CIANOBACTERIAS EN CEFALODIOS DE *STEREOCAULON* (ASCOMYCETES LIQUENIZADOS), UN ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD

PAULA CAMILA PAIPILLA GARZÓN

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN

PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

BOGOTÁ, D.C. 2022

TRABAJO DE GRADO: MODALIDAD INVESTIGACIÓN-INNOVACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CIANOBACTERIAS EN CEFALODIOS DE *STEREOCAULON* (ASCOMYCETES LIQUENIZADOS), UN ESTUDIO DE ESPECIFICIDAD

AUTOR:

PAULA CAMILA PAIPILLA GARZÓN

DIRECTOR: ABELARDO RODRÍGUEZ BOLAÑOS

CODIRECTOR: LILIA BIBIANA MONCADA CARDENAS

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN

PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

BOGOTÁ, D.C.

2022

A mis abuelas, Paulina y Elvia por su amor y

apoyo incondicional en cada etapa de mi vida.

Agradecimientos

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos

A la Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Facultad de Ciencias y Educación, Proyecto Curricular de Licenciatura en Biología, por el apoyo académico, moral y logístico para culminar mi trabajo de grado.

A la Dra. y profesora Bibiana Moncada por la dirección de mi trabajo, apoyo, cariño e invaluables aportes en mi vida y en la realización del documento.

Al Dr. Robert Lücking por su invaluable ayuda, dirección y revisión del documento final.

Al MSc y profesor Abelardo Rodriguez por su apoyo y por su invaluable ayuda durante la culminación del trabajo.

A los MSc. Ayda Lucía Patiño, MSc Diego Simijaca, MSc. Luis Fernando Coca, MSc. Jean Marc Torres, y al Biólogo Diego Rincón por su cooperación con las muestras para la realización de este trabajo.

A Lizeth Rodriguez y Stefania Oliveros por ser mis compañeras invaluables, por su amistad, su cariño y su apoyo.

A mis padres, Diana y Ricardo que me han apoyado, acompañado y amado durante mi proceso estudiantil. A mi hermana Natalia que fue mi pilar siempre y a Nicolas Rozo por su inmenso amor y compresión en todo mi proceso.

Y por último, al género *Stereocaulon*, por existir y dejarme descubrir sus misterios.

Resumen

Cianobacterias en *Stereocaulon* (Ascomycetes liquenizados), un estudio de especificidad

El género *Stereocaulon* es un género de líquenes tripartitos, es decir su talo contiene tres socios principales, un micobionte y dos fotobiontes, uno algal y el otro una cianobacteria. Este género tiene una amplia distribución y se encuentra representado en el territorio colombiano con al menos 22 especies. El estudio de las relaciones filogenéticas con las cianobacterias en las especies del género *Stereocaulon* en Colombia podría ayudar a reconocer el fenómeno de la liquenización y de la adquisición de las cianobacterias en líquenes tripartitos. Por lo tanto, este trabajo buscaba reconocer las interrelaciones de especies selectas del género *Stereocaulon* con sus fotobiontes cianobacterias en diversos complejos paramunos y bosques altoandinos colombianos. De especies representativas del género *Stereocaulon*, se generaron secuencias del marcador ITS para el componente fúngico y secuencias de los marcadores 16S de ADN ribosomal y de la región del Rubisco rbcLx para las cianobacterias. Los resultados muestran una asociación oportunista de las especies de *Stereocaulon* con las cianobacterias. Concluyendo de esta manera, que no hay una especificidad entre cianobionte y micobionte en las especies de *Stereocaulon* aquí estudiadas. Sin embargo, se evidenció una relación entre el área de distribución y la presencia de los géneros de cianobacterias. Por otra parte, se añadió información sobre el género *Stereocaulon* con la adición de secuencias de líquenes colombianos a la librería de GenBank.

Palabras clave: *Diversidad, filogenia, ecosistemas colombianos, simbiosis.*

Abstract

Cyanobacteria in *Stereocaulon* (lichenized Ascomycetes), a specificity study

The genus *Stereocaulon* is a genus of tripartite lichens, that is, its thallus contains three main partners, a mycobiont and two photobionts, one algal and the other a cyanobacterium. This genus, with a wide distribution, is represented in the Colombian territory with at least 22 species. The study of phylogenetic relationships with cyanobacteria in the species of the genus *Stereocaulon* in Colombia could help to recognize the phenomenon of lichenization and the acquisition of cyanobacteria in tripartite lichens. The aim of this study was therefore to recognize the interrelationships of some species of the genus *Stereocaulon* with their cyanobacterial photobionts in several Colombian paramunal complexes. Representative species of the genus *Stereocaulon* were selected, sequences of the ITS marker were generated for the fungal component, and sequences of the 16S ribosomal DNA markers and of the Rubisco rbcLx region for the cyanobacteria. An opportunistic association of cyanobacteria with *Stereocaulon* species was found. It can be concluded that there is no close specificity between cyanobiont and mycobiont in the *Stereocaulon* species studied here. However, a relationship between the distribution area and the presence of cyanobacterial genera was evidenced. On the other hand, information on the genus *Stereocaulon* was enriched with the addition of Colombian lichen sequences to the GenBank library.

Key words: *Diversity, phylogeny, Colombian ecosystems, symbiosis.*

Índice

Introducción **10**

1.1 Antecedentes 12

Problema **16**

Justificación **18**

Objetivos **20**

4.1. Objetivo General. 20

4. 2 Objetivos Específicos 20

Materiales y métodos **21**

5.1 Selección de las áreas de estudio 21

5.2 Selección de las especies motivo de estudio 22

5.3 Extracción y obtención de datos moleculares 23

5.3.1. Fotobionte cianobacterial: 23

5.3.2 Micobionte 23

5.3.3 Extracción del ADN 23

5.3.4 Reacción en cadena de polimerasa (PCR) 23

5.3. Análisis de datos 25

5.3.1. Análisis filogenético 25

Resultados **26**

6.1 Identificación de las especies del género *Stereocaulon* 26

6.2 Identificación de las cianobacterias en los cefalodios de especies de *Stereocaulon* 27

6.3 Correlaciones filogenéticas cianobiontes - especies liquénicas 29

Discusión **33**

Conclusiones **39**

Referencias **40**

Lista de tablas

Tabla 1. Zonas geográficas seleccionadas …….. 21

Tabla 2. Cebadores moleculares usados para la identificación de los organismos objeto de estudio ……..... 24

Tabla 3. Presencia de *Stigonema* por ubicación en porcentajes ……..31

Tabla 4. Presencia de *Nostoc* por ubicación en porcentajes ……... 32

Tabla 5. Presencia de *Rhizonema* por ubicación en porcentajes …… 33

Lista de figuras

Figura 1. Árbol de ITS código de barras para *Stereocaulon* …….. 26

Figura 2. Árbol del cebador 16S rRNA para la identificación de cianobacterias en *Stereocaulon*…… 27

Figura 3. Árbol de la región del Rubisco para la identificación de cianobacterias en *Stereocaulon*. …….. 28

Figura 4. Árbol correlación especie liquénica - cianobionte en relación con su ubicación… 29

Introducción

Los líquenes son organismos presentes en muchos ecosistemas de la Tierra, son asociaciones simbióticas entre un organismo heterótrofo, el micobionte y uno o más autótrofos fotobiontes, que pueden ser algas verdes y cianobacterias o ambas (Asplund & Wardle, 2017). Existen más de 19.387 especies de líquenes en todo el mundo (Lücking, et al.,2017) y en latitudes más altas, el número de especies de líquenes excede el número de especies de plantas vasculares (Friedl, et al., 2008). Sin embargo, se ha demostrado que la simbiosis de líquenes es mucho más compleja y puede incluir una amplia gama de otros organismos que interactúan, incluidas bacterias no fotosintéticas, hongos accesorios y algas (Sierra, et al.,., 2020; Smith, et al., 2020). La mayoría de los líquenes son asociaciones bipartitas, es decir solo dos socios; un micobionte y un fotobionte (Nelsen, et al., 2020). Sin embargo, algunos hongos formadores de liquen forman regularmente asociaciones tripartitas complejas, tres socios que incluyen un fotobionte algal y cianobacterias que generalmente están restringidas a cefalodios, pequeñas estructuras en o sobre el talo en las que la función de las cianobacterias está restringida a la fijación de nitrógeno y el carbono se obtiene del fotobionte de algas verdes a través del micobionte (Palmqvist, et al., 2017).

De las 19.387 especies de líquenes conocidos, alrededor de 700 a 760 especies de líquenes poseen cefalodios (Lücking, et al., 2017), encontrándose en mayor proporción en los géneros *Lobaria, Nephroma, Peltigera, Pseudocyphellaria, Placopsis* y *Stereocaulon* (Rikkinen, 2017). Colombia cuenta con una diversidad liquénica de 1.634 de líquenes especies de líquenes, de las cuales más o menos el 9% son líquenes tripartitos y de esos *Stereocaulon* cuenta con 22 especies en el territorio colombiano (Bernal, et al., 2020). *Stereocaulon* es un liquen tripartito; generalmente se compone del talo primario y los

pseudopodecios con filocladios, cefalodios y apotecios; algunas especies tienen soredios y/o tomento (Park, et al., 2018). Durante el crecimiento de estos líquenes, los cefalodios aparecen en una etapa temprana y persisten en la parte basal del pseudopodecio (Lamb, 1951; Högnabba, 2006). Los cefalodios se pueden definir según Smith et al., (2009) como: "Una región delimitada dentro o una estructura verrugosa, escamosa o arbustiva en la superficie de un talo liquénico que contiene un fotobionte (cianobacteria) diferente al que se se presenta en el resto del talo ". Los cefalodios además cuentan con diferentes morfologías y anatómias, con base en estas, hay cefalodios saculados, prosaculados, globosos, subglobosos o esféricos a botriosos (Sipman, 2002; Smith et al., 2009). Esto principalmente depende como esté dispuesto el córtex de la hifas del liquen y de las cianobacterias en el cefalodio (Högnabba, 2006; McCune et al., 2019). En cuanto a las cianobacterias en los cefalodios de *Stereocaulon* se han encontrado géneros como *Nostoc*, *Scytonema*, *Nodularia*, *Rhizonema* y *Stigonema* (Lücking et al., 2009; O'Brien et al., 2005, 2013; Ismed et al., 2018).

El primer acercamiento al estudio de los cefalodios en *Stereocaulon* se hizo por Johnson en 1938, quien analizó la anatomía de los cefalodios, los clasificó en tres tipos según su anatomía (esférico, botriosa y escrobiculado). También relaciona los tipos con su ubicación geográfica y su filogenia, asumiendo en algunos casos que la anatomía esférica era más basal que la botriosa (Johnson, 1938). Fue la primera vez que se habló de una determinada anatomía dependiendo de la ubicación geográfica de los líquenes correspondientes en el género *Stereocaulon*: se le restó importancia al tipo de cianobionte y un papel más allá de fijar nitrógeno. La mayoría de los trabajos posteriores tuvieron un enfoque en cuanto al nitrógeno aportado por el cefalodio del liquen, analizando sólo unas pocas especies (Kallio, 1973; Huss-Danell, 1979; Vitousek, 1994;Nash & Olafsen, 1995).

En cuanto a estudios sobre las cianobacterias presentes en los cefalodios de *Stereocaulon*, no hay trabajos de este tipo para los trópicos. Por lo tanto, sería importante examinar esas interrelaciones asumiendo que, en zonas tropicales, con dinámicas climáticas diversas, las cianobacterias en simbiosis, en este caso a *Stereocaulon*, podrían presentar unas dinámicas diferentes a las encontradas en este mismo género en otras zonas (Bergman & Huss-Danell, 1983; Stenroos et al., 2006 Högnabba, F. 2007; Anuforo, 2012; Vančurová et al., 2018; Rai, 2018; Renaudin et al., 2021). En este sentido, los complejos paramunos colombianos son de interés particular, ya que son hotspot de diversidad y los organismo que las habitan tienen adaptaciones únicas a un ambiente extremo, como representado generalmente por las zonas altoandinas (Hoorn et al., 2010). A lo largo de los años se ha tenido una concepción sobre las funciones de los cefalodios y sobre la identidad de los géneros de cianobacterias presentes en estos (Kytövita & Crittenden, 2002; Lücking et al., 2009; Lavoie et al., 2020; Renaundin et al., 2021). Sin embargo, aún no se ha explorado la potencial especificidad entre los géneros de cianobacterias que habitan los cefalodios y las especies de *Stereocaulon*. Persisten incógnitas en cuanto a cuáles cianobacterias están presentes en los cefalodios de *Stereocaulon*, si presenta algún tipo de especificidad micobionte-cianobionte o si hay interrelación filogenética entre algunos géneros de cianobacterias por alguna especie de *Stereocaulon* . También se desconoce si en un mismo cefalodio podrían habitar más de un taxón de cianobacterias y si existe alguna relación con el sustrato o área geográfica donde crece el liquen.

1.1 Antecedentes

Aproximadamente el 90% de los líquenes tienen fotobiontes de algas verdes, menos

diversos en comparación con la diversidad de los micobiontes asociados; entre estas algas verdes los 2 géneros principales son *Trebouxia* y *Trentepohlia*, mientras en las cianobacterias que actúan como fotobiontes, el género principal es *Nostoc* (Friedl et al., 2008). Aproximadamente el 85% de los líquenes tienen fotobiontes de algas verdes o clorobiontes; el 10% tiene fotobiontes cianobacterianos o cianobiontes y el 3% tiene ambos, en la formación de líquenes tripartitos, o sea de tres miembros (Tschermak-Woess, 1988; Rikkinen, 2017).

La organización anatómica de los socios puede variar: (1) ambos fotobiontes pueden estar presentes en una capa delicada dentro del talo (Henskens et al., 2012); (2) el fotobionte verde está presente en una capa delicada dentro del talo, mientras que las cianobacterias están confinadas a una región separada del talo, llamado el cefalodio (Villanueva et al., 2018); o (3) se producen talo separados, las cuales pueden vivir independientemente uno del otro o directamente asociados, uno con las cianobacterias y el otro con las algas verdes. Estas últimas se denominan «fotosimbiodemas», «fotopares» o «fotomorfos» y pueden ser morfológicamente similares o hasta muy diferentes, como es el caso de cianomorfos que se han descrito como un género separado, *Dendriscocaulon*, pero en realidad pertenecen a géneros como *Ricasolia* o *Sticta* (Magain et al., 2012).

Los cianolíquenes pueden ocurrir cerca de colonias de cianobacterias libres en una amplia gama de relaciones, desde facultativas hasta obligadas (Poelt & Mayrhofer 1988). A pesar de ello y la prevalencia del fotobionte, se sabe muy poco sobre la especificidad de la asociación entre micobiontes y fotobiontes. Por ejemplo, en relación a las algas verdes del género *Trebouxia*, se desconoce en su gran mayoría el aspecto de las interacciones fisiológicas entre las colonias de algas fuera de las estructuras del talo y el liquen en cuestión

(Cornejo et al., 2016).

Se ha demostrado que el liquen del suelo, *Psora decipiens*, está asociado con una amplia gama de especies de clorobiontes (Ruprecht et al., 2014). Se puede suponer que la capacidad de formar asociaciones con una gama más amplia de fotobiontes disponibles localmente incrementa la dispersión y supervivencia de estos líquenes, especialmente los que crecen en ambientes extremos, como en la Antártica (Romeike et al., 2002). Esto también podría explicar la distribución amplia o global de algunos líquenes y su capacidad para tolerar una amplia gama de condiciones ambientales. Pueden existir centros o focos de fotobiontes en áreas que permitan a muchas especies de micobiontes aprovechar especies o haplotipos de fotobiontes adaptados localmente, y algunas especies incluso han evolucionado para robar sus fotobiontes de otros líquenes (Rosentreter et al.,2016).

En los líquenes que forman cefalodios, el socio fotosintético principal es un alga verde, mientras que el cianobionte además fija nitrógeno atmosférico, el cual los dos otros simbiontes pueden utilizar (Cornejo et al., 2013). Se ha demostrado que las cianobacterias dentro de cefalodios frecuentemente tienen prevalencia de heterocistos más altas y tasas más altas de fijación de nitrógeno que las de los cianolíquenes bipartitos (Rai & Bergman 2002), lo que balancea su biomasa reducida en líquenes tripartidos comparado con cianolíquenes. Los cefalodios se conocen de alrededor de 520 especies de líquenes distribuidas en 21 géneros (Hawksworth & Hill 1984). Ocurren regularmente en la familia Stereocaulaceae y en los géneros *Psoroma* y *Placopsis*, y también se encuentran con frecuencia en las Peltigeraceae y Lobariaceae (Henssen & Jahns 1974). La dinámica de cómo adquieren los líquenes a sus simbiontes no ha sido develada en su totalidad, como es el trabajo de Aschenbrenner y colaboradores en 2016, dieron claridad a muchos asuntos de la simbiosis de

los líquenes a partir del enfoque clásico de simbiosis al referirse a un liquen puesto que allí se concluyó por medio de ese estudio que hay un tipo de especificidad en cuanto a microbiomas bacterianos para el micobionte, dejando claro que varios factores abióticos y bióticos pueden influir adicionalmente en la estructura de la comunidad bacteriana, así como los nichos ecológicos circundantes en el medio de algunos líquenes también tendrán una influencia en el microbioma bacteriano, la conclusión del estudio es que el talo liquenico de cierta forma actúa a modo de recolector de simbiontes bacterianos de muchos tipos y por supuesto de cianobacterias.

Algunos estudios relacionan innovaciones morfológicas en los líquenes con la adquisición de las cianobacterias. Schneider et al., (2016) realizaron un mapeo de los datos morfométricos sobre una filogenia fúngica de ocho cebadores, elaborando sobre el orígen de la simbiosis tripartita del género *Placopsis*, para explorar la función de las cianobacterias fijadoras de nitrógeno relacionado con diferencias de tamaño del talo. Se demostró que el grosor del talo aumentó en más del 150% y el volumen del núcleo del ascoma nueve veces en promedio después de la adquisición de cianobacterias y la formación de los cefalodios en el talo (Schneider et al., 2016). Esto sugiere que la mayor disponibilidad de nitrógeno fue el causante de un tamaño apotecio talino más grande, permitiendo al liquen acumular más biomasa y así habitar en ambientes más diversos.

Rikkinen, es uno de las personas más conocidas en esclarecer asuntos de los cianolíquenes y de algunos aspectos respecto a cianobacterias, en 2017, realizó una investigación sobre los líquenes y las cianobacterias, en donde una de sus más grandes conclusiones, concuerdan con la mayoría de las investigaciones de los últimos 15 años y es

que la diversidad actual de cianobiontes del liquen puede reflejar en parte los efectos evolutivos de su forma de vida y dispersión simbiótica de líquenes. Se recalca lo importante que es el ver como es la biología detrás de la simbiosis de líquenes y cianobacterias que por supuesto con las técnicas moleculares actuales han ayudado a ver cómo se las relaciones entre estos, a nivel evolutivo y además se recalca que " En el futuro, podemos esperar muchos resultados nuevos e intrigantes sobre los cianobiontes de linajes de líquenes previamente ignorados y de entornos ecológicos inexplorados. " (Rikkinen, 2017 pág 7).

La mayoría de los estudios que se han realizado en líquenes en cuanto a relación liquen-cianobacterias en cefalodios se han realizado en *Peltigera* y *Lobaria*, en el primer género por mencionar algo muy reciente, se estudió la diversidad de genotipos de simbiontes de cianobacterias en el género cianoliquen *Peltigera* (Jüriado et al., 2019), la identidad de micobiontes fue el factor principal que determinó la presencia del genotipo *Nostoc* específico dentro de los talos de *Peltigera* estudiados en Estonia. Los patrones específicos de especie de selectividad de cianobionte no siempre reflejan las relaciones filogenéticas entre las especies de hongos estudiadas, sino que se correlacionan con las preferencias de hábitat, se vio que además varios taxones definidos filogenéticamente (Jüriado et al., 2017) mostraron un patrón distinto de especificidad del genotipo *Nostoc*, que también estaba en correlación con las condiciones del hábitat, los hallazgos de la especificidad del simbionte ayudan a delimitar las especies no descritas.

Problema

Para el género en *Stereocaulon* se han hecho trabajos sobre extractos y algunas

particularidades sobre la química del género (Ismed, 2012; Perico-Franco, et al., 2015; Quispe, 2018, Ismed, et al., 2018, Nakajima, et al., 2019), hay algunos estudios sobre diversidad y riqueza sobre el género (Huan, 2010, Guzmán, 2018,). Sin embargo hay vacíos en cuanto a estudios ecológicos y más aún en cuanto estudios enfocados a la relación micobionte - fotobionte respecto a este género, hay algunos realizados (Lucie, et al., 2018; Vančurová, et al., 2018; Torres, 2021) respecto a cómo afectan la altura y algunos aspectos ecológicos al hospedero algal y la interrelación entre fotobionte algal y micobionte a nivel filogenético que presentan especies de *Stereocaulon* y el otro es un estudio realizado respecto a las cianobacterias, cercado a el género *Stigonema*, presente en los cefalodios de *Stereocaulon*, y aquí dan un acercamiento sobre el comportamiento e interrelación (Lavoie, et al., 2020), no obstante no hay trabajos de este tipo para los trópicos y sería interesante mirar cómo se dan esas interrelaciones puesto que en estas zonas las dinámicas climáticas son diversas y más específicamente como en este caso, en complejos paramunos colombianos, que como es bien sabido son hotspot de diversidad y son los espacios perfectos explorar la divergencia ecológica, puesto que los organismo que viven allí son producto probable de adaptaciones únicas a un ambiente extremo como lo son los Andes y su altitud actual (Hoorn, et al., 2010; Hederich, 2020). Por lo tanto, nos planteamos las siguientes preguntas:

¿Cuántos géneros de cianobacterias se encuentran en los cefalodios de los *Stereocaulon* de Colombia?

¿Existe una relación de especificidad entre las cianobacterias que habitan los cefalodios de las especies de *Stereocaulon*?

En caso de existir especificidad, esta relación también se presenta en iguales especies de *Stereocaulon* de diferentes complejos paramunos y bosques alto andinos de Colombia.

Justificación

En Colombia según la última actualización del catálogo de líquenes de Colombia (Bernal et al., 2020), de las 22 especies del género *Stereocaulon*, 20 son especies nativas y 10 variedades, *Stereocaulon ramulosum f. elegans, Stereocaulon ramulosum f. tomentosulum, Stereocaulon ramulosum var. gracilius*, *S. strictum var. compressum, S. strictum var. strictum, S.tomentosum var. alpestre, Stereocaulon tomentosum var. tomentosum, S. vesuvianum var. nodulosum* y *Stereocaulon vesuvianum var. efflorescens* (Sipman & Aguirre-C., 2016; Lücking et al., 2021). De ellas doce especies tienen cefalodios de tipo saculado, tres especies tienen cefalodio de tipo prosaculado, seis cefalodio de tipo globoso y una especie presenta cefalodio subgloboso (Sipman, 2002; Oset, et al., 2013). La distribución de las especies se encuentra mayormente en la región Andina, seguida por la región Caribe y Orinoquia.

Sin embargo, la información que poseemos del género, respecto a sus fotobiontes se limita a los fotobiontes algales, donde se ha revelado que el fotobionte, podría mostrar claras preferencias por factores ambientales (Rambold, et al., 1998; Peksa & Skaloud. 2011; Dal Grande, et al., 2018 Osyczka, et al., 2021). Por otro lado, por medio de investigaciones se ha visto que la baja especificidad por parte de los ficobiontes lo que permite al huésped asociarse con algas ecológicamente diversificadas, permitiendo así amplitud ecológica (Peksa & Skaloud. 2011; Vančurová, et al., 2018). En cuanto a estudios realizados, enfocados en las cianobacterias presentes en los cefalodios de *Stereocaulon* solo hay un trabajo hasta la fecha, donde se enfocó en un género en particular, *Stigonema* y en su especificidad para ecosistemas distintos de Canadá (Lavoie, et al., 2020). Se ha tenido una concepción sobre las funciones de los cefalodios y sobre la identidad de los géneros de cianobacterias presentes en

estos, en los últimos años (Kytövita & Crittenden, 2002; Lücking, et al., 2009). No se ha explorado la especificidad entre los géneros de cianobacterias que habitan los cefalodios y las especies de *Stereocaulon*. Este estudio pretende darle un enfoque adicional a la relación entre las cianobacterias de los cefalodios del género *Stereocaulon* y las especies del mismo, siendo el primer trabajo de investigación que busca reconocer si existe alguna relación de especificidad entre las cianobacterias y el liquen de diferentes especies del género *Stereocaulon*, y en segunda medida queremos analizar si en caso de existir especificidad, si esta relación también se presenta en iguales especies de *Stereocaulon* de diferentes complejos paramunos y bosques de alta montaña de Colombia.

El tener más información sobre estos organismos y su interrelación (micobionte-cianobionte) dará una explicación más detallada de procesos como la selectividad o especificidad por parte del liquen, sí presentan especificidad, daría paso a un mejor esclarecimiento de las dinámicas ecológicas entre los líquenes y las cianobacterias. Dar esbozos sobre la adquisición de cianobacterias por parte del liquen y más tratándose de un género como *Stereocaulon*, donde su distribución amplia podría ayudar al mundo científico para futuras investigaciones donde se evalúe la correlación de cianobacterias y líquenes, ver además cuál es la diversidad cianobacterial para algunas zonas de Colombia.

Objetivos

4.1. Objetivo General.

Reconocer la correlación filogenética entre los micobiontes y los cianobiontes de los cefalodios de especies seleccionadas del género *Stereocaulon* de Colombia.

4. 2 Objetivos Específicos

- Identificar las especies del género *Stereocaulon* utilizando el gen ITS de código de barras.
- Identificar las cianobacterias presentes en los cefalodios de especies de *Stereocaulon* motivo de estudio utilizando los cebadores 16S rRNA y la región del Rubisco rbcLX
- Analizar las correlaciones filogenéticas de especificidad entre cianobiontes de los cefalodios y las especies de micobionte estudiadas.

Materiales y métodos

5.1 Selección de las áreas de estudio

Para la realización del estudio se tomaron muestras de distintos puntos de las cordilleras que atraviesan al territorio colombiano con el objeto de reconocer

Tabla 1.

Zonas geográficas seleccionadas

Departamento	Cordillera	Ecosistema	Coordenadas	Elevación
Antioquía	Central	Bosque Alto Andino	6°48'02.4"N 75°43'01.0"W	2900 m
Caldas	Central	(Manizales) Páramo	5°05′21″N 75°17′32″O	3309 m
Cundinamarca	Oriental	Complejo paramuno Cruz Verde - Sumapaz	4°17'59.6"N 74°12'36.2"W	3600 m
Cundinamarca	Oriental	Complejo paramuno Cruz Verde - Sumapaz	4°33'41.0"N 74°00'05.6"W	3300 m
Cundinamarca	Oriental	Páramo (Chingaza)	4°47'30.5"N 73°54'29.0"W	3400 m
Nariño	Occidental	Complejo paramuno Chiles-Cumbal	0°49′39″N 77°57′52″O	3900 m

Santander	Oriental	Complejo paramuno Guantiva- La Rusia	5°56'26.6"N 73°03'07.7"W	3007 m
Tolima	Central	Cerro Machín. Bosque Andino	4°29′00″N 75°23′30″O	2500 m

5.2 Selección de las especies motivo de estudio

Se seleccionarán alrededor de 70 muestras de la colección del Herbario Forestal Emilio Mahecha sección Criptógamas previamente determinadas y corroboradas por el especialista Jean Marc Torres.

Para nuestro estudio, se seleccionaron muestras de diferentes complejos paramunos con el fin de realizar un análisis de correlación de fotobiontes, micobiontes y áreas biogeográficas.

Se seleccionarán muestras de las 4 especies más comunes en el territorio colombiano, *Stereocaulon ramulosum*, *S. tomentosum*, *S. strictum var compressum y S. vesuvianum*. Los especímenes que se tomaron para la extracción del ADN de los cefalodios eran los ejemplares en mejor estado de conservación, sin presencia de hongos liquenícolas o algas superficiales o demás organismos ajenos de la simbiosis visiblemente presente en el talo.

5.3 Extracción y obtención de datos moleculares

5.3.1. Fotobionte cianobacterial:

De cada una de las muestras seleccionadas se extrajo 1 o 2 cefalodios, se diseccionaron manualmente bajo un estereoscopio binocular y el contenido interno fue depositado en tubos de recolección Eppendorf.

5.3.2 Micobionte

Para la extracción de ADN del micobionte de las especies seleccionadas y a las cuales se les extrajeron los cefalodios, se prepararon trozos de talo y apotecios los cuales también se colectaron en tubos de recolección Eppendorf.

5.3.3 Extracción del ADN

La extracción de ADN de las especies de *Stereocaulon* seleccionadas y sus respectivos cefalodios se hizo siguiendo el protocolo para extracción de ADN REDExtract-N-Amp™ Plant PCR Kit de la casa comercial Sigma-Aldrich.

5.3.4 Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Se hizo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los siguientes cebadores moleculares para las cianobacterias (1-2) y el micobionte (3):

Tabla 2.

Cebadores moleculares usados para la identificación de los organismos objeto de estudio.

	Cebador	Nombre del Primer	Secuencia (5' –> 3')	Referencia
1	16S ribosomal DNA	27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Lane, et al., (1991)
	16S ribosomal DNA	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	Turner, et al., (1999)
2	RUBISCO rbcLX region	rbcLX_CW(F)	CGTAGCTTCCGGTGGTATCCACGT	Rudi, et al., (1998)
	RUBISCO rbcLX region	rbcLX_CX(R)	GGGGCAGGTAAGAAAGGGTTTCGTA	Rudi, et al., (1998)
3	ITS - Internal Transcribed Spacer, Ribosomal RNA	ITS1F	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes & Bruns (1993)
	ITS - Internal Transcribed Spacer, Ribosomal RNA	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White, et al., (1990)

Se usaron diluciones de 10:1 hasta 10:2 para amplificaciones por PCR con los pares de cebadores mencionados. Los parámetros del termociclador se acondicionaron para cada uno de los cebadores según las indicaciones de los autores de cada uno de los cebadores (White, et al., 1990; Lane, et al., 1991; Gardes & Bruns, 1993; Rudi, et al., 1998; Turner, et

al., 1999). Para la secuenciación se enviaron las muestras purificadas de la PCR a Macrogen.

5.3. Análisis de datos

5.3.1. Análisis filogenético

Se realizó el estudio del ITS a las muestras frescas de cada uno de los 6 complejos paramunos y bosques andinos. Las secuencias obtenidas fueron comparadas en el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y posteriormente alineadas con otras secuencias obtenidas de GenBank. Las secuencias fueron arregladas usando BioEdit 7.09 (Hall, 1999) y automáticamente alineadas usando el programa MAFFT en la opción --auto (Katoh & Standley, 2013). El resultado del alineamiento de las bases fue sometido a un análisis de máxima verosimilitud usando RAxML-HPC disponible en el servidor Cipres Science Gateway (Stamatakis 2006; Stamatakis, et al., 2008; Miller, et al., 2010; empleando un modelo GTR-Gamma, con bootstrap paramétrico, usando automáticamente un número de 650 réplicas determinados por el RAxML-HPC BlackBox, con una evaluación de saturación. Con las secuencias que se lograron obtener se calcularon árboles filogenéticos para cada uno de los cebadores. Posteriormente se hicieron los análisis de correlación.

Resultados

6.1 Identificación de las especies del género *Stereocaulon*

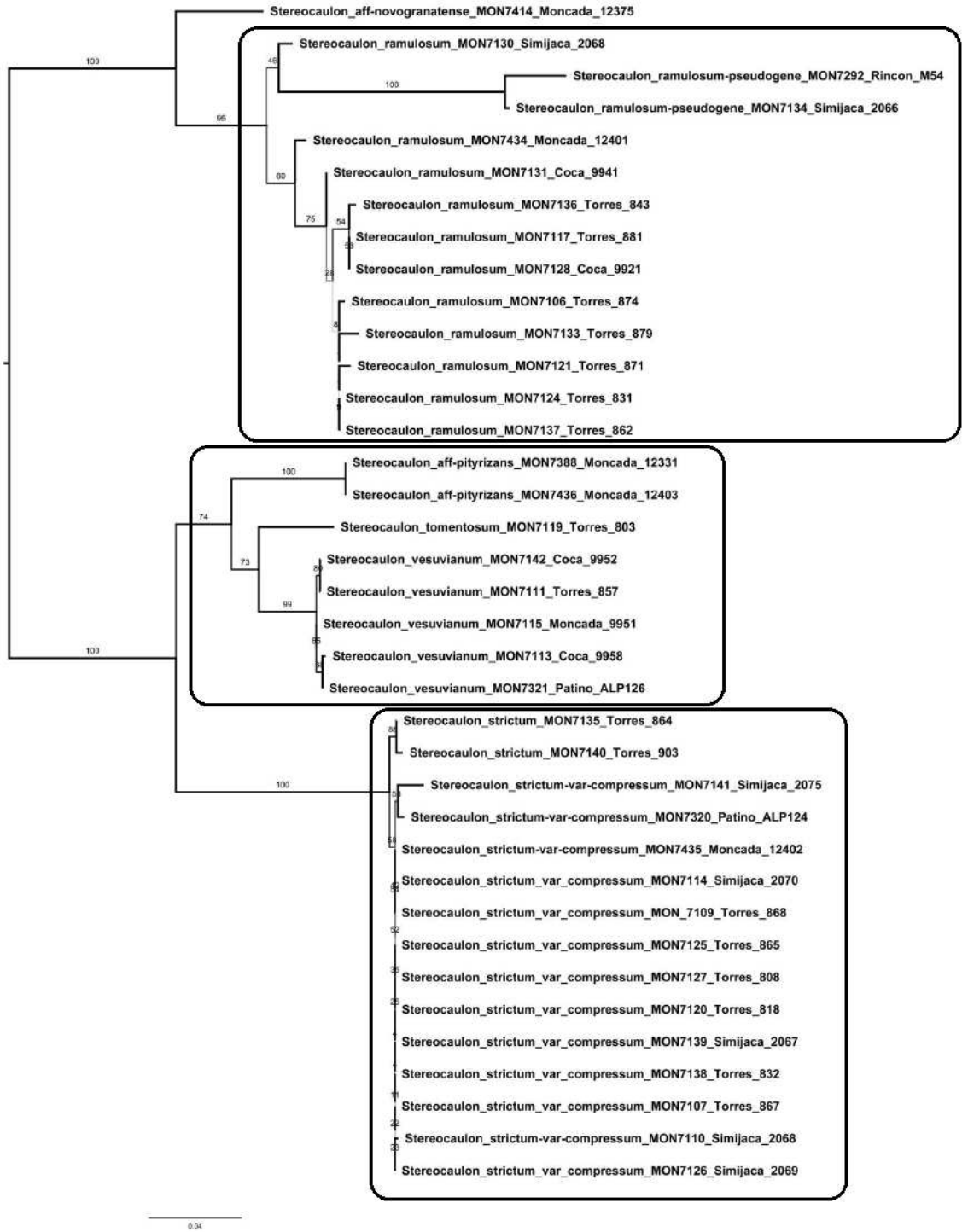


Figura 1. Árbol de ITS código de barras para *Stereocaulon*.

De las 79 muestras de *Stereocaulon,* se usaron 37 muestras para hacer el árbol ITS. De esas 37 muestras, el árbol arrojó tres clados principales, todos con soporte absoluto (100%), representando en total seis especies (Fig. 1). El primer clado incluye una muestra de *Stereocaulon aff. novogranatense* hermana a un clado con buen soporte (95%) representado por 14 ejemplares de *Stereocaulon ramulosum*. Dos de las muestras de la última especie se encuentran en una rama larga, porque se secuenció una copia del ITS no funcional (pseudogen). El segundo clado contiene dos ejemplares para *Stereocaulon pityrizans*, uno de *Stereocaulon tomentosum* y cinco de *Stereocaulon vesuvianum*, ese último clado con muy buen soporte (99%), mientras el tercer clado une 13 muestras de *Stereocaulon strictum var. compressum* y dos de *Stereocaulon strictum*, esa división con soporte moderado.

6.2 Identificación de las cianobacterias en los cefalodios de especies de *Stereocaulon*

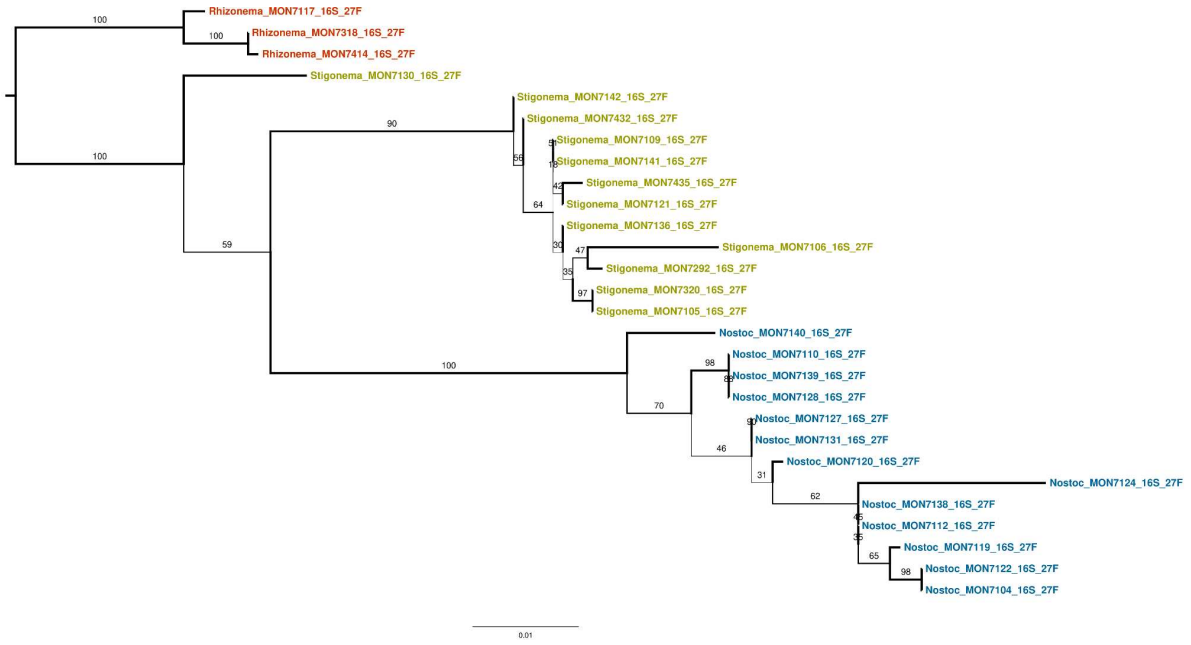


Figura 2. Árbol del cebador 16S rRNA para la identificación de cianobacterias en *Stereocaulon*.

Para el árbol de cianobacterias utilizando el cebador 16S rRNA se se incluyeron las 22 muestras que dieron resultados, para este gen se encontraron tres géneros de cianobacterias, *Rhizonema*, *Stigonema* y *Nostoc* (Fig. 2). Entre ellos, se detectaron dos posibles especies del género *Rhizonema*, ocho del género *Stigonema* y seis del género *Nostoc*. En *Rhizonema* hay dos posibles especies muy bien soportadas (100%). Se observan al menos siete subclados en el género *Stigonema*, por lo cual se tendrían siete u ocho posibles especies. En el caso de *Nostoc*, se ven alrededor de seis a siete posibles especies (Fig. 2).

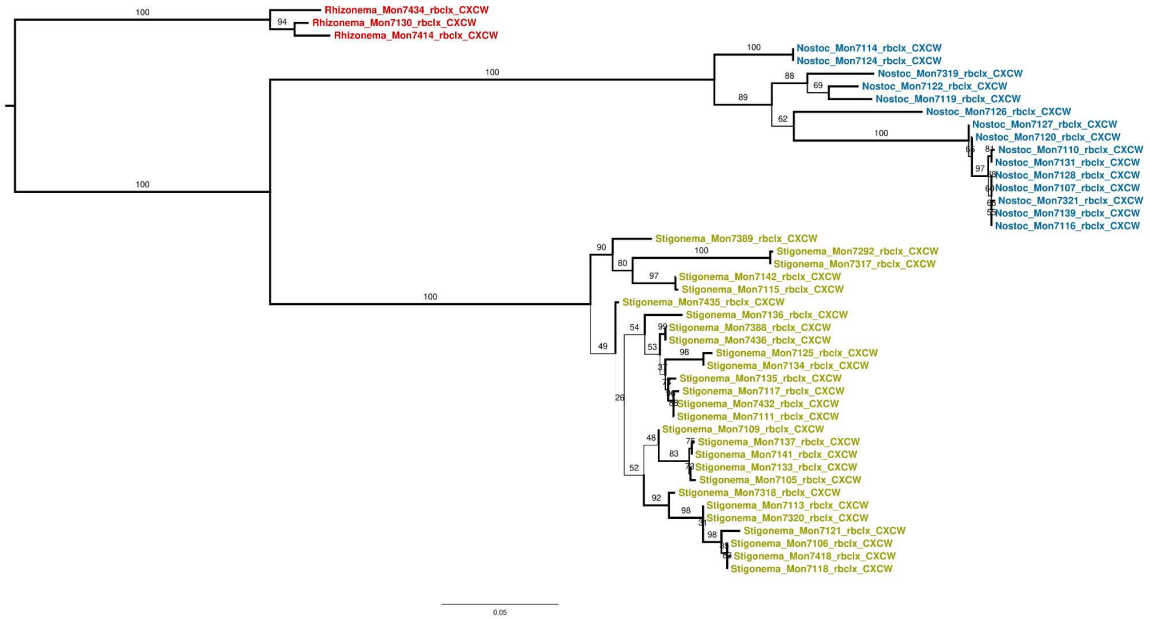


Figura 3. Árbol de la región del Rubisco para la identificación de cianobacterias en *Stereocaulon.*

En el árbol de los cianobiontes que se obtuvo con la región del Rubisco rbcLX, se obtuvieron los mismos tres géneros que con el cebador 16S rRNA, *Rhizonema*, *Stigonema* y

Nostoc (Fig. 3). En este árbol nuevamente se diferencian dos especies de *Rhizonema*, mientras el número potencial de especies para los otros dos géneros parece más alto: siete para *Nostoc* y 13–14 para *Stigonema* (Fig. 3). Significa que el marcador rbcLX brinda mayor resolución en la distinción de posibles especies de cianobacterias que el marcador conservado 16S.

6.3 Correlaciones filogenéticas cianobiontes - especies liquénicas

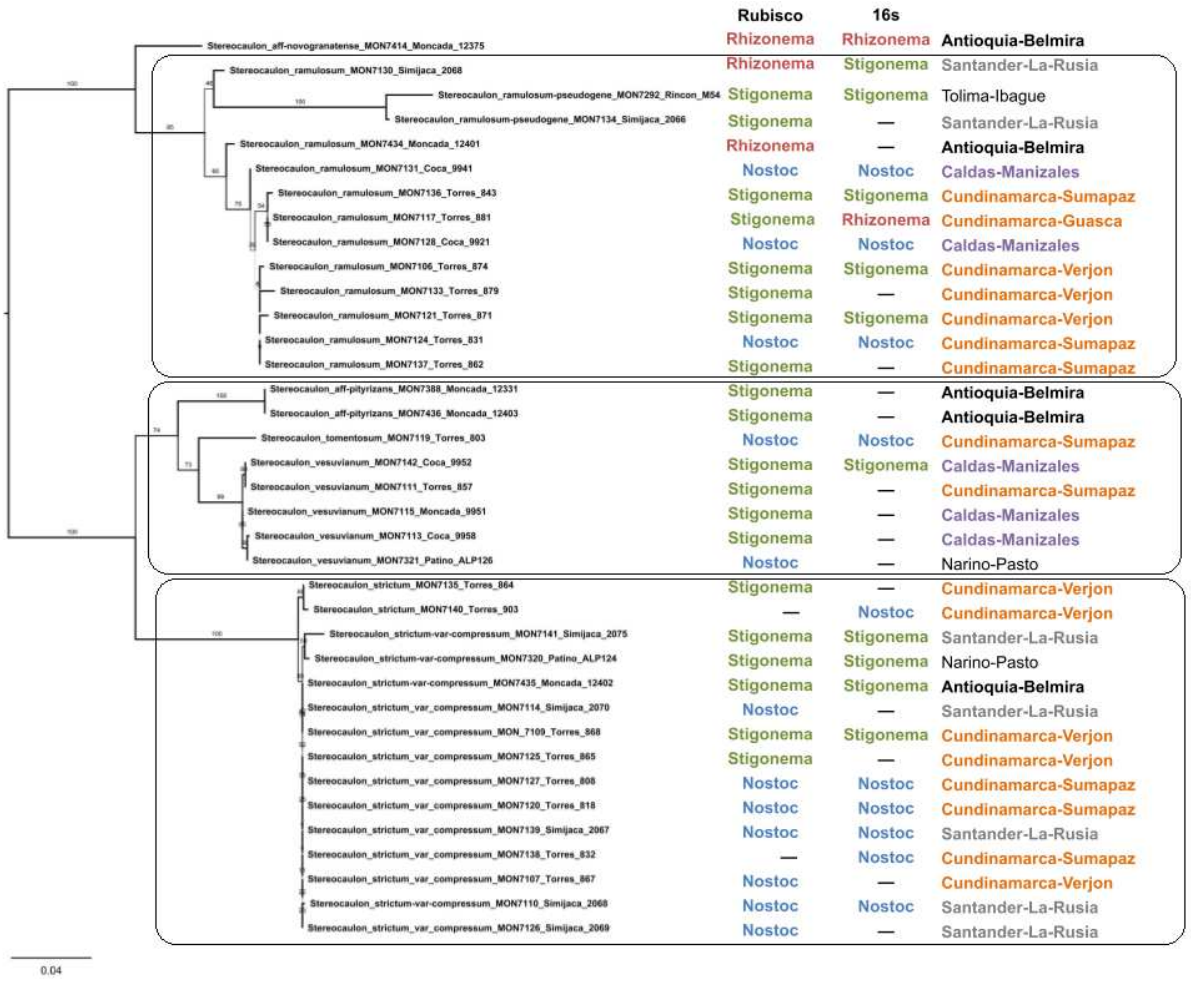


Figura 4. Correlación micobionte - cianobionte en relación con su ubicación.

Para la correlación entre micobionte y cianobionte se usaron las muestras donde se obtuvieron datos moleculares del cianobionte al menos del cebador 16S rRNA o de la región del Rubisco rbcLX (Fig. 4). Para el cebador 16S rRNA se obtuvieron 10 ejemplares con *Stigonema*, 10 con *Nostoc* y dos para *Rhizonema*, además de 15 muestras (40,5%) en donde este cebador no detectó ninguna cianobacteria. Para la región de Rubisco se encontraron 20 ejemplares con *Stigonema*, 12 con *Nostoc*, tres con *Rhizonema*, y dos muestras en las cuales no se detectaron cianobacterias. En dos casos, ambos en *Stereocaulon ramulosum*, los diferentes marcadores encontraron diferentes cianobiontes, o *Stigonema* o *Rhizonema*. (Fig. 4).

No se reconoce una correlación directa entre micobiontes y cianobiontes: las tres especies de micobiontes más representadas, *S. ramulosum*, *S. vesuvianum* y *S. strictum*, se asocian con dos a tres diferentes cianobiontes, aunque entre ellos, *Rhizonema* sólo se encontró en *S. ramulosum* (Fig. 4). También, *Nostoc* se encontró más frecuentemente en *S. strictum* que en las otras dos especies. Tampoco había correlación entre micobionte o cianobionte y región geográfica. En las tres regiones representadas por la mayoría de las muestras, Cundinamarca-Sumapaz, Santander-La Rusia y Caldas-Manizales, se encontraron entre dos y tres especies de micobiontes y dos a tres especies de cianobiontes en diferentes combinaciones. Igualmente, las mismas especies de líquenes (micobiontes) se encontraron en al menos dos de los tres complejos grandes de páramos más muestreados (Fig. 4).

Stigonema **en** ***Stereocaulon***

Entre los géneros de cianobacterias que se obtuvieron por medio del cebador 16S

rRNA y la región Rubisco, el primero a mencionar es *Stigonema*, el cual fue el género más común en las especies de *Stereocaulon* aquí investigadas. Con el cebador 16S rRNA se encontró en un 27% de las muestras (10) y con la región Rubisco en un 54% (20), resultando en un total de 21 muestras (56,75%), de las cuales con ambos cebadores solo se encontró en nueve muestras (24,32%).

Tabla 3.

Presencia de Stigonema por ubicación en porcentajes

Ubicación	**Muestras**	**Presencia %**
Cundinamarca-Verjón	6	28,6
Cundinamarca-Sumapaz	3	14,3
Santander - La Rusia	3	14,3
Antioquia - Belmira	3	14,3
Caldas - Manizales	3	14,3
Nariño - Pasto	1	4,8
Tolima - Ibagué	1	4,8
Cundinamarca Guasca	1	4,8

Nostoc* en *Stereocaulon

Nostoc fue el segundo género más común en las especies de *Stereocaulon*. Con el cebador 16S rRNA se encontró en un (10) 27% y con la región Rubisco se encontró en un (12) 32,4% de las muestras de este estudio. En la visualización de la correlación, se detectó a *Nostoc* en el 37,83% (14) de las muestras liquénicas con alguno de los dos cebadores, con ambos cebadores se detectó en el 21,6% (8) de las muestras.

Tabla 4.

Presencia de Nostoc por ubicación en porcentajes

Ubicación	**Muestras**	**Porcentaje %**
Cundinamarca-Sumapaz	5	35,70
Santander-La Rusia	4	28,60
Caldas-Manizales	2	14,30
Cundinamarca-Verjón	2	14,30
Nariño-Pasto	1	7,10

Rhizonema **en** ***Stereocaulon***

Rhizonema sólo se detectó en 10,8% (4) de las muestras (Tabla.5); se encontró en tres muestras con Rubisco y en dos con el 16S rRNA y solo se detectó en una muestra con ambos cebadores.

Tabla 5.

Presencia de Rhizonema por ubicación en porcentajes

Ubicación	Muestras	Presencia %
Antioquia - Belmira	2	50
Cundinamarca-Guasca	1	25
Santander-La Rusia	1	25

Discusión

Este estudio tuvo como enfoque reconocer si existe una correspondencia directa entre los fotobiontes cianobacteriales y las especies de *Stereocaulon* motivo de estudio, así como reconocer si existe relación directa entre el área de estudio y las cianobacterias asociadas en sus cefalodios

La simbiosis es una de las interacciones biológicas más singulares desde la ecología y el punto de vista evolutivo, para esta interacción surge la necesidad de ver o evaluar los patrones de asociación, especialmente la selectividad y la especificidad que ayudaría a predecir los procesos ecológicos presentes que permiten dicha interacción mutualista. Rambold et al., 1998 define la especificidad de la simbiosis liquénica como "el rango y la

relación taxonómica de los socios aceptables" y la selectividad como la "interacción preferencial de los organismos", complementario a esto, Yahr et al., 2004, aborda la especificidad como el rango de posibles fotobiontes y selectividad como los fotobiontes seleccionados de un conjunto de posibles fotobiontes. Nuestros resultados reflejaron un comportamiento oportunista en la simbiosis micobionte-cianobionte. Parece que las especies de *Stereocaulon* toman las cianobacterias del lugar en donde habitan, sólo necesitan un cianobionte para adquisición de nitrógeno, ejemplo de esto, se detectaron tres distintos géneros de cianobiontes para una misma especie, *Stereocaulon ramulosum* representado en el primer clado (Fig. 4). Y los ejemplares de la especie *Stereocaulon strictum var compressum*, presentes en el clado 3, tienen presencia de dos géneros de cianobacterias, se evidencia que no interesa el género de la cianobacteria aunque en el pasado se haya establecido a un género como usual en este caso, S*tigonema*, a las especies liquénicas solo les importa tener un cianobionte. Para *Stereocaulon* puede que la asociación con una especie de fotobionte persista, al tener a *Stigonema* como cianobionte en la mayoría de nuestras muestras, pero puede adquirir cianobiontes más beneficiosos para continuar la simbiosis, en caso que así se requiera por ejemplo, por condiciones ambientales, como sucede entre algunos corales y sus algas (Byler et al., 2013).

7.1 Correlación especie liquénica - cianobionte

Stigonema se detectó en cuatro de las seis especies de *Stereocaulon* (*S. ramulosum, S. vesuvianum, S. strictum* y *S. strictum var*. *compressum)* Siendo la cianobacteria más abundante en *Stereocaulon* (Lamb, 1951), así que no es de extrañar que sea también la cianobacteria que más se encontraría en las muestras liquénicas estudiadas aquí. Destaca que

no haya estado presente en las muestras de *Stereocaulon tomentosum* y *S.* aff. *novogranatense* analizados en este estudio, cuando se ha reportado como cianobionte para estas especies (Kershaw, 1960; Lamb, 1978; Sipman, 2001); sin embargo, se analizó solo una muestra en cada caso y es probable que *Stigonema* aparezca en otras muestras de estos taxones en Colombia.

La presencia de *Nostoc* en el primer clado (principalmente *Stereocaulon ramulosum*) no fue tan frecuente comparado con *Stigonema*. En el segundo clado, se detectó en dos muestras, en la única muestra de *S. tomentosum* y en una de las cinco ejemplares de *S. vesuvianum*. En el último clado, *Nostoc* fue el cianobionte prevalente, con 60% de los ejemplares, representados por *S. strictum* y *S. strictum var*. *compressum*. *Stereocaulon* se puede encontrar en grandes agrupaciones, como es muy común para *S. ramulosum* y *S. strictum* var. *compressum*, por lo tanto es posible que compartan el cianobionte entre los miembros de estas comunidades y así mantendrían esa preferencia cianobacterial, puesto que a veces al haber grupos grandes de la misma especie en el mismo espacio, tendrían cierta especificidad por el cianobionte.

En el caso de *Rhizonema*, como se mencionó antes, fue detectada solamente en *Stereocaulon* aff. *novogranatense* y en *S. ramulosum*, en un total de tres muestras (23,07%) de los 13 ejemplares que hacen parte de este clado. En dos ocasiones, ocurrió que los cebadores, con uno u otro se detectó a *Rhizonema* o *Stigonema* pero no con ambos a una sola cianobacteria. Sin embargo, *Rhizonema* fue detectada en *Stereocaulon* aff. *novogranatense* con ambos cebadores.

7.2 Correlación zona geográfica - cianobionte

Cundinamarca fue el departamento donde se estudiaron más muestras, el 46% (17), en especial del complejo paramuno Sumapaz - Cruz Verde. Se evidenció que no hay una coincidencia entre una cianobacteria por esta región geopolítica, ya que se detectaron a los tres géneros de cianobacterias en este departamento.

Stigonema fue el cianobionte con mayor presencia en Cundinamarca (Fig. 3). Para las muestras tomadas de esta zona geopolítica se detectó en un 58.8% (10). *Nostoc* se detectó en el 41,17% (7) de las muestras de esta zona y *Rhizonema* sólo se detectó en el 5.8% de las muestras de esta zona, es decir solo en 1; destaca que es la única especie (*Stereocaulon ramulosum* MON 7117) de Guasca, complejo paramuno Chingaza, por lo que habría que usar más muestras de esta zona, para establecer o negar la especificidad en este lugar.

Si bien hay una abundancia de *Stigonema* en el complejo paramuno Sumapaz- Cruz Verde, hay que tener en cuenta que es el complejo paramuno más grande del mundo, así que es de esperar que sea de cierta manera un reservorio de cianobacterias, incluso en musgos u otros líquenes que tengan cierta preferencias por *Stigonema* (Patova, et al., 2017). Habría que mirar cómo se dan las dinámicas de intercambio bacteriano en estos ecosistemas, puesto que dichos organismos circundantes presentan un cianobionte disponible para *Stereocaulon* (Büdel & Colesie, 2014).

La otra zona de la que se tienen más muestras es Santander - La Rusia, específicamente el complejo paramuno Guantiva - La Rusia. Nuevamente se detectaron tres

géneros de cianobacterias en este territorio. Esta vez, *Nostoc* fue la cianobacteria que más se detectó, seguido por *Stigonema* y *Rhizonema*. Tampoco se vió una especificidad entre micobiontes, cianobiontes y zona en este caso, aunque en su mayoría, las muestras analizadas representan la especie *Stereocaulon strictum var*. *compressum*. La preferencia de *Stereocaulon strictum var*. *compressum* por *Nostoc* puede deberse a la forma de reproducción de esta especie, por medio de soredios como rasgo distintivo de la especie (Sipman, 2001) puesto que ese mecanismo de reproducción hace que parte de ese nuevo talo esté en contacto con el suelo u otros organismo donde se podría adquirir a *Nostoc* del suelo, es decir, como otra opción de cianobionte cuando *Stigonema* no se encuentra disponible en el espacio (Magain, et al., 2018; Lavoie, et al., 2020), en este caso que no se encuentre en Guantiva - La Rusia como si en Sumapaza Cruz Verde. Habría que ver si es solo para esta zona, como es nuestro caso o es algo general para el liquen y su adquisición de cianobionte. Es posible pensar que la abundancia de *Stigonema* en las zonas mencionadas pueden ser el resultado de dinámicas de intercambio de cianobacterias entre organismos distintos (Anuforo, 2012) o a través del suelo o incluso estas cianobacterias podrían migrar entre complejos paramunos por medio de animales como insectos como puede darse con el polen (Suchan, et al.,, 2019).

Nostoc se detectó en solo cuatro de las ocho zonas (Fig. 4), muy alejadas unas de otras, lo que hace pensar que la asociación con *Nostoc* puede estar relacionada a otros organismos en las cuales se ha registrado la presencia de *Nostoc* en simbiosis, como plantas y musgos (Dodds, et al., 1995; Bonnett, 2018).

La otra zona a mencionar es Antioquia - Belmira, con el Páramo de Belmira. *Stigonema* vuelve a ser el cianobionte que más se encuentra en estas muestras, seguido por *Rhizonema* (Fig. 4). Sin embargo, son pocas muestras para concluir que esta zona tiene

mayor presencia de uno u otro género de cianobacterias (Fig. 5). Aunque esta zona tiene a cuatro de las seis especies de *Stereocaulon*, se detectó a *Rhizonema* en *S.* aff. *novogranatense* y en una muestra de *S. ramulosum*. Es probable que se encontraban en una zona con muy baja diversidad de cianobiontes o los organismos circundantes a él mismo tenían solo la presencia de esta cianobacteria, puede ser que las muestras con *Rhizonema* como cianobionte estaban junto a algún liquen como *Cora* o junto a alguno de los muchos musgos y hepáticas como *Frullania* de las cuales se sabe de la presencia de *Rhizonema* como cianobionte (Lavoie, et al., 2020; Dal Forno, et al., 2021;). Estos dos ejemplares fueron colectados en la misma fecha y no tenían más de diez metros de distancia entre los lugares de su colecta, por lo cual es posible pensar que en esa ubicación habría una comunidad de organismos que intercambian cianobiontes como ya se ha evidenciado en casos de líquenes, briofitos y otros (Rikkinen, 2002; Bragina, 2012) Sin embargo, no fueron los únicos casos, ya que se obtuvo presencia de *Rhizonema* en zonas tan lejanas como Santander - La Rusia y Cundinamarca- Guasca, lo cual contradice una especificidad por zona y no podría explicarse la presencia de *Rhizonema* solo por una interacción horizontal (Rikkinen, 2002; Dal Forno, et al., 2021). Curiosamente, *Rhizonema* fue detectado en esas muestras por los cebadores diferentes; en *Stereocaulon ramulosum* MON 7117 con el cebador 16S detectó a *Rhizonema* con Rubisco detectó a *Stigonema*. En el otro caso, *Stereocaulon ramulosum* MON 7130 con Rubisco detectó a *Rhizonema* MON 7130) y con el cebador 16S detectó a *Stigonema.*

Tener dos cianobiontes diferentes en el mismo liquen ocurrió en dos ocasiones, en ambos casos se detectó a *Stigonema* y *Rhizonema*, como mencionado arriba. En la extracción de los cefalodios de las especies de *Stereocaulon* se tuvo cuidado y se usaba alcohol al cambiar de especie del liquen y al cortar la parte del liquen que se necesitaba, entonces se puede excluir efectos de contaminación. La presencia de dos cianobacterias en un solo

cefalodio ha sido registrado antes, detectando a *Stigonema* y a *Nostoc* (Lavoie, et al., 2020).

El 16S y el operón rbcL-rbcX son los recomendados para la filogenia molecular de cianobacterias, aunque no siempre dan suficiente afinidad y resolución (Lücking, et al., 2009; Magain, et al., 2017). Hubo una mayor sensibilidad por parte de la región Rubisco para la detección de las cianobacterias que del 16S, por lo que la presencia de cianobacterias en las distintas especies de *Stereocaulon* se ve reflejada diferentemente si se usa uno u otro cebador.

Conclusiones

Los resultados presentados evidencian que las especies de *Stereocaulon* estudiadas no tuvieron especificidad a la hora de escoger a algún género de cianobacterias, en general, las especies tenían como cianobionte a dos de los tres géneros de cianobacterias aquí detectados, *Stigonema* y *Nostoc*, siendo el primero el más común. Solo una de las especies de *Stereocaulon*, tenía a los tres géneros de cianobacterias como socio. Nuestros resultados dejan ver que el género *Stereocaulon* es muy inespecífico respecto a la adquisición de cianobiontes. Pasa igual con la especificidad de las cianobacterias hacia los micobiontes, esto muestra que hay una capacidad del liquen y de la cianobacteria de asociarse con numerosos socios simbióticos adaptados a distintas condiciones climáticas y ecológicas, como las presentes aquí.

Es necesario tener en cuenta para posteriores investigaciones hacer un mayor muestreo de las especies liquénicas que se usarán como objeto de estudio y la cantidad de

muestras tenerlas acorde al tamaño del ecosistema a tomar, además de optar por una modificación o creación de nuevos cebadores que den resolución a los grupos, como en nuestro caso fue con el intro Rubisco más que con el cebador 16S rRNA . Resalta también la importancia de tener en cuenta a los organismos que comparten espacio con el liquen y al suelo, para establecer la interacción cianobacterial y para ver cómo es la adquisición del cianobionte. Puesto que como se ha visto, la adquisición de un cianobionte de vida libre pueda ser una estrategia adaptativa por parte del liquen.

Referencias

Arias, L.A., (1996). El relieve de la zona central de Antioquia. Revista Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia. Vol. 8, N°2, 84 – 96 pp.

Aschenbrenner, I. A., Cernava, T., Berg, G., & Grube, M. (2016). Understanding microbial multi-species symbioses. Frontiers in Microbiology, 7, 180.

Asplund, J., & Wardle, D. A. (2017). How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. Biological Reviews, 92(3), 1720-1738.

Anuforo, Ó. U. U. (2012). Cyanobacteria in lichens and mosses (Doctoral dissertation, University of Iceland).

Bragina, A., Berg, C., Cardinale, M., Shcherbakov, A., Chebotar, V., Berg, G. (2012). *Sphagnum* mosses harbour highly specific bacterial diversity during their whole lifecycle. The ISME journal, 6(4), 802-813.

Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis (eds.). 2019. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co

Bonnett, H. T. (2018). The *Nostoc-Gunnera* association. In CRC Handbook of Symbiotic

Cyanobacteria (pp. 161-171). CRC Press

Büdel, B., & Colesie, C. (2014). Biological soil crusts. In Antarctic terrestrial microbiology (pp. 131-161). Springer, Berlin, Heidelberg.

Byler KA, Carmi-Veal M, Fine M, Goulet TL (2013) Multiple Symbiont Acquisition Strategies as an Adaptive Mechanism in the Coral Stylophora pistillata. PLoS ONE 8(3): e59596. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059596

Carpentier, C., Queiroz, E. F., Marcourt, L., Wolfender, J. L., Azelmat, J., Grenier, D., ... & Voyer, N. (2017). Dibenzofurans and pseudodepsidones from the lichen *Stereocaulon paschale* collected in Northern Quebec. Journal of natural products, 80(1), 210-214.

Cardós, J. L. H., Prieto, M., Jylhä, M., Aragón, G., Molina, M. C., Martínez, I., & Rikkinen, J. (2019). A case study on the re-establishment of the cyanolichen symbiosis: where do the compatible photobionts come from?. Annals of botany, 124(3), 379-388.

Cornejo, C., & Scheidegger, C. (2013). New morphological aspects of cephalodium formation in the lichen *Lobaria pulmonaria* (Lecanorales, Ascomycota). The Lichenologist. 45. 77-87. 10.1017/S0024282912000631.

Cornejo, C., & Scheidegger, C. (2016). Cyanobacterial gardens: the liverwort *Frullania asagrayana* acts as a reservoir of lichen photobionts. Environmental Microbiology Reports, 8(3), 352-357.

Dal Grande, F., Rolshausen, G., Divakar, P. K., Crespo, A., Otte, J., Schleuning, M., & Schmitt, I. (2018). Environment and host identity structure communities of green algal symbionts in lichens. New Phytologist, 217(1), 277-289.

Dodds, W. K., Gudder, D. A., & Mollenhauer, D. (1995). The ecology of *Nostoc*. Journal of Phycology, 31(1), 2-18.

Erlacher, A., Cernava, T., Cardinale, M., Soh, J., Sensen, C. W., Grube, M., & Berg, G. (2015). Rhizobiales as functional and endosymbiotic members in the lichen symbiosis of *Lobaria pulmonaria* L. Frontiers in microbiology, 6, 53.

Friedl, T., Büdel, B., & Nash, T. H. (2008). Lichen biology.

Galvis-Hernández, M. y Ungar, P. M. (Eds.). 2021. Páramos Colombia: biodiversidad

y gestión. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, Colombia.

Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes‐application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular ecology, 2(2), 113-118.

Gauslaa, Y., Coxson, D. S., & Solhaug, K. A. (2012). The paradox of higher light tolerance during desiccation in rare old forest cyanolichens than in more widespread co‐occurring chloro‐and cephalolichens. New Phytologist, 195(4), 812-822.

Gauslaa, Y., Johlander, S., & Norden, B. (2019). *Lobaria amplissima* thalli with external cephalodia need more rain than thalli without. The Lichenologist, 51(3), 281-286.

Guzmán, D. B. (2018). Diversidad, distribución y riqueza de líquenes en las zonas verdes de la ciudad de Ibagué (Doctoral dissertation, Universidad del Tolima).

Grube M, Cernava T, Soh J, Fuchs S, Aschenbrenner I, Lassek C, et al., (2015) Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. The ISME Journal, 9, 412–424.

Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In Nucleic acids symposium series (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000..

Hawksworth, D. L., & Hill, D. J. (1984). The lichen-forming fungi. Blackie Academic and Professional.

Hederich Pelaez, L. (2020). Geodiversidad en Páramos de Colombia y su Relación con la Biodiversidad.

Henskens FL, Green TA, Wilkins A (2012) Cyanolichens can have both cyanobacteria and green algae in a common layer as major contributors to photosynthesis. Annals of

botany 110: 555–563.

Henssen, A., Jahns, H. M., & Santesson, J. (1974). Lichenes: eine Einführung in die Flechtenkunde. Thieme Georg Verlag.

Högnabba, F. (2006). Molecular phylogeny of the genus *Stereocaulon* (Stereocaulaceae, lichenized ascomycetes). Mycological Research, 110(9), 1080-1092.

Högnabba, F. (2007). Phylogenetic studies of cyanobacterial lichens.

Hoorn, C., Wesselingh, F.P., Hovikoski, J. & Guerrero, J. (2010a) The development of the Amazonian megawetland (Miocene; Brazil, Colombia, Peru, Bolivia). In Hoorn, C. & Wesselingh, F.P. (Eds) Amazonia, Landscape and Species Evolution: A Look into the Past, Wiley-Blackwell, Oxford.

Huang, M. R. (2010). Altitudinal patterns of *Stereocaulon* (lichenized Ascomycota) in China. Acta Oecologica, 36(2), 173-178.

Huss-Danell, K. (1979). The Cephalodia and their Nitrogenase Activity in the Lichen *Stereocaulon paschale*. Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie, 95(5), 431–440.

Ismed, F., Dévéhat, L. L., Guiller, A., Corlay, N., Bakhtiar, A., & Boustie, J. (2018). Phytochemical review of the lichen genus *Stereocaulon* (Fam. Stereocaulaceae) and related pharmacological activities highlighted by a focus on nine species. Phytochemistry Reviews, 17(5), 1165-1178.

Johnson, G. T. (1938). The Taxonomic Importance and Phylogenetic Significance of the Cephalodia of *Stereocaulon* . Annals of the Missouri Botanical Garden, 25(3), 729. doi:10.2307/2394275

Jüriado, I., Kaasalainen, U., Rikkinen, J., (2017). Specialist taxa restricted to threatened habitats contribute significantly to the regional diversity of *Peltigera* (Lecanoromycetes, Ascomycota) in Estonia. Fungal Ecol. 30, 76e87.

Jüriado, I., Kaasalainen, U., Jylhä, M., & Rikkinen, J. (2019). Relationships between mycobiont identity, photobiont specificity and ecological preferences in the lichen

genus *Peltigera* (Ascomycota) in Estonia (northeastern Europe). Fungal Ecology, 39, 45-54.

Kaasalainen, U., Jokela, J., Fewer, D. P., Sivonen, K., & Rikkinen, J. (2009). Microcystin production in the tripartite cyanolichen *Peltigera leucophlebia*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 22(6), 695-702.

Kallio, S. (1973). The ecology of nitrogen fixation in *Stereocaulon paschale*.

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Molecular biology and evolution, 30(4), 772-780.

Kershaw, K. (1960). The Genus *Stereocaulon* Schreb. in The British Isles. The Lichenologist, 1(4), 184-203. doi:10.1017/S002428296000042X

Kurina, L. M., & Vitousek, P. M. (2001). Nitrogen fixation rates of *Stereocaulon vulcani* on young Hawaiian lava flows. Biogeochemistry, 55(2), 179-194.

Kytövita, M. M., & Crittenden, P. D. (2002). Seasonal variation in growth rate in *Stereocaulon paschale*. The Lichenologist, 34(6), 533-537.

Lamb, I. M. (1951). On the morphology, phylogeny, and taxonomy of the lichen genus *Stereocaulon* . Canadian Journal of Botany, 29(5), 522-584.

Lamb, I.M. (1978). Keys to the species of the lichen genus *Stereocaulon* (Schreb.) Hoffm. J. Hattori Bot. Lab. 44: 209-250

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics, 115-175.

Lavoie, C., Renaudin, M., McMullin, R. T., Gagnon, J., Roy, C., Beaulieu, M. E., ... & Villarreal, J. C. (2020). Extremely low genetic diversity of *Stigonema* associated with *Stereocaulon* in eastern Canada. The Bryologist, 123(2), 188-203.

Lohtander, K., Oksanen, I., & Rikkinen, J. (2003). Genetic diversity of green algal and cyanobacterial photobionts in *Nephroma* (Peltigerales). The Lichenologist, 35(4),

325-339.

Lücking, R., Lawrey, J. D., Sikaroodi, M., Gillevet, P. M., Chaves, J. L., Sipman, H. J., & Bungartz, F. (2009). Do lichens domesticate photobionts like farmers domesticate crops? Evidence from a previously unrecognized lineage of filamentous cyanobacteria. American journal of botany, 96(8), 1409-1418.

Lücking, R., Hodkinson, B. P., & Leavitt, S. D. (2017). The 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota–Approaching one thousand genera. The Bryologist, 119(4), 361-416.

Lücking, R., Hodkinson, B. P., & Leavitt, S. D. (2017). Corrections and amendments to the 2016 classification of lichenized fungi in the Ascomycota and Basidiomycota. The Bryologist, 120(1), 58-69.

Lücking, R., Moncada, B., Soto-Medina, E., Simijaca, D., & Sipman, H. J. (2021). Actualización nomenclatural y taxonómica del Catálogo de Líquenes de Colombia. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.

Lucie, V., Muggia, L., Ondřej, P., Tereza, Ř., & Pavel, Š. (2018). The complexity of symbiotic interactions influences the ecological amplitude of the host: a case study in *Stereocaulon* (lichenized Ascomycota).

Magain N, Goffinet B, Sérusiaux E (2012) Further photomorphs in the lichen family Lobariaceae from Reunion (Mascarene archipelago) with notes on the phylogeny of *Dendriscocaulon* cyanomorphs. The Bryologist 115: 243-254.

Magain, N., & Sérusiaux, E. (2014). Do photobiont switch and cephalodia emancipation act as evolutionary drivers in the lichen symbiosis? A case study in the Pannariaceae (Peltigerales). PloS one, 9(2), e89876.

McCune, B., Di Meglio, E., Tønsberg, T., & Yahr, R. (2019). Five new crustose *Stereocaulon* species in western North America. The Bryologist, 122(2), 197-218.

Miadlikowska, J., Kauff, F., Högnabba, F., Oliver, J. C., Molnár, K., Fraker, E., ... & Stenroos, S. (2014). A multigene phylogenetic synthesis for the class

Lecanoromycetes (Ascomycota): 1307 fungi representing 1139 infrageneric taxa, 317 genera and 66 families. Molecular phylogenetics and evolution, 79, 132-168.

Miller MA, Holder MT, Vos R, Midford PE, Liebowitz T, Chan L, Hoover P, Warnow T. (2010). The CIPRES Portals. CIPRES. 2009-08-04. URL: http://www.phylo.org/sub_sections/portal.

Nakajima, H., Fujimoto, N., Yamamoto, Y., Amemiya, T., & Itoh, K. (2019). Response of secondary metabolites to Cu in the Cu-hyperaccumulator lichen *Stereocaulon japonicum*. Environmental Science and Pollution Research, 26(1), 905-912.

Nash, T. H., & Olafsen, A. G. (1995). Climate change and the ecophysiological response of arctic lichens. The Lichenologist, 27(6), 559-565.

Nelsen, M. P., Lücking, R., Boyce, C. K., Lumbsch, H. T., & Ree, R. H. (2020). The macroevolutionary dynamics of symbiotic and phenotypic diversification in lichens. Proceedings of the National Academy of Sciences, 117(35), 21495-21503.

O'Brien, H. E., Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2005). Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera*. European journal of phycology, 40(4), 363-378.

O'Brien, H. E., Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2013). Assessing population structure and host specialization in lichenized cyanobacteria. New Phytologist, 198(2), 557-566.

Oset, M., & Kukwa, M. (2013). Notes on *Stereocaulon* species from Bolivia. Mycotax, 121, 447-453.

Osyczka, P., Lenart-Boroń, A., Boroń, P., & Rola, K. (2021). Lichen-forming fungi in postindustrial habitats involve alternative photobionts. Mycologia, 113(1), 43-55.

Palmqvist, K., Franklin, O., & Näsholm, T. (2017). Symbiosis constraints: Strong mycobiont control limits nutrient response in lichens. Ecology and evolution, 7(18), 7420-7433.

Park, J. S., Park, C. H., Park, S. Y., Oh, S. O., Jayalal, U., & Hur, J. S. (2018). Revision of the Lichen Genus *Stereocaulon* (Stereocaulaceae, Ascomycota) in South Korea.

Mycobiology, 46(2), 101-113.

Patova, E., Sivkov, M., & Patova, A. (2017). Renitrogen fixation activity in cyanobacterial biological soil crusts with domination of the *Stigonema* genus species in mountain and plain north-east european tundra ecosystems. Environment Pollution and Climate Change, 1, 1-6.

Peksa, O., & Škaloud, P. (2011). Do photobionts influence the ecology of lichens? A case study of environmental preferences in symbiotic green alga *Asterochloris* (Trebouxiophyceae). Molecular Ecology, 20(18), 3936-3948.

Perico-Franco, L., Soriano-García, M., Cerbón, M., González-Sánchez, I., & Valencia-Islas, N. (2015). Secondary metabolites and cytotoxic potential of *Lobariella pallida* and *Stereocaulon strictum var. compressum*, two lichens from Colombian páramo region. UK Journal of Pharmaceutical and Biosciences, 3(4), 31-38.

Poelt, J., & Mayrhofer, H. (1988). Über Cyanotrophie bei Flechten. Plant Systematics and Evolution, 158(2), 265-281.

Quispe, E. L. M. C. (2018). Estudio químico del extracto metanólico del liquen *Stereocaulon glareosum* (Sav.) H. Magn (Doctoral dissertation, Pontificia Universidad Catolica del Peru-CENTRUM Catolica (Peru)).

Rambold, G., T. Friedl, and A.Beck. (1998). Photobionts in lichens: Possible indicators of phylogenetic relationships? Bryologist 101 : 392 – 397 .

Ramírez-Roncallo, K., Gómez-Ramírez, H., & Negritto, M. A. (2020). New records of lichenized fungi in Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. Check List, 16, 1421.

Rai, A. N., Bergman, B., & Rasmussen, U. (Eds.). (2002). Cyanobacteria in symbiosis. Kluwer Academic Pub.

Renaudin, M., Beaulieu-Laliberté, A., & Bellenger, J. P. (2021). *Stigonema* associated with boreal *Stereocaulon* possesses the alternative vanadium nitrogenase. The Lichenologist, 53(2), 215-220.

Rikkinen, J. (2002). Cyanolichens: an evolutionary overview. In Cyanobacteria in symbiosis (pp. 31-72). Springer, Dordrecht.

Rikkinen, J. (2013). Molecular studies on cyanobacterial diversity in lichen symbioses. MycoKeys, 6, 3.

Rikkinen, J. (2017). Cyanobacteria in terrestrial symbiotic systems. In Modern topics in the phototrophic prokaryotes (pp. 243-294). Springer, Cham.

Romeike, J., Friedl, T., Helms, G., & Ott, S. (2002). Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (lichenized ascomycetes) along a transect of the Antarctic Peninsula. Molecular Biology and Evolution, 19(8), 1209-1217.

Rosentreter R., Eldridge D.J., Westberg M., Williams L., Grube M. (2016) Structure, Composition, and Function of Biocrust Lichen Communities. In: Weber B., Büdel B., Belnap J. (eds) Biological Soil Crusts: An Organizing Principle in Drylands. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), vol 226. Springer, Cham.

Rudi, K., Skulberg, O. M., & Jakobsen, K. S. (1998). Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phyletically related strains. Journal of bacteriology, 180(13), 3453-3461.

Ruprecht, U., Brunauer, G., & Türk, R. (2014). High photobiont diversity in the common European soil crust lichen *Psora decipiens*. Biodiversity and conservation, 23(7), 1771-1785.

Sierra, M. A., Danko, D. C., Sandoval, T. A., Pishchany, G., Moncada, B., Kolter, R., ... & Zambrano, M. M. (2020). The microbiomes of seven lichen genera reveal host specificity, a reduced core community and potential as a source of antimicrobials. Frontiers in microbiology, 11, 398.

Sipman, H. J. M., Aguirre, J., Rangel-CH, O. (2000). Líquenes. Colombia. Diversidad biótica, III, Unibiblos, Bogotá, 379-434.

Sipman, H. J. M. (2002). Key to the *Stereocaulon* species in the Neotropics. Berlin.(viewed online on 4 May 2015: http://www. bgbm. org/sipman/keys/Neostereo. htm).

Sipman, H. J. M. & Aguirre-C., J. (2016). Líquenes. In: Bernal, R., Gradstein, S. R. & Celis, M. Catálogo de Plantas y Líquenes de Colombia. Volumen 1. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Instituto de Ciencias Naturales, Bogotá: 159-281

Sipman, H.J.M. & J. Aguirre-C. 2022-8-13. *Stereocaulon.* En Bernal, R., S.R. Gradstein & M. Celis (eds.). 2015. Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. http://catalogoplantasdecolombia.unal.edu.co.

Smith, C. W. (2009). Lichens of Great Britain and Ireland. British Lichen Society.

Smith, H. B., Dal Grande, F., Muggia, L., Keuler, R., Divakar, P. K., Grewe, F., ... & Leavitt, S. D. (2020). Metagenomic data reveal diverse fungal and algal communities associated with the lichen symbiosis. Symbiosis, 82(1), 133-147.

Schneider, K., Resl, P., & Spribille, T. (2016). Escape from the cryptic species trap: lichen evolution on both sides of a cyanobacterial acquisition event. Molecular ecology, 25(14), 3453-3468.

Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics, 22(21), 2688-2690.

Stamatakis, A., Hoover, P., & Rougemont, J. (2008). A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. Systematic biology, 57(5), 758-771.

Steinhäuser, S. S., Andrésson, Ó. S., Pálsson, A., & Werth, S. (2016). Fungal and cyanobacterial gene expression in a lichen symbiosis: Effect of temperature and location. Fungal biology, 120(10), 1194-1208.

Stenroos, S., Högnabba, F., Myllys, L., Hyvönen, J., & Thell, A. (2006). High selectivity in symbiotic associations of lichenized ascomycetes and cyanobacteria. Cladistics, 22(3), 230-238.

Suchan, T., Talavera, G., Sáez, L., Ronikier, M., & Vila, R. (2019). Pollen metabarcoding as a tool for tracking long‐distance insect migrations. Molecular Ecology Resources, 19(1), 149-162.

Torres, V. D. O. (2021). Variações morfológicas, químicas e genéticas de *Stereocaulon alpinum* Laurer (Stereocaulaceae) e seus fotobiontes da região sul da América do Sul e Antártica Marítima.)

Tschermak-Woess, E. (1988). The algal partner. In. CRC handbook of lichenology, 1, 39-92.

Treiber de Espinoza, B. (1993). Cianobacterias filamentosas, terrícolas de Punta Fort William, Isla Greenwich, Shetland del sur, Antártida.

Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis 1. Journal of Eukaryotic Microbiology, 46(4), 327-338.

Vančurová, L., Muggia, L., Peksa, O., Řídká, T., & Škaloud, P. (2018). The complexity of symbiotic interactions influences the ecological amplitude of the host: a case study in *Stereocaulon* (lichenized Ascomycota). Molecular ecology, 27(14), 3016-3033.

Villanueva, C. D., Hašler, P., Dvořák, P., Poulíčková, A., & Casamatta, D. A. (2018). *Brasilonema lichenoides sp. nov.* and *Chroococcidiopsis lichenoides sp.* nov.(Cyanobacteria): two novel cyanobacterial constituents isolated from a tripartite lichen of headstones. Journal of phycology, 54(2), 224-233.

Vitousek, P. M. (1994). Potential nitrogen fixation during primary succession in Hawaii Volcanoes National Park. Biotropica, 234-240.

Vu, T. H. (2014). Étude des acides gras du genre *Stereocaulon* et étude phytochimique du lichen *S. evolutum* Graewe (Doctoral dissertation, Université Rennes 1).

Yahr R, Vilgalys R, DePriest PT. 2004. Strong fungal specificity and selectivity for algae symbionts in Florida scrub Cladonia lichens. Molecular Ecology 13: 3367–3378.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322 in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, N., D. Gelfand, J. Sninsky & T. White, Eds.), Academic Press.