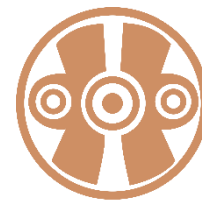




UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD  
DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

Identificación y caracterización de cianobacterias y microalgas  
aisladas de *Selaginella lepidophylla* crecida en condiciones de  
invernadero

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O**  
**P R E S E N T A:**

Dalia Karina Rojas Alvillar

**DIRECTOR**

Dr. Ramón Suárez Rodríguez

**CODIRECTORA**

M. en C. Nancy Sofía Hernández Bueno

CUERNAVACA, MORELOS

Octubre, 2023



**Laboratorio de Fisiología  
Molecular de Plantas**

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas del Centro de Investigación en Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos bajo la dirección del Dr. Ramón Suárez Rodríguez.

## **AGRADECIMIENTOS**

Dr. Ramón Suárez Rodríguez, gracias por haberme dado la oportunidad de ser parte del Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas y para realizar este gran proyecto de investigación, cada una de las sugerencias que me dio y haberme guiado para llegar hasta la conclusión de este trabajo.

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo por darme la confianza para que me admitieran en el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas, por haber sido muy paciente y brindarme su apoyo en cada uno de los experimentos en todo momento.

M. en C. Nancy Sofía Hernández Bueno, muchas gracias por ayudarme y solucionar las dudas en cada paso de los experimentos y material del laboratorio.

A mis sinodales, M. en C. Judith García Rodríguez, M. en C. Migdalia Díaz Vargas y M. en C. Alejandro Flores Morales por hacer sugerencias, y preguntas en cada seminario, gracias a ello mejore para lograr concluir este proyecto.

A todos mis compañeros de laboratorio Celi, Montse, Dayana, Lupita y Diego que siempre me brindaron ayuda y consejos para mejorar.

Por último agradezco infinitamente a mi hermosa familia que son mis papás Gabriela Al Villar Solano y Pedro Rojas Salazar y mis hermanos Diana y Pedro quienes siempre tuve todo su apoyo, comprensión y sobre todo paciencia en esta mi formación como profesional.

## DEDICATORIA

A mis papás Gabriela y Pedro por haberme formado y dado la oportunidad de llegar hasta donde estoy, muchos de mis logros se los debo a ustedes, por siempre motivarme para alcanzar la meta, nunca dudaron de mí y eso me llena de mucha satisfacción. Mis hermanos Diana y Pedro, porque son un ejemplo de fortaleza y valentía cada uno de ustedes siempre estuvieron brindándome palabras para motivarme y no rendirme, siempre sacándome una sonrisa al verme estresada por lo que este logro también es gracias a ustedes.

Este logro también se los debo a mis preciosos abuelitos Magdalena y Anselmo, siempre estuvieron en los momentos más importantes de mi vida y este no puede ser la excepción. Esta tesis es el resultado de todo lo que hasta el momento me han enseñado en la vida una persona responsable y entregada en su trabajo. A mis tías María del Rosario y Blanca, que gracias a todos los consejos como profesionistas me ayudaron a motivarme cada instante. Y este proyecto también se lo dedico a mis primitos Iker y Mateo que siempre lograron que me distrajera un momento jugando con ellos.

Dedico especialmente a Eduardo mi compañero de vida, tu ayuda ha sido fundamental, has estado en cada momento, motivándome, ayudándome ensayando antes de cada seminario y festejar cada logro. Eres y serás muy importante en mi vida.

Los amo mucho familia ♥.

## Contenido

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción .....   | 11 |
| 2. Marco teórico .....  | 13 |
| 2.1 Estrés en organismos.....   | 13 |
| 2.1.1 Estrés abiótico .....   | 14 |
| 2.1.2 Estrés hídrico .....  | 14 |
| 2.2 El género <i>Selaginella</i> .....  | 15 |
| 2.2.1 <i>Selaginella lepidophylla</i> .....   | 15 |
| 2.3 Trehalosa .....   | 20 |
| 2.3.1 Estructura fisicoquímica de la trehalosa .....  | 21 |
| 2.4 Organismos endófitos .....  | 21 |
| 2.5 Organismos epífitos .....   | 22 |
| 2.6 Microalgas .....  | 23 |
| 2.7 Interacción planta-microalga .....  | 24 |
| 2.8 Cianobacterias .....  | 25 |
| 2.8.1 Interacción planta – cianobacteria .....  | 28 |
| 2.8.2 Fijación biológica de nitrógeno .....   | 29 |
| 3. Justificación .....  | 30 |
| 4. Hipótesis.....   | 31 |
| 5. Objetivos.....   | 31 |
| 5.1 Objetivo General .....  | 31 |
| 5.2 Objetivos particulares .....  | 31 |
| 6. Metodología.....   | 32 |
| 6.1 Estrategia experimental.....  | 32 |
| 6.2 Origen de las muestras de <i>S. lepidophylla</i> .....  | 32 |
| 6.3 Aislamiento de cianobacterias y microalgas endófitas de la planta de <i>Selaginella lepidophylla</i> crecida en invernadero ..... | 33 |
| 6.4 Aislamiento de cianobacterias y microalgas epífitas de la planta de <i>Selaginella lepidophylla</i> crecida en invernadero .....  | 33 |
| 6.5 Caracterización fenotípica de las cianobacterias y microalgas por tinción de Gram.....  | 34 |
| 6.6 Obtención de cultivos puros de cianobacterias y microalgas.....   | 34 |
| 6.6.1 Lavado de cianobacterias y microalgas de los tratamientos con antibióticos .....  | 35 |

|   |    |
|---|----|
| 6.7 Determinación de ácido indolacético en cianobacterias y microalgas .  | 35 |
| 6.8 Determinación de la formación de heterocistos .....   | 36 |
| 6.9 Identificación por claves taxonómicas .....   | 36 |
| 6.10 identificación de cianobacterias y microalgas mediante herramientas moleculares .....  | 36 |
| 6.10.1 Extracción de ADN de las cianobacterias y microalgas e identificación molecular.....                                       | 36 |
| 6.10.2 Análisis filogenético .....  | 38 |
| 7. Resultados .....   | 39 |
| 7.1 Aislamiento de cianobacterias y microalgas epifitas de la planta <i>Selaginella lepidophylla</i> crecida en invernadero ..... | 39 |
| 7.2 Obtención de cultivos puros de cianobacterias y microalgas.....   | 41 |
| 7.3 Cuantificación de la producción de ácido indolacético (AIA).....  | 42 |
| 7.4 Determinación de la formación de heterocistos .....   | 43 |
| 7.5 Identificación por claves taxonómicas .....   | 46 |
| 7.6 Identificación molecular de microalgas .....  | 46 |
| 7.7 Identificación molecular de cianobacterias .....  | 49 |
| 7.8 Análisis filogenético .....   | 53 |
| 8. Discusión .....  | 54 |
| 9. Conclusiones.....  | 57 |
| 10. Perspectivas .....  | 57 |
| 11. Literatura citada .....   | 58 |
| 12. Anexos .....  | 65 |
| Anexo 1. Prueba de resistencia antibióticos .....   | 65 |
| Anexo 2. Tratamiento con Rifampicina 100 .....  | 67 |
| Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN por el método de CTAB .....   | 68 |
| Anexo 4. Protocolo de purificación DNA GeneJET Gel Extraction Kit #k0692 .....  | 68 |
| Anexo 5. Electroferograma de los aislados de microalgas MEPIK1, MEPIK13, MEPIK16 y MEPIK33.....                                   | 69 |
| Anexo 6. Electroferograma de los aislados de cianobacterias CEPIK4, EPIK9 y CEPIK17.....  | 70 |
| Anexo 7. Aislados de cianobacterias y microalgas.....   | 71 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Anexo 8. Resultados de la identificación molecular de microalgas a partir de la secuenciación de la región ITS y comparación mediante análisis tipo BLAST.</b> .....     | 75 |
| <b>Anexo 9. Resultados de la identificación molecular de cianobacterias a partir de la secuenciación de la región 16S y comparación mediante análisis tipo BLAST.</b> ..... | 75 |
| <b>Anexo 10. Composición del Medio BG11</b> .....   | 76 |
| <b>Anexo 11. Composición del Medio BG11 libre de nitrógeno</b> .....  | 76 |

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1. Tipos de estrés.</b> Las plantas son afectadas por situaciones que les impide expresar su máximo potencial de rendimiento, estos factores estresantes se dividen en dos grupos, abióticos y bióticos.....  | 13 |
| <b>Figura 2. Estructuras de una planta de <i>Selaginella lepidophylla</i>.</b> Se muestran sus principales tejidos vegetativos <b>(A)</b> las micrófilas y <b>(B)</b> el rizóforo. ....   | 17 |
| <b>Figura 3. RNAseq de <i>Selaginella lepidophylla</i> rehidratada por una hora.</b> <b>A)</b> Genes bacterianos expresados en donde se identifican genes de cianobacterias. <b>B)</b> Porcentaje de genes del grupo de cianobacterias (Van Buren <i>et al.</i> , 2018).....  | 18 |
| <b>Figura 4. RNAseq de <i>Selaginella lepidophylla</i> deshidratado durante 24 horas.</b> <b>A)</b> Genes bacterianos expresados en donde se identifican genes de cianobacterias. <b>B)</b> Porcentaje de genes del grupo de cianobacterias (Van Buren <i>et al.</i> , 2018).....   | 19 |
| <b>Figura 5. Modelo de osmoprotección mediado por la trehalosa.</b> <b>A)</b> Modelo de protección de las proteínas durante la desecación. <b>B)</b> Modelo de protección de las membranas celulares durante la desecación (Tomada de Suárez <i>et al.</i> , 2015)....  | 20 |
| <b>Figura 6. Estructura química de la <math>\alpha</math>, <math>\alpha</math>-trehalosa</b> (Tomado de Elbein <i>et al.</i> , 2003).<br>.....  | 21 |
| <b>Figura 7. Miembros de Clorofíceas/Chlorophyta (Algas verdes).</b> <b>A)</b> <i>Botryococcus brauni</i> , <b>B)</b> <i>Chaetophora elegans</i> , <b>C)</b> <i>Chlamydomonas angulosa</i> , <b>D)</b> <i>Chlamydomonas ehrenbergi</i> , <b>E)</b> <i>Chlamydomonas reinhardi</i> , <b>F)</b> <i>Closteriosis</i> sp, <b>G)</b> <i>Chlorella</i> sp, <b>H)</b> <i>Coelastrum</i> sp, <b>I)</b> <i>Cosmarium botrytis</i> , <b>J)</b> <i>Dictyosphaerium ehrenbergianum</i> , <b>K)</b> <i>Eudorina elegans</i> , <b>L)</b> <i>Pandorina morum</i> , <b>M)</b> <i>Pediastrum dúplex</i> , <b>N)</b> <i>Scenedesmus quadricauda</i> , <b>Ñ)</b> <i>Siderocelis</i> sp, <b>O)</b> <i>Spirogyra</i> sp, <b>P)</b> <i>Tetraselmis</i> sp, <b>Q)</b> <i>Volvox aureus</i> (Tomado de Rendón <i>et al.</i> , 2015). .... | 24 |
| <b>Figura 8. Miembros de Chroococcales.</b> <i>Aphanothece</i> sp. <b>(A)</b> , <i>Chroococcus</i> sp. <b>(B y C)</b> , <i>Gloeocapsa</i> sp. <b>(D)</b> , <i>Gloeothece</i> sp. <b>(E)</b> , <i>Merismopedia</i> sp. <b>(F)</b> , colonias de <i>Microcystis</i> sp. <b>(G)</b> , colonia de <i>Microcystis aeruginosa</i> <b>(H)</b> (Tomado de Sarma, 2012). ....  | 26 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 9. Miembros de Nostocales. <i>Anabaena</i> sp. (A), <i>Nostoc</i> sp. (B), <i>Gloeotrichia</i> sp. (C), <i>Scytonema</i> sp. (D) y <i>Nodularia spumigena</i> (E)</b> (Tomado de Sarma, 2012).   | 27 |
| <b>Figura 10. Intercambio de compuestos en las asociaciones con cianobacterias.</b> N <sub>2</sub> asa: nitrogenasa, GDH: glutamato deshidrogenasa, GS-GOGAT: vía glutamino sintetasa-glutamato sintasa, H: heterocistos, V: células vegetativas (tomado en Mayz-Figueroa, 2004).  | 30 |
| <b>Figura 11. Estrategia experimental empleada para el desarrollo del proyecto.</b>  | 32 |
| <b>Figura 12. Imágenes de las microalgas y cianobacterias tomadas en un microscopio de campo claro.</b> Microalgas (MEPIK3, MEPIK14, MEPIK21, MEPIK25 y MEPIK29) y Cianobacterias (CEPIK4, CEPIK9, CEPIK11.2y CEPIK27) aisladas de <i>S. lepidophylla</i> en condiciones de invernadero.   | 41 |
| <b>Figura 13. Placa de LB (Luria Bertani) donde cada una de las rayas muestra el crecimiento bacteriano en aislados de microalgas.</b> (MEPIK1, MEPIK2, MEPIK3, MEPIK6, MEPIK7, MEPIK12, MEPIK13, MEPIK15, MEPIK16, MEPIK20, MEPIK21, MEPIK22, MEPIK23, MEPIK24, MEPIK28, MEPIK29, MEPIK31, MEPIK32 y MEPIK33. (C) indica el control que contiene únicamente medio BG11. | 42 |
| <b>Figura 14. Producción de AIA.</b> Se muestran los valores que corresponden a los aislados MEPIK3, MEPIK11, CEPIK27, MEPIK29 y MEPIK33 con y sin triptófano así mismo a <i>A. brasilense</i> Cd.   | 43 |
| <b>Figura 15. Cianobacterias BG11 libre de nitrógeno. A)</b> Cianobacterias CEPIK9 BG11- líquido. <b>B)</b> Cianobacterias CEPIK9 BG11- sólido, segunda semana de crecimiento 100x.  | 44 |
| <b>Figura 16. Cianobacterias BG11 libre de nitrógeno. A)</b> Cianobacterias CEPIK27 BG11- líquido. <b>B)</b> Cianobacterias CEPIK27 BG11- sólido, segunda semana de crecimiento 100x.  | 45 |
| <b>Figura 17. Extracción de ADN genómico de los aislados.</b> MEPIK1, MEPIK13, MEPIK16 y MEPIK33, separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.   | 47 |
| <b>Figura 18. Imagen representativa de muestras correspondientes. A)</b> Producto de PCR, <b>B)</b> Purificación del producto de PCR de la región ITS de microalgas por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular 1kb GeneRuler (Thermo Fisher SM0311).   | 47 |
| <b>Figura 19. Aislados de microalgas.</b> MEPIK1 Y MEPIK33 corresponden a microalgas los cuales se identificaron como pertenecientes al género <i>Diplosphaera</i> sp.   | 48 |
| <b>Figura 20. Microalgas.</b> Imagen representativa de microalgas los cuales se identificaron del orden Sphaeropleales.  | 49 |
| <b>Figura 21. Extracción de ADN genómico.</b> Del de integridad de ADN de los aislados, CEPIK4, CEPIK9 y CEPIK17, separados en un gel de agarosa al 1%.  | 50 |
| <b>Figura 22. Amplificación por PCR. A)</b> productos de PCR con los oligonucleótidos CYA106F y CYA781Ra <b>B)</b> separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular 1kb GeneRuler (Thermo Fisher SM0311).   | 50 |



|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 23. Imagen representativa del aislado CEPIK4 el cual se identificó como <i>Phormidium</i> sp.</b> .....  | 51 |
| <b>Figura 24. Imagen representativa del aislado CEPIK9 el cual se identificó como <i>Nostoc</i> sp.</b> .....  | 52 |
| <b>Figura 25. Imagen representativa del aislado CEPIK17 el cual se identificó como <i>Leptolyngbya</i> sp.</b> .....   | 52 |
| <b>Figura 26. Árbol filogenético.</b> Construido con las secuencias de los aislados MEPIK33 y MEPIK1 que corresponden al género <i>Displophaera</i> sp. MEPIK13 y MEPIK16 corresponde al orden Sphaeropleales con la base de datos del NCBI, en base al método de máxima verosimilitud. .... | 53 |

## Índice de tabla

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabla 1. Antibióticos</b> .....  | 35 |
| <b>Tabla 2. Condiciones de PCR (16S)</b> .....  | 37 |
| <b>Tabla 3. Condiciones de PCR (ITS)</b> .....  | 37 |
| <b>Tabla 4. Reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b> .....   | 37 |
| <b>Tabla 5. Aislados de cianobacterias y microalgas de <i>Selaginella lepidophylla</i> en condiciones de invernadero</b> .....  | 39 |
| <b>Tabla 6. Grupos con características iguales de cianobacterias y microalgas</b> .....   | 40 |
| <b>Tabla 7. Identificación por claves taxonómicas</b> .....   | 46 |
| <b>Tabla 8. Resultados de la identificación molecular de microalgas a partir de la secuenciación de la región ITS y comparación mediante análisis tipo BLAST</b> .....    | 49 |
| <b>Tabla 9. Resultado de la identificación molecular de cianobacterias a partir de la secuenciación de la región 16S y comparación mediante análisis tipo BLAST</b> ..... | 53 |
| <b>Tabla 10. Especies de cianobacterias reportadas en el transcriptoma de <i>S. lepidophylla</i></b> .....  | 54 |

## RESUMEN

Las interacciones de las plantas con diversas especies bacterianas a través de la rizósfera y filósfera y dando como resultado la alteración de actividades biológicas junto con estrategias de defensa contra el estrés biótico y abiótico. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal y los hongos micorrícicos son capaces de inducir el crecimiento de las plantas directamente por un incremento en la asimilación de macronutrientes y minerales; y en las concentraciones de hormonas esenciales y/o indirectamente a través de la disminución de los impactos negativos ocasionados por patógenos. Las especies microbianas sobreviven como epífitos, mientras que los endófitos son aquellos que habitan los tejidos vegetales internos. Estudios recientes han demostrado que el crecimiento y desarrollo de una planta depende en mayor medida de estas especies simbióticas microbianas. En el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas (CEIB-UAEM) desde hace varios años se trabaja con la especie vegetal tolerante a la desecación de *Selaginella lepidophylla*, también conocida como planta de resurrección, en un proyecto que tiene como objetivo elucidar el papel de los microorganismos endófitos en el proceso de tolerancia a la desecación y específicamente en este trabajo de investigación se aislaron y caracterizaron cianobacterias y microalgas de plantas traídas de campo y que fueron mantenidas y crecidas en condiciones controladas de invernadero. Para el aislamiento de cianobacterias y microalgas se utilizó medio de cultivo BG11 obteniendo 30 aislados de las cuales seis correspondieron a cianobacterias y 24 de microalgas, y todos fueron aislados como microorganismos epífitos. Estos aislados se clasificaron de acuerdo con su morfología, y se establecieron protocolos para descontaminar los aislados de otros microorganismos utilizando antibióticos como ampicilina, rifampicina y kanamicina. Se cuantificó la producción de ácido indolacético (AIA) de cinco cepas, que se lograron descontaminar, siendo MEPIK33 la mayor productora de AIA y por sus características morfológicas y mediante herramientas moleculares, se identificó como una microalga del género *Diplosphaera* sp.

También se identificaron cianobacterias de los géneros *Phormidium*, *Nostoc* y *Leptolyngbya* y microalgas del género *Diplosphaera* y del orden Sphaeropleales. Se obtuvieron dos aislados identificados como del género *Nostoc*, que es un género fijador de nitrógeno, pero al crecerse en medio libre de nitrógeno para promover la formación de heterocistos, éstos aislados no presentaron estas células, por lo que se sospecha que no son aislados fijadores de nitrógeno. Se confirma que *S. lepidophylla* alberga cianobacterias y microalgas aún en condiciones de invernadero y que, por las características de los aislados de ambos grupos, pueden ser utilizados como biofertilizantes.

## 1. Introducción

Las cianobacterias constituyen el grupo de procariotas fotosintéticas más grande, diverso y distribuido del planeta. Estos organismos son capaces de llevar a cabo los procesos de fotosíntesis oxigénica y respiración en el mismo compartimiento simultáneamente. Esta singular característica les permite sobrevivir y prosperar en un amplio rango de condiciones ambientales (Vermaas, 2001) tanto en sistemas acuáticos como terrestres, incluidas las plantas, ya que estas pueden servir de sustrato. Las plantas pueden formar asociaciones simbióticas con especies de cianobacterias, siendo las especies del género *Nostoc* las más frecuentemente encontradas (Adams, 2000; Wong y Meeks, 2002). La diversidad tanto citomorfológica y fisiológica de procariotas es extensa en formas, podemos encontrar biotipos filamentosos, unicelulares y coloniales. Las filamentosas son el resultado de varias divisiones celulares, las cuales están repetidas dando lugar a una hilera de células que van consecutivas denominadas *tricoma*. Las unicelulares se distinguen por ser ovoides, esféricas o cilíndricas. Las cianobacterias también pueden presentar células especializadas en la fijación de nitrógeno llamadas heterocistos.

La fijación biológica de nitrógeno (N) por cianobacterias en asociación con musgos puede ser un importante suministro de N a los ecosistemas terrestres (Arróniz *et al.*, 2014). Una vez fijado este elemento en la biomasa bacteriana es incorporado y reciclado al interior del ecosistema, quedando disponible para las plantas (Chapin *et al.*, 1994). El nitrógeno es un elemento integral de varios compuestos esenciales de las plantas, entre los más importantes se destacan los aminoácidos, que son las unidades estructurales de las proteínas, de moléculas de enzimas, vitaminas, hormonas y ácidos nucleicos; también es componente de la molécula de clorofila por lo que además es esencial en la utilización de los carbohidratos y estimula el crecimiento y desarrollo radicular (Benimeli, 2019). Algunas cianobacterias tienen la facultad de interactuar de manera mutualista y en asociaciones simbióticas con diversos organismos eucariotas, incluidas las plantas tales como briofitas, cycadas y angiospermas (Rai y Bergman, 2000) o pueden formar parte de matas microbianas compactas, con una estratificación vertical característica, conteniendo grupos microbianos funcionalmente distintos (Howard-Williams y Vincent, 1990; Paerl y Stepe, 2000).

La historia evolutiva de la fotosíntesis de las microalgas eucariotas empezó hace millones de años, estos organismos se establecieron exitosamente en ambientes terrestres (Vries y Archibald 2018). Estas microalgas realizan funciones importantes y multifuncionales, tales como, roles ecológicos, por ejemplo, en la productividad primaria, estabilización de suelos y ciclo del nitrógeno (Karsten y Holzinger 2014).

También se encuentran en todas las regiones climáticas en diversos hábitats, como paredes de edificios urbanos (Raabová *et al.* 2016), como costras del suelo en regiones montañosas (Lewis y Flechtner 2002; Karsten y Holzinger 2014), o como endolitos antárticos (Büdel *et al.*, 2016). Además, varias microalgas son unicelulares, como miembros de los géneros *Stichococcus* y *Diplosphaera* y pueden actuar como fotobiontes típicos en líquenes (Fontaine *et al.*, 2012). Independientemente de la aparición en las costras biológicas del suelo, biopelículas, o en simbiosis, las microalgas terrestres son típicamente expuestas a una amplia gama de condiciones que cambian rápidamente los parámetros ambientales.

Las fluctuaciones frecuentes de las condiciones ambientales son comunes en la mayoría de los hábitats terrestres, así como para hábitats acuáticos.

Los factores de estrés más importantes para las algas verdes terrestres son la desecación, las altas temperaturas y la radiación solar. Estas desarrollaron características morfológicas, fisiológicas, y mecanismos bioquímicos de aclimatación para hacer frente a estos factores ambientales extremos (Hoffmann, 1989), como la capacidad de sintetizar osmolitos que retienen agua (Yancey, 2005) y protectores solares UV (Hartmann *et al.*, 2020) o forman colonias y biopelículas que también reducen pérdida de agua (Karsten *et al.*, 2007).

Además, las microalgas son microorganismos eucariotas capaces de realizar fotosíntesis oxigénica, gracias a que contiene clorofila a y otro tipo de pigmentos fotosintéticos. Estos organismos tienen una gran diversidad en cuanto a su morfología, tamaño y cabe destacar que para su identificación son Gram positivos.

*Selaginella lepidophylla* conocida comúnmente como planta de resurrección, doradilla, flor de roca, siempre viva, es una licofera perteneciente al género *Selaginella* y fue la primera planta vascular reportada en la literatura científica con la capacidad de sobrevivir a la pérdida de hasta el 95% del contenido de agua durante largos períodos (Adams *et al.*, 1990; Iturriaga *et al.*, 2000; Brighigna *et al.*, 2002; Vázquez-Ramírez *et al.*, 2005; Banks, 2009; Vargas *et al.*, 2009; VanBuren *et al.*, 2018). Esta especie se encuentra filogenéticamente en los primeros linajes divergentes de las plantas vasculares, además de presentar similitudes morfológicas ancestrales (VanBuren *et al.*, 2018).

## 2. Marco teórico

### 2.1 Estrés en organismos

En el área biológica el término estrés ha adquirido una connotación más amplia, refiriéndose tanto a los estímulos ambientales que se apartan de los rangos óptimos como al estado fisiológico que se observa en el organismo como consecuencia de los estímulos ambientales negativos (Larcher,1995).

Para los factores de estrés se han determinado distintas clasificaciones, por lo que generalmente se dividen en biótico y abiótico (**Figura 1**). Dentro del estrés biótico se encuentran las acciones de los seres vivos, por ejemplo, animales o las mismas plantas en interacciones como mutualismo, simbiosis y competencia entre otras, también por microorganismos como bacterias u hongos y por último virus o viroides. El estrés abiótico se debe tanto a un exceso o déficit en un entorno físico o químico. Condiciones ambientales que causan daños a las plantas incluyen inundaciones, sequías, temperaturas altas o bajas, excesivas salinidades del suelo, nutrientes minerales y exceso o insuficiente de luz (Buchanan *et al.*, 2000).



**Figura 1. Tipos de estrés.** Las plantas son afectadas por situaciones que les impide expresar su máximo potencial de rendimiento, estos factores estresantes se dividen en dos grupos, abióticos y bióticos.

### **2.1.1 Estrés abiótico**

Son tres los niveles que se dan como respuesta en el estrés abiótico, el primero es a un nivel fisiológico (crecimiento y desarrollo), ocurre el reconocimiento de la señal en la raíz consiguiendo inhibir la germinación en semillas, senescencia prematura, se presenta pérdida en la turgencia y ajuste osmótico; se reduce el potencial hídrico, la asimilación de nutrientes y nitrógeno, la fotosíntesis, la concentración interna y conductancia estomática del CO<sub>2</sub>. Se produce toxicidad metabólica generando la acumulación de inhibidores de crecimiento. También ocurren alteraciones en la tasa de transpiración y respiración (Verma *et al.*, 2013). El segundo nivel corresponde al bioquímico, donde se disminuye la eficiencia fotoquímica y la actividad de la RuBisCO (ribulosa-1,5-difosfato carboxilasa oxigenasa), se acumulan metabolitos (malondialdehído monohidroascorbato, glutatiónes, poliaminas y  $\alpha$ -tocoferoles), se incrementan las enzimas antioxidantes SOD (superóxido dismutasa), CAT (catalasa), APX (ascorbato peroxidasa), POD (peroxidasa) así como la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Shao *et al.*, 2008). Y por último a nivel molecular, donde se van expresando los genes para dar una respuesta al estrés abiótico.

### **2.1.2 Estrés hídrico**

Las plantas en alguna etapa de su desarrollo presentan cierto tipo de estrés, la más frecuente es la falta de agua. El estrés hídrico se caracteriza por la reducción del contenido de agua, la turgencia, el potencial hídrico total, el marchitamiento, el cierre de estomas y la disminución del crecimiento celular. El estrés hídrico severo puede resultar en la detención de la fotosíntesis, alteración del metabolismo y finalmente la muerte (Shao *et al.*, 2008).

Una de las principales respuestas al estrés hídrico es la modificación de la expresión génica, relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico (Bray, 1997; Zhu *et al.*, 2002). Los osmolitos funcionan para ajustar el balance osmótico y favorecen a que las plantas adsorban agua. La respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés generalmente incluye la alteración en la expresión de proteínas. Estos cambios generalmente están relacionados con el aumento o la disminución de la expresión de genes específicos y dependen de la naturaleza, duración y severidad del estrés (Moreno, 2009).

## 2.2 El género *Selaginella*

En el género *Selaginella* se encuentran las plantas vasculares más antiguas en la tierra. Donde se cuentan con registros fósiles de *Selaginella* que datan de hace 333 a 350 millones de años, los cuales al ser comparado con las especies actuales resultan interesante las grandes similitudes morfológicas que presentan (Banks, 2009; VanBuren *et al.*, 2018). La familia Selaginellaceae junto con Lycopodiaceae e Isoeteaceae pertenecen a la clase Lycophyta. Dentro de la familia Selaginellaceae el único género que presenta es *Selaginella* el cual es un grupo monofilético de los monilófitos por ejemplo helechos, *Equisteum* y *Psilotum*, también se encuentran las plantas con semillas (gimnosperma y angiosperma). Estas plantas presentan micrófilas y esporangios axiales contando con 700 especies incluidas las de climas desérticos, templados, tropicales y árticos capaces de tolerar condiciones de sequía y heladas (Banks, 2009). La adaptación de las plantas a periodos de desecación se indica que se ha ido modificando con el paso de los años ya que algunas plantas sobreviven cerca de la anhidrobiosis con menos del 10% del contenido relativo de agua durante la sequía prolongada, cabe mencionar que los mecanismos de las angiospermas evolucionaron a partir de la dispersión de semillas y/o polen (VanBuren *et al.*, 2018).

Gracias a esta evolución permitió que *Selaginella* pueda tener protección a los rayos UV, la producción de lignina brindándole rigidez a su pared celular protegiéndola de patógenos, gracias la que sintetiza metabolitos secundarios. Algunas especies de este género son utilizadas como medicina tradicional como ejemplo se tiene que *Selaginella moellendorffii* cuenta con compuestos biflavonoides ginkgetina y esta puede inhibir las células cancerígenas, *S. tamariscina* inhiben la inducción del ácido nítrico y prostaglandinas implicadas en la patogénesis de algunos cánceres (Banks, 2009).

### 2.2.1 *Selaginella lepidophylla*

*S. lepidophylla* pertenece al Reino Plantae, Filo Tracheophyta, Clase Lycopodiopsida, Orden Selaginellales, Familia Selaginellaceae, Género *Selaginella* y Especie *Selaginella lepidophylla* (NCBI, 2007). Están distribuidas en zonas tropicales de todo el mundo, aunque existen algunas especies en desiertos y en zonas de alta montaña. En México se localizan en los estados de Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, México, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Zacatecas (Iturriaga *et al.*, 2000; Vázquez-Ramírez *et al.*, 2005; Banks, 2009; Vargas *et al.*, 2009). Típicamente se encuentra

a una altitud de 1380 a 1840 msnm; normalmente crece en afloramientos de roca ígnea expuesta y menos frecuentes en taludes de tierra en forma expuesta o sombreada. El tipo de vegetación donde predomina *S. lepidophylla* es en bosque tropical caducifolio, bosque mixto con enebro e incluso en encinares en la Cuenca del Balsas (Abundiz y Tejero, 1990). Durante la época de primavera son consideradas especies xerofitas debido a la capacidad para sobrevivir largos períodos de sequía (Adams *et al.*, 1990). El aspecto de las plantas durante el estado hidratado presenta la expansión de las micrófilas con una coloración verde, mientras que en estado deshidratado las micrófilas forman una bola o roseta de tono marrón, su tamaño aproximado de 10 cm de diámetro, al ser hidratada la planta comienza nuevamente a extender las micrófilas y de tonalidad verde. También se caracteriza por no presentar flores ni tallos, su reproducción es por medio de esporas. La ramificación de brotes y raíces es dependiente del meristemo apical, el cual se va bifurcando para dar dos nuevos ápices y cada bifurcación forma una Y. La rizósfera se define como el volumen del suelo adyacente y está influenciada por las raíces de la planta, y representa una región de intensa actividad microbiana (Westover, 1997). La rizósfera es un ambiente que la planta misma ayuda a crear y donde los microorganismos patógenos y benéficos constituyen una fuerte influencia sobre la salud y crecimiento de las plantas (Ochoa, 2010). El grupo de microorganismos y otros agentes que se encuentran en la rizósfera incluyen bacterias, hongos, nemátodos, protozoos, algas y microartrópodos (Johansson *et al.*, 2004). Los mecanismos por los que microorganismos logran ejercer un beneficio en el crecimiento de las plantas son: a) biofertilización; b) estimulación del crecimiento de raíces; c) rizoremediación y d) control al estrés de las plantas. La micrófila son hojas que contienen un solo haz de tejido vascular, habitualmente pequeñas, se suelen asociar con tallos que tienen protostelas (Lobato y Cidras, 2013). El rizóforo (**Figura 2A**) es una modificación del tallo en un tipo de raíces adventicias que surgen en el ángulo que forma el tallo y las hojas (axilarmente). Las yemas axilares son un conjunto de células que forman un meristemo y unas pequeñas hojas rudimentarias o primordios foliares protegiendo a dicho meristemo. Todo este conjunto se encuentra en los nudos, en la zona entre la inserción del peciolo de la hoja y el tallo, y dará lugar a las ramas laterales. Las micrófilas se curvan formando una esfera de color marrón de un tamaño de 6 – 10 cm de diámetro, una vez que la planta vuelve a ser hidratada se expanden las micrófilas formando una roseta y vira a un color verde para reanudar el crecimiento normal (Iturriaga *et al.*, 2000; Banks, 2009) (**Figura 2B**).





**Figura 2. Estructuras de una planta de *Selaginella lepidophylla*.** Se muestran sus principales tejidos vegetativos **(A)** las micrófilas y **(B)** el rizóforo.

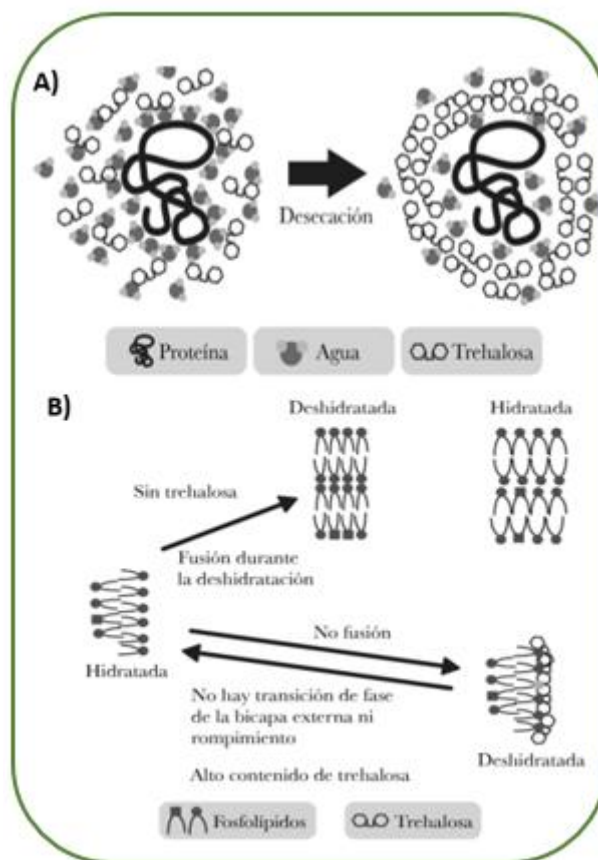
La disposición de las micrófilas y la simetría de rodaje se clasifican como anisofila o isofila. Sus requerimientos son en general muy básicos con suelos drenados, poca agua y exposición constante al sol (Iturriaga *et al.*, 2000; Vázquez-Ramírez *et al.*, 2005; Banks, 2009; Vargas *et al.*, 2009). Es una planta empleada en la medicina tradicional para el tratamiento de cálculos biliares, dolor de riñón, infecciones en el tracto urinario y diuréticos (Vázquez-Ramírez *et al.*, 2005). Esta especie de licopodio cuenta con un genoma de 109 Mb y tiene una extrema tolerancia a la desecación, ya que puede sobrevivir a la pérdida de más del 95% de agua celular durante décadas en un estado inactivo (VanBuren *et al.*, 2018). Gracias a su característica de sobrevivir mucho tiempo sin agua se analizó el transcriptoma de *S. lepidophylla* donde se encontraron genes que corresponden a cianobacterias (**Figura 3 y 4**). La tolerancia a la desecación que presenta *S. lepidophylla* es debido a que acumula un disacárido llamado trehalosa.





### 2.3 Trehalosa

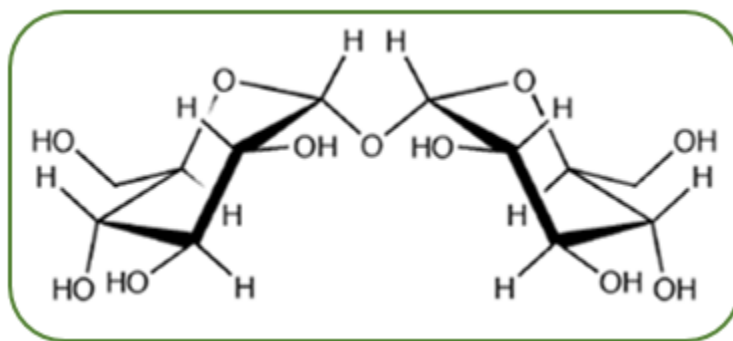
La trehalosa es un disacárido no reductor, formado por dos moléculas de glucosa. En la naturaleza se encuentra ampliamente distribuida y ha sido aislada de algas, bacterias, hongos, insectos, invertebrados y levaduras, así como también de plantas no vasculares como la licofita *S. lepidophylla*. Además de su papel como carbohidrato de reserva, la trehalosa actúa en la protección de proteínas (**Figura 5**) y membranas celulares de la inactivación o desnaturalización ocasionadas por diversas condiciones de estrés que incluyen deshidratación, calor, frío y salinidad (Suárez *et al.*, 2015).



**Figura 5. Modelo de osmoprotección mediado por la trehalosa. A)** Modelo de protección de las proteínas durante la desecación. **B)** Modelo de protección de las membranas celulares durante la desecación (Tomada de Suárez *et al.*, 2015).

### 2.3.1 Estructura fisicoquímica de la trehalosa

La trehalosa ( $\alpha,\alpha$ -trehalosa o  $\alpha$ -D-glucopiranosil  $\alpha$ glucopiranósido) (**Figura 6**) es un disacárido no reductor en el que dos moléculas de glucosa están unidas por un enlace glicosídico (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2015).



**Figura 6. Estructura química de la  $\alpha,\alpha$ -trehalosa** (Tomado de Elbein *et al.*, 2003).

### 2.4 Organismos endófitos

El término endófito proviene del griego *endon*, que significa dentro y *phyte* planta. Los endófitos más comunes se tipifican como comensales, con funciones desconocidas o aún desconocidas en las plantas y los menos comunes son aquellos que tienen efectos positivos (mutualistas) o negativos (antagónicos) en las plantas (Neves *et al.*, 2017).

Hardoim *et al.* (2015) mencionan que el término “endófito” debe referirse solo al hábitat, no a la función, y, por lo tanto, en general se deben incluir todos los microorganismos que durante todo o parte de su ciclo de vida colonizan tejidos internos de las plantas.

Los microorganismos endófitos entran por medio de la raíz, también por algunos lugares aéreos como tallos, flores, cotiledones y hojas. Hay registros de asociaciones de microorganismos endófitos con plantas como de bacterias y se ha demostrado que ciertas bacterias endofíticas mejoran el crecimiento de las plantas, aumentan la resistencia de las plantas a los patógenos, la sequía e incluso a los herbívoros, por lo que su potencial comercial ha recibido mucho estudio (Germaine, 2004). Por ejemplo, una de las aplicaciones que destaca es la de endófitos que se emplean en el área de la fitorremediación (eliminación de xenobióticos del suelo asistida por plantas) (Siciliano *et al.*, 2001).

En el norte de China la Pera Jingbai tiene un valor ecológico y económico, por lo que se han realizado estudios respecto a la estructura de las comunidades bacterianas endofíticas asociadas con diferentes tejidos y suelos de Jingbai. Los

perales se analizaron con secuenciación Illumina Miseq de rDNA bacteriano 16S, teniendo como resultado que diferentes tejidos albergaban un conjunto bacteriano único, como Cianobacteria que fue el filo más abundante, seguido de Proteobacteria y Actinobacteria (Ren, 2019).

Lu *et al.* en el año 2020 analizaron la estructura de las comunidades bacterianas endofíticas asociadas con diferentes tejidos, incluidos frutos, flores, hojas, tallos y raíces, y los suelos de la rizósfera con la secuenciación Illumina MiSeq de rDNA bacteriano 16S de la planta en peligro de extinción *Paeonia ludlowii*, obteniendo como resultado que en los tejidos vegetales Cianobacteria fue el filo bacteriano más abundante, seguido de Proteobacteria; sin embargo, los phyla más abundantes fueron Proteobacteria y Acidobacteria en muestras de suelo de tres capas diferentes.

Castillo en el año 2020 reportó bacterias endófitas aisladas de *S. lepidophylla* que se relacionan en la producción de AIA (Ácido indolacético), un porcentaje alto para la fijación de nitrógeno y en los niveles de trehalosa sugiere que la acumulación de este disacárido es por parte de la propia planta como de las bacterias endófitas.

## **2.5 Organismos epífitos**

El epifitismo es definido como una forma de vida que ocurre cuando un organismo crece sobre otro organismo vegetal, el que adquiere el nombre de forófito. (Borowitzka y Lethbridge, 1989). Esta relación biótica es considerada una posible estrategia ecológica, ya que el epífito obtiene un sustrato en óptimas condiciones de luz y protección, favoreciendo su establecimiento y desarrollo (Mateo-Cid *et al.*, 2014). El epifitismo se ubica tanto en hábitats terrestres como en acuáticos en combinación con plantas superiores e inferiores. En los climas terrestres templados muchas plantas inferiores son epífitas, tales como los musgos, líquenes, algas verdes aéreas y cianobacterias (algas azul-verdes). En los trópicos, las plantas inferiores constituyen una gran biomasa epífita, así como los musgos en los bosques de niebla (Lüttge, 1997).

## 2.6 Microalgas

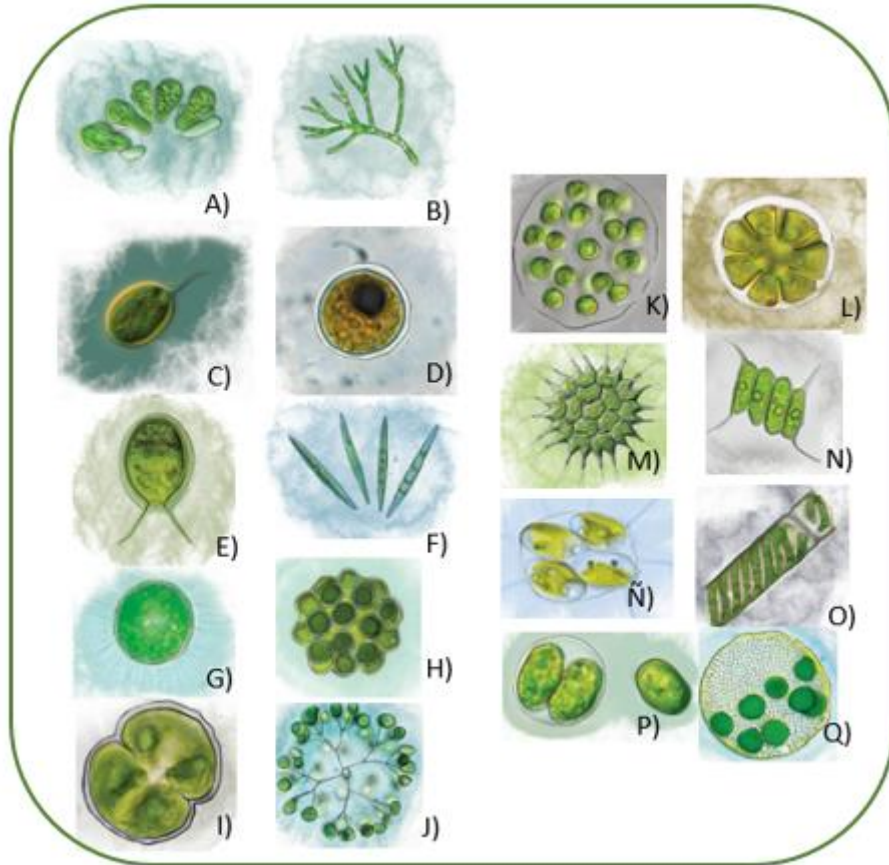
Las microalgas son organismos eucariotas unicelulares fotosintéticos que realizan la transformación de energía luminosa a energía química, contienen clorofila a además de otros tipos de pigmentos fotosintéticos. Son de gran importancia como productores primarios de la cadena trófica. Su tamaño es reducido y variado va de los 5 a los 50  $\mu\text{m}$  en promedio.

Su célula presenta un núcleo, mitocondrias y cloroplastos, vacuola de gas, pirenoide, mancha ocular entre otros organelos. Los pigmentos forman parte de la fracción lipídica polar. Las microalgas contienen tres grupos principales de pigmentos: clorofilas, carotenos y ficobilinas. Los principales pigmentos son las clorofilas y los carotenoides, que suponen del 0.5 al 5% del peso seco de la célula (Ben-Amotz *et al.*,1985). En el núcleo que contiene cada célula se encuentra el material genético, aunque este también lo pueden tener en los cloroplastos y mitocondrias. En los cloroplastos presentan sus pigmentos fotosintéticos y también pueden presentar un pirenoide, pero este suele estar asociado con el cloroplasto ya que su función es la translocación de enzimas para llevar a cabo sus funciones. Algunas especies de microalgas suelen tener mancha ocular y este funciona como fotorreceptor. En cuanto al mecanismo de osmorregulación de las microalgas, pueden acumular diferentes sustancias, como glicerol, galactosil glicéridos, manitol o prolina, en función de la salinidad, en algunos casos las microalgas están rodeadas solamente por la membrana plasmática, que puede estar envuelta en mucílago, pero la mayoría de las microalgas están rodeadas de una pared celular (Ben-Amotz *et al.*,1985).

La clasificación de los grupos de las microalgas es la siguiente:

A) Clorofíceas/Chlorophyta (Algas verdes) (**Figura 7**), B) Criptofíceas/Cryptophyta (Algas pardas), C) Crisofíceas/Chrysophyta (Algas doradas), D) Diatomeas/Bacillariophyta, E) Dinofíceas/Dinophyceae, F) Euglenofíceas/Euglenophyta y G) Xantofíceas/Xanthophyta.





**Figura 7. Miembros de Clorofíceas/Chlorophyta (Algas verdes).** A) *Botryococcus brauni*, B) *Chaetophora elegans*, C) *Chlamydomonas angulosa*, D) *Chlamydomonas ehrenbergi*, E) *Chlamydomonas reinhardi*, F) *Closteriosis* sp, G) *Chlorella* sp, H) *Coelastrum* sp, I) *Cosmarium botrytis*, J) *Dictyosphaerium ehrenbergianum*, K) *Eudorina elegans*, L) *Pandorina morum*, M) *Pediastrum dúplex*, N) *Scenedesmus quadricauda*, Ñ) *Siderocelis* sp, O) *Spirogyra* sp, P) *Tetraselmis* sp, Q) *Volvox aureus* (Tomado de Rendón *et al.*, 2015).

## 2.7 Interacción planta-microalga

Las microalgas del género *Chlorella* poseen características que las hacen ventajosas en estudios de sustancias que aportan al crecimiento de las plantas. También el interés en los biocombustibles ha impulsado diversos estudios y métodos para optimizar la producción de algas, incluido el uso de sustancias para el desarrollo de las plantas. Se han encontrado fitohormonas, incluidas auxinas, citoquininas, giberelinas, etileno, ácido abscísico (ABA), poliaminas, brasinoesteroides, jasmónidas, salicilatos y péptidos señal, en una variedad de algas (Tarakhovskaya *et al.*, 2007). Las auxinas son una de las fitohormonas más comúnmente estudiadas y participan en la promoción del crecimiento de las plantas



al controlar la división y elongación celular (George *et al*, 2008a). Por otro lado, se sabe que las microalgas contienen importantes macro y micronutrientes y estos funcionan en conjunto para mejorar la disponibilidad de nutrientes y tener cultivos saludables. Al ser inoculadas, viven asociadas con las plantas y así les benefician a su protección y nutrición.

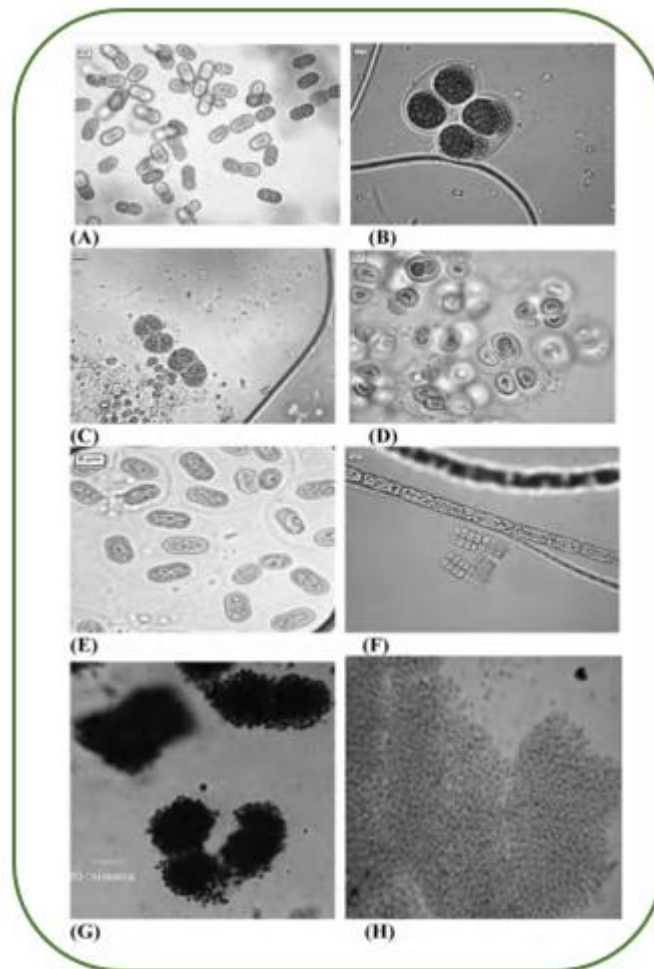
## 2.8 Cianobacterias

Las Cyanophyta, corresponden a un grupo de algas que son conocidas bajo diferentes denominaciones comunes: algas azules, algas verdeazuladas, cianofíceas, cianófitas y cianobacterias (Nuñez y Dos Santos, 2020). Las cianobacterias son organismos procariontes que carecen de organelos, pero presentan carboxisomas, protoplasma, cromatoplasma, centroplasma donde se encuentra el ADN, dentro de la región del centroplasma denominado nucleoplasma. En cuanto a su mecanismo de reproducción, que es asexual, se encuentra la reproducción por fisión binaria (que puede ser en varios planos) y por esporas (acinetos). Las esporas que las cianobacterias liberan pueden ser endosporas (originadas por división interna del protoplasto de la célula parental) o exocito (exoespora) originadas por la separación de una parte del protoplasto de la célula parental. Toxinas producidas por cianobacterias se conocen como toxinas cianobacterianas o cianotoxinas. Las cianobacterias tóxicas que forman floraciones pertenecen a los géneros *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Phormidium*, *Nodularia* y *Nostoc* (Sarma, 2012). La clasificación de las cianotoxinas se basa en las propiedades químicas o el nivel de toxicidad. Con base en su estructura química, las toxinas cianobacterianas se dividen en (1) péptidos cíclicos (2) alcaloides y (3) lipopolisacáridos, en orden de toxicidad decreciente. Con base a sus síntomas de toxicidad, las toxinas cianobacterianas se clasifican como (1) hepatotoxinas (2) neurotoxinas y (3) dermatotoxinas y por último la clasificación 1) Hepatotoxinas: microcistinas (MC), nodularina y cilindrospermopsina (CYN) son las tres hepatotoxinas producidas por las cianobacterias (Sarma., 2012).

Cabe mencionar que además de la toxicidad de las cianobacterias, también tiene efectos sobre la dinámica del ecosistema en la estabilidad de la superficie del suelo ya que esta estabilidad se promueve a través de dos mecanismos: primero, los organismos pueden agregar partículas del suelo por la producción de polisacáridos extracelulares; segundo, la forma de vida filamentosa de algunas cianobacterias genera una red que promueva la consolidación por el enredamiento de partículas de suelo. Los filamentos crean una estructura en forma de red firme y en multicapa, estabilizando el suelo, previniendo eventos de erosión. Esta capacidad de producir

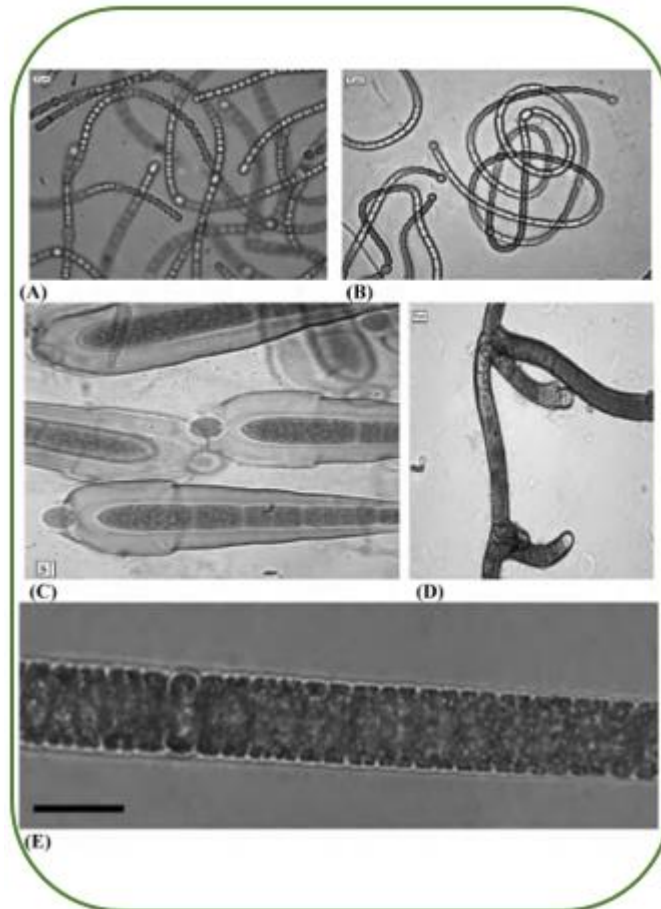
y excretar exopolisacáridos les confiere, además, tolerancia a condiciones de desecación (López y Maya, 2001).

Las formas unicelulares, por ejemplo, dentro del orden Chroococcales (**Figura 8**), se caracterizan por poseer células cilíndricas, ovoides o esféricas. Pueden encontrarse células únicas que se separan luego de la fisión binaria o agregadas, formando colonias irregulares, en las cuales una matriz de naturaleza viscosa es secretada por las células durante el crecimiento de la colonia (Mur y Utkilen, 1999).



**Figura 8. Miembros de Chroococcales.** *Aphanothece* sp. (**A**), *Chroococcus* sp. (**B** y **C**), *Gloeocapsa* sp. (**D**), *Gloeothece* sp. (**E**), *Merismopedia* sp. (**F**), colonias de *Microcystis* sp. (**G**), colonia de *Microcystis aeruginosa* (**H**) (Tomado de Sarma, 2012).

La morfología filamentosa de cianobacterias son divisiones celulares que se encuentran repetidas varias veces en el mismo plano, dando lugar a una hilera compuesta por células denominadas tricomas (**Figura 9**). El tricoma llega a estar recubierto de una vaina, cuando es así se le llama filamento. En algunos casos las formas filamentosas llegan a formar heterocistos, los cuales son células especializadas en la fijación biológica del nitrógeno.



**Figura 9. Miembros de Nostocales.** *Anabaena* sp. (A), *Nostoc* sp. (B), *Gloeotrichia* sp. (C), *Scytonema* sp. (D) y *Nodularia spumigena* (E) (Tomado de Sarma, 2012).

Son capaces de realizar fotosíntesis (aprovechan la energía lumínica) y fijación de nitrógeno atmosférico (convierten dinitrógeno a nitrato o amonio).

Así como, también la producción de fitohormonas está muy extendida entre procariontes asociados al suelo y a las plantas, por lo que en un estudio realizado demostraron que el 38% de cianobacterias liberaron IAA (Ácido indolacético) (Sergeeva *et al.*, 2002). Las fitohormonas son importantes como señales y reguladoras para el crecimiento y el desarrollo de las plantas. El ácido indol-3-acético es el más estudiado y lo refieren como el regulador del crecimiento donde

se incluyen aspectos tanto fisiológicos, bioquímicos y genéticos. Fitohormonas producidas por las bacterias asociadas a plantas están implicadas como determinantes clave en la estimulación del crecimiento de las plantas, en la patogénesis de las plantas y en procesos simbióticos asociativos o interacciones planta-microbio (Christiansen-Weniger, 1998).

### 2.8.1 Interacción planta – cianobacteria

La simbiosis cianobacterianas ocurren con representantes de las cuatro divisiones filogenéticas principales de las plantas terrestres: briófitas primitivas productoras de esporas (antocerotes y hepáticas) y helechos (*Azolla*) y las dos clases de plantas productoras de semillas, gimnospermas (*cícadas*) y angiospermas (*Gunnera*). (Meeks y Elhai, 2002).

Los musgos (*Sphagnum* spp.), hepáticas (*Marchantia* spp.) y antoceros (*Anthoceros* spp., *Notothylas* spp. y *Phaeoceros* spp.) forman asociaciones simbióticas con especies de cianobacterias, siendo especies de *Nostoc* las más frecuentemente encontradas (*N. ellipsoforum* y *N. punctiforme*) (Adams, 2000).

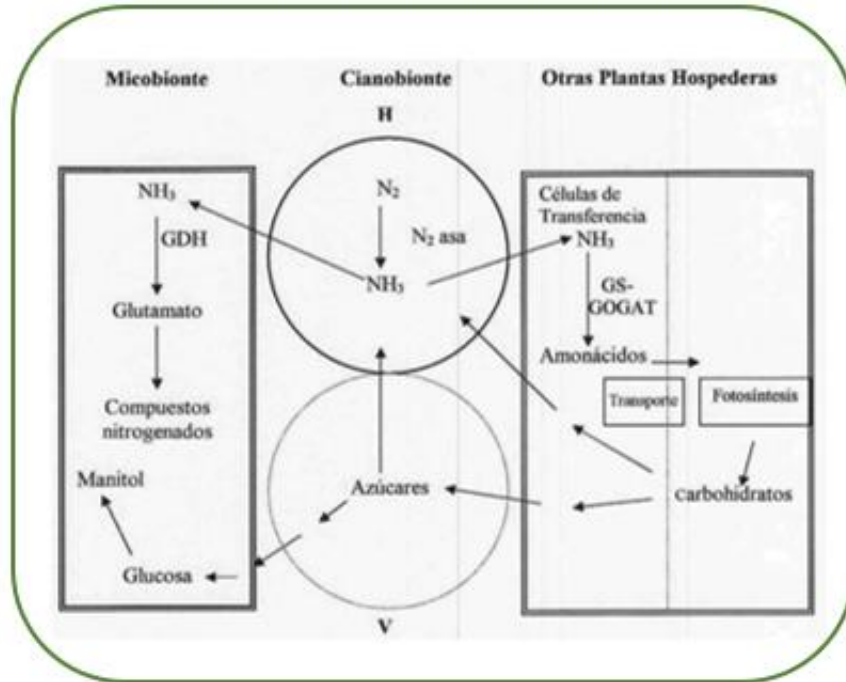
Las colonias de cianobacterias se alojan en cavidades especiales (domatias) localizadas en la parte ventral del gametofito, donde ocurre el intercambio de compuestos nitrogenados y carbohidratos (Vance *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2001). Obid y cols., (2016) definen a los biofertilizantes como sustancias compuestas por microorganismos vivos que pueden aplicarse directamente en las semillas, superficie de plantas o suelos, que colonizan la rizosfera o el interior de las plantas y promueven el crecimiento por favorecer el aporte o la viabilidad de nutrientes primarios. Las cianobacterias han sido empleadas como biofertilizantes que son un pequeño grupo de procariontes fotosintéticos, con capacidad de fijar N<sub>2</sub> estas desempeñan un papel vital en mantener a largo plazo la fertilidad de los suelos. Por otro lado, mejoran la estructura del suelo, que influye en su permeabilidad y capacidad de retención de agua (Mohan *et al.*, 2015). Estos microorganismos durante su ciclo de vida incrementan la materia orgánica y secretan compuestos bioactivos (fitohormonas, vitaminas, aminoácidos, etc.), los cuales promueven el crecimiento y desarrollo de las plantas; igualmente liberan metabolitos secundarios que ayudan al control biológico de enfermedades bacterianas y fúngicas en los cultivos. Las cianófitas son muy resistentes en condiciones de altas temperaturas y baja humedad (Nuñez y Dos Santos, 2020).

Se ha reportado que las cianobacterias contribuyen en la conversión de formas de fósforo insolubles a formas asimilables por las plantas (Hernández-Reyes *et al.*, 2019).

Las células especializadas que presentan algunas cianobacterias permiten la fijación del nitrógeno atmosférico, estas células son denominadas heterocistos y son las encargadas de proporcionar productos nitrogenados a las células vegetativas de la planta, y en turno reciben los productos fotosintéticos. Se asume que existen mecanismos reguladores (probablemente genes) que controlan la diferenciación y el patrón de distribución de los heterocistos en las cianobacterias simbióticas, a fin de optimizar la fijación de nitrógeno y por ende la simbiosis (Yoon y Golden, 2001).

### 2.8.2 Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno ( $N_2$ ) es una molécula indispensable para la composición tanto de las proteínas, ácidos nucleicos y demás componentes, por lo cual el nitrógeno es fundamental para el desarrollo y crecimiento de los organismos. En la atmósfera el  $N_2$  ocupa aproximadamente el 80% (Mayz-Figueroa, 2004). La fijación biológica de nitrógeno está relegada a organismos procariontes que son capaces de reducir el nitrógeno molecular a amoníaco tanto en vida libre como en simbiosis (Mercedes y Nuria, 2002). El  $N_2$  posee una estructura de triple enlace por lo cual es difícil que esa molécula sea aprovechada por las formas vivientes. Solo un pequeño grupo de microorganismos altamente especializados, que incluyen algas, bacterias y actinomicetos pueden asimilarlo (Mayz-Figueroa, 2004). Para que el nitrógeno pueda ser obtenido por los organismos, se debe de reducir para que posteriormente se fije. Para que el proceso de fijación se lleve a cabo, tiene que ser por medio de microorganismos tanto de vida libre o también en simbiosis con plantas (**Figura 10**) (Herrero *et al.*, 2001).



**Figura 10. Intercambio de compuestos en las asociaciones con cianobacterias.**  $N_2$  asa: nitrogenasa, GDH: glutamato deshidrogenasa, GS-GOGAT: vía glutamino sintetasa-glutamato sintasa, H: heterocistos, V: células vegetativas (tomado en Mayz-Figueroa, 2004).

### 3. Justificación

Los microorganismos endófitos desempeñan diversos papeles en el crecimiento, la sanidad y funciones ecológicas. Los endófitos mejor caracterizados son las bacterias y los hongos, mismos que establecen relaciones mutualistas benéficas con su planta hospedera. En los ecosistemas, diversos factores pueden afectar las comunidades endofíticas, incluyendo la temperatura, la precipitación y características del suelo. De igual manera, se ha reportado que los cambios temporales pueden afectar las comunidades de microorganismos endófitos. Diversas asociaciones simbióticas fijadoras de  $N_2$ , han sido estudiadas por años, por ejemplo, la asociación simbiótica Rhizobia-leguminosa y recientemente la asociación de bacterias en el intestino de las termitas, que les permite vivir alimentándose únicamente de la celulosa de la madera. Las simbiosis cianobacterianas han sido reportadas para plantas como las cícadas, las cuales poseen cianobacterias filamentosas en sus raíces; los antoceros y *Azolla*, que poseen paquetes de cianobacterias fijadoras de nitrógeno en sus hojas. Las cianobacterias han sido identificadas y asociadas a una gran variedad de plantas, entre otros organismos de distintos tipos de ambientes, por lo que en estudios recientes definen los beneficios o capacidades que las cianobacterias presentan

para proporcionar protección de las plantas. El conocimiento de cianobacterias y microalgas en la especie *S. lepidophylla* a futuro permitirá comprender el papel que juegan estos microorganismos en cuanto a la tolerancia a la deshidratación de *S. lepidophylla* y su potencial extrapolación como biofertilizantes en cultivos de interés agronómico.

#### **4. Hipótesis**

*Selaginella lepidophylla* alberga cianobacterias y microalgas con capacidad promotora del crecimiento vegetal.

#### **5. Objetivos**

##### **5.1 Objetivo General**

Caracterizar las cianobacterias y microalgas asociadas a *Selaginella lepidophylla* crecida en invernadero.

##### **5.2 Objetivos particulares**

- Aislar cianobacterias y microalgas endófitas y epífitas de *Selaginella lepidophylla* colectadas en ambiente natural y preservadas en invernadero.
- Identificar y caracterizar las cianobacterias y microalgas aisladas de la *Selaginella lepidophylla*.
- Cuantificar la producción de ácido indolacético en cianobacterias y microalgas.

## 6. Metodología

### 6.1 Estrategia experimental

Para cumplir con los objetivos del siguiente proyecto, se planteó la estrategia experimental mostrada en la figura 11.

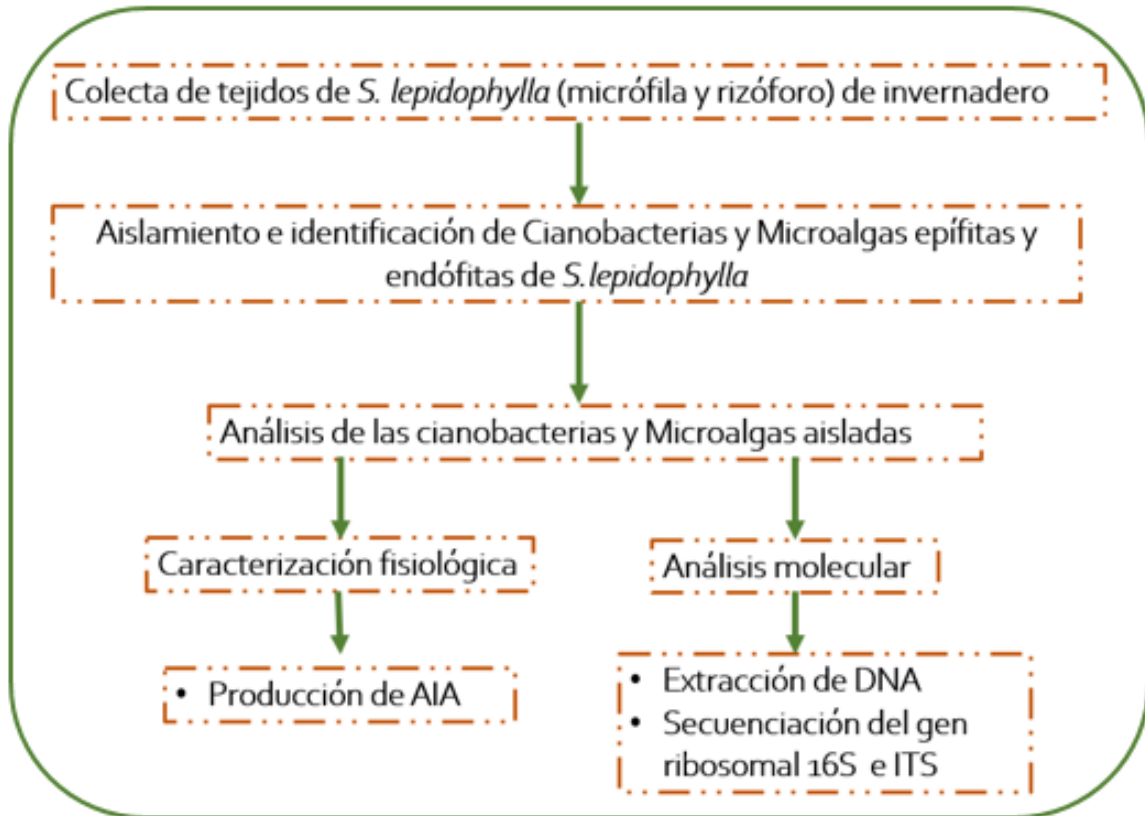


Figura 11. Estrategia experimental empleada para el desarrollo del proyecto.

### 6.2 Origen de las muestras de *S. lepidophylla*

Los aislados de cianobacterias y microalgas se obtuvieron a partir de plantas de *S. lepidophylla* colectadas en campo en la comunidad de San Andrés de la Cal, municipio de Tepoztlán Morelos. Las características que se tomaron en cuenta para la colecta son: planta adulta, sana y que cumpliera con las características de *S. lepidophylla*. Posteriormente la planta fue transportada y mantenida en condiciones de invernadero del CEIB-UAEM, durante 8 meses en sustrato Metro mix 200 (Vermiculita, Agrolita y Peat moss), su riego fue de cada tercer día con agua destilada estéril.



### **6.3 Aislamiento de cianobacterias y microalgas endófitas de la planta de *Selaginella lepidophylla* crecida en invernadero**

Para la obtención de los aislados, se transportaron las plantas del invernadero al laboratorio y los tejidos se procesaron de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Se colectó un gramo de rizóforo y de micrófila por separado y se eliminó el exceso de sustrato con agua corriente.
- 2.- Los tejidos de rizóforo y micrófila fueron transportados a la campana de flujo laminar y colocados en un recipiente estéril.
- 3.- La esterilización de los tejidos se realizó de acuerdo a los siguientes tratamientos:
  - Tejido en estado hidratado: hipoclorito de sodio al 10% y 0.05% de Tween 20 durante 10 min agitando vigorosamente.
  - Tejido en estado deshidratado: hipoclorito de sodio al 20% y 0.1% Tween 20 durante 20 min agitando vigorosamente.
- 4.- Posterior al tratamiento de desinfección se enjuagaron con agua destilada estéril (3-5 veces, agitando vigorosamente) y la eliminación del exceso de líquido se realizó colocando los tejidos sobre una pieza de papel filtro estéril (Torreblanca, 2017).
- 5.- Para verificar la correcta desinfección del tejido, se tomaron impresiones en placas Petri con medio de cultivo sólido BG11 (**Anexo 10**).
- 6.- Posteriormente, se maceró el tejido de rizóforo y micrófilas con ayuda de un mortero estéril adicionando 9 ml de una solución de MgSO<sub>4</sub> 10mM estéril.
- 7.- Se realizaron diluciones seriales con MgSO<sub>4</sub> 10 mM, tomando el extracto inicial o stock como 10<sup>-1</sup> y se platearon 100 µl de cada dilución de los extractos obtenidos hasta la dilución 10<sup>-3</sup> en cajas Petri con medio de cultivo BG11 (**Anexo 10**).
- 8.- Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias.

### **6.4 Aislamiento de cianobacterias y microalgas epífitas de la planta de *Selaginella lepidophylla* crecida en invernadero**

- 1.- Se colectó un gramo de rizóforo y de micrófila por separado y se eliminó el exceso de sustrato con agua destilada estéril.
- 2.- Cada gramo de rizóforo y micrófila se colocó en frascos estériles dentro de una campana de flujo laminar.

3.- Los tejidos de rizóforo y micrófila se lavaron vigorosamente con agua destilada estéril por separado (rizóforo y micrófilas).

4.- Posteriormente, se tomó un ml de agua destilada del enjuague de cada una de las muestras para hacer diluciones seriales hasta  $10^{-3}$

5.- Se platearon 100  $\mu$ l de cada una de las diluciones obtenidas tanto del rizóforo como de las micrófilas por separado en placas Petri con el medio de cultivo sólido BG11 (**Anexo 10**).

6.- Las placas se incubaron a 30°C hasta la aparición de colonias.

### **6.5 Caracterización fenotípica de las cianobacterias y microalgas por tinción de Gram.**

En una campana de flujo laminar los cultivos de las cianobacterias y microalgas fueron colocados en un portaobjetos con ayuda de un aza bacteriológica se colocó la muestra y se fijó con el mechero hasta que el frotis se encontrara seco para posteriormente en una rejilla de tinción de Gram llevar a cabo dicho procedimiento. El frotis se cubrió con colorante violeta de genciana por un minuto, después se drenó el colorante y sin enjuagar se colocó lugol por un minuto. Posteriormente, se aplicó una mezcla acetona-alcohol durante 30 segundos, transcurrido el tiempo se enjuago para eliminar el excedente de colorante con agua estéril, posteriormente se cubrieron los frotis con Safranina por un minuto, y nuevamente se enjuagaron con agua estéril. Por último, a las muestras teñidas se les colocó un cubreobjetos para documentar al microscopio LEICA DM500 con Objetivos de 40x y 100x (este último con aceite de inmersión).

### **6.6 Obtención de cultivos puros de cianobacterias y microalgas.**

Al realizar las observaciones en el microscopio se observaron contaminantes bacterianos y para asegurar se sembraron en un medio de cultivo para bacterias (LB), donde se confirmó la contaminación.

De acuerdo con la literatura revisada de Temraleeva (2016), para descontaminar las cianobacterias se utilizan diversos antibióticos para tratar los cultivos de acuerdo al siguiente protocolo:

1. A partir de cultivos frescos de cianobacterias se sembraron con palillos estériles a medio de agar LB incubando a 37° C durante 24 h.
2. Los aislados de cianobacterias en los que se notó crecimiento bacteriano se procedió al tratamiento con antibiótico.
3. En un nuevo tubo con medio BG11 se suplementó con casaminoácidos (CAA) 5% y Glucosa (Glu) 1%

4. Se adicionaron los diferentes antibióticos en las concentraciones mostradas en la tabla 1.
5. Posteriormente se sembró la cepa de cianobacteria y microalga.
6. Se incubó a 30° C en oscuridad de 24 a 48h.

**Tabla 1. Antibióticos**

| <b>Antibiótico</b> | <b>Concentración</b> |
|--------------------|----------------------|
| Ampicilina         | 1000 µg/ml           |
| Rifampicina        | 50 y 100 µg/ml       |
| Kanamicina         | 150 y 200 µg/ml      |

#### **6.6.1 Lavado de cianobacterias y microalgas de los tratamientos con antibióticos**

1. Transferir un ml de los cultivos tratados con los antibióticos y colocarlos en tubos eppendorf de 1 mL.
2. Se centrifugó a 6000 rpm por dos minutos y eliminar el sobrenadante.
3. Se agregó MgSO<sub>4</sub> (Sulfato de magnesio) 10 Mm, 0.05% Tween y nuevamente los antibióticos a las diferentes concentraciones.
4. Se agitó por 20 segundos e incubar cinco minutos como máximo, nuevamente centrifugar a 6000 rpm durante dos minutos.
5. Se retiró el sobrenadante y enjuagar las células con sulfato de magnesio 10 mM, tres veces.
6. A cada muestra se le adicionaron 500 µl de BG11 con ciclohexamida (CyCl) 20 µg/ml.
7. Se tomaron 100 µl de los 500 µl de BG11 + CyCl. Las muestras se incubaron a 30 °C con luz constante por 7 días.

#### **6.7 Determinación de ácido indolacético en cianobacterias y microalgas**

Los cultivos crecidos durante 18 días en medio BG11 con triptófano (Trp) 750 µg/ml se centrifugaron a 5,000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante del cultivo se utilizó para las determinaciones de los compuestos indólicos con el reactivo de

Salkowski (Glickmann y Dessaux 1995). El reactivo de Salkowski, modificado según Pilet y Chollet (1970) se añadió al sobrenadante en una proporción de 1:1 (v / v) se incubó por 30 minutos en oscuridad y se leyó a 540 nm. Las concentraciones de AIA se estimaron usando una curva patrón del compuesto puro (Sergeeva *et al.*, 2002).

## 6.8 Determinación de la formación de heterocistos

Al tener microorganismos con características del género *Nostoc* y *Anabaena* y el medio BG11 donde se sembraron cuenta con los nutrientes para su crecimiento por lo cual se crecieron las cianobacterias en medio BG11 libre de nitrógeno (sólido y líquido) (**Anexo 11**) para verificar si desarrollaban o no heterocistos. Posteriormente transcurrida una y dos semanas se coloca en portaobjetos la muestra y cubriéndolas con un cubreobjetos para observar al microscopio LEICA DM500 con objetivos de 40x y 100x este último con aceite de inmersión.

## 6.9 Identificación por claves taxonómicas

En colaboración con la maestra Judith García Rodríguez del Laboratorio de Acuicultura e Hidrobiología (CIB-UAEM), se llevó a cabo la identificación por claves taxonómicas (Gómez y Corral, 2011) y observaciones al microscopio (marca LEICA) en el objetivo 40X.

## 6.10 identificación de cianobacterias y microalgas mediante herramientas moleculares

### 6.10.1 Extracción de ADN de las cianobacterias y microalgas e identificación molecular.

A partir de cultivos líquidos de cianobacterias y microalgas, se colectaron las células por centrifugación y se extrajo ADN genómico por el método de CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio), fenol y cloroformo/alcohol isoamílico (Murray & Thompson, 1980) (**Anexo 3**). Posteriormente se amplificó el gen ribosomal 16S rRNA por PCR (**Tabla 4**) con los oligonucleótidos CYA106F 5'-CGGACGGGTGAGTAACGCGTGA-3' CYA781R 5'-GACTACTGGGGTATCTAATCCCATT-3' (Nübel *et al.*, 1997) en el caso de cianobacterias (**Tabla 2**) y para las microalgas fue amplificado la región espaciadora transcrito interno (ITS) con los oligonucleótidos ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (Argotti & Cazar, 2011) (**Tabla 3**).

| <b>Tabla 2. CONDICIONES DE PCR (16S)</b> |       |             |
|--|-------|-------------|
| <b>Desnaturalización inicial</b>         | 95°C  | 5 minutos   |
| <b>Desnaturalización</b>                 | 95°C  | 60 segundos |
| <b>Alineación</b>                        | 60 °C | 60 segundos |
| <b>Extensión</b>                         | 72 °C | 60 segundos |
| <b>No. de ciclos</b>                     | 35    |             |
| <b>Extensión final</b>                   | 72°C  | 5 minutos   |

| <b>Tabla 3. CONDICIONES DE PCR (ITS)</b> |       |             |
|--|-------|-------------|
| <b>Desnaturalización inicial</b>         | 95°C  | 5 minutos   |
| <b>Desnaturalización</b>                 | 95°C  | 30 segundos |
| <b>Alineación</b>                        | 55 °C | 30 segundos |
| <b>Extensión</b>                         | 72 °C | 60 segundos |
| <b>No. de ciclos</b>                     | 40    |             |
| <b>Extensión final</b>                   | 72°C  | 5 minutos   |

| <b>Tabla 4. Reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</b> |                      |
|---|----------------------|
| <b>Reactivo</b>   | <b>Concentración</b> |
| H <sub>2</sub> O  | cbp 50µl             |
| Buffer (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (10X)                | 1x                   |
| dNTP's  | 0.16 mM              |
| Oligonucleótidos  | 20 pmol              |
| MgCl <sub>2</sub>   | 1.5 mM               |
| Taq-pol   | 1 unidad             |
| ADN   | 100ng                |

El producto de PCR se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Los productos de PCR se purificaron del gel de agarosa con el protocolo de GeneJET Gel Extraction Kit #K0692 Thermo Scientific (**Anexo 4**). Se cuantificó el producto purificado por medio de NanoDrop 2000 y nuevamente se visualizó en un gel de agarosa al 1%. El producto de PCR purificado se envió a secuenciar al Instituto de Biotecnología-UNAM y Macrogen. Las secuencias obtenidas se analizaron utilizando la herramienta de búsqueda de alineamiento de nucleótidos básica local (BLASTn, por sus siglas en inglés) de la base de datos NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

### **6.10.2 Análisis filogenético**

A partir de las secuencias obtenidas de los diferentes aislados de cianobacterias y microalgas, se realizó un análisis comparativo con las secuencias registradas en la base de datos del NCBI (BLATS), para posteriormente construir árboles filogenéticos en el programa MEGA (<https://www.megasoftware.net/>).

## 7. Resultados

### 7.1 Aislamiento de cianobacterias y microalgas epífitas de la planta *Selaginella lepidophylla* crecida en invernadero

Se obtuvieron un total de 30 aislados (**Anexo 7**) seis de cianobacterias y 24 de microalgas en el medio selectivo BG11 (**Figura 12**), los cuales se identificaron previamente con una clave secuencial por morfología y que se muestra en la tabla 5. Posteriormente se realizó una reagrupación que consiste en seis grupos (**Anexo 7**) los cuales cada uno presentaba características iguales (**Tabla 6**).

**Tabla 5. Aislados de cianobacterias y microalgas de *Selaginella lepidophylla* en condiciones de invernadero**

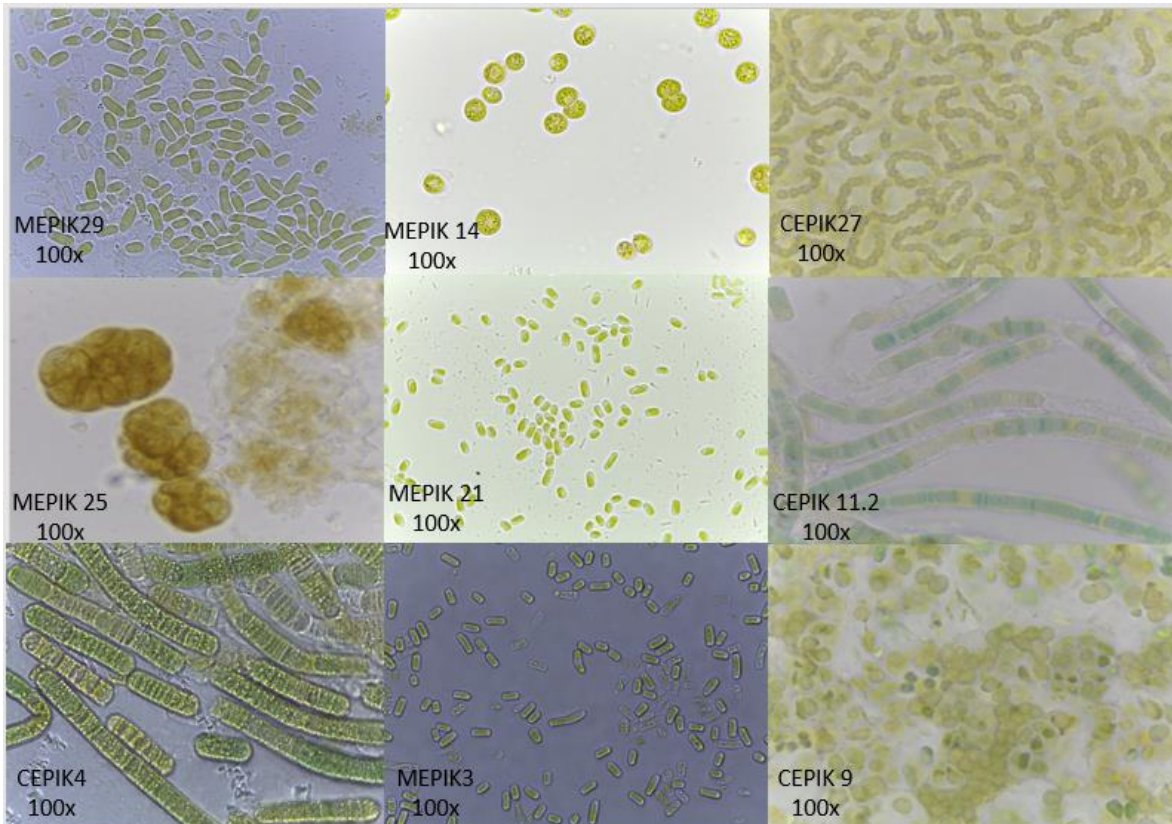
| UNICELULARES   | COLONIA          |
|--|------------------|
| 1.- MEPIK1 MH  | 23.- MEPIK25 RH  |
| 2.-MEPIK2 MH   | 24.-MEPIK26 RH   |
| 3.-MEPIK3 MH   |                  |
| 4.-MEPIK6 MH   | 25.-CEPIK4 MH    |
| 5.-MEPIK7 MH   | 26.-CEPIK9 MH    |
| 6.-MEPIK11 MH  | 27.-CEPIK10 RH   |
| 7.-MEPIK12 MH  | 28.-CEPIK11.2 MH |
| 8.-MEPIK13 MH  | 29.-CEPIK17 MH   |
| 9.-MEPIK14 MH  | 30.-CEPIK27 RH   |
| 10.-MEPIK15 MH   |                  |
| 11.-MEPIK16 MH   |                  |
| 12.-MEPIK20 MH   |                  |
| 13.-MEPIK21 MH   |                  |
| 14.-MEPIK22 MH   |                  |
| 15.-MEPIK23 MH   |                  |
| 16.-MEPIK24 MH   |                  |
| 17.-MEPIK28 MH   |                  |
| 18.-MEPIK29 MH   |                  |
| 19.-MEPIK30 MH   |                  |
| 20.-MEPIK31 MH   |                  |
| 21.-MEPIK32 MH   |                  |
| 22.-MEPIK33 MH   |                  |
| <b>Micrófila hidratada (MH) Rizóforo hidratado (RH)</b>  |                  |
| <b>MEP: microalga epífita CEP: cianobacteria epífita</b> |                  |

**Tabla 6. Grupos con características iguales de cianobacterias y microalgas**

| <b>Grupo A</b>   | <b>Grupo B</b> | <b>Grupo C</b> | <b>Grupo D</b> |
|------------------|----------------|----------------|----------------|
| CEPIK 4          | MEPIK 13       | MEPIK 1        | MEPIK 25       |
| CEPIK 11.2       | MEPIK 14       | MEPIK 2        | MEPIK 26       |
| <b>Grupo A.1</b> | MEPIK 15       | MEPIK 3        |                |
| CEPIK9           |                | MEPIK 6        |                |
| CEPIK 27         |                | MEPIK 7        |                |
| <b>Grupo A.2</b> |                | MEPIK 11       |                |
| CEPIK 10         |                | MEPIK 12       |                |
| CEPIK 17         |                | MEPIK 16       |                |
|                  |                | MEPIK 20       |                |
|                  |                | MEPIK 21       |                |
|                  |                | MEPIK 22       |                |
|                  |                | MEPIK 24       |                |
|                  |                | MEPIK 28       |                |
|                  |                | MEPIK 29       |                |
|                  |                | MEPIK 30       |                |
|                  |                | MEPIK 31       |                |
|                  |                | MEPIK 32       |                |
|                  |                | MEPIK 33       |                |

**Grupo A:** filamentos gruesos **Grupo A1:** filamentos de cadena **Grupo A2:** filamentos delgados **Grupo B:** Células redondas **Grupo C:** Células ovaladas **Grupo D:** sin definirse.





**Figura 12. Imágenes de las microalgas y cianobacterias tomadas en un microscopio de campo claro.** Microalgas (MEPIK3, MEPIK14, MEPIK21, MEPIK25 y MEPIK29) y Cianobacterias (CEPIK4, CEPIK9, CEPIK11.2y CEPIK27) aisladas de *S. lepidophylla* en condiciones de invernadero.

## 7.2 Obtención de cultivos puros de cianobacterias y microalgas

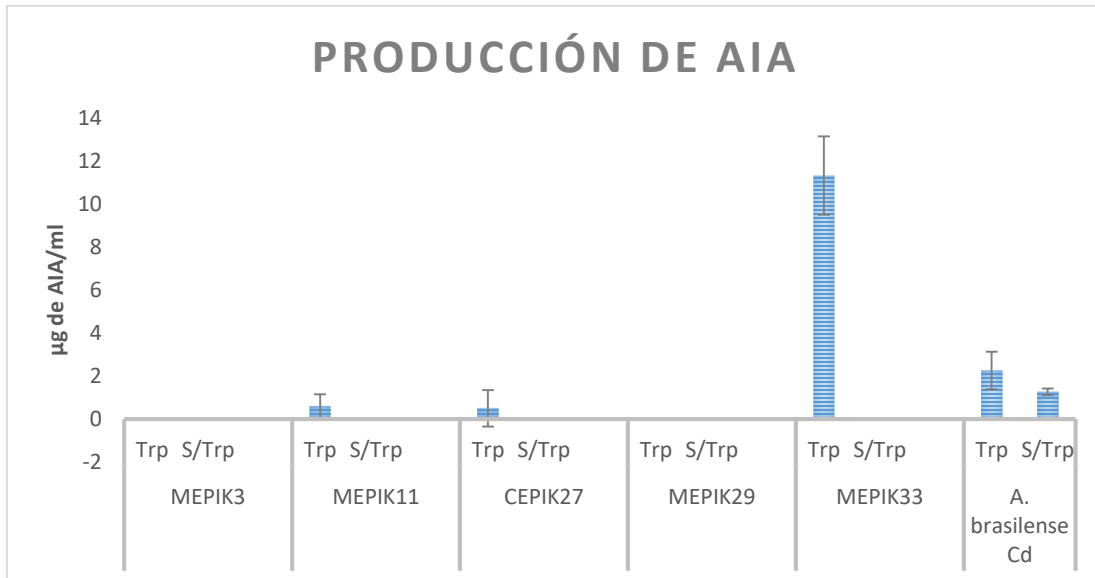
Posteriormente al aislamiento, para confirmar que las cianobacterias estuvieran libres de contaminación (por otras bacterias) se llevó a cabo un tratamiento con distintos tipos de antibióticos (**Anexo 1**) (Temraleeva, 2016). Se eligió la ampicilina ya que se utiliza en general para cianobacterias, por otro lado, también hay antibióticos específicos para una especie determinada de cianobacteria y al no saber qué tipo de especie pudiera ser, se trabajó con un antibiótico general. De 30 aislados 19 fueron tratados con Ampicilina 1 mg/ml ya que presentaban crecimiento bacteriano, como se muestra en la figura 13. Posteriormente fueron tratadas con Kanamicina (150 y 200 µg/ml) en medio BG11 líquido durante cuatro días en oscuridad. Se colocó un control con medio de cultivo BG11. De los 13 aislados con este antibiótico se obtuvieron cinco descontaminados MEPIK3, MEPIK11, CEPIK27, MEPIK29 y MEPIK33.



**Figura 13. Placa de LB (Luria Bertani) donde cada una de las rayas muestra el crecimiento bacteriano en aislados de microalgas. (MEPIK1, MEPIK2, MEPIK3, MEPIK6, MEPIK7, MEPIK12, MEPIK13, MEPIK15, MEPIK16, MEPIK20, MEPIK21, MEPIK22, MEPIK23, MEPIK24, MEPIK28, MEPIK29, MEPIK31, MEPIK32 y MEPIK33. (C) indica el control que contiene únicamente medio BG11.**

### **7.3 Cuantificación de la producción de ácido indolacético (AIA)**

La prueba del Reactivo de Salkowski se realizó con cuatro aislados de microalgas (MEPIK3, MEPIK11, MEPIK29 Y MEPIK33) y uno de cianobacteria (CEPIK27) con los aislados puros que se contaba. La producción de AIA se llevó a cabo en un medio de cultivo Jain & Patriquin con y sin triptófano (trp). Como muestra el control productor de AIA, se utilizó la cepa de *Azospirillum brasilense* Cd la cual esta reportada que presenta una alta concentración. Los datos de la síntesis de AIA, se muestran en la figura 14.

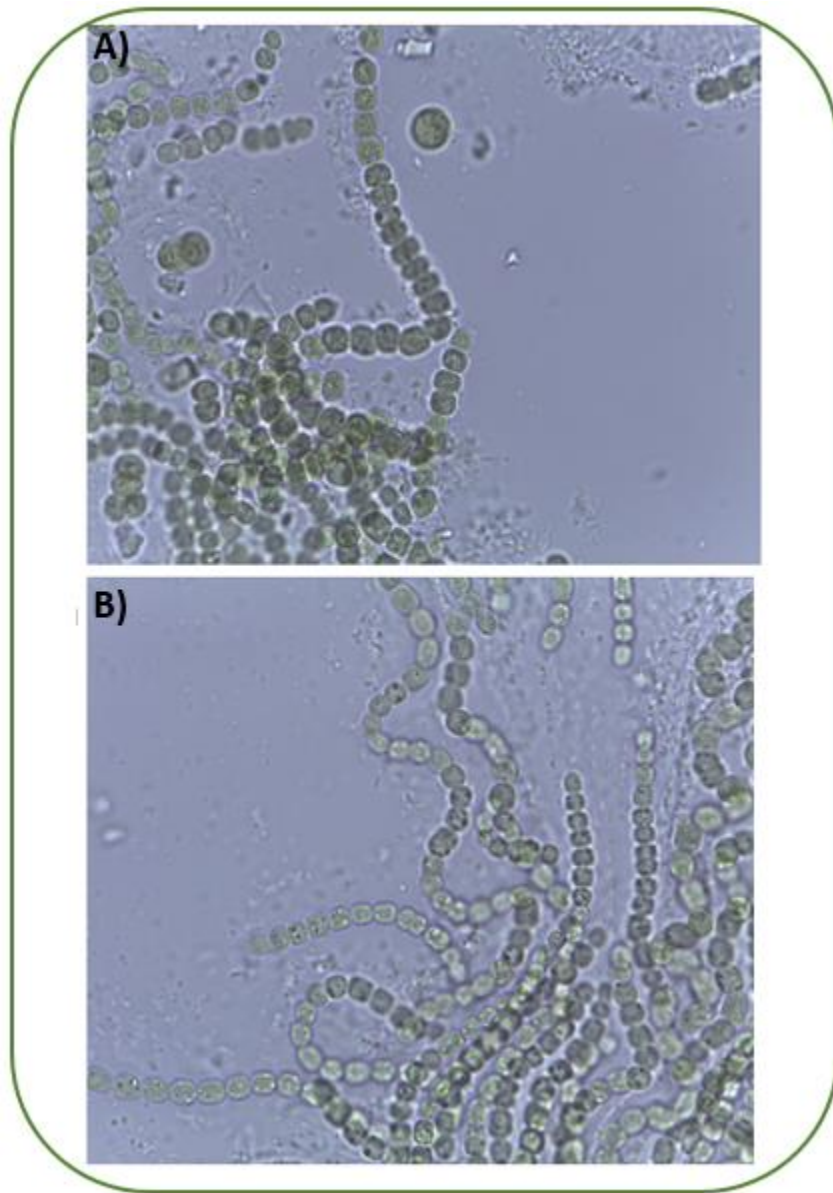


**Figura 14. Producción de AIA.** Se muestran los valores que corresponden a los aislados MEPIK3, MEPIK11, CEPIK27, MEPIK29 y MEPIK33 con y sin triptófano así mismo a *A. brasilense* Cd.

#### 7.4 Determinación de la formación de heterocistos

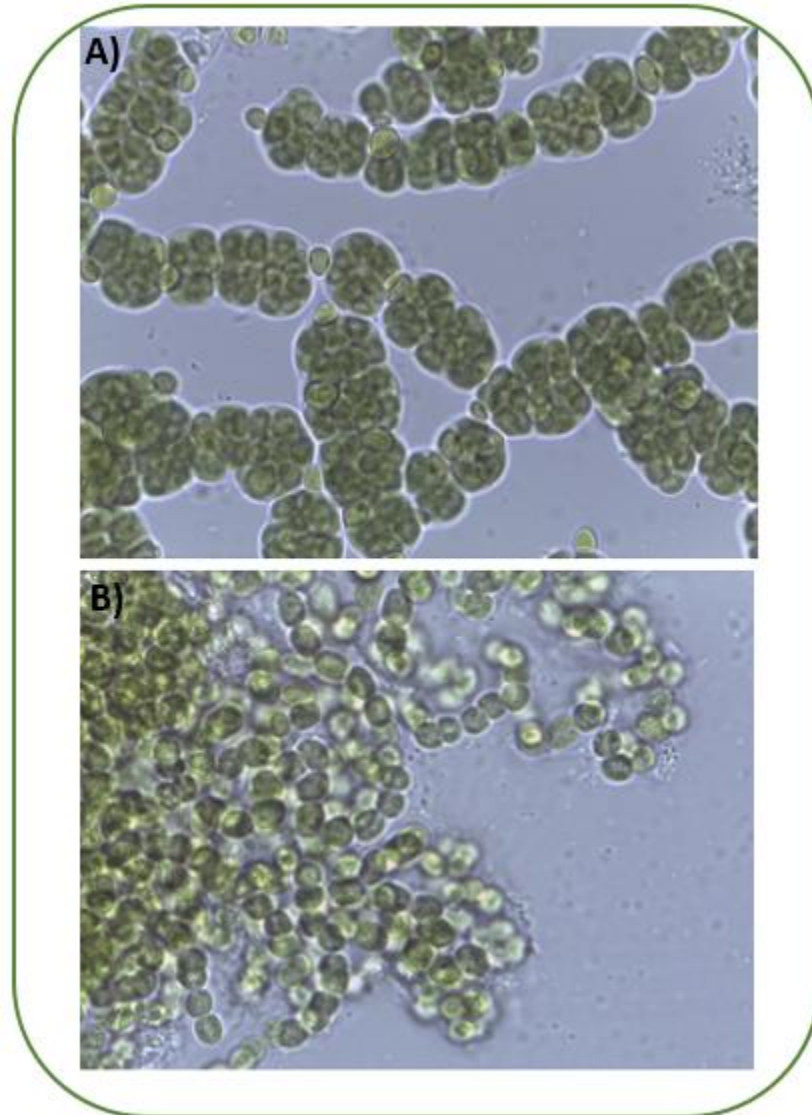
Los aislados CEPIK9 (**Figura 15**), CEPIK27 (**Figura 16**) son los que presentaban una morfología de cadena. En Cianobacterias Planctónicas del Uruguay Manual para la identificación y medidas de gestión se señala que no todas las especies del género *Nostoc* o *Anabena* presentan heterocistos (Bonilla, 2009), las cuales son células encargadas de fijar nitrógeno por lo que se inocularon en medio libre de nitrógeno para verificar la presencia de las células antes mencionadas.

Pasando una y dos semanas se tomaron fotografías en el microscopio para verificar la posible formación de heterocistos, pero el resultado fue negativo.



**Figura 15. Cianobacterias BG11 libre de nitrógeno. A)** Cianobacterias CEPIK9 BG11-liquido. **B)** Cianobacterias CEPIK9 BG11-solido, segunda semana de crecimiento 100x.





**Figura 16. Cianobacterias BG11 libre de nitrógeno. A)** Cianobacterias CEPIK27 BG11- líquido. **B)** Cianobacterias CEPIK27 BG11- sólido, segunda semana de crecimiento 100x.

## 7.5 Identificación por claves taxonómicas

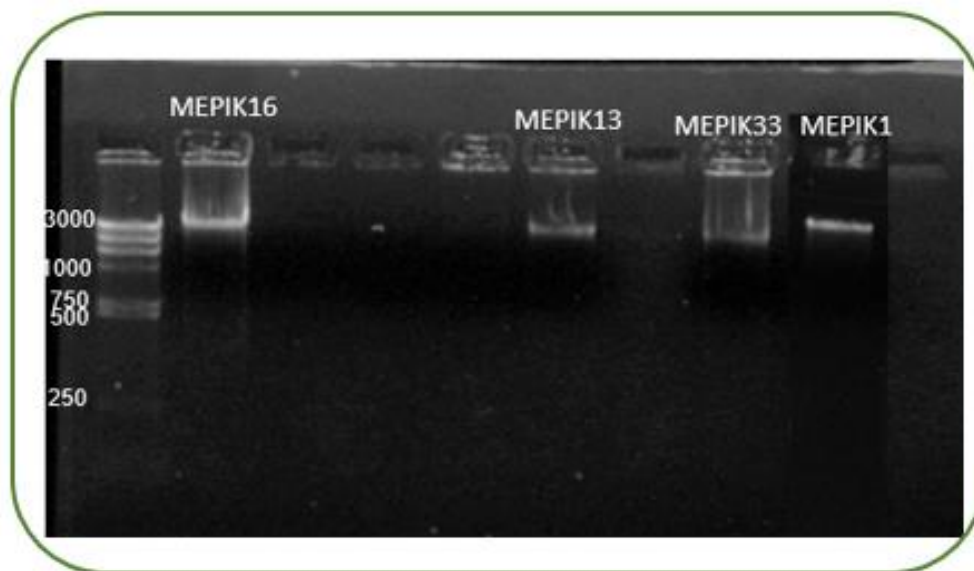
Con ayuda de claves taxonómicas (Gómez y Corral, 2011) se realizó la identificación en base a sus características morfológicas de cada aislado obteniendo identificación hasta nivel de Género (**Tabla 7**).

**Tabla 7. Identificación por claves taxonómicas**

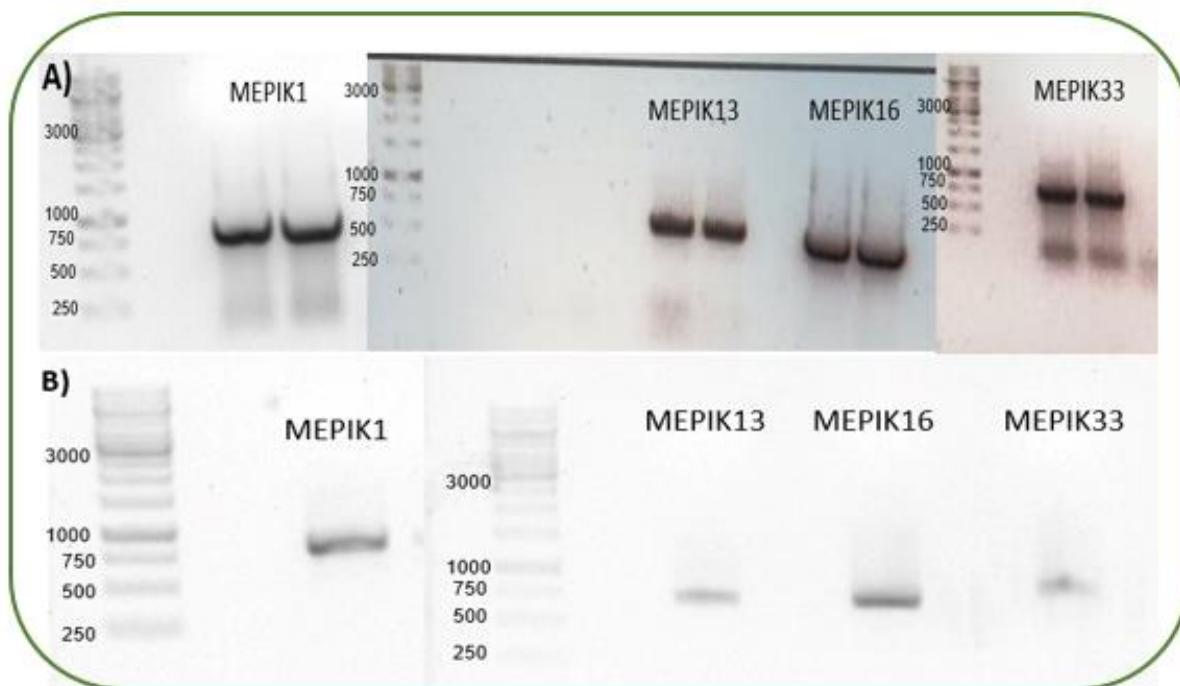
| <b>Aislado</b>   | <b>Características</b>                                       | <b>Género</b>          |
|--|--|------------------------|
| <b>CEPIK 4</b><br><b>CEPIK11.2</b>                                     | Filamento recto, cuadrados, presentan necrodios y Ormogonio. | <i>Oscillatoria</i>    |
| <b>MEPIK 13</b><br><b>MEPIK 14</b><br><b>MEPIK15</b><br><b>MEPIK16</b> | Células circulares y ovaladas                                | <i>Coelestrella</i> sp |

## 7.6 Identificación molecular de microalgas

Para la extracción de ADN genómico se eligieron cuatro aislados representativos de las distintas morfologías de microalgas (unicelulares esféricas y ovaladas), posteriormente se amplificó por PCR la región ITS (**Figura 18 A**) y se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 17**), los cuales se observaron con un programa digital DOC-IT, para así poder analizar el tamaño de las bandas (**Figura 18 B**) y poder purificarlo por medio del protocolo descrito en el anexo 4.



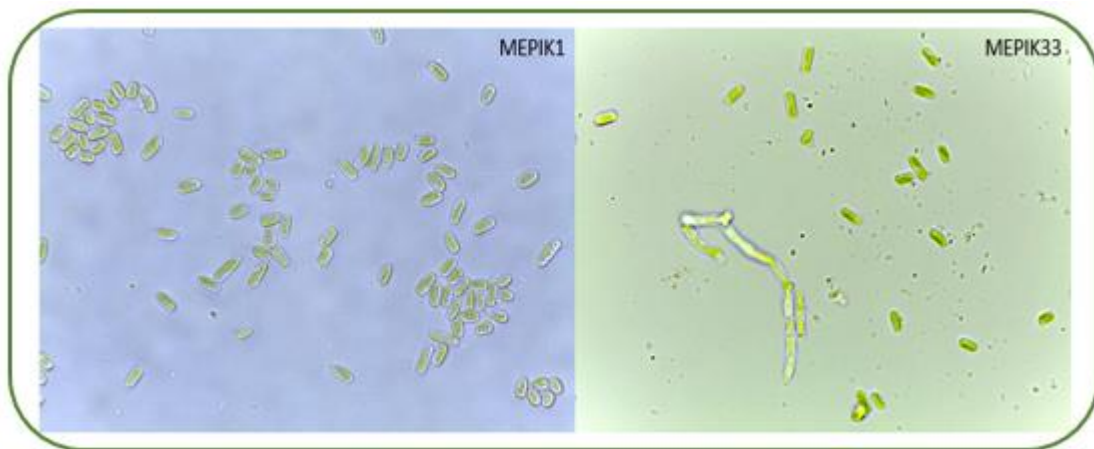
**Figura 17. Extracción de ADN genómico de los aislados.** MEPIK1, MEPIK13, MEPIK16 y MEPIK33, separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%.



**Figura 18. Imagen representativa de muestras correspondientes.** A) Producto de PCR y B) Purificación del producto de PCR de la región ITS de microalgas por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular 1kb GeneRuler (Thermo Fisher SM0311).

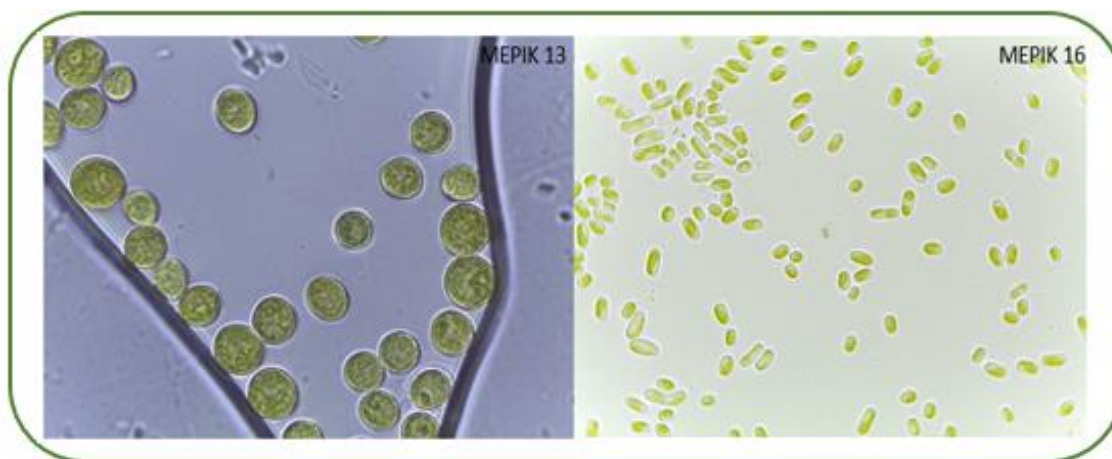
A partir de las secuencias de MEPIK1, MEPIK13, MEPIK16 y MEPIK33 aislados de microalgas y mediante análisis tipo BLAST, se determinó la identidad de las muestras con la de secuencias depositadas en la base de datos. En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos de la comparación de la base de datos del NCBI (BLAST), por otro lado, para tener estos resultados se tomaron las mejores bases las cuales son las que se observan en el anexo 8. Los aislados de microalgas de *Selaginella lepidophylla* en condiciones de invernadero MEPIK1 y MEPIK33 se identificó como *Diplosphaera* sp, dentro de la clase Trebouxiophyceae utilizando los primers ITS 1 e ITS 4. Las células de estos dos aislados son unicelulares ovaladas y varían en tamaño (**Figura 19**).

Las cepas de microalgas aisladas de *Selaginella lepidophylla* en condiciones de invernadero MEPIK 13 y MEPIK 16 se identificaron que pertenecen al orden Sphaeropleales. Utilizando los oligonucleótidos ITS 1 e ITS 4, las células para el aislado MEPIK 13 son esféricas y se aprecian los cloroplastos, mientras que para MEPIK 16 son ovaladas (**Figura 20**).



**Figura 19. Aislados de microalgas.** MEPIK1 y MEPIK33 corresponden a microalgas los cuales se identificaron como pertenecientes al género *Diplosphaera* sp.





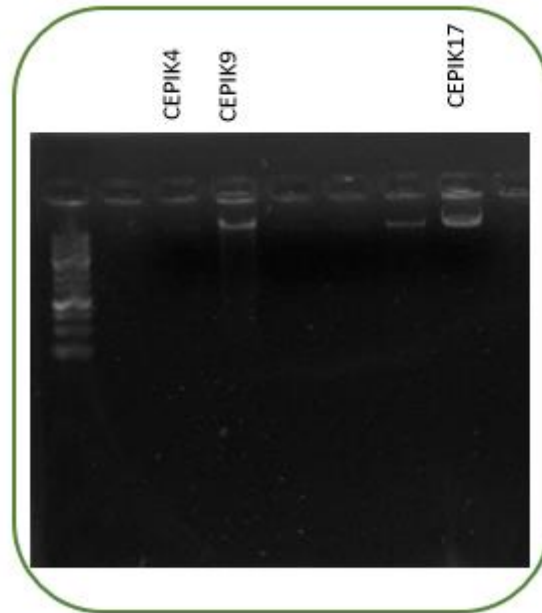
**Figura 20. Microalgas.** Imagen representativa de microalgas los cuales se identificaron del orden Sphaeropleales.

**Tabla 8. Resultados de la identificación molecular de microalgas a partir de la secuenciación de la región ITS y comparación mediante análisis tipo BLAST.**

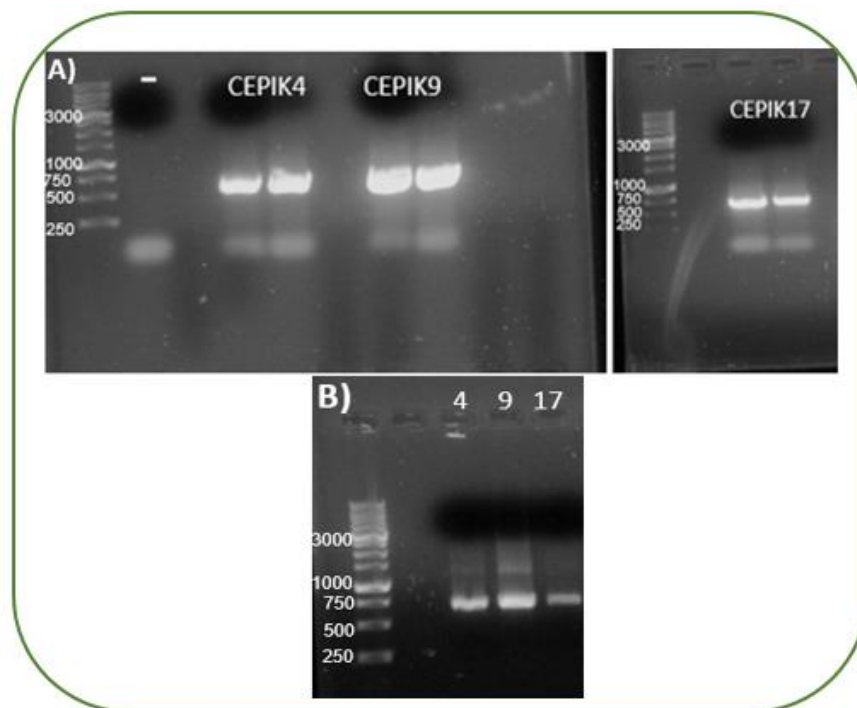
| Aislado | Género                 | Tamaño de amplicón | Cobertura | Identidad | No. Acceso |
|---------|------------------------|--------------------|-----------|-----------|------------|
| MEPIK1  | <i>Diplosphaera</i> sp | 750 pb             | 90%       | 99%       | OK636235.1 |
| MEPIK33 | <i>Diplosphaera</i> sp | 750 pb             | 75%       | 90%       | KT303058.2 |
|         | Orden                  |                    |           |           |            |
| MEPIK13 | Sphaeropleales         | 750 pb             | 80%       | 97.90%    | KT303058.2 |
| MEPIK16 | Sphaeropleales         | 750 pb             | 90%       | 98.08%    | OK636220.1 |

## 7.7 Identificación molecular de cianobacterias

Para la extracción de DNA genómico se eligieron representantes de las tres morfologías distintas de cianobacterias en cadena, filamento recto y delgado y filamento recto y grueso para que no se repitieran los aislados, posteriormente se verificó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1% (**Figura 21**), los cuales se observaron con un programa digital DOC-IT, para así poder realizar la prueba de PCR (**Figura 22 A**) y analizar el tamaño de las bandas (**Figura 22 B**) y así poder purificarlo por medio del protocolo **Anexo 4**.



**Figura 21. Extracción de ADN genómico.** Gel de integridad de ADN de los aislados, CEPIK4, CEPIK9 y CEPIK17, separados en un gel de agarosa al 1%.



**Figura 22. Amplificación por PCR.** A) productos de PCR con los oligonucleótidos CYA106F y CYA781Ra B) separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular 1kb GeneRuler (Thermo Fisher SM0311).

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de la comparación de la base de datos del NCBI (BLAST). Cabe mencionar que para poder llevar a cabo esta comparación se tomaron las mejores bases como se muestra en el anexo 9. Los aislados de cianobacterias de *S. lepidophylla* en condiciones de invernadero CEPIK4, CEPIK9 y CEPIK17, corresponden a individuos del género *Phormidium* (clase Oscillatoriophycideae) (**Figura 23**), *Nostoc* sp (clase Nostocaceae) (**Figura 24**) y *Leptolyngbya* (clase Leptolyngbyaceae) (**Figura 25**).



**Figura 23.** Imagen representativa del aislado CEPIK4 el cual se identificó como *Phormidium* sp.

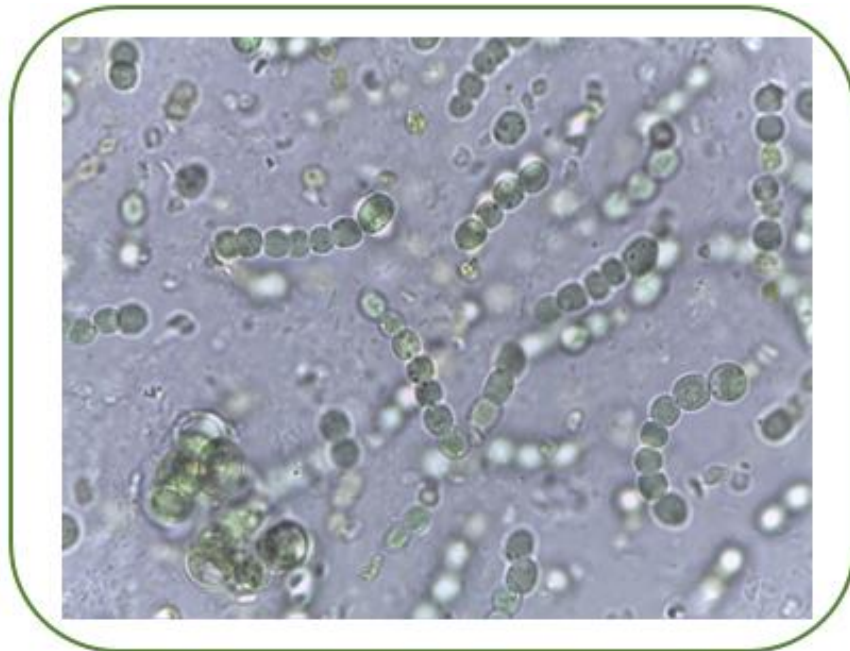


Figura 24. Imagen representativa del aislado CEPIK9 el cual se identificó como *Nostoc* sp.

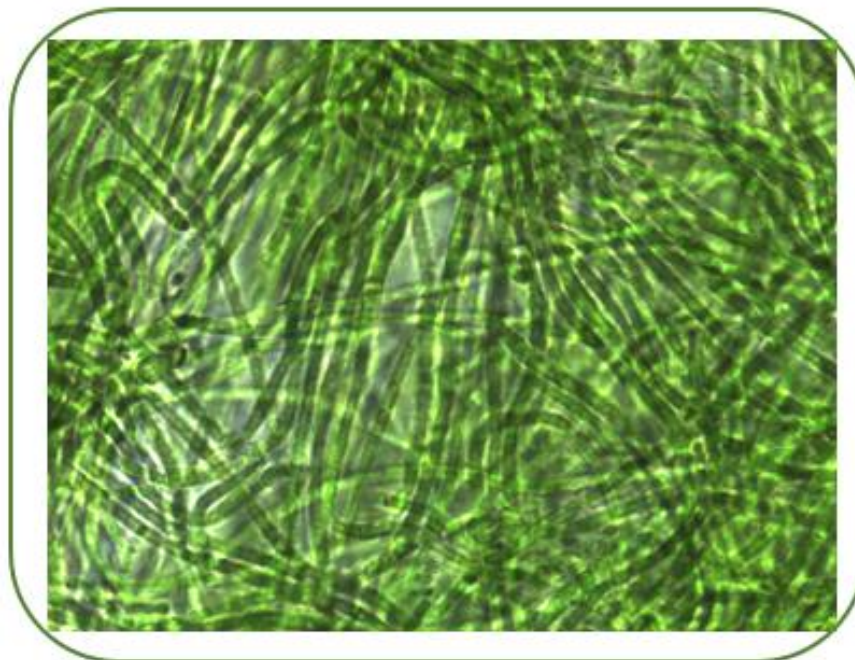


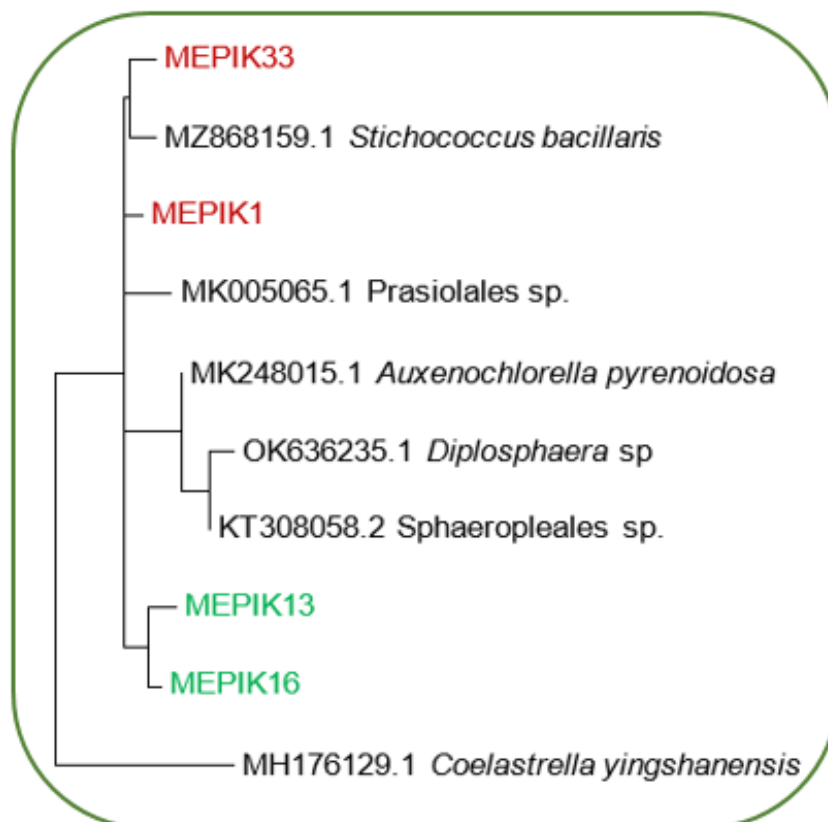
Figura 25. Imagen representativa del aislado CEPIK17 el cual se identificó como *Leptolyngbya* sp.

**Tabla 9. Resultados de la identificación molecular de cianobacterias a partir de la secuenciación de la región 16S y comparación mediante análisis tipo BLAST.**

| Aislado | Género                 | Tamaño de amplicón | Cobertura | Identidad | No. Acceso |
|---------|------------------------|--------------------|-----------|-----------|------------|
| CEPIK4  | <i>Phormidium sp</i>   | 640 pb             | 97%       | 98.22%    | MF629805.1 |
| CEPIK9  | <i>Nostoc sp</i>       | 640 pb             | 97%       | 99.19%    | MT425935.1 |
| CEPIK17 | <i>Leptolyngbya sp</i> | 650 pb             | 74%       | 88.73%    | OQ419104.1 |

### 7.8 Análisis filogenético

El objetivo de este análisis es encontrar las relaciones evolutivas o de parentesco entre diferentes especies o distintos taxones supraespecíficos, la máxima verosimilitud como modelo de reconstrucción filogenética, método que consiste en calcular la verosimilitud de múltiples filogenias candidatas y reportar aquella con el valor máximo, como la filogenia representativa de un grupo de organismos (Duchen, 2021).



**Figura 26. Árbol filogenético.** Construido con las secuencias de los aislados MEPIK33 y MEPIK1 que corresponden al género *Displophaera sp.* MEPIK13 y

MEPIK16 corresponde al orden Sphaeropleales con la base de datos del NCBI, en base al método de máxima verosimilitud.

## 8. Discusión

Las comunidades de microorganismos que poseen las plantas, además de proveerles nutrientes para que las plantas puedan tolerar etapas de estrés biótico y abiótico, algunos a su vez pueden ser nocivos y ocasionarles enfermedades. *Selaginella lepidophylla* se caracteriza por tolerar altos periodos de desecación gracias a la capacidad que tiene de acumular trehalosa (Suárez *et al.*, 2015). Con relación a la síntesis de trehalosa se propone que los microorganismos asociados a *S. lepidophylla* aportan considerablemente a los niveles del disacárido, los cuales participan para tolerar la desecación. VanBuren (2018), analizó el transcriptoma de la planta de resurrección *S. lepidophylla* e identificó diversas secuencias relacionadas con especies de cianobacterias (Tabla 10) que corresponden a las familias Leptolyngbyaceae, Oscillatoriothycideae, Nostocaceae, Microcoleaceae, Scytonemataceae de los cuales en este trabajo se logró aislar, crecer, caracterizar morfológicamente y con herramientas moleculares a microorganismos como *Phormidium* sp. del género *Oscillatoria*, *Nostoc* sp. y de la Familia Leptolyngbyaceae.

| <b>Tabla 10. Especies de cianobacterias reportadas en el transcriptoma de <i>S. lepidophylla</i>.</b> |  |
|---|--|
| No. Acceso  | Especies de la cianobacteria   |
| SRR6345601  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 183 Kbp <i>Scytonema tolypothrichoides</i> 4%</li> </ul>  |
| SRR6345602  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 7764 Kbp <i>Scytonema tolypothrichoides</i> 74%</li> <li>• 2682 Kbp <i>Phormidesmis Priestleyi</i> 26%</li> </ul> |
| SRR6345603  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 72 Kbp <i>Leptolyngbyaceae</i> 3%</li> <li>• 14 Kbp <i>Oscillatoriothycideae</i> 0.6%</li> </ul>                  |
| SRR6345605  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 79 Kbp <i>Leptolyngbyaceae</i> 2%</li> </ul>  |



|            |   |
|------------|---|
| SRR6345606 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 511 Kbp <i>Scytonema tolypothrichoides</i> 78%</li> <li>• 18 Kbp <i>Nostoc</i> 3%</li> <li>• 68 Kbp <i>Leptolyngbyaceae</i> 10%</li> <li>• 57 Kbp Cianobacterias <i>Oscillatoriales</i> 9%</li> <li>• 11 Kbp cianobacteria filamentosa 2%</li> </ul> |
| SRR6345607 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 51 Kbp Cianobacterias 2%</li> </ul>  |
| SRR6345608 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 3316 Kbp Cianobacterias 2%</li> </ul>  |
| SRR6345609 | 95 Kbp <i>Scytonema tolypothrichoides</i> 2%  |
| SRR6345610 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 135 Kbp <i>Scytonema tolypothrichoides</i> 2%</li> </ul>   |
| SRR6345611 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 140 Kbp <i>Scytonema tolypothrichoides</i> 4%</li> <li>• 8 Kbp <i>Synechococcales</i> 0.2%</li> </ul>  |
| SRR6345612 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 15341 Kbp <i>Scytonema tolypothrichoides</i> 37%</li> <li>• 9085 Kbp <i>Nostoc</i> 59%</li> <li>• 533 Kbp Orden: <i>Synechococcales</i></li> <li>• 369 Kbp <i>Leptolyngbyaceae</i> 2%</li> <li>• 164 Kbp <i>Synechococcus</i> 1%</li> </ul>          |
| SRR6345613 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 3010 Kbp <i>Scytonema tolypothrichoides</i> 2%</li> <li>• 143 Kbp <i>Synechococcales</i> 0.09%</li> </ul>  |
| SRR6345614 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 27 Kbp <i>Oscillatoriales</i> 21%</li> <li>• 100 Kbp <i>Scytonema tolypothrichoides</i> 78%</li> </ul>   |
| SRR6345615 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 213 Kbp <i>Phormidesmis priestleyi</i> 6%</li> </ul>   |

|            |  |
|------------|--|
| SRR6345616 | <ul style="list-style-type: none"> <li>● 6294 Kbp <i>Scytonema tolypothrichoides</i> 75%</li> <li>● 991 Kbp <i>Nostoc</i> 12%</li> <li>● 469 Kbp <i>Mastigocladopsis repens</i> 6%</li> <li>● 442 Kbp <i>Cyanothece</i> 5%</li> <li>● 210 Kbp <i>Leptolyngbyaceae</i> 2%</li> <li>● 22 Kbp <i>Microcoleaceae</i> 0.3%</li> </ul> |
| SRR6345617 | <ul style="list-style-type: none"> <li>● 59 Kbp <i>Leptolyngbyaceae</i> 0.04%</li> </ul>   |

Otros microorganismos que fueron aislados son microalgas, donde en el transcriptoma de *Selaginella lepidophylla* también se refleja que presentan secuencias eucariotas que corresponden a Viridiplantae el cual es un clado que representa a las plantas verdes y se encuentra conformado por las algas verdes y plantas terrestres. Sin embargo, en la identificación molecular de este trabajo confirma la presencia de microorganismos del género *Diplosphaera* y del Orden Sphaeropleales. Además, varias microalgas verdes terrestres unicelulares, como los miembros de los géneros *Stichococcus* y *Diplosphaera*, pueden actuar como fotobiontes típicos en los líquenes como lo menciona Fontaine y colaboradores (2012), por lo que en nuestro árbol filogenético (Figura 26) se muestra cómo es que el aislado MEPIK 33 se encuentra emparentado con la especie de *Stichococcus bacillaris*.

Hoffmann (1989) menciona que las algas terrestres desarrollaron mecanismos de aclimatación morfológicos, fisiológicos y bioquímicos específicos para hacer frente a factores estresantes ambientales extremos, siendo así como se muestra en la figura 20 MEPIK13 es de una morfología circular y MEPIK16 es ovalada y corresponden al orden Sphaeropleales, por lo cual su cambio morfológico de ambas microalgas puede deberse a las condiciones y etapa de crecimiento en las que se encuentre.

El aislado MEPIK33 se identificó como microalga del género *Diplosphaera* cuenta con la mayor concentración de IAA lo cual en la literatura hasta la fecha no existen reportes donde se haya cuantificado la producción de la auxina ácido indolacético pero el hecho de que esta microalga sintetice ácido indolacético la hace candidato para ser utilizada como un biofertilizante y promover el crecimiento de raíces.

Como bien la literatura menciona que no todas las cianobacterias filamentosas son fijadoras de nitrógeno lo cual con el protocolo de la inoculación de las cepas CEPIK9 y CEPIK27 las cuales pertenecen al género de *Nostoc*, no presentaron heterocistos esto nos indica que no son cianobacterias que fijen nitrógeno ya al ser inoculadas



en un medio libre de nitrógeno que induce la formación de heterocistos, no fue posible visualizarlos.

Las cianobacterias pueden enfrentar a distintos agentes estresantes ambientales, ya que cuentan con excreción de exopolisacáridos (EPS). No obstante, se sabe poco sobre cómo puede cambiar la composición de estos polímeros dependiendo de la disponibilidad de agua. El cultivo de microalgas y cianobacterias se han estudiado, por la capacidad que tienen de utilizar efectivamente la energía solar para producir compuestos orgánicos, como lo pueden ser los, lípidos, glicerol, pigmentos y polisacáridos. Por otro lado, proporcionan sustitutos proteicos, vitaminas, aminoácidos; compuestos biológicamente activos como toxinas, inhibidores enzimáticos, antivirales, antibióticos y marcadores fluorescentes para inmunología.

Cabe mencionar que todos los aislados tanto de microalgas como de cianobacterias fueron obtenidos como epifitos y la mayoría de la micrófila, lo que nos hace pensar que pueden actuar como bioestimulantes durante el crecimiento y desarrollo; así como también para hacer frente al ataque por patógenos.

Los resultados de este trabajo sientan las bases para profundizar el conocimiento que aportan las microalgas y cianobacterias en la planta de resurrección *S. lepidophylla* lo cual es necesario seguir realizando más investigaciones en este ámbito y sobre la posible aplicación que tienen para promover el crecimiento y desarrollo de las plantas.

## 9. Conclusiones

- *Selaginella lepidophylla* crecida en condiciones de invernadero, es un reservorio de cianobacterias y microalgas epífitas.
- Tanto las cianobacterias como las microalgas aisladas poseen características propias de los microorganismos promotores del crecimiento vegetal con potencial en la agricultura para ser empleadas como biofertilizantes.

## 10. Perspectivas

- Cuantificación de trehalosa en los aislados de microalgas y cianobacterias para comprobar su participación en la tolerancia a la desecación de *S. lepidophylla*.
- Evaluar el efecto de la inoculación en especies de interés agronómico como maíz y tomate para validar su efecto promotor del crecimiento vegetal en los cultivos.

## 11. Literatura citada

Abundiz, L. y Tejero, J. (1990). El género *Selaginella* pal. Beauv. (Selaginellaceae, lycopodiophyta) en el oeste del estado de México. Acta Botánica Mexicana. 11:23-47.

Adams, R. P., Kendall, E. and Kartha, K. K. (1990). Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. Biochemical Systematics and Ecology. 18:107 – 110.

Adams, D.G. (2000). Interacciones simbióticas, su diversidad en el tiempo y el espacio. Editorial Académica Kluwer, Boston, Mass. Pp 523-561.

Ahmed, M., Stal, L. and Hasnain, S. (2010). Production of indole-3-acetic acid by the cyanobacterium *Arthrospira platensis* strain MMG-9. J Microbiol Biotechnol.

Argotti, E., Cazar, M., Motte, E. y Cedeño, V. (2011). Análisis molecular de la región ITS de *Fusarium* spp., agente causal de la marchitez vascular de *Vasconcellea heilbornii* y *Solanum quiotense* en Ecuador. ESPE Ciencia y Tecnología, 3(1), 25-36.

Arróniz, M., Pérez, S., Ríos, A., Ochoa, R., Casermeiro, M.A., Cruz, M.T., Pintado, A., Palacios, D., Rozzi, R., Tysklind, N. and Sancho, L. (2014). Bryophyte-Cyanobacteria Associations during Primary Succession in Recently Deglaciated Areas of Tierra del Fuego (Chile). Plos one. 9(9):108759.

Banks, J. A. (2009). *Selaginella* and 400 million years of separation. Annual Reviews of Plant Biology. 60: 223 – 238.

Ben-Amotz, A., Tornabene, T.G. and Thomas, W. H. (1985). Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. J. Phycol. 21: 72- 81.

Benimeli, M. (2019). El nitrógeno del suelo. Cátedra de Edafología. Universidad Nacional de Tucumán Argentina. Pp 3.

Bonilla, S. (2009). Cianobacterias planctónicas del Uruguay. Manual para la identificación y medidas de gestión. Documento técnico PHI-LAC, 16.

Borowitzka, M.A. and Lethbridge, R.C. (1989). Seagrasses epiphytes, Chp. 14. En: Larkum, A.E.D., A.J. McComb & S.A. Sheperd (Eds.) Biology of Seagrasses. Aquatic Plant Studies 2 Elsevier, Amsterdam. Pp 841.

Bray, E.A. (1997). Respuestas de las plantas al déficit hídrico. Tendencias Ciencia vegetal. 2, 48-54.

Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R. L. (2000). Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists.

Büdel, B., Dulić, T., Darienko, T., Rybalka, N. y Friedl, T. (2016). Cianobacterias y algas de costras biológicas del suelo. En Costras biológicas del suelo: un principio organizador en las tierras secas. Springer, Cham. Pp. 55-80.

Castillo, M. G. (2020). Aislamiento y caracterización de bacterias endófitas de la planta de resurrección *Selaginella lepidophylla* en estado hidratado y deshidratado: posible implicación en la promoción del crecimiento vegetal y tolerancia a la desecación. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Pp 38.

Chapin, F.S., Walker, L.R., Fastie, C.I y Sharman L.C. (1994). Mecanismos de sucesión primaria tras la desglaciación en Glacier Bay Alaska. Monografías Ecológicas 64: 149-175.

Christiansen-Weniger C. (1998). Endophytic establishment of diazotrophic bacteria in auxin-induced tumors of cereal crops. Crit Rev Plant Sci 17:55–76.

Costa, J. L., Paulsrud, P., Rikkinen, J. and Lindblad, P. (2001). Genetic diversity of *Nostoc* symbionts endophytically associated with two bryophyte species. Appl Environ Microbiol. 67(9):4393-4396.

De Vries, J. y Archibald, J.M. (2018). Evolución vegetal: hitos en el camino hacia la vida terrestre. New Phytologist. 217 (4), 1428-1434.

Duchen, P. (2021). Métodos de reconstrucción filogenética I: máxima verosimilitud. Tequio. Revista de divulgación, investigación e innovación. 4(11), 69-79.

Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I. y Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: amultifunctional molecule. Glycobiology.

Figuroa, C. (2004). Actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa en plantas de *Selaginella lepidophylla* en respuesta a hidratación y desecación. Revista Fitotecnia Mexicana. vol. 27. Pp 17-22.

Fontaine, K.M., Beck, A., Stocker-Wörgötter, E. and Piercey-Normore, M.D. (2012). Photobiont relationships and phylogenetic history of *dermatocarpon luridum* var. *luridum* and related *Dermatocarpon* species. Plants. 1:39–60.

George, E.F., Hall, M.A. and de Klerk, G.J. (2008a). Plant growth regulators I: introduction; auxins, their analogues and inhibitors. Plant propagation by tissue culture. Springer, Berlin.

Germaine, K., Keogh E., García, Cabellos G., Borremans, B., Van der Leie, D., Barac, T., Oeyen, L., Vangronsveld, J., Porteous, F., R.B. Moore, E., Campbell, C., Ryan, D y Dowling, D. (2004). Colonisation of poplar trees by gfp expressing bacterial endophytes. FEMS Microbiology Ecology. 48, 109–118.

Glickmann, E. and Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and environmental microbiology*. 61 (2): 793 – 796

Gómez, S. C. y de Corral, A. Q. (2011). Catálogo de cianobacterias planctónicas potencialmente tóxicas de las aguas continentales españolas. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

Hardoim, P., Van Overbeek, L., Berg, G., Pirttila, A., Compant, S., Campisano, A., Doring, M. and Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol Mol Biology Reviews*.

Herrero, A., Muro-Pastor, A. M., and Flores, E. (2001). Nitrogen Control in Cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 183(2):411-425.

Hernández-Reyes, B. M., Rodríguez-Palacio, M. C., Castilla-Hernández, P., Sánchez-Robles, J., Vela-Correa, G., y Schettino-Bermúdez, B. (2019). Uso potencial de cianobacterias como biofertilizante para el cultivo de maíz azul en la Ciudad de México. *Revista latinoamericana de biotecnología ambiental y algal*. 10(1), 13-27.

Hoffmann, L. (1989). Algas de hábitats terrestres. *La revisión botánica*. 55, 77-105.

Howard-Williams, C. y Vincent, W.F. (1990). Comunidades microbianas en los arroyos del sur de la Tierra Victoria (Antártida). I. Fotosíntesis. *Hidrobiol.* 172: 27-38.

Iturriaga, G., Gaff, D. F. and Zentella, R. (2000). New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of México, accumulate trehalose. *Australian journal of Botany*. 48: 153 – 158.

Johansson, F., Paul, L. and Finlay, R. (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiology Ecology*. 48: 1-13.

Karsten, U., Schumann, R. and Mostaert, A. (2007). Aeroterrestrial algae growing on man-made surfaces. In: Seckbach J (ed) *Algae and cyanobacteria in extreme environments*. Springer, Dordrecht, Netherlands. Pp 583–597.

Karsten, U., y Holzinger, A. (2014). Algas verdes en comunidades biológicas de la corteza del suelo alpino: estrategias de aclimatación contra la radiación ultravioleta y la deshidratación. *Biodiversidad y Conservación*. 23 (7), 1845-1858.

Larcher, W. (1995). *Ecología fisiológica de las plantas*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Pp 506.

Lewis, L. A., and Flechtner, V. R. (2002). Green algae (Chlorophyta) of desert microbiotic crusts: diversity of North American taxa. *Taxon*. 51(3), 443-451.

Lobato, R. y Cidrás, J. (2013). Evolución vegetal: La conquista de la tierra firme. Universidad de Vigo. Arquegoniadas.

Lopez, A. y Maya, Y. (2001). Cianobacterias criptobioticas una alternativa de agricultura orgánica. CONACYT.

Lu, Y., Zhang, E., Hong, M., Yin, X., Cai, H., Yuan, L., Yuan, F., Li, L., Zhao, K. and Lan, X. (2020). Analysis of endophytic and rhizosphere bacterial diversity and function in the endangered plant *Paeonia ludlowii*. Archives of Microbiology. 202:1717–1728.

Luttge, U. (1997). Physiological ecology of tropical plants. SpringerVerlag Berlin Heidelberg New York. Printed in Germany.

Mateo-Cid, L.E., Sánchez-Rodríguez, I. y Rodríguez-Montesinos, E. (2014). Algas epífitas de *Sargassum sinicola* Setchell & Gardner (Fucales, Phaeophyceae), en las islas Magdalena y Margarita en Baja California Sur, México. Revista de Investigaciones Marinas 34(2): 31-44.

Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas. Laboratorio de Rizobiología.

Meeks, J.C. y Elhai, J. (2002). Regulación de la diferenciación celular en cianobacterias filamentosas en estados de crecimiento simbiótico de vida libre y asociados a plantas. Revisiones de microbiología y biología molecular. 66 (1) 94-121.

Mercedes, P. y Nuria, M. (2002). Fijación biológica de nitrógeno: factores limitantes. Ciencia y Medio Ambiente.

Mohan, A., Kumar, B. and Nath, D. (2015). Cyanobacterial consortium in the improvement of maize crop. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 4(3):264-274.

Moreno, L. (2009). Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. Departamento de Agronomía.

Mur, R., Skulberg, O.M. y Utkilen, H. (1999). Cianobacterias en el medio ambiente.

Murray, M.G. y Thompson, W. (1980). Aislamiento rápido de ADN vegetal de alto peso molecular. Investigación de ácidos nucleicos. 8 (19), 4321-4326.

Neves, D., Schwab, S., Ivo, J. y Morais, P. (2017). Diversity and function of endophytic microbial community of plants with economical potential. Diversity and benefits of microorganism from the tropics. Springer International Publishing. Pp 209-243.

Nübel, U., García-Pichel, F. and Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Applied and Environmental microbiology. 63 (8), 3327-3332.

- Núñez, A. y Dos Santos, R. M. (2020). Catálogo ficológico – Cyanophytas - del estanque artificial de la FACEN - UNA. Campus Universitario, San Lorenzo - Paraguay. Pp 72.
- Obid, S.A., Idris, A.E., and Ahmed, B.E.A.M. (2016). Effect of bio-fertilizer on growth and yield of two maize (*Zea mays* L.) cultivars at Shambat, Sudan. Sch. J. Agric. Vet. Sci, 3(4), 313-317.
- Ochoa, M., Madrigal, R., Martínez, M. y Carreón, Y. (2010). Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. Biológicas. 12(1): 65–71.
- Paerl, H. W. y Stepp, T. F. (2000). Ampliación de escala: el próximo desafío en microbiología ambiental. Environ. Microbiol. 5(11) : 1025-38.
- Pilet, P.E. y Chollet, R. (1970). Sur le dosage colorimétrique de l'acide indolylacétique. CR Acad Sci Ser D, 271, 1675-1678.
- Raabová, L., Elster, J. y Kováčik, L. (2016). Substratos colonizadores de microflora fototrófica de origen artificial en la región de Billefjorden, Svalbard central. Informes polares checos, 6 (1), 21-30.
- Rai, A.N., Söderbäck, E. y Bergman, B. (2000). Simbiosis cianobacteria-plantas. Nuevo Fitólogo. 147(3) 449-481.
- Rendón, L. J., Ramírez, M. E., y Vélez, Y. (2015). Microalgas para la industria alimenticia.
- Ren, F., Dong, W. y Yan, D.H. (2018). Endophytic bacterial communities of Jingbai Pear trees in north China analyzed with Illumina sequencing of 16S rDNA. Archives of Microbiology. 201, 199-208.
- Siciliano, S.D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., Ouellette, D., Roy, R., Whyte, L.G., Banks, M.K., Schwab, P., Lee, K. and Greer, C.W. (2001) Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. Appl Environ Microbiol. 67 (6) 2469–2475.
- Sarma, T. (2012). Handbook of Cyanobacteria. Formerly Professor of Botany Department of Botany, Punjabi University Patiala (Punjab), India.
- Sergeeva, E., Liaimer, A. and Bergman, B. (2002). Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. Springer link. 215: 229–238
- Shao, H.B., Chu, L-Y., Jaleei, C. A. and Zhao, C.X. (2008). Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. Elsevier. 331: 215-225.
- Suárez, R. R., Raya, P. J. C. e Iturriaga, G. (2015). La trehalosa: un azúcar osmoprotector con capacidad de señalización. Ciencia y tecnología Agropecuaria, México. 13(1): 1-13.

Tarakhovskaya, E.R., Maslov, Y.I. and Shishova, M.F. (2007). Phytohormones in algae. *Russ J Plant Physiol* 52:163–170.

Temraleeva, A.D., Dronova, S.A., Moskalenko, S.V. y Didovich, S.V. (2016). Métodos modernos para el aislamiento, purificación y cultivo de cianobacterias del suelo. *Microbiología*, 85 (4), 389-399.

Torreblanca, M. del P. (2017). Aislamiento e identificación de endófitos de la planta de resurrección *Selaginella nothohybrida*. Tesis en Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Centro de Investigación en Biotecnología. Cuernavaca, Morelos, México. Pp. 19.

VanBuren, R., Wai, C. M., Ou, S., Pardo, J., Bryant, D., Jiang, N., Mockler, T. C., Edger, P. and Michael, T. P. (2018). Extreme haplotype variation in the desiccation-tolerant clubmoss *Selaginella lepidophylla*. *Nature communications*. 9: 13.

Vance, C.P., Miller, S. S., Driscoll, B. T., Robinson, D. L., Trepp, G., Gantt, J. S. and Samas, D. A. (1998). Nodule carbón metabolism: organic acids for N<sub>2</sub> fixation. In *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Elmerich, C. Kondorisi, A and Newton, W.E. Dordrecht: Kluwer. Pp 443-448.

Vargas, M., Rocha, M., Iturriaga, P., Jiménez, S. y Bertozzi, G. (2009). Estudio del estrés abiótico de la planta de “resurrección” *Selaginella lepidophylla*. Métodos de investigación. Colegio Marymount. 1 – 17.

Vázquez-Ramírez, M. A., Meléndez-Camargo, M. E. y Arreguín, M. L. S. (2005). Estudio etnobotánico de *Selaginella lepidophylla* (Hook. Et Grev.) Spring (Selaginellaceae Pteridophyta) en San José Xicoténcatl municipio de Huamantla, Tlaxcala, México. *Polibotánica*. 19: 105 – 115.

Verma, S., Nizam, S. y Verma, P. K. (2013). Señalización de estrés biótico y abiótico en plantas. Señalización de estrés en plantas: perspectiva genómica y proteómica, volumen 1, 25-49.

Vermaas, W.F. (2001). Photosynthesis and Respiration in Cyanobacteria. En: *Encyclopedia of life sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group. Pp 1-7.

Westover, K., Kennedy, A. and Kellys, S. (1997). Patterns of rizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. *Journal of Ecology*, 85: 863-873.

Wong, F. C.Y. and Meeks, J.C. (2002). Establishment of a funtional simbiosis between the cyanobacterium *Nostoc punctiforme* and the bryophyte *Anthoceros punctatus* requires genes involved in nitrogen control and initiation of heterocyst differentiation. *Microbiol*. 148: 315-323.

Yancey, P.H. (2005). Osmolitos orgánicos como citoprotectores compatibles, metabólicos y contrarrestados en alta osmolaridad y otros estreses. *Revista de biología experimental*, 208 (15), 2819-2830.

Yoon, H.S and Golden, J.W. (2001). Pats and products of nitrogen fixation control heterocyst patten. *J. Bacteriol.* 183 (8): 2605-2613.

Zhu, J.K., Scumaker, K.S. y Xiong, L. (2002). Señalización celular durante el frío, la sequía y el estrés salino. *Célula vegetal*.14, 165-183.



## 12. Anexos

### Anexo 1. Prueba de resistencia antibióticos

| Cepa    | Km<br>50 | Cm<br>5 | Hyg<br>50 | Cb<br>100 | Gm<br>20 | Nal<br>20 | Sm<br>200 | Amp<br>100 | Rif<br>100 | Tc<br>10 |
|---------|----------|---------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|------------|------------|----------|
| CEPIK1  | +        | +       | ++        | ++        | +        | +         | +++       | ++         | +          | +        |
| CEPIK2  | +++      | +       | ++        | ++        | +++      | ++        | +++       | +++        | +          | +++      |
| CEPIK3  | +++      | ++      | +++       | ++        | +++      | +++       | +++       | +++        | +          | +        |
| CEPIK6  | +++      | +++     | +++       | +++       | +++      | +++       | +++       | +++        | -          | +++      |
| CEPIK7  | +++      | +++     | +++       | +++       | +++      | +++       | +++       | +++        | ++         | ++       |
| CEPIK12 | +++      | +++     | +++       | ++        | +++      | +++       | +++       | +++        | -          | +        |
| CEPIK13 | ++       | +++     | +++       | ++        | +++      | +++       | +++       | ++         | +          | +        |
| CEPIK15 | ++       | +       | ++        | +         | ++       | +         | +         | +          | -          | -        |
| CEPIK16 | ++       | ++      | ++        | ++        | +++      | +++       | +++       | +++        | +          | ++       |
| CEPIK20 | ++       | +       | ++        | +         | ++       | +         | +         | +          | -          | +        |
| CEPIK21 | +++      | ++      | +++       | ++        | +++      | +++       | +++       | +++        | -          | ++       |
| CEPIK22 | ++       | ++      | ++        | +         | ++       | ++        | ++        | +++        | -          | ++       |
| CEPIK23 | ++       | +       | ++        | +         | ++       | +         | ++        | +++        | -          | ++       |
| CEPIK24 | +++      | ++      | +++       | +++       | +++      | +++       | +++       | +++        | +          | +        |
| CEPIK28 | +        | +       | +         | +         | +        | +         | +         | +          | -          | +        |
| CEPIK29 | +++      | ++      | ++        | ++        | ++       | ++        | +++       | +++        | +          | ++       |
| CEPIK31 | +++      | ++      | +         | +         | +        | +         | ++        | +++        | +          | +++      |
| CEPIK32 | ++       | ++      | +++       | ++        | +++      | ++        | +++       | +++        | +++        | ++       |
| CEPIK33 | +++      | ++      | +++       | +++       | +++      | ++        | +++       | +++        | +          | ++       |

Km: kanamicina

Cm: cloranfenicol

Hyg: higromicina

Cb: carbenicilina

Gm: gentamicina

Nal: ácido nalidíxico

Sm: estreptomicina

Am: ampicilina

Rif: rifampicina

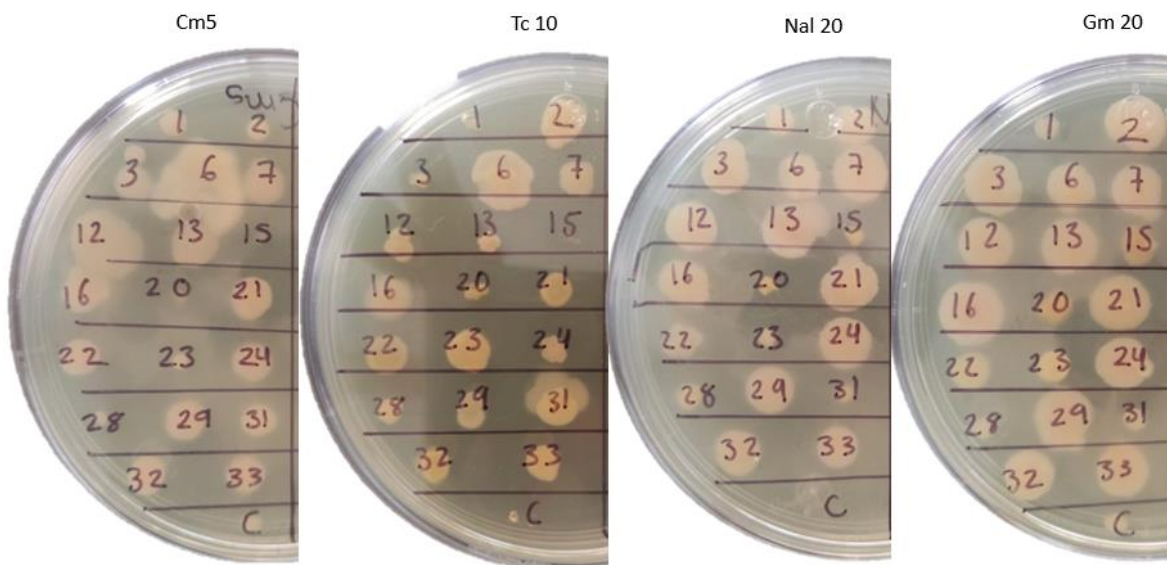
Tc: tetraciclina

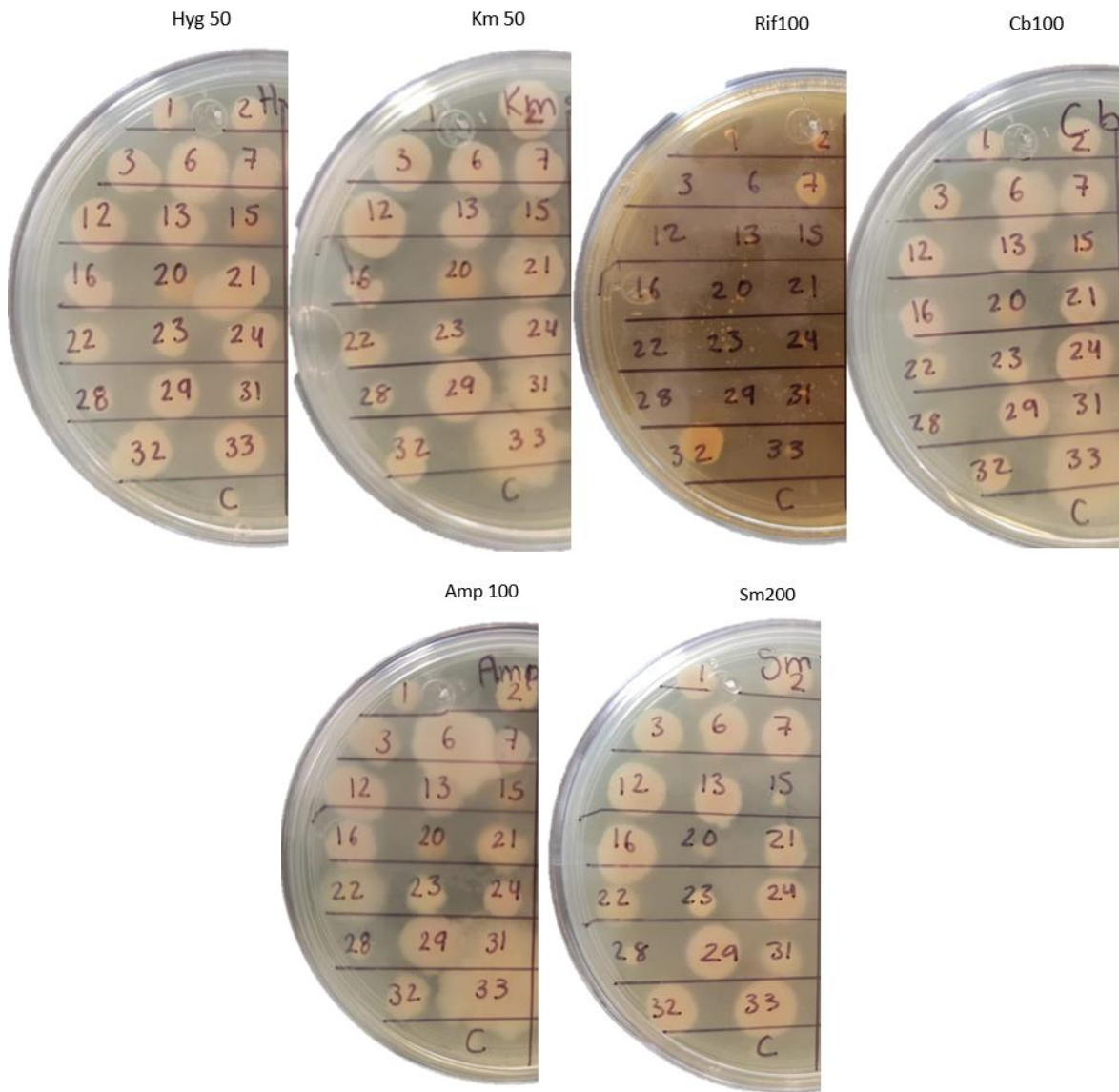
+++ Resistencia alta

++ Resistencia media

+ Resistencia baja

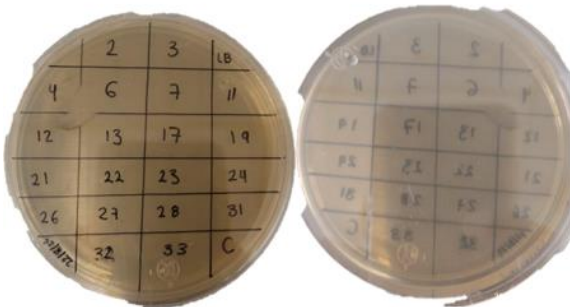
- Susceptible





## Anexo 2. Tratamiento con Rifampicina 100

1er día

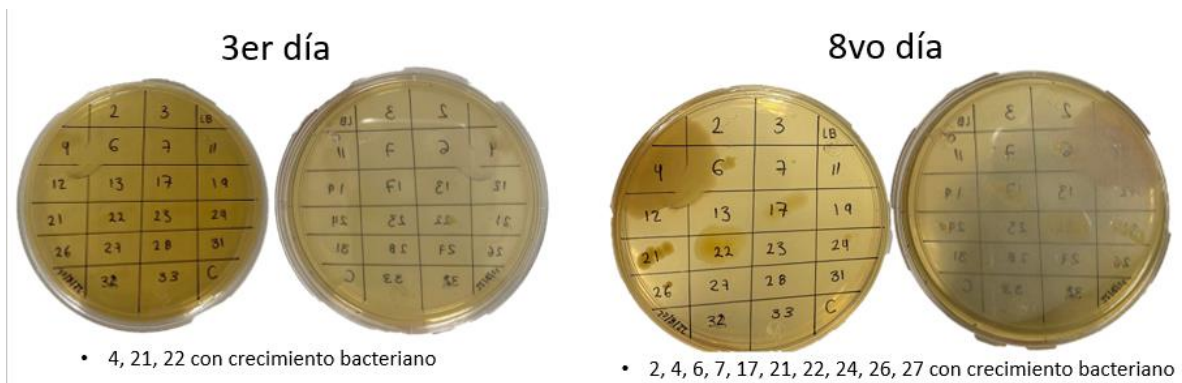


- Ningún crecimiento bacteriano

2do día



- 22 con poco crecimiento bacteriano



### **Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN por el método de CTAB**

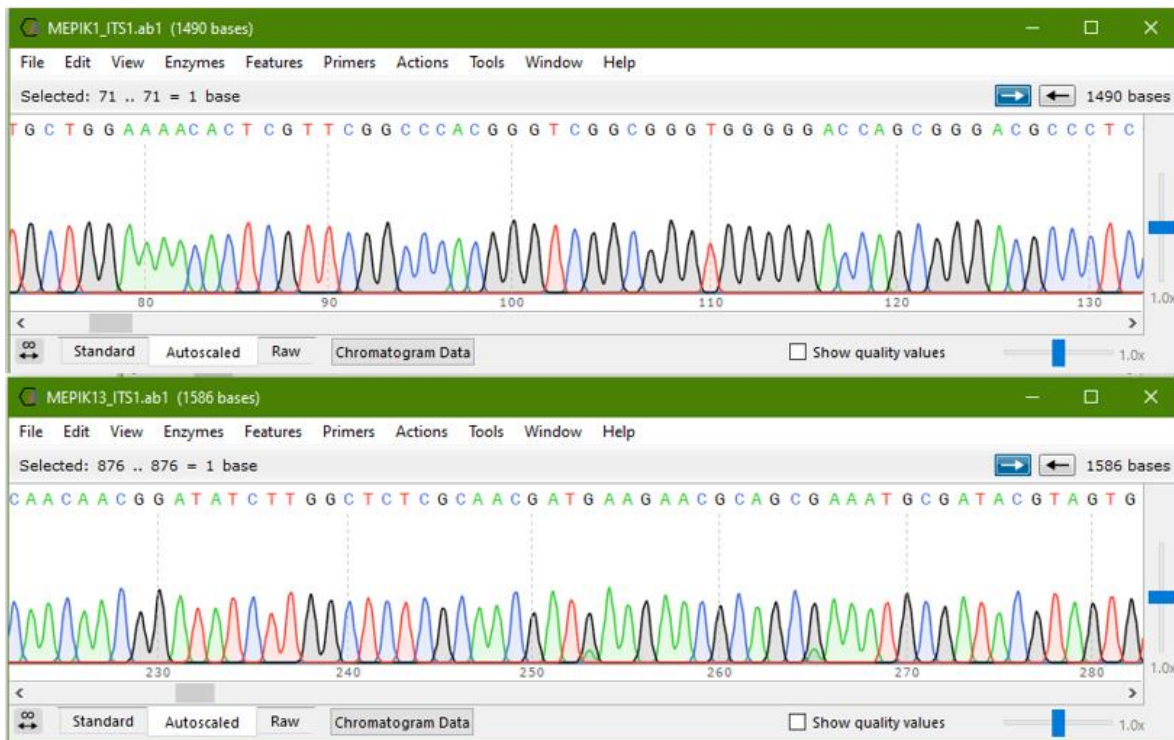
- 1.-Colectar de 5 a 10 mil de microalgas
- 2.- Centrifugar a 5,000 rpm por 10 minutos.
- 3.-Decantar sobrenadante y congelar pellet a -80°C
- 4.-Moler con motor y pistillo a 1000 rpm en 250 µL de CTAB.
- 5.-Adicionar perlas pequeñas de vidrio y usar el vortex por 10 minutos.
- 6.-Incubar a 65°C de 1 a 4 horas, invirtiendo los tubos cada 15 minutos.
- 7.- Adicionar 3 µL de RNAsaA (10mg/ml) e incubar 15 minutos a 37°C.
- 8.-Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos y transferir sobrenadante a un tubo nuevo.
- 9.-Adicinar a cada tubo 250 µL de cloroformo: Alcohol Isomilico (24:1) mezclar por invers.
- 10.-Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos y tranferir fase acuosa a un tubo nuevo.
- 11.-Adicionar 1 volumen de Isopropanol frio, incubar por 1 hora a -20°C.
- 12.-Centrifugar por 5 minutos a 14,000 rpm y eliminar sobrenadante.
- 13.-Lavar la pastilla con 500 µL de etanol 70% y centrifugar por un minuto.
- 14.-Decantar sobrenadante
- 15.-Secar la pastilla por 10 minutos.
- 16.-Resuspender la pastilla en 20 µL de T.E.

### **Anexo 4. Protocolo de purificación DNA GeneJET Gel Extraction Kit #k0692**

- 1.-En tubo de 1.5 ml depositar el gel previamente cortado y pesado.

- 2.-Añadir 1:1 volumen dependiendo lo que pese (Por ejemplo 100 µL de Binding Buffer por cada 100 mg de gel de agarosa).
- 3.-Incubar en el Termoblook a 60°C por 10 minutos.
- 4.-Transferir todo el tubo hasta 800 µL y centrifugar por un minuto.
- 5.-Colocar 100 µL Binding Buffer en GeneJET columna de purificación y centrifugar por un minuto.
- 6.- Decantar el tubo y volver a centrifugar por un minuto.
- 7.-Colocar en tubo nuevo de 1.5 ml y colocar la columna de purificación
- 8.-Adicionar 30 µL de Elution Buffer y centrifugar por un minuto.
- 9.-Lo que se queda en el tubo de 1.5 ml es el DNA purificado.

## Anexo 5. Electroferogramas de los aislados de microalgas MEPIK1, MEPIK13, MEPIK16 y MEPIK33.

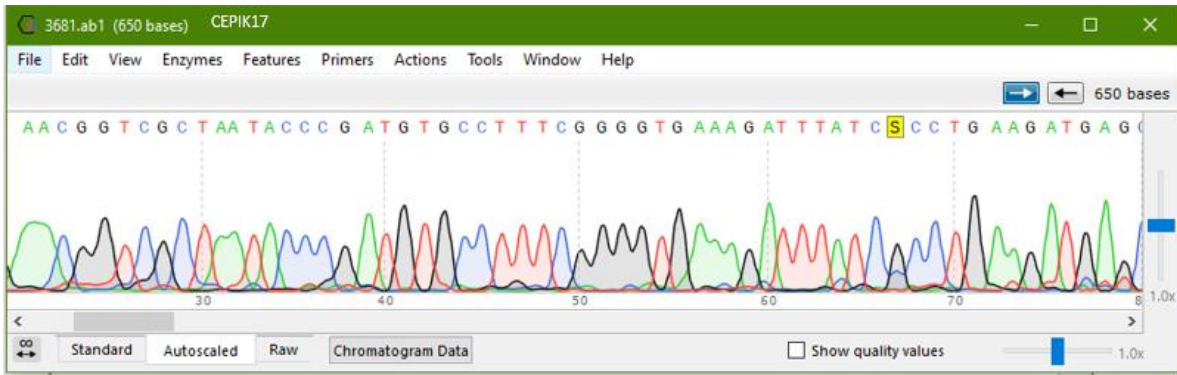






**Anexo 6. Electroferogramas de los aislados de cianobacterias CEPIK4, EPIK9 y CEPIK17.**





## Anexo 7. Aislados de cianobacterias y microalgas.

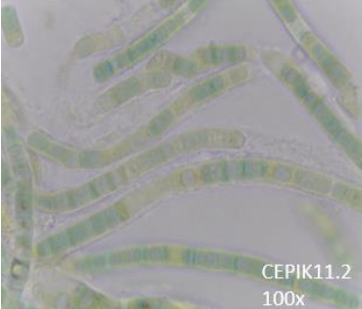


Laboratorio de Fisiología  
Molecular de Plantas

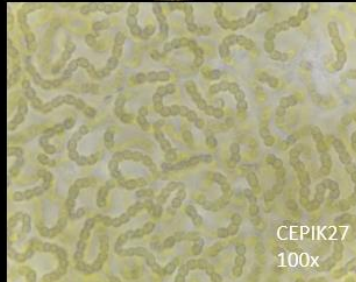
# CIANOBACTERIAS Y MICROALGAS POR MORFOLOGIA

# FILAMENTOS

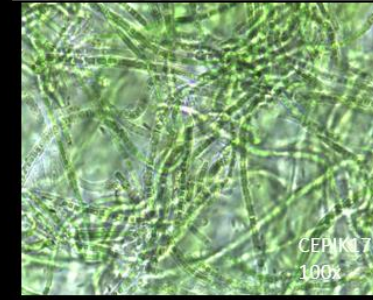
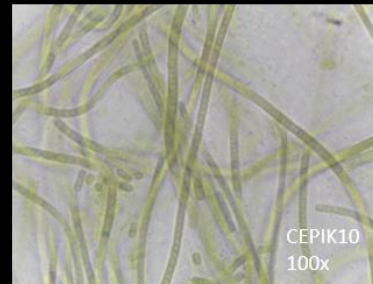
## Grupo A=Filamentos gruesos



## Grupo A.1=Filamentos de cadena

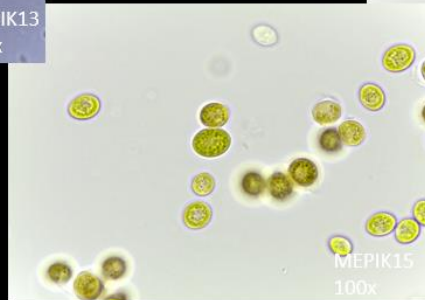
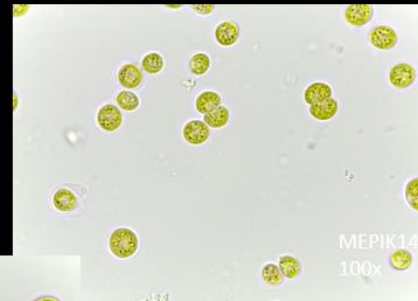
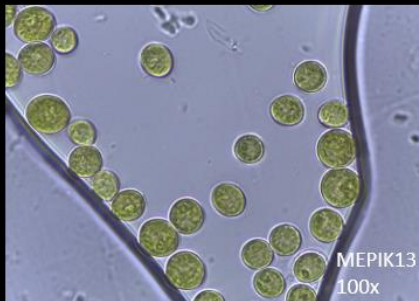


## Grupo A.2=Filamentos delgados



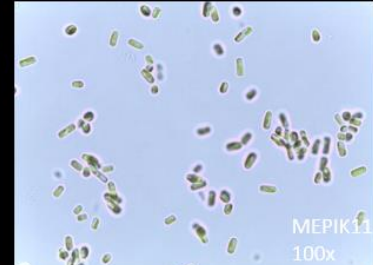
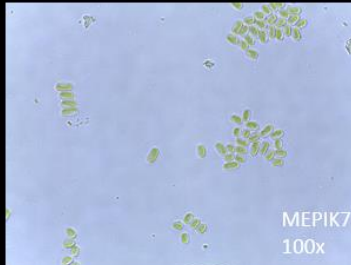
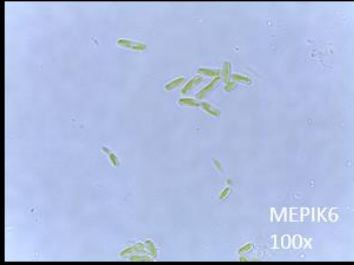
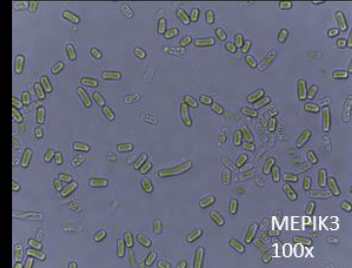
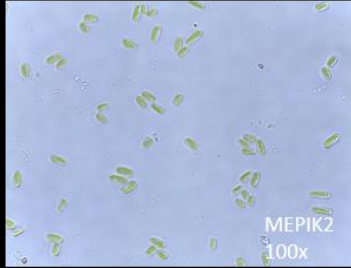
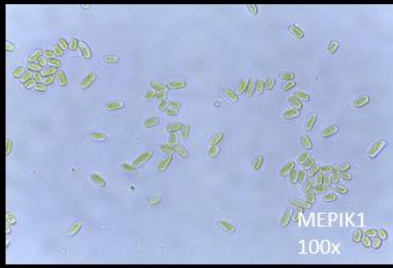
# UNICELULAR

## Grupo B= Células redondas

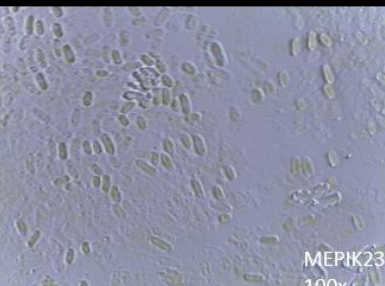
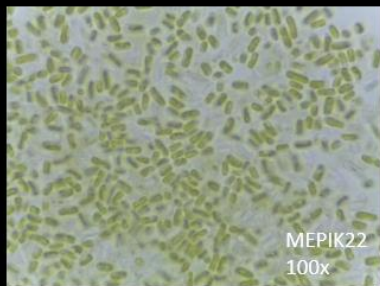
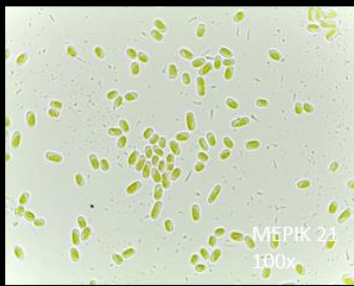
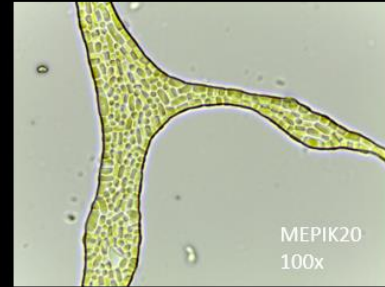


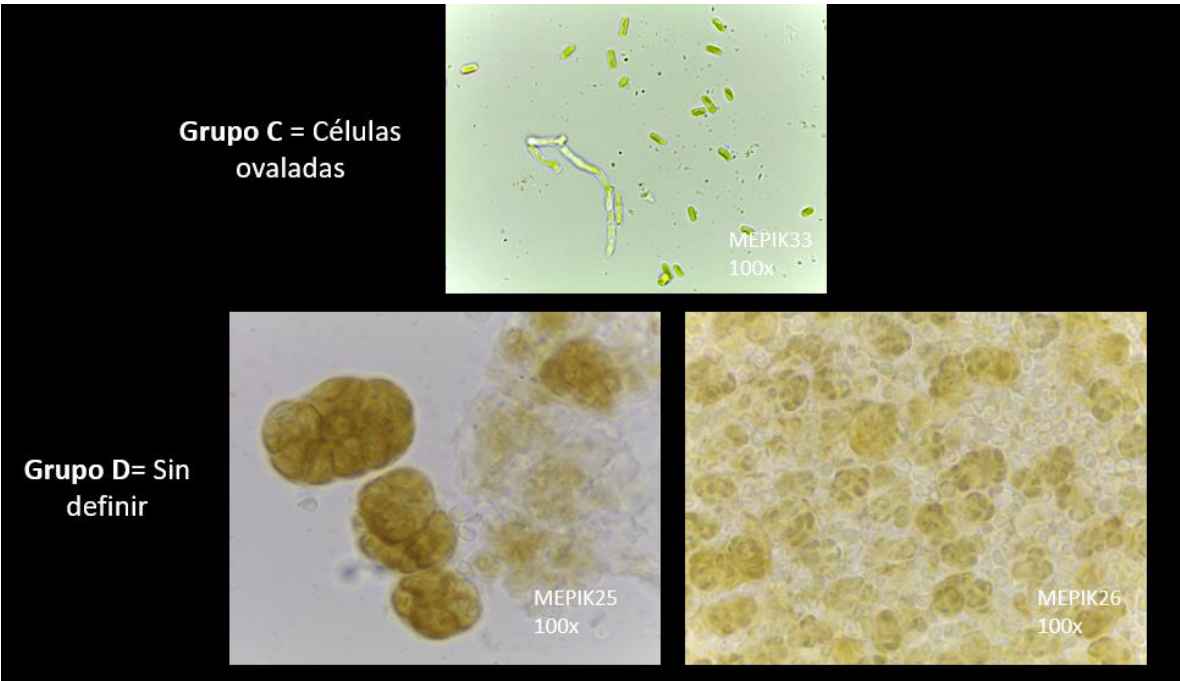
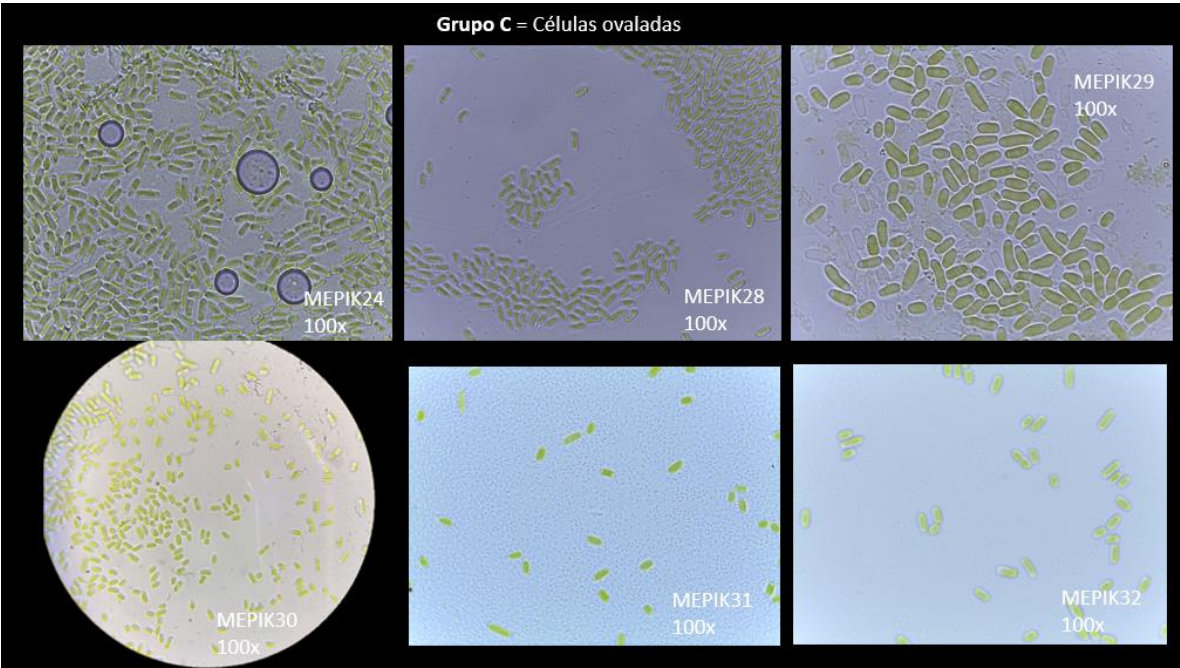


**Grupo C = Células ovaladas**



**Grupo C = Células ovaladas**





## Anexo 8. Resultados de la identificación molecular de microalgas a partir de la secuenciación de la región ITS y comparación mediante análisis tipo BLAST.

### MEPIK 1

|                                     | Descripción   | Nombre científico               | Maximo puntaje | Puntaje total | Cubierta de consulta | valor E | Por. Identificador | Cuenta Len | Adhesión                                 |
|-------------------------------------|---|---------------------------------|----------------|---------------|----------------------|---------|--------------------|------------|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Diplosphaera sp. 1 SC-2021 cepa TE1.D.gen de ARN ribosómico de subunidad pequeña...</a>       | <a href="#">Diplosphaera...</a> | 1230           | 1230          | 76%                  | 0.0     | 98,98%             | 3132       | <a href="#">gij2326009129 OK636219.2</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Diplosphaera sp. 1 SC-2021 cepa PPS2.D.espaciador interno transcrito 1. secuencia parc...</a> | <a href="#">Diplosphaera...</a> | 1230           | 1230          | 76%                  | 0.0     | 98,98%             | 727        | <a href="#">gij2124589819 OK636235.1</a> |

### MEPIK 13

|                                     | Descripción  | Nombre científico                  | Maximo puntaje | Puntaje total | Cubierta de consulta | valor E | Por. Identificador | Cuenta Len | Adhesión                                 |
|-------------------------------------|--|------------------------------------|----------------|---------------|----------------------|---------|--------------------|------------|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Sphaeropleales sp. LBA 21 gen de ARN ribosomal 18S. secuencia parcial: espaciador int...</a> | <a href="#">Sphaeropleale...</a>   | 728            | 728           | 63%                  | 0.0     | 89,70%             | 686        | <a href="#">gij966653655 KT308058.2</a>  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Coelastrella yingshanensis aislado FACHB-2311.gen de ARN ribosómico de subunidad p...</a>    | <a href="#">Coelastrella yi...</a> | 721            | 721           | 63%                  | 0.0     | 89,53%             | 1204       | <a href="#">gij1662935862 MH176129.1</a> |

### MEPIK16

|                                     | Descripción   | Nombre científico                | Maximo puntaje | Puntaje total | Cubierta de consulta | valor E | Por. Identificador | Cuenta Len | Adhesión                                 |
|-------------------------------------|---|----------------------------------|----------------|---------------|----------------------|---------|--------------------|------------|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Sphaeropleales sp. LBA 21 gen de ARN ribosomal 18S. secuencia parcial: espacia...</a> | <a href="#">Sphaeroplea...</a>   | 1072           | 1072          | 68%                  | 0.0     | 97,90%             | 686        | <a href="#">gij966653655 KT308058.2</a>  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Coelastrella yingshanensis aislado FACHB-2311.gen de ARN ribosómico de subuni...</a>  | <a href="#">Coelastrella ...</a> | 1057           | 1057          | 69%                  | 0.0     | 97,13%             | 1204       | <a href="#">gij1662935862 MH176129.1</a> |

### MEPIK 33

|                                     | Descripción   | Nombre científico               | Maximo puntaje | Puntaje total | Cubierta de consulta | valor E | Por. Identificador | Cuenta Len | Adhesión                                 |
|-------------------------------------|---|---------------------------------|----------------|---------------|----------------------|---------|--------------------|------------|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Diplosphaera sp. 1 SC-2021 cepa RF5B2.espaciador interno transcrito 1. secuencia parci...</a> | <a href="#">Diplosphaera...</a> | 1266           | 1266          | 80%                  | 0.0     | 98,08%             | 732        | <a href="#">gij2124589754 OK636220.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Diplosphaera sp. 1 SC-2021 cepa PPS2.D.espaciador interno transcrito 1. secuencia parc...</a> | <a href="#">Diplosphaera...</a> | 1264           | 1264          | 80%                  | 0.0     | 98,07%             | 727        | <a href="#">gij2124589819 OK636235.1</a> |

## Anexo 9. Resultados de la identificación molecular de cianobacterias a partir de la secuenciación de la región 16S y comparación mediante análisis tipo BLAST.

### CEPIK4

|                                     | Description  | Scientific Name                   | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession                                 |
|-------------------------------------|--|-----------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Phormidium sp. LEGE 15488 16S ribosomal RNA gene. partial sequence</a> | <a href="#">Phormidium sp...</a>  | 1079      | 1079        | 97%         | 0.0     | 98.22%     | 1246     | <a href="#">gij1229732737 IMF629805.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene. clone A44</a>              | <a href="#">uncultured bac...</a> | 1068      | 1068        | 97%         | 0.0     | 97.90%     | 748      | <a href="#">gij311334063 FR687543.1</a>   |

### CEPIK9

|                                     | Description   | Scientific Name                  | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession                                |
|-------------------------------------|---|----------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Nostoc sp. ACSSI 314 16S ribosomal RNA gene. partial sequence</a> | <a href="#">Nostoc sp. AC...</a> | 1110      | 1110        | 97%         | 0.0     | 99.19%     | 1412     | <a href="#">gij1837661439 MT425935.1</a> |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Nostoc sp. ACSSI 310 16S ribosomal RNA gene. partial sequence</a> | <a href="#">Nostoc sp. AC...</a> | 1110      | 1110        | 97%         | 0.0     | 99.19%     | 1459     | <a href="#">gij1837661427 MT425923.1</a> |

### CEPIK17

|                                     | Description  | Scientific Name                    | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession                                |
|-------------------------------------|--|------------------------------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Uncultured bacterium clone Prehnite13 16S ribosomal RNA gene. partial sequence</a> | <a href="#">uncultured bact...</a> | 680       | 680         | 81%         | 0.0     | 88.55%     | 1484     | <a href="#">gij209401315 FJ230814.1</a>  |
| <input checked="" type="checkbox"/> | <a href="#">Leptolyngbya sp. BEA0863B 16S ribosomal RNA gene. partial sequence</a>             | <a href="#">Leptolyngbya s...</a>  | 616       | 616         | 74%         | 2e-171  | 88.73%     | 1279     | <a href="#">gij2442333391 OQ419104.1</a> |

### **Anexo 10. Composición del Medio BG11**

Na NO<sub>3</sub>

K<sub>2</sub> HPO<sub>3</sub>

Mg SO<sub>4</sub>

Ca Cl<sub>2</sub>

Ácido Cítrico

Citrato de amonio férrico

EDTA

NaCO<sub>3</sub>

Metal mix (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, NaMoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O y Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O)

Agar

Agua destilada

### **Anexo 11. Composición del Medio BG11 libre de nitrógeno**

K<sub>2</sub> HPO<sub>3</sub>

Mg SO<sub>4</sub>

Ca Cl<sub>2</sub>

Ácido Cítrico

EDTA

Na CO<sub>3</sub>

Agar

Agua destilada

Metal mix



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de

Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 10 de octubre de 2023

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. ROJAS ALVILLAR DALIA KARINA**, con el título del trabajo: **Identificación y caracterización de cianobacterias y microalgas aisladas de *Selaginella lepidophylla* crecida en condiciones de invernadero.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: M. EN C. ALEJANDRO FLORES MORALES

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

\_\_\_\_\_

VOCAL: DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: M. EN C. JUDITH GARCÍA RODRÍGUEZ

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: M. EN C. MIGDALIA DÍAZ VARGAS

\_\_\_\_\_





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2023-10-10 13:44:18 | Firmante**

yTF6xmR1CMoLFORQCALqSqfeielajleQ3w08Ssw7yodGOH+wDWZYyGnm4SeSKKZqxBHBHPdTUIRY20smbwAVpzy5G7+dNSHQzPq/XlrxTxySyxZWG0jePry/uhuyfYCMNA70yZ8HfT+Z8odV9sJrNdfCdZizgdvErjACE6DejQ+iO5Z/ydsKQstCZSY0s6T8LbO32HzTtEtXRqhKWSHDHx7jcd0mpA9UvXIKiOvFlbrsOrZqGBAcapAD0Mth6PjNr89PPBXngStBcV63V/SeloRoXxbaBdSxgppq85OxjCxp4+Scbjo9z120Nvt0Q99VdjzljNPvP4l1IKNDISOW==

**ALEJANDRO FLORES MORALES | Fecha:2023-10-10 13:54:36 | Firmante**

p35Ngw1FE5Xh32kaliBNedXTZX3e/gV/r1Ytixd/3e+PBN8lg9qzXKDIhn9LPZ6h6iVZqgQ3rtwKa1DNbwSxFZYHFvtZnin0+6W67laplAufmrhO2Kw1F8kOtwWa7Kj2uhu/p/DvAwcN UxQTJrbxIA4QffFqvWmlwKpGdoJqBC8BqbuxshVvrc9dCFzoU+az47vJcpz67XRv5kZ6eUuaaihK95UBPUVhRdu1A6bHBSooxAt07ihtRVkCSISnjRSbhLckNqgEJV5Jtl0b4dKUft GWSbN5L4uCZJPaZDXDtaeozFpRzX+N5GSRNI5kUFkul0hdoB+UilrJF4mkg9g==

**RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2023-10-10 16:26:07 | Firmante**

l1XFVtniZPJDXiNXFOa4Zs2660DJD+R1evFZf1xEBNLxGBR3h8G/cYMBH/Uucs4jjuvXulrmSybT/pgyML39jIwSJKLNLzCCLwVZeFcEH2e/KGeekwA75WflMKxFznwcMmNzQ5 VOqPkzhxw+V7ZV0HXdlisdHdWwuFPqmyUNwKyTVuxQk2s/8see4lacX8f2EwS3hGX2ZnnVl2eZGAz7gFN00MI+GzqmZ55Fpb2Z10mpORqFAsX1T0zXe1pwX+cY/kt7ICBsG1y Dmp71vtQioYplgB//E8CeU3iM0B6EbHXKw5ktDWIAa+GLgMfMrrBJdsrP06ogTtBsaxTewEQ==

**MIGDALIA DIAZ VARGAS | Fecha:2023-10-10 18:24:34 | Firmante**

R/1hqCwHQy+2dbLn2x/yGevqRy1D3mQl4Wfk4XkgfJ7rspqdaBel2eSC07jcGpJkZSR8nWQ9/8BSMjS8Kd9RLvS7LW6M8HDKO6CgNDd1RPNuE1pRpNwBEo+1fW8OuETUpwS CY6iuNIWfPkReq+80oEpa7zDfST7VdRgQ+eaVhgxfMsL9xEe2Rdi6V3JbN821pxJMniGXs89K8j13fSv3VaSDXe4c8hf6ORHkbcv4qeo2zCu34o8CVrQtE5UwZRY6GBMK4o5wj AEI6z/o8VJqc3XR7qSF1WFaoeoeo/F1Y3OknF7CKMCbxuYg5CyRbGqXvaVRjNeqBgjgmtvXpA==

**JUDITH GARCIA RODRIGUEZ | Fecha:2023-10-10 22:11:00 | Firmante**

tfR/sgb9ul1qRPCrsuqLkTqb5V4Tg5+gCB/oOHS/mbaDRuB0b9oTm9ZwkyLb1Anh+avGbE2LZx8X/p4QMqcf2alj1TYwvedD9Q5z0hM+Sei6Tm4yMwRwDOn43JWSKn3/qEDhYS +OcsjvgEfmVgAQidqvLQWTZ8HQAACXaoJTUdjaFeOs2Cx0Bp3+q7j3RwPICkjQlVvCbX1WH18XCKgmDPC868QEzNDCEiWx38YyQb+ohGs/NrxJe1LmHGaoAYLOa9Tix7HDK1 Zjmg5Tb6PkWcq3xWVQvxbYPvY7wzyX9WfC8S6aAduXg7ynA4fwkEz8fTGDjvzPRJTfvr6VUbaA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



f0t78jFqX

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/St4PblwNynmWFCARj43AITU3TBLLYXt>

