



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR  
DE ALGUNAS ESPECIES DE *SCENEDESMUS* DE  
MÉXICO**

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**B I Ó L O G O**

Presenta

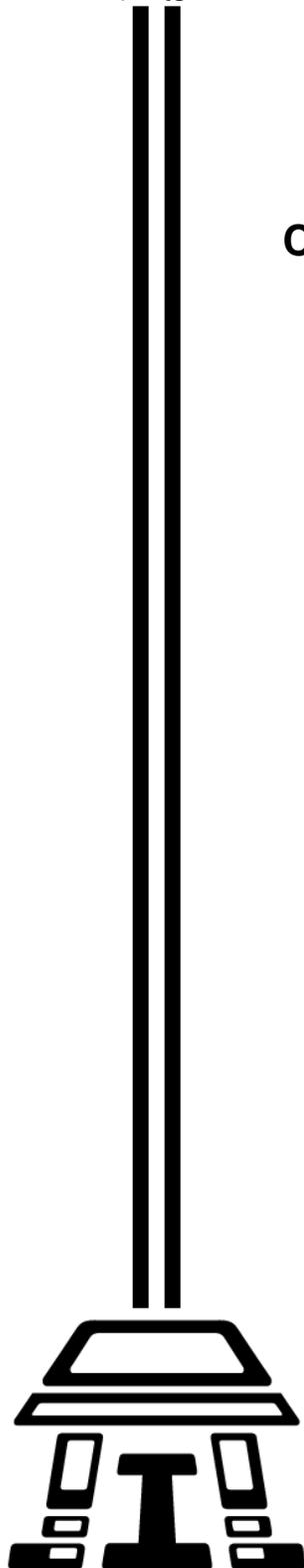
**ARMANDO DANIEL CORONA ARZOLA**

Directora de Tesis

**M. en C. GLORIA GARDUÑO  
SOLÓRZANO**

HERBARIO IZTA

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2014





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo recibió financiamiento del Programa de Apoyo a Profesores de Carrera 2013, de la FES Iztacala; PAPCA 2013, número 13



## AGRADECIMIENTOS

---

No me queda más que un suspiro del recuerdo de esta larga pero divertida travesía escolar en este lugar llamado Iztacala y el presente trabajo representa el final de esta historia en mi vida. Sin embargo esta tesis no hubiera podido ser completada por mi sencilla persona sin haber recibido el apoyo de un gran número de personas.

Aunque me resulte evidente agradecer a mi familia en primer lugar, quisiera hacer hincapié de igual forma diciendo “gracias papá” y “gracias mamá” por siempre apoyarme, aconsejarme y analizar todas las decisiones que he tomado en mi vida y en especial recordarme cuán importante era terminar este escrito y titularme. También a mis hermanos que a pesar de irnos distanciando con el paso del tiempo al formar nuestros propios caminos, siempre están ahí cuando necesito apoyo.

Un factor importante fueron mis profesores de la carrera y en especial mis tutores que me enseñaron muchas cosas de la biología, pero sobre todo compartieron sus experiencias laborales conmigo y mis compañeros.

Quiero agradecer a todos mis amigos de Iztacala que siempre me apoyaron y han creído en mí, desde el “club de nerds” hasta los “rock” y los “flosan”, gracias a todos ellos aprendí grandes cosas y pasé por varios cambios para mejorar. En especial a mis amigas Jimena y Diana que han sido mis colegas biólogas desde que entré a la carrera y terminaron a la par conmigo, siempre me han apoyado y se los agradezco; también una parte importante son mis amigas de laboratorio Alejandra y Celina que estuvieron conmigo prácticamente todos los días en que realicé este trabajo, ya fuera apoyándome con el proyecto o en los problemas de mi vida personal. A estas cuatro grandes mujeres quiero decirles “gracias” en especial por ayudarme a discernir los caminos de mi vida cuando veía el futuro con zozobra y por compartirme tanto tiempo de sus vidas. No podría describir en una hoja a toda la gente de Iztacala que aprecio porque no me alcanzaría el papel, pero en general a todos mis compañeros biólogos y de otras carreras, mis amigos de francés, de gimnasia, de laboratorio y los de toda la vida, quisiera agradecerles por echarme porras y finalizar diciéndoles que si nos encontramos mientras viva, terminaré inestable de felicidad...no quisiera que lo olviden.

ありがとう みなさん  
私のストーリーがここから続く  
さよなら★



## AGRADECIMIENTO AL TUTOR

---

No podría expresar en palabras la gratitud que tengo hacia la M. en C. Gloria Garduño Solórzano quien es la persona clave en este trabajo, ella me enseñó grandes cosas, no sólo de psicología sino también del simple vivir cotidiano y lo gratificante que puede ser el aprendizaje de la biología.

No sólo me apoyó en la realización de este escrito y de todo el proceso experimental, de colecta y en general todo lo mostrado en el presente trabajo, también me enseñó que el trabajo en equipo puede llegar a obtener mayores logros que el trabajo individual, lo importante es saber reunir las herramientas necesarias y las habilidades que cada uno de nosotros va desarrollando y sobre todo compartir experiencias con otros para enriquecer el progreso, tanto ajeno como el propio. Es cierto que se trabaja más cuando se tienen mayores perspectivas y grandes metas, pero por más cansado que llegue a ser en algún punto la realización de un ambicioso proyecto, los resultados llegan a ser útiles y satisfactorios si cada paso está bien hecho.

Muchas gracias profesora por todo el apoyo que me brindó, sobre todo la paciencia y todos los consejos que me ha dado, también quiero agradecerle el apoyo y su accesibilidad cuando yo tenía problemas personales o dificultades laborales.

También quiero agradecer a la Dra. Martha Martínez que me enseñó que se puede ser brillante e inteligente sin perder el carisma y la chispa por vivir alegremente sin importar las dificultades que se presenten, quiero agradecerle por las observaciones y mejoras que realizó y junto con la maestra Gloria enseñarme que en el campo laboral y en la vida personal la amistad puede ser maravillosa. De igual forma gracias por los consejos personales que también me ha brindado.

Finalmente quiero agradecer a mis tutores Jorge Campos, Mario A. Fernández y Rafael Quintanar por sus correcciones y ayudarme a pensar de manera más analítica, como un biólogo debe hacerlo.



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	<b>11</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>11</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>12</b>
<i>Documentación bibliográfica</i>	<b>12</b>
<i>Obtención del material biológico</i>	<b>13</b>
<i>Exploraciones ficológicas</i>	<b>13</b>
<i>Aislamiento de las cepas</i>	<b>13</b>
<i>Determinación taxonómica</i>	<b>14</b>
<i>Microscopia electrónica de barrido (MEB)</i>	<b>14</b>
<i>Extracción de ADN, PCR y secuenciación</i>	<b>15</b>
<i>Análisis filogenético</i>	<b>15</b>
<i>Cuantificación de variables fisicoquímicas</i>	<b>16</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>17</b>
<i>Documentación bibliográfica</i>	<b>17</b>
<i>Cuantificación de variables fisicoquímicas</i>	<b>18</b>
<i>Determinación taxonómica</i>	<b>20</b>
<i>Análisis morfológico</i>	<b>30</b>
<i>Análisis filogenético</i>	<b>31</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>34</b>
<b>LITERATURA CITADA</b>	<b>35</b>
<b>ANEXO 1</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>41</b>



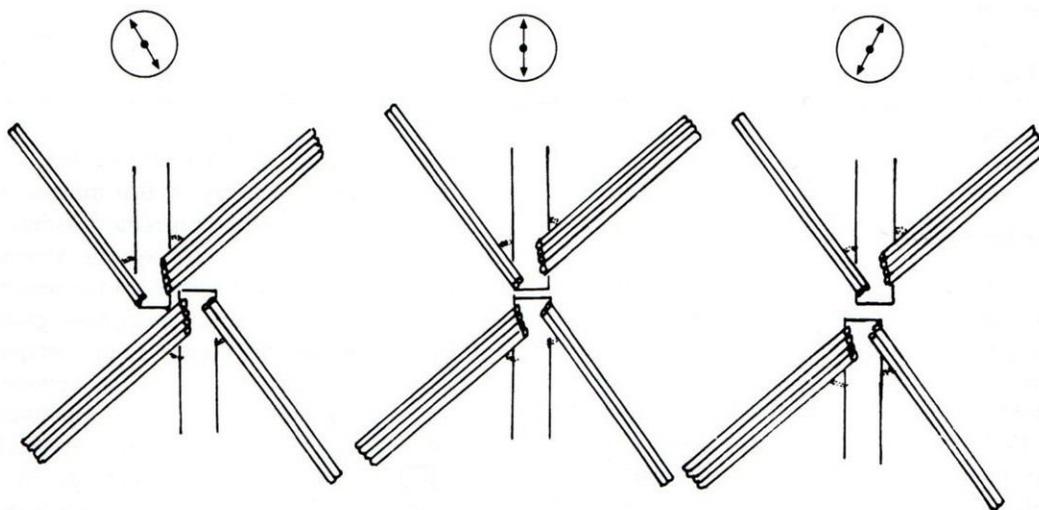
## RESUMEN

Durante muchos años, las clasificaciones taxonómicas de las algas sólo se establecían por caracteres morfológicos, pero desde hace cuatro décadas, con los resultados obtenidos a través de estudios moleculares, fisiológicos y ecológicos se han propuesto nuevos esquemas de clasificación debido a la gran diversidad morfológica que presentan. Un caso en particular es el género *Scenedesmus* Meyen, 1829, perteneciente a la familia Scenedesmaceae que presenta pleomorfismo y consecuentemente el número de especies conocidas podría estar sobrevalorado. Recientemente las investigaciones en las regiones 18S del ADN ribosomal (ADNr), 26S del ADNr y el espaciador interno al transcrito 2 (ITS2) del ADNr, han confirmado los cambios en las clasificaciones taxonómicas. El presente estudio está enfocado en el análisis morfológico y molecular de algunos taxa del género *Scenedesmus sensu latum* que se localizan en diferentes ambientes dulceacuícolas de México; para esto se concentraron los registros publicados del género en México, del periodo 1941-2008, en una base de datos; después se obtuvieron cultivos unialgales de nueve localidades correspondientes a seis entidades federativas del país, se determinaron *in vivo*, se observaron en microscopía electrónica de barrido (MEB), se secuenciaron las regiones ITS1 e ITS2 del ADNr con las que se realizó un árbol filogenético con el método Neighbor-Joining y se registraron algunas variables fisicoquímicas de algunos lugares de colecta. La información ficológica señala que sólo nueve de las 32 entidades del país, cuentan con registros publicados de especies del género *Scenedesmus*. Las especies determinadas en este trabajo fueron *Acutodesmus obliquus*, *A. dimorphus* y *Desmodesmus armatus* y aunque la determinación no correspondió con la búsqueda de sus secuencias en el NCBI para tres de las cepas estudiadas, en general la determinación taxonómica a través de las características morfológicas se complementó exitosamente con las características moleculares de la región ITS1 e ITS2. Por otro lado se encontró que *A. obliquus* crece en ambientes con un amplio intervalo de valores de nitratos, ortofosfatos y valores altos de amonio.



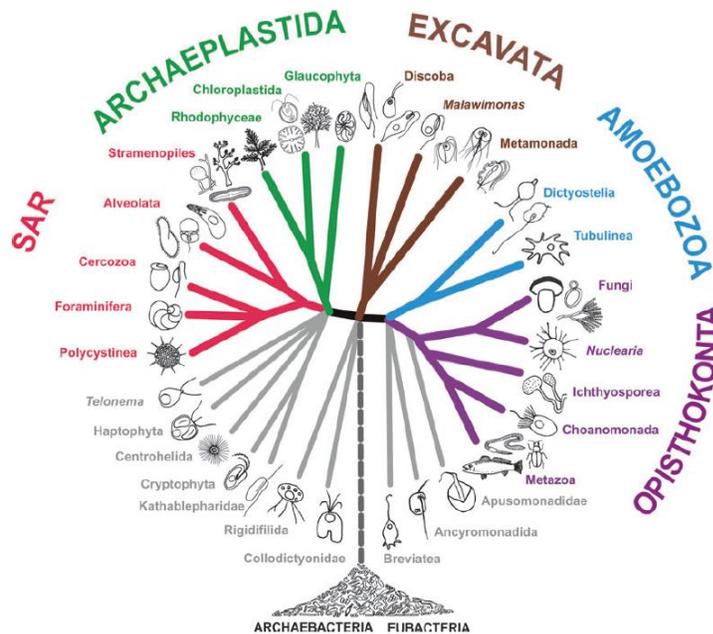
## INTRODUCCIÓN

En el mundo existen alrededor de 20,000 especies de algas verdes que crecen tanto en agua dulce, salobre, marina, así como en diferentes ambientes terrestres (Norton *et al.*, 1996). Estos organismos al igual que las plantas superiores, tienen un color verde debido a la clorofila a y b que contienen; por otra parte presentan células móviles que tienen dos flagelos lisos de la misma longitud cuyos cuerpos basales se organizan en forma de cruz o de manera unilateral. Durante muchos años, las clasificaciones taxonómicas propuestas sólo se establecían por caracteres morfológicos, pero desde hace cuatro décadas, con los resultados obtenidos a través de estudios moleculares, fisiológicos y ecológicos se han propuesto nuevos esquemas de clasificación (Hoek *et al.*, 1995; Adl *et al.*, 2012). Por ejemplo, nuevas investigaciones, se basan en la configuración mitótica a nivel de la telofase y la inserción flagelar de las células móviles para reclasificar las algas verdes, esta arquitectura flagelar se presenta en tres orientaciones distintas que son: sentido horario o “clockwise” (CW), sentido antihorario o “counterclockwise” (CCW) y directamente opuestos o “directly opposite” (DO) (Mattox y Stewart, 1984) (Figura 1). Actualmente las algas verdes comprenden diversos linajes (Graham *et al.* 2009).



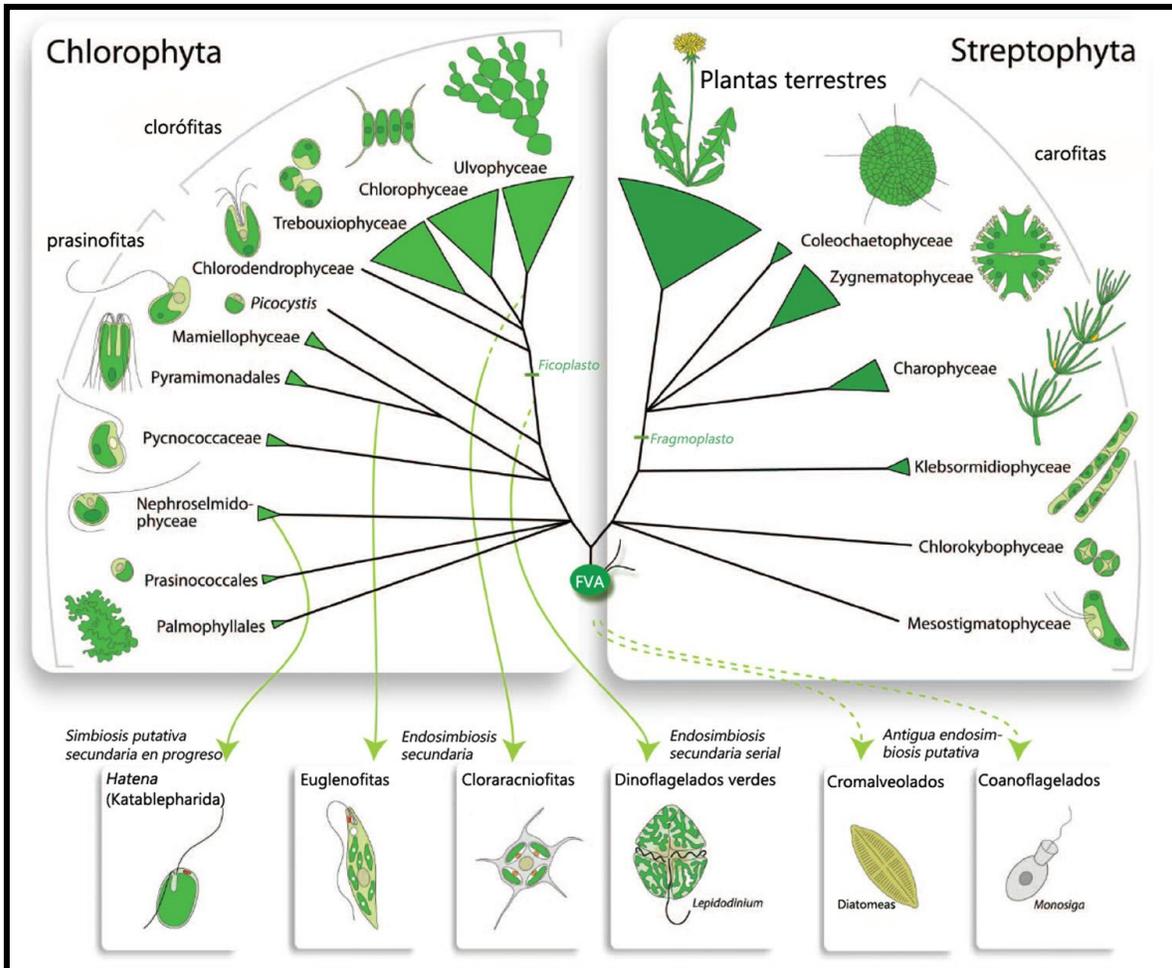
**Figura 1.** (Centro) Aparato flagelar hipotético ancestral visto desde arriba, donde los dos cuerpos basales están alineados teniendo disposición “directly opposite” o DO. (Izquierda) Cuerpos basales cruzados en disposición “counterclockwise” o CCW. (Derecha) Cuerpos basales cruzados en disposición “clockwise” o CW (Tomado y modificado de Van Den Hoek *et al.*, 1994).

Al principio Cavalier-Smith (1981) nombró como Viridiplantae a las plantas verdes, después Jeffrey (1982) las designó como Chlorobionta, mientras Kenrick y Crane (1997) como Chlorobiota. Así, en la clasificación de Cavalier-Smith (2004) las algas verdes y las plantas terrestres se encuentran en el reino Plantae y el subreino Viridiplantae, el cual se divide a su vez en los filos Chlorophyta, Bryophyta y Tracheophyta. Sin embargo, Adl *et al.* (2012) las clasificaron como el grupo “Chloroplastida” y no Viridiplantae a los organismos con un plasto, clorofilas a y b, centriolos y la presencia de pared celular con celulosa como pertenecientes a un supergrupo denominado “Archaeplastida”, en donde se encuentran los organismos con plastos fotosintéticos con clorofila a, proveniente de una endosimbiosis primaria ancestral con una cianobacteria; además de un plasto secundario perdido o reducido en algunos casos, con almidón como producto de reserva y aclaran que los nombres Chlorobiota y Chlorobionta no son aceptables debido a que existen muchos géneros “verdes” fuera de Archaeplastida y tampoco es aceptable Viridiplantae porque la mayoría de los géneros de este grupo mayor no son plantas, según las definiciones de estos mismos autores (Figura 2).



**Figura 2.** Filogenia de los eucariontes según la clasificación de Adl. *et al.* (Tomado de Adl *et al.*, 2012).

Las formas unicelulares conocidas como Prasinophyceae son las más antiguas divergentes de las modernas algas verdes, las cuales no forman un grupo monofilético, más bien son el conjunto de aproximadamente siete clados. Algo importante es que las Prasinophyceae están relacionadas a dos grandes clados, los cuales son nombrados como Streptophytas (Charophyta) y Chlorophytas también conocido como el clado UTC (Figura 3) (Graham *et al.* 2009).



**Figura 3.** Filogenia del linaje “verde” y propagación de genes “verdes en otros eucariontes (Tomado y traducido de Leliaert *et al.*, 2012). FVA=Flagelado verde ancestral.

El clado Chlorophyta, incluye las Clases **Ulvophyceae**, cuyos miembros crecen principalmente en ambientes marinos, **Trebouxiophyceae**, que son en su mayoría de agua dulce o terrestres e incluye a los géneros *Chlorella* y *Trebouxia*, y **Chlorophyceae**, que está formada por algas verdes de agua dulce (aunque también

hay terrestres), distinguiéndose por tener disposición CW o DO en las células móviles (Figura 3). Entre estas Clases, la Ulvophyceae divergió tempranamente, mientras que las otras dos son consideradas como grupos hermanos (Graham *et al.* 2009) y a su vez, la clasificación de Krienitz *et al.* (2003) reconoce que dentro de la Clase Chlorophyceae se ubican los órdenes Sphaeropleales y Chlorococcales.

El Orden Chlorococcales Marchand (1895) tuvo que ser usado a partir de 1915, ya que Bourrelly (1972) señaló el origen polifelético del mismo, además de que las investigaciones de la ultraestructura marcan los tres tipos de orientación de la arquitectura flagelar CW, CCW y DO; confirmándose aún más que se trata de un grupo artificial con varios linajes. A partir de estos avances, fueron propuestos cuatro órdenes: **Chlorococcales**, con zoósporas tipo Chlamydomona; **Protosiphonales**, con zoósporas tipo Dunaliella y células multinucleadas; **Chlorellales** con reproducción exclusivamente por autosporas y **Chlorokybales** con zoosporas con flagelos semejantes a las Charophyceae y con hábito sarcinoide (Graham *et al.* 2009).

En la década de los noventa, muchas Chlorococcales se ubicaron en el Orden Microthamniales según Melkonian (1990), y Deason *et al.* (1991) restablecieron el Orden **Sphaeropleales** incluyendo a organismos unicelulares, filamentosos o cenobiales que producen células móviles biflageladas con cuerpos basales en orientación DO y organismos autospóricos, cuya validez filogenética ha sido confirmada a través de estudios del ADN (Wilcox *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1992). Como se puede observar, la taxonomía de las algas ha sufrido constantes cambios, en particular las investigaciones en las regiones 18S del ADN ribosomal (ADNr), el 26S del ADNr (Buchheim *et al.*, 2001), el espaciador interno al transcrito 2 (ITS2) del ADNr (An *et al.*, 1999), así como la información combinada tanto del 18S como del 26S e información de genes cloroplásticos (*atpB*, *rbcl*) y nucleares (18S, 26S) han confirmado los cambios recientes en las clasificaciones taxonómicas (Tippery *et al.*, 2012).

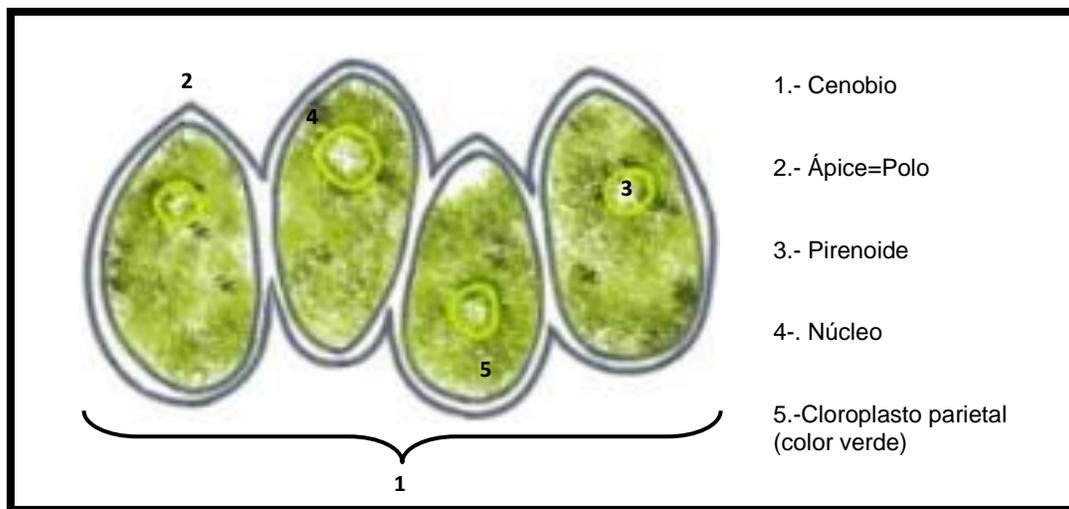
Estos cambios en la clasificación taxonómica de las algas siguen en continuo debate, debido a la gran diversidad morfológica que presentan, tales como la ornamentación de

la pared celular, las sustancias de reserva y la ultraestructura de los organelos, por lo que los taxónomos desde hace algunos años, utilizan la combinación tanto de observaciones morfológicas y de la ultraestructura, así como diversos marcadores moleculares para dilucidar entre las problemáticas de la clasificación de éstas, representando la secuenciación genética una herramienta cada vez más utilizada para apoyar el estatus taxonómico de cada taxón, así como sus relaciones filogenéticas (Kilian y Kroth, 2006; Van Hannen *et al.*, 2000).

Varios órdenes dentro de las Chlorophyceae han sido definidos con base en estos estudios moleculares, por ejemplo O'Kelly *et al.* (1994) señalan que las Oedogoniales, Chaetopeltidales y Chaetophorales son grupos monofiléticos. Para el Orden Sphaeropleales, sus géneros han sido también objeto de numerosos estudios taxonómicos y ecológicos, agrupándose por datos moleculares y por caracteres estructurales de las zoosporas o gametos. Actualmente, para este orden Guiry y Guiry (2014) reconocen 628 especies en el mundo distribuidas en diez familias: Ankistrodesmataceae, Bracteacoccaceae, Characiaceae, Hydrodictyaceae, Microsporaceae, Neochloridaceae, Radiococcaceae, Scenedesmaceae, Selenastraceae, y Sphaeropleales *incertae sedis*.

Un caso en particular es el del género *Scenedesmus* Meyen, 1829, perteneciente a la familia Scenedesmaceae. Los miembros de éste género se caracterizan por tener un cenobio laminar, recto o ligeramente curvo, con células generalmente en una o dos líneas, usualmente de dos, cuatro u ocho células, unidas lateralmente y acomodadas paralelamente una sobre la otra o alternadas; de forma alargadas o cilíndricas, ovoides, elipsoidales a ovoides, con ápices redondos, truncados, capitados o adelgazados; frecuentemente con espinas largas, dientes o costillas; con pared celular lisa, granular, espinosa o dentada; cloroplastos parietales, con un pirenoide y con reproducción asexual por autósporas liberadas por la fractura de la pared celular (Figura 4) (John *et al.*, 2002). Actualmente dentro de la familia Scenedesmaceae se reconocen 43 géneros: *Acutodesmus*, *Asterarcys*, *Astrocladium*, *Bilgramia*, *Chodatodesmus*, *Closteriococcus*, *Coelastrella*, *Coelastropsis*, *Coelastrum*, *Cohniella*, *Comasiella*,

*Crucigeniopsis*, *Danubia*, *Desmodesmus*, *Dimorphococcus*, *Enallax*, *Gilbertsmithia*, *Gloeoactinium*, *Hariotina*, *Hofmania*, *Hylodesmus*, *Komarekia*, *Lauterborniella*, *Neodesmus*, *Pectinodesmus*, *Pseudotetrastrum*, *Scenedesmus*, *Schistochilium*, *Schmidledesmus*, *Schmidleia*, *Schroederiella*, *Soropediastrum*, *Staurogenia*, *Suxenella*, *Tetradesmus*, *Tetrallantos*, *Tetranephris*, *Tetrastrum*, *Truncatulus*, *Verrucodesmus*, *Westella*, *Westellopsis* y *Willea* (Guiry y Guiry, 2014; Hegewald *et al.*, 2010).



**Figura 4.** Ilustración de un organismo del género *Scenedesmus*.

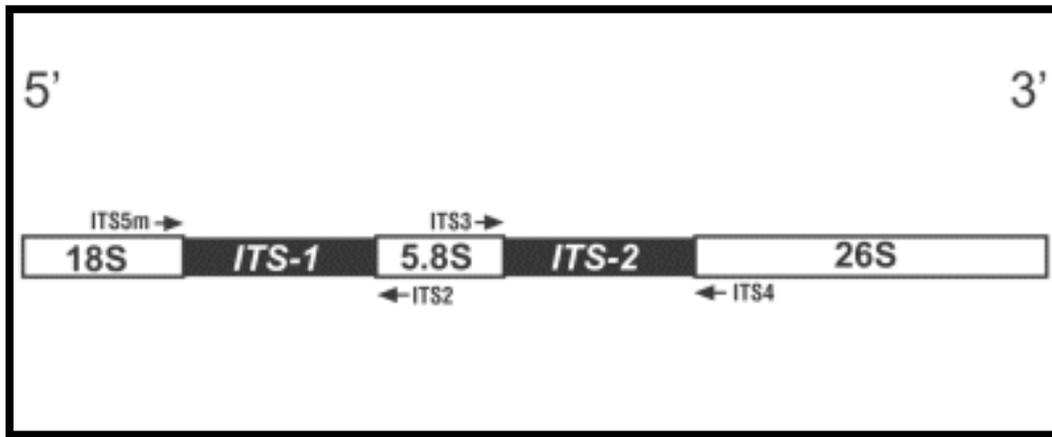
Durante su crecimiento muchas ecoformas se desarrollan a lo largo de su ciclo biológico, por ello ha sido difícil determinar el número de especies que comprenden el género *Scenedesmus sensu latum* (Van Hannen *et al.*, 2000). Vanormelingen (2007) y John *et al.*, (2002) han indicado que la morfología es inducida por las condiciones ambientales, por lo que este *taxa* presenta pleomorfismo y consecuentemente podría estar sobrevalorado el número de especies. Por ejemplo, las investigaciones de Trainor (1969, 1998) reconocieron 30 especies, ya que observó que la morfología del cenobio cambia con base en la composición mineral del medio de cultivo. En contraste, Hegewald y Silva (1988) en su catálogo indicaron 1,300 *taxa* intraespecíficos. Por su parte, Guiry y Guiry (2014) reconocen 231 especies.

Para la determinación taxonómica de éste género basándose en la morfología, algunos de los caracteres que se consideran son: el arreglo del cenobio, la forma de las células,

la presencia de espinas, dientes, crestas y otras ornamentaciones, sin embargo dados los antecedentes, estos caracteres deben tomarse con reserva al momento de su determinación taxonómica. Por ejemplo, Guiry y Guiry (2014) mencionan que el subgénero *Desmodesmus* ha sido aceptado como un género bien definido por estudios basados en 18S e ITS2 del ADNr por autores como Kessler *et al.* (1997) y Van Hannen *et al.* (2002), aunque la delimitación de especies es problemática. De hecho Trainor *et al.* (1976) ya habían propuesto que las formas con espinas y sin espinas corresponden a dos géneros distintos, según las características fenotípicas y fisiológicas; a esto se le suman las investigaciones de An *et al.*, (1999) quienes evaluaron a través de la secuenciación del ITS-2 del ADNr algunas especies de *Scenedesmus*, confirmando que se debería de dividir en dos géneros: *Scenedesmus sensu stricto* y *Desmodemus*; el primero con una pared celular de tres capas de esporopolenina y el segundo con cuatro capas, además de espinas.

Dentro de los estudios moleculares, Kessler *et al.* (1997) mencionan que la alta conservación del gen 18S no permite la comparación específica del subgénero, mientras que An *et al.* (1999) consideraron que debido a la gran variabilidad natural de la región ITS2 se pueden distinguir cepas dentro del mismo género *Scenedesmus*. Después Hegewald (2000) transfirió más de 32 especies y 22 variedades del género *Scenedesmus* a *Desmodesmus*. También Van Hannen *et al.* (2000) propusieron que la región ITS2 es una característica para la determinación del género, de este modo ellos secuenciaron esta región y el gen 5.8S ADNr de cepas pertenecientes a *S. obliquus*, *S. acutus* y *S. naegelii*, donde encontraron que la distancia genética entre éstas es menor que entre otras del mismo género, proponiendo su reubicación de todas en *S. obliquus*. Por otra parte, Vanormelingen *et al.* (2007) realizaron comparaciones entre las secuencias de la región ITS-2 del ADNr y la morfología de la pared celular de 22 cepas de *Desmodesmus costato-granulatus*; debido a los resultados entre estas dos características fueron divididas en cinco especies: *D. costato-granulatus*, *D. elegans*, *D. fennicus*, *D. regularis* y *D. ultrasquamatus*. El Searcy (2011) confirmó que el marcador ITS2 ayudó a ratificar la identificación de los organismos con los que trabajó en

comparación con el marcador 18S ARN que no discriminó entre las especies. Estas regiones utilizadas se muestran en la Figura 5.



**Figura 5.** ADN nuclear donde se indican el orden de los genes que codifican para las unidades 18S, 5.8S y 26.S del ARN ribosomal y entre ellos se encuentran las regiones ITS1 e ITS2 del ADN nuclear, así como algunos de los principales primers utilizados, "directo" ("forward" en inglés) (→) y "reverso" ("reverse" en inglés) (←) para aislar estas regiones (tomado de Polans y Saar, 2003).

Algo en común dentro de todos estos estudios es el objetivo de certificar la delimitación taxonómica de cada cepa, ya que resulta relevante por el número creciente de trabajos relacionados con su potencial biotecnológico, entre estos últimos, Abdel Hameed y Hammouda (2007) citan la capacidad de *Scenedesmus obliquus* para producir hidrógeno, y la de *S. bicellularis*, *S. bijugatus*, *S. intermedius*, *S. obliquus*, y *S. quadricauda* para remover fósforo y nitrógeno de aguas residuales, así como metales pesados, *S. quadricauda* (junto con *Chlorella ellipsoida* y *Navicula canalis*) y *S. obliquus* para remover Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb y Zn. En México, Almaraz (2013) indicó el potencial de remoción de nutrientes tales como nitrógeno y fósforo de *S. obtusus*, tanto inmovilizado como libre en aguas residuales tratadas, proponiendo su manejo junto con *Chlorella vulgaris* en humedales para evaluar su eficiencia en campo y diseñar un manejo integral en las cuencas de abastecimiento de agua potable.

Actualmente, el estudio de la biodiversidad de las algas no sólo se limita al registro del número de especies, sino también al registro filogenético, morfológico, ecológico, geográfico y genético. Novelo y Tavera (2011) indican que aproximadamente la mitad de las especies mexicanas de algas dulceacuícolas conocidas son organismos que

crecen en la zona central del país, en tanto que muchas de las entidades federativas no cuentan con la información relativa a su ficoflora, es decir, más de la mitad de los estados de México han sido poco explorados. Lo anterior permite señalar que aún son necesarias investigaciones ficoflorísticas. En contraste, explican que países europeos y norteamericanos que cuentan con floras algales bien documentadas, pueden diseñar programas de conservación, así como planes productivos o de impacto económico; por lo que, mientras mejor se conozcan los recursos ficológicos autóctonos, se podrán implementar propuestas viables de conservación tanto de las especies como de los ambientes nacionales.

En principio para estudiar la biodiversidad algal, es conveniente ver el nivel de conocimiento que se tiene sobre los registros de este género, con apoyo de una base de datos validada por expertos del tema, la cual permita delimitar el número de especies citadas para el país y que sirva de base para desarrollar nuevas investigaciones para aquellos *taxa* que necesiten una revisión taxonómica más amplia.

El presente estudio está enfocado principalmente en el análisis morfológico y molecular de especies del género *Scenedesmus sensu latum* que se localizan en diferentes ambientes dulceacuícolas de México.



## OBJETIVO GENERAL

---

Contrastar taxonómicamente algunos organismos del género *Scenedesmus sensu lato* de México, utilizando herramientas morfológicas y moleculares.

### OBJETIVOS PARTICULARES

-Identificar la distribución regional del género *Scenedesmus* en México utilizando los registros publicados durante el periodo de 1941 a 2008.

-Identificar algunas condiciones físicoquímicas de los *taxa* colectados: temperatura, pH, amonio, nitratos, ortofosfatos, oxígeno disuelto, alcalinidad y dureza.

-Describir el material biológico de estudio con base en el concepto de especie morfológica, de las cepas aisladas unalgales del género en estudio a través de microscopía de luz (ML) y microscopía electrónica de barrido (MEB).

-Analizar las cepas estudiadas a partir de la secuencia de la región ITS2 del ADNr, con base en el concepto de especie filogenética.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Documentación bibliográfica*

- A) Se concentraron los registros publicados del género *Scenedesmus sensu latum* en México del periodo 1941-2008 en una base de datos en Excel™ de Microsoft®.
- B) Captura de la información: Se diseñó el siguiente formato para reunir la información de los datos taxonómicos, geográficos y la referencia bibliográfica de cada registro.

REGISTRO DE LA INFORMACIÓN BIBLIOGRÁFICA	
Clase _____	Orden _____
Familia _____	Género _____
Especie _____	Variedad _____
Nombre válido _____	
Periodo de colecta _____	
Localidad _____	Entidad federativa _____
Autor _____	Página(s) del artículo donde está el registro _____
Cita _____	Año _____ Observaciones _____

- C) Actualización de la nomenclatura. Se verificó y actualizó el nombre válido a través de la consulta de “Algae base” (<http://www.algaebase.org/>) (Guiry y Guiry, 2014), así como bibliografía especializada del género (Hegewald *et al.*, 2010).
- D) Análisis de la información contenida en el banco de datos: Se reconoció la riqueza taxonómica a través de las publicaciones ficológicas y se observó la frecuencia de registro. Con esta información se puede delimitar qué especies podrían ser encontradas con mayor probabilidad, cuáles son las más frecuentes, cuáles son las entidades federativas en donde más estudios se han realizado respecto al género y cuáles especies pueden ser nuevos registros.

## Obtención del material biológico

Se trabajó con material biológico de nueve localidades correspondientes a seis entidades federativas del país, el cual se obtuvo por medio de colectas *in situ*, cultivos unialgales del cepario IZTA y de la UAM Iztapalapa (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Información del origen del material biológico estudiado. \*Organismos colectados por el autor.

No. de cepa	Localidad	Entidad federativa	Obtención	Hábitat	Fecha de colecta	Coordenadas geográficas
1	Lago de Catemaco	Veracruz	Herbario IZTA	Lago	enero 2011	18°24'36"N 95°05'51"O
2	Pirámide de las Flores en Xochitécatl	Tlaxcala	Herbario IZTA	Depósito de agua	diciembre 2011	19°14'41"N 98°20'59"O
3	Jardín Botánico de Campeche "Xmuch'Haltun"	Campeche	Herbario IZTA	Depósito de agua	diciembre 2011	19°50'52"N 90°32'06"O
4	Universidad Iberoamericana	Puebla	UAM Iztapalapa	Lago artificial de la Uni Ibero	marzo 2010	19°01'57"N 98°14'29"O
5	Río Amacuzac (cerca de una cascada)	Morelos	*	Río	marzo 2012	18°28'46"N 99°09'10"O
6	Laguito Santa Cruz del Rincón	Edo. de Méx.	*	Charco	abril 2012	19°40'05"N 100°06'10"O
7	Planta de tratamiento de aguas del Mpo. San José del Rincón	Edo. de Méx.	*	Agua residual	abril 2012	19°40'04"N 100°09'25"O
8	Laguna Villa Victoria	Edo. de Méx.	*	Laguna	abril 2012	19°27'24"N 100°02'21"O
9	Granja de cultivo de peces	Veracruz	UAM Iztapalapa	Estanque	2012	-

## Exploraciones ficológicas

Los lugares donde se realizaron colectas fueron: el Estado de México y Morelos debido a que pertenecen a la zona centro del país, además porque se conocía por la base de datos que ya cuentan con registros del género *Scenedesmus*. Para la colecta se utilizaron frascos de plástico de 100 mL y éstas se tomaron directamente o con una red de fitoplancton de 20 µm de apertura de malla.

## Aislamiento de las cepas

Se obtuvieron cultivos unialgales por aislamiento de un cenobio a través de una pipeta Pasteur adelgazada. Se tomó una gota con un solo organismo y se diluyó en tubos de

microcentrífuga de 1.5 mL con medio basal Bold modificado en un ciclo de luz 12:12, a temperatura ambiente, con una intensidad lumínica de  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  producida por lámparas fluorescentes (Andersen, 2005; Vanormelingen *et al.* 2007). Una vez comprobado el aislamiento del organismos (cultivo unialgal), se escaló a frascos de 10 mL con medio Fertiplus® (anexo 1) y después una segunda fase de escalamiento se realizó en 400 mL y se colocaron en un periodo de luz continua de 24 horas para la obtención de biomasa (Almaraz, 2013).

### *Determinación taxonómica*

Los organismos fueron determinados *in vivo* usando las claves de John *et al.* (2002) y Godinho *et al.* (2010). Para la delimitación de algunos caracteres se realizaron tinciones con azul de cresil y verde brillante (Kumar y Singh, 1979). Paralelamente se tomaron fotografías con una cámara Sony de 14 megapíxeles con filtro azul en un microscopio óptico marca Nikon. La validez taxonómica de las especies determinadas se corroboró en la base de datos de “Algae Base”.

### *Microscopia electrónica de barrido (MEB)*

A partir de los cultivos aislados se preservó el material biológico con glutaraldehído al 2%. Cada muestra se colocó en pequeñas bolsas de papel arroz y se dejaron reposar 30 min. en un buffer de fosfatos; posteriormente se realizó una post-fijación con vapores de tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) por 15 min., después se pasaron por un tren de etanol del 30% al 100% (con diferencia de 10% en cada paso), para finalmente llevarlas a punto crítico en un aparato de marca Quórum Q 150R ES Emitech (Kim & Takamura, 2000; Vanormelingen *et al.*, 2007). Después el material biológico se montó en discos de doble contacto y finalmente se recubrió con oro en un equipo Emitech k550 para su observación en un microscopio electrónico de barrido marca Hitachi modelo SU1510. Esta sección del trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de microscopia del Instituto de Biología de la UNAM con el apoyo de la M. en C. Berenit

Mendoza Garfias y en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Fes Iztacala con el M. en C. Rafael Emiliano Quintanar Zúñiga.

### *Extracción de ADN, PCR y secuenciación*

Las muestras utilizadas para el análisis molecular fueron obtenidas a partir de los cultivos unialgales. El ADN genómico de cada una de las especies de *Scenedesmus* aisladas, fue extraído utilizando los métodos DNeasy Plant kit (QIAGEN, 2006) y el kit MO-BIO; siguiendo las instrucciones del fabricante.

El ADN se almacenó a -20°C y para la verificación del correcto aislamiento del ADN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, adicionado con MIDORI GREEN™ como intercalante. Posteriormente, se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR en inglés) con los primers 1800 directo (ACCTG CGGAA GGATC ATT) (Helms *et al.*, 2003) e ITS4 reverso (TCCTC CGCTT ATTGA TATGC) (White, 1990), en las condiciones descritas por Van Hannen *et al.* (2000) y Hegewald y Wolf, (2003).

Los amplicones se observaron de la misma manera por electroforesis horizontal. Por su parte, la secuenciación se realizó con un equipo Genetic Analyzer 3130 XL de 16 capilares, 36 cm y 50 cm llenados con soporte POP 6 y las reacciones con el paquete BigDye 3.1; los reactivos y equipo son de marca Applied Biosystem.

### *Análisis filogenético*

Los cromatogramas fueron analizados usando los softwares Chromas y 4Peaks, mientras que el alineamiento de las secuencias se realizó de manera manual usando el software Geneious ver. 6.1.6., junto con la herramienta de búsqueda de alineación local básica BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de la base de datos del Centro

Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI) utilizándose las secuencias de los organismos con los que existiera un mayor porcentaje tanto de identidad como de homología.

Con ayuda del mismo software Geneious ver. 6.1.6., se realizó un árbol filogenético de las nueve secuencias obtenidas en este trabajo junto con 10 secuencias del NCBI que tenían el mayor porcentaje de identidad (I) y cobertura (C) con las cepas estudiadas. Los alineamientos fueron analizados con “Find Model” (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/findmodel/findmodel.html>) para obtener el mejor modelo que determine las relaciones filogenéticas. El método Neighbor-Joining se utilizó para la construcción de los árboles y se utilizó el modelo Jukes-Cantor con el método de “Bootstrap” para el remuestreo con un número de réplicas de 1,000. Como grupo externo se utilizó *Pediastrum duplex* Meyen [AY577757] (Hegewald *et al.*, 2010).

### *Cuantificación de variables fisicoquímicas*

En cada uno de los sistemas acuáticos donde se realizaron colectas, se registraron los siguientes parámetros: temperatura con un termómetro de mercurio marca Brannan®, pH del agua con ayuda de un potenciómetro portátil marca Conductronic®, cantidad de amonio, nitratos y ortofosfatos que se cuantificaron con la técnica de Nessler, reducción de cadmio y método de molibdovanato, respectivamente, utilizando un espectrofotómetro marca Hach® modelo DR2800 (APHA, 1995), la concentración de oxígeno disuelto mediante la técnica de Winkler modificada, la alcalinidad y dureza total por métodos titulométricos (Robles *et al.*, 2008) y las coordenadas geográficas quedaron registradas con un GPS marca Maguellan® modelo Meridian.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Documentación bibliográfica*

La información taxonómica del género *Scenedesmus* en México a lo largo de los últimos 67 años fue documentada del periodo de 1941 al 2008. A partir de 23 citas se registraron 63 *taxa* diferentes y la distribución del género en nueve entidades federativas: Estado de México, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz y el Distrito Federal (Figura 6).

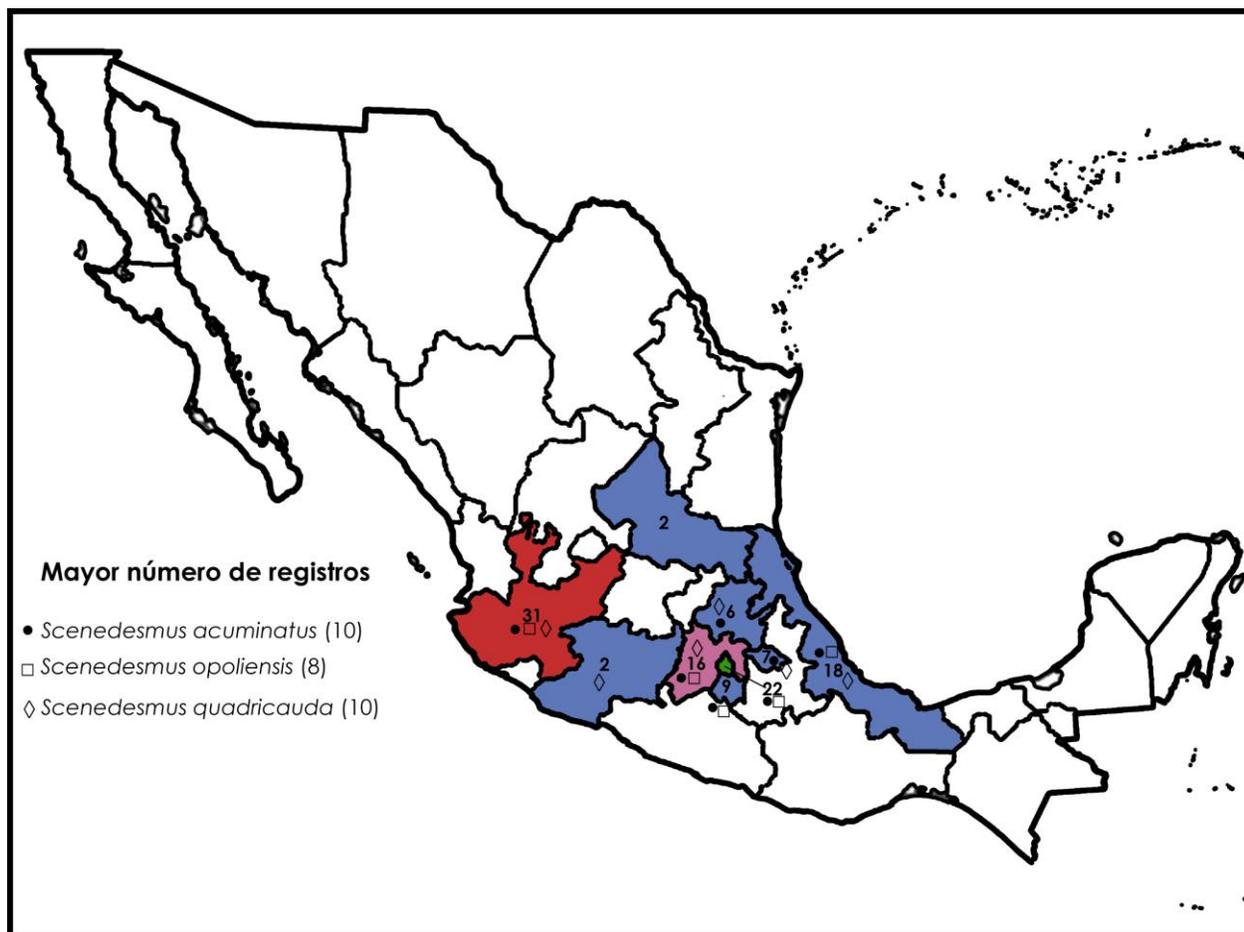
De los 166 registros incluidos en la base de datos elaborada, sólo se consideraron 138 cuyos nombres válidos fueron respaldados con base a la consulta de “Algae base”.

La información también reveló que 37 especies han sido citadas una vez, en contraste con *Scenedesmus acuminatus*, *Desmodesmus quadricauda* = *Scenedesmus quadricauda* y *Scenedesmus opoliensis* que fueron las especies con mayor número de registros, las dos primeras con 10 cada una y la última con ocho, en diferentes entidades federativas del centro del país.

Por otra parte, 20 fueron las especies que se consideraron de interés ya que no se encontraron en la base de datos de “Algae base” o por la necesidad de ser confirmadas; por ejemplo Novelo *et al.*, (2007) indica que *Scenedesmus similagineus* se encuentra en la Cantera Oriente en el Distrito Federal y que esta especie sólo está registrada en Hungría y Francia por lo que se requiere confirmar su identidad taxonómica.

Esta información muestra la necesidad de continuar los estudios ficoflorísticos que permitan conocer la diversidad de este género en México ya que, sólo en nueve entidades federativas se registran estos organismos; por lo que se confirma lo señalado por Novelo y Tavera (2011), quienes mencionan que en gran parte del territorio

nacional faltan exploraciones ficológicas para reconocer nuestros recursos, así como describir las nuevas especies del género *Scenedesmus* (Guiry y Guiry, 2014)(Figura 6).



**Figura 6.** Distribución del género *Scenedesmus* en el país, en las nueve entidades federativas señaladas en color; el mayor número de registros corresponde a Jalisco con 31 especies, en seguido el Distrito Federal con 22 y por último el Estado de México con 16. Se indican (●, □, ◇) las tres especies con mayor número de registros.

### Cuantificación de variables fisicoquímicas

En el cuadro 2 se presentan las características fisicoquímicas de las localidades donde se realizaron las colectas. No se incluyen los datos de aquellas especies obtenidas de los ceparios.

Los cuerpos de agua donde se colectaron los organismos fueron reservorios con una buena cantidad de oxígeno disuelto, los valores obtenidos son los niveles recomendados para el crecimiento de muchas especies acuáticas del plancton (Gama

*et al.*, 2010). La temperatura es típica de ambientes tropicales y la dureza total registrada mostró valores de 72 a 97 mgCaCO<sub>3</sub>/L lo cual indica con base en la clasificación de Rodier, J. (1981) un ambiente satisfactorio para la vida acuática.

*Acutodesmus obliquus* fue el único taxón que se localizó en varias localidades donde las condiciones ambientales registraron amplios intervalos físico-químicos como nitratos (0.2 -1.4 mg/L N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), ortofosfatos (0.1- 12.9 mg/L PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) e incluso valores altos de amonio (0.13 - >2.5 N-NH<sub>3</sub>). Con esta información se observa la gran variedad de condiciones ambientales en donde este organismo puede desarrollarse vegetativamente y por tanto expresar diferentes ecoformas (Cepák y Přibyl, 2006).

**Cuadro 2.** Variables fisicoquímicas medidas en las zonas donde se realizaron colectas en el presente trabajo. En algunos casos (\*) no se tiene registro.

Lugar	pH	Temp. Agua (°C)	Alcalinidad (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Dureza (mg/L CaCO <sub>3</sub> )	Oxígeno disuelto (mg L <sup>-1</sup> )	Nitrato (mg/L N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	Amonio (mg/L N-NH <sub>3</sub> )	Ortofosfatos (mg/L PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )
Río Amacuzac (cerca de una cascada)	7.8	29	46	72	7.5	0.14	*	*
Laguito Santa Cruz del Rincón	8	18	51	74	6.7	0.5	0.21	0.1
Planta de tratamiento en San José del Rincón	7.2	20	76	97	6.7	1.4	>2.5	12.9
Laguna Villa Victoria	7.8	20	57	85	6.3	0.2	0.13	0.8

## *Determinación taxonómica*

### ***Acutodesmus obliquus* (Turpin) Hegewald et Hanagata 2000**

=*Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing var. ***obliquus***,

*Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing 1833

*Achnanthes oblique* Turpin 1828

John *et al.*, 2002:394, lam. 96O; Godinho *et al.*, 2010:542, Figs. 96-105; Comas, 1996:251, Fig. 51.

## **DESCRIPCIÓN**

Godinho *et al.* (2010) mencionan que esta especie presenta gran variabilidad morfológica y al igual que Comas (1996) señalan dos variedades para la especie: *S. obliquus* var. *dimorphus* y *S. obliquus* var. *obliquus*, la primera con polos ampliamente fusiformes y la segunda con polos entre redondos y acuminados.

Las diferentes expresiones morfológicas del taxón observadas por el autor se muestran en las Figuras 7-12.

## **DISTRIBUCIÓN MUNDIAL**

Isla Ellesmere en el ártico, Andorra, las Islas Baleares, Inglaterra, Portugal, Rumania, España, las islas Canarias, Cuba, Brasil, Irán, China, Singapur, Nueva Gales del Sur, Nueva Zelanda y en Australia en Queensland y Victoria (Guiry y Guiry, 2014).

## LOCALIDADES ESTUDIADAS:

**1.- Lago de Catemaco, Veracruz:** Cenobios planos presentes de manera ocasional de 4 células arregladas alternadamente. En cultivo se presentaron más grandes y solitarias midiendo 4-12 µm de ancho y 7-12 µm de largo, las células eran ovaless-fusiformes, un poco convexas sobre todo en cultivo, con los polos de las células acuminados-redondos (Figura 7).

*NOTA:* El material coincidió con *S. obliquus* var. *obliquus* y no con *S. obliquus* var. *dimorphus* como se pensó al principio.

**2.- Jardín botánico X'much haltún, Campeche:** Cenobios planos de 2-4 células alternadas, cada una de 5-6  $\mu\text{m}$  de ancho y 10-14  $\mu\text{m}$  de largo. Células fusiformes a elipsoidales, rectas en el caso de las células internas y las marginales lunadas hacia afuera. En cultivo con Fertiplus se presentaron de manera totalmente aislada y ampliamente convexas, aunque los polos siguieron terminando en punta mucronada (Figura 8).

**3.- Universidad Iberoamericana, Puebla:** Células de 4-7  $\mu\text{m}$  de ancho y 9-12  $\mu\text{m}$  de largo, rectas o ligeramente curvas en forma de huso que se adelgazaban en un ápice obtuso. Desde la obtención del cultivo, este se presentó sin el cenobio por lo que se desconoce su arreglo (Figura 9).

**4.- Laguito Santa Cruz del Rincón, Estado de México:** Cenobios planos de 4 células ligeramente alternadas. Células de 3-5  $\mu\text{m}$  de ancho y 6-8  $\mu\text{m}$  de largo, ovales-cilíndricas con los polos levemente agudos y las células de los extremos convexas. En medio de cultivo se presentaron de manera aislada, más ovales y con los polos ligeramente obtusos (Figura 10).

**5.- Planta de tratamiento de aguas residuales en San José del Rincón, Estado de México:** Cenobios planos formados por 4 células, ordenadas de manera lineal u ocasionalmente alternadas, alargadas-elípticas de 3.6-4.5  $\mu\text{m}$  de ancho y de 6-10  $\mu\text{m}$  de largo, con ápices adelgazados en uno de los extremos, aunque en cultivo se presentaron más convexas y con algunos de los polos redondeados (Figura 11).

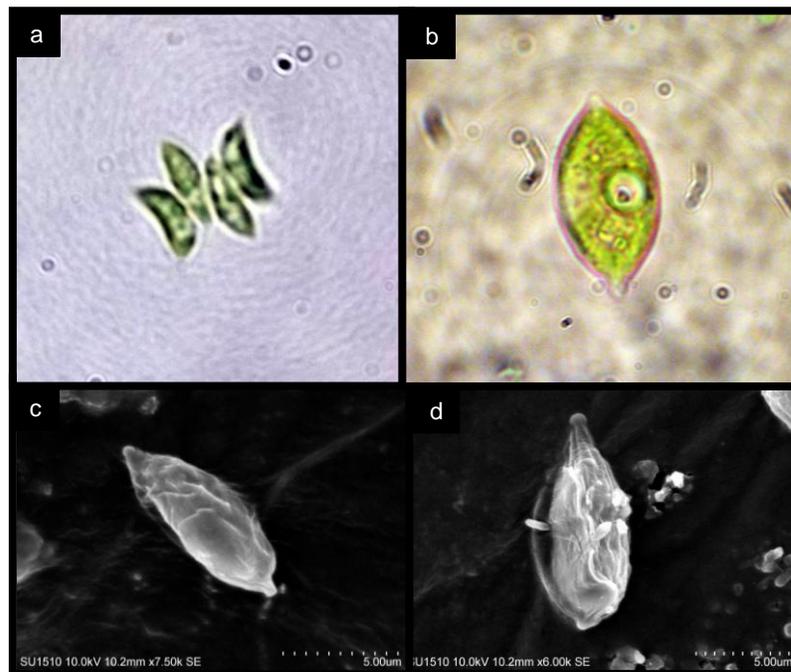
**6.- Laguna Villa Victoria, Estado de México:** Cenobios planos de 4 células con un arreglo marcadamente alterno, midiendo 4-5  $\mu\text{m}$  de ancho y 6-10  $\mu\text{m}$  de largo, ovales-cilíndricas, sin espacios intracelulares, con las células de los extremos convexas y todas con los polos redondeados aunque algunas eran ligeramente puntiagudas o

presentaban una pequeña punta. En medio Fertiplus, se presentaron tanto en cenobio como células aisladas redondas (Figura 12).

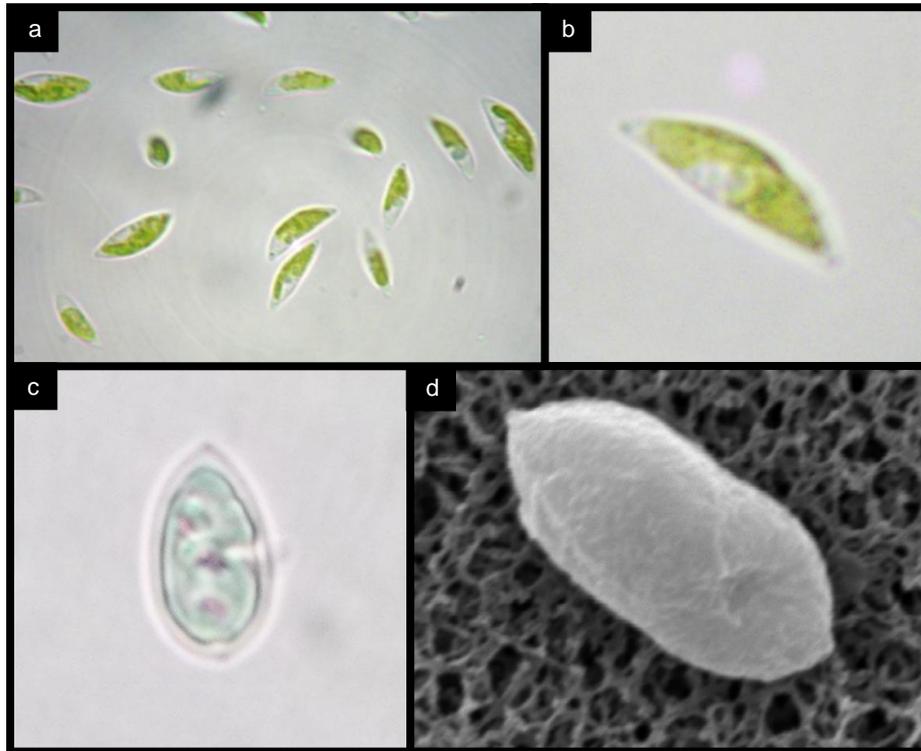
Notas: Al principio se consideró como *S. obtusus*, ya que la literatura menciona que éste último no siempre presenta los ápices obtusos y se puede observar una pequeña verruga subpolar, sin embargo tampoco se observó engrosamiento de la pared celular, ni mucílago; características de la misma especie; por lo que se determinó finalmente como *S. obliquus* = *A. obliquus* ya que las células eran mayormente de ápices agudos.



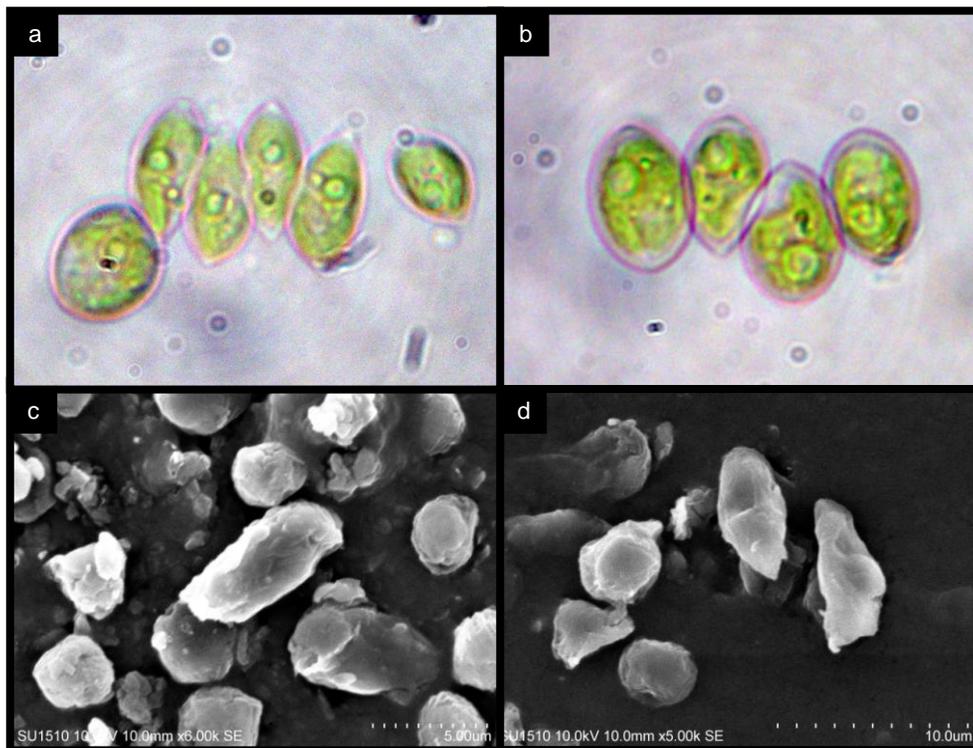
**Figura 7.** *Acutodesmus obliquus* aislado del lago de Catemaco, Veracruz. **a)** Forma del organismo antes del aislamiento, visto a 1250X. **b)** En cultivo, después de 14 días en medio con Fertiplus, visto a 40X.



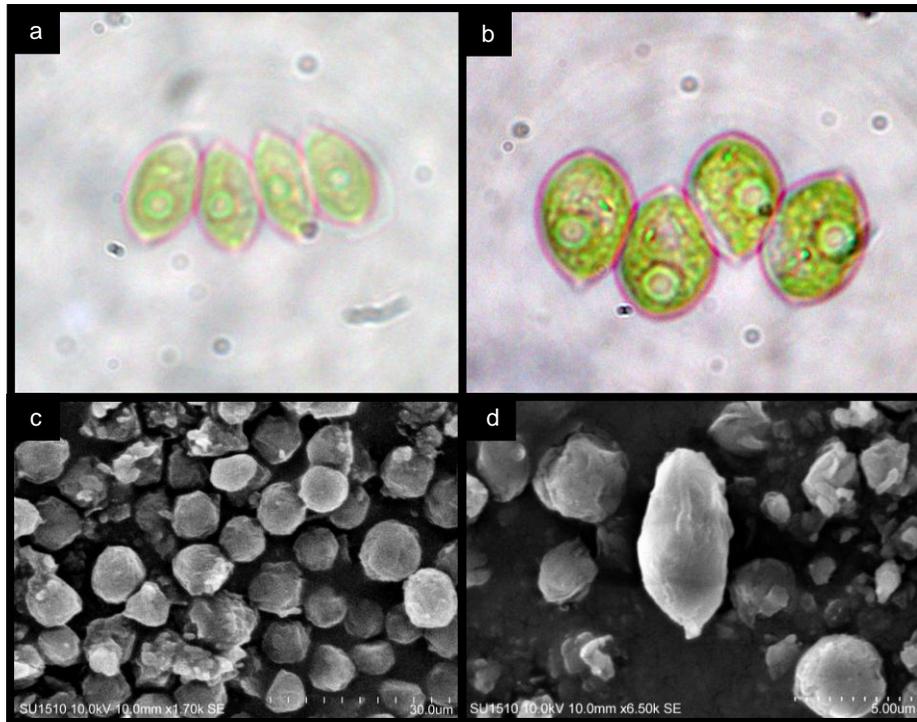
**Figura 8.** *Acutodesmus obliquus* aislado del Jardín botánico X'much haltún, Campeche. **a)** Forma del organismo visto a 40 X antes del aislamiento con las células de los extremos lunadas y **b)** después de ser cultivada por 14 días en medio con Fertiplus en 1250X. **c)** y **d)** Fotografías tomadas en MEB.



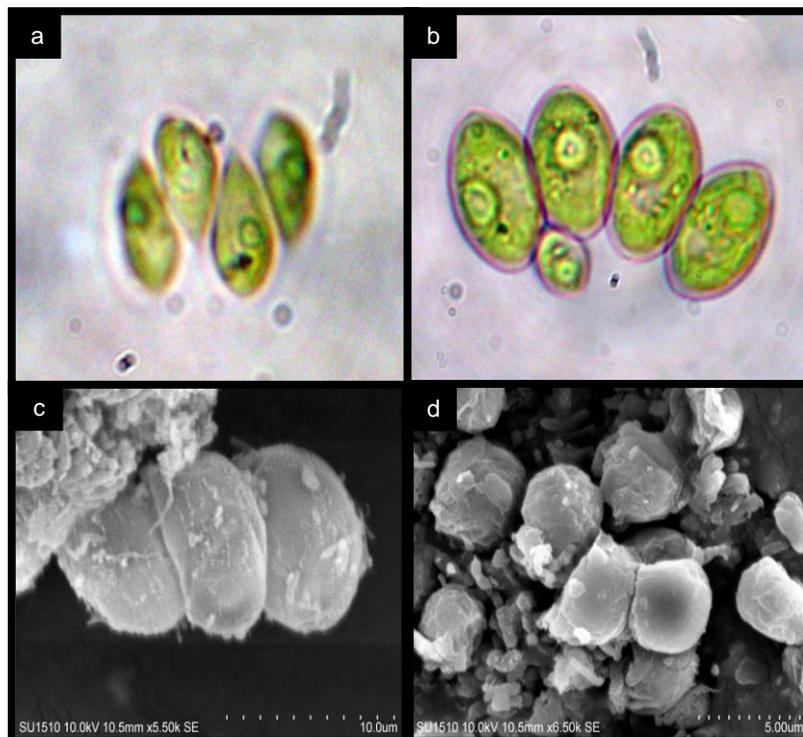
**Figura 9.** *Acutodesmus obliquus* aislado de la planta piloto de cultivo de microalgas de la Universidad Iberoamericana, Puebla. **a)** Forma del organismo a 40X antes del aislamiento y **b)** a 1250X. **c)** Vista a 1250X después de ser cultivada por 17 días en medio Fertiplus. **d)** Pared lisa vista en MEB.



**Figura 10.** *Acutodesmus obliquus* aislado del laguito Santa Cruz del Rincón, Veracruz. **a)** Forma del organismo antes del aislamiento, visto a 1250X y **b)** después de ser cultivada por 17 días en medio con Fertiplus, mientras que en **c)** y **d)** se observa la pared lisa en MEB.



**Figura 11.** *Acutodesmus obliquus* aislado de la planta de tratamiento en San José del Rincón, Estado de México. **a)** Forma del organismo antes del aislamiento, visto a 1250X y **b)** después de ser cultivada por 17 días en medio con Fertiplus. En MEB **c)** y **d)** se aprecian los extremos de las células, después del cultivo en Fertiplus, un poco alargados y con la pared lisa.



**Figura 12.** *Acutodesmus obliquus* aislado de la laguna Villa Victoria, Estado de México. **a)** Forma del organismo antes del aislamiento y visto 40X y **b)** en 1250X después de ser cultivada por 17 días en medio Fertiplus, se aprecian las puntas agudas. **c)** y **d)** Cenobios alineados con la pared lisa, margen exterior convexo en las células externas, vistos con MEB.

## ***Desmodesmus armatus* (R. Chodat) E. Hegewald 2000**

=*Scenedesmus armatus* (R. Chodat) R. Chodat 1913,

*Scenedesmus hystrix* var. *armatus* R. Chodat 1902

John *et al.*, 2002:389, lam. 94I; Godinho *et al.*, 2010: 526, Figs. 28-32

### **DESCRIPCIÓN**

Godinho *et al.* (2010) mencionan que esta especie presenta gran variabilidad morfológica.

### **DISTRIBUCIÓN MUNDIAL**

Isla Ellesmere en el ártico, Inglaterra, Portugal, Rumania, España, China, Nueva Gales del sur, Queensland, España, Brasil y Singapur (Guiry y Guiry, 2014).

Las diferentes expresiones morfológicas del taxón observadas por el autor se muestran en las Figuras 13-14.

#### **LOCALIDADES ESTUDIADAS:**

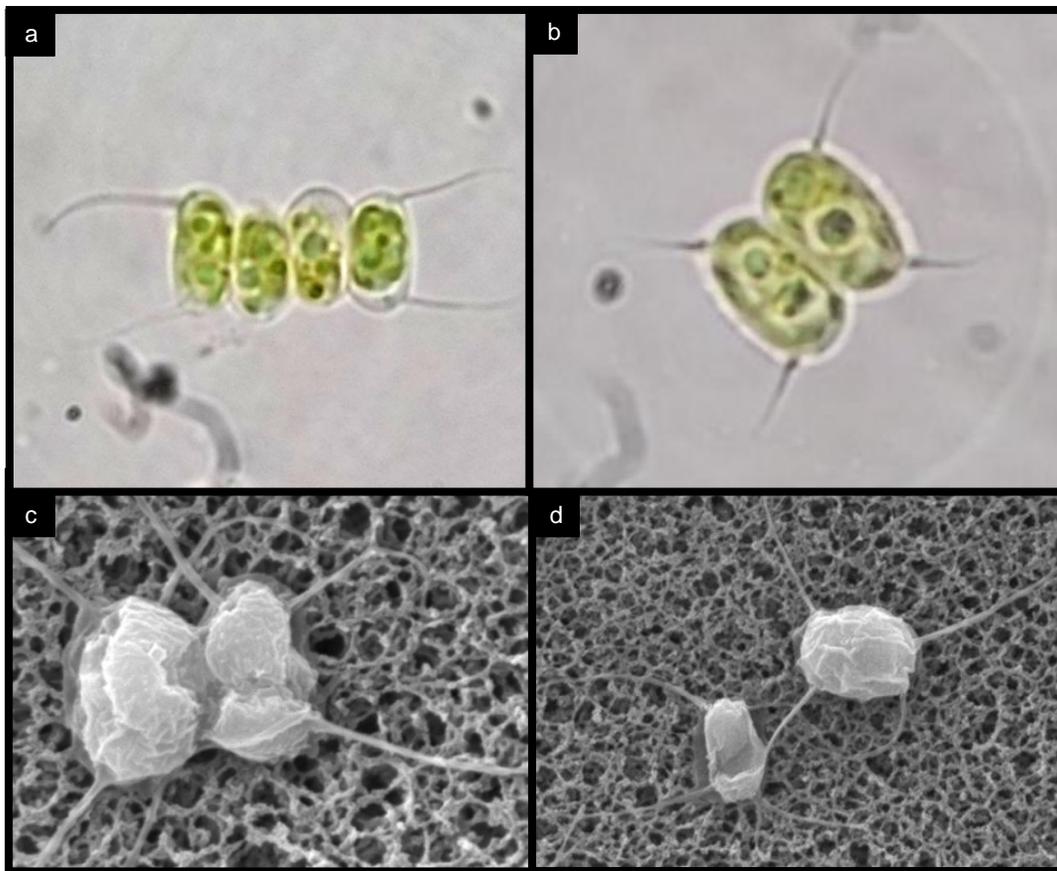
**1.- Pirámide de las Flores en Xochitécatl, Tlaxcala:** Cenobios planos, lineares de 2-4 células, cada una de estas de 2.7-3.7  $\mu\text{m}$  de ancho y 6.4-8.2  $\mu\text{m}$  de largo, elipsoidales-cilíndricas con los polos de las células marginales redondeados, en cada uno de éstos presentó una espina larga (de la mitad del tamaño de la célula) mientras que las células internas presentaron ocasionalmente espinas delgadas en sus polos; éstas mismas células tenían una costillas que llegaba hasta la mitad de su largo (Figura 13).

NOTA: No se observaron rosetas como lo señalan las referencias.

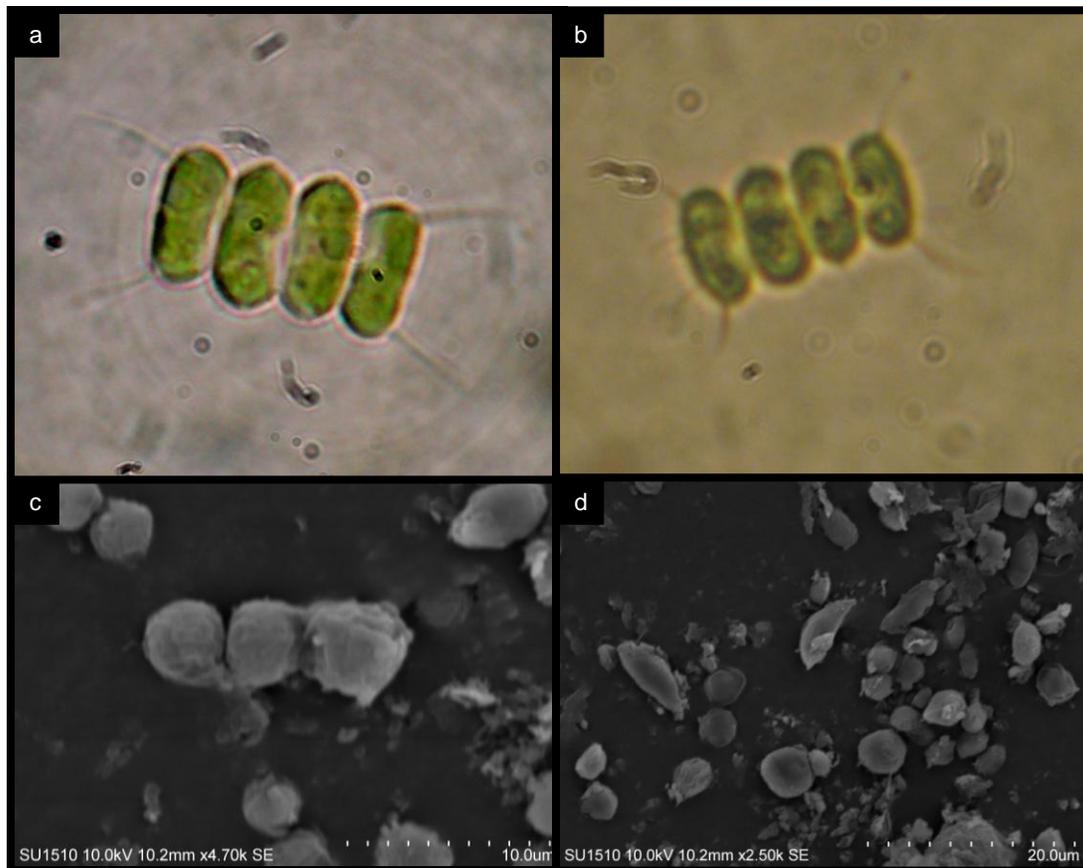
**2.- Granja de cultivo de peces, Veracruz:** Cenobio planos, lineares de 2-4 células, cada una de estas de 4.8  $\mu\text{m}$  de ancho y 7-8.5  $\mu\text{m}$  de largo, con forma oblonga-cilíndrica, polos redondeados y una espina larga de 3.6-5.4  $\mu\text{m}$  de largo, en cada extremo de las células externas, también presentaban algunas espinas medianas en

los costados mientras que las células internas ocasionalmente tenían estas mismas espinas medianas en los polos (Figura 14).

NOTA: Durante el cultivo en extracto de suelo también se presentaron células aisladas que habían perdido las espinas, mismas que aparecen en las fotografías de MEB, sin embargo se conoce que desde la obtención de la cepa, ésta presentaba espinas y se había determinado como *D. armatus* (R. Chodat) Hegewald var. *armatus* con las claves de Godinho (2010).



**Figura 13.** *Desmodesmus armatus* aislado de la pirámide de las flores en Xochitécatl, Tlaxcala. **a)** Forma del organismo antes del aislamiento visto a 1250X y **b)** después de ser cultivada por 14 días en medio con Fertiplus. **c)** y **d)** Organismos del cultivo vistos en MEB, a pesar de pasar por punto crítico, los organismos colapsaron un poco, pero se aprecian las espinas.



**Figura 14.** *Desmodesmus armatus* aislado de la granja de cultivo de peces, Veracruz. **a)** Forma del organismo recién obtenido, visto a 1250X y **b)** los primeros días de ser cultivado en Extracto de Suelo. **c)** y **d)** Las fotos de MEB se tomaron 15 días después de cultivarse en Extracto de Suelo, donde se observa que los organismos perdieron las espinas.

## ***Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko 2001**

= *Scenedesmus obliquus* var. *dimorphus* (Turpin) Hansgirg

*Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kützing 1834,

*Achnanthes dimorpha* Turpin 1828

John *et al.*, 2002:394, lám. 96M; Godinho *et al.*, 2010: 542, láms. 96-105.

### **DESCRIPCIÓN**

Godinho *et al.* (2010) mencionan que esta especie presenta la mayor variabilidad morfológica dentro del género y que existe la variedad *S. obliquus* var. *obliquus* y *S. obliquus* var. *dimorphus* distinguiéndose porque la segunda tiene los polos mucho más puntiagudos y en las claves de John *et al.* (2002) aparecen con una forma mucronada.

Las diferentes expresiones morfológicas del taxón observadas por el autor se muestran en la Figura 15.

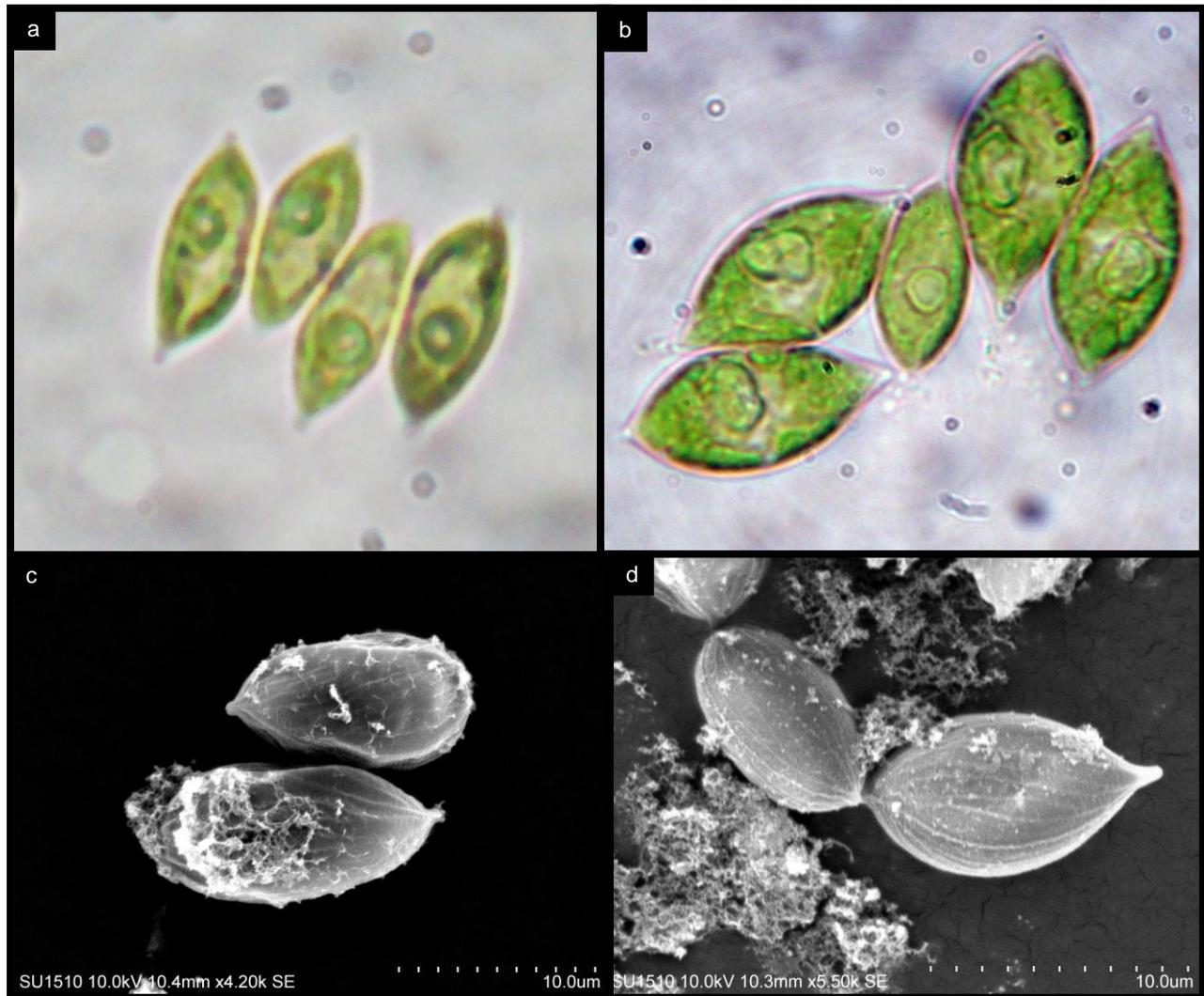
**DISTRIBUCIÓN MUNDIAL:** Inglaterra, Rumania, España, Turquía, Brasil, Irán, Paquistán, China y Nueva Zelanda entre otros (Guiry y Guiry, 2014).

### LOCALIDADES ESTUDIADAS:

**1.- Río Amacuzac:** Cenobio plano de 2-4 células alternadas, cada una de 4-8 µm de ancho y 9-18 µm de alto, ovals-fusiformes, con los polos agudos a elipsoidales, todas las células tanto las internas como las externas, rectas y las puntas se presentaron de manera mucronada. En cultivo se mantuvo aislada sin formar cenobio (Figura 15).

NOTAS: En el caso de esta especie, se compararon las características de *A. dimorphus* y *S. pectinatus* Meyen (= *Acutodesmus pectinatus* (Meyen) Tsarenko) ya que el análisis molecular concordó con especies relacionadas a éste último. Hegewald *et al.* (1990) mencionan que *A. pectinatus* generalmente tiene las células curvadas, aunque también se presentan rectas, además de que las células tienen diferentes ángulos del plano que lleva el cenobio, sin embargo se determinó como *A. dimorphus*

porque las células de *A. pectinatus* tienen la forma de huso más marcada. Se requiere de un estudio más detallado para tomar en cuenta el punto de partida expuesto por Hegewald *et al.* (2010) donde señalan que las ornamentaciones de costillas longitudinales permitieron reubicar a *A. pectinatus* en un nuevo género *Pectinodesmus* y a *A. pectinatus* como *P. pectinatus* a partir del subgénero *Acutodesmus*.



**Figura 15.** *Acutodesmus dimorphus* aislado del Río Amacuzac, Morelos. **a)** Forma del organismo antes del aislamiento, visto a 40X y **b)** después de ser cultivada por 17 días en medio con Fertiplus, visto a 1250X. Se aprecian proyecciones en los polos (forma mucronada). **c)** y **d)** En las imágenes tomadas con MEB, se pueden ver líneas que corren de manera paralela al organismo.

## *Análisis morfológico*

Dentro de las especies estudiadas, ninguna se ubicó en el género *Scenedesmus* ya que al corroborarse en “Algae base” (Guiry y Guiry, 2014), éstas se han transferido con base en estudios moleculares a otros géneros propuestos; por tanto su nombre válido corresponde actualmente a los géneros *Acutodesmus* y *Desmodesmus*.

Con base en las características morfológicas y moleculares se determinaron tres especies: *Acutodesmus obliquus* (Turpin) Hegewald et Hanagata, *Desmodesmus armatus* (R. Chodat) E.Hegewald y *Acutodesmus dimorphus* (Turpin) Tsarenko.

*A. obliquus* fue difícil de determinar taxonómicamente, ya que, como lo mencionan Godinho *et al.* (2010) y Comas (1996), este es un taxón con amplia variabilidad morfológica, tal como se observan en las colectas de las diferentes localidades. Se presentaron organismos con y sin cenobio, además de células con puntas agudas y a veces un poco más redondeadas.

Tanto *A. obliquus*, *A. dimorphus* y *A. pectinatus* tienen polos agudos, pero consultando la bibliografía y en este mismo orden, se nota como los polos son puntiagudos de menor a mayor grado respectivamente, razón por la cual el *A. dimorphus* aislado en este trabajo se caracterizó como tal por tener los polos más agudos que los de *A. obliquus* y a su vez, no tan agudos y curvados como *A. pectinatus* descrito por Hegewald *et al.* (1990).

En el caso de las dos cepas de *Desmodesmus armatus*, se observó variación tanto en la formación del cenobio como en el número de espinas, perdiendo una de las cepas las espinas, tanto con medio extracto de suelo como con medio Fertiplus tal como se observa en la figura nueve, demostrándose la gran variabilidad de ésta especie y cómo los nutrientes influyen en la formación del cenobio y de las espinas como lo menciona Trainor (1969, 1976, 1998).

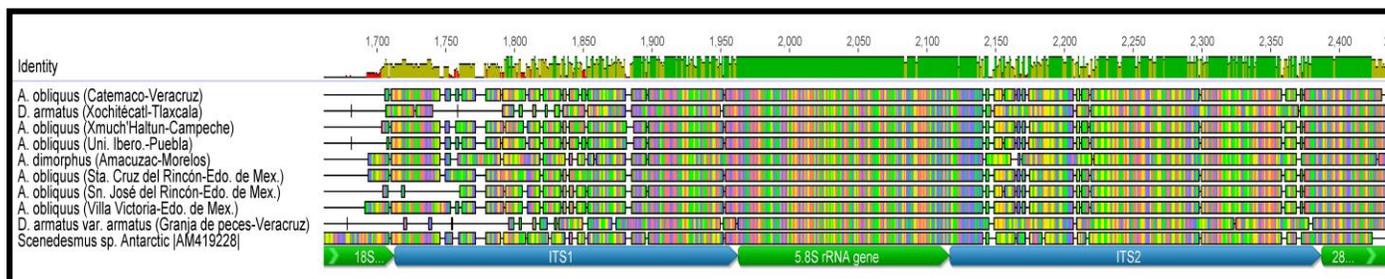
En general todos los organismos del presente trabajo se vieron afectados de manera considerable, en la forma de las células, tamaño, formación del cenobio e incluso la presencia de ornamentaciones por el medio de cultivo utilizado, ya que en el medio Bold y el Extracto de Suelo, las formas del cenobio llegaban a conservarse mejor, mientras que en el medio Fertiplus los cultivos perdían rápidamente el cenobio a la vez que las células se presentaban más redondas y grandes.

En total, fueron tres organismos cuya determinación no correspondió con la búsqueda de sus secuencias en el NCBI, que fueron, como ya se mencionó, *A. dimorphus* del río Amacuzac, *A. obliquus* de la laguna Villa Victoria y *A. obliquus* obtenido de la Universidad Iberoamericana. En el caso de este último, inicialmente se pensó que era *S. raciborskii*, pero a diferencia de éste, la cepa conseguida no tenía la punta mucronada, ni mucílago y tenía los polos más agudos, por lo que se determinó como *A. obliquus*.

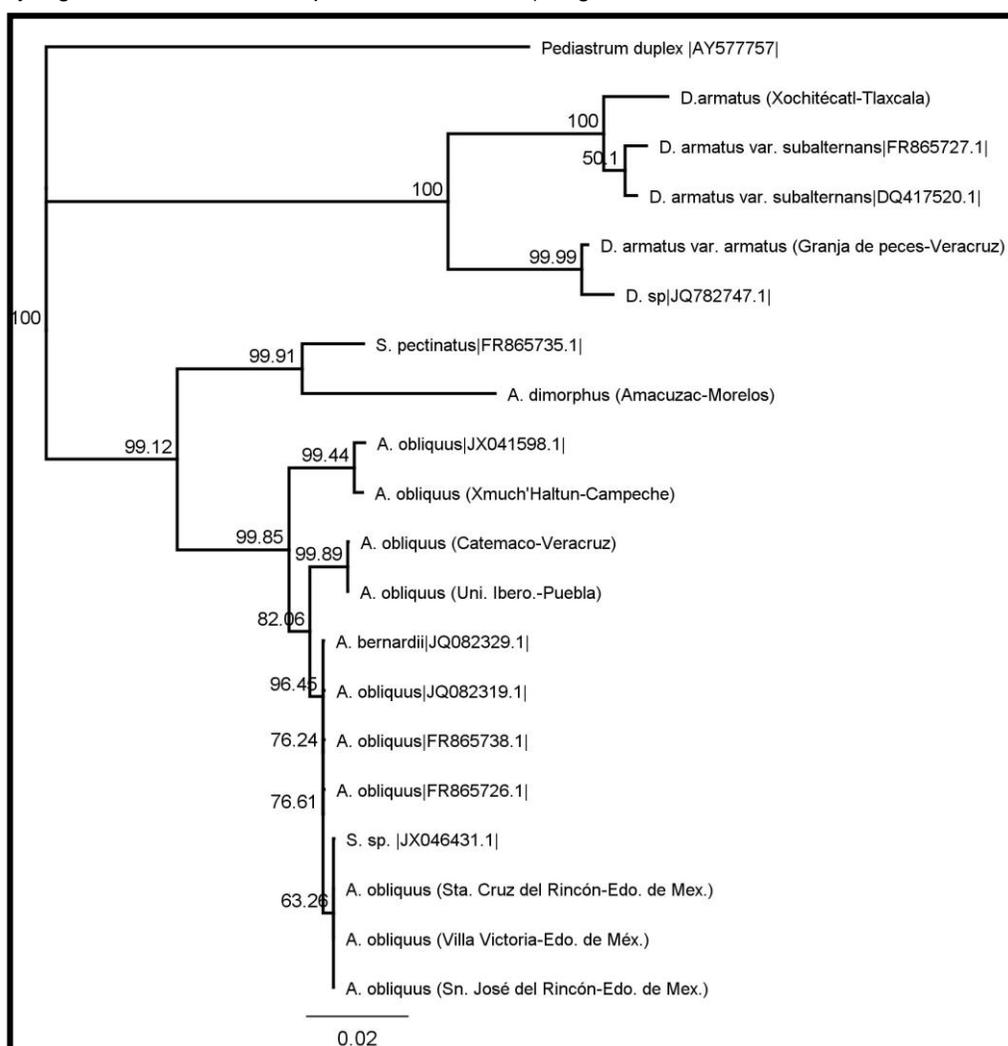
### *Análisis filogenético*

Las regiones ITS2 secuenciadas, mostraron gran variabilidad entre los organismos de distinta especie e incluso se encontraron diferencias en algunos pares de bases entre organismos de la misma especie. Sólo 3 organismos tuvieron una identidad del 100% con secuencias encontradas en el NCBI, (anexo 2) por lo que resultó muy útil la utilización de ésta región para complementar la determinación taxonómica de los organismos aislados.

Con los primers utilizados en el presente trabajo, no sólo se obtuvo la región ITS2, también las regiones ITS1, 5.8 y una pequeña parte de las regiones 18.S y 28.S como se muestra en la Figura 16.



**Figura 16.** Las nueve secuencias obtenidas en este trabajo abarcan de forma parcial la región del gen 18.S, toda la región de ITS1, todo el gen 5.8S, la región ITS2 y una parte de la región 28.S. En la imagen se comparan con la secuencia de *Scenedesmus* sp. de la Antártida (AM419228) encontrado en la base de datos del NCBI cuyas anotaciones de las regiones venían incluidas. En la parte de arriba se muestra el consenso del alineamiento (Identity), donde el color verde indica mayor homogeneidad en las bases de las secuencias, así la región 5.8S muestra mayor grado de conservación que las ITS1 e ITS2. (Imagen realizada con el software Geneious ver. 6.1.6.).



**Figura 17.** Árbol filogenético de las especies del género *Acutodesmus*, *Scenedesmus* y *Desmodesmus*. Los organismos estudiados en el presente trabajo se muestran con el lugar de donde se colectaron, las restantes son las secuencias obtenidas del banco NCBI junto con su clave de registro en el banco de datos. El árbol se realizó con el software Geneious ver. 6.1.6., utilizando método Neighbor-Joining, el modelo Jukes-Cantor y el método de Bootstrap con un número de 1,000 réplicas.

En el árbol filogenético obtenido, se marca claramente la separación de los géneros *Acutodesmus* y *Desmodesmus*, con un soporte del 99.8 % entre todos los miembros del primero y 100% entre los miembros del segundo. Todos los nodos del árbol tienen un soporte mayor al 50%, por lo que el análisis tiene un nivel alto de confianza. También se muestra de manera separada el organismo identificado como *A. dimorphus* del resto de especies del género *Acutodesmus*. Godinho *et al.* (2010) al igual que Comas (1996) manejan las variedades *S. obliquus* var. *dimorphus* y *S. obliquus* var. *obliquus*, siendo todas a la vez pertenecientes al género *Acutodesmus*, y en este caso se marca claramente la separación de ambas variedades, tal como lo establece “Algae base” (Figura 17).

Como se ha observado, los géneros *Scenedesmus*, *Acutodesmus* y *Desmodesmus* son muy variables y presentan muchas ecoformas como ya lo han establecido Van Hanne *et al.*, (2000), Vanormelingen (2007) y John *et al.*, (2002); es importante que el manejo de estos organismos como géneros diferentes siga estableciéndose, así como las especies pertenecientes a cada una y que en el pasado se manejaban como parte del género *Scenedesmus* dejen de manejarse incorrectamente y queden acorde a los estudios que se van realizando.

En el caso de este trabajo, la caracterización molecular resultó de mucha utilidad para comparar y realizar mejor la determinación taxonómica, por lo que los estudios moleculares resultan útiles en la actualidad para resolver los grandes problemas taxonómicos que presentan gran cantidad de taxa; sin embargo, hay que recordar que éstos estudios son una herramienta de ayuda y deben estar de acorde a las características morfológicas de los organismos, consiguiendo así una taxonomía que ayude a dilucidar de manera más certera los problemas que se presentan constantemente en esta rama de la biología.



## CONCLUSIONES

---

Sólo nueve entidades federativas del país son las que cuentan con registros publicados de especies del género *Scenedesmus*, por lo que aún hace falta explorar en muchos Estados.

Las especies determinadas en este trabajo fueron *Acutodesmus obliquus*, *A. dimorphus* y *Desmodesmus armatus*.

Los datos físicoquímicos de las localidades donde se colectó *A. obliquus* indican que esta especie crece en ambientes con un amplio intervalo de valores de nitratos, ortofosfatos y valores altos de amonio, elementos que permiten señalar su variabilidad morfológica en estado vegetativo.

Se comprobó a través de los cultivos de *D. armatus* que la presencia de espinas en el cenobio puede perderse, dependiendo el medio de cultivo o el tiempo del mismo.

La determinación taxonómica de las especies a través de características morfológicas se complementó con las características moleculares de la región ITS1 e ITS2 en las especies del género *Acutodesmus* y *Desmodesmus* estudiadas.

Se recomienda fijar las muestras y tomar fotografías del material colectado durante los primeros días del cultivo antes de que los organismos lleguen a perder el cenobio.

Los géneros *Scenedesmus*, *Acutodesmus* y *Desmodesmus* son muy variables y presentan muchas ecoformas por lo que es importante tener cuidado al momento de su determinación taxonómica y utilizar en conjunto las herramientas taxonómicas posibles; este caso la región ITS2 resultó de mucha utilidad para complementar esta determinación.



## LITERATURA CITADA

Abdel Hameed, M.S. & Hammouda E., O. 2007. Biotechnological potential uses of immobilized algae. *International journal of agriculture & biology* 9: 183-192.

Adl, S.M., A.G.B. Simpson, C.E. Lane, J. Lukes, D. Bass, S.S. Bowser, M.W. Brown, F. Burki, M. Dunthorn, V. Hampl, A. Heiss, M. Hoppenrath, E. Lara, L.L. Gall, D.H. Lynn, H. McManus, E.A.D. Mitchell, S.E. Mozley-Stanridge, L.W. Parfrey, J. Pawlowski, S. Rueckert, L. Shadwick, C.L. Schoch, A. Smirnov & F.W. Spiegel. 2012. The revised classification of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 59(5): 429-493.

Almaraz R., A. 2013. Remoción de nutrientes (N:P) a partir del uso de microalgas en agua residual de la planta de tratamiento de San José del Rincón, Estado de México. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores Iztacala. UNAM. México, 39 p.

An, S.S., T. Friedl & E. Hegewald, 1999. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. *Plant Biology* 1: 418-428.

Andersen, R.A. 2005. *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Incorporation. China, pp. 91-92.

APHA., 1995. *Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health* 20th Edition. APHA, AWWA, WPCF. Washington United States of America, 1269 p.

Bourelly, P. 1972. *Les Algues d'eau douce, Les algues vertes*. Éditions N. Boubée & Cie. Paris, pp. 125.

Buchheim, M.A., E.A. Michalopoulos & J.A. Buchheim, 2001. Phylogeny of the Chlorophyceae with special reference to the Sphaeropleales: a study of 18S and 26 rDNA data. *Journal of Phycology* 37: 819-835.

Cavalier-Smith, T. 1981. Eukaryote kingdoms: Seven or nine?. *BioSystems* 14:461-481. In: Graham L.E., J.M. Graham & L.W. Wilcox. 2009. *ALGAE*. Second Edition. Pearson. Estados Unidos de América, pp. 355.

Cavalier-Smith, T. 2004. Only six kingdoms of life. *Proceedings of The Royal Society B: Biological sciences* 271:1251-1262.

Cepák V. y P. Přibyl. 2006. The effect of colour light on production of zooids in 10 strains of the green chlorococcal alga *Scenedesmus obliquus*. *Czech Phycology, Olomouc* 6: 127-133.

Comas G., A. 1996. Las Chlorococcales dulceacuícolas de Cuba. J. Cramer. Berlín, pp. 251.

Deason, T.R., P.C. Silva, S. Watanabe & G.L. Floyd, 1991. Taxonomic status of the species of the green algal genus *Neochloris*. *Plant Systematics and Evolution* 177: 213-219. In: Fanés T., I. 2008. Estudios taxonómicos en algas verdes cocales del sur de España. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Botánica, España, 324 p.

El Semary, N.A. 2011. The polyphasic description of a *Desmodesmus* spp. Isolate with the potential of bioactive compounds production. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 15(2): 231-238.

Gama F., J.L., E.L. Pavón, T. Ramírez, O. Ángeles y M.A. Fernández. 2010. Análisis de calidad del agua: Relación entre factores bióticos y abióticos. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México, 199 p.

Godinho, L.R., A.A.C. González & C.E. de Mattos Bicudo, 2010. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Algas*, 30: Chlorophyceae (familia Scenedesmaceae). *Hoehnea* 37(3): 513-553.

Graham, L.E., J.M. Graham & L.W. Wilcox, 2009. ALGAE. Second Edition. Pearson. Estados Unidos de América, pp. 353-365.

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2014. *AlgaBase*. World-wide electronic publication, Universidad Nacional de Irlanda, Galway. Disponible en: <http://www.algaebase.org>. Fecha de acceso: Julio 2013.

Hegewald, E. 2000. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). *Archiv für Hydrobiologie, Suppl.* 131 [Algological Studies 96]: 1-18. In: John, D.M., B.A. Whitton & A.J. Brook, 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles An identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge University Press, Reino Unido, pp. 384.

Hegewald, E. & M. Wolf, 2003. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Acutodesmus* (Chlorophyta, Chlorophyceae) as inferred from 18S rDNA and ITS-2 sequence comparisons. *Plant Systematics and Evolution* 241: 185-191.

Hegewald, E. & P.C. Silva, 1988. Annotated catalogue of *Scenedesmus* and Nomenclaturally related genera, including original descriptions and figures. J. Cramer. Berling, 587 p.

Hegewald, E., F. Hindák & E. Schnepf. 1990. Studies on the genus *Scenedesmus* MEYEN (Chlorophyceae, Chlorococcales) from South India, with special reference to the cell wall ultrastructure. J.Cramer, Alemania. 210 p.

Hegewald, E., M. Wolf, A. Keller, T. Friedl & L. Krientz. 2010. ITS2 sequence-structure phylogeny in the Scenedesmaceae with special reference to *Coelastrum* (Chlorophyta,

Chlorophyceae), including the new genera *Comasiella* and *Pectinodesmus*. *Phycologia* 49(4): 325-335.

Helms, G., T. Friedl & G. Rambold, 2003. Phylogenetic relationships of the Physciaceae inferred from rDNA sequence data and selected phenotypic characters. *Mycologia* 95(6): 1078-1099.

Hoek, C. van den, D.G. Mann & H.M. Jahns, 1995. *Algae: An introduction to phycology*. Cambridge University Press, Estados Unidos de América, 623 p.

Jeffrey, C. 1982. Kingdoms, codes, and classification. *Kew Bulletin* 37: 403-416. In: Cavalier-Smith, T. 1981. Eukaryote kingdoms: Seven or nine?. *BioSystems* 14:461-481. In: Graham L.E., J.M. Graham y L.W. Wilcox. 2009. *ALGAE*. Second Edition. Pearson. Estados Unidos de América, pp. 355.

John, D.M., B.A. Whitton & A.J. Brook, 2002. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles An identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Cambridge University Press, Reino Unido, pp. 384-398.

Kenrick, P. & P.R. Crane. 1997. *The Origin and Early Diversification of Land Plants: A Cladistic Study*. Smithsonian Institution, Washington, DC. In: Graham L.E., J.M. Graham & L.W. Wilcox. 2009. *ALGAE*. Second Edition. Pearson. Estados Unidos de América, pp. 355.

Kessler, E., M. Shafer, C. Hummer, A. Kloboucek & V.A.R. Huss, 1997. Physiological, biochemical and molecular characters for the taxonomy of the subgenera of *Scenedesmus* (Chlorococcales, Chlorophyta). *Botánica Acta* 110: 244-50. In: Van Hannen, E.J., M. Lüring & E. Van Donk, 2000. Sequence analysis of the ITS-2 Region: A tool to identify strains of *Scenedesmus* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 36: 605-607.

Kilian, O. & P.G. Kroth, 2006. *Molecular Biology and Genetic Engineering in Microalgae*. In: Subba, D.V. *Algal cultures analogues of blooms and applications*. Volumen 2. Science publishers. Estados Unidos de América, pp. 769-799.

Kim, B.H. & N. Takamura, 2000. Morphological study of the coenobium of *Coronastrum lunatum* (Chlorophyceae). *Phycologia* 39(2): 153-156.

Krienitz, L., E. Hegewald, D. Hepperle & M. Wolf, 2003. The systematic of coccoid green algae: 18S rRNA gene sequence data versus morphology. *Biologia* 58: 437-446.

Kumar, H.D., & H.N. Singh, 1979. *A textbook on algae*. Macmillan Tropical Biology Series. Hong Kong. 216 p.

Leliaert, F., D.R. Smith, H. Moreau, M.D. Herron, H. Verbruggen, C.F. Delwiche & O. De Clerck. 2012. Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31: 1-46

Lewis, L.A., L.W. Wilcox, P.A. Fuerst & G.L. Floyd, 1992. Concordance of molecular and ultrastructural data in the study of zoosporic Chlorococcalean green algae. *Journal of Phycology* 28: 375-380.

Mattox, K.R. & K.D. Stewart, 1984. Classification of the green algae: a concept based on comparative cytology. In Irvine, D.E.G. & D.M. John (eds), Systematics of the green algae. The Systematics Association, Special Vol., No. 27. Academic Press, London, Orlando: 29-72.

Melkonian, M. 1990. Chlorophyte orders of uncertain affinities: order Microthamniales. *In: Handbook of Protoctista* (L. Margulis, J. O. Corliss, M. Melkonian & D.J. Chapman, eds.) Jones and Barlett Publishers, Boston, pp. 652-654.

Norton, T.A., M. Melkonian & R.A. Andersen, 1996. Algal biodiversity. *Phycologia* 35: 308-326.

Novelo, E., E. Ponce, R. Ramírez & M. Ramírez, 2007. Algas. *In: A. Lot* (coord.) Guía Ilustrada de la Cantera Oriente: caracterización ambiental e inventario biológico. Coordinación de la Investigación Científica, Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria, UNAM. México, pp. 63-95.

Novelo, E. & Tavera R. 2011. Un panorama gráfico de las algas de agua dulce de México. *Hidrobiología* 21(3): 333-341.

O'Kelly, C.J., S. Watanabe & G.L. Floyd, 1994. Ultrastructure and phylogenetic relationships of Chaetopeltidales *ord. nov.* (Chlorophyta, Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 30: 118-128.

Polans, N.O. & D.E. Saar. 2003. ITS sequence variation in wild species and cultivars of pea. Department of Biological Science and Plant Molecular Biology Center. Northern Illinois University, Dekalb, IL. Disponible: <http://hermes.bionet.nsc.ru/pg/34/9.htm>. Fecha de acceso: Enero 2014.

QIAGEN, 2006. *DNeasy Plant Hand Book*, 55 p.

Rodier, J. 1981. Análisis de las aguas: aguas naturales, aguas residuales, agua de mar. Ediciones Omega, S.A. España, pp. 822.

Robles V., E., M.E. González, M.G. Sáinz, M.E. Martínez & R. Ayala, 2008. *Análisis de aguas métodos físicoquímicos y bacteriológicos*. FESI, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 182 p.

Tippery, N.P., K. Fučíková, P.O. Lewis & L.A. Lewis, 2012. Probing the monophyly of the Sphaeropleales (Chlorophyceae) using data from five genes. *Journal of Phycology* 48: 1482-1493.

Trainor, R.F. 1969. *Scenedesmus* morphogenesis. Trace elements and spine formation. *Journal of Phycology* 5: 185-190.

Trainor, R.F. 1998. Biological aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae) phenotypic plasticity. *Nova Hedwigia* 117: 1-367.

Trainor, H.R., J Cain & L.E. Shubert, 1976. Morphology and nutrition of the colonial green alga, *Scenedesmus*: 80 years later. *Botanical Review* 42: 5-25. *In*: El Semary, N.A. 2011. The polyphasic description of a *Desmodesmus* spp. Isolate with the potential of bioactive compounds production. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 15(2): 231-238.

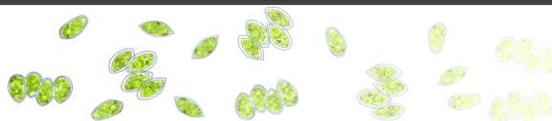
Van Den Hoek, C., D. Mann & H.M. Jahns. 1994. *Algae: An introduction to Phycology*. Cambridge University Press. Estados Unidos de América, pp. 324.

Van Hannen, E.J., M. Lüring & E. Van Donk, 2000. Sequence analysis of the ITS-2 Region: A tool to identify strains of *Scenedesmus* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology* 36: 605-607.

Vanormelingen, P., E. Hegewald, A. Braband, M. Kitschke, T. Friedl, K. Sabbe & W. Vyverman, 2007. The systematics of a small spineless *Desmodesmus* species, *D. costato-granulatus* (Sphaeropleales, Chlorophyceae), based on ITS2 rDNA sequence analyses and cell wall morphology. *Journal of Phycology* 43: 378-396.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In*: Innis, M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky y T.J. White. 1990. *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications*. Academic Press, Inc. New York, pp. 315-322.

Wilcox, L.W., L.A. Lewis, P.A. Fuerst & G.L. Floyd, 1992. Assessing the relationships of autosporic and zoosporic Chlorococcalean green algae with 18S rDNA sequence data. *Journal of Phycology* 28: 381-386.



## ANEXO 1

El fertilizante “Fertiplus” es una marca registrada Delta, hecho en México y contiene los siguientes nutrientes orgánicos y un porcentaje NPK de 11-8-5:

Ingredientes activos (porcentaje en peso)	
<b>Nitrógeno (N)</b>	7.28
<b>Fósforo (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)</b>	8.21
<b>Potasio (K<sub>2</sub>O)</b>	14.07
<b>Magnesio (Mg)</b>	0.086
<b>Hierro (Fe)</b>	0.006
<b>Cobre (Cu)</b>	0.001
<b>Zinc (Zn)</b>	0.002
<b>Manganeso (Mn)</b>	0.075
<b>Azufre (S)</b>	1.31
<b>Boro (B)</b>	0.002
<b>Calcio (Ca)</b>	0.19
<b>Molibdeno (Mo)</b>	TRAZAS

El stock es preparado con una proporción 3:1000 mL en agua potable.



## ANEXO 2

Resumen de los datos obtenidos del BLAST con los marcadores moleculares de la región ITS1, 5.8 e ITS2 para cada una de las cepas obtenidas en este trabajo.

Especie	No. de acceso	Cobertura (%)	Identidad (%)
<b><i>Acutodesmus obliquus</i> (Turpin) Hegewald et Hanagata 2000</b>			
<b>1.-Lago de Catemaco, Veracruz (685 pb)</b>			
<i>Acutodesmus acuminatus</i>	JQ082312.1	100	98
<i>Acutodesmus bernardii</i>	JQ082329.1	100	98
<i>Acutodesmus obliquus</i>	JQ082319.1	100	98
<b>2.-Jardín botánico X'much haltún, Campeche (700 pb)</b>			
<i>Acutodesmus nygaardii</i>	JQ082320.1	100	99
<i>Acutodesmus obliquus</i>	JX041598.1	97	99
<b>3.-Uni. Ibero, Puebla (693 pb)</b>			
<i>Acutodesmus acuminatus</i>	JQ082312.1	99	98
<i>Acutodesmus bernarii</i>	JQ082329.1	99	97
<i>Acutodesmus obliquus</i>	JQ082319.1	99	97
<b>4.-Laguito Sta. Cruz del Rincón, Edo. de Méx. (792 pb)</b>			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	FR865737.1	100	97
<b>5.-Planta de tratamiento, Sn José del Rincón, Edo. de Méx. (652 pb)</b>			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	FR865737.1	100	100
<b>6.-Laguna Villa Victoria, Edo. de Méx. (64 pb)</b>			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	FR865737.1	97	97
<b><i>Desmodesmus armatus</i> (R.Chodat) E.Hegewald 2000</b>			
<b>7.-Xochitécatl, Tlaxcala (654 pb)</b>			
<i>Scenedesmus armatus</i> var. <i>armatus</i>	FR865727.1	97	97
<b>8.-Granja de cultivo de peces, Veracruz (625 pb)</b>			
<i>Desmodesmus</i> sp	JQ782747.1	98	98
<i>Scenedesmus armatus</i>	JQ910904.1	95	93
<b><i>Acutodesmus dimorphus</i> (Turpin) Tsarenko 2001</b>			
<b>9.-Río Amacuzac, Morelos (720 pb)</b>			
<i>Pectinodesmus pectinatus</i>	JQ082314.1	98	90
<i>Scenedesmus pectinatus</i>	FR865735.1	97	90