. Se enumeraron 57 bandas de digestión en la digestión con *Xho* I en base a la figura 21A (Fig. 23A).



**Figura 23.** Enumeración de los fragmentos de restricción observados en las PFGEs del ADN cromosómico de las cepas de *C. raciborskii* digerido *Xho* I (A) y *Mlu* I (B). Cada banda fue enumerada de acuerdo a su migración en el gel y de forma independiente de la cepa de procedencia.

La enumeración de las bandas en la PFGE de la digestión con *Mlu* I, se realizó en base a la figura 21A y B (Fig. 23B). Se enumeraron 54 bandas de digestión. Debido a que la cepa CS-511 se analizó en una PFGE distinta al del resto de las cepas, no fue posible enumerar los fragmentos de restricción de esta cepa al igual que el resto.

El marcador de peso molecular utilizado en las PFGEs de las figuras 21A y 21C correspondió al ADN genómico de *V. parahaemolyticus* cepa KX digerido con *Not* I y en la figura 21B digerido con *Apa* I. Sin embargo, sólo la digestión con *Not* I produce fragmentos de restricción de tamaños que se encuentran descritos, por lo tanto los tamaños genómicos de las cepas de *C. raciborskii* se calcularon en base a este marcador de peso molecular, y a la migración de cada banda enumerada en el gel de PFGE, según

lo indicado en materiales y métodos. El tamaño estimado del genoma de las cepas de *C. raciborskii* obtenido en la digestión con *Mlu* I se encontró entre 2,12 y 3,05 Mb (tabla 7) y en la digestión con *Xho* I entre 1,6 y 2,06 Mb (tabla 8). El tamaño de CS-511 fue estimado de la misma forma, según la migración de las bandas en la figura 22 (tabla 7). (Los gráficos y ecuaciones obtenidas, utilizadas para el cálculo de los tamaños genómicos se encuentran en el Anexo F).

**Tabla 7.** Extrapolación de los tamaños de los macrofragmentos de restricción obtenidos mediante la digestión total del ADN genómico de las cepas de *C. raciborskii* con la enzima de restricción *Mlu* I.

	D9	CS-505	CS-506	CS-507	CS-508	CS-509	CS-510	CS-511
	261,34	325,70	388,92	374,24	374,24	282,24	282,24	406,05
	218,85	287,72	310,07	282,24	282,24	261,34	253,63	286,69
	195,41	268,70	261,34	268,70	268,70	247,74	218,85	261,74
	169,34	238,39	208,80	261,34	261,34	218,85	184,85	165,14
	147,69	191,69	195,41	191,69	191,69	208,80	168,26	143,67
	136,46	175,23	165,76	152,50	152,50	168,26	147,69	135,45
	118,50	155,46	155,46	143,64	143,64	147,69	138,81	123,01
	101,38	147,69	143,64	128,26	128,26	138,81	118,50	109,34
	97,97	136,46	123,15	118,50	118,50	123,15	107,18	103,63
	93,27	128,26	118,50	107,18	107,18	118,50	101,38	97,18
	78,45	123,15	107,18	93,27	93,27	97,97	93,27	85,46
	69,6	104,46	97,97	83,64	83,64	93,27	89,18	82,76
	67,26	101,38	93,27	81,52	81,52	89,18	81,52	74,75
	64,30	93,27	89,18	69,60	69,60	81,52	78,45	63,66
	62,14	86,18	83,64	67,26	67,26	78,45	69,60	60,66
	57,66	83,64	73,89	62,14	62,14	69,60	62,14	53,35
	50,83	73,89	72,02	57,66	57,66	67,26	57,66	51,66
	44,71	72,02	64,30	46,07	46,07	57,66	53,51	48,97
	41,93	64,30	62,14			53,51	46,07	46,66
	39,50	62,14	57,66			46,07	44,71	
		57,66	48,70			41,93	41,93	
		46,07	46,07					
			44,71					
			41,93					
<b>Tamaño estimado del genoma (Mb)</b>	<b>2,12</b>	<b>3,02</b>	<b>3,05</b>	<b>2,59</b>	<b>2,59</b>	<b>2,69</b>	<b>2,44</b>	<b>2,4</b>

**Tabla 8.** Extrapolación de los tamaños de los macrofragmentos de restricción obtenidos mediante la digestión total del ADN genómico de las cepas de *C. raciborskii* con la enzima de restricción *Xho* I.

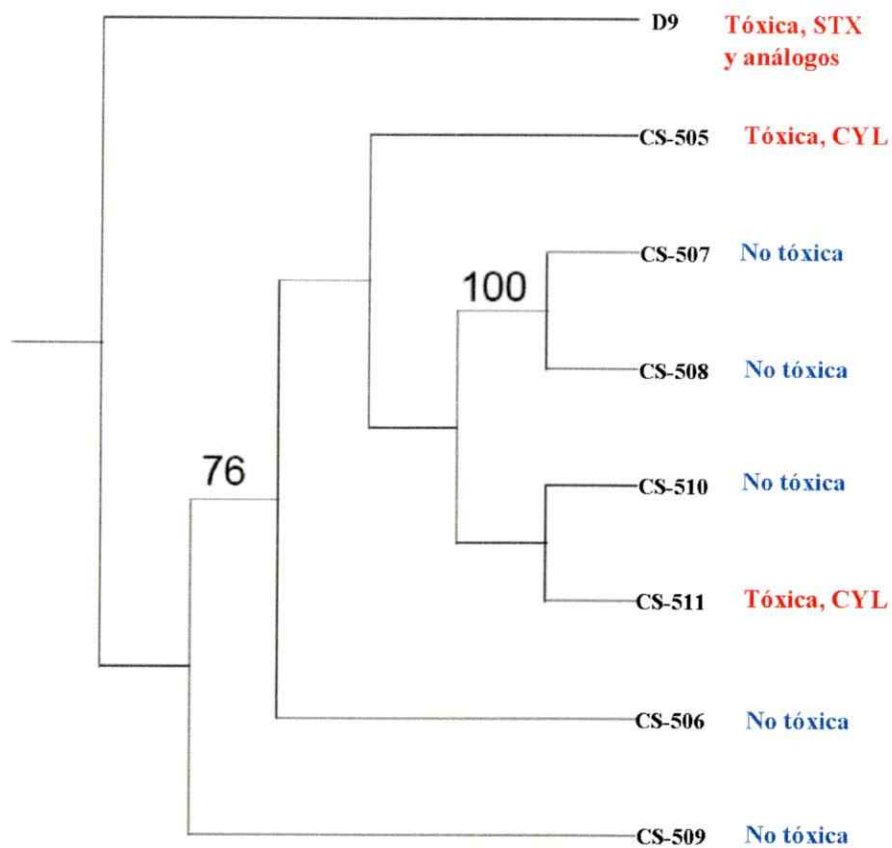
D9	CS-505	CS-506	CS-507	CS-508	CS-509	CS-510	CS-511	
155,51	158,75	153,92	158,75	158,75	153,92	148,21	137,43	
129,64	148,21	121,87	148,21	148,21	137,43	137,43	114,57	
110,70	116,95	111,08	113,01	113,01	105,14	118,57	105,14	
93,88	107,70	105,14	105,14	105,14	98,50	111,08	93,88	
90,09	105,14	100,90	98,50	98,50	93,88	100,90	87,65	
84,69	98,50	98,50	95,18	95,18	90,09	95,18	84,40	
77,73	95,18	92,60	90,09	90,09	79,07	92,60	77,73	
74,85	90,09	87,65	84,40	84,40	74,08	87,65	74,08	
68,46	87,65	84,40	79,07	79,07	68,22	81,56	70,85	
64,58	84,40	77,73	74,08	74,08	64,80	77,73	68,22	
61,76	77,73	74,08	70,85	70,85	61,76	74,08	61,76	
58,26	74,08	68,22	68,22	68,22	58,26	70,85	60,29	
55,14	68,22	64,80	64,80	64,80	55,33	68,22	56,87	
53,28	64,80	61,76	60,29	60,29	50,78	61,76	53,28	
50,78	60,29	60,29	56,87	56,87	48,90	60,29	50,78	
48,90	58,26	56,87	53,28	53,28	46,28	56,87	47,90	
46,28	55,33	55,33	48,90	48,90	44,57	53,28	45,50	
44,57	51,48	53,28	47,90	47,90	41,33	50,78	42,62	
39,80	50,78	48,90	45,50	45,50	38,98	47,90	41,33	
37,54	47,90	47,90	44,57	44,57	37,54	45,50	37,54	
31,29	45,50	44,57	42,62	42,62	36,02	42,62	36,02	
30,34	42,62	41,75	41,33	41,33	33,98	41,33	34,57	
29,52	41,33	37,54	40,07	40,07	32,50	38,98	33,40	
27,47	38,98	36,77	36,77	36,77	30,34	36,02	32,17	
	37,54	34,57	36,02	36,02	29,52	34,57	30,34	
	34,57	33,98	33,40	33,40	27,47	32,17	27,47	
	33,98	32,17	31,29	31,29		29,52		
	31,29	31,29	30,34	30,34				
	29,52	29,52	27,47	27,47				
	27,47	27,47						
<b>Tamaño estimado del genoma (Mb)</b>	<b>1,63</b>	<b>2,06</b>	<b>1,97</b>	<b>1,93</b>	<b>1,93</b>	<b>1,64</b>	<b>1,92</b>	<b>1,60</b>



## 2.2 Matriz de distancia y relaciones filogenéticas entre cepas de *C. raciborskii*.

Para establecer relaciones filogenéticas entre cepas de *C. raciborskii*, se creó una matriz de distancia basada en la presencia o ausencia de cada banda de restricción obtenida según la enumeración en la figura 23 de las PFGE de digestión con *Xho* I y con *Mlu* I. En el caso de la cepa CS-511, la enumeración de las bandas se realizó asignando a cada tamaño de fragmento un número de banda. Con estas matrices de distancia (Anexos G y H) se construyó un árbol filogenético utilizando el algoritmo de máxima parsimonia (materiales y métodos) (Fig. 24).

El árbol filogenético entre las cepas de *C. raciborskii* agrupa a las cepas CS-507 y CS-508, ambas no tóxicas, formando una rama y a las cepas CS-510, no tóxica y CS-511 productora de CYL, formando otra, estas ramas agrupan juntas, presentando un alto valor de "bootstrap" (100%). La cepa CS-505 productora de CYL agrupa relacionada a la rama anterior y más lejanamente a la cepa no productora de toxinas, CS-506. La cepa no tóxica CS-509 se encuentra más relacionada a la cepa CS-506 y más lejana a la cepa D9 productora de STX, que forma un clado independiente en el árbol filogenético. Las agrupaciones observadas en este árbol no se correlacionan con el fenotipo toxigénico de las cepas de *C. raciborskii*. Sólo es posible determinar una correlación con la región de procedencia de las cepas (Australia y Brasil).



**Figura 24.** Árbol filogenético construido a partir de los análisis restricción de PFGE con las enzimas *Xho* I y *Mlu* I. Se obtuvo una matriz de distancia basada en la presencia o ausencia de bandas de cada gel de electroforesis, 58 bandas para la electroforesis en campo pulsado de ADN cromosómico digerido con *Xho* I y 58 bandas características para la digestión con *Mlu* I. Se obtuvo un único árbol más parsimonioso al utilizar el algoritmo máxima parsimonia y bootstrap de 1000 réplicas. (Largo: 195 pasos, IC: 0,5744, IR: 0,4503).

## DISCUSION

Para realizar estudios genómicos en un cultivo no axénico, como es el caso de los cultivos de *C. raciborskii*, se requirió optimizar un protocolo que redujera la carga de bacterias heterótrofas que acompañan a las cianobacterias. Sin embargo, reducir el número de bacterias acompañantes de *C. raciborskii* no es fácil, ya que los filamentos, que pueden alcanzar una longitud de 200  $\mu\text{m}$ , se agrupan formando redes y a menudo secretan mucílago manteniendo a las bacterias adheridas a ellos (Fig. 7G'). Además, las bacterias forman cúmulos que no atraviesan el filtro de 3  $\mu\text{m}$ . Debido a esto, el protocolo utilizado contempló el lavado con abundante agua (1 l para lavar 20 ml de cultivo y 2 l para lavar 100 ml de cultivo), agitando constantemente para remover las bacterias adheridas. Con este protocolo se logró obtener un concentrado de cianobacterias con una carga reducida de bacterias heterótrofas y de confiabilidad para realizar estudios genómicos (Fig. 7A'-I').

*C. raciborskii* es una especie altamente homogénea en las secuencias del gen de rARN 16S, lo que ha impedido utilizar este marcador para diferenciar las distintas cepas de la especie (Neilan y col., 2003). Sin embargo, el análisis ARDRA del gen de rARN 16S con la enzima *Eco* RI había demostrado polimorfismos en dos cepas de *C. raciborskii* presentes en el cultivo mixto SPC 338, demostrando que con éste método sí era posible diferenciar entre cepas. A pesar de estos antecedentes, no se observaron polimorfismos en el gen de rARN 16S en ninguna de las cepas de *C. raciborskii*, ni siquiera en la cepa ACMB13 de *A. circinalis* (Fig. 9), sugiriendo que la región de

reconocimiento de *Eco* RI dentro de este gen es altamente conservada entre estas dos especies de cianobacterias.

La correlación entre el número de operones ribosomales y la presencia de productos de PCR de diferentes tamaños al amplificar la región intergénica ITS, ha sido descrita en los géneros de cianobacterias *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Anabaenopsis*, *Nostoc*, *Cylindrospermopsis*, y *Nodularia* (Neilan y col., 1997; Iteman y col., 2000, 2002; Janse y col., 2003). En este estudio, la totalidad de las cepas de *C. raciborskii* presentó dos espaciadores ITS, sugiriendo la presencia de al menos dos operones ribosomales (Fig. 10). El análisis de estas secuencias evidenció que la diferencia en pesos moleculares entre ITS L e ITS C está dada por la presencia de tARN<sup>Ala</sup> y tARN<sup>Ile</sup> en las secuencias de mayor tamaño o ITS L (Fig. 15). Esto apoya lo descrito en la literatura, donde no todos los operones ribosomales de cianobacterias contienen tARN<sup>Ala</sup> y tARN<sup>Ile</sup>, no observándose en ningún caso la presencia de tARN<sup>Glu</sup> descrita para otras bacterias (Boyer y col., 2001). A diferencia de las cepas procedentes de Australia, la cepa D9 de fenotipo toxigénico distinto, presentó dos espaciadores más pequeños (Fig. 11), lo que se debe a la ausencia de 27 pb en el extremo 3' de estos espaciadores. Este análisis reveló de manera adicional la presencia de motivos conservados en bacterias, descritos tan solo para un número reducido de cianobacterias (Iteman y col., 2000) y que la mayor variabilidad en las secuencias se encuentra entre estos dominios (Fig. 15). Se encontró que el grado de variación presente entre espaciadores de una misma cepa es tan o más alto que entre cepas, tal como se ha descrito en cianobacterias (Iteman y col., 2000).

La alta homogeneidad en las secuencias del rARN de 16S se contradice con el fenotipo encontrado en cepas de *C. raciborskii*, ya que existen morfologías, características de crecimiento y fenotipos toxigénicos diversos. Por lo tanto, es esperable encontrar heterogeneidad genética en *C. raciborskii*. Una aproximación para abordar este punto es la técnica de PFGE, que ha sido utilizada ampliamente en estudios de epidemiología molecular en *V. parahaemolyticus*, (Wong y col., 1996), *V. cholerae* (Cameron y col., 1994) y *S. aureus* (Chung y col., 2000), entre otros microorganismos. Es por esto, que han sido descritos una serie de protocolos para la obtención de ADN íntegro en bacterias. Sin embargo, la obtención de ADN de cianobacterias filamentosas embebido en moldes de agarosa no es un proceso trivial y se deben tener en cuenta una serie de consideraciones: i) hay que superar el problema de las bacterias heterótrofas presentes en el medio de cultivo; además, ii) se debe considerar el gran número de DNAsas descritas en cianobacterias (Scharnagl y col., 1998; Sopper y Reddy, 1994), lo que resulta en una rápida degradación del ADN al momento de ser liberado al medio; iii) no se han descrito protocolos de obtención de ADN genómico íntegro de cianobacterias filamentosas.

Después de lograr reducir la carga de las bacterias heterótrofas en la preparación de cianobacterias, en base al protocolo descrito en materiales y métodos, se utilizó una modificación del protocolo descrito para la obtención de ADN genómico de la cianobacteria unicelular *Prochlorococcus* (Hess y col., 1999). Las células fueron mezcladas rápidamente con agarosa LMP y tratadas con proteinasa K por 3 días, para asegurarnos de que las lisis proteica y celular fueran completas. De esta manera, se obtuvo ADN íntegro embebido en moldes de agarosa de todas las cepas de *C.*

*raciborskii* (Fig. 18). En el caso de la cepa CS-509, se puede observar un cierto nivel de degradación del ADN (Fig. 18A). Esto puede estar relacionado con que se utilizó el doble de cultivo para realizar los moldes de agarosa pero se mantuvo la concentración de proteinasa K, lo que pudo impedir la total degradación de las DNAsas, o simplemente a que ocurrió una fragmentación de los filamentos en el momento del lavado. Aunque la lisis por proteinasa K permite obtener ADN íntegro la mayoría de las veces, la desproteinización no es siempre completa, ya que luego de 4 meses el ADN comienza a degradarse (resultados no mostrados). Por este motivo los moldes se utilizaron dentro de ese lapso de tiempo.

La PFGE de ADN genómico permitió observar la presencia de un solo cromosoma en todas las cepas de *C. raciborskii*, de tamaño ligeramente superior a 2,2 Mb (Fig. 18).

Se ha descrito que muchas cianobacterias, tanto unicelulares como filamentosas, poseen uno o más elementos extracromosómicos (Schaefer y col., 1993). En *Nostoc* PCC 7120 se han descrito 4 plásmidos, uno de más de 100 kb, dos de 55 y 40 kb y uno de 5,5 kb (Lee y col., 2003). Mediante un sistema de pulsos para separar bandas de alto y bajo peso molecular (protocolo 2, tabla 5) se investigó la presencia de estos elementos en las cepas CS-505, D9, CS-508 y CS-509, encontrándose elementos extracromosómicos sólo en las cepas CS-505 y CS-509 (Fig. 18B).

Para estimar en forma más exacta el tamaño del ADN cromosómico de las cepas de *C. raciborskii* se realizaron PFGEs con ADN digeridos con distintas enzimas de restricción. En este punto hay que tener en cuenta que existen antecedentes de que el genoma de las cianobacterias posee una alta tasa de metilación (Soper y Reddy, 1994;

Scharnagl y col., 1998), lo que impediría el completo reconocimiento de las enzimas de restricción. Estudios previos realizados en el laboratorio demostraron que la enzima de restricción *Mlu* I digiere el ADN de *C. raciborskii* D9. Por este motivo se utilizó esta y otras 15 enzimas para este análisis. Sin embargo, sólo se obtuvo un patrón de digestión de fragmentos discretos con las enzimas *Xho* I y *Mlu* I (Fig. 21). De acuerdo a los resultados obtenidos con las enzimas de restricción y a la sensibilidad a metilaciones de cada enzima utilizada, se infirió que el patrón de metilación del genoma de *C. raciborskii* está determinado por metilaciones en adenina y citosina al azar ya que dentro de las enzimas utilizadas obtuvimos tres tipos de resultados: ADN sin digerir, digestión incompleta del ADN y digestión completa pero en fragmentos de bajo peso molecular y similares entre ellos (que migraron en la parte inferior del gel) (Figs. 19 y 20). Estos resultados también podrían sugerir un bajo porcentaje de GC en el genoma de *C. raciborskii*, ya que las enzimas de restricción que reconocen alto contenido de GC: *Not* I, *Apa* I, *Sgs* I y *Sma* I, no cortaron o produjeron digestión incompleta.

Aunque se estimó un tamaño genómico levemente superior a 2,2 Mb para todas las cepas de *C. raciborskii*, sólo los tamaños calculados con *Mlu* I apoyaron este resultado, encontrándose en el rango de 2,12 y 3,05 Mb (tabla 6), los tamaños estimados con *Xho* I, por el contrario, se encontraron en el rango de 1,6 y 2,06 Mb (tabla 7), inferiores a 2,2 Mb. Esta subestimación de los tamaños genómicos puede deberse a que la digestión con *Xho* I produce fragmentos de menor peso molecular que *Mlu* I y a que con el sistema de pulsos utilizado estos no se separan por completo. El fragmento más grande encontrado con *Xho* I es de 150 kb (Fig. 21A) y con *Mlu* I es de 406 kb (Fig. 21B y C). Utilizando un sistema de pulsos más cortos, que separaran los fragmentos de bajo

peso molecular, se podría obtener una mayor resolución de las bandas y por lo tanto una mejor estimación del tamaño del genoma de las cepas de *C. raciborskii*.

Los resultados obtenidos mediante PFGE se pueden evaluar de acuerdo a parámetros como tipificabilidad, reproducibilidad y discriminación. En el caso de las digestiones con *Xho* I y *Mlu* I, a las 8 cepas estudiadas se les asignó un patrón de restricción con claridad, indicando un 100% de tipificabilidad. Este patrón de restricción además, se repitió cada vez que realizamos PFGE con ADN digerido por *Mlu* I (Figs. 21B y C y 22 en resultados y Anexo E) y *Xho* I (Fig. 21A en resultados y Anexo D), denotando un 100% de reproducibilidad en la técnica. Por último, y de acuerdo con lo descrito en la literatura de los métodos de genotipificación, PFGE es una de las técnicas que posee valores más altos de discriminación (Eriksson y col., 1999; Tullus y col., 1999). El índice de discriminación obtenido para ambas PFGE fue 0,9643 (descripción del cálculo en Anexo I), lo que quiere decir que existe un 96,43 % de probabilidad que dos cepas de *C. raciborskii* no relacionadas (o con genotipos distintos) sean agrupadas correctamente, demostrando la heterogeneidad genética de la especie.

Si bien dentro de las especies de cianobacterias existen cepas que producen diferentes toxinas y cepas que no producen toxinas (tabla 1), sólo se ha descrito una relación entre el fenotipo toxigénico y la distribución filogeográfica para *A. circinalis*, productora de neurotoxinas (Beltran y Neilan, 2000). Hasta ahora no se han realizado este tipo de estudios para *C. raciborskii* ni para otras especies de cianobacterias productoras de STX o CYL. En esta tesis se presentó el primer estudio dirigido a investigar la relación entre la asociación filogenética y el fenotipo toxigénico entre cepas de *C. raciborskii*.



El estudio del operón ribosomal en cepas de *C. raciborskii* fue dirigido a los genes de rARN 16S asociados a su espaciador ITS. De las cianobacterias filamentosas cuyo genoma se encuentra secuenciado, *Anabaena variabilis* y *Nostoc* PCC 7120, ambas pertenecientes al orden Nostocales, presentan un 100% de identidad en la secuencia de los genes ribosomales de 16S entre sus dos operones ribosomales. Para las cepas de *C. raciborskii* se estudiaron estas regiones correspondientes a los dos operones ribosomales (estimados por la presencia de dos espaciadores ITS). Los alineamientos de estas secuencias demostraron que a diferencia de *Anabaena variabilis* y *Nostoc* PCC 7120, existen polimorfismos en esta región, aunque estos corresponden a un 0,23% (Anexo B) y son transiciones y transversiones al azar (Anexo A). Se investigó si la presencia de estos polimorfismos se reflejaba en una divergencia en el árbol filogenético, no encontrándose diferencias entre las cepas de la misma procedencia (Anexo C).

Se ha descrito que las regiones intergénicas ITS son más polimórficas que el gen de rARN 16S (Navarro y col., 1992) y por lo tanto aptas para establecer relaciones filogenéticas en cianobacterias (Boyer y col., 2001). Por este motivo el uso del espaciador ITS asociado al gen de rARN 16S puede proporcionar mayor información evolutiva al sumar los cambios presentes en estas dos secuencias. Debido a que los análisis de las secuencias del rADN de 16S más ITS demostraron que la variación intragénica es tan o más alta que la variación entre las distintas cepas (Fig. 15), se realizaron árboles filogenéticos por separado de las secuencias correspondientes a cada operón. La filogenia obtenida demostró que todas las cepas de *C. raciborskii* agrupan estrechamente relacionadas, separadas de la cianobacteria *A. circinalis*, utilizada como grupo interno (Fig. 16). Esto corrobora lo descrito por Neilan (2003), que caracteriza a

*C. raciborskii* como una especie monofilética. De manera interesante, se distinguió una topología distinta en el árbol filogenético creado para cada operón, lo que puede ser un indicio de que cada operón evolucionó de forma independiente.

Los análisis filogenéticos realizados en base a las secuencias de una parte de del operón ribosomal, y en base a PFGE demuestran que no existe una correlación entre la asociación filogenética y el fenotipo toxigénico (Figs. 16 y 24 respectivamente). Sí es posible, por otro lado, determinar una asociación filogeográfica entre las cepas. Esta asociación se observa claramente en la figura 17, donde las cepas productoras de CYL agrupan de acuerdo a su región de procedencia y la cepa productora de neurotoxinas, D9, agrupa en conjunto con las cepas procedentes de América, pero no productoras de toxinas.

De acuerdo a estos resultados, en el transcurso de la evolución de *C. raciborskii*, dos posibilidades podrían dar cuenta del fenotipo toxigénico:

- i) Los genes involucrados en la toxicidad estuvieron presentes en el ancestro común de *C. raciborskii*, y en el transcurso de la evolución las cepas no tóxicas los perdieron.
- ii) Los genes involucrados en la toxicidad pudieron haber sido adquiridos por procesos de transferencia horizontal, en eventos independientes de acuerdo a la región de procedencia de las cepas.

Una explicación posible del fenómeno de transferencia horizontal, es que las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de toxinas fueron transferidas por fagos, ya que se ha descrito la transferencia de islas genómicas entre cianobacterias mediada por cianofagos, en la cianobacteria *Prochlorococcus marinus* (Coleman y col., 2006).

Los complejos híbridos entre péptido sintetetasas no ribosomales (NRPS) y policétido sintetasas (PKS), son responsables de la síntesis de la hepatotoxina microcistina en las cianobacterias unicelulares *Microcystis* sp. (Tillett y col., 2000) y *Planktotrix* sp. (Christiansen y col., 2003) y en la cianobacteria filamentosa *Anabaena* sp. (Rouhiainen y col., 2004). Se ha demostrado que estos genes están presentes en cepas de *C. raciborskii* productoras de CYL (Kellman y col., 2006). La presencia de estos genes en cepas de *C. raciborskii* productoras de STX no se ha estudiado.

No es ilógico pensar en la presencia de estos complejos híbridos en *C. raciborskii*, ya que han sido descritos en una serie de cianobacterias filamentosas (Ehrenreich y col., 2005) y se encuentran involucrados en la producción de una serie de metabolitos secundarios, como antibióticos, toxinas (Tang y col., 2004; Dittman y Börner, 2004) y sideróforos (Crossa y col., 2002).

Una estrategia para comprobar si existen estos complejos es utilizar partidores dirigidos a dominios conservados de NRPS, PKS e híbridos NRPS/PKS, descritos para otras cianobacterias (Kellman y col., 2006). Además se pueden utilizar estas secuencias conservadas como sondas de hibridación para Southern blot en PFGE, lo que permitiría determinar la cantidad y posición en el genoma de ellos. A partir de estas aproximaciones y los resultados obtenidos en esta tesis por PFGE se podrá construir librerías de cósmidos o fósmidos que contengan el operón completo como se ha descrito para *Microcystis* que posee un operón de 55 kb (Tillett y col., 2000). Esto permitiría dilucidar cómo cepas tan homogéneas en su rADN de 16S presentan toxicidades distintas.

Los estudios realizados en esta tesis permitirán sustentar los futuros estudios genómicos que faciliten el entendimiento de la biosíntesis y función de STX en cianobacterias y desde allí establecer las comparaciones con otros sistemas más complejos como lo son los dinoflagelados marinos productores de STX.

## CONCLUSIONES

- ❖ La optimización de un protocolo de lavado logró obtener un concentrado de cianobacterias con una carga reducida de bacterias heterótrofas acompañantes y apto para realizar estudios genómicos en las cepas de *C. raciborskii*.
- ❖ La detección de dos espaciadores ITS indicó la presencia de dos operones ribosomales. Mediante el análisis de las secuencias de los genes ribosomales de 16S asociados a su espaciador ITS se determinó que existe una variación intragénica en cada cepa mayor a la variación que existe en la misma región entre distintas cepas y se establecieron relaciones filogenéticas entre las cepas de *C. raciborskii*.
- ❖ Se logró obtener ADN íntegro de todas las cepas de *C. raciborskii* para realizar PFGE, con el que se observó la presencia de elementos extracromosómicos sólo en las cepas CS-505 y CS-509. Se estimó el tamaño genómico entre 1,6 y 2,06 Mb y 2,12 y 3,05 Mb mediante digestión con las enzimas *Xho* I y *Mlu* I respectivamente. El patrón de digestión permitió establecer relaciones filogenéticas entre las cepas de *C. raciborskii*.
- ❖ Los análisis filogenéticos realizados en esta tesis demuestran que no es posible establecer una correlación entre la asociación filogenética y el fenotipo toxigénico entre cepas de *C. raciborskii* y apoyan la hipótesis que eventos independientes de transferencia horizontal estuvieron involucrados en la adquisición del fenotipo toxigénico de las cepas productoras de STX y CYL.

## REFERENCIAS

- Alduina, R.**, De Grazia, S., Dolce, L., Salerno, P., Sosio, M., Donadio, S. y Puglia, A. 2002. Artificial chromosome libraries of *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Planobispora rosea*. FEMS Microbiol. Lett. **218**:181-186.
- Azevedo, S.M.F.Q.**, Carmichael W., Jochimsen E.M., Rinehart, K.L., Lau, S., Shaw G.R., y Eaglesham, G.K. 2002. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. Toxicology. **181-182**:441-446.
- Bancroft, I.**, Wolk, C.P. y Oren, E.V. 1989. Physical and genetic maps of the genome of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. J. Bacteriol. **171** 5940-5948.
- Banker, R.**, Teltsch, B., Sukenik, A., y Carmeli, S. 2000. 7-Epicylindrospermopsin, a toxic minor metabolite of the cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum* from lake Kinneret, Israel. J. Nat. Prod. **63**:387-389.
- Beltran, C.**, y Neilan, B.A. 2000. Geographical segregation of the neurotoxin-producing cyanobacterium *Anabaena circinalis*. App. Environ. Microbiol. **66**:4468-4474.
- Birnboim, H.C.**, y Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. **7**:1513-1523.
- Bourke, A.T.C.**, Hawes, R.B., Neilson, A., y Stallman, N.D. 1983. An outbreak of hepato-enteritis (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. Toxicol. **3**:45-48.
- Bouvy, M.**, Molica, R., Oliveira, S.D., Marinho, M. y Becker, B. 1999. Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom *Cylindrospermopsis raciborskii* in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil. Aquat. Microb. Ecol. **20**:285-97.
- Bowling, L.C.** y Baker, P.D. 1996. Major cyanobacterial bloom in the Barwon-Darling river, Australia, in 1991, and underlying limnological conditions. Mar. Freshwat. Res. **47**:643-657.
- Boyer, S.L.**, Flechtner, V.R. y Johansen, J.R. 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. Mol. Biol. Evol. **18**:1057-1069.
- Briand, J.F.**, Robillot, C., Quiblier-Lloberas, C., Humbert, J.F., Coute, A., y Bernard, C. 2002. Environmental context of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) blooms in a shallow pond in France. Wat. Res. **36**:3183-3192.
- Cameron, D.N.**, Khambaty, F.M., Wachsmuth, I.K., Tauxe, R.V., y Barrett, T.J. 1994. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. **32**:1685-1690.
- Christiansen, G.**, Fastner, J., Erhard, M., Börner, T., y Dittmann, E. 2003. Microcystin biosynthesis in *Planktothrix*: genes, evolution and manipulation. J. Bacteriol. **185**:564-572.
- Chen, X.**, y Widger, W.R. 1993. Physical genome map of the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. J. Bacteriol. **175**:5106-5116.
- Chung, M.**, De Lencastre, H., Matthews, P., Tomasz, A., Adamsson, I., Aires de Sousa, M., Camou, T., Cocuzza, C., Corso, A., Couto, I., Dominguez, A., Gniadkowski, M.,

- Goering, R., Gomes, A., Kikuchi, K., Marchese, A., Mato, R., Melter, O., Oliveira, D., Palacio, R., Sa-Leao, R., Santos Sanches, I., Song, J.H., Tassios, P.T., y Villari, P. 2000. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb. Drug Resist.* **6**:189-198.
- Coleman, M.L.**, Sullivan, M.B., Martiny, A.C., Steglich, C., Barry, K., Delong, E.F., y Chisholm, S.W. 2006. Genomic islands and the ecology and evolution of *Prochlorococcus*. *Science*. **311**:1768-1770.
- Crosa, J.H.**, y Walsh, C.T. 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:223-249.
- Dittmann, E.**, Neilan, B.A., Erhard, M., Von Döhren, H., y Börner, T. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene which is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis* PCC7806. *Mol. Microbiol.* **26**:779-787.
- Dittman, E.** y Börner, T. 2005. Genetic contributions to the risk assessment of microcystin in the environment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **3**:192-200.
- Ehrenreich, I.M.**, Waterbury, J.B., y Webb, E.A. 2005. Distribution and diversity of natural product genes in marine and freshwater cyanobacterial cultures and genomes. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7401-7413.
- Falconer, I.R.** 1999. An overview of problems caused by toxic blue-green algae (cyanobacteria) in drinking and recreational water. *Env. Toxicol.* **14**:5-12.
- Fernández-Piñas, F.**, Leganés, F., y Wolf, C. P. 1994. A third genetic locus required for the formation of heterocysts in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **176**:5277-5283.
- Ferris, M.J.**; Muyzer, G., y Ward, D.M. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:340-346.
- Francis, G.R.** 1978. Poisonous australian lake. *Nature*. **18**:11-12.
- Gilroy, D.J.**, Kauffman, K.W., Hall, R.A., Huang, X., y Chu, F.S. 2000. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environ. Health Persp.* **108**:435-439.
- Griffiths, D.J.**, y Saker M.L. 2003. The Palm Island mystery disease 20 Years on: a review of research on the cyanotoxin cylindrospermopsin. *Environ. Toxicol.* **18**:78-93.
- Gugger, M.**, Molica, R., Le Berre, B., Dufour P., Bernard, C., y Humbert, J.F. 2005. Genetic diversity of *Cylindrospermopsis* strains (cyanobacteria) isolated from four continents. *App. Environ. Microbiol.* **71**:1097-1100.
- Hackett, J.D.**, Anderson, D.M., Erdner, D.L., y Bhattacharya, D. 2004. Dinoflagellates: A remarkable evolutionary experiment. *Am. J. Bot.* **91**:1523-1534.
- Hara-Kudo, Y.**, Sugiyama, K., Nishibuchi, M., Chowdhury, A., Yatsuyanagi, J., Ohtomo, Y., Saito, A., Nagano, H., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Miyahara, M., y Kumagai, S. 2003. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3883-3891.
- Hawkins, P.R.**, Runnegar, M.T.C, Jackson, A.R.B., y Falconer, I.R. 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga)

- Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Raju isolated from a domestic water supply reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1292-1295.
- Hess, W.R.,** Steglich C., Lichtlé, C., y Partensky, F. 1999. Phycoerythrins of the oxyphotobacterium *Prochlorococcus marinus* are associated to the thylakoid membranes and are encoded by a single large gene cluster. *Plant Mol. Biol.* **40**:507-521.
- Hobbie, J.E.** 1977. Use of nucleopopre folters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**:1225-1228.
- Humpage, A.R.,** Fenech, M., Thomas, P. y Falconer, I.R. 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutat. Res.* **472**:155-161.
- Hunter, P.R.,** y Gaston, M.A. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**:2465-2466.
- Hunter, P.R.** 1990. Reproducibility and index of discriminatory power of microbial typing methods. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1903-1905.
- Istvánovics, V.,** Shafik, H.M., Présing, M. y Juhos, Sz. 2000. Growth and phosphate uptake kinetics of the cyanobacterium, *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) in throughflow cultures. *Freshwat. Biol.* **43**: 257-275.
- Iteman, I.,** Rippka, R., Tandeau de Marsae, N. y Herdman, M. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16SrRNA-23SrRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiol.* **146**:1275-1286.
- Janse, I.,** Meima, M., Kardinaal, E.A., y Zwart, G. 2003. High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:6634-6643.
- Kellmann, R.,** Mills, T., y Neilan, B.A. 2006. Functional modeling and phylogenetic distribution of putative cylindrospermopsin biosynthesis enzymes. *J. Mol. Evol.* **62**:267-280.
- Khudyakov, I.,** y Wolf, C.P. 1996. Evidence that the hanA gene coding for HU protein is essential for heterocyst differentiation in, and cyanophage A-4(L) sensitivity of *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **178**:3572-3577.
- Lagos, N.,** Onodera, H., Zagatto, P.A., Andrinolo D., Azevedo S.M.F.Q. y Oshima Y. 1999. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. *Toxicon.* **37**:1359-1373.
- Lane, D.J.,** Pace, B. y Olsen, G.J. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Nat. Acad. Sci U.S.A.* **20**:6955-6959.
- Lee, M.H.,** Scherer, M., Rigali, S., y Golden, J.W. 2003. PlmA, a new member of the GntR Family, has plasmid maintenance functions in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **185**:4315-4325.
- Moffitt, M.C.,** y Neilan, B.A. 2004. Characterization of the Nodularin Synthetase Gene Cluster and Proposed Theory of the Evolution of Cyanobacterial Hepatotoxins. *App. Environ. Microbiol.* **70**:6353-6362.
- Navarro, E.,** Simonet, P., Normand, P., y Bardin, R. 1992. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Arch. Microbiol.* **157**:107-115.



- Neilan, B.A., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L.L., Hawkins, P.R., Cox, P.T., y Goodman, A.E. 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**:693-697.
- Neilan, B.A., Saker, M.L., Fastner, J., Torokne, A., y Burns, B.P. 2003. Phylogeography of the invasive cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Mol. Ecol.* **12**:133-140.
- Nübel, U., Garcia-Pichel F., y Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *App. Environ. Microbiol.* **63**:3327-3332.
- Norris, R.L., Eaglesham, G.K., Pierens, G., Shaw, G.R., Smith, M.J., Chiswell, R.K., Seawright, A.A., y Moore, M.R. 1999. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* **14**:163-66.
- Ohtani, I., Moore, R.E., y Runnegar, M.T.C. 1992. Cylindrospermopsin, a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. *J. Amer. Chem. Soc.* **114**:7942-7944.
- Padisák, J., 1997. *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya et Subba Raju, an expanding, highly adaptive cyanobacterium: worldwide distribution and review of its ecology. *Arch. Hydrobiol.* **107**:563-593.
- Padisák, J., 2003. Estimation of minimum sedimentary inoculum (akinetes) pool of *Cylindrospermopsis raciborskii*: a morphology and life-cycle based method. *Hydrobiol.* **502**:389-394.
- Rouhiainen, L., Vakkilainen, T., Siemer, B.L., Buikema, W., Haselkorn, R., y Sivonen, K. 2004. Genes coding for hepatotoxic heptapeptides (microcystins) in the cyanobacterium *Anabaena* strain 90. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:686-692.
- Runnegar, M.T.C., Kong, S.M., Zhong, Y.Z., Ge, J.L., y Lu, S.C. 1994. The role of glutathione in the toxicity of a novel cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin in cultured rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **201**:235-241.
- Runnegar, M.T.C., Xie, C., Snider, B.B., Wallace, G.A., Weinreb, S.M., y Kuhlenkamp, J. 2002. In vitro hepatotoxicity of the cyanobacterial alkaloid cylindrospermopsin and related synthetic analogues. *Toxicol. Sci.* **67**:81-87.
- Saker, M.L., Neilan B.A., y Griffiths D.J. 1999. Two morphological forms of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolated from Solomon Dam, Palm Island, Queensland. *J. Phycol.* **35**:599-606.
- Saker, M.L. 2000 Cyanobacterial blooms in tropical north Queensland water bodies. Tesis doctoral, Universidad de James Cook, Townsville, Australia.
- Saker, M.L y Neilan B.A. 2001. Varied diazotrophies, morphologies, and toxicities of genetically similar isolates of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanophyceae) from northern Australia. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1839-1845.
- Saker, M.L., Jungblut, A.D., Neilan, B.A., Rawn, D., y Vasconcelos, V.M. 2005. Detection of microcystin synthetase genes in health food supplements containing the freshwater cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Toxicon.* **46**:555-562.
- Schaefer, M.R., Chiang, G.G., Cogley, J.G., y Grossman, A.R. 1993. Plasmids from two morphologically distinct cyanobacterial strains share a novel replication origin. *J. Bacteriol.* **175**:5701-5705.
- Scharnagl, M., Richtner, S. y Hagemann, M. 1998. The cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 expresses a DNA methyltransferase specific for the recognition sequence of the restriction endonuclease PvuI. *J. Bacteriol.* **180**:4116-4122.

- Schembri, M.A.,** Neilan, B.A., y Saint, C.P. 2001. Identification of genes implicated in toxin production in the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environ. Toxicol.* **16**:413-421.
- Schwartz, D.C.** y Cantor, CH.R. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell.* **37**:67-75.
- Shalev-Alon, G.,** Sukenik, A., Livnah, O., Schwarz, R. y Kaplan, A. 2002. A novel gene encoding amidinotransferase in the cylindrospermopsin producing cyanobacterium *Aphanizomenon ovalisporum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**:83-87.
- Shaw, G.R.,** Seawright, A.A., Moore, M.R., y Lam, P.K.S. 2000. Cylindrospermopsin, a cyanobacterial alkaloid: Evaluation of its toxicologic activity. *Ther. Drug Monit.* **22**:89-92.
- Shimizu, Y.** 1986. Toxigenesis and biosynthesis of saxitoxin analogues. *Pure. Appl. Chem.* **58**:257-262.
- Sivonen, K.** 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate and bacteria on growth and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardii* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2658-2666.
- Sivonen, K.** y Jones, G. 1999. Cyanobacterial toxins. pp 41-111. *In* I. Chorus and J. Bartram (ed), *Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management.* E & FN Spon. Publishers, London, United Kingdom.
- Soper, B.W.** y Reddy, K.J. 1994. Identification of a nuclease and host restriction-modification in the unicellular, aerobic nitrogen-fixing cyanobacterium *Cyanothece* sp. *J. Bacteriol.* **176**:5565-5570.
- Strehl, B.,** Holtzendorff, J., Partensky, F. y Hess, W. 1999. A small and compact genome in the cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375: lack of an intron in the gene for tRNA (Leu)<sup>UAA</sup> and a single copy of the rRNA operon. *FEMS Microbiol. Lett.* **181**:261-266.
- Tang, L.,** Cheng, Y., y Shen, B. 2004. Leinamycin biosynthesis revealing unprecedented architectural complexity for a hybrid polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase. *Chem. Biol.* **11**:33-45.
- Tillett, D.,** Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., y Neilan, B.A. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem. Biol.* **7**:753-764.
- Tóth, G.L.,** y Padisák, J. 1986. Meteorological factors affecting the bloom of *Anabaenopsis raciborskii* Wolosz. (Cyanophyta: Hormogonales) in the shallow Lake Balaton, Hungary. *J. Plankton Res.* **8**:353-363.
- Wong, H.,** Lu, K., Pan, T., Lee, C., y Shih, D.Y. 1996. Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1535-1539.
- Yentsch, C.S.,** y Menzel D.W. 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and paheophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.* **10**:221-231.

# **ANEXOS**





(1261) 1261 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400

505 B (1161) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

506 B (1161) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

507 B (1198) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

508 B (1161) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

509 B (1161) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

510 B (1161) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

511 B (1198) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

D9 B (1198) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

D9 BS (1198) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

505 BS (1161) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

506 BS (1161) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

507 BS (1161) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

508 BS (1161) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

509 BS (1161) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

510 BS (1161) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

511 BS (1198) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

E coli (1258) GCGACTCCCGAGGAGCAAGCGGAGCTTAAAGTTCCTGTTAGTTCAGATTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

Consensus (1261) GCAAGCCAGGGATGCCAAGCGAATC-CAGAAACCGTAGTCAAGTTCAGATCGAAGGTCGCAACTCGGCTTCGTGAAGGAGGAATCCCTAGTAATTCAGCCAGCATACTGCAGTGAATTTCGTCCCGGGCCCTGTACAC

(1401) 1401 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540

505 B (1300) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

506 B (1300) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

507 B (1337) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

508 B (1300) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

509 B (1300) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

510 B (1300) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

511 B (1300) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

D9 B (1337) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

505 BS (1300) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

506 BS (1300) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

507 BS (1337) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

508 BS (1300) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

509 BS (1337) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

510 BS (1300) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

511 BS (1337) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

E coli (1398) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

Consensus (1401) ACCCGCCGTCACACCAATGCAAGTTGGTCAAGCCCGAAGTCATTACCCACACGAAAGGAGGGGGATGCTTAAGGTAGGACTGGTGACTGGGCTGAAGTCGTAAACAAGGTAACCGTACCAGGCTGTGGCTGGATCACT

**322F**

Los alineamientos de las secuencias del gen de rARN 16S de las cepas de *C. raciborskii* D9, CS-505, CS-506, CS-507, CS-508, CS-509, CS-510 y CS-511 y cepa K-12 de *E. coli* se realizaron con el programa Vector NTI®. Los partidores 27F y 322F se indican en recuadros rojos. En amarillo se indican las secuencias idénticas y en azul las secuencias conservadas. En círculos púrpura se destacan los polimorfismos encontrados entre las secuencias.

## ANEXO B

**Cálculo de las distancias entre las secuencias del gen de rARN 16S correspondientes al operón largo y corto de las cepas de *C. raciborskii*.**

```

Title: 16S cepas C raciborskii
Description
  No. of Taxa : 16
  Data Type : Nucleotide
  Analysis : Pairwise distance calculation
  Compute : Distances only
  Include Sites : -----
  Gaps/Missing Data : Complete Deletion
  Substitution Model : -----
  Model : Nucleotide: Kimura 2-parameter
  Substitutions to Include : d: Transitions + Transversions
  Pattern among Lineages : Same (Homogeneous)
  Rates among sites : Uniform rates
  No. of Sites : 1444
  d : Estimate

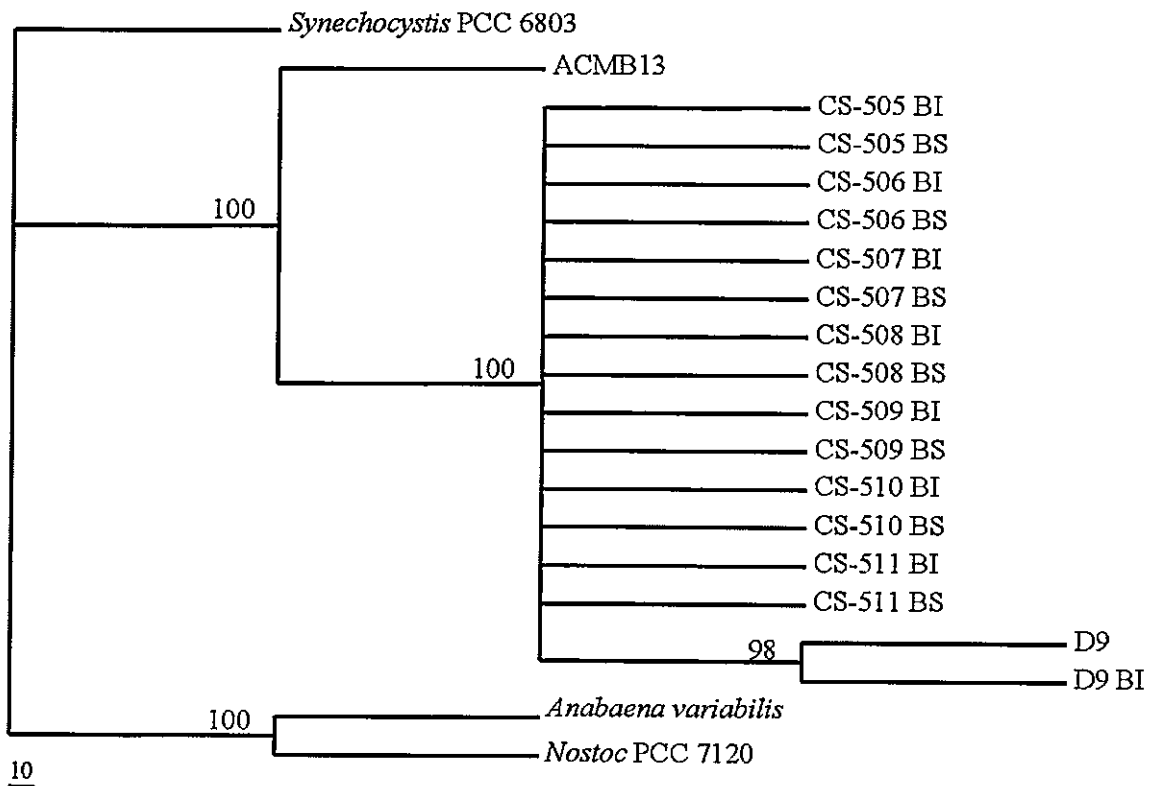
[ 1] #D9_BS
[ 2] #505_BI
[ 3] #505_BS
[ 4] #506_BI
[ 5] #506_BS
[ 6] #507_BI
[ 7] #507_BS
[ 8] #508_BI
[ 9] #508_BS
[10] #509_BI
[11] #509_BS
[12] #510_BI
[13] #510_BS
[14] #511_BI
[15] #511_BS
[16] #D9_BI

[      1      2      3      4      5      6      7      8      9      10      11      12      13      14      15      16 ]
[ 1]
[ 2] 0.0049
[ 3] 0.0056 0.0007
[ 4] 0.0069 0.0014 0.0021
[ 5] 0.0056 0.0007 0.0014 0.0021
[ 6] 0.0056 0.0007 0.0014 0.0021 0.0014
[ 7] 0.0049 0.0000 0.0007 0.0014 0.0007 0.0007
[ 8] 0.0056 0.0007 0.0014 0.0021 0.0014 0.0014 0.0007
[ 9] 0.0070 0.0021 0.0028 0.0035 0.0028 0.0028 0.0021 0.0028
[10] 0.0049 0.0000 0.0007 0.0014 0.0007 0.0007 0.0000 0.0007 0.0021
[11] 0.0070 0.0021 0.0028 0.0035 0.0028 0.0028 0.0021 0.0028 0.0042 0.0021
[12] 0.0049 0.0000 0.0007 0.0014 0.0007 0.0007 0.0000 0.0007 0.0021 0.0000 0.0021
[13] 0.0049 0.0000 0.0007 0.0014 0.0007 0.0007 0.0000 0.0007 0.0021 0.0000 0.0021 0.0000
[14] 0.0049 0.0000 0.0007 0.0014 0.0007 0.0007 0.0000 0.0007 0.0021 0.0000 0.0021 0.0000 0.0000
[15] 0.0070 0.0021 0.0028 0.0021 0.0014 0.0028 0.0021 0.0028 0.0042 0.0021 0.0042 0.0021 0.0021 0.0021
[16] 0.0014 0.0035 0.0042 0.0049 0.0042 0.0042 0.0035 0.0042 0.0056 0.0035 0.0056 0.0035 0.0035 0.0035 0.0056
  
```

El cálculo de las distancias se obtuvo con el programa MEGA 3.1, utilizando el modelo de Kimura de dos parámetros. La distancia promedio calculada fue: **0,0023**.

## ANEXO C

**Relaciones filogenéticas de los genes de rARN 16S correspondientes al operón largo y corto de las cepas de *C. raciborskii*.**



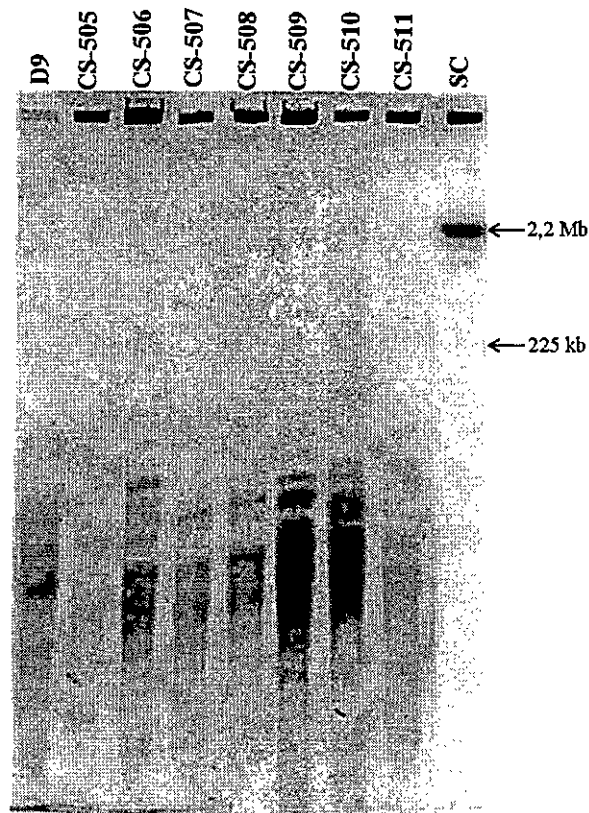
Relación filogenética de los genes de rARN 16S. Se muestra el árbol consenso de los 16 árboles más parsimoniosos, el que se construyó utilizando el algoritmo de Máxima Parsimonia y realizando búsqueda heurística. Los valores sobre los nodos corresponden a bootstrap (1000 réplicas). (Largo: 1814 pasos, IC: 0,9525; IR: 0,9456). BS: Gen de rARN 16S proveniente del operón que contiene el espaciador ITS largo. BI: Gen de rARN 16S proveniente del operón que contiene el espaciador ITS corto.



## ANEXO D

### PFGE del ADN digerido con la enzima *Xho* I.

Se muestra una PFGE adicional de digestión con la enzima de restricción *Xho* I, que comprueba la digestión incompleta de los fragmentos señalados en círculos turquesa en la figura 25. Se demuestra además la reproducibilidad del método.

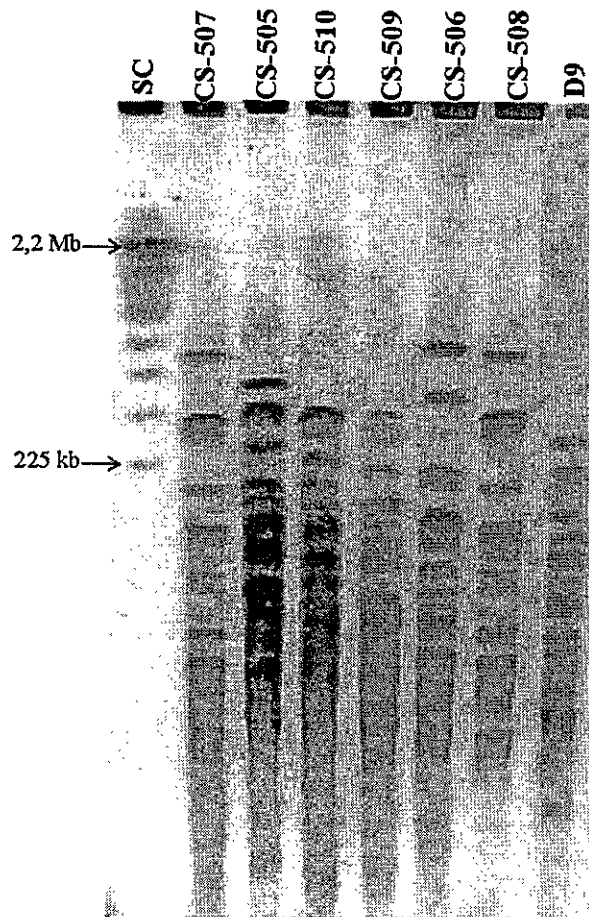


PFGE del ADN cromosómico digerido con *Xho* I de las cepas D9, CS-505, CS-506, CS-507, CS-508, CS-509, CS-510 y CS-511 de *C. raciborskii*. La PFGE se realizó en un gel de agarosa al 1,2 %, bajo las condiciones de pulsos de 0,1-25 s, por 21 h, a 6 V/cm, en tampón TBE 0,5 X a 14°C. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. SC: ADN cromosómico de *S. cerevisiae*.

## ANEXO E

### PFGE del ADN digerido con la enzima *Mlu* I.

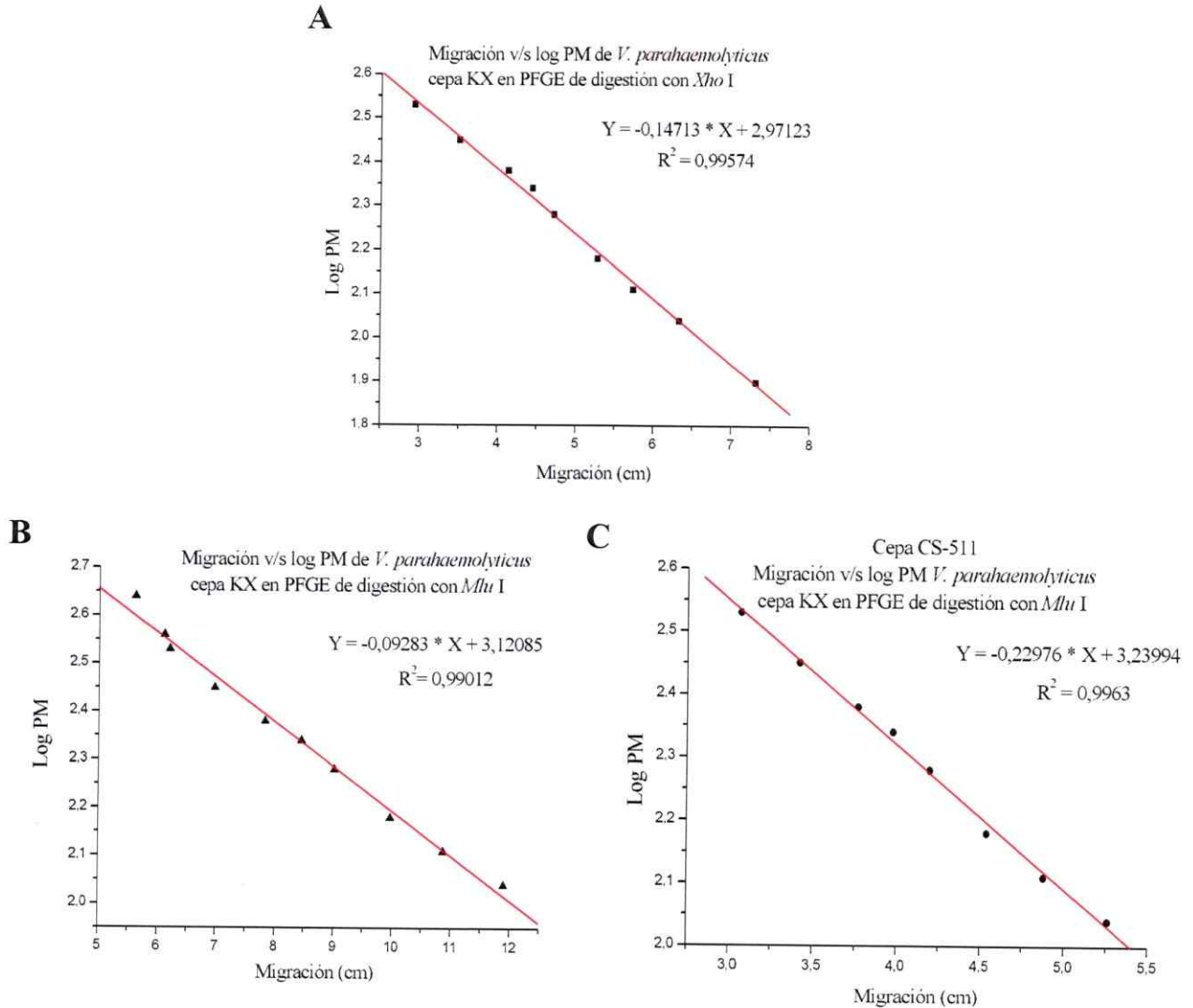
Se muestra una PFGE adicional de la digestión con la enzima de restricción y *Mlu* I, que comprueban la digestión incompleta de los fragmentos señalados en círculos turquesa en la PFGE de la figura 26. Se demuestra además la reproducibilidad del método.



PFGE del ADN cromosómico digerido con *Mlu* I de las cepas CS-507, CS-505, CS-510, CS-509, CS-506, CS-508 y D9 de *C. raciborskii*. La PFGE se realizó en un gel de agarosa al 1,2 %, bajo las condiciones de pulsos de 1-18 s por 10 h y 3-80 s por 10 h, a 6 V/cm, en tampón TBE 0,5 X a 14°C. El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. SC: ADN cromosómico de *S. cerevisiae*.

## ANEXO F

### Determinación de las curvas de calibración para el cálculo del tamaño del genoma de *C. raciborskii*.



Gráficos de la migración de los fragmentos del ADN cromosómico de *V. parahaemolyticus* cepa KX digerido con *Not* I versus el logaritmo del peso molecular de cada fragmento de tamaño conocido. Se muestra la ecuación de la recta (y el valor R cuadrado) utilizada para el cálculo del tamaño de los fragmentos de restricción de todas las cepas de *C. raciborskii* en la PFGE de digestión con *Xho* I de la figura 25 (A) y *Mlu* I de la figura 26 (B) y para el cálculo del tamaño de los fragmentos de restricción de la cepa CS-511 en la PFGE de digestión con *Mlu* I de la figura 24 (C).

## ANEXO G

**Matriz de distancia obtenida según la PFGE de digestión con *Xho* I, en base a la enumeración de las bandas de la figura 25.**

Banda	D9	CS-505	CS-506	CS-507	CS-508	CS-509	CS-510	CS-511
1	0	1	0	1	1	0	0	0
2	1	0	1	0	0	1	0	0
3	0	1	0	1	1	0	1	0
4	0	0	0	0	0	1	1	1
5	1	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0	1	0
8	0	1	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	1
10	0	0	0	1	1	0	0	0
11	1	0	1	0	0	0	1	0
12	0	1	0	0	0	0	0	0
13	0	1	1	1	1	1	0	1
14	0	0	1	0	0	0	1	0
15	0	1	1	1	1	1	0	0
16	0	1	0	1	1	0	1	0
17	1	0	0	0	0	1	0	1
18	0	0	1	0	0	0	1	0
19	1	1	0	1	0	1	0	0
20	0	1	1	0	0	0	1	1
21	1	1	1	1	1	0	0	1
22	0	0	0	0	0	0	1	0
23	0	0	0	1	1	1	0	0
24	1	1	1	0	0	0	1	1
25	1	1	1	1	1	1	1	1
26	0	0	0	1	1	0	1	1
27	1	1	1	1	1	1	1	1
28	1	1	1	1	1	1	0	0
29	1	0	1	0	0	1	1	1
30	0	1	1	1	1	0	1	1
31	1	1	0	0	0	1	0	0
32	0	0	1	1	1	0	1	1
33	1	1	1	0	0	1	0	0
34	1	0	1	1	1	0	1	1
34a	0	1	0	0	0	0	0	0
35	1	1	0	0	0	1	1	1
36	1	0	1	1	1	1	0	0
37	0	1	1	1	1	0	1	1

38	1	0	0	0	0	1	0	0
39	0	1	0	1	1	0	1	1
40	1	0	1	1	1	1	0	0
41	0	1	0	1	1	0	1	1
42	0	0	1	0	0	0	0	0
43	0	1	0	1	1	1	1	1
44	1	0	0	1	1	0	0	0
45	0	1	0	0	0	1	1	0
46	1	1	1	0	0	1	0	1
47	0	0	1	1	1	0	0	0
48	0	0	0	1	1	1	1	1
49	1	1	1	0	0	0	1	1
50	0	1	1	0	0	1	0	0
51	1	0	0	1	1	0	0	1
52	0	0	0	0	0	1	0	0
53	0	0	1	0	0	0	1	1
54	1	1	1	1	1	0	0	0
55	1	0	0	1	1	1	0	1
56	1	1	1	0	0	1	1	0
57	1	1	1	1	1	1	1	1

## ANEXO H

**Matriz de distancia obtenida según la PFGE de digestión con *Mlu* I, en base a la enumeración de las bandas de la figura 26.**

Banda	D9	CS-505	CS-506	CS-507	CS-508	CS-509	CS-510	CS-511
0	0	0	0	0	0	0	0	1
1	0	0	1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	1	1	0	0	0
3	0	1	0	0	0	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0	0	0
5	0	1	0	0	0	0	0	1
6	0	0	0	1	1	1	1	0
7	0	1	0	1	1	0	0	0
8	1	0	1	1	1	1	0	1
9	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	1	0
11	0	0	0	0	0	1	0	0
12	0	1	0	0	0	0	0	0
13	1	0	0	0	0	1	1	0
14	0	0	1	0	0	1	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
16	1	0	1	0	0	0	0	0
17	0	1	0	1	1	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	1	0
19	0	1	0	0	0	0	0	0
20	1	0	0	0	0	1	1	0
21	0	0	1	0	0	0	0	1
22	0	1	1	0	0	0	0	0
23	0	0	0	1	1	0	0	0
24	1	1	0	0	0	1	1	0
25	0	0	1	1	1	0	0	1
26	0	0	0	0	0	1	1	0
27	1	1	0	0	0	0	0	1
28	0	1	0	1	1	0	0	0
29	0	1	1	0	0	1	0	1
30	1	0	1	1	1	1	1	0
31	0	0	1	1	1	0	1	1
32	0	1	0	0	0	0	0	0
33	1	1	0	0	0	0	1	1
34	1	0	1	0	0	1	0	0
34a	0	0	0	0	0	0	0	1
35	0	1	1	1	0	1	1	0

36	0	0	1	0	0	1	1	0
37	0	1	0	0	0	0	0	0
38	1	1	1	1	1	0	0	1
39	0	0	0	1	1	1	1	1
40	1	0	0	0	0	1	1	0
41	0	1	1	0	0	0	0	0
41a	0	0	0	0	0	0	0	1
42	0	1	1	0	0	0	0	0
43	1	0	0	1	1	1	1	0
44	1	0	0	1	1	1	0	0
45	1	1	1	0	0	0	0	0
46	1	1	1	1	1	0	1	1
46a	0	0	0	0	0	0	0	1
47	0	1	1	1	1	1	1	0
48	1	0	0	0	0	1	1	1
49	1	0	0	0	0	0	0	1
50	0	0	1	0	0	0	0	0
50a	0	0	0	0	0	0	0	1
51	0	1	1	1	1	1	1	1
52	1	0	1	0	0	0	1	0
53	1	0	1	1	1	1	1	0
54	1	0	0	0	0	0	0	0

## ANEXO I

### Cálculo del índice de discriminación ( $D$ )

El índice de discriminación se calculó según la fórmula descrita por Hunter y Gaston, (1988):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

Donde  $N$  es el número de cepas,  $s$  es el número total de tipos (o patrones de digestión de PFGE en este caso) determinados y  $n_j$  es el número de cepas que pertenecen al  $j^{\text{vo}}$  tipo.

Para la digestión con *Xho* I y *Mlu* I se determinó:

$$N = 8$$

$$s = 7$$

$$n_{(1-6)} = 1$$

$$n_7 = 2$$

y por lo tanto el índice de discriminación obtenido,  $D = 0,9643$ .