

Artículo

Diversidad de fotobiontes presentes en muestras de líquenes del Estado de Guanajuato.

Clementina Franco-Palatto¹, César Álvarez-Mejía², Varinia López-Ramírez^{1*}

¹ Tecnológico Nacional de México/ITS de Irapuato. Coordinación de Ing. Bioquímica. Carretera Irapuato-Silao km 12.5 Col. El Copal, Irapuato, Guanajuato, 36821. México.

² Tecnológico Nacional de México/ITS de Abasolo, Coordinación de ingeniería Ambiental, Blvd. Cuitzeo de los Naranjos 401, Col. Cuitzeo de los Naranjos, Abasolo Guanajuato, México.

* Correspondencia: varinia.lr@irapuato.tecnm.mx.

Resumen: Los líquenes son organismos formados por una simbiosis entre un micobionte, uno o más fotobiontes y una levadura. Los géneros de fotobiontes más frecuentemente encontrados en líquenes son *Trebouxia*, *Trentepohlia* y *Nostoc*. En este trabajo se estudiaron las especies de fotobiontes presentes en algunos líquenes recolectados en Áreas Naturales Protegidas (ANP) del estado de Guanajuato. Los fotobiontes se obtuvieron a partir de la maceración de un trozo de liquen, inoculados en medio BG-11 e incubados a temperatura ambiente con un fotoperiodo de 16 h luz por 8 h de oscuridad. La caracterización molecular se realizó mediante la amplificación y secuenciación del gen *rbcl* de la enzima RuBisCo. Los géneros de fotobiontes identificados corresponden a *Trebouxia sp.*, *Bracteacoccus minor*, *Elliptochloris subsphaerica* y *Stichococcus bacillaris* procedentes de los líquenes *Parmelia sp.*, *Lecanora sp.*, *Hypotrachyna sp.* y *Ramalina sp.*, respectivamente.

Keywords: Fotobionte; simbiosis; líquenes.

1. Introducción

Los líquenes son organismos simbióticos conformados por un hongo (micobionte) un alga o cianobacteria (fotobionte) y una levadura [1]. La clasificación general de los líquenes es a partir de su morfología macroscópica, como crustosos, foliosos y fruticosos [2]. La selectividad de un simbiote se ha estudiado en líquenes principalmente respecto al micobionte, porque suelen ser más selectivos respecto a los fotobiontes [3-4]. La diversidad de fotobiontes presentes en líquenes puede ser influenciada por muchos factores, incluyendo la disponibilidad del simbiote, la estrategia reproductiva, el medio ambiente y los requisitos ecológicos específicos de cada simbiote [5-6].

Los fotobiontes han tenido un creciente interés en su diversidad y relaciones evolutivas, dado al papel que juegan dentro de la simbiosis como productores primarios de metabolitos que servirán de fuente de carbono al micobionte. La selección específica del fotobionte puede ser considerada como un rasgo filogenético característico. La especificidad se define por la relación taxonómica de los socios, mientras que la selectividad se define por la interacción preferencial de los organismos [7]. Esta interacción preferencial puede ser favorecida por la presencia de lectinas, las cuales son sintetizadas por los fotobiontes y pueden unirse de forma reversible con proteínas de membrana de los micobiontes [8].

Los fotobiontes presentes en talos liquénicos (aproximadamente cincuenta y seis géneros), algas y cianobacterias de tipo unicelular reciben diferentes denominaciones como ficobionte o clorobionte. Los géneros *Trebouxia*, *Trentepohlia* y *Nostoc* son los fotobiontes más frecuentes, y de amplia distribución en los líquenes. Los géneros *Trebouxia* y *Trentepohlia* son eucarióticos y pertenecen a las algas verdes; mientras que *Nostoc* pertenece al grupo de bacteria oxígeno-fotosintética (cianobacteria) [9]. La mayoría de los fotobiontes

Citar este trabajo: Clementina Franco-Palatto, César Álvarez-Mejía, Varinia López-Ramírez. Diversidad de fotobiontes presentes en muestras de líquenes del Estado de Guanajuato. *REIA* 2022, 6 (2), 11-16.

Recibido: 18/07/2022

Aceptado: 09/09/2022

Publicado: 07/12/2022

son de vida libre, es decir, pueden subsistir libremente en la naturaleza en donde se reproducen sexual y asexualmente y se comportan como simbioses facultativas en la asociación líquénica [10].

Los estudios de diversidad de fotobiontes respecto a los de micobiontes se presentan en menor proporción [11], por lo que, es necesario realizar análisis con el fin de conocer el tipo, número de fotobiontes presentes en líquenes para poder relacionar el tipo de fotobionte con el micobionte, la distribución ecológica de los mismos, así como los beneficios que otorgan a su correspondiente socio fúngico.

Por lo anterior, en este estudio nos propusimos aislar e identificar los fotobiontes presentes en muestras de líquenes, con el fin de identificar el tipo de fotobionte asociado a los diferentes morfotipos de especies líquénicas presentes en el estado de Guanajuato.

2. Materiales y Métodos

Selección de muestras líquénicas

A partir del cepario de líquenes presente en el Laboratorio de Diversidad e Interacción Microbiana del Instituto Tecnológico de Irapuato, se seleccionaron siete muestras de líquenes colectadas de diversas ANPs del estado de Guanajuato, procurando tener una representación de los diferentes morfotipos de líquenes (crustosos, foliosos y fruticosos), identificadas a través de su respuesta frente a compuestos químicos y sus características macroscópicas [2]. La colecta de muestras se realiza tomando una muestra pequeña del liquen con ayuda de una navaja o pinzas, depositándola en sobres de papel procurando anotar su geolocalización y morfotipo.

Aislamiento de fotobiontes.

Los cultivos axénicos de fotobiontes se obtuvieron desinfectando un pequeño fragmento de liquen (0.5 cm) con jabón y posterior lavado con agua destilada estéril en tres ocasiones, para remover el exceso de jabón. Posteriormente, la muestra se maceró con un micropistilo en 0.5 mL de agua destilada estéril, de dicha mezcla se inocularon 0.3 mL en cajas Petri con agar BG-11. Los fotobiontes sembrados se incubaron a temperatura ambiente y se expusieron a fotoperiodos de 16 h luz x 8 h de oscuridad. Para que los cultivos sembrados fueran axénicos o lo más cercano a ello, se realizaron numerosas resiembras.

Extracción de ADN de fotobiontes aislados.

Para la extracción de ADN genómico de los fotobiontes, se adaptó el método descrito por Chi et al., (2009) [12], tomando una asada del cultivo para luego colocarlo en un tubo eppendorf con 500 µL de solución reguladora de lisis (1 M KCl, 100 mM Tris-HCl y 10 mM EDTA) agregando tres perlas de metal y agitación exhaustiva en vórtex por 5 minutos. Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se deposita en un tubo eppendorf con 2 volúmenes de etanol absoluto frío; se volvió centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos para obtener una pasilla con material genómico que luego se lavó tres veces con etanol al 70% (v/v).

*Amplificación por PCR del gen *rbcl* de la enzima RuBisCo.*

La subunidad mayor de la enzima Rubisco (*rbcl*) fue amplificada mediante PCR, con un paso inicial de desnaturalización a 95°C/5 min.; y 30 ciclos (95°C/30 s, 48°C/45 s, 72°C/1 min.) y una extensión final a 72°C/5 min. Los oligonucleótidos utilizados fueron *rbcl*-203 directo (CAATCWTCTWACWGGWACTTGGACWAC), *rbcl*-991 reverso (CCTTCTARTTTACWACAAC) [13].

La integridad y tamaño de los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v. El tamaño del fragmento se fue de aproximadamente 700 pb.

Los productos de PCR se purificaron por el método QIAquick PCR purification (Invitrogen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron enviadas para su secuenciación al Laboratorio de Genómica para la Biodiversidad del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV Unidad Irapuato). Como controles positivos para el gen *rbcL* RuBisCo se utilizó un aislado de *Chlorella sp.*, y *Clamydomonas sp.*

Reconstrucción filogenética del gen *rbcL*

El análisis de las secuencias se realizó empleando la base de datos Genbank del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). Con ayuda del programa BLASTn, la selección de candidatos se realizó analizando el porcentaje de identidad, el porcentaje de cobertura y el E-value. Se tomaron como posibles candidatos aquellos registros cuyo E-value fuera cercana a cero, el porcentaje de cobertura > 80% y el porcentaje de identidad > 90%.

Las secuencias obtenidas, así como algunas seleccionadas de la base de datos del GenBank se alinearon en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor 7.2.6.1 [14] y posteriormente se realizó la reconstrucción filogenética con el programa MEGA7 [15] para una posterior comparación de las especies estudiadas.

La reconstrucción filogenética se realizó por el método de Máxima verosimilitud (Maximum Likelihood), la validación de la reconstrucción se realizó con el método estadístico de remuestreo Bootstrap con un número de réplicas de 850, el modelo de sustitución empleado fue Jukes-Cantor (JK), estimado con el programa jModelTest 2 [16].

3. Resultados.

3.1. Fotobiontes aislados de muestras de líquenes.

A partir del catálogo de líquenes colectados a lo largo del estado de Guanajuato, se seleccionaron 7 muestras de líquenes recolectadas en las ANPs “Las Musas”, *Melanelixia sp.* (JDAR018), *Lecanora sp.* (JDAR019), *Parmelia sp.* (JDAR021); “Cuenca de la Esperanza” (Palomas) *Punctelia sp.* (LPDS001), *Ramalina sp.* (VLR-42) y “Sierra de Lobos”, *Hypotrachina sp.* (S.L. #10) y *Teloschistes sp.* (AAA-21). Estas muestras fueron seleccionadas ya que son representantes de los tres morfotipos liquénicos (crustosos, foliosos y fruticosos; Figura 1).

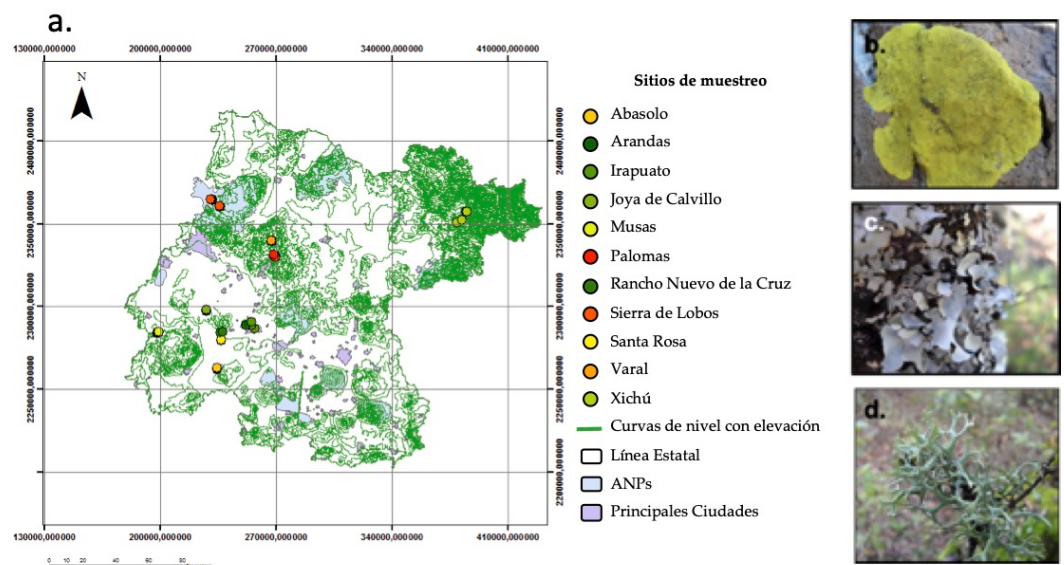


Figura 1. Distribución de líquenes y estructura morfológica de los líquenes de Guanajuato. a. Sitios de colecta en el estado de Guanajuato de donde se seleccionaron las muestras de trabajo para este

estudio; **b.** Liqen crustoso; **c.** liqen folioso; **d.** Liqen fruticoso. (Imágenes representativas de cada morfotipo).

A partir de los líquenes seleccionados, se obtuvieron cultivos axénicos de sus fotobiontes asociados (Figura 2), de los cuáles se extrajo ADN genómico y se amplificó el gen de la subunidad mayor de la enzima rubisco (*rbcL*), para las muestras de algas, y el gen 16S rADN para una muestra única de cianobacteria procedente del líquen *Telochistes sp.* Esta última secuencia no se consideró en el análisis filogenético.

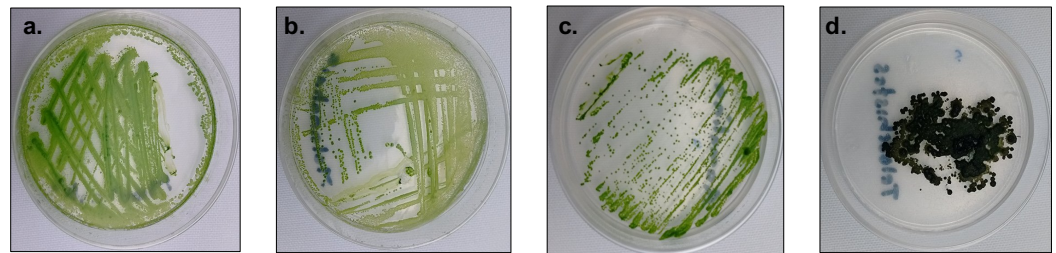


Figura 2. Morfología colonial de los fotobiontes de los líquenes. **a.** Fotobionte del líquen folioso *Hypotrachina sp.* (SL. 10); **b.** Fotobionte del líquen folioso *Melanelixia sp.* (JDAR-018); **c.** Fotobionte del líquen fruticuloso *Ramalina sp.* (VLR-42); **d.** Fotobionte del líquen fruticuloso *Teloschistes sp.* (AAA-21).

3.2. Análisis comparativo de secuencias del gen *rbcL*.

Las secuencias de la subunidad mayor de la enzima rubisco (*rbcL*), se analizaron mediante análisis BLASTn en la página de NCBI, obteniéndose los resultados presentados en la Tabla 1. Las secuencias candidatas se descargaron y se emplearon para realizar el análisis filogenético.

Tabla 1. Análisis comparativo de secuencias mediante análisis tipo BLASTn en la página de NCBI.

Liqen	Tamaño secuencia (pb)	% de cobertura	% de identidad	E-value	Candidatos
<i>Ramalina sp.</i>	779	93	91	0	<i>Stichococcus bacillaris</i> strain UTEX LB 1962
<i>Parmelia sp.</i>	808	77	92	0	<i>Myrmecia sp.</i> BCP-SEV3VF12
<i>Hypotrachyna sp.</i>	768	75	91	0	<i>Elliptochloris subsphaerica</i>
<i>Lecanora sp.</i>	774	99	99	0	<i>Bracteacoccus minor</i> strain ATA2-1KO1
<i>Teloschistes sp.*</i>	403	<50	83	7e-25	<i>Crinalium epipsammum</i> PCC 9333

* El fotobionte aislado a partir de *Teloschistes sp.* correspondía a una cianobacteria.

Las secuencias de las muestras *Punctelia sp.* (LPDS001) y *Melanelixia sp.* (JDAR018) no presentaron la calidad suficiente (porcentaje de identidad menor al 50%), para poder establecer un análisis comparativo de las mismas, lo que imposibilitó la identificación del fotobionte.

3.3. Reconstrucción filogenética del gen *rbcL* de fotobiontes aislados de líquenes del estado de Guanajuato.

La topología obtenida a partir de la reconstrucción filogenética muestra dos clados principales, con un buen soporte de ramas (Bootstrap > 70), la mayoría de las especies de

fotobiontes aislados pertenecen a la familia Trebouiaceae, misma que ha sido descrita como predominante en los líquenes.

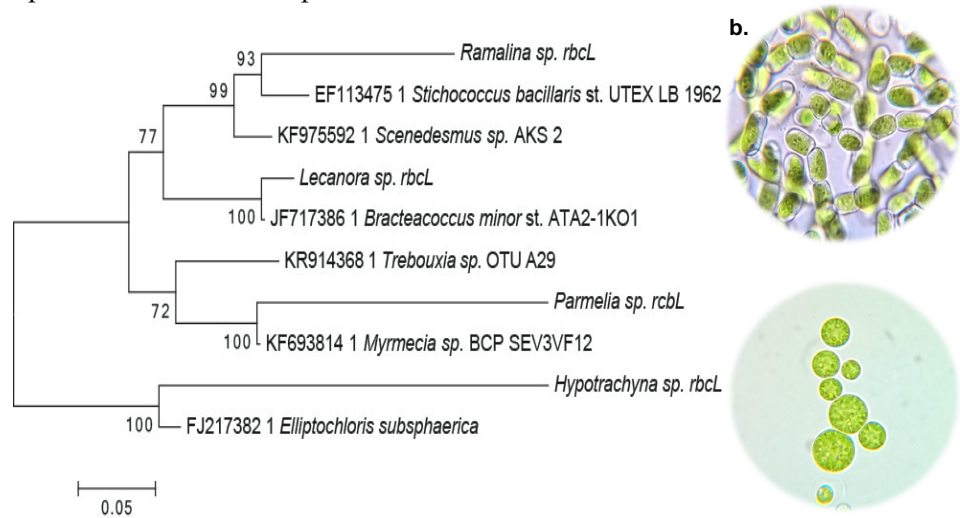


Figura 3. Reconstrucción filogenética del gen *rbcL* de fotobiontes. **a.** Se muestra el árbol con la probabilidad logarítmica más alta (-4199,2761). Hubo un total de 734 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA6 [15]. **b y c.** Morfología microscópica de los fotobiontes *Stichococcus bacillaris* y *Bracteacoccus minor* de *Ramalina sp.* y *Lecanora sp.*, respectivamente.

4. Discusión

De los fotobiontes identificados, encontramos que la secuencia del fotobionte obtenido a partir del líquen *Lecanora sp.* (JDAR019), está relacionado con la especie *Bracteacoccus minor*. La cual es un alga verde cocoidal que se ha demostrado que presenta una relación de mutualismo facultativo nutricional incluso con hongos saprófitos como es el caso de *Rhizidium phycophilum* [18].

Otros autores, han descrito otros fotobiontes en simbiosis en líquenes del género *Lecanora* como Helms y col. (2001) [17], que lograron identificar a *Trebouxia incrustata* como fotobionte de *Lecanora dispersa*, mediante un análisis de la secuencia de ITS de rRNA, sugiriendo la presencia de diversos géneros de fotobiontes asociados a especies de *Lecanora*.

Por otra parte, el fotobionte *Myrmecia israelensis* aislado a partir del líquen *Parmelia sp.* (JDAR021) pertenece a la familia Trebouiaceae, familia que se encuentra en mayor proporción presente en los líquenes [6]. Para el caso del líquen *Ramalina sp.* (VLR-42) se identificó un fotobionte con filiación genética con la especie *Stichococcus bacillaris*. Fotobiontes del género *Stichococcus* han sido descritos como simbiontes fotosintéticos de líquenes por Ahmadjian (1993) [19], particularmente de la especie *Endocarpon pusillum*, un líquen crustoso, mientras que *Ramalina* corresponde a un líquen fruticoso.

El análisis filogenético de la secuencia obtenida para la muestra *Hypotrachyna sp.* (S.L. #10) indicó estar relacionada con la especie *Elliptochloris subsphaerica*, un microorganismo del filo *Chlorophyta* clase *Trebouxiophyceae* el cual ha sido encontrado en la especie líquénica *Baeomyces rufus* [20], sin embargo, si analizamos el largo de las ramas en el árbol filogenético, podemos sugerir que se trata de otra especie, son necesarios más estudios para poder confirmar esta hipótesis.

5. Conclusiones

Los fotobiontes asociados a líquenes del estado de Guanajuato, aislados en este trabajo, es una muestra de la diversidad que puede encontrarse de estos organismos. Determinar si dichos fotobiontes son específicos para diferentes géneros de líquenes requerirá futuros estudios. Así como un análisis bioprospectivo para establecer si su

distribución ecológica está relacionada con el sitio de muestreo o las condiciones ambientales del mismo.

Contribución: Conceptualización, Álvarez-Mejía, C. y López-Ramírez, V; metodología, Álvarez-Mejía, C. y Franco-Palatto, C.; análisis filogenéticos, López-Ramírez, V; validación: Álvarez-Mejía, C., Franco-Palatto, C. y López-Ramírez, V.

Financiamiento: Esta investigación fue financiada por el INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE IRAPUATO, con número de convenio 295-2019 y clave de registro INV-LGAC-IBIOQ-004-2019.

Agradecimientos: Agradecemos al Instituto Tecnológico Superior de Irapuato y al Instituto Tecnológico Superior de Abasolo, por las facilidades e infraestructura prestada para la realización de este proyecto. Así como a Miguel Ángel Vega-Rivera y Ma. Concepción Araujo-Gamiño por su apoyo técnico.

Conflicto de interés: Los autores declaran no tener conflicto de intereses. Los financiadores no tuvieron ningún rol en el diseño del estudio; en la recopilación, análisis o interpretación de datos; en la redacción del manuscrito, o en la decisión de publicar los resultados.

Referencias

1. Spribille, T.; Tuovinen, V.; Resl, P.; Vanderpool, D.; Wolinski, H.; Aime, M.C.; Schneider, K.; Stabentheiner, E.; Toome-Heller, M.; Thor, G.; Helmut, M.; Johannesson, H.; McCutcheon, J. P. Basidiomycete yeasts in the cortex of ascomycete macrolichens. *Science* **2016**, 353, 488-492.
2. Hale, M. E. How to know the Lichens. 1st ed.; P. K. N. Series. W.M. C. Brown Company Publishers: Dubuque, Iowa, U.S.A, **1969**, 3-6.
3. Dal Forno, M.; Lawrey, J. D.; Masoumeh, S.; Extensive photobiont sharing a rapidly-radiating cyanolichen clade. *Mol. Ecol.* **2021**, 30(8), 1755-1776.
4. Pino-Bodas, R.; Stenroos, S. Global biodiversity patterns of the photobionts associated with the genus *Cladonia* (Lecanorales, Ascomycota). *Microb. Ecol.* **2021**, 82, 173-187.
5. Fedrowitz, K.; Kaasalainen, U.; & Rikkinen, J. Geographic mosaic of symbiont selectivity in a genus of epiphytic cyanolichens. *Ecol. and Evol.*, **2012**, 2(9), 2291-303.
6. De Carolis, R.; Cometto, A.; Moya, P.; Barreno, E.; Grube, M.; Tretiach, M.; Leavitt, S. D.; Muggia, L. Photobiont diversity in lichen symbioses from extreme environments. *Frontiers in Microb.* **2022**, 13, 809804.
7. Rambold, G.; Friedl, T.; Beck, A. Photobionts in Lichens: Possible Indicators of Phylogenetic Relationships. *American Bryological and Lichenological Society access to The Bryologist* **2014**, 101(3), 392-397.
8. Sigh, R. S.; Walia, A., K. Characteristics of lichen lectins and their role in symbiosis. *Symbiosis* **2014**, 62, 123-134.
9. Saini, K. C.; Nayaka, S.; Bast, F. Diversity of lichen photobionts: Their Coevolution and Bioprospecting Potential. In: Satyanarayana, T., Das, S., Johri, B. (eds) *Microbial Diversity in Ecosystem Sustainability and Biotechnological Applications*. Springer, Singapore. **2019**.
10. Martínez, I.; Flores, T.; Otálora, M. A. G.; Belinchón, R.; Prieto, M.; Aragón, G.; Escudero, A. Multiple-scale environmental modulation of lichen reproduction. *Fungal Biology*, **2012**, 116(11), 1192-201.
11. Nelsen, M. P. Sharing and double-dating in the lichen world. *Mol. Ecol.* **2021**, 30(8), 1751-1754.
12. Chi, M. H.; Park, S. Y.; Lee, Y. H. A quick and safe method for fungal DNA extraction. *Plant Pathol. J.* **2009**, 25(1), 108-111.
13. Otálora, M. A. G.; Martínez I.; O'Brien H.; Molina M. C.; Aragón G.; Lutzoni F. Multiple origins of high reciprocal symbiotic specificity at an intercontinental spatial scale among gelatinous lichens (Collembataceae, Lecanoromycetes). *Mol. Phylogenet. Evol.* **2010**, 56(3), 1089-95.
14. Hall, T. A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, **1999**, 41, 95-98.
15. Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipinski, A.; Kumar, S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. and Evol.*, **2013**, 30(12), 2725-2729.
16. Darriba D.; Taboada G. L.; Doallo R.; Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **2012**, 9(8), 772.
17. Helms, G.; Friedl, T.; Rambold, G.; Mayrhofer, H. Identification of photobionts from the lichen family Phisciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. *The Lichenologist*, **2001**, 33(1), 73-86.
18. Picard, K. T.; Letcher, P. M.; Powell, M. J.; Bidartondo, M. I. Evidence for a facultative mutualist nutritional relationship between the green coccoid alga *Bracteacoccus* sp. (*Chlorophyceae*) and the zoosporic fungus *Rhizidium phycophilum* (*Chytridiomycota*). *Fungal Biology*, **2013**, 117(5), 319-328.
19. Ahmadjian, V. The lichen symbiosis. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY., USA, **1993**. 75-78.
20. Gustavs, L.; Schiefelbein, U.; Darienko, T.; Pröschold, T. Symbioses of the Green Algal Genera *Coccomyxa* and *Elliptochloris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). In *Algal and cyanobacteria symbioses*. Grube, M.; Sechback, J.; Muggia, L. World Scientific Publishing Europe Ltd. Singapore, Malaysia, **2017**; pp. 169-208.