

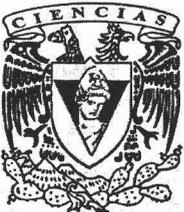


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO MORFOLÓGICO Y GENÉTICO DE LA POBLACIÓN DE
Nitzschia frustulum (BACILLARIOPHYTA) DEL PARQUE
ECOLÓGICO DE XOCHIMILCO, MÉXICO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A:
ERIKA MARLENE DÍAZ ALMEYDA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU

2005

m342118



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

“Estudio Morfológico y Genético de la Población de *Nitzschia frustulum*
 (Bacillariophyta) del Parque Ecológico de Xochimilco, México.”

realizado por Erika Marlene Díaz Almeyda

con número de cuenta 9950978-5 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

A t e n t a m e n t e

Director de Tesis

Propietario Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau

Daniel Piñero

Propietario Dr. Eberto Novelo Maldonado

Eberto Novelo

Propietario Dr. Enrique Arturo Cantoral Uriza

Cantoral

Suplente Dr. Efraín Tovar Sánchez

Efraín Tovar Sánchez

Suplente M. en C. Fabiola Ramírez Corona

Fabiola Ramírez Corona

Consejo Departamental de Biología

Juan Manuel Rodríguez Chávez

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

A la memoria de mi papá,
te quiero con todo mi corazón.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau por su apoyo en todo momento, por haber creído en mí y por el tiempo dedicado a mi formación. Gracias a él este trabajo fue posible.

Al Dr. Eberto Novelo Maldonado por haberme enamorado perdidamente de las algas, por el tiempo dedicado a mi formación.

Agradezco profundamente a la M. en C. Fabiola Ramírez Corona, por su ayuda desinteresada al haber dedicado tanto tiempo y esfuerzo a mi entrenamiento, por sus valiosos comentarios a lo largo de todo mi trabajo.

A la M. en C. Laura Márquez por haberme ayudado a darle otra perspectiva a mi trabajo, por el tiempo y la confianza depositados en mí.

Agradezco también al Dr. Efraín Tovar Sánchez por sus invaluable observaciones en todo momento y por alentarme a dar lo mejor de mí.

Al Dr. Luis Eguiarte y a la Dra. Valeria Souza por ser parte importante de formación, por sus importantes sugerencias al inicio de este proyecto.

Agradezco al Dr. Enrique Cantoral Uriza por el interés en mi trabajo

A la Dra. Margarita Caballero que, sin conocerme, me apoyó sin condición.

Agradezco a la Biól. Rocío Esteban por su ayuda en el trabajo de laboratorio.

A Oscar Rodríguez, sin él mi trabajo hubiera sido exhaustivo.

A la Biól. Ana Batis, agradezco profundamente por todas las veces me acompañó en mi preocupaciones logísticas.

A mis compañeros de laboratorio: Alejandra Moreno, Alejandra Vázquez, Ana Wegier, Lev Jardón, Miroslava Rentería, Rodolfo Salsas y en especial a Valentina Islas; por su apoyo.

Agradecimientos Personales

A mis papás Guadalupe y Sergio por apoyarme en todo momento, gracias por todo lo que me han dado. Gracias a ustedes soy lo que soy. A mis hermanas Susana, Frida y Daniela: las adoro.

A mis abuelos Elisa, Raúl, Lupita y Gabriel que siempre han estado al pendiente de mí. Los quiero muchísimo, gracias por ser parte de mi vida.

A mi esposo Alejandro por su apoyo en TODO. Gracias por todo el amor que me das. Te amo profundamente. Sin ti mi vida no sería lo que es.

A mis suegros Irene y José, gracias por su apoyo y comprensión.

A mi amiga Alma, gracias por todo tu apoyo.

A mi amiga Karla, gracias por todo, eres como una hermana para mí. Te quiero mucho.

A mis sis, Abril, por su apoyo en las buenas y en las malas, tq1c.

A mi amiga Anny, gracias por el tiempo compartido, te extraño.

A mi amiga Rocío, gracias por darme aliento en los momentos difíciles.

A mis amigos de siempre: Eugenio, Laura y Jorge. Gracias por su apoyo en todo momento.

A mis amigos del Instituto de Biología: Adán, Patty, Jenny y Lizbeth. Gracias por los momentos juntos.

A Sofía, gracias por todo el apoyo que me has dado.

A Gaby por creer en mí y darme trabajo, gracias a ello pude concluir mi tesis.

A Carlos Sitja, sin tu ayuda esto no hubiera sido posible.

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Introducción General.....	3
1.1 Aspectos generales de la biología de las diatomeas	3
1.1.1 Evolución de diatomeas	4
1.1.2 Ciclo de vida	6
1.1.3 Dispersión	8
1.1.4 Importancia de las diatomeas.....	8
1.2 Evolución y biología molecular.....	9
1.2.1 Inferencia filogenética	9
1.2.2 Demografía, tamaño efectivo y recombinación.....	11
1.2.3 Marcadores moleculares	12
2. Justificación y Objetivos	15
Justificación	15
Objetivo General.....	15
Objetivos Particulares.....	15
3. Localidad de estudio	16
4. Especies estudiadas	18
4.1 Taxonomía de Bacillariaceae.....	18
4.1.1 Descripción de <i>Nitzschia</i>	19
4.1.2 Descripción de <i>Pseudo-nitzschia</i>	21
4.1.3 Descripción de <i>Nitzschia frustulum</i>	22
4.2 Genética Poblacional de Diatomeas	26
5. Materiales y métodos.....	28
5.1 Muestreo	28
5.2 Cultivo.....	30
5.3 Caracterización Morfológica de <i>Nitzschia frustulum</i>	32
5.4 Extracción de ADN.....	34
5.4.1 Microsatélites	34
5.4.2 Oligonucleótidos de cloroplasto	36

5.4.3 Región parcial de la subunidad grande de rADN	37
5.5 Análisis de secuencias	39
5.5.1 Inferencia filogenética	43
6. Resultados	48
6.1 Morfología de <i>Nitzschia frustulum</i>	48
6.1.1 Fíbulas.....	50
6.1.2 Estrías.....	51
6.1.3 Relación largo-ancho	51
6.1.4 Ápice.....	52
6.1.5 Valva.....	53
6.1.6 Análisis de agrupación.....	53
6.2 Estructura genética.....	54
6.2.1 Microsatélites.....	54
6.2.2 Oligonucléotidos de cloroplasto	55
6.2.3 Región parcial de la subunidad grande de rADN	56
6.3 Inferencia filogenética	58
6.3.1 Filogenias.....	58
6.3.2 Matriz de particiones.....	65
7. Discusión.....	67
7.1 Morfología	67
7.2 Estructura genética.....	69
7.2.1 <i>Nitzschia frustulum</i> de Xochimilco.....	69
7.2.2 Especies de Género <i>Pseudo-nitzschia</i>	70
7.2.3 Demografía, tamaño efectivo y recombinación	72
7.3 Inferencia filogenética	73
8. Conclusiones	75
9. Literatura Citada.....	77
10. Apéndices	86
10.1 Elaboración de medio de cultivo	86
10.2 Extracción de ADN.....	87
10.3 Limpieza de diatomeas para preparaciones permanentes.....	89

Resumen

Díaz-Almeyda, E.M. 2005. **Estudio Morfológico y Genético de la Población de *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta) del Parque Ecológico de Xochimilco, México.** Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México.

Conocer la variación genética morfológica y genética de las especies de diatomeas mexicanas, es importante sobretodo en aquellas que son utilizadas como indicadoras como *Nitzschia frustulum*, para poder utilizarlas adecuadamente. En este trabajo se determinó la variación morfológica y la estructura genética de *Nitzschia frustulum* del Parque Ecológico de Xochimilco, México, así como conocer su relación filogenética con otras especies de la familia Bacillariaceae, con este objetivo fueron colectados y cultivados 67 individuos de *Nitzschia frustulum* en el Parque Ecológico de Xochimilco, México.

Algunos caracteres morfológicos (estrías/10 μ m, fibras/10 μ m, largo/ancho, forma de la valva, forma del ápice) se observaron, encontrando diferencias significativas entre los sitios de colecta. El patrón que observamos con los datos morfológicos es complejo e incluye factores como: salinidad, evaporación, movimiento del agua, sustrato y presencia de aves.

Se analizaron dos microsátélites y dos regiones no codificantes de cloroplasto, resultando ser iguales en tamaño. Para 24 de estos individuos se secuenció una región parcial de 28S de 517 pb. La diversidad nucleotídica (Pi) encontrada fue de 0.00711 y $\theta = (4N\mu) = 0.0083$. Estas secuencias fueron comparadas con otros miembros de la familia Bacillariaceae para los cuales había secuencias homólogas (Genbank). Se realizaron inferencias demográficas, de tamaño efectivo de la población y de recombinación, de las secuencias generadas en este trabajo, comparándolas con otras dos especies cuya diversidad nucleotídica fuese similar, encontrando que *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (n= 15) ha tenido históricamente el mayor tamaño efectivo de la población ($\theta = 0.0307$), lo que sugiere que el efecto de la deriva génica no ha sido importante. Para *Pseudo-nitzschia australis* (n= 7) y *Pseudo-nitzschia multistriata* (n= 5), ($\theta = 0$, para ambas) la deriva génica ha tenido un mayor efecto que el observado en *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*. *P. galaxiae* (n= 9) y *P. pungens* (n= 7) muestran un valor similar, ($\theta = 0.00071$ y 0.00079 respectivamente), lo que sugiere que la deriva

génica también ha sido importante históricamente, en menor medida que en *P. australis* y *P. multistriata*. *Nitzschia frustulum* colectada en Xochimilco (n= 24) muestra un valor similar a *P. delicatissima* (n= 12) podemos considerarlos un valor intermedio ($\theta = 0.00829$ y 0.00649 respectivamente).

Para *Nitzschia frustulum* colectada en Xochimilco, se observa la mayor tasa de recombinación comparada con *Pseudo-nitzschia delicatissima* y *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*. Para nuestra especie encontramos que por lo menos hubo dos eventos históricos de recombinación. La evidencia de recombinación es probablemente el resultado de la reproducción sexual, pero no necesariamente se aplica en este caso ya que se ha reportado paedogamia en el caso de *Nitzschia frustulum* var. *perspusilla*, evento que incluye recombinación sin reproducción sexual.

Se realizaron inferencias filogenéticas con métodos de parsimonia y distancia incluyendo a *Nitzschia frustulum* colectada en Xochimilco y a otras especies de la familia Bacillariaceae encontrando que *Pseudo-nitzschia* (representado por *Pseudo-nitzschia americana*, *Pseudo-nitzschia australis*, *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Pseudo-nitzschia galaxiae*, *Pseudo-nitzschia multistriata*, *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* y *Pseudo-nitzschia pungens*) y *Fragilariopsis curta* formaron un grupo monofilético. *Nitzschia* fue parafilético.

Los individuos de *Nitzschia frustulum* colectados en Xochimilco se agrupan entre ellos y no se agrupan con el individuo colectado en La Jolla, CA, USA. La distancia genética entre éstas fue de 0.124, ésta distancia es similar a la observada entre *N. frustulum* de Xochimilco y *N. vitrea* (0.129) o *N. frustulum* de Xochimilco y *Phaeodactylum tricorutum* (0.131) que fue la especie utilizada como grupo externo en este trabajo. La especie más cercana en distancia a *N. frustulum* de Xochimilco es *Nitzschia* cf. *pusilla*.

Pudimos reconocer especies bien definidas como *Pseudo-nitzschia galaxiae*, *Pseudo-nitzschia pungens* y *Pseudo-nitzschia australis*; para *Pseudo-nitzschia multistriata* excepto por un individuo. *Pseudo-nitzschia multistriata* y *Pseudo-nitzschia australis* están cercanamente relacionadas. Por último, especies con amplia distribución geográfica, como *Pseudo-nitzschia galaxiae*, *Pseudo-nitzschia pungens* y *Pseudo-nitzschia australis*, pueden presentar poca diversidad genética. Mientras que otras, como *Pseudo-nitzschia delicatissima*, no se agrupan geográficamente, pero ello puede deberse a su errónea identificación específica.

1. Introducción General

1.1 Aspectos generales de la biología de las diatomeas

Las diatomeas están consideradas dentro de la división Heterokontophyta según Hoek et al. (1998) u Ochrophyta según Graham y Wilcox (2000), en la familia Bacillariophyceae. Son especies unicelulares conformadas por células de pared celular silíceas similar a una caja llamada frústulo (Figura 1.1), altamente ornamentada, la cual se considera que refleja su diversidad taxonómica (Graham & Wilcox 2000).

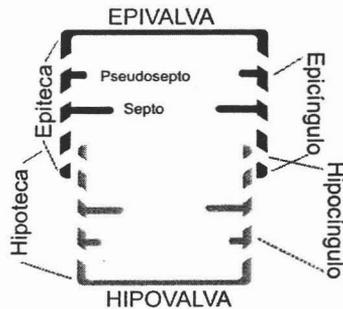


Figura 1.1. Diagrama de una frústulo mostrando sus características (Graham & Wilcox 2000).

Su distribución es amplia en número de especies, encontrándose tanto en agua dulce como salada. Se calcula, dependiendo del concepto de especie utilizado, la existencia de unas 10,000 especies (Medlin et al. 1996a); de 100,000 (Hoek et al. 1998) o hasta 200,000 especies (Kristiansen 1996, Mann & Droop 1996). Las diatomeas son probablemente los organismos acuáticos eucariontes más abundantes (Graham & Wilcox 2000) y se considera que contribuyen en un 25% a la producción primaria global (Scala & Bowler 2001).

Las diatomeas fueron descubiertas en el siglo XVIII, con sólo cinco reportes durante los siguientes cien años; durante el siglo XIX se realizó un catálogo especializado de especies de diatomeas, basándose casi completamente en las características de la pared celular (Mann & Chepurnov 2004). Esto derivó en que la taxonomía del grupo inicialmente se enfocara en la morfología del exoesqueleto de sílice, posteriormente se emplearon técnicas de microscopía electrónica, cultivos para observar sus ciclos de vida (Edlund & Stoermer 1997), características citológicas (Medlin & Kaczmarska 2004) y

técnicas moleculares (Manhart & McCourt 1992, Medlin et al. 1995). Como consecuencia hemos tenido permanentes cambios en la clasificación de las diatomeas ya que ha estado relacionada con el tipo de herramienta que se ha utilizado en ese momento. Actualmente diversos autores hacen esfuerzos por combinar los diferentes tipos de información (Kooistra & Medlin 1996, Lundholm et al. 2002, Medlin & Kaczmarska 2004)

1.1.1 Evolución de diatomeas

Las diatomeas se incluyen en la división Ochrophyta (Graham & Wilcox 2000) o Heterokontophyta (Hoek et al. 1998) basándose en la presencia de fucoxantina y clorofila a , c_1 y c_2 así como plástidos rodeados de retículo endoplásmico, crisolaminarina y lípidos como materiales de reserva. Se considera a las Ocrofitas un grupo monofilético de acuerdo a estudios de la subunidad pequeña de rDNA (SSU) (Medlin et al. 1996b).

Las diatomeas se agrupan en dos órdenes: Centrales (células discoideas o cilíndricas con simetría radial) y Pennales (con simetría más o menos bilateral). Algunas diatomeas Pennales tienen un sistema de rafe asociado con su movilidad, lo que las divide Pennales con rafe o sin rafe. Los datos moleculares indican las diatomeas Centrales y Pennales sin rafe son parafiléticas, por lo que la taxonomía clásica no es consistente con las relaciones filogenéticas deducidas con información molecular (Graham & Wilcox 2000).

Estudios de la subunidad pequeña y grande de rDNA, subunidad grande de rubisco y tufA (Medlin et al. 1993, Medlin et al. 1996a, Medlin et al. 1996b, Kooistra & Medlin 1996) sugieren que las diatomeas se dividen en dos clados (Figura 1.2) de acuerdo a los dos principales tipos de procesos tubulares que pasan a través de las valvas (Medlin & Kaczmarska 2004). Conforme a estos datos y al registro fósil se considera que las diatomeas Centrales son más antiguas que las formas Pennales, y que las diatomeas con rafe son monofiléticas, además se calculó el reloj molecular con los diferentes genes sugiriendo que la fecha promedio del origen de las diatomeas ocurrió hace más de 200 Ma mientras que los heterokontos pigmentados surgen cerca del límite Pérmico-Triásico (Kooistra y Medlin 1996).

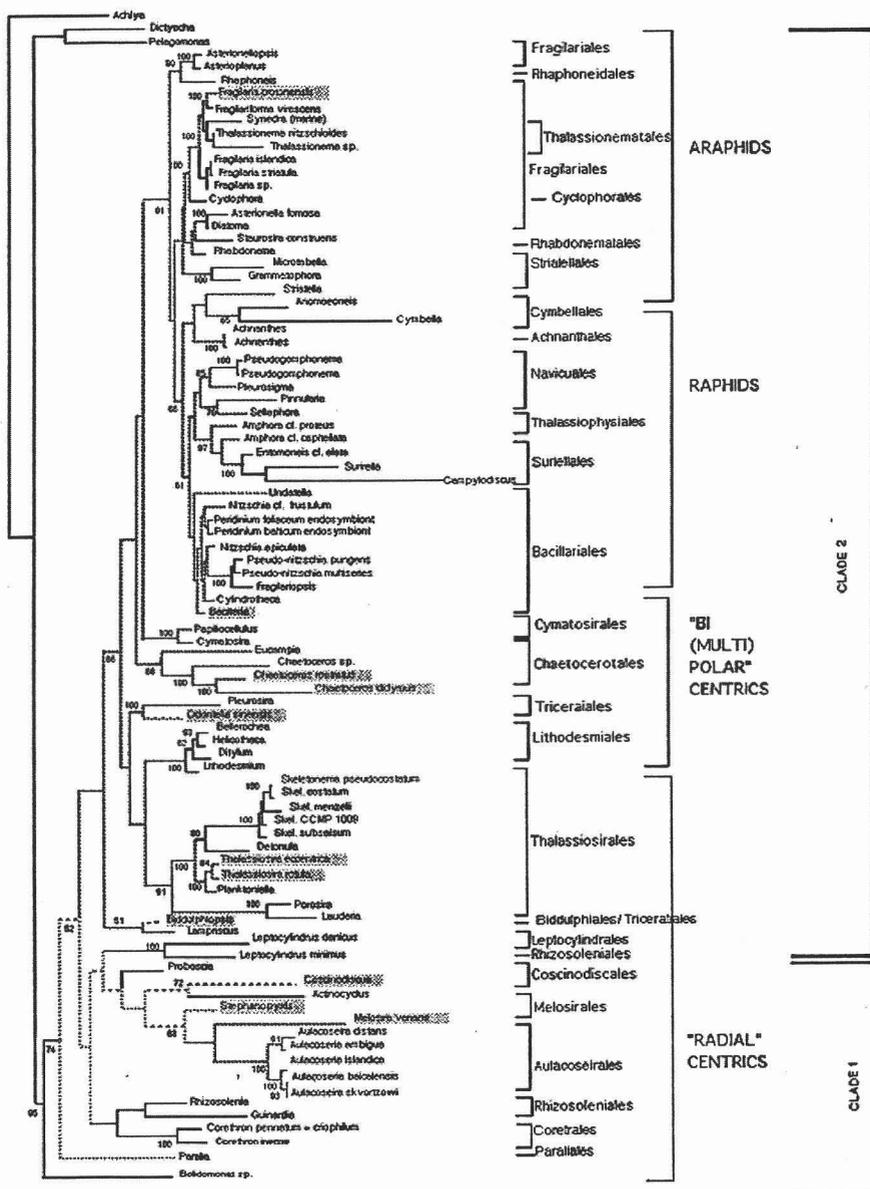


Figura 1.2 Filogenia de diatomeas basada en secuencias de subunidad pequeña y grande de rDNA y subunidad grande de RUBISCO y tufa (Medlin et al. 1996b).

1.1.2 Ciclo de vida

La mayoría de las estrategias de historias de vida de muchas diatomeas se desconocen (Edlund & Stroemer 1997). Se ha observado que cultivadas en condiciones óptimas, el ciclo de vida de muchas diatomeas puede durar varios meses (Werner 1997). En la naturaleza, los ciclos de vida son mayores y pueden durar varios años (Mann 1988, Jewson 1992). Las células vegetativas de las diatomeas son diploides y la producción de gametos es vía meiosis.

Las diatomeas Centrales son oogamas produciendo dos oogonios por célula parental y de 4 a 128 gametos masculinos flagelados por célula parental. Las valvas de las células parentales se separan permitiendo que los gametos masculinos escapen y exponiendo a su vez el protoplasto del óvulo. Los gametos poseen plástidos; pero no tienen frústulo de sílice. La fusión de gametos resulta en un cigoto que se convierte en una auxospora, que puede estar libre del frústulo parental, unido a una de las tecas parentales o cubierto por ambas (Figura 1.3a) (Graham & Wilcox 2000).

Las diatomeas Pennales son mayoritariamente isogamas sin gametos flagelados. Su reproducción comienza cuando las células parentales se emparejan en un mucílago común, seguida de una primera división meiótica y una citocinesis desigual; los dos núcleos pequeños mueren. Los frústulos se abren y el protoplasma emerge antes de la segunda división mitótica. Dentro de cada protoplasto muere un núcleo haploide producto de la segunda división meiótica. Los protoplastos se fusionan formando una célula binucleada que forma su pared de sílice llamada perizonio. Después ocurre la fusión nuclear y de la pared celular dando como resultado una célula diploide (Figura 1.3b) (Graham & Wilcox 2000).

La maduración de las auxosporas en ambas diatomeas (Centrales y Pennales) eventualmente producen una nueva segunda parte de su pared de sílice. Bajo condiciones favorables, las auxosporas germinan por una serie de divisiones que generan células con la típica morfología del frústulo y el tamaño máximo de la especie (Graham & Wilcox 2000). Las esporas y las células de latencia tienen una función de perennación en períodos no aptos para el crecimiento (como la estratificación de la columna de agua), y germinan cuando las condiciones mejoran. El desarrollo de estas estructuras generalmente no involucra la reproducción sexual; son ricas en materiales de reserva que

suministran las necesidades metabólicas para la germinación. Éstas pueden sobrevivir en sedimentos por años o incluso décadas (Graham & Wilcox 2000).

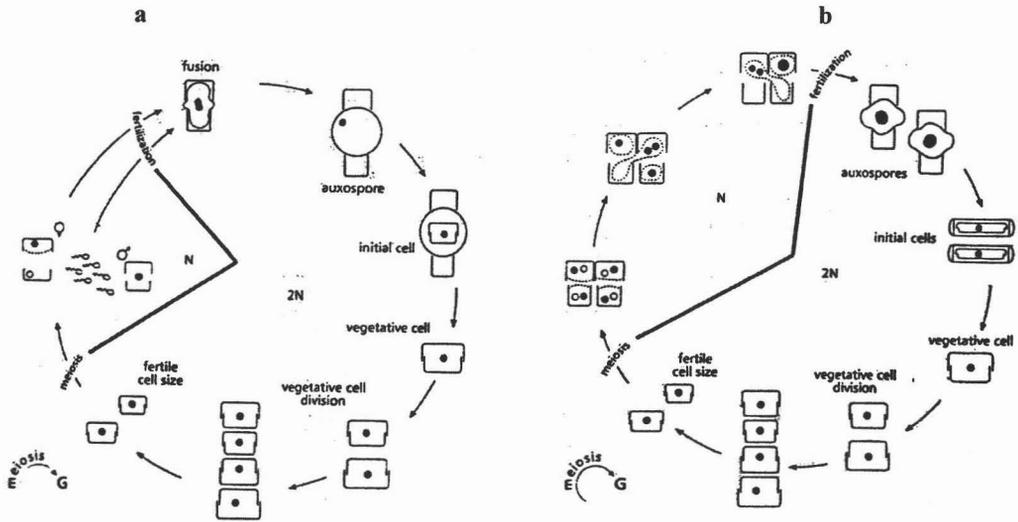


Figura 1.3. Ciclo de vida de las diatomeas: a) Centrales, b) Pennales (Graham & Wilcox 2000).

Como podemos observar en la figura 1.3, dado el arreglo de la pared celular, una diatomea que se divide por mitosis produce dos células hijas: una de igual tamaño que la célula madre y la otra ligeramente más pequeña (Edlund & Stroemer 1997), por lo que el tamaño de las células en una población que se divide por mitosis se reduce binomialmente. En la mayoría de las especies la sexualidad es el medio para la restauración del tamaño.

La reproducción sexual de las diatomeas probablemente es más común de lo que se cree, dadas las esporádicas observaciones en la naturaleza (Mann & Chepurnov 2004). Graham & Wilcox (2000) han descrito cuatro estrategias, que son muy particulares para cada especie, para la regulación de la sexualidad en diatomeas: la sincronización de la sexualidad ocurre bajo condiciones favorables de crecimiento (como se ha observado en algunas especies durante la primavera), sincronización sexual bajo condiciones que no favorecen el crecimiento vegetativo (limitaciones de luz y nitrógeno), sexualidad no sincronizada en condiciones favorables para el crecimiento cuando relativamente pocos

miembros de una población experimentan sexualidad en un período de tiempo largo y sexualidad asincrónica en condiciones pobres como estrategia para probar ventajas en ambientes no predecibles y fluctuantes.

Werner (1997) describe como factores ambientales que pueden afectar a la sexualidad los cambios en: la cantidad de luz, la temperatura y la concentración de CO₂. Bates y Davidovich (2000) describen para *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* el decrecimiento del tamaño de la célula (30-40% del diámetro máximo de la valva, por ejemplo) también mencionado por Edlund & Stroemer (1997). Posteriormente la célula debe estar en buenas condiciones fisiológicas, lo que implica estar en una fase de crecimiento exponencial, con suficiente exposición a la luz (Davidovich & Bates 1998).

1.1.3 Dispersión

Wuthrich y Matthey (1980) reportan que *Nitzschia frustulum* se dispersa por viento, adhiriéndose a las patas de los insectos acuáticos migratorios y de aves acuáticas (*Anas platyrhynchos*, *Ardea cinerea* y *Gallinago gallinago*), lo que puede resultar en dispersión por largas distancias. Ellos encontraron hasta 13 células de diatomeas por insecto y en aves acuáticas hasta 3×10^6 células en el pico y patas.

Otros trabajos similares han sido mencionados en Kristiansen (1996), Mann y Droop (1996), Mann (1999) y Kociolek y Spaulding (1999).

1.1.4 Importancia de las diatomeas

La fotosíntesis de diatomeas marinas generan del 18 al 20% del carbono producido en el mar, su papel en el ciclo del carbono se ha comparado con el de las selvas tropicales. Su existencia desde hace más de 180 millones de años y su dominancia en los océanos han contribuido a vastos depósitos de diatomita y a una fracción considerable de las reservas de petróleo actuales (Armbrust et al. 2004).

Se considera a las diatomeas ideales como monitor biológico ya que existen muchas especies ecológicamente sensibles que son abundantes en casi todos los hábitats donde el agua está presente, al menos ocasionalmente, y permanecen preservadas en los sedimentos de muchos lagos y de muchas áreas de los océanos (Scala & Bowler 2001). Su principal uso es como indicadores para descifrar los efectos a largo plazo de perturbaciones ecológicas como cambio climático, acidificación de lagos y eutrofización

(Mann & Chepurnov 2004). También hay aplicaciones directas como en la explotación petrolera y en la ciencia forense (Stroemer & Smol 1999). Igualmente su ornamentación representa el paradigma del futuro de la nanotecnología (Scala & Bowler 2001).

1.2 Evolución y biología molecular

1.2.1 Inferencia filogenética

El objetivo de los estudios filogenéticos es reconstruir las relaciones genealógicas entre entidades biológicas, estimar los tiempos de divergencia entre los organismos y encontrar la secuencia de eventos a lo largo de linajes evolutivos (Graur & Li 2000). Durante siglos, los naturalistas han tratado de detectar, describir y explicar la diversidad biológica, esta labor es conocida como sistemática (Hillis et al. 1996), que puede definirse como una disciplina de la biología comparada que se encarga de estudiar los patrones y procesos de la diversidad biológica (Perez-Ponce et al. 1997). La sistemática molecular utiliza marcadores genéticos para hacer inferencias sobre procesos poblacionales y filogenéticos creando bases de datos las cuales son usadas en estudios de evolución molecular para evaluar tasas, procesos, y cambios moleculares a través del tiempo abarcando la variación intraespecífica que es el campo de estudio de la genética de poblaciones y la diversidad interespecífica, campo de estudio de la filogenética (Hillis et al. 1996).

Dicha diversidad biológica es resultado de la evolución que puede definirse como descendencia con modificaciones y diversificaciones (Futuyma 1998). Existen diferentes marcadores moleculares que reflejan los cambios genéticos con diferente tasa de evolución por lo que reflejan diversidad genética a diferentes niveles. Es decir, un marcador molecular con tasa de evolución rápida muestra variación genética intraespecífica y un marcador molecular con tasa de evolución lenta muestra variación genética interespecífica.

Este vínculo es fundamental en la integración de la evolución molecular y la sistemática y ha sido incrementada por el uso de árboles de genes en ambos niveles. La teoría de la coalescencia predice el efecto de la deriva génica, de la mutación, de la migración y de la selección en un tiempo esperado para un ancestro común de un alelo. Si

la tasa de sustitución nucleotídica es suficiente para estimar la genealogía alélica, entonces pueden realizarse inferencias sobre tamaño poblacional, flujo génico y eventos de selección. La aparición significativa de estudios teóricos y empíricos entre especies ayudará al entendimiento de las condiciones para que los árboles de genes y los de organismos sean congruentes.

La sistemática filogenética trata de reconstruir relaciones de ancestría común, es decir, busca grupos monofiléticos, basándose en caracteres derivados, es decir, que surgieron una sola vez como novedades evolutivas y se comparten con los descendientes (Perez-Ponce et al. 1997). La filogenia de cualquier grupo es una verdad que nunca podrá conocerse completamente, se dice que nunca se tendrán suficientes datos para ello (Kocielek et al. 1989). Por lo tanto, solo se puede aspirar a hacer una estimación. Para ello es necesario identificar las características homólogas y con estos datos producir una hipótesis de filogenia, suponiendo que esas similitudes son una guía para encontrar relaciones, es decir, se asume que dichas similitudes se deben a una genealogía en común y no son producto de linajes independientes que obtuvieron la misma característica por diferentes caminos (Hillis et al. 1996).

Aspectos controversiales

Árboles de genes y árboles de organismos

Suponiendo que los genes comparados son verdaderamente homólogos, los árboles de genes pueden diferir de las filogenias de los organismos dada la retención de polimorfismos ancestrales o reticulación entre poblaciones (i.e., flujo génico) o entre especies (i.e., hibridación). Esto particularmente concierne a los segmentos no recombinantes, como los genomas de los organelos, porque los efectos de la reticulación potencialmente se retienen a través de las generaciones subsecuentes (Hillis et al. 1996).

Datos morfológicos y moleculares

Ha habido un considerable debate sobre si los caracteres morfológicos o moleculares son por si mismo mejores fuentes de información para estimar filogenias. Algunos han aclamado que los caracteres moleculares son relativamente débiles mientras que otros han aclamado que los caracteres morfológicos tienden a ser no informativos o engañosos. Una examinación más cercana muestra que esta visión carece de argumentos.

Hillis et al. (1996) sugieren que el conflicto entre evidencia molecular y morfológica se ha sobreenfatizado. El desarrollo de la sistemática molecular no ha resultado en amplias refutaciones de hipótesis generadas por morfólogos; aunque el enfoque molecular puede ser revelador en situaciones donde la variación morfológica es limitada o donde la homología de los caracteres morfológicos no es clara (Hillis et al. 1996). La verdadera preocupación de los sistematistas debe ser que los caracteres examinados ya sean morfológicos o genéticos exhiban la variación apropiada para la pregunta propuesta, que los caracteres tengan una base genética clara e independiente y que los datos sean colectados y analizados de tal manera que sea posible comparar y combinar hipótesis filogenéticas derivadas de ellos.

Relación entre evolución molecular y evolución fenotípica

Aunque la mutación y la deriva génica son muy importantes en la evolución, la selección natural juega un papel significativo en la evolución fenotípica (Hedrick 2000). Esto resulta obvio al observar que la mayoría de los caracteres morfológicos y fisiológicos están bien adaptados al ambiente en el que el organismo vive. Para conciliar estas dos observaciones, hay que suponer que la mayoría de las mutaciones moleculares se comportan como genes neutros en poblaciones pero que no son estrictamente neutras y que su efecto acumulativo en muchos loci es responsable de los cambios adaptativos de los organismos (hipótesis del mínimo efecto del gen). La otra manera de conciliarlo es suponer que la mayoría de las mutaciones no deletéreas son más o menos neutras; pero que hay pequeñas proporciones de mutaciones adaptativas y que estas mutaciones son responsables de la adaptación (hipótesis del máximo efecto del gen) (Nei, 1987)

1.2.2 Demografía, tamaño efectivo y recombinación

Como sabemos, la transmisión de genes de una generación a otra es fundamentalmente un proceso demográfico; el tamaño de la población es una parte integral de cualquier análisis de genética de poblaciones. Para entender la teoría neutral es necesario entender la deriva, la mutación y la migración. La deriva génica es una fuerza que reduce la heterocigosis por la pérdida al azar de alelos, está inversamente relacionada con el tamaño poblacional (N_e). Grandes poblaciones (suponiendo que estén

en equilibrio de Hardy-Weinberg) no experimentarán deriva mientras que poblaciones pequeñas experimentaran mayores efectos de la deriva (Griffiths et al. 2002). Es por ello que conocer el tamaño efectivo de la población nos puede dar pistas sobre el efecto de la deriva. El principal problema para calcular N_e es que generalmente es parte de un producto cuyo parámetro no es posible estimar. Si se logra obtener un buen estimado del tamaño efectivo de la población (demográficamente) o de la tasa de mutación, se puede estimar el otro parámetro. Si queremos comparar el tamaño relativo de la población sobre un loci, puede hacerse. Para ello debe asumirse que la tasa de mutación es la misma sobre el loci y que las poblaciones están cercanamente relacionadas. Es decir, la deriva génica está directamente relacionada con el tamaño de la población (si es pequeño, hay más deriva; si es grande, hay menos). Existen factores que afectan N_e como que el tamaño real de la población sea fluctuante, el solapamiento de generaciones y la dispersión espacial de la población. Su influencia en el tamaño efectivo de la población está dada por la varianza de la distancia de dispersión, la densidad de individuos y la distribución de las distancias de dispersión (Hedrick 2000, Gillespie 1998).

1.2.3 Marcadores moleculares

Microsatélites

Los microsatélites son regiones del genoma caracterizados por repeticiones tándem de unidades cortas de ADN (1-6 bp) y se encuentran en el genoma nuclear, mitocondrial y de cloroplasto. Dichas secuencias son altamente polimórficas, varían en el número de repeticiones de las unidades a nivel de individuos permitiendo así identificar individuos (Hancock 1999). Una característica potencial de los microsatélites es que los oligonucleótidos desarrollados para una especie pueden ser utilizados en taxa relacionados. Se han estimado tasas de mutación promedio de 10^{-4} por generación (Jarne & Lagoda, 1996), aunque esta tasa varía dependiendo de la especie. Se considera que la fuente de variación en la longitud de las secuencias se debe al deslizamiento de la maquinaria esencial de síntesis de ADN durante la replicación de estas regiones repetitivas. Se han desarrollado marcadores de microsatélites nucleares para diferentes macroalgas como *Laminaria digitata* (Phaeophyceae) (Billot et al. 1998),

Cladophoropsis membranacea (Chlorophyta) (Strate et al. 2000), *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta) (Luo et al. 1999) encontrando que son menos abundantes comparados con los de plantas superiores y animales y que muestran variabilidad genética extremadamente alta. También se han desarrollado microsátélites para las diatomeas *Ditylum brightwellii* (Ryneron & Armbrust 2000), *Pseudo-nitzschia pungens* (Evans & Hayes 2004) y *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Evans et al. 2004) con el fin de detectar variación genética a nivel poblacional.

Ryneron y Armbrust (2004) detectaron tres poblaciones genéticamente distintas. Las diferentes poblaciones estaban asociadas a diferentes estuarios y dicha diferenciación sugiere que el intercambio genético entre poblaciones se ve restringido por selección diferencial. Se secuenció la región de 18S de rADN de aislados de las dos poblaciones más divergentes, siendo éstas idénticas, lo que sugiere que se muestrearon la misma especie o una recién divergida. Los autores consideraron que, poblaciones con diferentes características genéticas y fisiológicas, se mantienen por largos períodos de tiempo dado la combinación de la hidrología y la selección diferencial. Ryneron y Armbrust (2000) encuentra una heterocigosis esperada (H_e) de 0.69 a 0.88 y en 2004, con otras poblaciones (2004) encuentran una H_e : 0.42-0.96. Evans & Hayes (2004) encuentran para *Pseudo-nitzschia pungens* seis microsátélites con H_e : 0.55-0.86. Evans et al. (2004) reportan para *Pseudo-nitzschia multiseriis* una H_e : 0.39-0.70.

Oligonucleótidos universales de cloroplasto

Basándose en la estructura conservada del ADN de cloroplasto se desarrollaron oligonucleótidos universales (Demesure et al. 1995) que amplifican regiones no codificantes. Teniendo el genoma de cloroplasto completamente secuenciado de varias plantas, se buscaron regiones de genes de tRNA altamente conservados y de genes de proteínas. Estos oligonucleótidos se unen a regiones conservadas y amplifican la región intergénica no codificante; han sido probados en al menos ocho especies de plantas entre angiospermas y gimnospermas (Demesure et al., 1995) variando de 1500 a 4000 pb dependiendo de la especie. Algunos de estos primers fueron probados en macroalgas verdes existosamente (Taberlet et al. 1991). Estos marcadores se utilizan en este trabajo con el objetivo de buscar variación genética a nivel poblacional

Región parcial de la subunidad grande de rADN

Una de las razones por las que el rADN es útil para los análisis filogenéticos es porque diferentes regiones de este evolucionan a diferentes tasas. Por lo tanto diferentes regiones pueden ser informativas para responder a casi cualquier pregunta sistemática a diferentes niveles. La subunidad grande de rADN contiene regiones que evolucionan más rápidamente que la subunidad pequeña, por ello puede ser utilizada exitosamente para inferir relaciones filogenéticas entre organismos cercanamente relacionados (Hillis & Dixon 1991). El dominio D1 y D3 de dicha región, que es hipervariable, fue utilizado por Lundholm et al. (2002) para realizar la filogenia de Bacillariaceae y por otros autores (Orsini et al. 2002; Stehr et al. 2002; Lundholm et al. 2003; Cerino et al. 2004) para dilucidar relaciones filogenéticas de especies del género *Pseudo-nitzschia*. Para este trabajo se amplificó el segmento 9 (que incluye a estos dos dominios) con los oligonucleótidos 28y y 28z (ver figura 1.4).

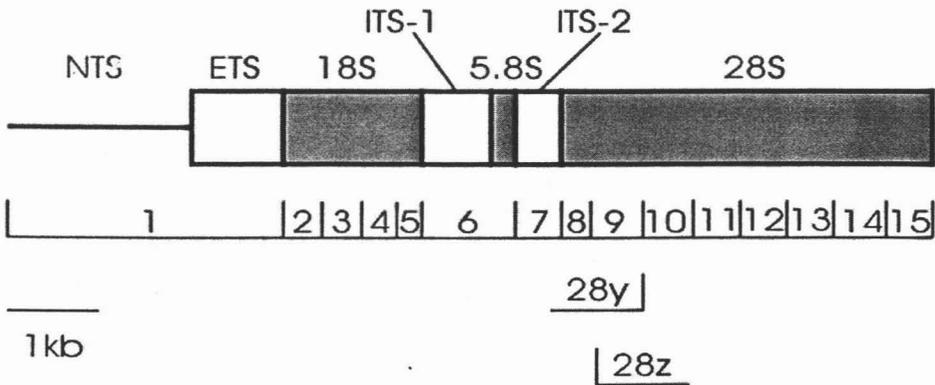


Figura 1.4. Mapa de rADN, los números del centro dividen el fragmento en secciones, la sección 9 se amplifica con los oligonucleótidos 28y y 28z (Hillis & Dixon 1991).

2. Justificación y Objetivos

Justificación

Existen pocos estudios en diatomeas de agua dulce y ninguno con diatomeas no planctónicas. No se ha realizado ningún trabajo de genética de diatomeas de agua dulce en México; los esfuerzos se han enfocado a descripciones de floras, aspectos taxonómicos y fisiológicos. Se desconoce la variación genética de las especies mexicanas, sólo una especie colectada en México (*Pseudo-nitzschia galaxiae*) ha sido incluida en las filogenias de diatomeas. Es importante realizar estudios en diatomeas, sobretudo en aquellas especies que son utilizadas como indicadoras como *Nitzschia frustulum*, para poder utilizarlas adecuadamente. La mayoría de las estrategias de historias de vida de muchas diatomeas se desconocen (Edlund & Stroemer 1997) por lo que es necesario aportar información en este campo.

Objetivo General

Determinar la variación morfológica y la estructura genética de *Nitzschia frustulum* del Parque Ecológico de Xochimilco, México, así como conocer su relación filogenética con otras especies de la familia Bacillariaceae.

Objetivos Particulares

1. Analizar la variación morfológica de la población de *Nitzschia frustulum* del Parque Ecológico de Xochimilco.
2. Conocer la estructura genética de *Nitzschia frustulum* mediante marcadores nucleares, de cloroplasto y de ADN ribosomal.
3. Conocer la estructura genética de *Pseudo-nitzschia delicatissima* y *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*.
4. Inferir la relación filogenética de *Nitzschia frustulum* con otras especies contenidas en la Clase Bacillariaceae.

3. Localidad de estudio

El Parque Ecológico de Xochimilco (PEX) se encuentra en el Sureste del Distrito Federal, México (Figura 3.1). Fue inaugurado en 1993 como parte de un proyecto de rescate del Sistema Lacustre del Valle de México. Abarca casi 190 hectáreas, 50 de ellas son espejos de agua (lagos, ciénagas y canales). Está situado sobre un área de antiguas cenizas con suelos lacustres y palustres con elementos volcánicos aluviales y orgánicos. En esta área, el manto freático cambia estacionalmente, lo que favorece la evaporación y acumulación de sales de sodio cuando hay poco agua. Para rescatar las zonas inundadas y evitar la acumulación de sales, se agrega materia orgánica continuamente.



Figura 3.1. Mapa de la República Mexicana mostrando el Distrito Federal y la Delegación Xochimilco.

Además del agua de lluvia, se incorporan 1500 litros por segundo de agua tratada a nivel terciario (Rodríguez 1998) que viene de la planta de tratamiento de Cerro de la Estrella, lo que tiene como consecuencia que los cuerpos de agua sean eutróficos, algunos con florecimientos de diferentes especies de algas (*Microcystis* spp, *Planktothrix agardhii*, *Anabaenopsis circinalis*, *Arthrospira* cf. *jenneri*, *Euglena acus*, *Phacus tortus*, *Pteromonas alata*, etc.), entre ellas diatomeas (principalmente del género *Nitzschia* y *Navicula*) (Tavera et al. 2000). El agua tratada hace disponible el alimento a lo largo del año, en comparación con las zonas cercanas que sólo tienen buenas condiciones en época de lluvias. El PEX está siendo rehabilitado, se puede observar colonización por flora y fauna, destacando el retorno de la avifauna migratoria (Tepayotl 1999).

El clima en general, según la clasificación de Koeppen modificada por García (1986), es C(w), templado subhúmedo con lluvias en verano, con una precipitación pluvial de 700 a 900 mm de promedio anual, y temperatura media anual de 15.9o C, con heladas ocasionales en invierno. El Parque presenta una de las cuatro subunidades de este clima que es el subtípico C(Wo) (el más seco de los templados subhúmedos) con luvias en verano y con un coeficiente P/T menor que 43.2, (Wo) porcentaje de lluvia invernal menor de 5% del total anual, con régimen térmico de verano fresco largo, (i) con oscilación térmica anual entre 5° C y 7° C.

Aquí se encuentran especies de flora y fauna originales del sur de la cuenca. En cuanto a la flora encontramos 119 especies, de las cuales 15 son acuáticas. Entre las que se encuentran a las orillas de los cuerpos de agua tenemos a *Eichhornia crassipes* (lirio acuático), *Scirpus pungens* y *Typha latifolia* (tule) (Salas 1998).

En el Parque Ecológico de Xochimilco se han reportado 64 especies de aves de las cuales 33 son residentes y 31 son migratorias, encontrándose que 19 de las migratorias visitan el parque en otoño-invierno, 11 en invierno y 1 en otoño. Del total, 39 son acuáticas y 25 son terrestres. Entre la especies de aves acuáticas más abundantes encontramos (en orden de abundancia) a *Anas platyrhynchos diaza*, *Gallinula chloropus*, *Fulica americana* y *Oxyura jamaicensis*. Tepayotl (1999) define

Los factores que afectan la permanencia y comportamiento de las aves no es constante ya que el PEX es manejado por el hombre dado que requiere de un mantenimiento periódico. De acuerdo a su investigación, Tepayotl (1999) define como zona de reserva aquella que presenta poca actividad humana (cerca al canal del bordo y alrededor del Lago Acitlalín) donde las condiciones más propicias para la distribución se acercan al óptimo, como zona intermedia al lago Huetzalín en su parte central y los pequeños cuerpos de agua que lo rodean y zona de condiciones cercanas al mínimo donde hay vegetación herbácea sin cuerpos de agua. La presencia de aves es importante para la dispersión de diatomeas (Wuthrich & Matthey, 1980). Otro papel importante de las aves es, también, el de aportar nutrientes al medio a través del guano (Tepayotl 1999). Se definen áreas

Tavera et al. (2000) encuentran especies de chlorococcales distribuidas en el lago Huetzalín y el canal del bordo; no encuentran chlorococcales en el lago Acitlalín y un

pequeño cuerpo de agua que está al noreste. De acuerdo sus mediciones de la temporada fría y seca en Noviembre, reportan que el pH de los cuerpos de agua oscila de 7.5 (en el vertedero) a 9.6 (en el canal El Bordo) y la conductividad va de 519 (en el vertedero) a 1335 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (en el lago Acitlalín).

4. Especies estudiadas

4.1 Taxonomía de Bacillariaceae

Se han descrito a 16 géneros pertenecientes a la familia Bacillariaceae, entre ellos a *Nitzschia* y *Pseudo-nitzschia*. Durante muchos años se han debatido las relaciones entre los géneros *Pseudo-nitzschia*, *Fragilariopsis* y *Nitzschia*. Round et al. (1990) recomiendan retener a *Fragilariopsis* como un género separado de *Nitzschia*. Hasle, en 1993 y 1994 reconstruye a *Pseudo-nitzschia* como un género separado después de hacer comparaciones morfológicas entre *Pseudo-nitzschia* y *Nitzschia* (citado en Kaczmarska & Fryxell 1994). *Nitzschia* comprende a más de 900 especies por lo que Mann (1986) indica que es necesaria una revisión taxonómica, lo cual implica un mayor esfuerzo ya que pocos taxa han sido estudiados en el microscopio electrónico de transmisión y barrido y no existen monografías recientes comprensibles.

Lundholm et al. (2002) realizaron un análisis filogenético de Bacillariaceae de 42 especies tomando las primeras 872 pares de bases de la subunidad grande de rDNA que incluye algunos de los dominios más variables. Cuatro géneros arráfidos se usaron como grupo externo para análisis de distancia, parsimonia y máxima verosimilitud. Las inferencias filogenéticas revelaron que Bacillariaceae es monofilética. Los autores tomaron también diversas características morfológicas observadas al microscopio óptico y electrónico (rafe levantado sobre la valva, presencia o ausencia de poroides en la pared del canal rafideano, presencia o ausencia de nódulo central, número de estrías comparado con el número de fíbulas, número de filas de poroides, patrón de perforaciones en el himen del poroide, copula, estructura secundaria en la frústula, forma de crecimiento o tipo de colonia). Los análisis sugieren que *Nitzschia* no es monofilético para los análisis realizados (máxima parsimonia y máxima verosimilitud) (Figura 4.1).

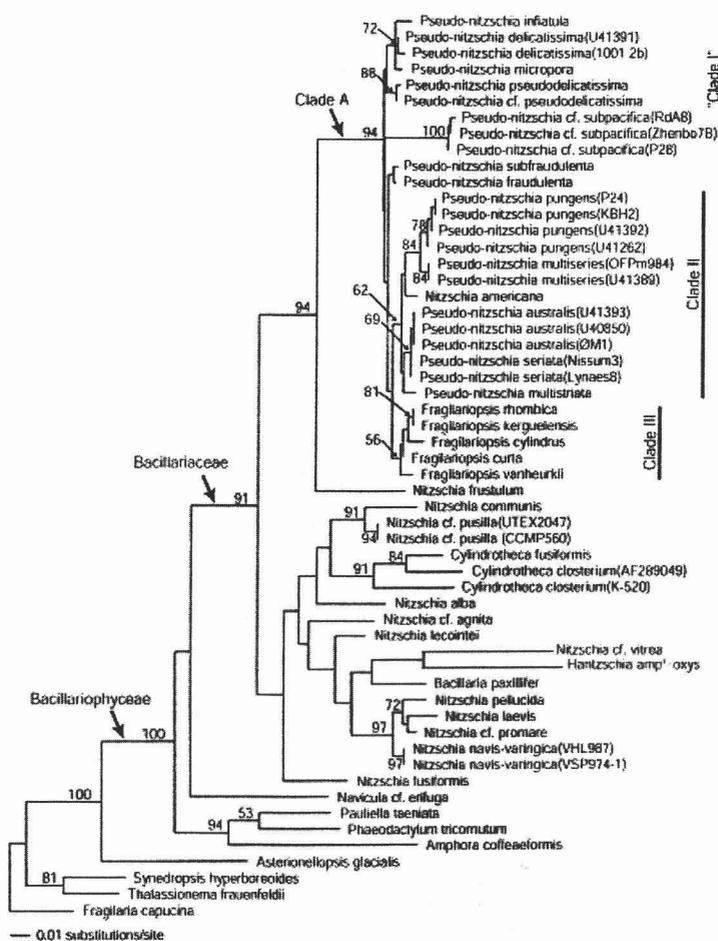


Figura 4.1. Árbol de máxima parsimonia de Bacillariaceae basado en la región variable de la subunidad grande de rDNA. Los valores de bootstrap (1000 réplicas) para parsimonia se muestran antes de la diagonal y los valores de bootstrap del análisis de distancia (1000 réplicas) se muestran después de la diagonal (Lundholm et al. 2002).

4.1.1 Descripción de *Nitzschia*

Round et al. (1990) definen al género *Nitzschia* como células solitarias o formando cadenas o colonias en forma de estrellas, o viviendo en tubos de mucilago, usualmente derechas y con forma de aguja otras veces sigmoide en vista valvar o del rafe; dos plástidos, uno al final de cada célula, raramente muchos plástidos pequeños discordes, plástidos simples o lobulados, conteniendo de uno a más pirenoides con forma

de barra, de agua dulce a marinos, usualmente epipéllicos o planctónicos. Valvas rectas o sigmoides, angostas; lineales, lanceoladas o elípticas, algunas veces expandidas en el centro, más o menos simétricas con respecto al plano apical; pero comúnmente de fuerte asimetría en su estructura. Polos diversos generalmente rostrados o capitados. Estrías usualmente uniseriadas no interrumpidas por esterna lateral, conteniendo pequeños poroides redondos ocluidos por hímenes y algunas veces por cribas también. Areolas ocasionalmente loculadas en las especies sigmoides grandes. Cadenas marginales algunas veces presentes. Sistema rafideano ligero a muy fuertemente excéntrico, cercano al margen proximal (Figura 4.2a), fibulado. Sistema de rafe en las dos valvas del mismo lado (simetría hantzschoides) o de lados opuestos (simetría nitzschioide) del frústulo (Figura 4.2b). Durante la división celular el sistema de rafes de las valvas hermanas se forma en lados opuestos de la célula parental, entonces células hantzschoides no se entrecruzan realmente. Terminaciones simples del rafe central presente en algunas especies, rafe continuo de polo a polo en otras, terminan en una helictoglossa pequeña o grande y doble, terminaciones externas simples o desviadas hacia el margen distal. Fisuras terminales usualmente presentes, giradas o en gancho hacia el lado distal o proximal. Fíbulas muy diversas, algunas veces extendidas a lo largo de la valva. Bandas del rafe abiertas, muy variables en número, usualmente con uno o varias filas transversales de cada uno de los poroides.

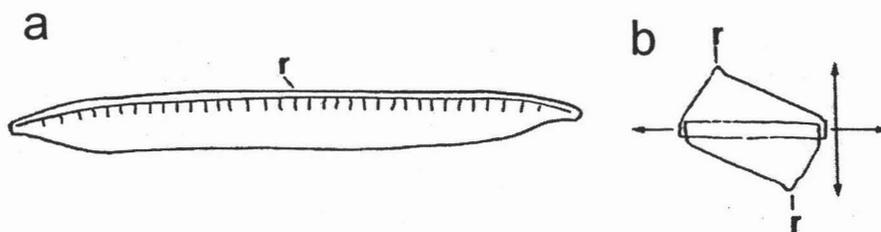


Figura 4.2. a. vista valvar de *Nitzschia* con el rafe (r) a lo largo de un lado. b. Vista transapical de un frústulo de mostrando la heteropolaridad de la epivalva e hipovalva (Barber & Haworth 1994).

Es un género relativamente grande con cientos de especies marinas y de agua dulce. La mayoría de las especies son epipéllicas en microhábitats pero *Nitzschia* contiene también especies planctónicas, epilíticas y epifíticas. *Nitzschia* contiene

Es un género grande y difícil, dividido en varias secciones por Cleve y Grunow en 1880. Round et al. (1990) separan *Nitzschia* en *Fragilariopsis*, *Psammodictyon* y *Tryblionella*. Otros estudios sobre el género se han realizado por Lange-Beralot (1980) y otros, revisando los conceptos de varias especies de agua dulce con el objetivo de establecer relaciones subgenéricas.

Nitzschia es uno de los géneros más grandes de diatomeas y no ha sido sujeto a una revisión taxonómica mayor desde hace casi un año. Se han descrito muchas especies a partir de la descripción original realizada por Hassall en 1845, con muchas de éstas sin asignación taxonómica al género. Recientemente se han aplicado dos aproximaciones para clarificar los sistemas intragenéricos.

En un esfuerzo extensivo, Lange-Beralot (1980) y Lange-Beralot y Simonsen (1978) (citado en Lange-Beralot, 1980) han revisado los conceptos de varias especies mayoritariamente de agua dulce (principalmente la sección *Lanceolatae*) con el objetivo de establecer relaciones subgenéricas dentro del género. Por ejemplo, Lange-Beralot (1980) Mientras que Mann (1986) y Round et al. (1990) definen caracteres diagnóstico del género examinando el tipo genérico y ciertas secciones, para proveer un marco de referencia para futuras consideraciones de lo que debe ser considerado el género *Nitzschia*. Un ejemplo son los cambios progresivos que han rodeado la taxonomía intragenérica como la historia del género *Pseudo-nitzschia* H. Perigallo y *Fragilariopsis* Husdelt cuya relación con *Nitzschia* ha experimentado cambios repetidos durante las últimas décadas. Mann en 1986 indica que es necesaria una revisión taxonómica.

4.1.2 Descripción de *Pseudo-nitzschia*

El género *Pseudo-nitzschia* incluye a 27 especies de diatomeas pennaes que forman colonias, originalmente estaba considerado dentro de una sección *Nitzschia americana*. Es un género marino, planctónico de diatomeas que forman cadenas; algunas especies dentro del género producen ácido domóico; tiene una distribución mundial e incluye a especies cosmopolitas, templadas y tropicales. La identificación de las especies puede ser compleja ya que es necesario observar detalles finos de la estructura del frústulo en el microscopio electrónico para poder definir a la especie. Fehling et al. (2004) demuestran en un estudio con varias especies de *Pseudo-nitzschia* la importancia

de combinar aproximaciones morfológicas y genéticas para identificar y separar especies de *Pseudo-nitzschia* cercanamente relacionadas.

Para *Pseudo-nitzschia delicatissima* colectada en el golfo de Nápoles, Italia, Orsini et al. (2004) encontraron cinco diferentes linajes con *ITS1-5.8S-ITS2*. Detectaron alta variación genética en la fase anterior de florecimiento; dichos cultivos se agrupan en un clado. Las secuencias de la subunidad grande de rADN (LSU) generan la misma topología. Se reveló una alta diversidad genética dentro de la especie, que previamente se había considerado una morfoespecie bien definida. Al encontrar diversidad críptica para *Pseudo-nitzschia delicatissima* consideran que con la técnica de microscopía de luz se subestima la diversidad de especies. El análisis filogenético considera la existencia de especies reproductivamente aisladas dentro de *Pseudo-nitzschia delicatissima*; pero no descartan que pueda haber hibridación, que puede ser la causa de la alta diversidad encontrada. Mencionan que la distancia genética entre diferentes poblaciones es comparable a aquella que existe entre diferentes especies de plantas además de que encuentran diferentes rendimientos fotosintéticos a pesar de ser aparentemente idénticos morfológicamente (Orsini et al. 2004). En el estudio realizado por Orsini et al. (2004) utilizaron sólo secuencias de *Pseudos-nitzschia delicatissima* y una secuencia de *Pseudo-nitzschia fraudulenta* que utilizan como grupo externo.

Cerino et al. (2004) encuentran que la diversidad genética en *Pseudo-nitzschia galaxiae* menor que en otras especies. Stehr et al. (2002) describen muy poca variación en *P. pungens* colectada en Estados Unidos. Stehr et al. (2002) mencionan que *P. pseudodelicatissima* muestra alta variación genética. Basándose en observaciones de aislados con caracteres similares a *P. pseudodelicatissima* y a *P. cuspidata*, Lundholm (2003) considera que existen más especies no descritas de *Pseudo-nitzschia*.

4.1.3 Descripción de *Nitzschia frustulum*

Nitzschia frustulum (Kützing) Grunow en Cleve y Grunow 1880, sección Lanceolatae sensu Krammer y Lange-Bertalot 1998 la describen como valvas lanceoladas, linear lanceoladas, a lineares con ápices ligeramente alargados, agudos, redondeados, ligeramente capitados, márgenes ligeramente cóncavos en la parte media de

la rafe; estrías punteadas paralelas, generalmente dos por fibula; fibulas cortas, angostas o anchas, con nódulo central evidente, irregularmente dispuestas. Largo de las valvas: 5-60 μm . Ancho de las valvas: 2-4.5 μm . Densidad de estrías: 17 a 27 en 10 μm . Densidad de puntos (aerolas) en las estrías: 19 a 30 en 10 μm . Densidad de fibulas en el centro: 10-16 en 10 μm . Crece en natas, flóculos filamentosos, tapetes, películas compactas, crecimientos hemisféricos, macrófitas, perifiton, pláncton, costras, flóculos mucilaginosos y películas filamentosas; edáficas, plánctica, epífita, epipsámica, epilítica, epipélica, en charcos, canales, lagos, arroyos, ríos, represas, ambientes mixtos y estanques artificiales.

Se ha encontrado a la especie en sedimentos fósiles de lago, pantanos, aguas estancadas y lagos salobres someros. Habita en ríos, lagos, manantiales, charcos, pantanos marginales y suelos húmedos. Las aguas donde se encuentran suelen ser someras, con salinidad variable, alcalinas y/o salobres con profundidad moderada, eutérmica, eurihalobia, alcalifila (pH de 6.2 a 8.6), eutrófica, halófila e indiferente a la sal y aparentemente eurihalobia, limnobiontica mesooxibióntica (Novelo, 1998; Krammer & Lange-Bertalot 1988). La forma de vida que presentan son: béntica, litoral, plánctica, edáfica, perifítica y endozooica.

Distribución

La especie es considerada cosmopolita. Novelo (1998) encuentra registros en: Inglaterra, Reino Unido; Europa Central; Maharashtra, India; Córdoba, Argentina; Francia; México central, Texcoco, Tehuacan, Puebla, México; Alemania; Nowy Sacs, Polonia. Para la variedad *perpusilla* hay registros en Arizona, Estados Unidos y Baviera; Alemania. Para la variedad *subsalina* hay registros en Irak, Francia y Murcia, España. Otros autores la han reportado en Holstein, Alemania (Wendker 1990), Bahía Chesapeake (Maryland, Pensilvania, Virginia y distrito de Columbia, EUA (Intersate Commission on the Potomac River Basin 1998)), Tierra del Fuego (Argentina) (Mataloni 1998), California, EUA (Herbst & Blinn 1998, Brown & Short 1999), Tuva, Russia (Naumenko 1999), Norte de África (Marruecos, Tunes y Egipto) (Fathi et al. 2001), Victoria, Australia (Blinn & Bailey 2001), La Jolla, California, Estados Unidos (Lundholm 2002),

Aiguamolls de l'Empordà, España (Trobajo et al. 2004) por mencionar algunos (Figura 4.3).

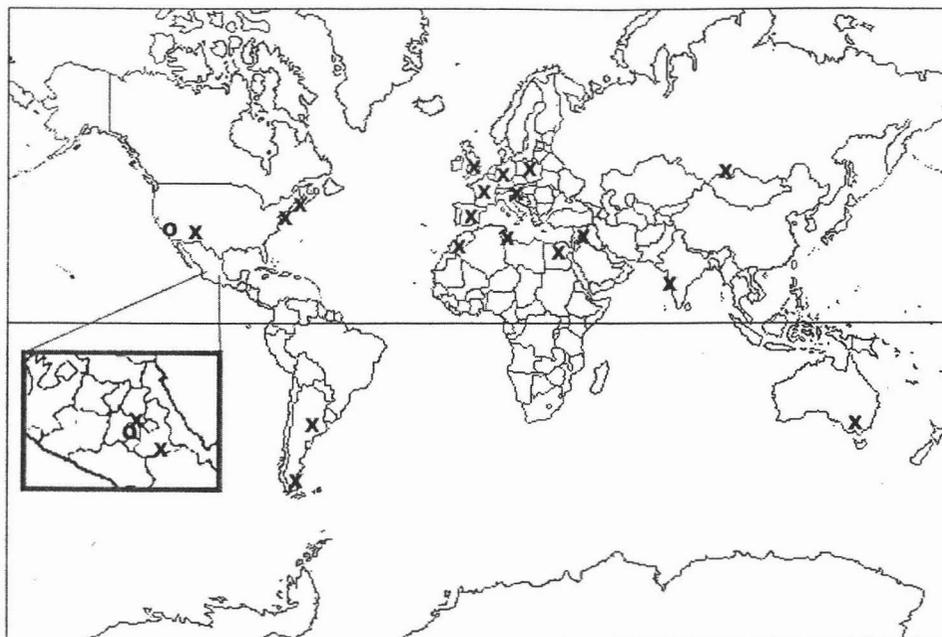


Figura 4.3. Mapa mostrando los sitios donde se ha reportado la presencia de *Nitzschia frustulum*.

Morfología de *Nitzschia frustulum*

Además de los factores ambientales que afectan la tasa de disminución del tamaño, se ha demostrado para que hay tamaños variables entre diferentes clonas de la misma especie, en las mismas condiciones de crecimiento, lo que sugiere que el control de la disminución del tamaño tiene un valor competitivo (Edlund & Stroemer 1997). La variación morfológica es claramente una respuesta a condiciones ambientales (Cox 1995).

Wendker (1990) en el estuario Schlei de Holstein, Alemania, encuentra que en poblaciones naturales de *Nitzschia frustulum* el largo y ancho de la valva y la densidad de fibulas aumenta conforme se aproxima a la boca del estuario, mientras que el incremento de la densidad de fibulas coincide con un decremento de P.

Trobajo et al. (2004) describen, para una cepa de *Nitzschia frustulum* aislada de un pantano salado mediterráneo, los efectos de salinidad, tasa de N:P y movimiento del agua en su morfología, encontrando que la salinidad es el principal factor que afecta el largo, ancho y densidad de fibulas, pero que la densidad de fibulas y el ancho también se ven afectados por la tasa N:P y el movimiento del agua respectivamente. Consideran que la densidad de estrías es el carácter más estable de los mencionados en este estudio. Mencionan que el ancho de la valva adaptación que provee de una mayor superficie de unión en condiciones turbulentas.

Observaciones casuales sugieren que el tamaño promedio y máximo de las células son mayores en aquellas poblaciones en ambientes colectados antes de ser disturbados por el hombre que en ambientes modernos (Edlund & Stroemer 1997).

Sexualidad en *Nitzschia frustulum*

Algunas diatomeas son automíticas y se pueden dividir en paedógamas, donde dos gametos del mismo gametangio se fusionan; autógamias, donde la fusión del núcleo gamético ocurre sin unión al protoplasma gametangial, o partenogénéticas.

En las diatomeas Pennales la paedogamia (Figura 4.4) se conoce en *Synedra ulna*, algunas poblaciones de *Cymbella* y *Gomphonema* y en *Nitzschia frustulum* var. *perpusilla*, *Amphora* cf. *veneta* y *Achnanthes subsessilis*. En cada caso la restricción o evasión de recombinación y sexualidad es claramente secundaria (Mann 1993). Los taxa automíticos y partenogénéticos están cercanamente relacionados a las diatomeas con un ciclo sexual normal y están dispersos en los diferentes grupos de diatomeas. Su distribución sugiere que cualesquiera que sean sus ventajas a corto plazo de abandonar el sexo, las apomíticas y automíticas han sacrificado sus prospectos evolutivos (Round et al. 1990)

Mann (1993) considera que *Nitzschia* se ha diversificado particularmente rápido en sus procesos sexuales o que *Nitzschia* puede ser un grupo taxonómico no natural, lo cual dividiría al género en varios como lo propone Round et al. (1990).

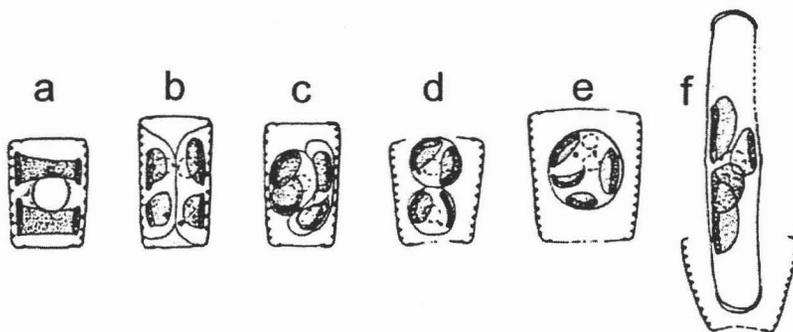


Figura 4.4.. a. Profase meiótica en gametangios no pareados, b-d. Gametos antes, durante y después del rearreglo, e. La paedogamia resulta en la formación de un único cigoto que queda dentro del gametangio, f. Auxospora expandida (Round et al. 1990).

4.2 Genética Poblacional de Diatomeas

La genética de poblaciones analiza los fenómenos microevolutivos en términos de genes y sus frecuencias así como de individuos y sus genotipos. Trata de explicar, en términos cuantitativos y predictivos, el proceso de adaptación (Eguiarte 1999). La detección y cuantificación de la variación genética intraespecífica nos sirve para encontrar factores clave como el tamaño de la población, distancia geográfica entre poblaciones, tamaño y frecuencia de los disturbios ecológicos y tasa y patrones de dispersión. Entender estos patrones de variación genética y estructura de la población dentro de una especie es fundamental en estudios de ecología y evolución (Coyer et al. 1997).

La sexualidad permite la recombinación y resulta en presencia de radiación adaptativa, selección natural y entrecruzamiento, permitiendo la diversidad genotípica y la heterocigosis, que es un beneficio para los organismos que habitan ambientes irregulares (Edlund & Stroemer 1997).

Estudios de estructura poblacional el diatomeas planctónicas (Tabla 4.1) muestran que hay altos niveles de diversidad genética entre poblaciones alopátricas y alocrónicas de lo que es morfológicamente la misma especie, sugiriendo flujo génico restringido o deriva génica en poblaciones aisladas, o fuerte selección, o una combinación de estos factores. También se observa que puede haber alta diversidad genética, acompañada por

variación fisiológica, dentro de una misma población muestreada en un sitio en un mismo tiempo, lo que se ha interpretado como reflejo de un cambio continuo de dirección de la selección en un ambiente variable continuamente.

Tabla 4.1. Estudios anteriores de genética de poblaciones realizados en diatomeas. *especie marina, **especie de agua dulce.

Organismo	Marcador	Referencia
<i>Skeletonema costatum</i> *	isoenzimas	Gallager 1980, 1982
<i>Asterionella formosa</i> **	isoenzimas	Soudek y Robinson 1983
<i>Fragilaria capuchina</i> **	RAPD	Lewis et al. 1997
<i>Ditylum brightwellii</i> *	microsatélites	Rynearson & Armbrust 2000, 2004

5. Materiales y métodos

5.1 Muestreo

El muestreo se llevó a cabo el 8 de noviembre de 2002 en el Parque Ecológico de Xochimilco, México D.F. Se tomó una muestra de agua (aproximadamente 10 ml) de cada uno de los siguientes nueve sitios que fueron elegidos buscando que estuvieran alejados entre sí y que fueran diferentes en apariencia (Figura 5.1):

La muestra consistió principalmente del agua obtenida al exprimir las plantas encontradas en el sitio, de este modo, elegimos que la especie fuera bentónica o epifítica. De cada sitio muestreado se tomó la ubicación, la altitud y el procedimiento para tomar la muestra (Tabla 5.1). El promedio de altitud fue de 2244.9 ± 4 metros, por lo que podemos decir que no hay una variación importante en la altitud entre los sitios de muestreo.

Tabla 5.1 Ubicación y altitud de cada sitio donde fueron tomadas las muestras. Se menciona el sustrato de donde fue tomada la muestra

Sitio	Ubicación		Toma de la muestra
	N	W	
A	19° 17.597'	99° 05.810'	Exprimido de <i>Scirpus lacustris</i>
B	19° 17.558'	99° 05.805'	Exprimido de <i>Eichhornia cassipes</i>
C	19° 17.609'	99° 05.728'	Exprimido de <i>Scirpus lacustris</i>
D	19° 17.434'	99° 05.712'	Exprimido de <i>Eichhornia cassipes</i>
E	19° 17.154'	99° 05.742'	Exprimido de <i>Scirpus lacustris</i>
F	19° 17.149'	99° 05.744'	Exprimido de <i>Scirpus lacustris</i> y <i>Eichhornia cassipes</i>
G	19° 17.731'	99° 05.488'	Exprimido de <i>Typha latifolia</i>
H	19° 17.808'	99° 05.482'	Exprimido de <i>Scirpus lacustris</i>
I	19° 17.833'	99° 05.611'	Exprimido de <i>Scirpus lacustris</i>

Podemos observar que los sitios B, D y E forman parte del Lago Huetzalin. Los sitios A, C, H e I son pequeños y están sujetos a altas tasas de evaporación

Tepayotl (1999) define como zona de reserva aquella que presenta poca actividad humana (cerca al canal del bordo y alrededor del Lago Acitlalín) donde las condiciones más propicias para la distribución se acercan al óptimo, como zona intermedia al lago Huetzalin en su parte central y los pequeños cuerpos de agua que lo rodean y zona de condiciones cercanas al mínimo donde hay vegetación herbácea sin cuerpos de agua.

Tavera et al. (2000) encuentran especies de chlorococcales distribuidas en el lago Huetzalin y el canal del bordo; no encuentran chlorococcales en el lago Acitlalín y un

pequeño cuerpo de agua que está al noreste. De acuerdo sus mediciones de la temporada fría y seca en Noviembre, reportan que el pH de los cuerpos de agua oscila de 7.5 (en el vertedero) a 9.6 (en el canal El Bordo) y la conductividad va de 519 (en el vertedero) a 1335 mS cm⁻¹ (en el lago Acitlalin).

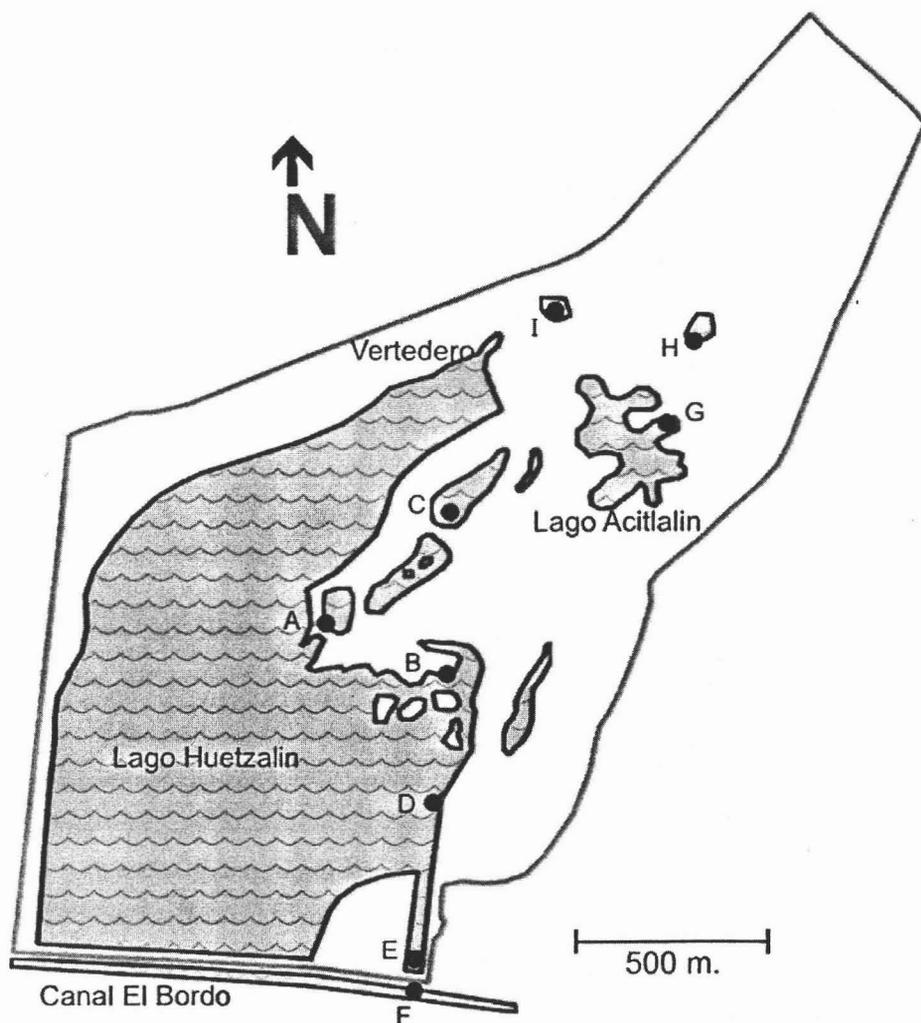


Figura 5.1. Mapa del Parque Ecológico de Xochimilco. Las letras (A-I) corresponden a los sitios de donde se tomaron las muestras de agua.

5.2 Cultivo

De cada una de estas nueve muestras de agua, se tomaron dieciséis alícuotas de aproximadamente 0.5 ml cada una. Se buscó el método de crecimiento adecuado para obtener monocultivos de diatomeas libres de bacterias y hongos.

Se sembraron las dieciséis alícuotas tomadas de cada muestra de agua, en una caja de Petri con el medio elegido (Apéndice 10.1) y al cabo de siete días se buscaron diatomeas para ser resembradas. Los cultivos se colocaron en una cámara de crecimiento con luz y temperatura controlada, siendo éstas: temperatura de 18°C con fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. La intensidad luminosa en la cámara de crecimiento fue de 0.15 $\mu\text{einsteins m}^{-2}\text{s}^{-1}$, proveniente de tubos fluorescentes. Se encontraron varias especies de diatomeas pero *Nitzschia frustulum* fue la especie encontrada en todos los sitios colectados y fue la que se resembró. Los cultivos presentaban bacterias y hongos, de modo que se probó agregar diferentes antibióticos (penicilina, estreptomycin y penicilina/estreptomycin) a diferentes concentraciones resultando que, en bajas y medias concentraciones (50 mg/ml y 75 mg/ml) no se inhibía el crecimiento de hongos ni bacterias, y en altas concentraciones (100 mg/ml) se inhibió el crecimiento de las bacterias y hongos; pero también de las diatomeas, por lo que se optó por buscar un método manual para quitar dichos microorganismos. El método que a continuación se describe (Welch 1948), permitió aislar una sola célula de diatomea, logrando erradicar la presencia de otros microorganismos no deseados, asegurándose de esta manera tener cultivos que provinieran de un mismo individuo. Todo el procedimiento se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, en condiciones estériles.

1. Elaborar una micropipeta a partir de una pipeta pasteur calentándola en el mechero y estirándola con unas pinzas de disección.
2. Tomar una gota de medio de cultivo líquido para diatomeas con la micropipeta y depositarla en la caja de Petri, donde se observen diatomeas.
3. Tomar esa gota de la muestra con diatomeas con la micropipeta y ponerla en el centro de la tapa de una caja de Petri invertida.

4. Colocar de 6 a 8 gotas de medio líquido alrededor de la muestra, marcando una gota como la número 1.
5. Usar una pipeta estéril y transferir en una gota las células de la muestra de interés a la gota número 1.
6. Repetir el procedimiento de la gota número 1 a la 2 en el movimiento de las manecillas del reloj.
7. Repetir hasta tener una sola célula en la gota.
8. De no ser posible tener una sola célula, sembrar una gota lo más pura posible en medio de cultivo con agar y esparcirla en la caja de Petri con un poco de medio de cultivo líquido.

Este procedimiento se repitió 18 veces a modo de asegurarnos de tener en cada caja a un individuo clonal. Después del procedimiento descrito en la metodología, algunos cultivos se perdieron por contaminación, mientras que en otros no se encontró a *Nitzschia frustulum*, quedando el siguiente número de individuos por sitio:

Tabla 5.2. Número de individuos de *Nitzschia frustulum* aislados de cada sitio muestreado.

Sitio	Número de individuos aislados
A	8
B	9
C	4
D	10
E	10
F	6
G	8
H	6
I	6
Total	67

Finalmente se crecieron los individuos por duplicado, almacenando una muestra en medio de cultivo con glicerol al 30% a -70° C, y utilizando la otra muestra para la extracción de ADN.

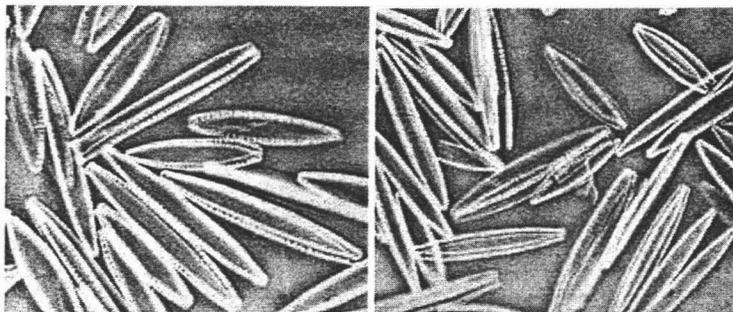
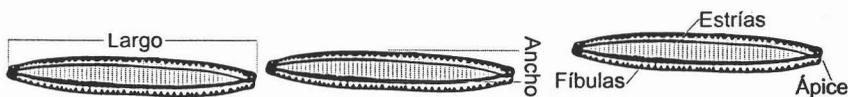


Figura 5.2. Fotografías de los cultivos de *Nitzschia frustulum* observados al microscopio a 1000X a las cinco semanas de crecimiento.

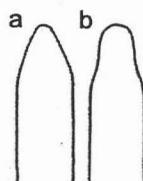
5.3 Caracterización Morfológica de *Nitzschia frustulum*

Se observó al microscopio una mezcla de cultivos de cada sitio a las cinco semanas de crecimiento. Para ello se recolectó el material directamente de las cajas de Petri. Se elaboraron dos preparaciones permanentes (Anexo 5.2) por sitio, que fueron observados en el microscopio óptico en contraste de fases a 1000X. De cada una de las preparaciones se tomaron datos morfológicos de 5 células, teniendo los siguientes datos de diez células por sitio:

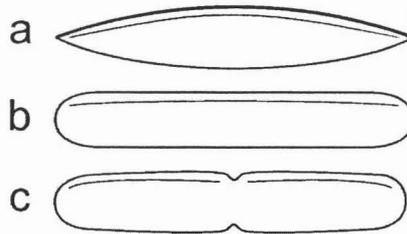
- Sitio de la muestra
- Largo en μm (de ápice a ápice)
- Ancho en μm (medido en el centro de la valva)
- Número de Fíbulas en 10 μm (en el centro de la valva)
- Número de Estrías en 10 μm (en el centro de la valva)



- Tipo de Ápice:
 - Tipo 1: cuneado (a)
 - Tipo 2: rostrado (b)



- Tipo de Valva:
 - Tipo 1: lanceolada (a)
 - Tipo 2: no lanceolada linear (b)
 - Tipo 3: no lanceolada linear acinturada (c)



Para asegurar que los datos de 10 células por sitio fueran representativos y válidos para los análisis estadísticos; en una prueba al azar se midieron 20 células observando el promedio acumulado. Con esta prueba resultó ser suficiente medir 6 células, posteriormente se decidió medir 10.

Se realizó una correlación del número de fibulas, número de estrías y proporción largo/ancho con el programa *Statistica* (StatSoft Inc. 1998).

Posteriormente los datos fueron transformados para corregir su heteroescasticidad, no normalidad y no aditividad (Zar 1999) Los datos discretos (número de fibulas en 10 μm y número de estrías en 10 μm) fueron transformados logarítmicamente, para la proporción largo/ancho se utilizó la transformación arcoseno (Zar 1999). Para buscar diferencias significativas de cada carácter entre los sitios de muestreo se realizó un análisis de varianza con el programa *Statistica* (StatSoft Inc. 1998), para los análisis de varianza que presentaron diferencias significativas, se realizó la prueba post-hoc que nos ayuda a encontrar que grupos son diferentes a otros. La prueba utilizada fue Duncan (Duncan's multiple range test).

Con el promedio de cada carácter se realizó un análisis de agrupación que nos ayuda a organizar los datos en estructuras significativas. El algoritmo utilizado es el de árbol de agrupación, el propósito de este algoritmo es juntar objetos (en este caso sitios) en grupos utilizando una medida de similitud o distancia dando como resultado un árbol jerárquico. En este estudio se utilizó el análisis de cluster de unión simple con distancias euclidianas.

5.4 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo utilizado por Lewis et al. (1997) modificándolo al añadir RNAsa antes de la precipitación con isopropanol (ver protocolo modificado en Apéndice 10.2). Para familiarizarse con los protocolos de laboratorio, se recomienda revisar a Karp et al. (1998).

Se realizaron las extracciones de ADN de los 67 cultivos obtenidos, tomando aproximadamente 0.1 g de células como lo indica el protocolo de extracción. Las muestras de ADN se corrieron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (Figura 5.3) con ADN del fago λ de concentración conocida para calcular la concentración aproximada de cada muestra, mediante la comparación de la intensidad de las bandas. Posteriormente se midieron las muestras en un fluorómetro. De las dos cuantificaciones, que fueron similares (20 ng/ μ l en promedio), se obtuvo un promedio a partir del cual se hicieron diluciones, quedando todas las muestras a la misma concentración. La pureza del ADN (ADN poco poca o nula presencia de proteínas) es óptima cuando la relación entre la A260/280 es \sim 1.8-2.0 (Sambrook et al. 1989), el 90% de nuestros valores se encontraron en este rango.



Figura 5.3. Gel de agarosa al 1% donde se observa la presencia de ADN de diferentes individuos (el nombre de la cepa se muestra arriba de la fotografía) de *Nitzschia frustulum*.

5.4.1 Microsatélites

Con el fin de buscar variación a nivel poblacional, se utilizaron los microsatélites desarrollados para *Ditylum brightwellii*, una diatomea Central (Ryneronson & Armbrust 2000), ya que en el momento en el que se inició este trabajo eran los únicos que se habían desarrollado para diatomeas. Estos ocho microsatélites se encontraron en el genoma nuclear, y se diseñaron los oligonucleótidos para uno de los locus (Dbr4). Las siete secuencias restantes fueron obtenidas del genbank, dichas secuencias incluyen el

microsatélite y la secuencia flanqueadora. De estas siete secuencias, sólo era posible diseñar oligonucleótidos para tres de ellas, ya que las otras cuatro las secuencias flanqueadoras no contenían suficiente ADN no repetitivo. Utilizando el programa Primer 3 (Rozen & Skaletsky 2000) se obtuvieron posibles oligonucleótidos y se revisaron manualmente. Se probaron los dos siguientes loci:

Tabla 5.3 Secuencia (Ryneronson & Armbrust 2000) y oligonucleótidos de microsatélites nucleares encontrados de *Ditylum brightwellii*.

Loci	Dbr1 (Ryneronson & Armbrust 2000)	Dbr4 (este trabajo)
Secuencia	(GA) ₈ AAGCAA(GA) ₆ T(GA) ₂ AA(GA) ₃ GTA(GA) ₁₈	(GT) ₉ (GC) ₅ AC(GT) ₃ CTGTTGTCT(GT) ₃ CTGTGC
# de acceso	AF263001	AF263004
Genebank		
Oligonucleótido forward	5'- CGCAATCTAACAAATGA -3'	5'- AATTTTCCCAAGGATAC -3'
Oligonucleótido reverse	5'- CGCATAGTAGGGCCACAGAT -3'	5'- CGCATAGTAGGGCCACAGAT -3'

Para estos oligonucleótidos se realizaron gradientes de temperatura de alineación ($48 \pm 5^\circ \text{C}$) y curvas de concentración de cloruro de magnesio (1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM) para determinar sus condiciones óptimas para su amplificación (Tabla 3.3).

Tabla 5.4 Concentraciones de los reactivos para la amplificación de los microsatélites Dbr1 y Dbr4.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	uL por reacción
ADN templado	10 ng/uL	50 ng	5
ddH ₂ O			4.25
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	50 mM	3 mM	1.5
Dinucleótidos trifosfatados (dNTP)	2.5 mM	0.15 mM	1.5
ADN polimerasa	5 U/uL	1.25 U	0.25
Glicerol	50%	5%	2.5
Oligonucleótidos (Primers)	2 mM cd/uno	0.3 mM	3.75 c/u
Buffer	10 X	1 X	2.5
TOTAL			25

A continuación se presenta el programa utilizado en el termociclador (Eppendorf modelo MasterCycler Gradient).

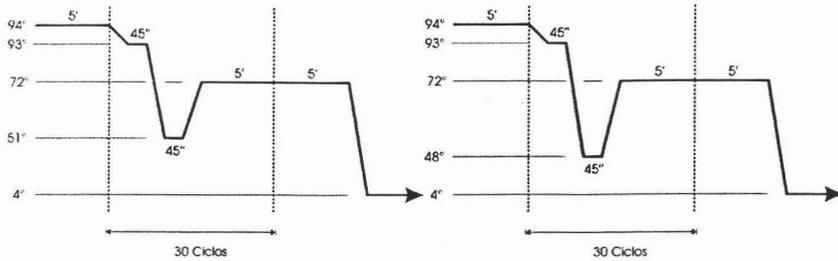


Figura 5.4. Programa utilizado en el termociclador Eppendorf MasterCycler Gradient. Izquierda, para el oligonucleótido Dbr1; derecha, para el oligonucleótido Dbr4.

El producto de PCR fue corrido en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X para confirmar la presencia del amplificado. Después se corrió en un gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, con el fin de obtener buena definición del tamaño.

La presencia del fragmento amplificado se observó en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Para conocer la exactitud del tamaño se corrieron los fragmentos amplificados en geles de acrilamida al 6%.

5.4.2 Oligonucleótidos de cloroplasto

Posteriormente se probaron los siguientes oligonucleótidos universales de cloroplasto (Demesure et al. 1995).

Tabla 5.5. Oligonucleótidos universales de cloroplasto. El nombre indica la región conservada a la que se adhiere el oligonucleótido (Demesure et al. 1995).

NOMBRE	Oligonucleótido 1	Oligonucleótido 2
<i>trnC</i> [tRNA-Cys (GCA)] - <i>trnD</i> [tRNA-Asp (GUC)]	5'- CCAGTTCAAATCTGGGTGTC -3'	5'- GGGATTGTAGTTCAATTGGT -3'
<i>trnM</i> [tRNA-Met (CAU)] - <i>rbcl</i> [RuBisCO subunidad grande]	5'- TGCTTTCATACGGCGGAGT -3'	5'- GCTTTAGTCTCTGTTGTGG -3'
<i>trnD</i> [tRNA-Asp (GUC)] - <i>trnT</i> [tRNA-Thr (GGU)]	5'- ACCAATTGAACTACAATCCC -3'	5'- GGGATTGTAGTTCAATTGGT -3'
<i>trnS</i> [tRNA-Ser (UGA)] - <i>trnM</i> [tRNA-Met (CAU)]	5'- GAGAGAGAGGGATTCTGAAC -3'	5'- CATAACCTTGAGGTCACGGG -3'

Para estos oligonucleótidos se realizaron gradientes de temperatura de alineación ($55 \pm 6^\circ \text{C}$) y curvas de concentración de cloruro de magnesio (1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 mM) para determinar las condiciones óptimas para su amplificación, quedando lo siguiente:

Tabla 5.6. Concentraciones de los reactivos para la amplificación de las regiones intergénicas de cloroplasto.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	uL por reacción
ADN templado	10 ng/uL	50 ng	5
ddH ₂ O			5.6
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	50 mM	2.5 mM	1
Dinucleótidos trifosfatados (dNTP)	2.5 mM	0.15 mM	1.2
ADN polimerasa	5 U/uL	1 U	0.2
Glicerol	50%	5%	2
Oligonucleótidos (Primers)	2 mM cd/uno	0.15 mM	1.5 c/u
Buffer	10 X	1 X	2
TOTAL			20

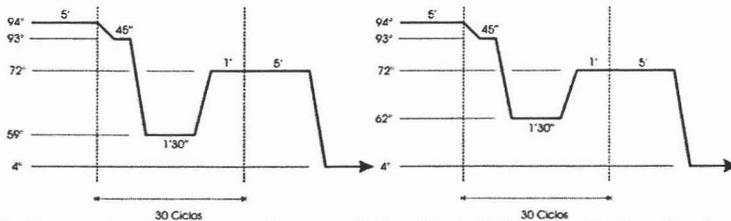


Figura 5.5. Programa utilizado en el termociclador Eppendorf MasterCycler. Izquierda, para el oligonucleótido *trnM - rbcL*; derecha, para el oligonucleótido *trnS - trnM*.

El producto de PCR fue corrido en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X para confirmar la presencia del amplificado. Después se corrió en un gel de poliacrilamida al 6%, con el fin de obtener buena definición del tamaño.

La presencia del fragmento amplificado se observó en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. Para conocer la exactitud del tamaño se corrieron los fragmentos amplificados en geles de acrilamida al 6%.

5.4.3 Región parcial de la subunidad grande de rADN

Se probaron dos oligonucleótidos universales que amplificaron el segmento 9 de la región parcial de la subunidad grande de rADN (Hillis & Dixon 1991).

Oligonucleótido forward (28 y) 5' CTAACCAGGATTCCCTCAGTAACGGCGAGT 3'
 Oligonucleótido reverse (28 z) 5' ACACTCCTTGGTCGGTGTTC AAGAC 3'

Estos oligonucleótidos se utilizaron de acuerdo a lo descrito por Resendiz (2004). Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 5.7.

Tabla 5.7 Concentraciones de los reactivos para la amplificación de la región parcial de la subunidad grande de rADN.

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración stock</i>	<i>Concentración final</i>	<i>uL por reacción</i>
ADN templado	10 ng/uL	150 ng	15
ddH ₂ O			14.75
Cloruro de Magnesio (MgCl ₂)	25 mM	2.5 mM	5
Dinucleótidos trifosfatados (dNTP)	25 mM	4 mM	8
ADN polimerasa	5 U/uL	1.25 U	0.25
Oligonucleótidos (Primers)	2 mM cd/uno	0.08 mM	1 c/u
Buffer	10 X	1 X	5
TOTAL			50

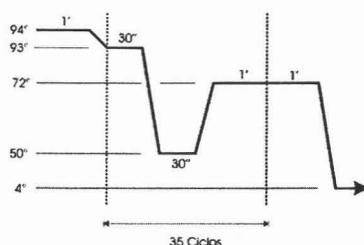


Figura 5.6. Programa utilizado en el termociclador Eppendorf MasterCycler para la amplificación de un segmento de rADN.

Se corrieron 5 µl del producto de PCR en un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, para confirmar la presencia del amplificado. Se purificó dicho producto con el kit de Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen), haciendo después la reacción de secuenciación que se detalla en la tabla 5.8 (Sanger et al. 1977) con el kit de Big Dye V.2 (Applied Biosystems) Para ello se requiere de un ADN templado de cadena sencilla, un oligonucleótido, taq polimerasa, deoxirribonucleótidos trifosfatados y dideoxirribonucleótidos trifosfatados terminadores marcados con fluorescencia (el color corresponde a cada nucleótido). Al final de la reacción, cada uno de los nucleótidos está marcado con fluorescencia de diferente color. La muestra sube por un capilar que pasa a través de un láser que detecta la fluorescencia en cada posición.

Tabla 5.8. Cantidades utilizadas de reactivos para la reacción de secuenciación de la región parcial de la subunidad grande de rADN.

Reactivo	1 reacción
Big dye	2 µl
Buffer 5X	2 µl
Producto de PCR purificado	4 µl
Oligonucleótido (2mM)	0,5 µl
ddH ₂ O	1,5 µl
TOTAL	10 µl

La reacción se llevó a cabo en un termociclador PTC 100 MJ Research con el siguiente programa: 25 ciclos de 96° C por 10 seg., 58° C por 5 seg., 60° C por 4 mins.

El producto de la reacción de secuenciación se purificó con columnas CentriSep. La terminación de cada fragmento se detectó al correr las muestras en un Secuenciador automático de capilar modelo 3100 de Applied Biosystems.

5.5 Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas con el programa Sequencher 4.2 (Arbor 2004) y puede consultarse en <http://jubilo.ca/ediaz>. Del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se obtuvieron las secuencias de la misma región para especies de la familia Bacillariaceae que no habían sido utilizadas en su conjunto en ningún estudio (Tabla 5.9 y 5.10), se alinearon con el programa Clustal X (Thompson et al. 1997) y la alineación se revisó manualmente en el programa Bioedit (Hall 1999).

Tabla 5.9. Lista de cepas de la familia Bacillariaceae (una secuencia por especie) descritas en Lundholm et al. 2002 utilizadas en este estudio.

Especie	Cepa	Localidad	No. de Acceso Genebank
<i>Bacillaria paxillifer</i>	Tenerife7	Tenerife, Islas Canarias	AF417678
<i>Cylindrotheca closterium</i>	K-520	Kattegat, Dinamarca	AF417666
<i>Fragilariopsis curta</i>	1-A	Mar de Ross, Antártida	AF417659
<i>Nitzschia alba</i>	M1354	Bretaña, Francia	AF417670
<i>Nitzschia cf. pusilla</i>	CCMP 560	Woods Hole, Massachusetts, EUA	AF417663
<i>Nitzschia cf. vitrea</i>	UTEX2033	New Haven, Connecticut, EUA	AF417669
<i>Nitzschia communis</i>	M1762	Colonia, Alemania	AF417661
<i>Nitzschia frustulum</i>	UTEX2042	La Jolla, California, EUA	AF417671
<i>Nitzschia navis-varingica</i>	VSP974-1	Do Son, vietnam	AF417576
<i>Nitzschia pellucida</i>	99NG1-16	Isla Ishigaki, Japón	AF417672
<i>Phaeodactylum tricoratum</i>	CCMP1327	Long Island, Nueva York, EUA	AF417681

Tabla 5.10. Lista de cepas de la familia Bacillariaceae con más de una secuencia por especie, descritas por varios autores, obtenidas del Genebank.

Especie	Clave	Cepa	Localidad	Fuente	No. de Acceso Genebank
<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	1	PAU41393	Bahía de Monterey, EUA	Scholin et al. 1994	U41393
		PAU40850	Bahía de Monterey, EUA	Scholin et al. 1994	U40850
	2	PLYS154B	Escocia, Reino Unido	Fehling et al. 2004	AY452530
		PLYS119A	Escocia, Reino Unido	Fehling et al. 2004	AY452529
		NWFSC 003	Bahía Sequim, EUA	Stehr et al. 2002	AF440768
		OM1	Aveiro, Portugal	Lundholm et al. 2002	AF417651
	PAU92260	North Island, Nueva Zelanda	Rhodes et al. no publicado	U92260	
<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	1	20-02	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2004	AY519348
	2	21-02	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2004	AY519350
	3	27-02	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2004	AY519353
	4	SZN-B18	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2002	AF416748
	5	SZN-B19	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2002	AF416749
	6	SZN-B33	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2002	AF416758
	7	PDU41391	Santa Cruz, Washington, EUA	Scholin et al. 1994	U41391
	8	NWFSC 002	Bahía Sequim, Washington, EUA	Stehr et al. 2002	AF440767
	9	Laesoe5	Kattegat, Dinamarca	Lundholm et al. 2003	AY257849
		10	18-02	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2004
24-02			Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2004	AY519351
	26-02	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2004	AY519352	
<i>Pseudo-nitzschia galaxiae</i>	1	Sydney 4	Sydney, Australia	Lundholm et al. 2002	AY081137
		SZN-B54	Golfo de Nápoles, Italia	Cerino et al. 2004	AY544786
		SZN-B55	Golfo de Nápoles, Italia	Cerino et al. 2004	AY544791
		SZN-B56	Golfo de Nápoles, Italia	Cerino et al. 2004	AY544790
	3	Mex 23	Cerca de Tuxpan, México	Lundholm et al. 2002	AY081136
		SZN-B57	Golfo de Nápoles, Italia	Cerino et al. 2004	AY544789
		SZN-B58	Golfo de Nápoles, Italia	Cerino et al. 2004	AY544788
		SZN-P1	Golfo de Nápoles, Italia	Cerino et al. 2004	AY544787
		SZN-P5	Golfo de Nápoles, Italia	Cerino et al. 2004	AY544792
<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i>	1	SZN-B17	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2002	AF416747
	2	SZN-B26	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2002	AF416752
	3	SZN-B30	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2002	AF416755
	4	SZN-B34	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2002	AF416759
	5	SZN-B35	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2002	AF416760
	6	SZN-B109	Golfo de Nápoles, Italia	Cerino et al. 2004	AY550126
	7	SZN-B112	Golfo de Nápoles, Italia	Cerino et al. 2004	AY550127
	8	SZN-B111	Golfo de Nápoles, Italia	Cerino et al. 2004	AY550128
		SZN-B113	Golfo de Nápoles, Italia	Cerino et al. 2004	AY550129
	9	NWFSC 011	Penn Cove, Washington, EUA	Stehr et al. 2002	AF440772
	10	NWFSC 047	Kalaloch, Washington, EUA	Stehr et al. 2002	AF440774
	11	NWFSC 006	Bahía Sequim, Washington, EUA	Stehr et al. 2002	AF440771
	12	NWFSC 040	La Push, Washington, EUA	Stehr et al. 2002	AF440773
	13	P-11	Hobart, Tasmania, Australia	Lundholm et al. 2002	AF417640
14	Hobart5	Costa Nova, Portugal	Lundholm et al. 2002	AY257851	

Tabla 5.10. (Continuación) Lista de cepas de la familia Bacillariaceae con más de una secuencia por especie, descritas por varios autores, obtenidas del Genebank.

Especie	Clave	Cepa	Localidad	Fuente	No. de Acceso Genebank
<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>	1	SZN-B27	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2002	AF416753
	2	SZN-B29	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2002	AF416754
	3	SZN-B31	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2002	AF416756
	4	SZN-B32	Golfo de Nápoles, Italia	Orsini et al. 2002	AF416757
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	5	KoreaA	Chinhae Bay, Corea	Lundholm et al. 2002	AF417654
	1	NPU41392	Santa Cruz, California, EUA	Scholin et al. 1994	U41392
	2	NPU41262	Santa Cruz, California, EUA	Scholin et al. 1994	U41262
	3	KBH2	Bahía de Khan Hoa, Vietnam	Lundholm et al. 2002	AF417650
	4	NWFSC 32	Kalaloch, Washington, EUA	Stehr et al. 2002	AF440776
		NWFSC 004	Bahía Sequim, Washington, EUA	Stehr et al. 2002	AF440769
		NWFSC 028	Point Whitney, Washington, EUA	Stehr et al. 2002	AF440775
		P-24	Costa Nova, Portugal	Lundholm et al. 2002	AF417648

Se calcularon algunos parámetros (que a continuación se describen) de las secuencias en el programa DnaSP versión 4.0 (Rozas et al. 2003). Se calcularon índices relacionados con la recombinación para el grupo de secuencias de *Nitzschia frustulum* de Xochimilco, *Pseudo-nitzschia delicatissima* y *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* ya que los otros grupos de secuencias no permitieron el análisis dada su baja diversidad nucleotídica.

Diversidad Haplotípica (Hd)

Es un estimado imparcial de la diversidad genética (Nei 1987), está dado por

$$Hd = \hat{h} = n(1 - \sum \hat{x}_i^2) / (n-1)$$

donde \hat{x}_i es la frecuencia del haplotipo y n es el tamaño de la muestra.

Diversidad Nucleotídica (Pi)

La diversidad nucleotídica (Pi) es el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias. La diversidad nucleotídica de Jukes y Cantor ($Pi(JC)$) es el número promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre dos secuencias con una corrección que se realiza en cada comparación pareada, obteniendo el estimado como el promedio de los valores de todas las comparaciones.

$$\hat{\pi} = \sum_{i < j} \pi_{ij} / n_c$$

Donde n es el número de secuencias examinadas, n_c es el número total de comparaciones de la secuencias $[n(n-1)/2]$ (Nei 1987).

Theta

Theta por sitio de Eta (η), está dado por:

$$\hat{L} = p_n / A$$

donde $p_n = s_n / m_T$ siendo s_n y m_T el número de sitios polimórficos por secuencia y el total de nucleótidos examinados respectivamente. $A = 1 + 1/2 + \dots + (n-1)^{-1}$ siendo n el número de secuencias examinadas. Cabe mencionar que p_n es dependiente del tamaño de la muestra. Por lo tanto, es posible estimar que $\theta = 4Ne\mu$ para un organismo diploide donde Ne es el tamaño efectivo de la población y μ es la tasa de mutación por sitio por generación (Nei 1987).

Estimado de R, por gen

R denota el número total de eventos de recombinación en la historia de la muestra y está dado por:

$$R = \sum_{i=1}^m Ri$$

donde Ri es el número de eventos de recombinación en la historia del segmento i . Por lo tanto, Sabemos que $R = 4Ner$ donde Ne es el tamaño efectivo de la población y r es la tasa de recombinación por secuencia (por gen) (Hudson 1987). Por lo tanto se puede inferir que si la tasa de recombinación es cero, entonces $R=0$, y si la tasa de recombinación es infinita $R=\infty$.

Estimado de R, entre sitios adyacentes

Se calcula de la siguiente manera:

$$R(\text{entre sitios adyacentes}) = R(\text{por gen}) / D$$

donde D es la distancia nucleotídica promedio de la región analizada (Hudson 1987).

Número mínimo de eventos de recombinación, R_m

Este parámetro indica el número mínimo de eventos de recombinación en la historia de la muestra. R_m se obtiene utilizando la prueba de los cuatro gametos (Hudson & Kaplan, 1985).

También se calcularon el número mínimo de eventos de recombinación en la historia de la muestra (R_m). Este parámetro se obtiene utilizando la prueba de los cuatro gametos (Hudson & Kaplan 1985).

Matriz de particiones

Se obtuvo una matriz de particiones con el programa Partimatrix. La matriz de partición es una herramienta gráfica para análisis comparativo de secuencias alineadas. La matriz es generada al determinar la consistencia de los sitios parsimoniosamente informativos en un grupo de secuencias alineadas con las particiones binarias inferidas a partir de las secuencias, nos permite identificar visualmente las diferencias en la historia evolutiva entre diferentes regiones (Jakobsen et al. 1997).

La matriz de particiones se genera al determinar la consistencia de los sitios parsimoniosamente informativos en un grupo de secuencias alineadas con las particiones binarias inferidas a partir de las secuencias. La utilizamos en este estudio ya que nos permite identificar visualmente las diferencias en la historia evolutiva entre diferentes regiones. Cada partición es equivalente a una posible rama en una filogenia.

5.5.1 Inferencia filogenética

Las relaciones filogenéticas fueron inferidas utilizando el programa MEGA versión 2.1 (Kumar et al. 1993). Para los análisis de Neighbor joining (NJ) y de Evolución Mínima (ME) se utilizó el modelo de dos parámetros de Kimura, que es el que comunmente se utiliza (Lundholm et al. 2002). Este modelo incorpora diferentes tasas de mutaciones en transiciones y transversiones (Nei 1987).

Para los tres análisis (NJ, ME y MP) el soporte de bootstrap fue calculado usando 1000 réplicas.

Métodos de parsimonia

Los métodos de parsimonia fueron desarrollados originalmente para caracteres morfológicos. Si no existen substituciones reversas o no paralelas (no homoplasia) en cada sitio nucleotídico y el número de nucleótidos examinados (n) es muy grande, se espera que los métodos de máxima parsimonia (MP) produzcan el árbol correcto. En la práctica, comúnmente las secuencias nucleotídicas son objeto de substituciones reversas o no paralelas y n es entonces pequeña. En este caso, los métodos de MP tienden a dar topologías incorrectas (Nei & Kumar 2000).

En la búsqueda de árboles de MP, los sitios nucleotídicos que tienen los mismos nucleótidos para todos los taxa (sitios invariables) se eliminan del análisis y solo los sitios variables son utilizados. De cualquier modo, no todos los sitios variables son útiles para encontrar la topología de un árbol de MP, lo son los sitios que contienen por lo menos dos tipos de nucleótidos (o aminoácidos), con al menos dos de ellos ocurriendo en una frecuencia mínima de dos (Graur & Li 2000).

Para tener información sobre la filogenia, se pueden calcular los siguientes índices. El índice de consistencia (CI) es una medida de la cantidad de homoplasia que se observa en un conjunto de caracteres en un árbol. Se define como la suma del número mínimo de cambios en el carácter del árbol dividido por el número de cambios observados. Si no hay homoplasia, el resultado de dicha división será igual a uno. El índice de retención (RI) refleja la cantidad de sinapomorfías (carácter derivado compartido) y se define como la relación entre la longitud observada del árbol y la longitud mínima posible. El valor de RI es alto cuando la mayoría de los cambios están en las ramas basales y es bajo cuando la mayoría de los cambios están en las ramas terminales. El índice de consistencia reescalado (RCI) se utiliza para evaluar la congruencia y ajuste de los caracteres en un árbol. Se calcula multiplicando el índice de consistencia por el índice de retención. Un alto valor indica que los caracteres en el conjunto de datos son más congruentes entre sí y el árbol generado. (Felsenstein 2004).

Métodos de distancia: Evolución mínima y Unión de Vecinos (Neighbor joining)

En los métodos de distancia, las distancias evolutivas son calculadas para todos los pares de taxa y un árbol filogenético es construido considerando las relaciones entre estos valores de distancias. Está basado en el principio de evolución mínima, el cuál consiste en calcular la suma (S) de los estimados de longitud de las ramas para todas las topologías plausibles, y la topología que tiene el menor valor de S es el mejor árbol. El método de unión de vecinos no examina todas las topologías posibles; pero en cada fase de la agrupación de un taxón se utiliza el principio de mínima evolución. Uno de los conceptos importantes del método de NJ son los vecinos, que se definen como dos taxas que están conectados por un solo nodo en un árbol sin raíz.

Existen diferentes medidas de distancia (d) para estimar el número de sustituciones nucleotídicas o de aminoácidos considerando diferentes modelos matemáticos. En general una medida de distancia basada en un modelo matemático complejo requiere estimar muchos parámetros y esto incrementa la varianza del estimado d . En general, la exactitud de un árbol inferido depende de la menos dos factores: la relación lineal de la distancia usada con el número de sustituciones y el error estándar del coeficiente de variación del estimado de la medida de distancia (Nei & Kumar 2000).

Pruebas estadísticas

Para optimizar los árboles filogenéticos lo mejor es realizar simulaciones en la computadora. Cuando el número de secuencias es pequeño, se pueden analizar todas las topologías posibles. La prueba generalmente utilizada para la confiabilidad de una inferencia filogenética es la de bootstrap y consta de lo siguiente: primero se construye un árbol de todos los datos utilizando un método para construcción de árboles (NJ, MP, ME). En el remuestreo para bootstrap, n sitios nucleotídicos se eligen al azar con reemplazo del set original de secuencias. Entonces, algunos sitios serán elegidos dos o más veces, mientras que otros sitios no serán elegidos. Estos sitios muestreados al azar ahora constituyen un nuevo grupo de secuencias de DNA y este grupo es usado para construir otro árbol mediante el mismo método. La topología de este árbol se compara con la topología el árbol original. A cualquier rama interna del árbol original que da la misma separación de secuencias como en el árbol de bootstrap se le da un valor de 1

(valor de identidad), mientras que otras ramas interiores tienen un valor de 0. Este proceso se repite cientos de veces y se calcula el porcentaje de las veces que la rama interior del árbol recibió un valor de 1. Dicho porcentaje es llamado el valor de bootstrap. En general, si este valor es de 95% a 99% o más dependiendo de la exactitud deseada se considera significativamente positiva (Nei & Kumar 2000).

Reloj molecular

La tasa constante de sustituciones neutras predice que si el número de diferencias nucleotídicas entre dos especies se grafica contra el tiempo desde la divergencia de un ancestro común, el resultado debe ser una recta con una pendiente igual a μ . Esto es, que la evolución procede de acuerdo a un reloj molecular que avanza a la tasa de μ . La tasa constante de cambio de una secuencia de DNA o de proteína es consecuencia de la mutación al azar y de la deriva génica de variantes moleculares no seleccionadas (Griffiths et al. 2002).

La hipótesis del reloj molecular considera que la tasa de sustitución de aminoácidos o nucleotídica es aproximadamente constante a lo largo del tiempo evolutivo. Estrictamente hablando, ningún gen o proteína evoluciona a una tasa constante a lo largo del tiempo evolutivo, porque la función de un gen probablemente cambia a lo largo del tiempo particularmente cuando el número de genes en el genoma incrementa desde los organismos sencillos hasta los complejos o cuando las condiciones ambientales cambian. También los mecanismos de daño y reparación del DNA pueden variar entre los diferentes grupos de organismos. Por estas razones es útil tratar de encontrar los genes que muestren un reloj molecular universal; pero de cualquier modo un reloj molecular no requiere ser universal. Si se trabaja con cierto grupo de organismos, puede ser muy útil estudiar las relaciones filogenéticas entre ellos y estimar los tiempos de divergencia. Es por ello que muchos evolucionistas están interesados en los relojes moleculares (Nei & Kumar 2000). Se desarrolló una prueba de Tajima (Relative rate test) cuyo objetivo es probar la hipótesis de reloj molecular para secuencias de nucleótidos, observando la tasa de sustitución nucleotídica. La hipótesis de reloj molecular puede probarse mediante el estadístico χ^2 con un grado de libertad (Nei & Kumar 2000).

No debemos olvidar que la tasa de sustitución varía entre phylas y reinos es diferente. El tiempo generacional o longitud de una generación de un organismo es el tiempo promedio entre dos fases idénticas y sucesivas del ciclo de vida de un organismo. Por ejemplo, el tiempo generacional de un animal grande puede definirse como el tiempo promedio en el que un individuo produce otro individuo (Fu 2001). Este tiempo es variable y afecta la tasa de sustitución, por lo que debemos ser cuidadosos al comparar con organismos con historias de vida muy diferentes.

6. Resultados

6.1 Morfología de *Nitzschia frustulum*

Para *Nitzschia frustulum* del Parque Ecológico de Xochimilco encontramos lo siguiente: largo de las valvas: 9 a 43 μm , ancho de las valvas: 3.3 a 5.3 μm , densidad de estrías: 17 a 27 en 10 μm , densidad de fibulas: 8 a 15 en 10 μm .

Se buscó correlación entre los parámetros observados encontrando la siguiente matriz de correlación:

Tabla 6.1. Matriz de correlación de datos morfológicos. Los valores en *itálicas* presentan un valor de $P < 0.05$ por lo tanto están correlacionados significativamente ($N = 90$).

	Fibulas	Estrías
Estrías	0.11	
Largo/Ancho	-0.20	<i>-0.33</i>

De las 3 combinaciones de caracteres, podemos observar una correlación negativa entre el largo/ancho y el número de estrías (con $P < 0.05$).

A continuación se observan fotografías de individuos de cada sitio (Figura 6.1, página 49).

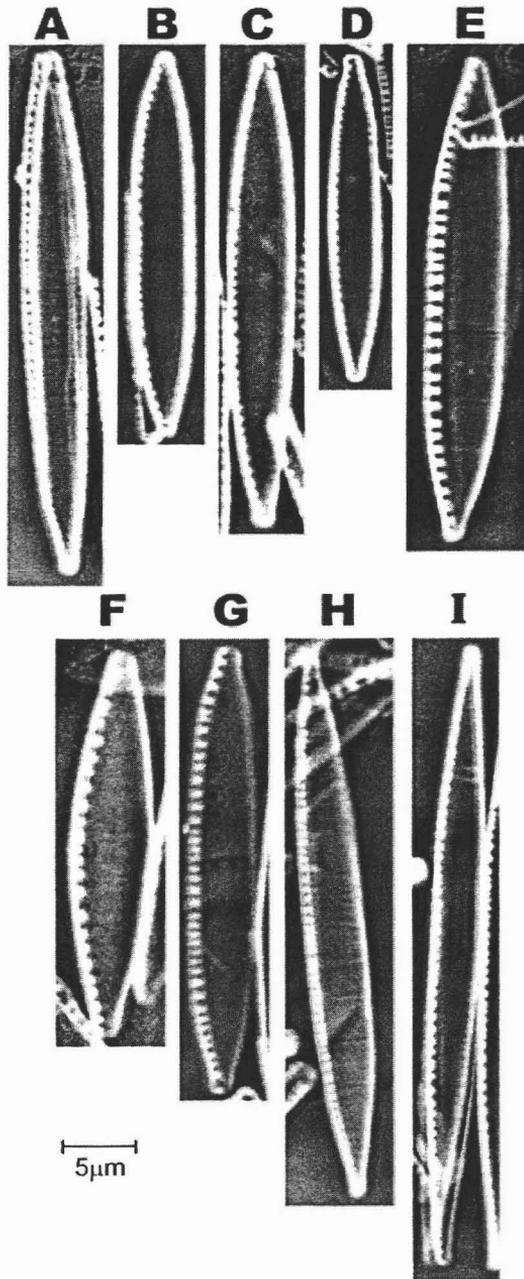


Figura 6.1. Individuos promedio de *Nitzschia frustulum* de cada sitio. La letra corresponde al sitio donde fue colectado.

A continuación se presentan los datos morfológicos obtenidos:

6.1.1 Fíbulas

Se realizó una prueba de ANOVA, encontrando que hay un efecto significativo de la localidad sobre el número de fíbulas ($F_{8,81}=2.15, P<0.05$).

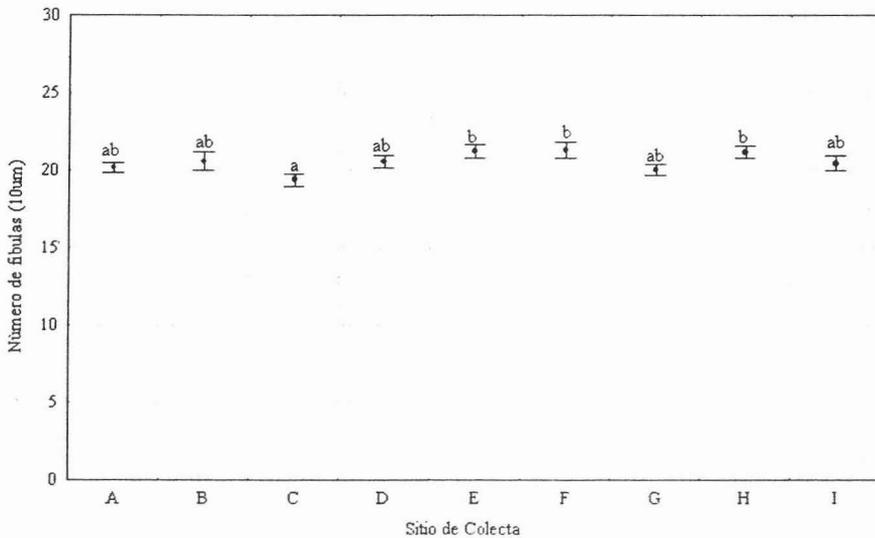


Figura 6.2. Número de fíbulas promedio en 10 µm (\pm error estándar) encontradas por sitio de colecta. Letras diferentes muestran diferencia significativa con $P<0.05$ (Prueba de Duncan's).

El sitio C, que fue el que presentó menor número de fíbulas, corresponde a un cuerpo de agua separado de la entrada del agua tratada (vertedero). Los sitios E y F, que presentaron mayor número de fíbulas, son lejanos al vertedero, están cercanos al canal de El Bordo. Los otros no difirieron significativamente.

6.1.2 Estrías

Se realizó una prueba de ANOVA, encontrando que hay un efecto significativo de la localidad sobre el número de estrías ($F_{8,81}=5.84, P<0.001$).

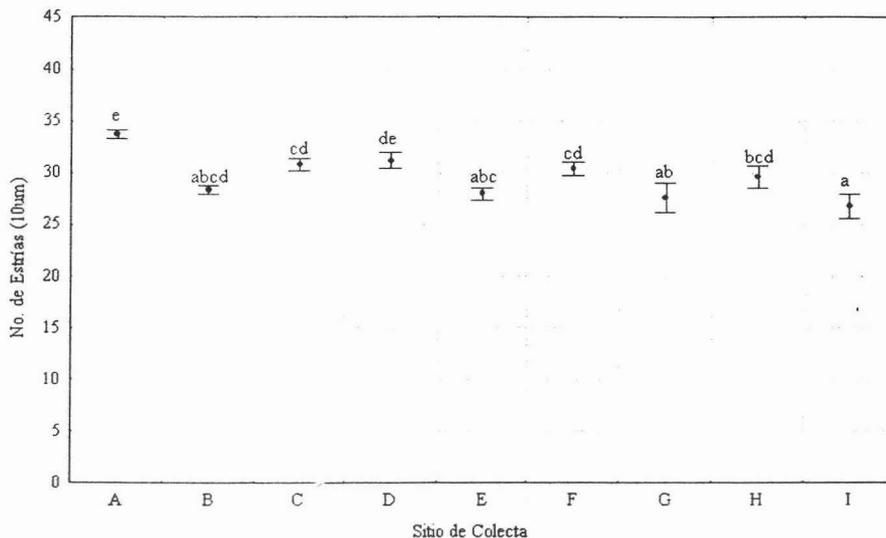


Figura 6.3. Número de estrías promedio en 10 µm (\pm error estándar) encontradas por sitio de colecta. Letras diferentes muestran diferencia significativa con $P < 0.05$.

El sitio A, que fue el que presentó mayor número de estrías, es el más cercano al vertedero, pero es cuerpo de agua separado del Lago Huetzalín. El sitio I, que fue el que presentó menor número de estrías, es uno de los cuerpos de agua alejados del vertedero. Para los demás sitios no se observa ningún gradiente, de cercanía o lejanía, de acuerdo al vertedero.

6.1.3 Relación largo-ancho

Se realizó una prueba de ANOVA, encontrando que hay un efecto significativo de la localidad sobre la relación largo/ancho ($F_{8,81}=29.22, P<0.001$).

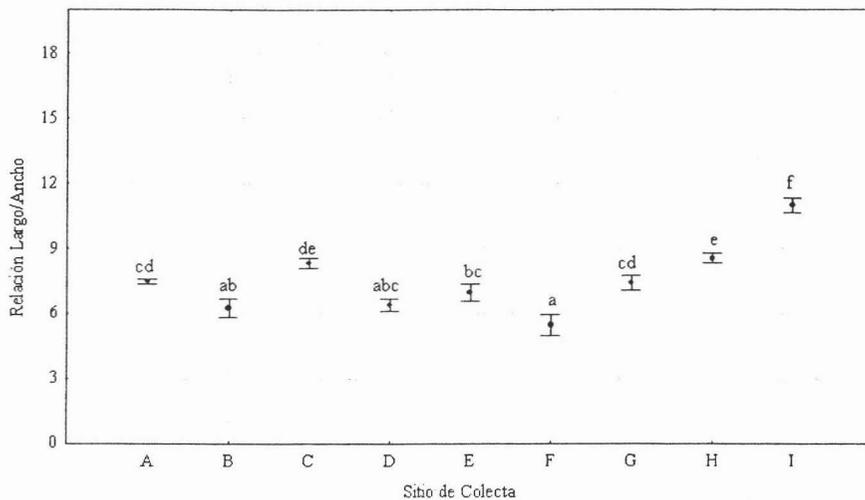


Figura 6.4. Relación promedio largo/ancho (\pm error estándar) encontradas por sitio de colecta. Letras diferentes muestran diferencia significativa con $P < 0.05$.

Tenemos que el sitio que presentó una relación largo/ancho menor, es decir que las diatomeas eran menos delgadas, fue el sitio F que es el canal de El Bordo, mientras que el sitio I fue el que presentó una relación largo/ancho mayor, es decir, que las diatomeas fueron más delgadas.

6.1.4 Ápice

Tabla 6.2. Frecuencias de tipos de ápice encontradas por sitio. Tipo 1: cuneado, Tipo 2: rostrado.

<i>Sitio</i>	<i>Tipo 1</i>	<i>Tipo 2</i>
A	0.8	0.2
B	0.6	0.4
C	0.9	0.1
D	1.0	0.0
E	0.8	0.2
F	0.9	0.1
G	1.0	0.0
H	0.7	0.3
I	0.7	0.3
Promedio	0.822	0.178
Error estándar	0.0465	0.0465

Encontramos que el tipo de ápice acuminado es mucho más frecuente que el acuminado.

6.1.5 Valva

Tabla 6.3. Frecuencias de tipos de valva encontradas por sitio. Tipo 1: no lanceolada linear acinturada, Tipo 2: no lanceolada linear, Tipo 3: lanceolada.

Sitio	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
A	0.3	0.5	0.2
B	0.4	0.2	0.4
C	0.4	0.3	0.3
D	0.3	0.4	0.3
E	0.1	0.4	0.5
F	0.2	0.3	0.5
G	0.5	0.4	0.1
H	0.6	0.2	0.2
I	0.0	0.4	0.6
Promedio	0.311	0.344	0.344
Error estándar	0.063	0.034	0.056

6.1.6 Análisis de agrupación

El análisis de agrupación de unión simple con distancias euclidianas dio como resultado un dendograma de sitios (Figura 6.5).

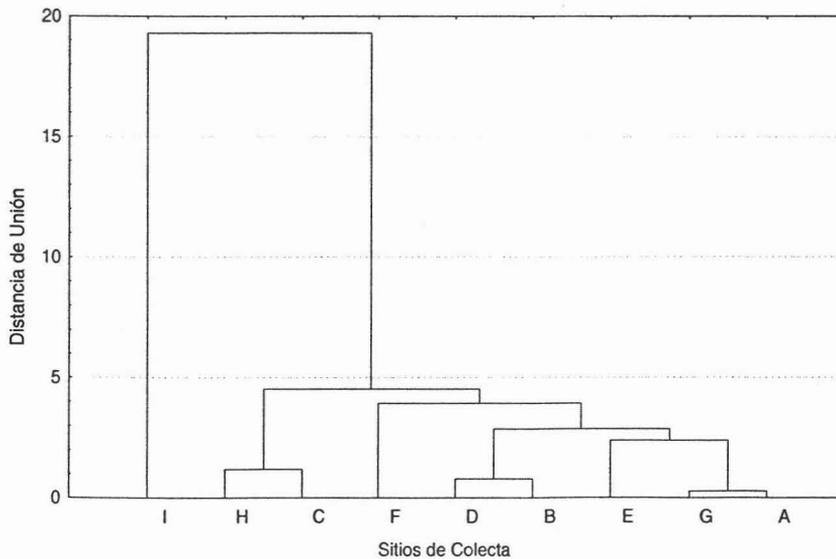


Figura 6.5. Dendograma tomando todos los datos morfológicos de *Nitzschia frustulum* (No. de Fíbulas en 10 μ m, No. de Estrías en 10 μ m, Relación Largo-Ancho, Tipo de Ápice, Tipo de Valva). La letra indica el sitio de colecta.

En el árbol obtenido no se observa ningún patrón particular sino algo más complejo relacionado con la salinidad, el estancamiento del agua, la tasa de evaporación, el sustrato y el movimiento de las aves.

6.2 Estructura genética

6.2.1 Microsatélites

De los 67 individuos de *Nitzschia frustulum* analizados, todos fueron monomórficos para ambos marcadores. Para el locus Dbr1 ampliamos un fragmento de 150 pb, para el locus Dbr4, el tamaño fue de 200 pb.

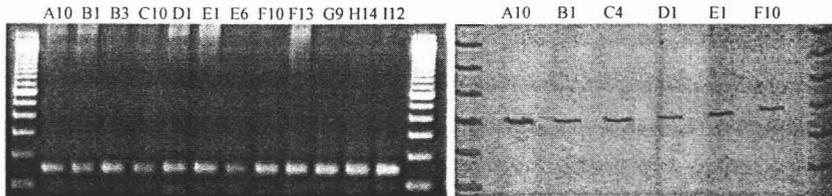


Figura 6.6. Fragmento amplificado por PCR del microsatélite Dbr1 de varios individuos de *Nitzschia frustulum*. *Izq.* Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, marcador de 100 pb. *Der.* Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, marcador de 10pb. El tamaño del fragmento es de 150 pb. El nombre de la cepa se muestra arriba de la fotografía.

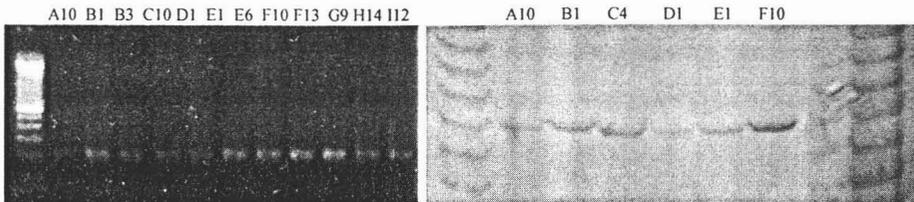


Figura 6.7. Fragmento amplificado por PCR del microsatélite Dbr4 de varios individuos de *Nitzschia frustulum*. *Izq.* Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, marcador de 100 pb. *Der.* Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, marcador de 10pb. El tamaño del fragmento es de 200 pb. El nombre de la cepa se muestra arriba de la fotografía.

6.2.2 Oligonucleótidos de cloroplasto

De los 67 individuos de *Nitzschia frustulum* analizados, todos fueron monomórficos para los oligonucleótidos *trnM-rbcL* y *trnS-trnM* y no se observó presencia de un fragmento con los oligonucleótidos *trnC-trnD* y *trnD-trnT*. Los oligonucleótidos *trnC-trnD* y *trnD-trnT* no amplificaron ningún fragmento.

A continuación se presenta una tabla (6.4) de los resultados obtenidos para los oligonucleótidos universales de cloroplasto

Tabla 6.4. Oligonucleótidos de regiones no codificantes de cloroplasto, Temperatura de alineación (Ta) utilizada para su amplificación (Demesure et al. 1995) y el tamaño obtenido en este estudio.

NOMBRE	Ta utilizada	Tamaño obtenido para <i>Nitzschia frustulum</i>
<i>trnC</i> [tRNA-Cys (GCA)] - <i>trnD</i> [tRNA-Asp (GUC)]	58° C	Ninguno
<i>trnM</i> [tRNA-Met (CAU)] - <i>rbcL</i> [RuBisCO subunidad grande]	59° C	> 600pb
<i>trnD</i> [tRNA-Asp (GUC)] - <i>trnT</i> [tRNA-Thr (GGU)]	54,5° C	Ninguno
<i>trnS</i> [tRNA-Ser (UGA)] - <i>trnM</i> [tRNA-Met (CAU)]	62° C	~ 800pb

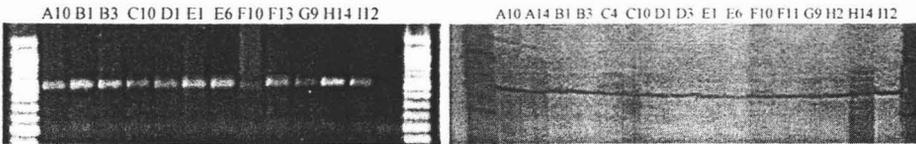


Figura 6.8. Fragmento amplificado por PCR de la región no codificante de cloroplasto *trnM-rbcL* de varios individuos de *Nitzschia frustulum*. *Izq.* Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, marcador de 100 pb. *Der.* Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, marcador de 10pb. El tamaño del fragmento es de > 600pb. El nombre de la cepa se muestra arriba de la fotografía.

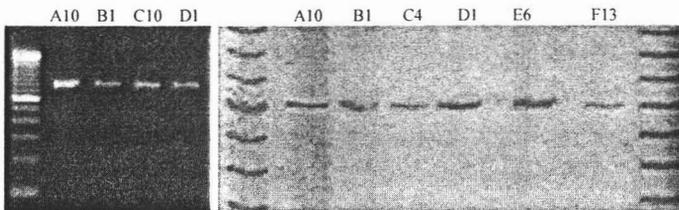


Figura 6.9. Fragmento amplificado por PCR de la región intergénica de cloroplasto *trnS-trnM* de varios individuos de *Nitzschia frustulum*. *Izq.* Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, marcador de 100 pb. *Der.* Gel de acrilamida al 6% teñido con nitrato de plata, marcador de 10pb. El tamaño del fragmento es de ~ 800pb. El nombre de la cepa se muestra arriba de la fotografía.

6.2.3 Región parcial de la subunidad grande de rADN

En este estudio se obtuvieron secuencias de una región parcial de la subunidad grande de rADN (28S) de 24 individuos de *Nitzschia frustulum* (tabla 6.5). A continuación se observa el fragmento amplificado.

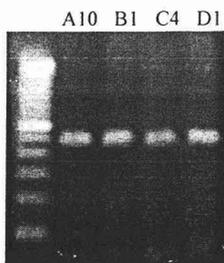


Figura 6.10. Fragmento amplificado por PCR de una región parcial de la subunidad grande de rADN (28S) en varios individuos de *Nitzschia frustulum* en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, marcador de 100 pb. El tamaño del fragmento es de 517 pb. El nombre de la cepa se muestra arriba de la fotografía.

A los haplotipos encontrados se les asignó un número. En la tabla 6.5 se muestra qué individuos comparten cada haplotipo.

Tabla 6.5. Haplotipos encontrados para *Nitzschia frustulum*. En los individuos, la letra indica el sitio colectado y el número indica el número de individuo.

No. de Haplotipo	Individuos
1	A10, C10, D14, I13
2	A14
3	A15, D13
4	B1, H16
5	B3, E6, I16
6	D1, E1, F11, H14
7	E2, F10
8	F12
9	F13
10	G9, I12
11	H12
12	H15

Se calcularon los índices de diversidad nucleotídica (θ) para *Nitzschia frustulum* de Xochimilco y para las especies que tuvieron más de cinco individuos secuenciados. Los valores se muestran en la tabla 6.6.

Tabla 6.6. Resultados de polimorfismo de DNA para las especies de las cuales se contó al menos cinco secuencias. Para todos los casos, las secuencias presentaron una tasa de evolución sin diferencia significativa (Prueba de Tajima).

Especie	<i>Nitzschia frustulum</i> Xochimilco	<i>Pseudo-nitzschia australis</i>	<i>Pseudo-nitzschia multistriata</i>	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	<i>Pseudo-nitzschia galaxiae</i>	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i>	<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>
No. de individuos	24	7	5	12	9	15	7
Long. de la secuencia	517	520	520	523	518	535	519
Sitios con gaps o ?	0	20	1	13	0	24	2
sitios no variables	501	500	519	500	518	468	516
sitios variables	16	0	0	10	1	43	1
singletons	6	0	0	5	1	21	1
sitios parsimoniosamente informativos	10	0	0	5	0	22	0
No. de haplotipos	12	2	5	10	3	14	4
Diversidad haplotípica (Hd)	0.931	0	0	0.758	0.222	0.933	0.286
Diversidad nucleotídica, Pi	0.00711	0	0	0.00615	0.00043	0.02544	0.00055
Diversidad nucleotídica, Pi (JC)	0.00715	0	0	0.00619	0.00043	0.02605	0.00055
Theta ($\theta = 4Ne\mu$)	0.00829	0	0	0.00649	0.00071	0.03069	0.00079

Se calcularon índices relacionados con la recombinación (Tabla 6.7) para el grupo de secuencias de *Nitzschia frustulum* de Xochimilco, *Pseudo-nitzschia delicatissima* y *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* ya que los otros grupos de secuencias no permitieron el análisis dada su baja diversidad nucleotídica.

Tabla 6.7. Resultados de análisis de recombinación para las especies cuya diversidad nucleotídica permitieron dicho análisis.

RECOMBINACIÓN	<i>Nitzschia frustulum</i> *	<i>Pseudo-nitzschia delicatissima</i>	<i>Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima</i>
No. de secuencias	24	12	15
No. de sitios	517	510	535
Sitios polimórficos (segregantes), S	16	10	43
R, por gen ($R=4Ne\mu$)	48.7	8.1	8.9
Estimado de R, entre sitios adyacentes	0.094	0.016	0.017
Número mínimo de eventos de recombinación, Rm	2	0	5

* Las secuencias analizadas de *Nitzschia frustulum* en este apartado no incluyen al individuo de *Nitzschia frustulum* colectado en La Jolla, California, EUA.

De la ecuación $\theta=4Ne\mu$, despejamos Ne , quedando $Ne = \theta/4\mu$ y de la ecuación $R=4Ner$, despejamos r , quedando $r = R/4Ne$. Sustituyendo el primer despeje en el segundo, tenemos $r = R\mu/\theta$. Para *Nitzschia frustulum* colectada en Xochimilco tenemos que r es igual a $5,874.548\mu$, para *Pseudo-nitzschia delicatissima* tenemos que r es igual a $1,246.154\mu$ y para *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* tenemos que r es igual a 289.997μ . Considerando que μ es constante, *Nitzschia frustulum* presenta la mayor tasa de recombinación.

6.3 Inferencia filogenética

Las 24 secuencias obtenidas de *Nitzschia frustulum* fueron alineadas, mostrando que algunos individuos presentaban el mismo haplotipo para los individuos de *Nitzschia frustulum* colectados en Xochimilco (ver Tabla 6.5). En la alineación se añadieron secuencias de especies de la familia Bacillariaceae representantes de cada clado reportadas en el artículo de Lundholm et al. 2002 y por otros autores (Orsini et al. 2002; Stehr et al. 2002; Lundholm 2003; Cerino et al. 2004) encontrando también que algunos individuos presentaban el mismo haplotipo (ver Tabla 5.9 y 5.10). Se incluyó sólo una secuencia representando los haplotipos repetidos (Ver en apéndice 8.3 la alineación de las secuencias), utilizando a *Phaeodactylum tricorutum* de la familia Phaeodactylaceae como grupo externo.

6.3.1 Filogenias

En el análisis de máxima parsimonia (MP) se obtuvieron 601 árboles igualmente parsimoniosos de una longitud (L) de 519 pasos, con un índice de consistencia (CI) de 0.636, un índice de retención (RI) de 0.828 y un índice de consistencia reescalado (RCI) de 0.527 (para todos los sitios), un índice de consistencia para todos los sitios parsimoniosamente informativos (iCI) de 0.513, un índice de retención para todos los sitios parsimoniosamente informativos (iRI) de 0.828 y un índice de consistencia

reescalado para todos los sitios parsimoniosamente informativos (iRCI) de 0.425. El árbol consenso se muestra en la figura 6.11.

Para el árbol de evolución mínima (ME) el método de distancia utilizado fue el de dos parámetros de Kimura, pairwise deletion. La longitud del árbol (SBL) fue de 0.583. Se muestra un árbol de distancia en la figura 4.17. Para el árbol de unión de vecinos o neighbor-joining (NJ) el método de distancia utilizado fue el de dos parámetros de Kimura, pairwise deletion. La longitud del árbol (SBL) fue de 0.572 (Figura 6.12).

Se puede observar una topología básica descrita por Lundholm se mantiene en los árboles de máxima parsimonia (MP), evolución mínima (ME) y neighbor joining (NJ). Con los tres métodos se observa un clado bien soportado que contiene a las especies del género *Pseudo-nitzschia* (*Pseudo-nitzschia americana*, *Pseudo-nitzschia australis*, *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Pseudo-nitzschia galaxiae*, *Pseudo-nitzschia multistriata*, *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* y *Pseudo-nitzschia pungens*) y *Fragilariopsis curta* con los siguientes valores de bootstrap: MP: 98%, ME: 98% y NJ: 99%. Los altos valores de bootstrap soportan la monofilia del género *Pseudo-nitzschia*. *Nitzschia frustulum* de La Jolla, CA, USA se une en los tres análisis al clado anterior con MP: 91%, ME: <50% y NJ: 91%. En los tres análisis, se observa que el género *Nitzschia* es polifilético. También podemos observar, en los tres casos, que los individuos de *Nitzschia frustulum* colectados en Xochimilco (Nfrustulum) se agrupan con altos valores de bootstrap (MP: 99%, ME: 100% y NJ: 100%) y no se agrupan con *Nitzschia frustulum* colectada en La Jolla, CA, USA. Igualmente, en los tres casos no se observa un patrón de agrupamiento significativo para los individuos de *Nitzschia frustulum* de Xochimilco. *Pseudo-nitzschia galaxiae* se agrupa monofiléticamente en los tres análisis con altos valores de bootstrap (MP: 98%, ME: 99% y NJ: 98%) al igual que *Pseudo-nitzschia pungens* (MP: 82%, ME: 74% y NJ: 82%) y *Pseudo-nitzschia australis* (MP: 92%, ME: 62% y NJ: 59%). Los individuos de *Pseudo-nitzschia multistriata* forman un grupo monofilético en el análisis de MP, con un bootstrap de 90%; pero un individuo de esta especie, colectado en Nápoles, Italia, se agrupa con el clado de *Pseudo-nitzschia australis* en el análisis de ME y NJ. *Pseudo-nitzschia multistriata* y *Pseudo-nitzschia australis* se agrupan en el análisis de ME (72%) y de NJ (71%).

Para *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* se observan los grupos significativos: uno que contiene a los individuos 1, 3, 4 y 5 colectados en Nápoles, Italia (valores de bootstrap, MP: 94%, ME: 93% y NJ: 95%) y otro que contiene a los individuos 6, 7 y 8 colectados en Nápoles, Italia, uno colectado en Portugal, otro en Australia y otro de La Push Washington, EUA (valores de bootstrap, MP: 81%, ME: 95% y NJ: 94%). El resto de los individuos de esta especie no se agrupan significativamente. Finalmente, para los individuos de *Pseudo-nitzschia delicatissima* encontramos que no se agrupan con altos valores de bootstrap, por lo que en los tres análisis no parece ser un grupo monofilético.

En los tres análisis observamos que *Nitzschia communis* se agrupa con *Nitzschia* cf. *pusilla* con altos valores de bootstrap (MP: 78%, ME: 91% y NJ: 92%) así como *Nitzschia navis-varingica* se agrupa con *Nitzschia pellucida* (valores de bootstrap, MP: 94%, ME: 99% y NJ: 99%).

Nitzschia fue polifilética para los tres análisis realizados, lo cual concuerda con lo encontrado por Lundholm et al. (2002). En los tres casos, que *Nitzschia frustulum* colectada en Xochimilco se agrupa con altos valores de bootstrap (MP: 99%, ME: 100% y NJ: 100%) y no se agrupa con *Nitzschia frustulum* colectada en La Jolla, CA, USA. La distancia genética entre éstas es de 0.124, distancia similar a la que se observa entre *N. frustulum* de Xochimilco y *N. vitrea* (0.129) o *N. frustulum* de Xochimilco y *Phaeodactylum triconutum* (0.131) que es el grupo externo. La especie más cercana a *N. frustulum*, por distancia, es *Nitzschia* cf. *pusilla*, manteniéndose cercanos en las filogenias pero sin valores significativos de bootstrap.

Nitzschia communis se agrupa con *Nitzschia* cf. *pusilla* con altos valores de bootstrap (MP: 78%, ME: 91% y NJ: 92%), teniendo una distancia genética entre ellas de 0.027. *Nitzschia navis-varingica* se agrupa con *Nitzschia pellucida* (valores de bootstrap, MP: 94%, ME: 99% y NJ: 99%), teniendo una distancia genética entre ellas de 0.023. Estas relaciones se corroboran en la matriz de particiones.

Para *Pseudo-nitzschia galaxiae* encontramos se agrupa monofiléticamente en los tres análisis con altos valores de bootstrap (MP: 98%, ME: 99% y NJ: 98%) al igual que *Pseudo-nitzschia pungens* (MP: 82%, ME: 74% y NJ: 82%) y *Pseudo-nitzschia australis* (MP: 92%, ME: 62% y NJ: 59%). Los individuos de *Pseudo-nitzschia multistriata* forman un grupo monofilético en el análisis de MP, con un bootstrap de 90%; pero un

individuo de esta especie, colectado en Nápoles, Italia, se agrupa con el clado de *Pseudo-nitzschia australis* en el análisis de ME y NJ. *Pseudo-nitzschia multistriata* y *Pseudo-nitzschia australis* se agrupan en el análisis de ME (72%) y de NJ (71%). La identidad de estas especies se corrobora en la matriz de particiones.

Para *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* se observan los grupos significativos: uno que contiene a los individuos 1, 3, 4 y 5 colectados en Nápoles, Italia (valores de bootstrap, MP: 94%, ME: 93% y NJ: 95%) y otro que contiene a los individuos 6, 7 y 8 colectados en Nápoles, Italia, uno colectado en Portugal, otro en Australia y otro de La Push Washington, EUA (valores de bootstrap, MP: 81%, ME: 95% y NJ: 94%). El resto de los individuos de esta especie no se agrupan significativamente. Finalmente, para los individuos de *Pseudo-nitzschia delicatissima* encontramos que no se agrupan con altos valores de bootstrap, por lo que en los tres análisis no parece ser un grupo monofilético.

Entre las especies del género *Pseudo-nitzschia*, *P. australis* y *P. americana* están cercanamente relacionadas ya que presentan menor distancia genética (0.009); así como *P. australis* y *P. multistriata* (0.009); pero estas relaciones no se observan en los análisis filogenéticos.

La prueba de tasa relativa (relative rate test) (Tajima 1993), mostró que la filogenia era válida, ya que, entre todas las ramas, se observó que la tasa de sustitución no es significativamente diferente.

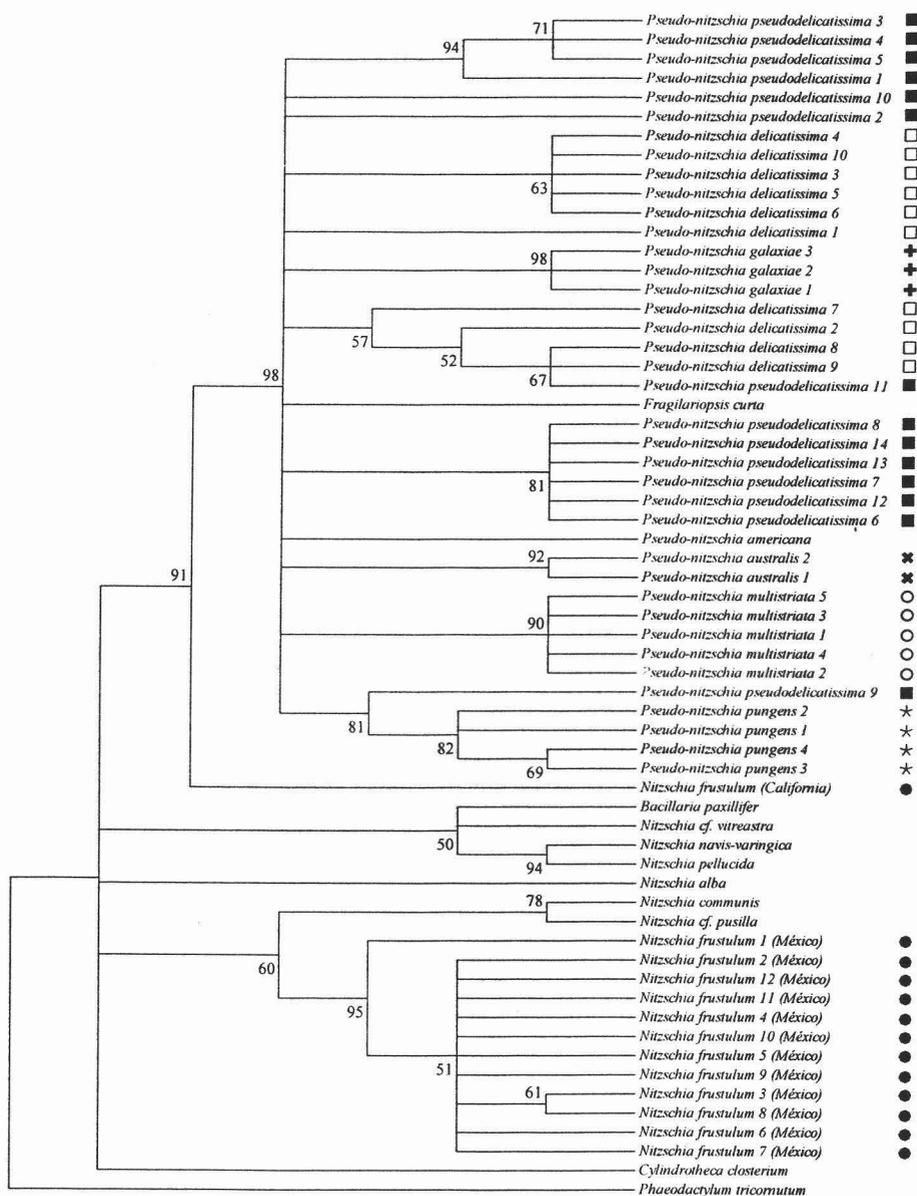


Figura 6.11. Árbol consenso de máxima parsimonia basado en una región parcial de 28S de rADN (incluye 885 posiciones) de 17 especies de la familia Bacillariaceae y *Phaeodactylum tricornutum* como grupo externo. Se obtuvieron 601 árboles igualmente parsimoniosos. L= 519 pasos. 123 caracteres parsimoniosamente informativos. Sobre las ramas se muestran los valores de bootstrap (1000 replicas) por arriba del 50%. El número después del nombre indica el número de haplotipo (ver Tabla 5.9, 5.10 y 6.5).

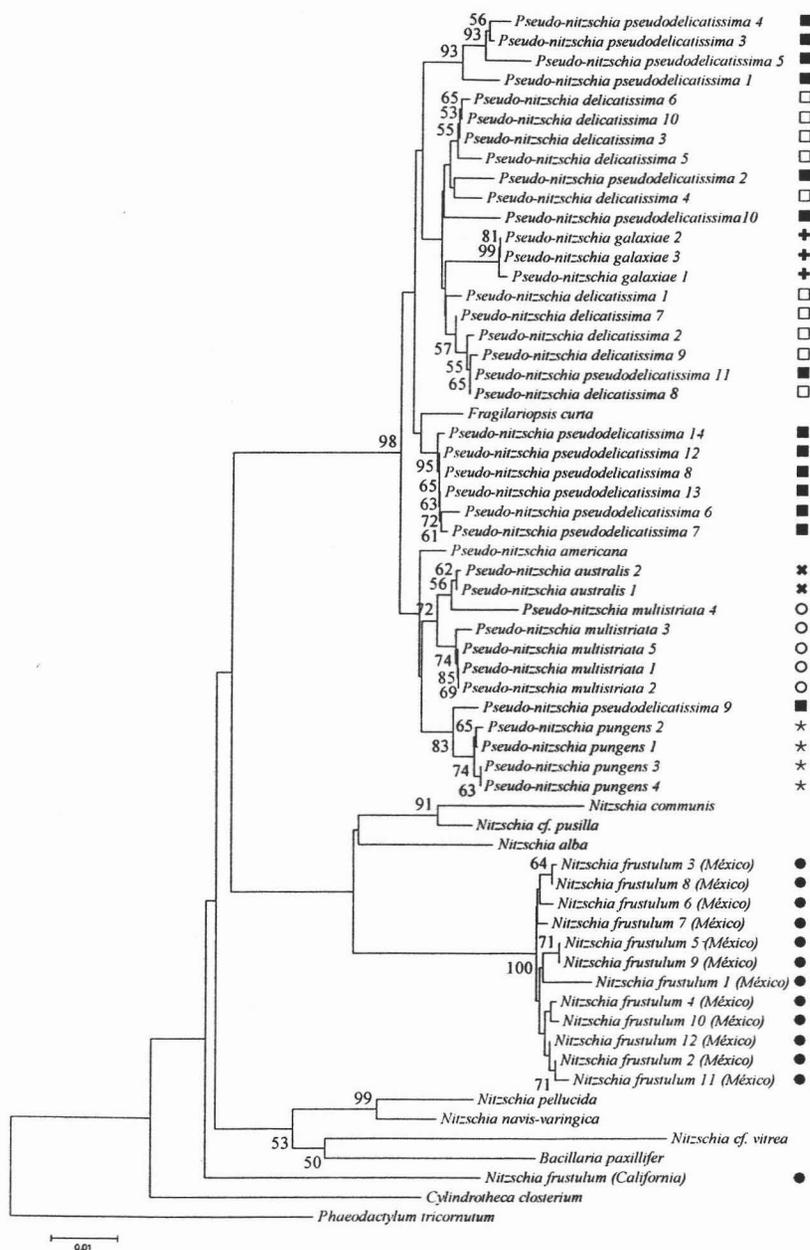


Figura 6.12. Árbol consenso de evolución mínima basado en una región parcial de 28S de rADN (incluye 885 posiciones) de 17 especies de la familia Bacillariaceae y *Phaeodactylum tricorneratum* como grupo externo. Sobre las ramas se muestran los valores de bootstrap (1000 replicas) por arriba del 50%. El número después del nombre indica el número de haplotipo (ver Tabla 5.9, 5.10 y 6.5).

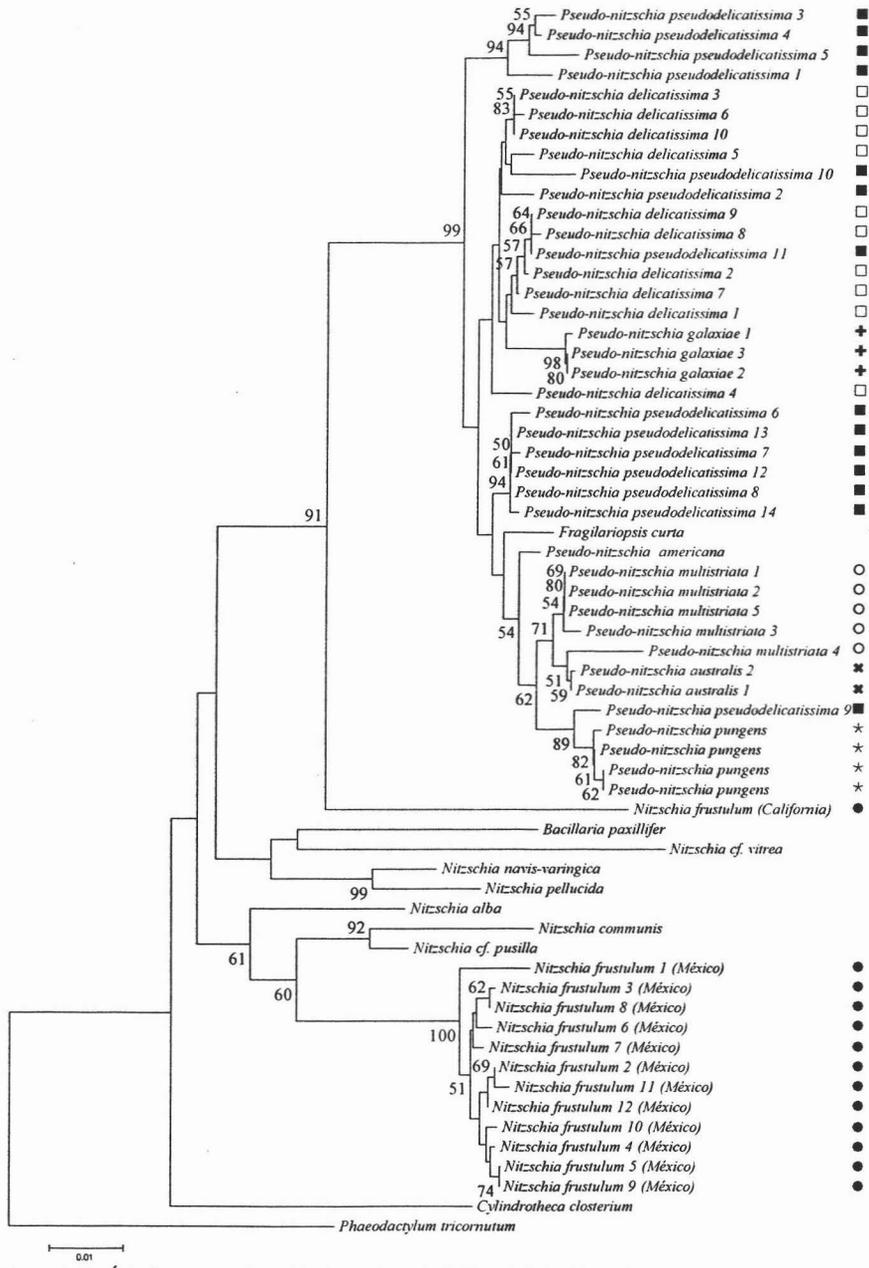


Figura 6.13. Árbol consenso de unión de vecinos (neighbor-joining) basado en una región parcial de 28S de rADN (incluye 885 posiciones) de 17 especies de la familia Bacillariaceae y *Phaeodactylum tricorutum* como grupo externo. Sobre las ramas se muestran los valores de bootstrap (1000 replicas) por arriba del 50%. El número después del nombre indica el número de haplotipo (ver Tabla 5.9, 5.10 y 6.5).

6.3.2 Matriz de particiones

La matriz de particiones nos dio como resultado 79 particiones, éstas contenían por lo menos 0.5 de soporte, posteriormente se quitaron los sitios con menos soporte y más conflicto, quedando un total de 41 particiones (Figura 6.14). La partición que más soporte tiene nos separa a las especies del género *Pseudo-nitzschia*, a *Fragilariopsis curta* y *Nitzschia frustulum* (La Jolla, California) de *Bacillaria paxillifer*, *Cylindrotheca closterium*, *Phaeodactylum tricorutum* y al resto de las especies del género *Nitzschia*. Dicha partición está soportada por 68.7% de los sitios parsimoniosamente informativos, de esos sitios siete son consistentes con la partición. Después tenemos en orden de soporte a una partición que nos separa a *Bacillaria paxillifer* y a *Nitzschia cf. vitrea* del resto de las secuencias y está apoyada por el 71.9% de los datos con dos sitios que son consistentes con la partición. Las siguientes tres tienen el mismo soporte (dos sitios consistentes con la partición). Una separa a *Pseudo-nitzschia galaxiae* del resto de las secuencias con el 99.2% de los sitios apoyando dicha partición, otra separa a *Phaeodactylum tricorutum* y *Nitzschia communis* del resto de las secuencias con el 74.2% de los sitios apoyando esta partición y la última separa *Bacillaria paxillifer*, *Cylindrotheca closterium* y las secuencias del género *Nitzschia* excepto *N. frustulum* de EUA y *N. cf. vitrea* del resto de las secuencias con el 52.3% de los sitios apoyando esta partición. El resto de las particiones (de la matriz reducida) presentan sólo un sitio consistente con la partición.

Para *Nitzschia frustulum* colectada en Xochimilco tenemos 13 particiones que son únicas (comparada con los otros grupos de secuencias) para la especie, una con 68.7% de los sitios apoyando la partición y que contiene 7 sitios que son idénticos a la partición, otra con 52.3% de los sitios apoyando la partición y contiene 2 sitios que son idénticos a la partición y 11 con los siguientes porcentajes de sitios que las apoyan: 69.5, 65.6, 62.5, 57.8, 54.7, 51.6, 49.2, 49.2, 48.4, 46.9 y 41.4%.

Podemos observar que las particiones consistentes con las filogenias obtenidas, observamos diferencias en la historia evolutiva entre diferentes regiones.

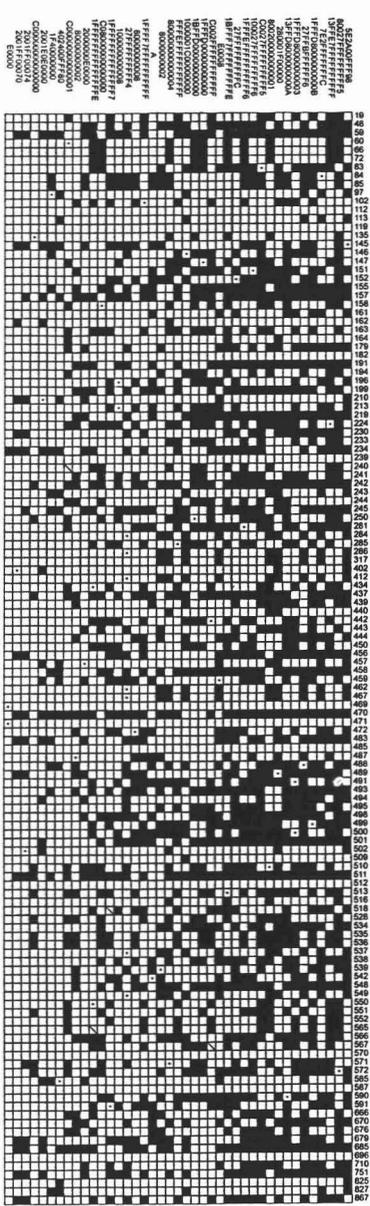
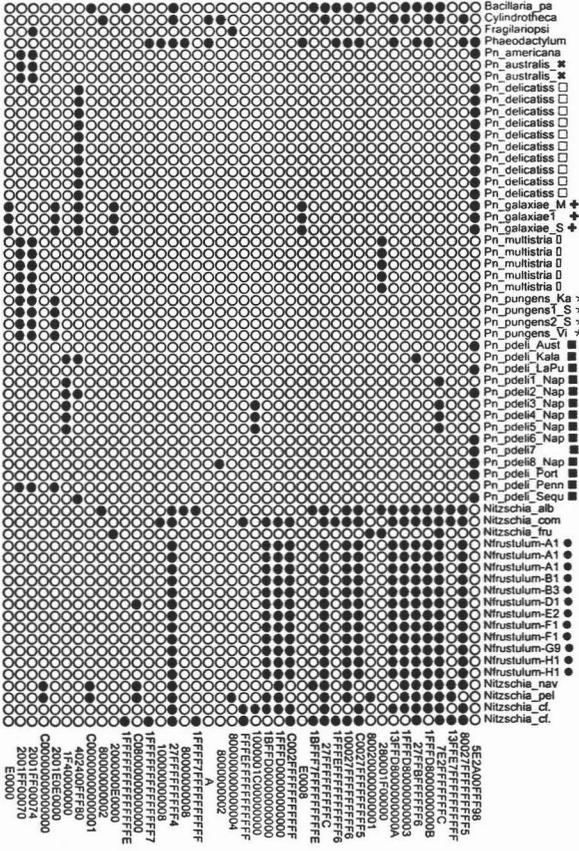
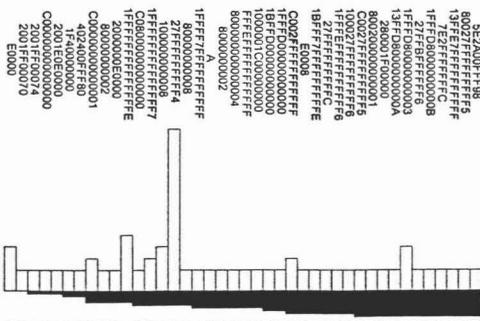


Figura 6.14. Matriz de particiones. Cada columna representa una partición observada a partir de los datos. Del lado izquierdo se observan las particiones, arriba de ellas se observa en barras blancas el soporte de los sitios y en barras negras el conflicto para cada partición. Del lado derecho se observan los sitios parsimoniosamente informativos que son consistentes con una partición están representados con un cuadro blanco, los sitios inconsistentes están representados con un cuadro negro. Los cuadros blancos marcados con un punto indican sitios que son idénticos a la partición dada, los cuadros con una diagonal representan sitios que proveen la mitad de soporte a dos particiones.

7. Discusión

7.1 Morfología

Las observaciones morfológicas de *Nitzschia frustulum* en Xochimilco, concuerdan con la mencionada por Krammer y Lange Bertalot (1988). Por su parte, para el mes de noviembre en Xochimilco, Tavera et al. (2000) observan un pH de 7.5 a 9.6. Cabe destacar que la descripción de Krammer y Lange Bertalot es de muestras europeas, por lo que se hace una adaptación a ella. Krammer y Lange Bertalot (1988) mencionan que la especie se encuentra en ambientes variables entre ellos alcalinos y salobres, con forma de vida muy variable entre ellas planctónica y bentónica. Esto concuerda con la población que estamos observando.

Se considera que el ambiente del Parque Ecológico de Xochimilco es relativamente homogéneo en general ya que dada la entrada constante de agua tratada, se hacen disponibles los nutrientes a lo largo del año. Y en los sitios ajenos al Lago Huetzalin, lejanos del vertedero, se aportan nutrientes a través del guano de las aves, ya que dichos sitios coinciden con las áreas donde las aves están la mayor parte del tiempo, denominada por Tepayotl (1999) como zona de reserva, además de que estos sitios presentan evaporación al ser poco profundos. Tavera et al. (2000) consideran que el aporte de agua y la evaporación homogeniza el ambiente, lo que puede generar que se comparta un alto número de especies entre los cuerpos de agua. Los valores de pH y temperatura son similares a través de las estaciones, lo que sugiere que la calidad y cantidad del agua que llena los cuerpos de agua permite cierta estabilidad ecológica (Tepayotl 1999, Tavera et al. 2000). Dicha estabilidad es favorable para las aves (Tepayotl 1999), cuya presencia es importante también ya que las diatomeas se adhieren a sus patas y pico, ayudando a que haya flujo entre los diferentes cuerpos de agua (Wuthrich & Matthey 1980).

A pesar de la homogeneidad aparente del ambiente, se encontraron diferencias significativas en los caracteres observados. A continuación se muestra un resumen por sitio de los caracteres con diferencias significativas y algunas características particulares (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Resumen sitio de los caracteres con diferencias significativas y algunas características particulares.

Sitio	No. de Fíbulas	No. de Estrías	Largo/Ancho	Sustrato	Movimiento del agua	Evaporación	Presencia de Chlorococcales*	Presencia de aves**
A	12.0	33.8	7.5	<i>Scirpus lacustris</i>	bajo	si	?	intermedia
B	12.5	28.4	6.3	<i>Eichhornia cassipes</i>	alto	no	si	intermedia
C	11.1	30.8	8.3	<i>Scirpus lacustris</i>	bajo	si	?	intermedia
D	12.4	31.2	6.4	<i>Eichhornia cassipes</i>	alto	no	si	intermedia
E	13.2	28.0	6.9	<i>Scirpus lacustris</i>	alto	no	si	alta
F	13.3	30.4	5.5	<i>Scirpus lacustris</i> y <i>Eichhornia cassipes</i>	alto	no	si	alta
G	11.8	27.6	7.4	<i>Typha latifolia</i>	bajo	si	no	alta
H	13.1	29.6	8.5	<i>Scirpus lacustris</i>	bajo	si	no	alta
I	12.3	26.8	11.0	<i>Scirpus lacustris</i>	bajo	si	?	alta

*Basado en Tavera et al. 2000; **Basado en Tepayotl

Aunque no se observa un patrón general, podemos reconocer diferencias en algunos caracteres. Para las fíbulas tenemos que se ven afectadas por la salinidad y tasa N:P (Trobajo et al. 2004); en este trabajo encontramos una menor densidad en pequeño cuerpo de agua (C) sujeto a evaporación, y una mayor densidad en los cuerpos E (cerca del canal El Bordo) y F (canal El Bordo); también observamos que estos sitios presentan diferencias en el movimiento del agua, en la evaporación del agua y en la presencia de aves.

Para las estrías se ha reportado que es el carácter más estable (Trobajo et al. 2004), en este trabajo no observamos un patrón claro, por lo que puede ser que sea estable en este caso también o que sus diferencias se deban a algún parámetro no contemplado en este trabajo.

Se ha reportado para la relación largo/ancho que este puede verse afectado por salinidad, pero principalmente por el movimiento del agua (Trobajo et al. 2004). Encontramos en este caso que es menor en el sitio F y mayor en el sitio I, es decir que en el sitio F encontramos valvas menos delgadas y más delgadas en el sitio I. Entre estos sitios podemos observar diferencias en el movimiento del agua y en la evaporación que se presenta en el sitio I que es un pequeño cuerpo de agua. Como se mencionó

anteriormente, el ancho de la valva adaptación que provee de una mayor superficie de unión en condiciones turbulentas, esto coincide con nuestro estudio.

Las frecuencias de tipo de ápice y tipo de valva se mantuvieron similares en todos los sitios. En el análisis de agrupación podemos observar que los sitios en general se unen según el sustrato., pero este patrón parece ser más complejo al estar involucrados otros factores.

7.2 Estructura genética

7.2.1 *Nitzschia frustulum* de Xochimilco

Los microsatélites analizados para esta especie no resultaron variables en tamaño, al igual que las regiones no codificantes de cloroplasto. Estos marcadores buscaban variación a nivel poblacional, este resultado no necesariamente implica que no haya variación genética en ese nivel.

Para las secuencias de la región parcial de la subunidad grande de rADN encontramos que la diversidad haplotípica fue 0.931 que es similar a la encontrada para *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (0.933) y la nucleotídica fue 0.007, que es similar a la encontrada para *Pseudo-nitzschia delicatissima* (0.006). Podemos observar que los estimados de diversidad nucleotídica (Pi) y la de Jukes-Cantor (Pi (JC)) fueron muy similares entre ellas (ver Tabla 6.6). Cabe destacar que su diversidad es comparable con especies de amplia distribución; en este análisis *P. pseudodelicatissima* incluye individuos de Australia, EUA, Italia y Portugal, mientras que *P. delicatissima* incluye individuos de Dinamarca, EUA e Italia; y los individuos de *Nitzschia frustulum* para este análisis fueron colectados en su totalidad del Parque Ecológico de Xochimilco.

Para buscar información más detallada a nivel poblacional se recomienda secuenciar las regiones que fueron monomórficas, o buscar otro marcador molecular. Una opción sería probar los microsatélites recientemente desarrollados para *Pseudo-nitzschia pungens* o *Pseudo-nitzschia multiseriis*, ya que esta especie está más cercana filogenéticamente a *Nitzschia frustulum* que *Ditylum bightwelli*. Es esencial entender la estructura genética intraespecífica para el establecimiento de un concepto de especie en algas que pueda ayudar a la identificación de especies cercanamente relacionadas o crípticas.

7.2.2 Especies de Género *Pseudo-nitzschia*

En este análisis encontramos que los siete individuos de *Pseudo-nitzschia australis* (colectados en Escocia, Nueva Zelanda y Estados Unidos) y los cinco individuos de *Pseudo-nitzschia multistriata* (colectados en Italia y Corea) presentan una diversidad haplotípica, Hd , de 0 y una diversidad nucleotídica, Pi , de 0. Estas dos especies son las que cuentan con menor número de individuos, por lo que la diversidad puede aumentar al aumentar el número de individuos muestreados.

Stehr et al. (2002) describen muy poca variación en *P. pungens* colectada en Estados Unidos. Este patrón se mantiene a pesar de que para este estudio se añadió una secuencia de un individuo colectado en Vietnam. La identidad de la especie se puede observar en las filogenias. La diversidad haplotípica fue 0.286 y la nucleotídica fue 0.0005 (dicha diversidad es similar a la encontrada para *Pseudo-nitzschia galaxiae*).

Cerino et al. (2004) encuentran que la diversidad genética en *Pseudo-nitzschia galaxiae* menor que en otras especies. La identidad de la especie y su substancial homogeneidad genética es confirmada por el análisis de LSU. La matriz de particiones y la diversidad haplotípica y nucleotídica coinciden con lo reportado en este estudio. La diversidad haplotípica fue 0.222 y la nucleotídica fue 0.0004; dicha diversidad es similar a la encontrada para *P. pungens*.

Para *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* encontramos que la diversidad haplotípica fue 0.933, que fue similar a la encontrada en *Nitzschia frustulum* y la nucleotídica fue 0.02544, que es el valor mas alto de las especies estudiadas. Al añadir a este estudio secuencias de individuos colectados en Australia, Estados Unidos y Portugal, aumentamos aún más la diversidad genética reportada. En las filogenias no se observa la identidad de la especie.

En el estudio realizado por Orsini et al. (2004) utilizaron sólo secuencias de *Pseudos-nitzschia delicatissima* y una secuencia de *Pseudo-nitzschia fraudulenta* que utilizan como grupo externo. Para nuestro estudio se agregaron las secuencias de un individuo colectado en Dinamarca y dos de Estados Unidos y de otras especies del género *Pseudos-nitzschia* (Tabla 5.10). En nuestro análisis no observamos los linajes descritos por Orsini et al. (2004); observamos grupos con muy bajo soporte y éstos no se agrupan por sitio de colecta. La diversidad haplotípica fue 0.758 y la nucleotídica fue 0.006.

Lundholm 2003 consideran que existen más especies no descritas de *Pseudo-nitzschia* basándose en observaciones de aislados con caracteres similares a *P. pseudodelicatissima* y a *P. cuspidata*. Orsini et al. (2002) no logran resolver completamente la topología entre los taxa incluidos y no consideran estos datos como exhaustivos para resolver la filogenia del género, por lo que solo pueden distinguir tres principales grupos politómicos. Evaluando los caracteres morfológicos encuentran que el número y estructura de las estrías y las fíbulas no muestran claramente una tendencia filogenética ya que especies con un número similar de estrías y fíbulas se agruparon en clados cercanos y en clados lejanos; por ello, consideran que estos caracteres tienen un valor limitado en el reconocimiento de grupos naturales dentro del género. Sus resultados reflejan que la filogenia de algunos caracteres utilizados para la identificación taxonómica no reflejan estrictamente la filogenia de las especies.

Se esperaría que poblaciones planctónicas de gran tamaño y amplia distribución biogeográfica presentaran bajos niveles de diferenciación genética. Alta variación genética ha sido reportada en una limitada escala espacial, demostrando que distintos genotipos que comparten características morfológicas muy similares pueden coexistir en un mismo ambiente lo que ha sugerido la existencia de taxa crípticos. En general se ha considerado que la mayoría de las especies diatomeas son cosmopolitas mientras que otras tienen distribuciones restringidas principalmente controladas por la temperatura; pero las posibilidades de dispersión son importantes. (Kristiansen 1996). Pero aquí podemos observar especies con amplia distribución geográfica que pueden presentar poca diversidad genética. Mientras que otras, como *Pseudo-nitzschia delicatissima*, no se agrupan geográficamente, pero ello puede deberse a su errónea identificación específica.

Orsini et al. (2002) recomiendan un análisis más detallado que incluya un mayor número de especies y con otras regiones de ADN para refinar los patrones filogenéticos y para clarificar posteriormente la validez de los caracteres taxonómicos utilizados en el género *Pseudo-nitzschia*. Además de datos morfológicos, información del ciclo de vida, ultraestructura de las células en diferentes etapas de ciclo pueden proporcionar más información para interpretar árboles filogenéticos. El descubrimiento de diversidad críptica en varios taxa resalta el hecho de que con la morfo-taxonomía clásica se ha pasado por alto una notable fracción de biodiversidad, lo cual puede interpretarse como

una muestra de nuestra profunda ignorancia de las características biológicas de los organismos con los que estamos tratando. En el caso de las diatomeas se han hecho filogenias y taxonomía basadas en caracteres morfológicos del frústulo de sílice; pero entendemos poco sobre el significado evolutivo y adaptativo de estos pocos, diminutos caracteres. (Orsini et al. 2004)

7.2.3 Demografía, tamaño efectivo y recombinación

Como comprobamos con la prueba de Tajima (1993), la tasa de sustitución nucleotídica es aproximadamente constante a lo largo del tiempo evolutivo, por lo que podemos considerarla como una constante.

La especie que presenta un valor de θ mayor fue *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* por lo que podemos inferir que es la que presenta una N_e mayor, lo que implica que de las especies estudiadas aquí es en la que la deriva tiene un menor efecto. En el caso contrario tenemos a *Pseudo-nitzschia australis* y *Pseudo-nitzschia multistriata*, que tienen un θ igual a 0; pero esto puede deberse a que es necesario incluir un mayor número de individuos o analizar una región con más variación para conocer θ . De cualquier modo, podemos inferir que la N_e es menor para estas especies por lo que se esperaría que la deriva génica tuviera un efecto más importante en la población comparada con *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*.

Para *Nitzschia frustulum* colectada en Xochimilco tenemos que r es igual a 5,874.548 μ , para *Pseudo-nitzschia delicatissima* tenemos que r es igual a 1,246.154 μ y para *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* tenemos que r es igual a 289.997 μ . Considerando que μ es constante, *Nitzschia frustulum* presenta la mayor tasa de recombinación.

Tenemos que *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* tuvo como mínimo 5 eventos de recombinación, mientras que *Nitzschia frustulum* tuvo 2 y *Pseudo-nitzschia delicatissima* tuvo 0.

Graham y Wilcox et al. (2000) mencionaron que la reproducción sexual se puede presentar bajo condiciones favorables de crecimiento vegetativo, no favorables y en ambientes no predecibles y fluctuantes. Werner (1977) comenta que otros factores que

afectan la sexualidad son los cambios de luz, temperatura y de concentración de CO₂. La evidencia de recombinación puede resultar en evidencia de reproducción sexual; pero esto no se puede asegurar para *Nitzschia frustulum* ya que para una variedad de *Nitzschia frustulum* hay reportes de paedogamia, lo que implica presencia de recombinación sin reproducción sexual (Round et al. 1990).

7.3 Inferencia filogenética

Para la inferencia filogenética encontramos que cuando no hay homoplasias (similitud de caracteres por otras razones diferentes a la coancestría), el método de máxima parsimonia produce el árbol correcto; pero en este trabajo podemos observar que el índice de consistencia (CI) que mide la homoplasia fue de 0.636, lo que nos indica que hay mucha homoplasia (sin homoplasia el valor sería de 1, en completa homoplasia es 0). Esto también lo podemos observar con la matriz de particiones. El valor de RI fue alto (0.828) lo que indica que la mayoría de los cambios están en las ramas basales. El valor de RCI que fue de 0.527, es un valor intermedio por lo que los caracteres en el conjunto de datos son más o menos congruentes entre sí y el árbol dado. Para los índices de los sitios parsimoniosamente informativos se mantiene el mismo patrón.

Como se mencionó anteriormente, si el valor de bootstrap es de 95% a 99% o más dependiendo de la exactitud deseada se considera a la topología significativamente positiva (Nei & Kumar 2000). Con los tres métodos (ME, MP, NJ) se observa un clado bien soportado que contiene a las especies del género *Pseudo-nitzschia* (*Pseudo-nitzschia americana*, *Pseudo-nitzschia australis*, *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Pseudo-nitzschia galaxiae*, *Pseudo-nitzschia multistriata*, *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* y *Pseudo-nitzschia pungens*) y *Fragilariopsis curta* con los siguientes valores de bootstrap: MP: 98%, ME: 98% y NJ: 99%.

Observamos que *Nitzschia* es parafilético. Los individuos de *Nitzschia frustulum* colectados en Xochimilco se agrupan significativamente y no se agrupan con *Nitzschia frustulum* colectada en La Jolla, CA, USA. La distancia genética entre éstas es de 0.124, distancia similar a la que se observa entre *N. frustulum* de Xochimilco y *N. vitrea* (0.129) o *N. frustulum* de Xochimilco y *Phaeodactylum tricornutum* (0.131) que es el grupo

externo. La especie más cercana a *N. frustulum* de Xochimilco, por distancia, es *Nitzschia* cf. *pusilla*.

Podemos observar algunas relaciones entre las especies como por ejemplo: *Nitzschia communis* se agrupa con *Nitzschia* cf. *pusilla*. *Nitzschia navis-varingica* se agrupa con *Nitzschia pellucida*.

Para entender mejor a *Nitzschia frustulum* valdría la pena realizar un análisis morfológico más detallado (observando los poroides en las valvas y en las bandas, patrón de perforaciones en los hímenes de los poroides y estructura detallada del frústulo), e incluir en estudios como este a más individuos de la especie colectados en regiones.

La no identidad de *P. pseudodelicatissima* pueden ser resultado de la confusión con *P. cuspidata* o con especies posiblemente no descritas (Lundholm et al. 2003). Cerino et al. (2004) mencionaron que *P. pseudodelicatissima* se ha descrito como no-homogénea morfológicamente, con al menos dos morfotipos. Definen tres clados encontrando que uno de los clados comparte poroides bipartitos mientras que los otros dos tienen un patrón típico “rose-window”. Esto indica que al menos dos; pero posiblemente tres especies forman *P. pseudodelicatissima*. El uso de múltiples y/o más marcadores moleculares, con análisis morfológicos más detallados, se requieren para clarificar la taxonomía de este taxón. La falta de caracteres claramente distintivos y la variación estructural de algunos taxa pueden ser indicativos de especiación reciente, para comprobarlo sugieren experimentos de fertilización cruzada.

Para *Pseudo-nitzschia delicatissima* tenemos que se había reportado una alta diversidad; esto concuerda con nuestros datos. Orsini et al. 2004 reporta diferentes linajes que se observan antes y después de los florecimientos. Ellos infieren que *P. delicatissima* puede incluir a linajes separados por las condiciones ambientales, aunque puede haber híbridos.

Mann (1999) sugiere que se estudien la ontogenia de los caracteres morfológicos que han sido utilizados para la clasificación de las diatomeas. Igualmente no debemos olvidar que los árboles de genes pueden diferir de las filogenias de los organismo dado la retención de polimorfismos ancestrales o reticulación entre poblaciones (flujo génico por ejemplo) o entre especies (por ejemplo hibridación) (Hillis et al. 1996).

8. Conclusiones

Podemos concluir que el patrón que observamos con los datos morfológicos es complejo e incluye factores como: salinidad, evaporación, movimiento del agua, sustrato y presencia de aves.

Los microsatélites analizados así como las regiones no codificantes de cloroplasto no resultaron variables en tamaño para esta especie, por lo que se necesita secuenciar la región.

Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima presentó la diversidad nucleotídica más alta; mientras que *P. multistriata* y *P. australis* presento la menor diversidad. La diversidad nucleotídica de *Nitzschia frustulum* de Xochimilco fue de 0.007.

Para *Nitzschia frustulum* encontramos una $\theta=0.00829$, *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* presenta un tamaño efectivo (N_e) mayor ($\theta=0.0307$), lo que implica que la deriva génica tiene un menor efecto. En el caso contrario tenemos a *Pseudo-nitzschia australis* y *Pseudo-nitzschia multistriata*, donde la deriva génica tiene un efecto mas importante en la población comparada con *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (valores de $\theta=0$ para ambas).

Nitzschia frustulum presenta la mayor tasa de recombinación, comparada con *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* y *Pseudo-nitzschia delicatissima*. *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* tuvo como mínimo 5 eventos de recombinación, mientras que *Nitzschia frustulum* tuvo 2 y *Pseudo-nitzschia delicatissima* tuvo 0. La evidencia de recombinación en *Nitzschia frustulum* no implica reproducción sexual (paedogamia).

Nitzschia frustulum colectada en Xochimilco presenta la mayor tasa de recombinación (comparada con *Pseudo-nitzschia delicatissima* y *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima*), y un número mínimo de eventos de recombinación de 2. La evidencia de recombinación puede resultar en evidencia de reproducción sexual; pero esto no se puede asegurar para esta especie ya que para una variedad *Nitzschia frustulum* hay reportes de paedogamia, lo que implica presencia de recombinación sin reproducción sexual.

Las especies del género *Pseudo-nitzschia* (*Pseudo-nitzschia americana*, *Pseudo-nitzschia australis*, *Pseudo-nitzschia delicatissima*, *Pseudo-nitzschia galaxiae*, *Pseudo-*

nitzschia multistriata, *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* y *Pseudo-nitzschia pungens*) y *Fragilariopsis curta* forman un grupo monofilético. El género *Nitzschia* fue parafilético.

Nitzschia frustulum colectados en Xochimilco se agrupan significativamente y no se agrupan con *Nitzschia frustulum* colectada en La Jolla, CA, USA. La especie más cercana a *N. frustulum* de Xochimilco, por distancia, es *Nitzschia* cf. *pusilla*.

Nitzschia communis se agrupa con *Nitzschia* cf. *pusilla*. *Nitzschia navis-varingica* se agrupa con *Nitzschia pellucida*.

Podemos reconocer como especies bien definidas a *Pseudo-nitzschia galaxiae*, *Pseudo-nitzschia pungens* y *Pseudo-nitzschia australis*; *Pseudo-nitzschia multistriata* excepto por un individuo. *Pseudo-nitzschia multistriata* y *Pseudo-nitzschia australis* están cercanamente relacionadas.

Por último, especies con amplia distribución geográfica, como *Pseudo-nitzschia galaxiae*, *Pseudo-nitzschia pungens* y *Pseudo-nitzschia australis*, pueden presentar poca diversidad genética. Mientras que otras, como *Pseudo-nitzschia delicatissima*, no se agrupan geográficamente, pero ello puede deberse a su errónea identificación específica.

9. Literatura Citada

- Arbor A. 2004. *Sequencher Versión 4.2* Gene Codes, EUA.
- Armbrust E.V., Berges J.A., Bowler C., Green B.R., Martinez D., Putnam N.H., Zhou S., Allen A.E., Apt K.E., Bechner M., Brzezinski M.A., Chaal B.K., Chiovitti A., Davis A.K., Demarest M.S., Detter J.C., Glavina T., Goodstein D., Hadi M.Z., Hellsten U., Hildebrand M., Jenkins B.D., Jurka J., Kapitonov V.V., Kröger N., Lau W.W.Y., Lane T.W., Larimer F.W., Lippmeier J.C., Lucas S., Medina M., Montsant A., Obornik M., Parker M.S., Palenik B., Pazour G.J., Richardson P.M., Rynearson T.A., Saito M.A., Schwartz D.C., Thamatrakoln K., Valentin K., Vardi A., Wilkerson F.P. & Rokhsar D.S. 2004. The Genome of the Diatom *Thalassiosira Pseudonana*: Ecology, Evolution, and Metabolism *Science* 306: 79-86.
- Barber, H.G. & Haworth E.Y. 1994. *A Guide to the Morphology of the Diatom Frustule, with a Key to the British Freshwater Genera*. Freshwater Biological Association, Reino Unido.
- Bates S., Davidovich N. 2000. Factors affecting the sexual reproduction of diatoms, with emphasis on *Pseudo-nitzschia*. En: *LIFEHAB: Life histories of microalgal species causing harmful blooms* Garcés E., Zingone A., Montresor M., Reguera B. & Dale B. (Eds.) European Commission: Directorate General, Science, Research and Development.
- Billot C., Rousvoal S., Estoup A., Epplen J.T., Saumitou-Laprade P., Valero M. & Kloareg B. 1998. Isolation and characterization of microsatellite markers in the nuclear genome of the brown alga *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Molecular Ecology* 7: 1778-1780.
- Blinn D.W. & Bailey P.C.E. 2001. Land-use influence on stream water quality and diatom communities in Victoria, Australia: a response to secondary salinization. *Hydrobiologia* 446: 231-244.
- Brown L.R. & Short T.M. 1999. *Biological, Habitat and Water Quality Conditions in the Upper Merced River Drainage, Yosemite National Park, California, 1993-1996*. Water-Resources Investigations Report, EUA.

- Cerino F., Orsini L., Sarno D., Dell'Aversano C., Tartaglione L. & Zingone A. 2004. The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae* 4: 33-48.
- Cox E.J. 1995. Morphological variation in widely distributed diatom taxa: taxonomic and ecological implications. En: Marino D. & Montresor M. (Eds.) *Proceedings of the 13th International Diatom Symposium 1994*. Biopress, Reino Unido.
- Coyer J.A., Olsen J.L. & Stam, W.T. 1997. Genetic variability and spatial separation in the sea palm *Postelsia palmaeformis* (Phaeophyceae) as assessed with M13 fingerprints and RAPDs. *Journal of Phycology*. 33: 561--568.
- Davidovich N.A. & Bates S.S. 1998. Patterns of sexual reproduction in the pennate diatoms *Pseudo-nitzschia multiseriata* and *P. pseudodelicatissima*, p.152-155. **En:** Reguera B. Blanco J. Fernández M.L. & Wyatt T. (Eds.) *Harmful algae*. Junta de Galicia y el IOC de UNESCO, Francia.
- Demesure B., Sodji N. & Petit R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4: 129-131.
- Edlund M.B. & Stoermer E.F. 1997. Ecological, evolutionary, and systematic significance of diatom life histories. *Journal of Phycology* 33:897-918.
- Eguiarte L.E. 1999. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. En: Núñez-Farfán, J. & Eguiarte L.E. (Eds.) *La evolución biológica*. U.N.A.M., México.
- Evans K.M. & Hayes P.K. 2004. Microsatellite markers for the cosmopolitan marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens*. *Molecular Ecology Notes* 4: 125-126.
- Evans K.M., Bates S.S., Medlin L.K. & Hayes P.K. 2004. Microsatellite marker development and genetic variation in the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseriata* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 40: 911-920.
- Fathi A.A., Abdelzaher H.M.A., Flower R.J., Ramdani M. & Krařem M.M. 2001. Phytoplankton communities of North African wetland lakes: the CASSARINA Project. *Aquatic Ecology* 35: 303-318.
- Fehling J., Green D.H., Davidson K., Bolch C.J. & Bates S.S.. 2004. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia seriata* (Bacillariophyceae) in Scottish waters. *Journal of Phycology* 40: 622-630.

- Felsenstein J. 2004. *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, EUA.
- Fu Y.X. 2001. Estimating mutation rate and generation time from longitudinal samples of DNA sequences. *Molecular Biology & Evolution*. 18:620-626
- Futuyma D.J. 1998. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, EUA.
- Gallagher J.C. 1980. Population genetics of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in Narragansett Bay. *Journal of Phycology* 16: 464-474.
- Gallagher J.C. 1982. Physiological variation and electrophoretic banding patterns of genetically different seasonal populations of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 18: 148-162.
- García M. 1986. *Apuntes de Climatología*. Facultad de Ciencias (U.N.A.M.) México D.F. p.76-114.
- Gillespie J.H. 1998. *Population genetics. A concise guide*. The John Hopkins Univ. Press. EUA.
- Graham L. E. & Wilcox L.W. 2000. *Algae*. Prentice-Hall, EUA.
- Graur D. & Li W.H. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, EUA.
- Griffiths A.J F., Miller J.H., Suzuki D.T., Lewontin R.C. & Gelbart W.M. 2002. *An Introduction to Genetic Analysis*. W. H. Freeman, EUA.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hancock J.M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein D.B. & Schlötterer (Eds.) *Microsatellites: Evolution and applications*. Oxford University Press, Reino Unido.
- Hedrick P.W. 2000. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett, EUA.
- Herbst D.B. & D.W. Blinn. 1998. Experimental mesocosm studies of salinity effects on the benthic algal community of a saline lake. *Journal of Phycology* 34:772-778.
- Hillis D.M. & Dixon M.T. 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- Hillis D.M., Moritz C. & Mable B.K. 1996. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, EUA.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Hoek C., Mann D.G. & Jahns H.M. 1998. *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Reino Unido.
- Hudson R.R. & Kaplan N.L. 1985. Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics* 111: 147-164.
- Hudson R.R. 1987. Estimating the recombination parameter of a finite population model without selection. *Genetical Research* 50: 245-250.
- Interstate Commission on the Potomac River Basin. 1998. *A Comprehensive List of Chesapeake Bay Basin Species*. United States Environmental Protection Agency, EUA.
- Jakobsen I.B., Wilson S.R. & Eastal S. 1997. The partition matrix: Exploring variable phylogenetic signals along nucleotide sequence alignments. *Molecular Biology and Evolution* 14: 474-484.
- Jarne P. & Lagoda P.J.L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*. 11: 424-429.
- Jewson D.H. 1992. Life cycle of a *Stephanodiscus* sp. (Bacillariophyta) *Journal of Phycology*. 28: 856-866.
- Kaczmarek I. & Fryxell G.A. 1994: The genus *Nitzschia*: Three new species from the equatorial Pacific Ocean. *Diatom Research* 9: 87-98.
- Karp A., Isaac P.G. & Ingram D.S. 1998. *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman & Hall, Reino Unido.
- Kociolek J.P., Theriot E.C. & Williams D.M. 1989. Inferring diatom phylogeny: A cladistic perspective. *Diatom Research* 4: 289-300.
- Kociolek J.P. & Spaulding S.A. 1999. Freshwater diatom biogeography. *Nova Hedwigia* 71: 223-241.
- Kooistra W.H. & Medlin L. K. 1996. Evolution of the diatoms (Bacillariophyta) IV A reconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and fossil record. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6/3:391-407.
- Krammer K. & Lange-Bertalot H. 1988. *Bacillariophyceae. 2. Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, Band 2/2. Die Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Pascher, A.; Ettl, H.; Gerloff, J.; Heynig, H.; Mollenhauer, D. (Eds.) Gustav Fischer Verlag, Alemania.

- Kristiansen J. 1996. Biogeography of freshwater algae - conclusions and perspectives. *Hydrobiologia* 336: 159-161.
- Kumar S., Tamura K. & Nei M. 1993. *MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis*. Pennsylvania State University, University Park, PA.
- Lange-Bertalot H. 1980. New Species, Combinations, and Synonyms in the Genus *Nitzschia*. *Bacillaria* 3:41-78.
- Lewis R.J., Jensen S.I., DeNicola D.M., Miller V.I., Hoagland K.D. & Ernst S.G. 1997. Genetic variation in the diatom *Fragilaria capucina* (Fragilariaceae) along a latitudinal gradient across North America. *Plant Systematics and Evolution* 204: 99-108.
- Lundholm N., Daugbjerg N. & Moestrup Ø. 2002. Phylogeny of the Bacillariaceae with emphasis on the genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) based on partial LSU rDNA. *European Journal of Phycology* 37:115-134.
- Lundholm N., Moestrup Ø., Hasle G.R. & Hoef-Emden K. 2003. A study of the *Pseudonitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): what is *P. pseudodelicatissima*? *Journal of Phycology* 39: 797-813.
- Luo H., Mörchen M., Engel C.R., Destombre C., Epplen J.T., Epplen C., Saumitou-Laprade P. & Valero M. 1999. Characterization of microsatellite markers in red alga *Gracilaria gracilis*. *Molecular Ecology* 8: 700-702.
- Manhart J.R. & McCourt R.M. 1992. Molecular data and species concepts in the algae. *Journal of Phycology* 28:730-737.
- Mann D.G. 1986. *Nitzschia* subgenus *Nitzschia* (Notes for a monograph of the Bacillariaceae 2). En: M. Ricard (Ed.), Proceedings of the 8th International Diatom Symposium, 215-226. O. Koeltz, Alemania.
- Mann, D.G. 1993. Sexual reproduction in a marine member of the Bacillariaceae. *Diatom Research* 8: 109-116.
- Mann D. & Droop S. 1996. Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. *Hydrobiologia* 336: 19-32.
- Mann, D.G. 1999. The species concept in diatoms. (Phycological Reviews 18). *Phycologia* 38: 437-495.

- Mann, D.G. & Chepurinov, V.A. 2004. What have the Romans ever done for us? The past and future contribution of culture studies to diatom systematics. *Nova Hedwigia* 79: 237–291.
- Mataloni G. 1998. Ecological studies on algal communities from Tierra del Fuego peat bogs. *Hydrobiologia* 391: 157-170.
- Medlin L. K., Williams D. M. & Sims, P. A. 1993. The evolution of the diatoms (Bacillariophyta) I. Origin of the group and assessment of the monophyly of its major divisions. *European Journal of Phycology* 28: 261-275.
- Medlin L.K., Lange M., Barker G.L.A. & Hayes P.K. 1995. Can molecular techniques change our ideas about the species concept? *Molecular Ecology of Aquatic Microbes* G38: 133 - 152.
- Medlin L.K., Kooistra W.H.C.F., Geronde R., Wellbrock U. 1996a. Evolution of the Diatoms (Bacillariophyta). II. Nuclear-Encoded Small-Subunit rRNA Sequence Comparison Confirm Paraphyletic Origin for the Centric Diatoms. *Molecular Biology and Evolution* 13: 67-75.
- Medlin L.K., Gersonde R., Kooistra W.H.C.F. & Wellbrock U. 1996b. Evolution of the diatoms (Bacillariophyta) III. Molecular evidence for the origin of the Thalassiosirales *Nova Hedwigia* 112,221-234.
- Medlin L.K. & I. Kaczmarska 2004. Evolution of the diatoms: morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. *Phycologia* 43: 1-29.
- Naumenko Y.V. 1999. Algae of Lake Bai-Khol (Tuva, Russia). *International Journal of Salt Lake Research* 8: 171-176.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, EUA.
- Nei M. & Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Novelo M. E. 1998. *Floras ficológicas del Valle de Tehuacan, Puebla*. Tesis Doctorado (Doctorado en Ciencias (Biología) Facultad de Ciencias., U.N.A.M.
- Orsini L., Sarno D., Procaccini G., Poletti R., Dahlmann J. & Montresor M. 2002. Toxic *Pseudo-nitzschia multistriata* (Bacillariophyta) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species. *European Journal of Phycology* 37 : 247-257.

- Orsini L., Procaccini G., Samo D. & Montresor M. 2004. Multiple rDNA ITS-types within the diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Marine Ecology Progress Series* 271: 87-98.
- Perez-Ponce de León G., León R.V. & García P.L. 1997. ¿Qué es la sistemática filogenética? *Ciencia y Desarrollo* 135: 61-65.
- Resendiz A.N. 2004. *Descripción morfológica y caracterización molecular de las cercaria Glythelmins quieta (Stafford, 1900.) Stafford, 1905 (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea)*. Tesis de Licenciatura (Bióloga) Facultad de Ciencias, U.N.A.M.
- Rhodes L.L., Scholin C.A., Garthwaite I., Haywood A.J., White D. & Thomas A. New Records of Domoic Acid (DA) Producing *Pseudo-nitzschia* Species Educed by Concurrent Use of Whole Cell DNA Probe-Based and DA Immunochemical Assays. No publicado.
- Rodríguez G.P. 1998. *Análisis bacteriológico de aguas residuales en las plantas de tratamiento de la Delegación de Xochimilco*. Tesis Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo) Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, U.N.A.M.
- Round F.E., Crawford R.M. & Mann D.G. 1990. *The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Rozas J., Sánchez-Del Barrio J. C., Messeguer X. & Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Rozen S. & Skaletsky H. J. 2000. Primer3 en internet para usuarios generales. (http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)
- Rynearson T.A. & Armbrust E.V. 2000. DNA fingerprint reveals extensive genetic diversity in a field population of the centric diatom *Ditylum brightwellii*. *Limnology and Oceanography* 45: 1329-1340.
- Rynearson T.A. & Armbrust E.V. 2004. Genetic differentiation among populations of the planktonic marine diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 40: 34-43.
- Salas S. 1998. Estudio de la vegetación del Parque Ecológico de Xochimilco. Tesis Licenciatura (Biólogo) Facultad de Ciencias, U.N.A.M.

- Sambrook J., Fritsch E.F., & Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, EUA.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson R. 1977. DNA sequencing with Chain Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74: 5463-5468.
- Scala S. & Bowler C. 2001. Molecular insights into the novel aspects of diatom biology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 1666-1673.
- Scholin C.A., Villac M.C., Buck K.R., Krupp J.M., Powers D.A., Fryxell G.A. & Chavez F.P. 1994. Ribosomal DNA sequences discriminate among toxic and non-toxic *Pseudo-nitzschia* species. *Natural Toxins* 2: 152-165.
- Soudek D. & Robinson G.G.C. 1983. Electrophoretic analysis of the species and population structure of the diatom *Asterionella formosa*. *Canadian Journal of Botany*. 61: 418-433.
- StatSoft, Inc. 1998. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc. (<http://www.statsoft.com>)
- Stehr C.M., Connell L., Baugh K.A., Bill B.D., Adams N.G. & Trainer V.L. 2002. Morphological, toxicological, and genetic differences among *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species in inland embayments and outer coastal waters of Washington State, USA. *Journal of Phycology* 38: 55-65.
- Strate H.J. van der, Olsen J.L., Zande L. van de, Edwards K. J. & Stam, W. T. 2000. Isolation and characterization of microsatellite loci in the benthic seaweed, *Cladophoropsis membranacea* (Cladophorales, Chlorophyta). *Molecular Ecology* 9: 1442-1443.
- Stroemer E.F. & Smol J.P. 1999. *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*. Reino Unido, Cambridge University Press.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G. & Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Tajima F. 1993. Simple methods for testing molecular clock hypothesis. *Genetics* 135: 599-607.
- Tavera R., Novelo E. & Comas A. 2000. Chlorococcalean algae (*s.l.*) from the Ecological Park of Xochimilco, México. *Algological Studies* 100: 65-94.

- Tepayotl S.M. 1999. *Evaluación de la diversidad y distribución de la fauna ornitológica residente y migratoria del Parque Ecológico de Xochimilco, México*. DF. Tesis Licenciatura (Biólogo) Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, U.N.A.M.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Trobajo R., Cox E.J. & Quintana X.D. 2004. The effects of some environmental variables on the morphology of *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta), in relation its use as a bioindicador. *Nova Hedwigia* 79: 433-445.
- Welch P. 1948. *Limnological Methods*. McGraw Hill, EUA.
- Werner D. 1997. *The biology of Diatoms*. Blackwell Scientific Publications, Gran Bretaña.
- Wéndker S. 1990. Morphologische Untersuchungen an Populationen aus dem Formenkreis um *Nitzschia frustulum* (Kützing) Grunow. *Diatom Research* 5: 179-187.
- Wuthrich M. & Matthey W. 1980. Les diatomées de la Tourbière du Cachot (Jura neuchâtelois) III. Etude de l'apport eolien et du transport par les oiseaux et insectes aquatiques. *Schweizer Zeitschrift Hydrologie* 42: 269-284.
- Zar J.H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall Inc., EUA.

10. Apéndices

10.1 Elaboración de medio de cultivo

DM (Diatom Medium) de agua dulce

<i>Stocks</i>		para 200 ml
(1)	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	4.00 g
(2)	KH ₂ PO ₄	2.48 g
(3)	MgSO ₄ ·7H ₂ O	5.00 g
(4)	NaHCO ₃	3.18 g
(5)	EDTAFeNa	0.45 g
	EDTANa ₂	0.45 g
(6)	H ₃ BO ₃	0.496 g
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.278 g
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.20 g
(7)	Cyanocobalamin	0.008 g
	Thiamine HCl	0.008 g
	Biotin	0.008 g
(8)	NaSiO ₃ ·9H ₂ O (Sigma S4392)	11.4 g
<i>Medio</i>	Stock solutions 1 - 8	1.0 ml each

1. Se toma 1 ml de cada uno de los 8 stocks
2. Se afora a 1 litro (992 ml)
3. Se ajusta el pH a 6.9
4. Se agrega agar al 1.8% (18g por cada litro de medio)
5. Se autoclavea
6. Se vacía el medio de cultivo en cajas de Petri en la campana cuando el medio este tibio. La caja no debe estar llena de medio, solo debe cubrir el piso de la caja.

<http://www.ife.ac.uk/ccap/> (The Culture Collection of Algae and Protozoa)

10.2 Extracción de ADN

1. Colectar las diatomeas por centrifugación o con una asa de siembra.
2. Tomar aproximadamente 0.1 g de células frescas con nitrógeno, moler con nitrógeno líquido con un pistilo en un tubo de 2.0 µl con 1.5 µL de buffer de aislamiento y mezclar:
 - a. 100mM Tris HCl (pH 7.4)
 - b. 50 mM EDTA (pH 8)
 - c. 500 mM NaCl
3. Cada muestra se transfiere a 2 tubos de centrifuga de 1.5µL y se agrega a cada tubo:
 - a. 10.5 µL β-mercaptoetanol
 - b. 50 µL de SDS al 20%
4. Agitar vigorosamente.
5. Incubar 65° C durante 20 minutos mezclando por inversión cada 5 minutos
6. Agregar 250 µL de acetato de potasio 5M a cada tubo.
7. Agitar vigorosamente.
8. Congelar a -20° C durante 10 minutos.
9. Centrifugar a 14,000 rpm a 4° C durante 20 min.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio.
11. Agregar 20 µL de RNAsa calentada previamente a 37° C
12. Incubar a 37° C durante 30 minutos.
13. Agregar 500 µL de isopropanol frío a cada tubo.
14. Mezclar la muestra por inversión antes de ser incubada a -20° C por 2 a 12 horas.
15. Centrifugar a 14,000 rpm a 4° C durante 20 min.
16. Descartar el sobrenadante y escurrir el pelet lo mejor posible.
17. Disolver en 70 µL de buffer TE-1:
 - a. 50 mM Tris HCL (pH 8)
 - b. 10 mM EDTA (pH 8)
18. Centrifugar a 14,000 rpm a 4° C durante 10 min.
19. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio cuidadosamente, pasar las muestras a un mismo tubo

20. Agregar 15 μL 3M acetato de sodio y 100 μL de isopropanol frío.
21. Centrifugar a 14,000 rpm a 4° C durante 4 min
22. Lavar el pelet con 100 μL de etanol 80% frío.
23. Secar aproximadamente 30 min.
24. El pelet seco se resuspende en 50 μL de agua

10.3 Limpieza de diatomeas para preparaciones permanentes

1. Medir 10 ml de la muestra.
2. Colocar las muestras en matraces de 100ml.
3. Agregar 20ml de dH₂O.
4. Agregar 10ml de ácido nítrico.
5. Calentar lentamente y hervir hasta que disminuya a 20 ml. No sobrecalentar para evitar que salpique la muestra.
6. Agregar una pizca de dicromato de potasio y hervir 5 minutos más.
7. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

Una vez frías las muestras

8. Colocar en tubos de centrifuga de 15ml. Centrifugar 10 minutos a 500 rpm.
9. Resuspender hasta que se vea homogénea la muestra.
10. Centrifugar y decantar 6 veces (o hasta que la muestra se vea transparente) y después de la última vez llevar a 10ml en vez de 14ml.

Preparaciones

11. Colocar una gota de la muestra limpia en 1 cubreobjetos calentando hasta que se evapore.
12. Colocar una gota de Naphax ® en un porta objetos
13. Calentar de 3-10 segundos. Cuidar que salgan los vapores del portaobjetos.
14. Inmediatamente después de remover el portaobjetos del calor, colocar el cubreobjetos con la muestra en resina caliente. El Naphax hervirá un poco más.
15. Colocar el portaobjetos en la parrilla para que la resina hierva nuevamente.
16. Eliminar las burbujas dejando caer muy suavemente y repentinamente el portaobjetos.