



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE CIANOPROCARIONTES BÉNTICOS DE BAHÍAS  
DE HUATULCO, OAXACA, MÉXICO.

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARÍA LAURA GONZÁLEZ RESENDIZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. HILDA P. LEÓN TEJERA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. HELGA OCHOTERENA BOOTH**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
**DR. GUSTAVO A. MONTEJANO ZURITA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**MÉXICO, D.F. MARZO, 2016**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE CIANOPROCARIONTES BÉNTICOS DE BAHÍAS  
DE HUATULCO, OAXACA, MÉXICO.

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARÍA LAURA GONZÁLEZ RESENDIZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:**

**DRA. HILDA P. LEÓN TEJERA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR:**

**DRA. HELGA OCHOTERENA BOOTH**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
**DR. GUSTAVO A. MONTEJANO ZURITA**  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**MÉXICO, D.F. MARZO, 2016**



OFICIO FOIE/DEP/097/16

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de noviembre del 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS del (la) alumno (a) GONZÁLEZ RESENDIZ MARÍA LAURA con número de cuenta 91311801 con la tesis titulada: "Caracterización taxonómica de cianoprocariontes bénticos de Bahías de Huatulco, Oaxaca, México", realizada bajo la dirección del (la) DRA. HILDA PATRICIA LEÓN TEJERA:

Presidente:	DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY
Vocal:	DRA. MARÍA ESTHER ANGÉLICA MEAVE DEL CASTILLO
Secretario:	DRA. HELGA OCHOTERENA BOOTH
Suplente:	DRA. DENÍ CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS
Suplente:	DR. GUSTAVO ALBERTO MONTEJANO ZURITA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 22 de febrero de 2016

*M. del Coro Arizandi Arriaga*  
Dra. María del Coro Arizandi Arriaga  
Coordinadora del Programa

MCAA/MJFM/ASR/mnm

## AGRADECIMIENTOS

- ✓ Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la formación recibida a lo largo del doctorado.
- ✓ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención que me permitió desarrollar este proyecto (CVU 171541)
- ✓ Al proyecto IN223614-PAPIIT por el apoyo económico otorgado para la finalización del trabajo de campo y molecular
- ✓ A los miembros de mi comité tutor la Dra. Hilda León, Dra. Helga Ochoterena y el Dr. Gustavo Montejano
- ✓ Al Parque Nacional Huatulco (PNH) por todas las facilidades y apoyo técnico otorgado en la realización del trabajo de campo
- ✓ A la Dra. Luisa Alba Lois del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias, por el apoyo en el uso de infraestructura y equipo necesario para el trabajo molecular.
- ✓ A la Q. Viviana Escobar Sánchez del Laboratorio de Biología Molecular y Genómica de la Facultad de Ciencias, por la invaluable ayuda técnica en el trabajo molecular para la obtención de las secuencias presentadas en este trabajo.
- ✓ A la M en C. Laura Patricia Olgún Santos de la Unidad de ambientes controlados de la Facultad de Ciencias por la ayuda técnica en el mantenimiento de los cultivos de poblaciones marinas de cianoprocariontes
- ✓ A Mónica Peralta Caballero, Ana Hernández Vázquez, Ariadna Mora Ramírez y Carolina Pineda Macedo por el apoyo en la edición de imágenes y elaboración de esquemas.

Es difícil expresar con palabras la gratitud que me inspiran todos aquellos que contribuyeron a llevar a buen término este proyecto.

En primera instancia quiero reconocer a mi comité tutorial por la infinita paciencia que me tuvieron a lo largo de estos años. A la Dra. Hilda León, Dra. Helga Ochoterena y Dr. Gustavo Montejano me ayudaron a crecer, sufrir y disfrutar esta etapa de mi vida.

Mi reconocimiento para el comité ampliado, la Dra. Claudia Segal, Dra. Dení Rodríguez y la Dra. María Esther Meave por sus invaluable y atinados comentarios.

Aunque no formalmente pero si en la práctica la Maestra Michele Gold Morgan participó en este trabajo con su dialéctica de la Biología, que me ha permitido ver de otra manera mi razonamiento “no razonado”.

Como siempre todos tenemos un equipo de trabajo que nos acompaña yo, no soy la excepción y quiero agradecer a mi “super team” del laboratorio de Ficología: José, Annie May, Ernesto, Mónica, Berenice y el último modelo Joaquín, por apoyarme en todas mis locuras, por soportar los malos chistes y el mal humor del trabajo cotidiano, pero también los buenos momentos sobre todo en el trabajo de campo, gracias por su ayuda y apoyo!!!

A Viviana Escobar sin tus conocimientos y trabajo super organizado y pulcro una parte importante de esta tesis no sería posible, gracias!!!

Por que sin la familia esto no tiene significado: A mis papás por su apoyo incondicional sobre todo con la “fiera”, ellos saben que fueron fundamentales a lo largo de estos años. Mamá TE AMO, eres mi “porra” personal!!!!!! A Gabriel, Araceli, Patricia, Felipe y Héctor, los quiero mucho!!!.

A mis dos amores de la vida, Jorge y Elena ambos han sido muy pacientes conmigo estos años, los AMO.

A mi familia ampliada, Juanita, Luis Ángel, Catalina y Luis Ángel Martínez por su apoyo y cariño incondicional.

A todos aquellos que de una u otra manera han contribuido a mi desarrollo profesional y personal a lo largo de estos años...

***¡¡¡GRACIAS!!!!***

*En tiempos oscuros, tengamos el talento suficiente para arriesgarnos a volar en la noche como los murciélagos.*

*En tiempos oscuros, seamos lo suficientemente sanos como para vomitar las mentiras que nos obligan a tragar cada día.*

*En tiempos oscuros seamos lo suficientemente valientes como para tener el coraje de estar solos y lo suficientemente valientes como para arriesgarnos a estar juntos.*

*En tiempos oscuros seamos lo suficientemente maduros como para saber que podemos ser compatriotas y contemporáneos de todos los que tienen voluntad de belleza y voluntad de justicia, porque no creemos en la fronteras de los mapas ni del tiempo.*

*En tiempos oscuros, seamos lo suficientemente tercos para seguir creyendo contra toda evidencia, que la condición humana vale la pena.*

*En tiempos oscuros seamos lo suficientemente locos como para ser llamados locos.*

*En tiempos oscuros seamos lo suficientemente inteligentes como para ser desobedientes cuando recibimos órdenes contradictorias con nuestra conciencia o contra nuestro sentido común*

**Eduardo Galeano**

**“NOS FALTAN 43, MÁS 125 MIL”**



## LISTA DE ARTÍCULOS Y CONTRIBUCIONES DEL AUTOR A ESTA TESIS

1. **González-Resendiz, L.**, León-Tejera, H. P. & Gold-Morgan, M. (2015) Morphological diversity of benthic Nostocales (Cyanoprokaryota/ Cyanobacteria) from the tropical rocky shores of Huatulco region, Oaxaca, México. *Phytotaxa* 219 (3): 221-232.
2. Gold-Morgan, M., **González-Resendiz, L.**, León-Tejera, H. P. & Montejano-Zurita, G. (2015) Description of coccoid cyanoprokaryote *Nisada stipitata* gen. et sp. nov. from the supralittoral zone in the tropical Mexican Pacific. *Phytotaxa* 220 (3): 268-276
3. **González-Resendiz, L.**, León-Tejera, H. P., Díaz-Larrea, J., Alba-Lois, L. & C.Segal-Kischinevzky (2013) *Hassallia littoralis* sp. nov. (Cyanobacteria, Microchaetaceae) from Mexico's marine supralittoral based on morphological and molecular evidence. *Phytotaxa* 137: 35–47.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	.....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	.....	2
<b>2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN</b>	.....	10
<b>3. OBJETIVOS</b>	.....	12
<b>4. CAPÍTULO I.</b>		
Diversidad morfológica de Nostocales (Cyanoprokaryota/ Cyanobacteria) bénticos de las costas tropicales rocosas de la región de Huatulco, Oaxaca, México.	.....	14 (221-231)
<b>5. CAPÍTULO II.</b>		
Descripción del cianoprocarionte cocoide <i>Nisada stipitata gen. et sp.</i> <i>nov.</i> de la zona supralitoral en el Pacífico Tropical Mexicano.	.....	15 (268-275)
<b>6. CAPÍTULO III.</b>		
<i>Hassallia littoralis sp. nov.</i> (Cyanobacteria, Microchaetaceae) del supralitoral marino basada en evidencia morfológica y molecular.	.....	16 (35-45)
<b>7. CAPÍTULO IV.</b>		
Análisis filogenético de especies heterocitosas de las costas rocosas de la región de Huatulco, Oaxaca, México.	.....	17
<b>8. DISCUSIÓN GENERAL</b>	.....	23
<b>9. PERSPECTIVAS</b>	.....	29
<b>10. CONCLUSIONES</b>	.....	30
<b>11. REFERENCIAS</b>	.....	31
<b>12. ANEXO I</b> Clave de identificación genérica para las heterocitosas del capítulo I.	.....	51

## RESUMEN

Se presentan los resultados sobre la diversidad taxonómica de cianoprocariontes marinos de la zonas inter y supralitoral región de Huatulco en las costas oaxaqueñas. Como parte de éste estudio se describen con criterios morfológicos nuevos registros para México y un nuevo género y especie para la ciencia (*Nisada stipitata*); se describe asimismo una nueva especie, *Hassallia littoralis*, con criterios morfológicos y moleculares (16SrRNA). Los resultados obtenidos demostraron que algunas de las poblaciones estudiadas en diversos sitios de la zona inter y supralitoral representan nuevas taxa, por lo que se analiza la necesidad de fomentar los estudios de inventario en poblaciones marinas tropicales. Se discuten algunas dificultades que presenta la resolución de problemas taxonómicos de los cianoprocariontes y la necesidad de incorporar la aproximación polifásica propuesta actualmente en la llamada "Moderna revisión de la taxonomía de cianoprocariontes". Se utilizaron diversas aproximaciones metodológicas, que incluyeron técnicas de microscopia óptica y electrónica y análisis moleculares, que contribuyeron a obtener la caracterización fenotípica y evaluación filogenética de las poblaciones examinadas en este trabajo.

## ABSTRACT

We present the results on the taxonomic diversity of marine cyanoprokaryotes in the inter and supralitoral zones of the Huatulco region in the coast of Oaxaca. As part of this study new records for Mexico and a new genus and species (*Nisada stipitata*) are described with morphological criteria; also *Hassallia littoralis*, a new species, is described with morphological and molecular criteria (16SrRNA). The results obtained show that some of the populations studied in various parts of the inter and supralittoral zones represent new taxa, so the need to promote inventory type studies in tropical marine cyanoprokaryotes is analyzed. We discussed some difficulties concerning the resolution of cyanoprokaryotes taxonomic problems and the need to incorporate the polyphasic approach currently proposed in the "Modern revision of the taxonomy of cyanoprokaryotes". Multiple methodological approaches were used, which included techniques of optical and electron microscopy and molecular analysis, that helped to obtain the phenotypic characterization and phylogenetic evaluation of the populations examined by this work

## 1. INTRODUCCIÓN

Los cianoprocariontes (Cyanophyta o Cyanobacteria), son uno de los grupos procariontes más interesantes y antiguos (3500 Ma aprox. Schopf, 1993). Desde un punto de vista evolutivo, tienen gran relevancia como grupo ancestral que dio origen al plastidio (vía la endosimbiosis intracelular) de algas eucariontes y plantas (Criscuolo & Gribaldo, 2011; McFadden, 2014), involucradas como precursoras de la atmósfera oxigénica (Schopf, 2014), además se consideran el origen de la diversificación metabólica de la fotosíntesis vía la clorofila  $\alpha$  (Björn & Govindjee; 2009, Govindjee & Shevela, 2011). Las cianobacterias son los únicos organismos fijadores de nitrógeno atmosférico, que producen oxígeno como un subproducto del proceso de fotosíntesis, y que debe competir con la inevitable presencia de oxígeno molecular con una enzima esencialmente anaerobia (nitrogenasa) (Berman-Frank *et al.*, 2003). Además, tienen la capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios que les otorgan (en parte) la capacidad de soportar condiciones extremas como desecación y radiaciones UV (Leão *et al.*, 2012; Dewapriya & Kim, 2014). Son organismos capaces de sobrevivir en numerosos ambientes terrestres y acuáticos (Flechtner *et al.*, 2008; Komárek *et al.*, 2008; Komárek 2009; Sant'Anna *et al.*, 2010; Flombaum *et al.*, 2013; Dvořák *et al.*, 2014; Oren, 2015, entre muchos otros) y como simbioses de plantas, diatomeas, invertebrados y otros organismos (Rai *et al.*, 2000; Bergman *et al.*, 2007; Adams & Duggan, 2008, Euichi *et al.*, 2009).

Desde el punto de vista morfológico los cianoprocariontes, son extremadamente diversos, pudiendo tener formas desde muy simples hasta propiamente pluricelulares. Pueden ser sencillos morfológicamente, como los cocos y bacilos que se presentan de manera aislada o formas coccas agregadas en colonias de tamaño y organización variada, filamentos uniseriados o pluriseriados, con o sin ramas, hasta filamentos agregados formando un pseudotejido. Algunos grupos tienen diferenciación celular morfológica y/o fisiológica, ya que pueden presentar entre otros, heterocitos, acinetos y hormogonios, estructuras especializadas en la fijación de nitrógeno, sobrevivencia y propagación, respectivamente. Por otro lado tienen

formas de reproducción variadas que incluyen, entre otros, la formación de endosporas (beocitos), además de ciclos de vida relativamente complejos (por ejemplo en el género *Asterocapsa*), por lo que se considera que los niveles de complejidad que llegan a presentar son similares a los de algunas algas eucariontes.

Estos organismos tienen gran relevancia evolutiva, ecológica y económica, derivada de su historia, su nivel de organización procarionte y sus capacidades fisiológicas particulares (Sciuto & Mora, 2015). Desde hace 150 años llamaron la atención de botánicos, por sus características fotosintéticas, diversidad de estructuras y papel en la naturaleza como productores primarios, estos especialistas las incorporaron al sistema de clasificación botánico; a este se le conoce como tradicional porque es el esquema más antiguo para clasificar a los cianoprocariontes, denominados Cyanophyta. Este sistema se rige por el Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Hongos y Plantas (CIN) (McNeill *et al.*, 2012). Bajo este esquema, se enmarcan los trabajos clásicos o punto de partida del grupo, los de Thuret (1875), Bornet & Flahault (1886-1888) y Gomont (1892). Posteriormente Geitler (1932) llevó a cabo una monografía muy completa de las especies reportadas principalmente en Europa, con una clara definición morfológica, en la que consideró como caracteres importantes para la clasificación del grupo la forma de división celular, la presencia y forma de los filamentos y los patrones de ramificación, entre otras características. Le siguieron trabajos importantes como los de Elenkin (1936-49), Desikachary (1959) y Starmach (1966) entre otros, quienes con modificaciones menores al trabajo de Geitler, siguieron utilizando su obra como base para manuales de identificación taxonómica.

La historia taxonómica de las cianobacterias (cianoprocariontes), comienza a partir de los años 60, del siglo XX cuando se reconocen plenamente las características bacterianas de los cianoprocariontes; Stanier & Van Niel (1962) fueron los primeros en proponer de que las algas verde-azules debían clasificarse como bacterias. Con la incorporación de nuevas técnicas de estudio como la microscopía electrónica y los análisis moleculares y bioquímicos entre otros se

demonstró plenamente su carácter procarionte, esto llevó a Roger Stanier a escribirle una carta a Peter Raven en 1970 (5 de noviembre de 1970, Archivos Nacionales de Canadá, MG 31, J35 adhesión, vol. 6) donde se utiliza el término "cianobacterias" como un reemplazo para "algas verde-azules". Para 1974, se convirtieron "oficialmente" en cianobacterias, ya que fue incluido como tal en el Manual de Bacteriología de Bergey (Buchanan & Gibbons, 1974; Sapp, 2005a, b). Posteriormente, Stanier (1978), propuso la incorporación de la nomenclatura de las cianobacterias bajo reglas del Código de Nomenclatura Bacteriológico (ICNB, después llamado ICNP) (Oren 2011).

En las últimas décadas, un número considerable de bacteriólogos se han dado a la tarea de aplicar las técnicas tradicionales bacteriológicas a los cianoprocariontes (Waterbury, 2006). El esquema bacteriológico (ICNP), que se usa en cianoprocariontes, está basado en algunas características como morfología, fisiología y bioquímica de cepas aisladas en cultivos axénicos y requiere como referencia taxonómica básica una muestra viva (cepa), depositada en dos de las colecciones de cianobacterias oficiales existentes en el mundo y publicada en el International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM), formalmente llamado International Journal of Systematic Bacteriology (IJSB) (Wilmotte, 1994; Oren, 2011).

Un grupo cada vez mayor de bacteriólogos comenzaron a investigar a este grupo utilizando cepas de laboratorio puras (Rippka *et al.*, 1979). El enfoque basado en cultivos impulsó un avance sustancial en la comprensión de la estructura de la célula cianoprocarionte y sus relaciones filogenéticas. Reconociendo las principales discrepancias de sus hallazgos con el sistema botánico tradicional, los bacteriólogos decidieron crear un sistema provisional "forma-géneros", "familias" y "secciones" (Castenholz, 2001). Si bien es muy útil para el trabajo de laboratorio con cepas clonales, este sistema no está avalado en ninguna de las dos nomenclaturas, ni botánica ni bacteriológica. Por otra parte, la aplicación de este sistema provisional en los estudios florísticos independientes de cultivo, estudios ecológicos y de evaluación ambiental entre otros es bastante problemático.

Una de las principales diferencias que crean debate entre el esquema bacteriológico y el botánico es el requerimiento, de obtención de cultivos axénicos y la transferencia (siembra) y mantenimiento de cultivos de poblaciones naturales, lo que se ha comprobado origina a largo plazo poblaciones con adaptaciones fisiológicas y morfológicas que no se encuentran en la naturaleza (Komárek, 2011).

La combinación en la variabilidad de los patrones genéticos, metabólicos y estructurales, les confiere a los cianoprocariontes una flexibilidad para adaptarse a una amplia gama de condiciones ambientales, las cuales influyen fuertemente algunos caracteres morfológicos y fisiológicos (Komárek & Kaštovský, 2003). Por ejemplo, en cultivo se ha observado la no diferenciación celular hacia heterocito, la germinación de hormogonio no característico de poblaciones naturales o la ausencia de atenuaciones en "pelo" en algunas especies de la familia Rivulariaceae (Hindák, 2007).

El cultivo axénico ha llevado a debates intensos; en una de las reuniones más importantes de especialistas en cianoprocariontes (The International Association for Cyanophyte Research, IAC) en 1979, el tema principal fue "Cyanophyta vs cianoprocariontes, principios y problemas en el tratamiento taxonómico de las poblaciones naturales frente a cultivos axénicos" (Komárek, 2011), en donde se discutió entre otras cosas, la necesidad de determinar qué tanto, los cambios fisiológicos y morfológicos se basan en mutaciones genéticas o simplemente se deben a la selección de genotipos particulares según el medio de cultivo utilizado (Komárek, 2006, 2011). Así que, además del problema que plantea la obtención de cultivos axénicos, se debe hacer una evaluación del uso de caracteres morfológicos observados únicamente en cultivo para la delimitación taxonómica.

Para entender la diversidad de este grupo, en años recientes se ha generado una propuesta diferente, en un conjunto de publicaciones de la llamada serie "Aproximación Moderna" por Komárek y Anagnostidis (Anagnostidis & Komárek, 1985, 1988, 1990; Komárek & Anagnostidis, 1986, 1989). En ella, se plantea que: "la moderna clasificación taxonómica, es un

método para el reconocimiento y registro de la diversidad orgánica (tanto en poblaciones naturales, como en cultivos), dependiente de las relaciones evolutivas (genética), ecológicas y de la variación fenotípica. Debe basarse en la caracterización molecular y genotípica de los clados filogenéticos naturales, combinada con la evaluación de marcadores bioquímicos, morfológicos, citológicos, ecológicos y que debe ser consistente con la diversificación filogenética” (Komárek, 2011). Esta propuesta es un intento de unificar los conocimientos tradicionales con los resultados de los estudios modernos, tomando como base el sistema botánico tradicional en una taxonomía tan natural como sea posible, más recientemente utilizando una combinación de todos los recursos útiles como la información morfológica-ultraestructural, ecológica, molecular, bioquímica y fisiológica. Tal aproximación o enfoque, incluyendo las filogenias moleculares disponibles a la fecha, ha sido plasmado en una serie de libros “Süßwasserflora von Mitteleuropa” (Komárek & Anagnostidis, 1999, 2005; Komárek, 2013). Esta serie es una monografía del grupo basada principalmente en especies europeas, aunque con comentarios sobre especies de otras zonas geográficas. Actualmente es una referencia obligada que ha generado trabajos muy importantes como el de Komárek & Kaštovský, (2003), Hoffmann *et al.*, (2005), y más recientemente Komárek *et al.*, (2014), los cuales han sido muy importantes en la consolidación de la llamada Taxonomía Polifásica.

Los debates en la delimitación taxonómica de las especies han llevado a los especialistas del grupo con puntos de vista diferentes, a plantear la necesidad de una definición o redefinición del concepto de especie y género cianoprocarionte. Distintos conceptos se han aplicado en la literatura entre los que destacan:

El del CIMP (Código Internacional de Nomenclatura Procarionte), donde el concepto de especie cianoprocarionte es el mismo del resto de los procariontes. La unidad básica en taxonomía de procariontes se ajusta al concepto que denominamos filo-fenético (Rosselló-Mora & Amann, 2001) y entiende la especie como “una categoría que circunscribe a un grupo de cepas de origen monofilético y que se muestran coherentes tanto desde el punto de vista



genómico como fenotípico y que por ello, es posible distinguirlo de otros grupos semejantes". (Rosselló-Mora, 2005).

Otras propuestas han surgido con la incorporación de algunas características del concepto ecológico y filogenético de especie al ya tradicional basado únicamente en la morfología. En 2005, Johansen & Casamatta, propusieron adoptar el concepto de especie filogenética (Mishler & Theriot, 2000; Wheeler & Platnick, 2000), para ajustándolo organismos asexuados cianoprocariontes; en este concepto las especies son "grupos monofiléticos pequeños que merecen reconocimiento taxonómico". Con este punto de vista, los géneros se definen como grupos monofiléticos de especies.

Komárek (2011), retomando las discusiones de Komárek (2006, 2010); Komárek & Kaštovský, (2003); Gold–Morgan & González–González, (2005); Johansen & Casamatta, (2005); hace hincapié en que en la delimitación de especies se debe aplicar además un cierto énfasis en la ecología de los organismos. En este mismo trabajo Komárek hace una definición de la categoría específica y se puede resumir como sigue: "grupo de poblaciones (cepas), que pertenecen a un mismo genotipo (género), con características fenotípicas estables (definidas, reconocibles y con límites de variación) y semejantes criterios ecológicos, que ocurren repetidamente (en tiempo) en una variedad de localidades ecológicamente similares", con la acotación de su propio autor de que sin embargo, este concepto necesita de una mayor especificación.

En las últimas décadas el enfoque polifásico para el estudio de cianoprocariontes ha tenido un enorme desarrollo, describiéndose nuevos taxones (Becerra *et al.*, 2013; Komárek *et al.*, 2012; Johansen *et al.*, 2011; Rajaniemi *et al.*, 2005, entre otros), corroborando o corrigiendo taxones descritos con la taxonomía tradicional (Hentschke *et al.* 2016; Hauer *et al.*, 2014; Mühlsteinová *et al.*, 2014; Rodarte *et al.*, 2014; Strunecký *et al.*, 2014; Mareš *et al.*, 2013; Engene *et al.*, 2012; Zapomělová *et al.*, 2012; entre otros) y construyendo un sistema de clasificación más robusto y con ello el inicio en el entendimiento más claro de la diversidad y las

relaciones entre estos organismos. Sin embargo, el uso de este enfoque presenta algunas dificultades para su correcta aplicación, dado que la base de la taxonomía polifásica es la descripción morfológica detallada y necesariamente la caracterización molecular de cepas con morfologías claramente reconocidas. La obtención de cultivos puros o unialgales es uno de los principales obstáculos en taxa con requerimientos de crecimiento específico, además de ser común la contaminación con otros cianoprocariontes acompañantes. En taxa con vainas muy gruesas y talos desarrollados como *Stigonema* y *Petalonema*, donde la lisis celular es escasa, y se dificulta la obtención de DNA, se ha buscado aplicar otro tipo de técnicas como la extracción de DNA de una célula o filamento (Mares *et al.*, 2015).

El uso del enfoque polifásico en los estudios de diversidad taxonómica se ha desarrollado sobre todo en Europa y Norteamérica (Bohunická *et al.*, 2015; Mares *et al.*, 2013; Komárek *et al.*, 2012; Komárek *et al.*, 2012; Rajaniemi *et al.*, 2005, entre otros), en zonas tropicales o subtropicales sobre todo en Brasil y en ambientes de bosques tropicales donde se han descrito nuevos taxa (Hentschke *et al.* 2016; Komárek *et al.*, 2013; Sant'Anna *et al.*, 2011a y b; Sant'Anna *et al.*, 2010; Fiore *et al.*, 2007), y para el norte de México en zonas costeras (López-Cortés *et al.*, 2001; Nübel *et al.*, 2000).

Por otro lado, en cuanto a la diversidad de especies, en ambientes muy particulares y poco explorados, importantes trabajos han reportado la diversidad taxonómica sin incluir el enfoque polifásico (Gamma *et al.*, 2014; Tavera *et al.*, 2013; Komárek & Komárkova, 2007), expandiendo de esta manera nuestro conocimiento, al incluir descripciones morfológicas detalladas de los taxa de estas zonas.

La diversidad vista desde el punto de vista geográfico ha cambiado, en los últimos años se ha incrementado el número de estudios de diferentes ambientes, geográficamente contrastantes, como son los tropicales (Tavera *et al.*, 2013; Abed *et al.*, 2006, 2003) o los antárticos (Komárek *et al.*, 2012, 2008), ambientes extremos (López-Cortés *et al.*, 2001) o de condiciones más favorables como son los marinos arrecifales (Engene *et al.*, 2013, 2012;

Charpy *et al.*, 2010). En una revisión reciente realizada por Nabout *et al.*, (2013), demostraron claramente que existe una diferencia considerable en los trabajos de diversidad publicados para zonas poco conocidas como las ubicadas en el trópico. En 2005, Gaylarde & Gaylarde realizaron un análisis comparando la composición y distribución de especies de biopelículas en zonas templadas y tropicales. Encontraron que las especies de Chroococcales presentaron mayor frecuencia y mayor abundancia en zonas tropicales latinoamericanas que en zonas templadas europeas; en otros trabajos se ha reconocido una diversidad rica en bosques tropicales (Gama *et al.*, 2014), pantanos (Komárek & Komárková, 2007) y ambientes arrecifales (Engene *et al.*, 2013, 2012; Charpy *et al.*, 2010), entre otros.

El conocimiento de la diversidad de cianoprocariontes tropicales, comparado con el de ambientes templados es insuficiente, el principal problema es la carencia de taxónomos especialistas en el grupo y la poca claridad en la delimitación de las especies, por el uso inadecuado de nombres de taxa generalmente de ambientes templados, extraídos de manuales de identificación realizadas por especialistas para especies europeas; un ejemplo de ello es la monografía de Geitler (1932), ampliamente conocida y utilizada mundialmente, en la que casi dos terceras partes de las especies originalmente descritas son de zonas templadas de Europa y América.

Particularmente son poco conocidas las especies de cianoprocariontes del ambiente marino béntico, esto incluye no sólo las áreas templadas (Hindák, 2007), sino sobre todo las tropicales costeras, generalmente sin explorar (Golubic *et al.*, 1999; Díez *et al.*, 2007). La mayoría de los trabajos que se han publicado son listas florísticas sin suficiente información descriptiva o ambiental, por ejemplo Tsuda *et al.*, (2010). Otros reportes ecológicos y ecofisiológicos se enfocan en la explicación de fenómenos ambientales (Ritson *et al.*, 2005), pero tales trabajos en muchas ocasiones, no toman en cuenta la delimitación taxonómica de las poblaciones involucradas, reportan especies sin epíteto específico y en muchos casos incluso sin una buena caracterización morfológica. Otros, los menos, son trabajos que involucran

técnicas moleculares específicas como la metagenómica o de perfiles genéticos como el Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE) (Pope *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2006), que les permiten determinar la diversidad y composición de genotipos presentes en ambientes particulares, pero donde la asignación taxonómica de tales secuencias es imprecisa. Pocas obras relacionadas con estudios de diversidad cianoprocarionte incluyen una caracterización suficiente de las especies y/o imágenes o figuras que permitan corroborar las identidades; otras en ocasiones no toman en cuenta la información ambiental para la caracterización de especies. El grado de conocimiento del ambiente marino se presenta además como muy heterogéneo y escaso para muchos de los grupos de cianoprocariontes, las localidades de trabajo están concentradas en su mayoría en 2 ó 3 regiones muy amplias geográficamente como son el Pacífico oriental o el occidental, especialmente en islas, por ejemplo Tsuda, (2003, 2006), para las Islas Marianas.

En trabajos de diversidad de ambientes marinos se han descrito nuevos morfotipos utilizando claves tradicionales, que en muchos casos no son identificables a nivel específico con las claves tradicionales. Por ejemplo Nagarkar, (2002), registró 32 taxones de cianoprocariontes filamentosas de 26 localidades de la costa rocosa de Hong Kong, de las cuales sólo el 40% de los morfotipos pudo ser identificado a nivel de especie. Otro ejemplo importante por la alta diversidad de estos organismos en el ambiente marino, es el que presentan Silva & Pienaar, (2000), para la República de Mauricio, con información morfológica de poblaciones naturales y de cultivo describen 43 taxa colectados en bancos de arena y escombros de coral, de los cuales el 43% fue designado como “cf.” o “sp.”.

## **2. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**

Es muy escaso el conocimiento que se tiene sobre cianoprocariontes marinos en México. En 2009 León Tejera y colaboradores, realizaron una revisión bibliográfica de cianoprocariontes marinos bénticos reportados de la región del Golfo de México, evidenciando la escasez de estudios y la importancia de una caracterización ecológica y taxonómica de este grupo. Del lado del Pacífico, también son pocos los estudios, entre ellos se destaca la

caracterización polifásica (molecular y morfológica) de cianoprocariontes bénticos de ambientes hidrotermales, marinos e hipersalinos de López-Cortes y colaboradores (2001), realizada en Baja California.

Por otro lado, a pesar de que el estado de Oaxaca es el segundo estado en el país en cuanto a diversidad biológica y la región de Huatulco es considerada prioritaria, existen muy pocos estudios sobre diversidad de cianoprocariontes (León-Tejera *et al.*, 2016, 2005, 2003).

De ahí la importancia de conocer y caracterizar la diversidad taxonómica de este grupo de organismos de la zona costera tropical de México, lo cual además de ser un reto, representa una oportunidad para ampliar el conocimiento de estas comunidades.

El presente estudio se enfoca en la caracterización taxonómica de los crecimientos evidentes de cianoprocariontes bénticos de las costas de Huatulco, Oaxaca, México. Como ya se ha mencionado en el texto, derivado de la falta de consenso en la definición del concepto de especie cianoprocarionte, la escasez de taxónomos especialistas, las dificultades técnicas en el cultivo y la falta de información en este tipo de ambientes; la caracterización de las poblaciones mexicanas se realizó en dos niveles: uno enfocado en la descripción morfológica detallada, con información del ciclo de vida y ecología; en el otro además de lo anterior, se incorporó información derivada de métodos moleculares y filogenéticos. Además de la caracterización taxonómica de las poblaciones marinas con dos aproximaciones, en este trabajo se discuten sus ventajas y desventajas en su uso para el estudio en las costas tropicales rocosas.

Existen en este trabajo dos objetivos generales: el primero relacionado con los organismos mismos y su caracterización taxonómica; el segundo se deriva del debate y la gran actividad desarrollados recientemente; ésto es, la evaluación de dos enfoques o aproximaciones al estudio de comunidades de cianoprocariontes poco trabajadas, como son las marinas bénticas.

### 3. OBJETIVOS GENERALES

→ Caracterizar taxonómicamente los crecimientos de cianoprocariontes marinos bénticos más conspicuos o evidentes de las costas rocosas de Bahías de Huatulco, Oaxaca.

→ Evaluar el uso de dos aproximaciones de caracterización taxonómica utilizando crecimientos conspicuos de cianoprocariontes marinos bénticos colectados en las costas rocosas de Huatulco, Oaxaca.

#### 3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar la diversidad morfológica de las poblaciones conspicuas de cianoprocariontes bénticos en seis localidades de la región de Huatulco, Oaxaca **(capítulo I)**.
- Comparar la composición y distribución de los cianoprocariontes bénticos más evidentes en seis localidades de la región de Huatulco, Oaxaca **(capítulo I)**.
- Analizar la composición y distribución de las comunidades de cianoprocariontes bénticos más evidentes de la zona supramareal e intermareal de la región de Huatulco, Oaxaca **(capítulo I)**.
- Caracterizar de manera polifásica algunas de las poblaciones más evidentes de cianoprocariontes marinos bénticos de la región de Huatulco, Oaxaca **(capítulo IV)**.
- Realizar un análisis de los alcances en los diferentes enfoques usados en la delimitación taxonómica de poblaciones de cianoprocariontes bénticos de la región de Huatulco, Oaxaca **(capítulo II, III y IV)**.

Los siguientes capítulos (I al IV) abordan la descripción de la diversidad taxonómica de cianoprocariontes bénticos marinos de la región de Huatulco en Oaxaca. De estos cuatro, tres están publicados y el cuarto corresponde a un artículo que está en preparación. En el presente trabajo se hace una descripción de los resultados preliminares más importantes de este último,

que permitan cumplir con los objetivos planteados y realizar una discusión global de la caracterización de la diversidad taxonómica de cianoprocariontes de las costas rocosas de Huatulco en Oaxaca.

Dos de estos capítulos analizan la delimitación taxonómica de la diversidad desde la perspectiva tradicional botánica, así como la caracterización taxonómica de una especie de cocal béntica de la zona supramareal, realizando un análisis detallado donde se incluye la morfología, el ciclo de vida, el ambiente y la temporalidad de su presencia como elementos principales.

En los otros dos capítulos se realiza la caracterización polifásica de cinco Nostocales en distintos niveles taxonómicos. En uno de ellos se describe una nueva especie dominante de los tapetes microbianos en tres de las seis localidades trabajadas. En el otro se presentan resultados preliminares (aún en proceso) de una nueva especie, dos nuevos géneros y una nueva familia de Nostocales.

Se finaliza este trabajo con la discusión, perspectivas y conclusión sobre las ventajas y desventajas en el uso de los enfoques polifásico y botánico tradicional en poblaciones bénticas tropicales de México.

#### 4. CAPÍTULO I.

Se explora la diversidad morfológica de los principales crecimientos bénticos (supra e intermareal) de cianoprocariontes. Las localidades en las que se colectó el material de este trabajo fueron: Bahía La Entrega, Bahía San Agustín, Bahía Cacaluta, Playa El Arrocito, Bahía Tangolunda y Playa Panteones, con un trabajo enfocado desde la perspectiva de la taxonomía tradicional botánica, con una delimitación de taxa basado en la morfología y ecología del grupo dominante en los crecimientos (Nostocales) y su incidencia en el litoral rocoso.

##### Artículo I

**González-Resendiz, L.**, León-Tejera, H. P. & Gold-Morgan, M. (2015). Morphological diversity of benthic Nostocales (Cyanoprokaryota/ Cyanobacteria) from the tropical rocky shores of Huatulco region, Oaxaca, México. *Phytotaxa* 219 (3): 221-232.

Este capítulo presenta adicionalmente una “**Clave de identificación genérica**” para las heterocitosas de este capítulo. Se encuentra al final de la tesis en el **ANEXO I**.





## Morphological diversity of benthic Nostocales (Cyanoprokaryota/Cyanobacteria) from the tropical rocky shores of Huatulco region, Oaxaca, México

LAURA GONZÁLEZ-RESENDIZ<sup>1,2\*</sup>, HILDA P. LEÓN-TEJERA<sup>1</sup> & MICHELE GOLD-MORGAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Coyoacán, Código Postal 04510, P.O. Box 70–474, México, Distrito Federal (D.F.), México

<sup>2</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

\* Corresponding author (e-mail: [mlauragonzalez@ciencias.unam.mx](mailto:mlauragonzalez@ciencias.unam.mx))

### Abstract

The supratidal and intertidal zones are extreme biotopes. Recent surveys of the supratidal and intertidal fringe of the state of Oaxaca, Mexico, have shown that the cyanoprokaryotes are frequently the dominant forms and the heterocytous species form abundant and conspicuous epilithic growths. Five of the eight special morphotypes (*Brasilonema* sp., *Myochrotes* sp., *Ophiothrix* sp., *Petalonema* sp. and *Calothrix* sp.) from six localities described and discussed in this paper, are new reports for the tropical Mexican coast and the other three (*Kyrtuthrix* cf. *maculans*, *Scytonematopsis* cf. *crustacea* and *Hassallia littoralis*) extend their known distribution.

**Key words:** Marine environment, stressful environment, Scytonemataceae, Rivulariaceae

### Introduction

The rocky shore is a highly stressful habitat, due to the lack of nutrients, elevated temperatures and high desiccation related to tidal fluctuation (Nagarkar 2002). Previous works on this habitat report epilithic heterocytous species that are often dominant especially in the supratidal and intertidal fringes (Whitton & Potts 1979, Potts 1980; Nagarkar & Williams 1999, Nagarkar 2002, Diez *et al.* 2007). On tropical rocky shores, primary producers such as cyanoprokaryotes, are able to fix atmospheric nitrogen (Nagarkar 2002, Diez *et al.* 2007); they are often the main epilithic components, and are distributed from the subtidal to the supratidal zone (Whitton & Potts 1979, Potts 1980; Nagarkar & Williams 1999, Nagarkar 2002), forming the base of the benthic food web and contributing greatly to the productivity and organization of the marine community in tropical coastal shores (Williams *et al.* 2000, Nagarkar *et al.* 2004).

Despite their ecological and physiological significance, little is known about the diversity of marine cyanoprokaryotes along the Mexican littoral (León-Tejera *et al.* 2009). There are a few reports for this group (León-Tejera *et al.* 2005, González-Resendiz *et al.* 2013) from the Oaxaca coast. The aim of this study is to describe the main morphotypes of supra- and intertidal epilithic heterocytous cyanoprokaryotes for the Tropical Mexican Pacific rocky shore.

### Materials and Methods

**Study site and sample collection:**—Sampling was conducted between April 2004 and August 2014 in the supratidal and intertidal zones of five bays of the Huatulco region, and one site, Panteones beach, in Puerto Angel, located north of Huatulco. San Agustín and Cacaluta are within the Huatulco National Park (PNH); La Entrega, El Arrocito and Tangolunda are situated in Bahías de Huatulco south of PNH (Figs. 1A–1C), all in the tropical Mexican Pacific. Each site was collected between one and six times for a total of 56 samples. The tides of the coast of Oaxaca are mixed, with semidiurnal dominance. Conspicuous cyanoprokaryotic growths (Figs. 1B, 1D–1G) were collected with hammer and chisel along the supra and intertidal fringes, between 0–7 meters above sea level. Each sample was fixed with 4% formaldehyde in seawater and semi-permanent slides in glycerin gel were made.



**FIGURE 1.** A. Map showing study area. B. *Ophiotrix* sp. growth at Cacaluta bay. D. *Hassallia littoralis* growth at El Arrocito bay. E. *Petalonema* sp. growth at San Agustín bay. F. *Kyrtothrix* cf. *maculans* growth at Panteones beach. G, H. *Brasilonema* sp. growth at Tangolunda bay. B, C, D. Supratidal environments. E, F, G. Intertidal environments.

**Sample processing:**—Observations and micrographs were made with an Olympus BX51 microscope equipped with a DP12 digital camera. Measurements ( $n=30$ ) were obtained using SigmaScan Pro© software, automated image analyses (Jandel Scientific, Sausalito, CA). Morphological identification was done in accordance with traditional reference works for Cyanoprokaryotes (Frémy 1929, Geitler 1932, Komárek 2013) and several papers that report tropical and subtropical rocky shore cyanoprokaryote taxa (Umezaki 1961, Whitton & Potts 1979; Sant’Anna 1995, 1997, Thajuddin & Subramanian 1992, Nagarkar 2002, Montoya-Terreros 2003). Systematic arrangement was done using the system of Komárek *et al.* (2014).



**FIGURE 2.** A–D. *Brasilonema* sp. A. Filaments densely fasciculate. B. False branches. C. Intercalary heterocyte. D. Development of isopolar hormogonia. E–I. *Myochrotes* sp. E. Geminate and simple false branches. F. Filaments constricted, densely entangled and widening towards ends. G. Hormogonia in a row. H. Closed apex closed prior to hormogonia liberation. I. Isopolar filament with variations in diameter. Arrow pointing at crescent-shape hormogonia, ap = apical cell, nc = necridic cell, ihet =intercalary heterocyte. Scale bars: A = 20  $\mu$ m, D = 20  $\mu$ m, B, C, E–I = 6  $\mu$ m.

## Results

In 39 of the 56 samples, the dominant growths were heterocytous: eight morphospecies belonging to eight genera and three families. Following are the descriptions of the dominant heterocytous components of the rocky shore mats. Descriptions include taxonomic comments and occurrence.

Family Scytonemataceae

*Brasilonema* Fiore, Sant'Anna, Azevedo, Komárek, Kaštovský, Sulek *et* Lorenzi (2007: 794)

*Brasilonema* sp. (Figs. 2A–2D).

Thallus caespitose composed of blackish-green erect filaments densely fasciculate 2–3 cm high, filaments with rarely geminate false branching 9–15 µm wide. Sheaths firm, cylindrical, lamellate, yellowish brown. Trichomes cylindrical constricted or not, at cross-walls 6–10 µm wide, slightly tapered towards the ends also in hormogonia; apical cell colorless, distinctively short and rounded, cap-like. Cells isodiametric in old filaments 5–8 µm long, shorter than wide in apical zones 2–3 µm long, with blue-green, olive-green, granulated content. Heterocytes intercalary, elongated, flattened, discoid or cylindrical 8–15 µm long, 2–3 times longer than wide, one or rarely three heterocytes contiguous or near one another 4.5–6.7 × 1.8–4.8 µm (long × wide). Akinetes not found. Reproduction by isopolar hormogones attached to filaments, sometimes crescent-shape.

**Habitat:**—Supratidal and intertidal fringes; epilithic on granitic rock.

**Notes:**—These populations are morphologically closest to *Brasilonema angustatum* Vaccarino *et* Johansen (2012: 1180) but distinctive characters such as heterocyte size and number, apical cell shape, as well as its distribution in a marine biotope, in contrast to the freshwater habitat of *B. angustatum*, probably indicate a new taxon.

**Occurrence:**—MEXICO. Oaxaca: San Agustín Bay, 15°41' 17.41" N, 96° 14' 15.28" W, April and May 2004, April and December 2010, October 2012, August 2014, L. González-Resendiz & H. León-Tejera (C36, C57, C645, C694, C719, C737, C1313); Tangolunda Bay, 15° 46' 24.79" N, 96° 5' 28.32" W, August 2014 H. León-Tejera & L. González-Resendiz (C1288, C1289, C1290).

*Scytonema* sect. *Myochrotes* Bornet *et* Flahault (1887: 86)

'*Myochrotes*' sp. (*sensu* Komárek 2013) (Figs. 2E–2I).

Thallus prostrate, crustose or woolly, blackish-brown, usually up to 1 cm long. Filaments elongated, densely entangled, 3.4–8.6 µm wide, repeatedly falsely branched with divaricated solitary or geminate branches. Sheaths lamellated, yellowish-brown. Trichomes cylindrical, constricted at cross-walls, 2.3–6.0 µm wide, slightly narrowed in central parts of old trichomes. Cells olive-green, shorter than wide, rarely quadrate, 1.5–3.0 µm long. Heterocytes 2.0–2.8 µm long, 4.5–5.8 µm wide, intercalary ± cylindrical to ± quadrate, sometimes wider than vegetative cells. Reproduction by isopolar hormogonia, rarely heteropolar.

**Habitat:**—Supratidal fringe; epilithic on gneiss rock.

**Notes:**—Given the complexity the relationships among *Scytonema* Bornet *et* Flahault (1887: 85), '*Myochrotes*' and *Petalonema* Berkeley ex Correns (1898: 321), we consider it necessary to analyze the morphology of populations of other marine localities and perform molecular studies, before assigning a specific epithet. New report of the genus for the coast of Mexico.

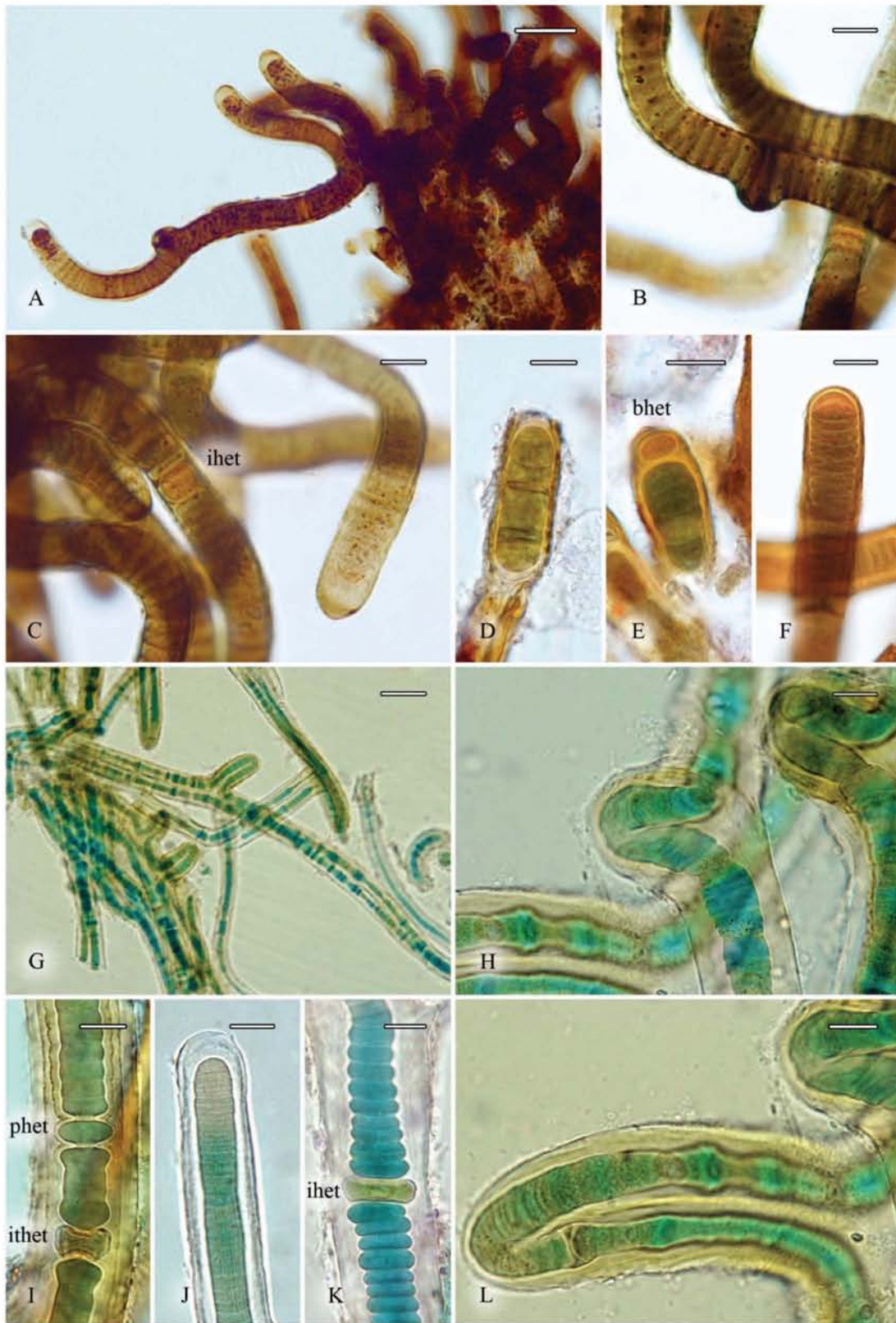
**Occurrence:**—MEXICO. Oaxaca: La Entrega Bay, 15° 44' 37" N, 96° 07' 40" W, December 2010, L. González-Resendiz & H. León-Tejera (C72, C73).

*Ophiothrix* Sant'Anna, Azevedo, Kaštovský *et* Komárek (2010: 218)

*Ophiothrix* sp. (Figs. 3A–3F).

Thallus short 100–150 µm high, black epilithic, formed by small groups of short yellowish to brownish filaments irregularly flexuous, creeping on substratum with erected ends forming a wide open "U", 6.5–9.0 µm wide, with false branching of scytonematoid or infrequently coleodesmioid type (almost basically heterocytes). Trichomes, 4.5–6.0 µm wide cylindrical along their whole length, not attenuated towards the ends, constricted at cross-walls; enveloped by a thin, firm lamellate yellowish sheath, closed or open at the apex after liberation of hormogonia. Cells cylindrical, always shorter than wide 1.2–3.0 µm; yellowish, pale blue-green or olive-green; apical cells widely rounded, without

calyptra. Commonly hemispherical, barrel-shaped or cylindrical, simple intercalary heterocytes 3.4–4.9 long  $\times$  5.0–6.6  $\mu\text{m}$  wide, in filaments as well as in isopolar hormogonia, rarely heteropolar (only at the base of a few hormogonia). Reproduction by isopolar hormogonia formed by necridic cell separation.



**FIGURE 3.** A–D. *Ophiothrix* sp. A. Filament with wide “U” shape. B. False branching detail. C. Apex closed and intercalary heterocyte. D. Isopolar hormogonia. E. Heteropolar hormogonia. F. Hormogonia formation by necridic cell. G–L. *Petalonema* sp. G. Thallus showing erect loops. H, L. Filament folds with loops. I. Isopolar hormogonia formation by heterocytes. J. Closed apex. K. Trichomes constricted at cross walls. nc = necridic cell, bhet = basal heterocyte, ihet = intercalary heterocyte, phet = pro-heterocyte. Scale bars: A = 20  $\mu\text{m}$ , G = 30  $\mu\text{m}$ , B–F, H–L = 6  $\mu\text{m}$ .

**Habitat:**—Supratidal fringe; epilithic on gneiss rock.

**Notes:**—Our populations resemble *Ophiothrix epibryos* (Komárek 2003: 224) Sant’Anna, Azevedo, Kastovský & Komárek (2010: 220), in particular in the shape of the apex, the lamellated sheath and easily fragmented filaments; on the other hand, they are also similar to the genus *Camptylonemopsis* Desikachary (1948: 46) in the “U” shape of filaments. However, our populations are marine whereas those of both *O. epibryos* and all species of *Camptylonemopsis* are freshwater. We will complete the polyphasic approach given the morphologic convergence with other genera of Scytonemataceae such as *Scytonema* and *Brasilonema*. New report of the genus for the coast of Mexico.

**Occurrence:**—MEXICO. Oaxaca: Cacaluta Bay, 15° 43’ 09.00” N 96° 09’ 59” W, December 2010 *H. León-Tejera L. & González-Resendiz* (C48), October 2012 *L. González-Resendiz & H. León-Tejera* (C658, C662).

*Kyrtuthrix* Ercegović (1929: 170)

*Kyrtuthrix* cf. *maculans* (Gomont) Umezaki (1961: 85) (Figs. 4E–4H).

Thallus crustaceous, flat, firm, forming a blue-green, expanded, but neatly delimited mat of up to 60 µm long, formed by a tight parallel series of isopolar filaments that form loops in the lower part, with narrowed (attenuated) ends towards the upper part. Filaments 10–60 µm long. Sheath firm, colorless, lamellate. Trichomes constricted at cross walls. Cells cylindrical, pyramidal to irregular 3–6 × 2.5–5.0 µm (long × wide). Heterocytes solitary, intercalary, cylindrical to quadrate 5–10 µm diameter. Reproduction by hormogonia.

**Habitat:**—Supratidal and intertidal fringes; epilithic on granitic rock.

**Notes:**—Our populations resemble *K. maculans* (Gomont 1901: 210) Umezaki (1961: 85) but its filaments are much shorter and its cell diameter is slightly smaller.

**Occurrence:**—MEXICO. Oaxaca: San Agustín Bay, 15° 41’ 17.41” N, 96° 14’ 15.28” W, December 2010, October 2012, August 2014 *L. González-Resendiz & H. León-Tejera* (C59, C61, C695, C700, C707, C708); Cacaluta Bay, 15° 43’ 09.00” N, 96° 09’ 59” W, August 2014 *H. León-Tejera L. & González-Resendiz* (C1319), Panteones beach at Puerto Angel, 15° 39’ 50.00” N, 96° 29’ 43.93” W, August 2014 *González-Resendiz & H. León-Tejera* (C1339, C1340, C1341).

*Petalonema* Berkeley ex Correns (1889: 321)

*Petalonema* sp. (Figs. 3G–3L).

Thallus caespitose or cushion-like, 5 mm high, blackish green; filaments isopolar, folds with loops at the base and terminal parts upwards. In old parts, filaments are prostrate on the substrate and then vertically erected 11.7–21.35 µm wide. Sheath thick, lamellated with divergent layers, hyaline to yellowish, apex closed. Ascendant false branches, often in pairs forming loops included within a common sheath. Trichomes coiled, spiral or only curved, 3.5–7.3 µm wide, cylindrical, torulose in parts and constricted at the cross walls. Cells cylindrical or barrel-shaped, green to blue-green 1.5–3.9 µm long. Heterocytes oblong to slightly compressed (1.6) 3.8 long × (4.2) 9.0 wide.

**Habitat:**—Supratidal and intertidal fringes; epilithic on granitic rock.

**Notes:**—Although our populations are in morphological accordance with the description of *P. incrustans* Komárek (2012: 143), there are differences in size, growth form and color as well as its distribution in a marine biotope; they were always found in crevices or partially shaded vertical walls. The populations cited here as *Petalonema* sp. probably belong to a new entity.

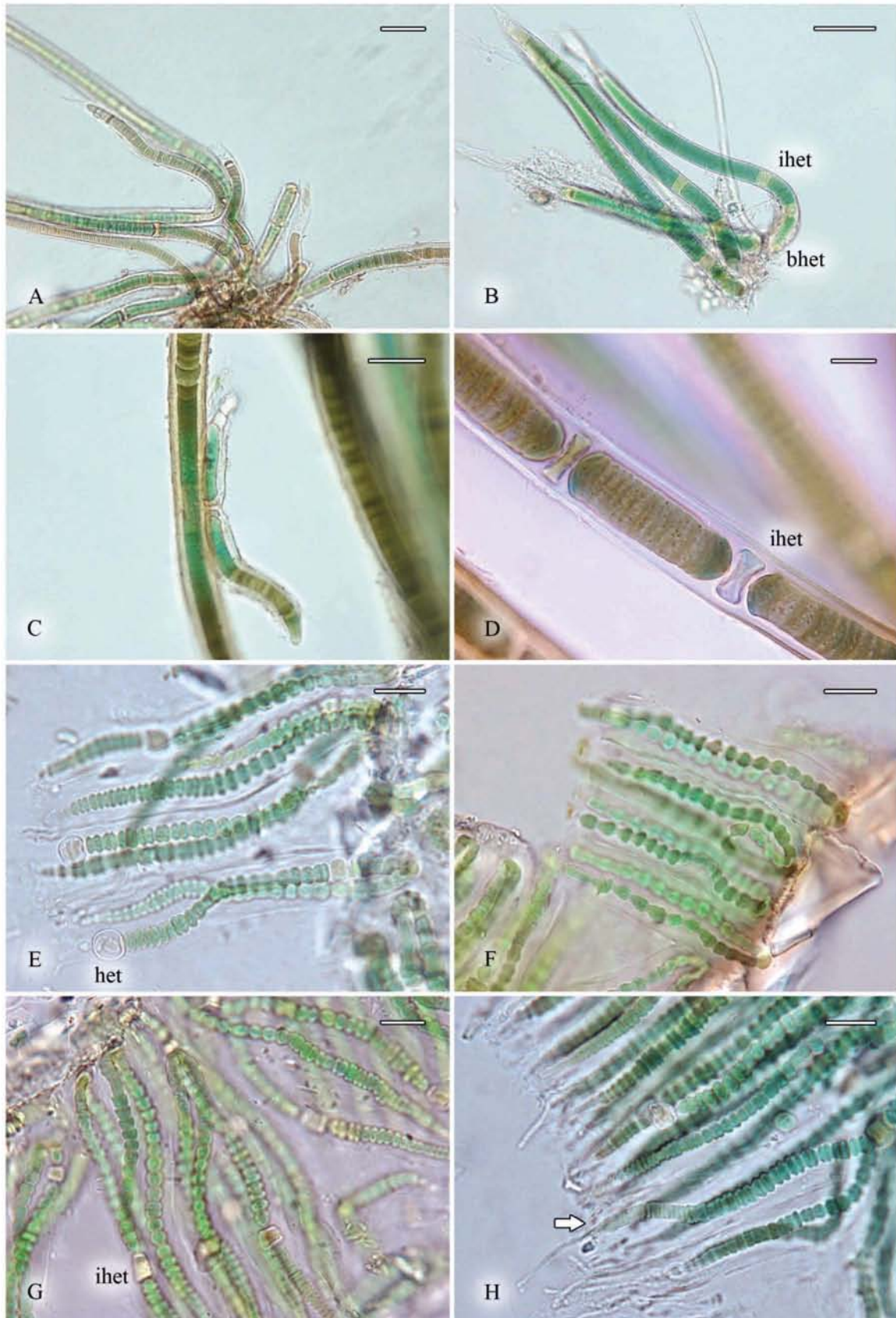
**Occurrence:**—MEXICO. Oaxaca: San Agustín Bay, 15° 41’ 17.41” N, 96° 14’ 15.28” W, December 2010, October 2012 *L. González-Resendiz & H. León-Tejera* (C57, C58, C719).

*Scytonematopsis* Kiseleva (1930: 174)

*Scytonematopsis* cf. *crustacea* Kováčik et Komárek (1988: 306) (Figs. 4A–4D).

Thallus caespitose, blue-green, blackish, or yellow-brown. Filaments densely entangled, blue-green, slightly curved, with double and single false branching, 5.1–14.1 µm wide. Young filaments are heteropolar, older ones are isopolar, narrowed at both sides to form a long hair. Sheath in old parts lamellated, hyaline to yellowish, narrower and open in terminal parts.

Trichomes constricted at cross-walls, thickened at the base, gradually attenuated above and ending in long, hyaline cellular hair 5.1–8.3 µm wide. Cells slightly granulated, shorter than wide (2.1–4.5 µm long), also in tapered region of trichome cells. Necridia dark blue-green, biconcave lens-shaped. Heterocytes basal or intercalary, hemispherical, spherical to oval-cylindrical, slightly complanate, solitary 2.9–5.0 µm long. Reproduction by hormogonia. Akinetes not found.

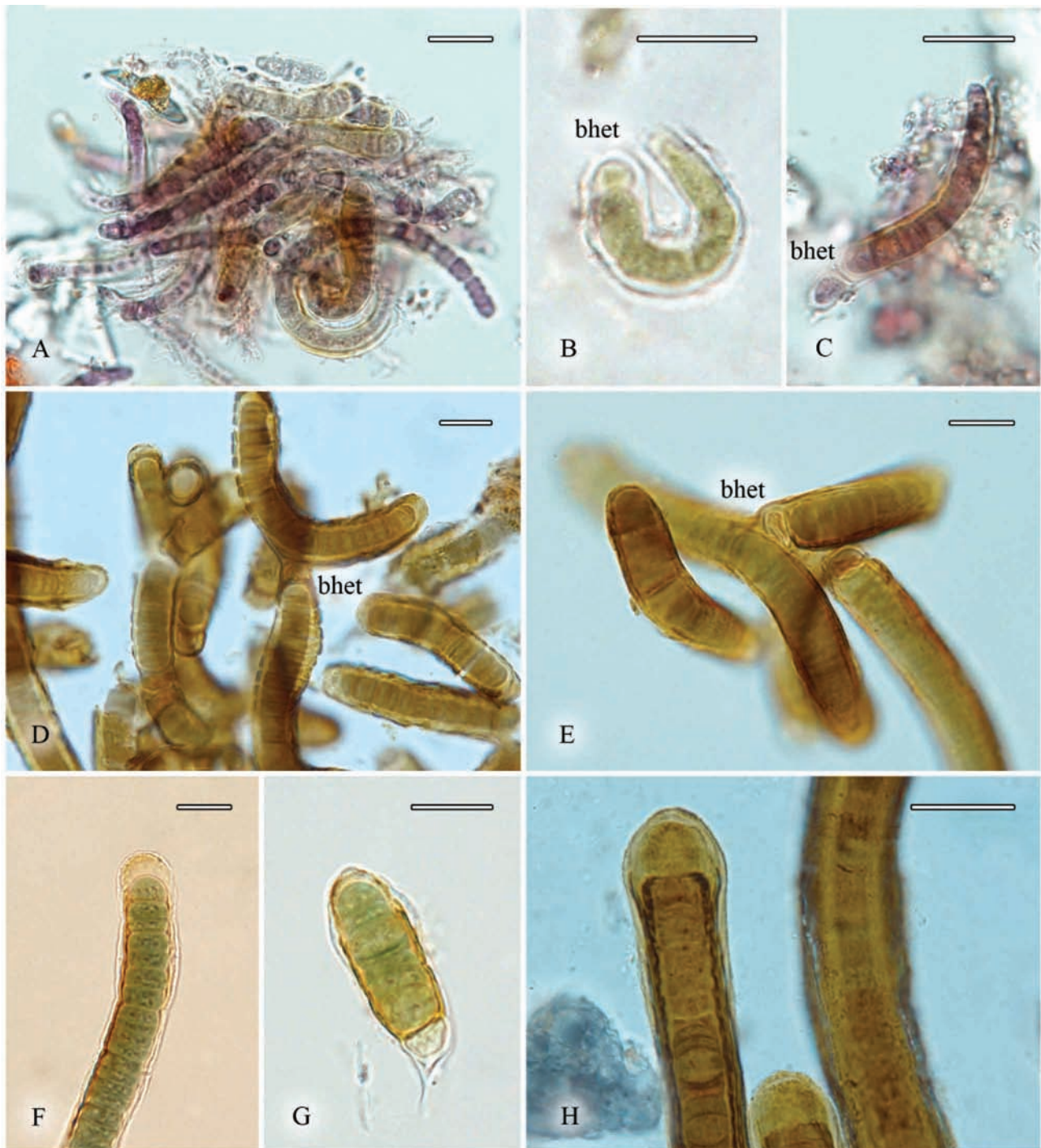


**FIGURE 4.** A–D. *Scytonematopsis* cf. *crustacea*. A. Thallus with false branching. B. Thallus of isopolar attenuated filaments, basal and intercalary heterocytes. C. Isopolar crescent-shaped development of hormogonia. D. Isopolar hormogonia formation. E–H. *Kyrtothrix* cf. *maculans*. E. Isopolar and attenuated filaments in parallel series. F. Filaments within a firm sheath. G. Epilithic thallus with intercalary heterocytes. H. Cells pyramid-shaped, arrow pointing at heteropolar hormogonia formation. het = heterocyte, ihet = intercalary heterocyte, bhet = basal heterocyte. Scale bars: A = 30  $\mu\text{m}$ , B–C = 20  $\mu\text{m}$ , D–H = 6  $\mu\text{m}$ .

**Habitat:**—Supratidal and intertidal fringes; epilithic on granitic rock.

**Notes:**—In the Huatulco material the thallus is smaller than previously reported for the Mexican coast in temperate Guadalupe Island by Setchell and Gardner (1930) as *Calothrix crustacea* Thuret ex Bornet & Flahault (1886: 359).

**Occurrence:**—MEXICO. Oaxaca: San Agustín Bay, 15° 41' 17.41" N, 96° 14' 15.28" W, December 2010, October 2012 L. González-Resendiz & H. León-Tejera (C57, C695, C700, C701).



**FIGURE 5.** A–C. *Calothrix* sp. A. Entangled filaments. B, C. Curved heteropolar filaments without terminal hair, cells more or less isodiametric. D–H. *Hassallia littoralis*. D. Heteropolar filaments with basal heterocyte. E. Divaricated false branch with basal heterocyte. F. Closed apex. G. Heteropolar hormogonia. H. Terminal widening of the sheath. bhet = basal heterocyte. Scale bars = 6 µm.

Family Rivulariaceae

*Calothrix* Agardh ex Bornet & Flahault (1886: 345)

*Calothrix* sp. (Figs. 5A–5C).



Macroscopic green, brown to blackish filamentous mats, epiphytic or epilithic; short, creeping, filaments not branched, up to 20–60 µm long, slightly widened at the base, 3–4 µm, slightly curved or coiled and narrowed towards to the apex, 1–2 µm wide, the ends without terminal hair. Sheaths fine, open at apex, colourless, homogeneous. Trichomes blue-green, 2.2–2.8 µm wide at the base, slightly constricted at cross-walls. Cells 1.5–3.0 µm long, slightly longer than wide almost isodiametric in lower parts. Heterocytes solitary, basal, spherical to ovoid 1.5–2.0 µm diam.

**Habitat:**—Supratidal and intertidal fringes; epiphytic on *Petalonema* sp. and ‘*Myochrotes*’ sp.; epilithic on granitic and gneiss rock.

**Notes:**—The filament of the mats are very small. Our material is in accordance with the description of the section *Calothrix* without terminal hair or akinetes, but not with the description of the morphology of any marine *Calothrix* species previously described.

**Occurrence:**—MEXICO. Oaxaca: La Entrega Bay, 15° 44’ 37” N, 96° 07’ 40” W, December 2010 González-Resendiz & H. León-Tejera (C73); San Agustín Bay, 15° 41’ 17.41” N, 96° 14’ 15.28” W, December 2010, October 2012 L. González-Resendiz & H. León-Tejera (C58, C708).

#### Family Tolypothrichaceae

*Hassallia* Berkeley ex Bornet et Flahault (1886: 115)

*Hassallia littoralis* González-Resendiz et León-Tejera in González-Resendiz et al. (2013: 37) (Figs. 5D–5H).

Caespitose, short mats brown to blackish; filaments cylindrical, straight or curved, parallelly oriented or intermingled. Falsely branched, branches tightly joined or irregularly divaricated to the main filament. Trichomes 3–6 µm wide, constricted at cross-walls. Cells cylindrical to barrel-shaped, shorter than wide, 3–6 µm wide, 1–3 µm long, with slightly granulated content. Sheaths firm, stratified, amber or dark yellowish-brown, often widening with pronounced, rounded terminals 3–7 µm in diameter. Heterocytes spherical, ovoid to cylindrical. Reproduction by hormogonia. A more detailed description is available in González-Resendiz et al. (2013).

**Habitat:**—Supratidal fringe; epilithic on granitic and gneiss rock.

**Notes:**—This species has been recorded previously for Tangelunda Bay as a macroscopic black filamentous mat. This report is new for Cacaluta and El Arrocito bays in the same environmental conditions of the type locality, expanding the known distribution on the coast of Oaxaca; always in the supratidal fringe.

**Occurrence:**—MEXICO. Oaxaca: Cacaluta Bay, 15° 43’ 09.00” N, 96° 09’ 59” W, October 2012 H. León-Tejera L. & González-Resendiz (C660, C661); Tangelunda Bay, 15° 46’ 24.79” N, 96° 5’ 28.32” W, August 2014 L. González-Resendiz & H. León-Tejera (C1295); El Arrocito Bay 15° 45’ 40.05” N, 96° 6’ 0.95” W, August 2014 L. González-Resendiz & H. León-Tejera (C1297, C1299).

## Discussion

**Taxonomy:**—Several of the heterocytous cyanoprokaryotes reported here are morphologically complex and in the midst of a deep taxonomic reevaluation to the degree that many taxa are being transferred to different or newly created families and even orders (Komárek et al. 2014). For example, *Brasilonema* was recently separated from *Scytonema* by Fiore et al. (2007) based on molecular studies. *Brasilonema* now contains the group of tropical species previously classified as *Scytonema*, particularly from tropical forests (Komárek 2013). No marine species had been previously described. Our samples differ both in morphological and ecological characters not recognized in other species of *Brasilonema*.

‘*Myochrotes*’ has been considered a section or subgenus of the genus *Scytonema* but recent works sustain that there are enough morphological differences to separate it as an independent genus (Komárek 2013, Komárek et al. 2014). Due to the lack of molecular studies this has not been yet validated. Komárek (2013) reports that some authors consider the subgenus or section ‘*Myochrotes*’ as part of the genus *Scytonema sensu lato*, and its morphological features are often similar to those of *Petalonema*, especially those of trichomes and sheaths. Our material from La Entrega Bay is in accordance with the generic description of ‘*Myochrotes*’ *sensu* Komárek (2013) but not with the morphology or ecology of any species previously described.

In *Petalonema* there are numerous populations morphologically convergent with the genera *Scytonema* and ‘*Myochrotes*’. Thajuddin & Subramanian (1992) and Nagarkar (2002) had reported *S. crustaceum* Agardh ex Bornet et Flahault (1887: 85) as a marine species. Recently, Komárek (2012) separated *P. incrustans* (Kützinger (1843: 216))

Komárek (2012: 143) from *Petalonema crustaceum* Agardh ex Kirchner in Engler & Prantl (1900: 79) ( $\equiv S. crustaceum$ ), both species as non-marine. Our populations are similar in general morphology to *P. incrustans* (a species that has significant differences with the typical *Petalonema*) but they are different in cell dimensions, ecology and geography, therefore they probably belong to a different entity.

The genus *Ophiothrix* Sant'Anna, Azevedo, Kastovský & Komárek (2010: 218) was described and classified as a member of the family Microchaetaceae; in 2014, Komárek *et al.* transferred it to the family Scytonemataceae, where all species are from freshwater habitats. Our populations referred here as *Ophiothrix* are additions for the marine environment.

It is now proposed (Komárek 2013), that the heterogeneous genus *Calothrix* contains several morphotypes, which probably represent separate genera, because the *Calothrix*-complex includes a wide geographic distribution, genetic diversity and therefore represents several genotypes (Komárek 2013). Our populations belong to the group of *Calothrix* species that do not form terminal hairs. According to Komárek (2013) it is probable that populations without terminal hairs belong to another, not yet taxonomically described taxon.

The genus *Kyrtuthrix* has two marine species, with very little morphological differences between them, both being euendolithic or partly epilithic. Our populations are epilithic on granitic rock, as were those of the first report for the Mexican coast (León-Tejera *et al.* 2005). Similar populations were also described from Brazil in Sant'Anna *et al.* (1985) and Crispino & Sant'Anna (2006) for the supratidal fringe and Montoya (2003) for three Peruvian sites of the supra and intertidal fringes. It is important that the Mexican populations of *K. cf. maculans* be characterized in detail, using the polyphasic approach. This report increases the number of localities reported for the coast of Oaxaca.

*Scytonematopsis crustacea*, reported as *Calothrix crustacea* for Guadalupe Island (Setchell & Gardner 1930), and *H. littoralis* (González-Resendiz *et al.* 2013), for the Mexican tropical Pacific) are morphologically and ecologically distinctive. Here we are expanding the distribution record of both species for the tropical coast of México.

It is important to note that marine species of *Brasilonema*, *Petalonema*, '*Myochrotes*', *Ophiothrix* and *Calothrix* cited here should be characterized in detail, using the polyphasic approach, to solve taxonomic uncertainties. Additionally, to help clarify the position and taxonomic relationships of Mexican marine *Scytonematopsis cf. crustacea* and *Kyrtuthrix cf. maculans*, the use of molecular markers and comparison with populations from other localities is needed.

**Ecology:**—The greater diversity and abundance of heterocytous populations in the upper and intertidal zones has been attributed to their diazotrophic capacity and stress tolerance, which are lacking in non heterocytous populations (Nagarkar 2002).

Most of the benthic rocky shore mats of the Huatulco coast in Oaxaca are dominated by growths formed by the association of several species belonging to different orders of cyanoprokaryotes, excepting *Brasilonema* and *Kyrtuthrix*, which are usually the only macroscopic species present. Heterocytous cyanoprokaryotes were always a dominant component in our samples and form a crustaceous or an entangled growth form intermingled with Oscillatoriales and Chroococcales. This has been already reported for other rocky shore environments (Whitton & Potts 1979, Sant'Anna 1995, 1997, Nagarkar 2002).

The most dominant species in terms of frequency (number of samples) and distribution (number of localities) was *Kyrtuthrix cf. maculans*, followed by *Brasilonema sp.* and *Hassallia littoralis*. It is clear that there is a close correlation between morphology and the environment. For example, the sheaths of all of our species, all exposed to high insolation, are brownish to yellowish. In the most exposed populations of *Kyrtuthrix*, the external part of the sheath covering the tips of the filaments are yellowish whereas the lower part of the sheath is hyaline. Further knowledge of this type of correlation in the supratidal and intertidal fringes will allow better predictions of the morphology of the species inhabiting them and a better understanding of their ecophysiology.

## Conclusion

Eight special marine morphotypes are characterized: *Brasilonema sp.*, *Myochrotes sp.* (*sensu* Komárek 2013), *Ophiothrix sp.*, *Petalonema sp.* and *Calothrix sp.* probably representing new taxa. The majority of these morphospecies are additions for Mexico's cyanoprokaryote diversity as well as the first step in the recognition of new taxa. Most of our material has a morphology slightly different to that of species described from non-marine and temperate biotopes, but the fact that our material comes from tropical marine environments justifies the use of '*sp.*' and '*cf.*' instead of the published specific epithets given in the identification manuals currently available for this type of tropical environment.

For these morphospecies, the application of molecular procedures will derive in a more robust and precise

taxonomic delimitation and will allow a better knowledge of the diversity of the cyanoprokaryotes of the tropical rocky shore.

### **Acknowledgments**

The authors thank Monica Peralta Caballero, Ariadna Mora Ramirez and Carolina Pineda Macedo for image edition. This paper constitutes a partial fulfillment of the doctorate degree of L. González-Resendiz, in the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). Authors acknowledge infrastructure provided by UNAM, and UNAM-DGAPA-PAPIIT IN221410 and IN223614 for financing sampling work. The authors would like to thank anonymous referees for their comments leading to improve the manuscript.

## 5. CAPÍTULO II.

En este capítulo se presenta la descripción de un nuevo género y especie de Chroococcal con un enfoque tradicional botánico, utilizando datos morfológicos y ecológicos. Este documento muestra la importancia de la delimitación morfológica de taxa en ambientes poco trabajados, con el fin de dar a conocer morfotipos antes no documentados en ambientes similares. Adicionalmente, en este trabajo se discute y propone, tomando como ejemplo las características particulares de este nuevo taxón, el uso y la importancia de la complejidad en la polaridad como carácter taxonómico de las Chroococcales.

### Artículo II

Gold-Morgan, M., **González-Resendiz, L.**, León-Tejera, H. P. & Montejano-Zurita, G. (2015) Description of coccoid cyanoprokaryote *Nisada stipitata morphogen. et sp. nov.* from the supralittoral zone in the tropical Mexican Pacific. *Phytotaxa* 220 (3): 268-276.



## Description of coccoid cyanoprokaryote *Nisada stipitata morphogen. et sp. nov.* from the supralittoral zone in the tropical Mexican Pacific

MICHELE GOLD-MORGAN<sup>1</sup>, LAURA GONZÁLEZ-RESENDIZ<sup>1,2</sup>, HILDA LEÓN-TEJERA<sup>1</sup> & GUSTAVO MONTEJANO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Coyoacán, Código Postal 04510, P.O. Box 70-474, México, Distrito Federal (D.F.), México

<sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

\* Corresponding author (e-mail: [michloug.m@ciencias.unam.mx](mailto:michloug.m@ciencias.unam.mx))

### Abstract

A distinctive morphotype consisting of an epilithic, one-layered colony of polarized, 1–3-celled pseudofilaments was recognized in the rocky shores of the state of Oaxaca in the Mexican tropical Pacific. Morphologically, it was not identifiable as any species of a previously described genus. It is similar to species from the former order Chroococcales, recently modified by Komárek *et al.* (2014), in its sessile heteropolar pseudofilaments. Specifically, it is most similar to the colonial species of the genus *Chamaesiphon*; and of *Chamaecalyx*, but the cells of the Mexican populations divide symmetrically in one or two planes, differentiating them from *Chamaesiphon* which divides asymmetrically and only in one plane, and from *Chamaecalyx*, which has multiple fission. The other defining feature is that all cells of the pseudofilament have differentiated mucilaginous structures (pad and/or stipe and cup). It has not been possible to obtain cultures of our material for further studies to complete the polyphasic approach. Nevertheless, its morphological characteristics and life cycle, plus its distinctive extreme biotope, form a unique combination of features that derive in our proposal of the morphogenus *Nisada gen. nov.*, with the type species, *Nisada stipitata, sp. nov.* We describe the proposed taxa and the problems and current inconveniences regarding its assignment to higher taxonomic levels. We also discuss the different degrees of complexity of heteropolarity in *Nisada* and other taxa.

**Key words:** Cyanobacteria, Cyanophyta, *Chamaecalyx*, *Chamaesiphon*, Chroococcales, colonial species, *Godlewskia*

### Introduction

Numerous recent studies of the Cyanoprokaryota at the ultrastructural and molecular levels have disputed monophyly of the previously described groups, including coccoids (Brito *et al.* 2012, Strunecký *et al.* 2014). Using the polyphasic approach the Czech school of Jiri Komárek has proposed a new classification. In its current version (Komárek *et al.* 2014) many taxa, especially genera, have been ranked temporarily awaiting the necessary information for a more definitive assignment.

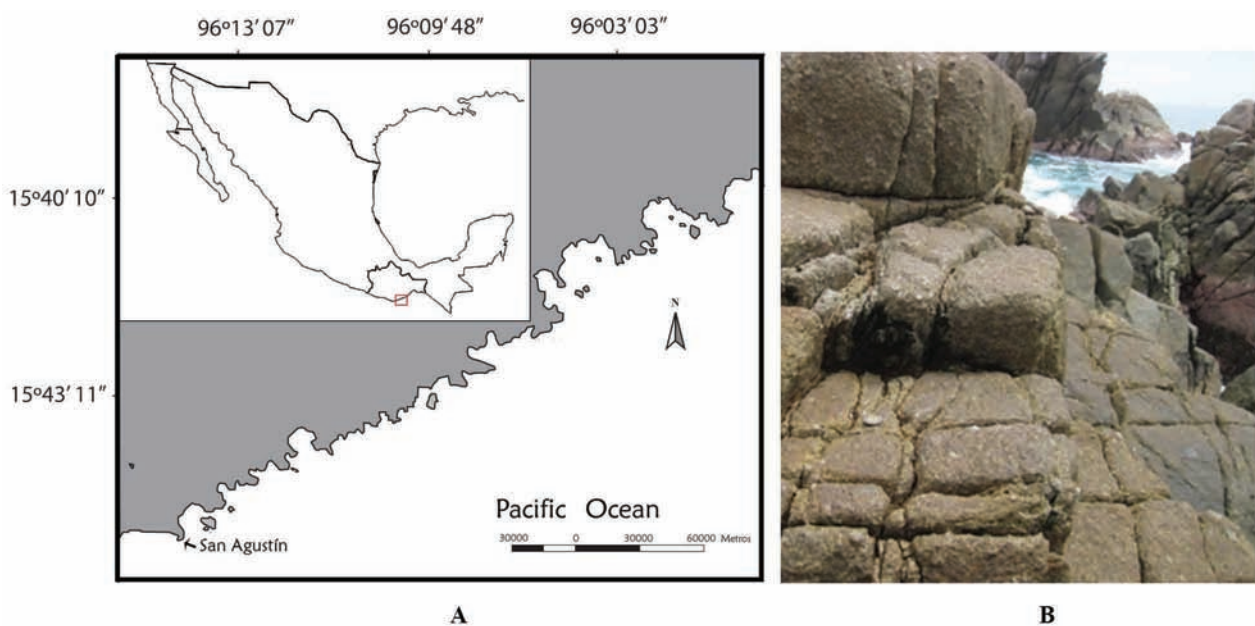
It is to be expected that surveys in little known types of environment, such as the tropical upper tidal zone or tropical alkaline marshes, will reveal undescribed species, perhaps belonging to new supraspecific taxa. This assumption is supported by Nabout *et al.* (2013) who estimate that 3582 species of cyanoprokaryotes (57% of the total estimated number) worldwide have yet to be described due to the lack of biodiversity studies within this group and specially in tropical/subtropical and terrestrial environments.

During the floristic studies of cyanoprokaryotes of the tropical Pacific coast of Mexico, we collected populations of a colonial biofilm in the upper tidal zone, which were not identifiable morphologically into any known cyanoprokaryote at the generic level. Our populations have conspicuous morphological and life cycle features not present in any of the species of the morphologically closest genera. We herein describe the unique morphology of the pseudofilaments that compose the colonies and discuss different degrees of complexity of sessile heteropolarity. We comment on the harsh biotope in which the Mexican populations live and finally propose the new genus and species, *Nisada stipitata, morphogen. et sp. nov.*, in the spirit of Komárek *et al.* (2014) expressed at the end of their article: “Registration

of cryptogenera and morphogenera has a role in advancing understanding, but are only ad interim solutions to the description of genera following polyphasic evaluation". Finally, we explain why we do not assign the proposed taxon to higher taxonomic levels. We shall refer to our material by the name *Nisada stipitata* in the remainder of this paper and to higher taxa with their current names in the classification of Komárek *et al.* (2014).

## Materials and Methods

Samples were collected during field trips made in April and December 2010 and October 2012 in San Agustín, Huatulco, Oaxaca (Fig. 1A) in the tropical Mexican Pacific. The tides are mixed with semidiurnal dominance. The Sierra Madre del Sur mountain chain ends in the coast of Huatulco, forming bays and rocky cliffs which characterize this portion of the Pacific, with a predominance of granitic and gneiss rocks (CONANP 2003). The upper tidal zone is approximately 7 m a.s.l. (Fig. 1B). (More environmental and site information in González-Resendiz *et al.* 2013). The cyanoprokaryotic growths were collected with chisel and hammer. Samples were kept dry until they were observed under the microscope after rehydration and fixation in 4% formaline in seawater, up to 6 months later. Semipermanent slides were made with glycerine jelly. Observations and micrographs were made under an Olympus BX51 microscope equipped with a DP12 digital camera. Epifluorescence micrographs were taken with an Olympus Provis AX70 microscope. Measurements were made using SigmaScan©Pro. Taxonomic determination was done following Geitler (1932) and Komárek & Anagnostidis (1998) for taxonomic position Komárek *et al.* (2014) was used.



**FIGURE 1.** San Agustín Bay, state of Oaxaca, México. A. Map showing location of collection site. B. Panoramic photograph of the supralittoral zone of the site.

## Results

Class *Cyanophyceae*, *incertae sedis* (see under Discussion)

*Nisada* Gold-Morgan, González-Resendiz, León-Tejera *et* Montejano, *morphogen. nov.* (Figs. 2–6)

Biofilm composed of a continuous and homogeneously structured mucilaginous, one-layered colony, sometimes mixed with other cyanoprokaryotes (Figs. 2A–G; 4A) made up of densely, parallelly arranged, polarized unicells to pseudofilaments (Figs. 2D, H–M). Basal and non-basal cells of the pseudofilament with differentiated mucilaginous structures: basal pad, stipe and cup-like structure (Figs. 2I–M; 4B, C) (except for the pad which is part only of the basal cell), therefore pseudofilament and each cell heteropolar.

Pseudofilaments set individually and vertically in the also mucilaginous, black, thick, rigid, well-delimited colonial sheath visible in top and lateral views (Figs. 2E, G, H). Basal/mother cell dividing symmetrically in a plane perpendicular to the longitudinal axis of the pseudofilament (Figs. 3A, B, F); first daughter cells dividing symmetrically either in a plane perpendicular to the longitudinal axis (morph 1; Figs. 3B, F) or parallel to this axis (morph 2; Fig. 3D) in pseudofilaments of the same colony; second daughter cells (present only in morph 1) dividing symmetrically in a perpendicular plane (Fig. 3B). All daughter cells reproductive and, when released (except the basal/mother cell), fix themselves in the colonial mucilage and begin a new cycle (Figs. 3E, H). The basal/mother cell remains and divides again, also initiating a new cycle. In morph 1, first daughter cells either double their size before dividing (Figs. 2K, L) and are released, or triple it and are then released without dividing (Fig. 2I). In morph 2, the two daughter cells resulting from longitudinal division of the first daughter cell are released after this division. Both morphs are present in the same colony but morph 1 is the most abundant. No morph distribution pattern is apparent within a colony.

**Type:**—*Nisada stipitata* Gold-Morgan, González-Reséndiz, León-Tejera *et* Montejano, *sp. nov.* (see below)

**Etymology:**—*Nisada* (Zapotec) = ‘Marine’ (Zapotec is the language spoken by one of the ethnic groups of Oaxaca).

### ***Nisada stipitata* Gold-Morgan, González-Reséndiz, León-Tejera *et* Montejano, *sp. nov.* (Figs. 2–6)**

Epilithic colonies of up to 5 mm in height. Biofilm formed by a colony of parallel, erect, short pseudofilaments of a maximum of three cells. From top view, colonies seen as composed of black round or oval cells which are pseudofilament apices: single (morph 1 in Figs. 2G and H) or in pairs (morph 2 in Figs. 2E and G). In lateral view, pseudofilaments with three types of mucilaginous structures visible: pad, stipe and cup, as cited in the generic description. Pseudofilaments enveloped by individual grayish-black, thin, firm or slightly diffuent sheaths (Fig. 2I). Stipe with rigid mucilage, straight, conical or an inverted cone, with alternating horizontal dark and light stripes or bands; top of stipe with a black, cup- or bullhorn-shaped mucilaginous structure (Figs. 2I, G; 3C; 4B, C). Cell content smooth, without granules, colorless or with an irregular brownish pattern (Figs. 2I, K; 3A, E). Cell shape diverse: spherical, hemispherical, quadrate, clavate, ovate, obovate, elongate or an inverted cone (Figs. 2L, M; 3E, F). Reproductive cells formed by binary fission. In morph 1, one or two daughter cells are released at a time; in morph 2, the two reproductive upper cells are released at a time. Dimensions: morph 1: pseudofilaments up to 7  $\mu\text{m}$  (length); basal cells 0.5–3.0  $\times$  1.0–2.5  $\mu\text{m}$  (l  $\times$  w); daughter cells 1.5–3.0  $\times$  1.0–2.5  $\mu\text{m}$  (l  $\times$  w); in top view cells 1.0–2.5  $\mu\text{m}$  (diameter). Morph 2: pseudofilaments up to 6  $\mu\text{m}$  (length); basal cell 2.0–2.5  $\times$  2.0  $\mu\text{m}$  (l  $\times$  w); daughter cells 3.0  $\times$  1.5–2.0  $\mu\text{m}$  (l  $\times$  w); in top view 3.0  $\mu\text{m}$  (diameter).

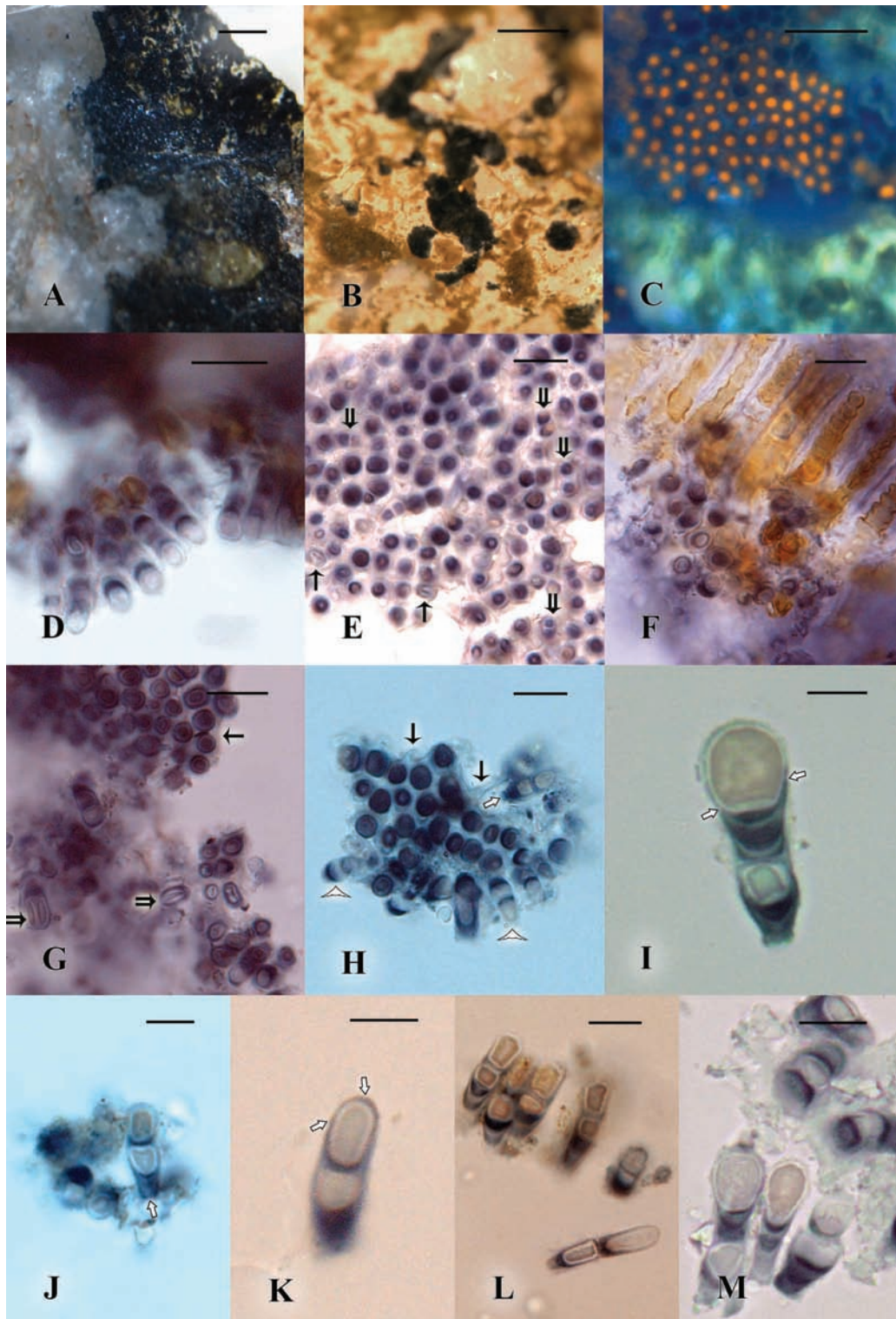
**Type:**—MEXICO. Oaxaca: San Agustín, insolated plateau of granitic cliff 7 m a.s.l., off marine tropical shore not exposed directly to wave shock, but only receiving intermittent spray, 15° 41' 17.41" N, 96° 14' 15.28" W, González-Reséndiz & León-Tejera, 02-12-2010 (C59, C61), 03-10-2012 (C701) (holotype FCME! C59, isotypes FCME!, C61, C701).

**Etymology:**—from Latin *stipitata*=‘stipitate’.

**Observations:**—The basic pseudofilament morphology in *Nisada* has many variants due to the way the cup and stipe develop and to the growth process of the pseudofilament. The cup begins as a narrow horizontal band which increases in width and each ‘horn’ seems to grow upwards (Figs. 2I, K) until the two join. Different stages of this apparently upwards growth can be seen in lateral view as longer or shorter horns.

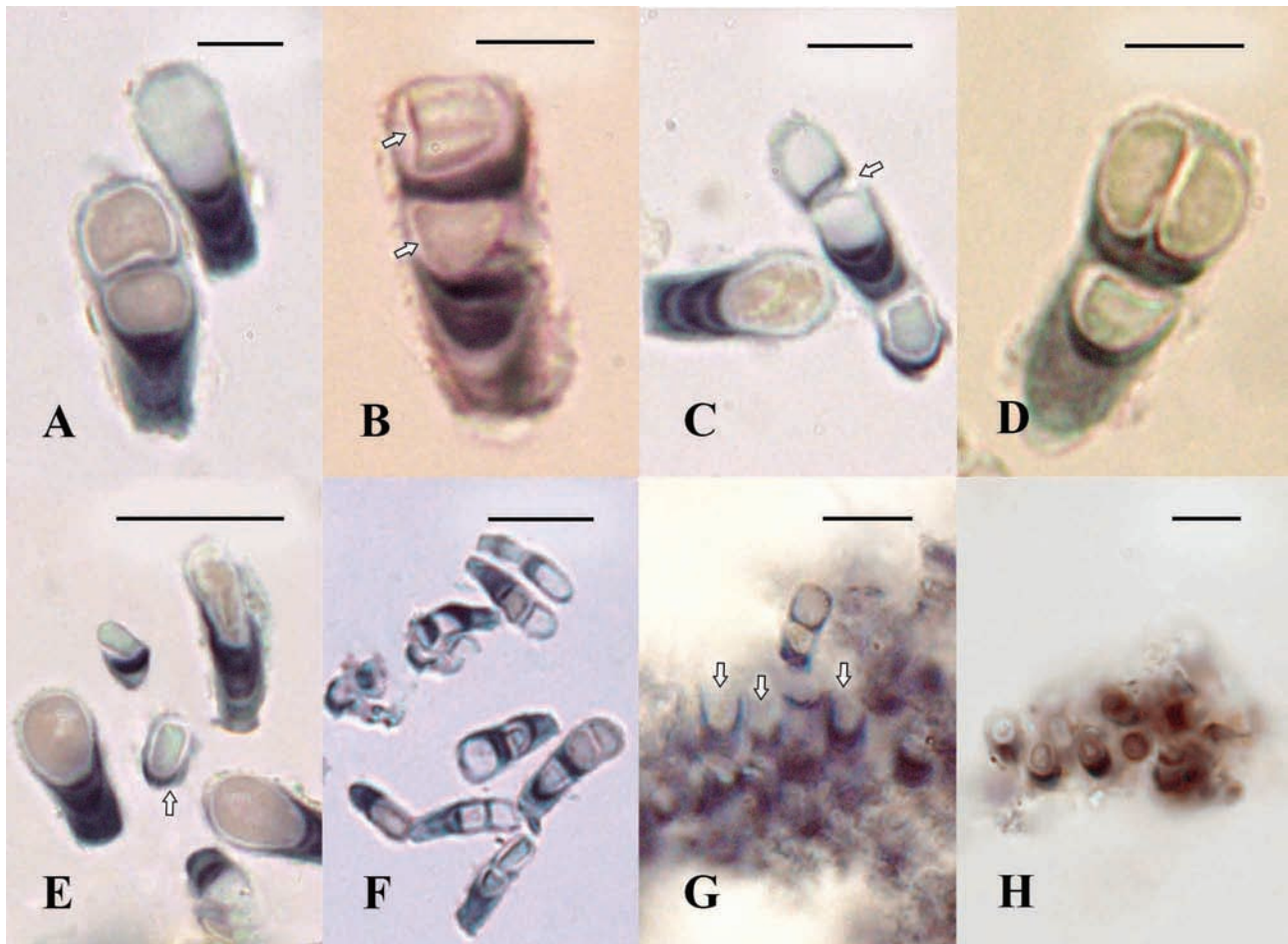
Pseudofilament heteropolarity in *N. stipitata* is expressed shortly after a cell enters in direct contact with a substrate, as in other heteropolar coccoid species, but also after every division of a non basal cell it produces a cup and stipe, or at least a cup, before being released. Even when the division of the first daughter cell occurs lengthwise, there is a cup and stipe between the basal mother cell and the two daughter cells. This ‘stronger version’ of heteropolarity of *N. stipitata* is associated with the basal part of each cell, whether in contact with an external substrate or another cell of its pseudofilament.

*Nisada stipitata* is very stable regarding the number of cells of the pseudofilament and the presence of its differentiated mucilaginous features; but it is also morphologically quite diverse. Three factors contribute to its variability, aside from that due to the development of the cup-stipe: 1) cell growth in different length/ width proportions, between and within pseudofilaments; 2) cell size reached before division or release; and 3) the possibility of two alternative planes of division of the first daughter cells.



**FIGURE 2.** Morphology of *Nisada stipitata*. A. Macroscopic view of partially covered rock (black portion). B. Macroscopic view of strip of biofilm on rock. C. (tv) Pseudofilament apices in fluorescent microscopy. D. (tv) Edge of biofilm with pseudofilaments in a row. E. (tv) Apices of morph 2 before cell division (single arrow) and after division but before separation (double arrow). F. With dying filaments of *Kyrthuthrix cf. maculans*. G. (tv) Colonial mucilage (single arrow); apices of morphs 1 and 2 and (lv) two morphs 2 (double arrows). H. (tv) Apices of morph 1 with a few pseudofilaments in lv (arrow heads); pad of a complete pseudofilament (white arrow) and colonial mucilage (black arrow). I. (lv) Pseudofilament of morph 1 with developed stipe and cups; “horns” (sheath) with synchronous growth (arrows). Daughter much larger than mother cell. J. (lv) Pseudofilament of morph 1 without pad (base of stipe, arrow). K. (lv) Pseudofilament of morph 1 showing “horns” (sheath) with asynchronous growth (arrows). L, M. Diversity of morphology of morph 1. Micrographs D–M with light microscopy. tv = top view, lv = lateral view. Scale bars: A = 1 mm, B = 200  $\mu$ m, C = 25  $\mu$ m, D–H, J, L = 6  $\mu$ m, I, K, M = 3  $\mu$ m.



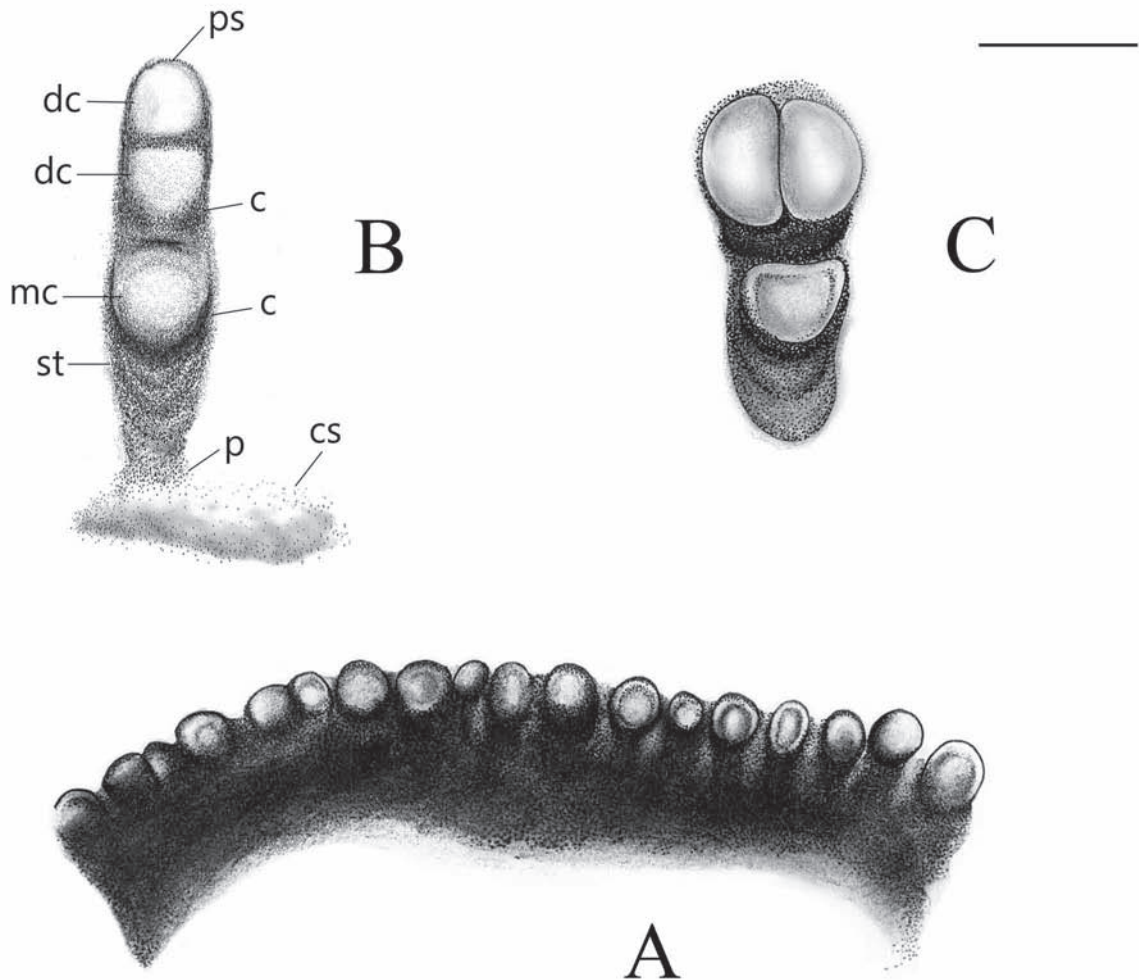


**FIGURE 3.** Stages of reproduction of *Nisada stipitata* in lateral view. A. (lv) Two pseudofilaments of morph 1 with and without cell division; perpendicular plane of division evident in left pseudofilament. B. Two-celled pseudofilament of morph 1 with beginning of perpendicular cell division of the daughter cell (top arrow); displaced basal/mother cell allowing partial view of the inside of the cup (bottom arrow). C. (lv) Two pseudofilaments of morph 1. Three-celled pseudofilament with fracture (arrow). D. (lv) Complete pseudofilament of morph 2 with division of daughter cell. E, F. Diversity of stages of the life cycle of morph 1. Pseudofilaments with all or some of the differentiated mucilaginous structures. Basal cell with incipient cup (arrow). G. (lv) Empty cups/stipes set in the colonial mucilage (arrows). H. (lv) Basal cells with different degrees of development, set in colonial mucilage. Scale bars: A–E = 3  $\mu$ m, F–H = 6  $\mu$ m.

## Discussion

**Taxonomic considerations:**—The taxonomy of coccoid cyanoprokaryotes is based principally on cell morphology (shape and polarity), patterns of cell division, reproduction and thallus structure (unicellular or colonial). The heteropolar coccoids are classified in three families and orders. The genus *Nisada* is most similar to the species of *Chamaesiphon* A. Braun & Grunow in Rabenhorst (1864: 177) within the Chamaesiphonaceae/Synechococcales; to *Godlewskia* Janczewski (1883: 142) *sensu* Komárek *et al.* (2014: 300, 302) in the Stichosiphonaceae/Chroococcales; and to species of *Chamaecalyx* Komárek & Anagnostidis (1986: 199) in the Pleurocapsaceae/Pleurocapsales in the classification of Komárek *et al.* (2014). Of these taxa, it is most similar to the colonial species of *Godlewskia* and several of *Chamaesiphon* in having of heteropolar cells. It also is similar to *Chamaecalyx* in having more than one plane of cell division.

The differences between *N. stipitata* and other taxa with coccoid, sessile, heteropolar pseudofilaments are: 1) *N. stipitata* undergoes symmetrical, binary cell division and therefore does not produce exocytes or baeocytes; 2) it presents two morphs and therefore two variants of the life cycle; 3) it exhibits ‘strong’ heteropolarity (all cells heteropolar) and therefore a more complex morphology; and 4) the morphological differentiation of its stipe versus the simple stipe in taxa with this feature. It differs from the colonial species of this group in the possibility of having two planes of division, not only one as in some *Chamaesiphon* and *Godlewskia*, and not more than two as in *Chamaecalyx*, which undergoes almost simultaneous multiple fission.



**FIGURE 4.** (lv) Line drawings of *Nisada stipitata*. A. Edge of biofilm with pseudofilaments in a row. B. Complete pseudofilament of morph 1. C. Complete pseudofilament of morph 2. Ps = pseudofilament sheath, dc = daughter cell, c = cup, mc = mother cell, st = stipe, p = pad, cs = colonial sheath. Scale bars: A = 8  $\mu\text{m}$ , B, C = 6  $\mu\text{m}$ .

*Nisada* also has several features in common with *Pleurocapsa* Hauck (1885: 515)/Pleurocapsaceae such as being a thin-layered, epilithic cluster of cells which form uniseriate or multiseriate rows, enveloped in a coloured, firm sheath. In this genus, a longitudinal division of the apical cell results in pseudodichotomous divarication typical of it (Komárek & Anagnostidis 1998). However, whereas *Pleurocapsa* is a crust formed by true multicelled pseudofilaments, with irregular or radial rows and enveloped by a thin sheath, *Nisada* is a mucilaginous film formed by pseudofilaments with a maximum of three cells, arranged in parallel rows, presenting a very thick colonial sheath. Longitudinal division occurs only in morph 2 of *Nisada* (Fig. 4C) and it does not result in divarication. There are also differences in the type of cell division and reproduction. *Pleurocapsa* has an irregular binary fission which may lead to baeocytes or nanocytes, whereas *Nisada* has symmetrical binary fission which forms two or three large reproductive cells.

An additional feature of *N. stipitata* is that each reproductive structure is liberated from its pseudofilament and henceforth grows as an independent individual, easily distinguishable from others. The consequence is the constitution of one-layered colonies, which are densely arranged but not clustered or stacked. This is different from what occurs in several colonial, sessile heteropolar pseudofilaments such as in *Godlewskia*, for example, or in the recently described *Chamaesiphon komarekii* Rott (2008:39) or *Ch. stratosus* Sant' Anna *et al.* (2011:26), in which reproductive structures (exocytes) remain attached to the sheath of the mother cell and develop a new pseudofilament *in situ* forming multilayered shrub-like colonies.

Planes of cell division and type of reproductive structures are diacritical features at the family level in the classification of Komárek *et al.* (2014), and sessile heteropolar pseudofilaments are placed in three families belonging to three orders: Chamaesiphonaceae/Synechococcales, Stichosiphonaceae/Chroococcales and Pleurocapsaceae/Pleurocapsales. *Nisada* is not in accordance with any of the three groups, which are built with insufficient information (ancient single reports or without sequence data for most taxa) or information which indicates polyphyletic groups, as explained in detail for

each order and family by Komárek *et al.* (2014). Part of these problems, in turn, are caused by the difficulty of culturing and having enough material for molecular studies. Additionally, reproductive structures in Cyanoprokaryota in general, and in coccales in particular, require further work to clarify the different types of structures that exist in different groups and the processes that produce them. For example, in some coccales there are intermediate forms of division between typical binary fission and simultaneous or sequential multiple fission, such as in *Chamaecalyx* which, although currently assigned to Pleurocapsaceae, does not produce the characteristic baeocytes of this family. Furthermore, regardless of these conceptual problems, the structures of *Nisada* are not either exocyte-or baeocyte-like, as mentioned above, as they are the result of symmetric division. The need for further studies on types of reproductive structures and the atypical characteristics regarding precisely planes of cell division and type of reproductive structures in *Nisada*, have led us to consider it premature to try to solve its placement above the genus level or to name its reproductive structures until more information is available.

*Nisada* was collected in an extreme environment: the upper littoral zone on granitic rocks subjected to high insolation, variable amounts of saline spray, rain and desiccation. This environment has not been explored by phycologists and, given its harshness, finding an undescribed taxon was predictable. The same situation occurred at a larger scale in the surveys done in the marshes the surveys done in the marshes of Belize by Komárek & Komárková-Legnerová (2007) and in the studies of the cyanoprokaryotes of central Mexico (Komárek *et al.* 1996).

**Life cycle considerations:**—Reproductive mechanism(s) are not yet totally clear because, although we have recognized the reproductive structures, which are produced after the symmetric binary fissions in both morphs, we have not observed unequivocal evidence of their process of liberation such as opening of the apical sheaths, gelatinization or pores. We have found empty stipes and cups (Fig. 3G), as well as pseudofilaments with fractures of different degrees of completion between mother and daughter cells in morph 1 (Fig. 3C), another possible mechanism of release, but it is possible that manipulations of the material originated them. On the other hand, the biofilm is quite fragile and, consequently, it may also break easily in nature. In morph 2, the two cells produced by the longitudinal division, most probably separate along this plane. In Figs. 5 and 6 we present the life cycles of morphs 1 and 2, respectively, with the current available information. As for the beginning of the life cycle, we have found (in lateral view) small, mostly spherical cells fixed in the colonial mucilage with an incipient mucilaginous band initiating the cup (Figs. 3E, H); and basal cells with well-developed stipes and cups (Figs. 3A, E).

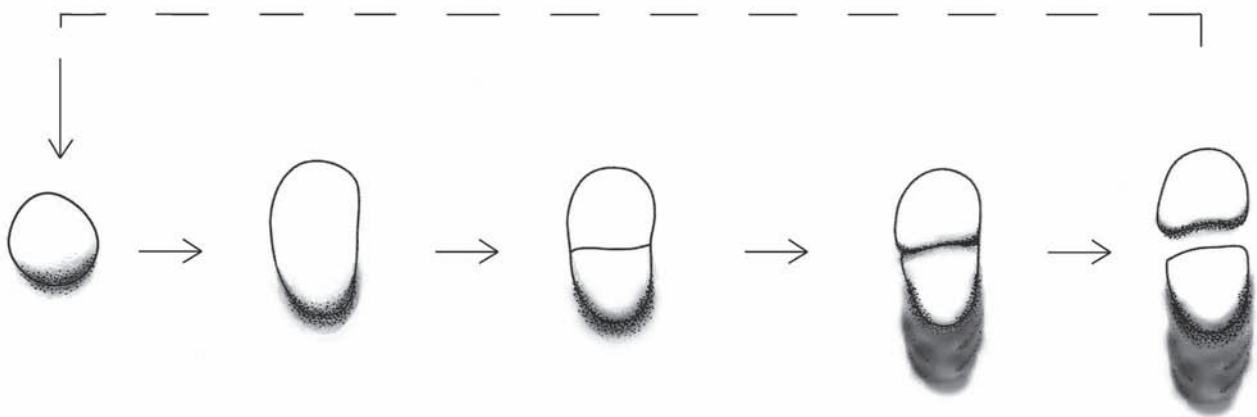


FIGURE 5. Line drawing of life cycle of morph 1.

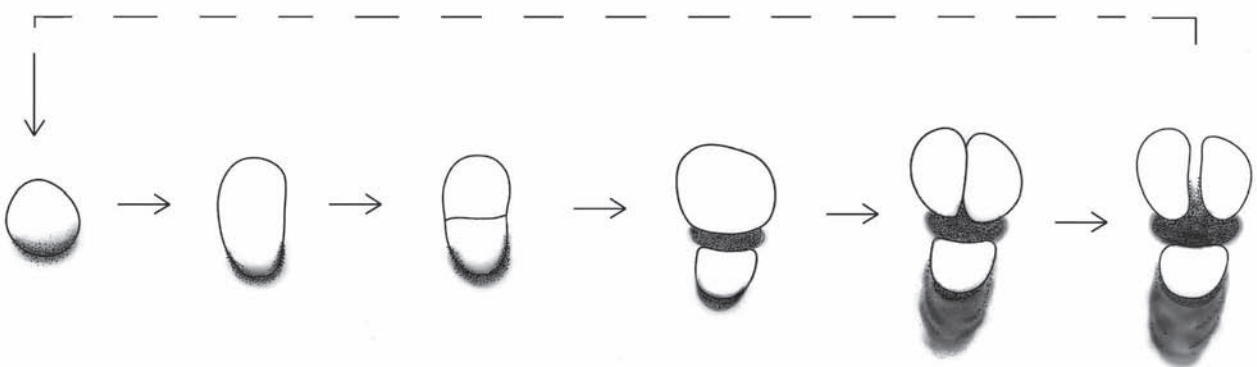


FIGURE 6. Line drawing of life cycle of morph 2

## Conclusion

Considering the high estimated percentage of undescribed species of cyanoprokaryotes, and the unbalanced approximation to the exploration of different geographic latitudes and types of environments, finding of a new species in the upper tidal zone of a tropical coast is in line with the implicit prediction. We also conclude that degree of heteropolarity in cyanoprokaryotes is a new and useful taxonomic criterion and heteropolarity an interesting physiological phenomenon in need of further study.

## Acknowledgments

The authors thank M. Sc. Alejandro Martínez Mena for his extraordinary technical assistance with epifluorescence images. Our special thanks to L.A.V. Mónica Peralta Caballero for image edition and L.A.V. Ana Hernández Vázquez for illustrations. The authors also thank the two anonymous reviewers for *Phytotaxa* for their very valuable and constructive evaluations. This paper constitutes a partial fulfillment of the doctorate degree of L. González-Resendiz, in the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). Authors acknowledge infrastructure provided by UNAM, and Project UNAM-DGAPA-PAPIIT 223614.

## 6. CAPÍTULO III.

En este capítulo se presenta la descripción de una nueva especie de Nostocal de la costa oaxaqueña. En este trabajo se utiliza y discute la importancia del enfoque polifásico en poblaciones de cianoprocariontes marinos para el conocimiento de la diversidad de ambientes considerados extremos, particularmente de zonas tropicales que han sido largamente olvidadas.

### Artículo III

**González-Resendiz, L.,** León-Tejera, H. P., Díaz-Larrea, J., Alba-Lois, L. & C. Segal-Kischinevzky (2013) *Hassallia littoralis* sp. nov. (Cyanobacteria, Microchaetaceae) from Mexico's marine supralittoral based on morphological and molecular evidence. *Phytotaxa* 137: 35–47.



## ***Hassallia littoralis* sp. nov. (Cyanobacteria, Microchaetaceae) from Mexico's marine supralittoral based on morphological and molecular evidence**

LAURA GONZÁLEZ-RESENDIZ<sup>1,2\*</sup>, HILDA P. LEÓN-TEJERA<sup>1</sup>, JHOANA DÍAZ-LARREA<sup>3</sup>, LUISA ALBA-LOIS<sup>4</sup> & CLAUDIA SEGAL-KISCHINEVZKY<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Coyoacán, Código Postal 04510, P.O. Box 70–474, Mexico, Distrito Federal (D.F.), Mexico

<sup>2</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

<sup>3</sup> Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. A.P. 55-535, México, D.F. 09340, México.

<sup>4</sup> Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F., México.

\* Corresponding author ([mlauragonzalez@ciencias.unam.mx](mailto:mlauragonzalez@ciencias.unam.mx))

### **Abstract**

A new species of *Hassallia* (Cyanobacteria, Nostocales, Microchaetaceae) from a supralittoral tropical marine biotope is described. *Hassallia littoralis* is a false-branched nostocalean cyanobacterium with caespitose free filaments or with fasciculated individual filaments not in a common sheath. Filaments are mainly heteropolar, bearing mono- and bi-pored heterocysts and isopolar or heteropolar hormogonia. The sheath is often widening, with pronounced rounded terminals. This new species is defined according to molecular, morphological and ecological criteria, considering data from different stages of its life cycle as well as the 16S rRNA partial gene sequence.

### **Introduction**

In recent decades, many important revisions have occurred for Cyanobacteria, applying the polyphasic approach that generated a modern classification system (Hoffmann *et al.* 2005). This strategy has led to major advances in taxonomy and the phylogenetic cyanobacterial classification by combining the traditional morphological characterization with the inclusion of molecular and ecological data from cultured, and especially field material. This new approach has provided essential support for the modern classification system of cyanobacteria (Komárek 2006). Key studies such as those of Flechtner *et al.* (2002), Gugger *et al.* (2002), Iteman *et al.* (2002), Rajaniemi *et al.* (2005), and Komárek *et al.* (2012), among others, have contributed to support the relevance of this approach, that has produced the description of numerous new taxa, as well as species being transferred into different generic entities.

The family Microchaetaceae (Nostocales) has been under intensive revision, with several new species and even genera being described, such as *Spirirestris* Flechtner & Johansen in Flechtner *et al.* (2002: 6), *Rexia* Casamatta, Gomez & Johansen (2006: 23), *Streptostemon* Sant'Anna, Azevedo, Kastovský & Komárek (2010: 220), *Ophiothrix* Sant'Anna, Azevedo, Kastovský & Komárek (2010: 218), *Godleya* Novis & Visnovsky (2011: 14), *Toxopsis* Lamprinou & Pantazidou in Lamprinou *et al.* (2012: 2872), and *Calochaete* Hauer, Bohunická & Mühlsteinová (2013: 38). Currently, the family Microchaetaceae contains 13 genera (Table 1).

*Hassallia* Berkeley ex Bornet & Flahault (1886–1888: 115), *Coleodesmium* Borzi ex Geitler (1942: 154) and *Tolypothrix* Kützing ex Bornet & Flahault (1886–1888: 118) are genera that show some morphological overlapping traits, and therefore have delimitation problems. Even *Hassallia* and *Coleodesmium* have not been accepted in some identification manuals (Komárek *et al.* 2012), for instance Starmach (1966) included several species of *Hassallia* within *Tolypothrix*, and similar criteria were used by Bourrelly (1969, 1970). Similar morphotypes of *Hassallia* have been sometimes identified as members of genus *Tolypothrix*, such as

*T. bouteillei* (Brébisson & Desmazières ex Bornet & Flahault) Lemmermann (1910: 219), which was recently included within genus *Hassallia* (Komárek *et al.* 2012) and has been recorded as the marine *Hassallia bouteillei* Brébisson & Desmazières ex Bornet & Flahault (1886–1888: 116) by Bárbara *et al.* (2005). In addition, populations of *T. byssoidea* (Berkeley) Kirchner in Engler & Prantl (1898: 80) are reported by Whitton & Potts (1979) as endolithic and chasmolithic in the Aldabra supralittoral, these probably belong to *Hassallia byssoidea* Hassall (1845: 233) in Bornet & Flahault (1888: 116).

The supralittoral zone is a distinctive extreme biotope from the intertidal zone to the limit of terrestrial vegetation (Garbary 2007). This zone is inhabited by few organisms, and is considered to have one of the toughest physical conditions (Ramírez-Reinat, 2010). Mexican marine cyanobacteria are poorly known, with just a few studies describing populations of this group of organisms (León-Tejera & Montejano 2000, López-Cortés *et al.* 2001, Montejano & León-Tejera 2002, León-Tejera *et al.* 2003, 2005). Previous reports from the supralittoral zone in Oaxaca coasts are few, reporting dark green-brown crusts or dark green filamentous mats. For the supralittoral of the same region (San Agustín, Huatulco area), *Scytonema cf. insulare* Sant'Anna (1988: 528), a heterocystous cyanobacteria, which grows over a crust of *Kyrtuthrix cf. maculans* (Gomont 1901: 210) Umezaki (1961: 85) and *Cyanodermatium gonzalezii* León-Tejera, Montejano & Cantoral-Uriza (2003: 365) have been reported.

Marine species of *Hassallia* have not been recorded previously from Mexico; however, we have found conspicuous growths of epilithic black mats of this genus as the dominant taxon in the rocky supralittoral zone of Tangolunda bay (Tropical Pacific Mexico). The aim of this work is to describe a new species of *Hassallia* from field material collected in a particular and extreme marine biotope, using a polyphasic approach that combines a detailed morphological characterization of our populations as well as genotypic characteristics determined by 16S rRNA analysis.

## Materials and Methods

**Site description and sample collection:**—This study was conducted with material collected from a granitic coastal cliff on the east side of Tangolunda bay (15° 46' 24.79" N, 96° 5' 28.32" W), within Huatulco National Park, located in the Tropical Mexican Pacific (TMP). Climate is warm subhumid with summer rains and low rainfall in winter, with an annual average temperature of 26.9 °C. This region has a torrential rainfall regime with annual values from 800 to 1500 mm, concentrated from June to October. Seawater temperature range is 20.5–34.4 °C, and salinity values 17.3–40.1 PSU, average 34.6 PSU (Granja & López-Pérez 2008). Tidal regime is mixed, with semidiurnal dominance. The dominant swell comes from the West and a component from the South during summer. 92.5% of the incident waves arrive with heights in the range of 0.3 to 2.4 m (highest values in summer, CONANP 2003). Three samples of conspicuous microbial mat growths, found on nearly vertical rock walls 7 m above sea level, were collected in February 2011 with hammer and chisel. Each sample was divided into two subsamples, one preserved dry and the other in 4% formaline in seawater. Even though cultures have not been obtained, we have made an ecological, molecular and morphological characterization to describe these populations.

**Morphology:**—For the morphological characterization of field populations, we have analysed micrographs obtained with an Olympus DP12 digital camera in an Olympus CX51 microscope (DIC and light field); epifluorescence micrographs were obtained with an Olympus Provis AX70 microscope. Transmission electron microscopy (TEM) images were obtained in a JEOL mod JEM 1010 microscope from live material after fixation in 6% glutaraldehyde in 0.1 M PBS and subsequent postfixation in 1% osmium tetroxide, dehydration in ethanol series and embedding in epoxy resin. Ultrathin sections were contrasted with acetate uranyl and lead citrate according to Reynolds (1963). Morphology measurements were obtained using SigmaScan© automated image analysis software (Jandel Scientific, Sausalito, California) and expressed as means ± standard deviation of 20–40 measurements. Morphological identification was done in accordance with new and traditional reference works (Bornet & Flahault 1886–1888, Gardner 1927, Frémy 1930, Flechtner *et al.* 2008, Komárek *et al.* 2012). Komárek & Hauer (2013) was used for the systematics.

**Molecular analysis:**—Total DNA was extracted from natural populations using the MoBio UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc., Carlsbad, California), according to manufacturer's instructions. Quality and quantity of extracted DNA were checked on a 1% agarose gel. The 16S rRNA gene was partially amplified using the cyanobacteria specific primers proposed by Nübel *et al.* (1997) (106F, CYA781R, CYA781F) and Neilan *et al.* (1997) (CYA359F, 1494Rc). PCR conditions used for the 16S rRNA gene cyanobacterial amplification were as follows: 50 µl PCR reaction mix containing 1x reaction buffer, 1 µl of each primer (36 µmol), 1 µl of a stock solution of dNTPs (10 mM dNTPs mixture) 5 µl of MgCl<sub>2</sub> buffer (1 × 2.5 mM) and 1 µl of DNA polymerase (5U/µl) (Amplificasa, Biogénica, Mexico), as well as 1 µl of genomic DNA (10 ng DNA). Cycling conditions had an initial denaturation step of 95 °C for 7 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94 °C for 0.5 min, annealing at 58 °C for 1 min, extension at 72 °C for 1 minute and final extension at 4 °C. PCR products were visualized on a 1% agarose gel. After amplification, DNA was cleaned using the QIAquick® PCR purification kit (QIAGEN). Sequencing was conducted using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied Biosystems, California) on an ABI PRISM3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, California). The same primers were used for sequencing.

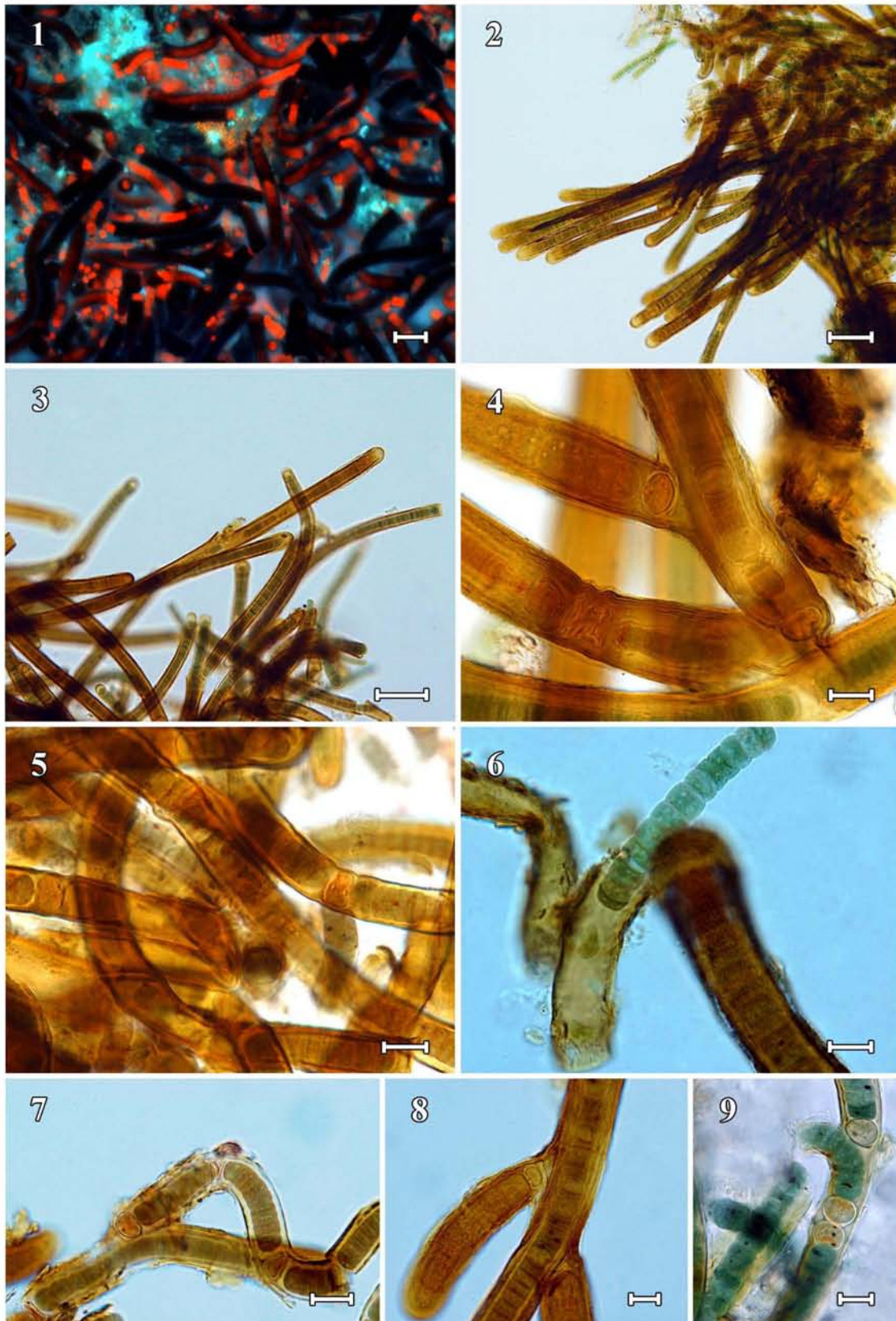
**Phylogenetic analysis:**—Sequences were obtained for both DNA strands, assembled and corrected into 1307 bp fragments using Bioedit software version 7.0.9.0 (Hall 1999). Representative taxa from available sequences of Microchaetaceae and Scytonemataceae taxa from GenBank were used as ingroups and outgroups. Phylogenetic analysis was based on 20 sequences obtained from GenBank (>1100 bp fragments of the 16S rRNA gene) except *Hassallia byssoidea* type species sequence (1057 bp). These sequences included all those of the *Hassallia* species described up to date as well as sequences of representative genera of the family Microchaetaceae (*Microchaete*, *Fortiea*, *Tolypothrix*, *Spirirestris*, *Toxopsis*, *Calochaete* and *Coleodesmium*). Additionally, we added three sequences considered as outgroups, two belonging to *Brasilonema* and one to *Scytonema* (family Scytonemataceae). All sequences were aligned using the CLUSTAL W Multiple Sequence Alignment Program (Thompson *et al.* 1994) and manually edited in PhyDE® version 0.9971 (Müller *et al.* 2010). Phylogenetic relationships were inferred with Winclada (Nixon 1999–2002) and TOPALi v2 (Milne *et al.* 2009). Maximum parsimony (MP) trees were constructed using the Ratchet search (Nixon 1999). The model used in the Bayesian analysis (B) was the Hasegawa-Kishino-Yano model of nucleotide substitutions with invariant sites and gamma distributed rates for the variable sites (HKY+I+G). This model was selected based on the Maximum Likelihood (ML) ratio test implemented by TOPALi version 2 software with a significance level of 0.01. For the Bayesian analysis, we ran five chains of the Markov chain Monte Carlo (one hot and four cold), sampling one tree every 1000 generations for 5 × 10<sup>6</sup> generations starting with a random tree. ML and MP analyses were subjected to bootstrap resampling (1000 replicates with 10 random additions) to estimate robustness (Felsenstein 1985). The range of 16S ribosomal RNA gene divergence values within and among species was calculated using uncorrected “p” distances using PAUP\* version 4.0b10 (Swofford 2002).

## Results

### *Hassallia littoralis* González-Resendiz & León-Tejera, *sp. nov.* (Figs. 1–25)

Cespitose short mats brown to blackish (Figs. 1, 2), filaments cylindrical (Fig. 13), straight or curved; parallelly oriented or intermingled, sometimes forming fascicles 200–300 µm long and 5–12 µm in diameter, without a common sheath (Figs. 2, 3, 20, 21). Falsely branched, branches tightly joined or irregularly divaricated to the main filament (Figs. 4, 8, 11, 21, 24). Trichomes 3–6 µm wide (Figs. 3, 5), constricted at cross-walls (Figs. 15, 16). Cells cylindrical to barrel-shaped (Figs. 15, 16), shorter than wide, 3–6 µm wide, 1–3 µm long, with slightly granulated content. Terminal cells widely rounded, sometimes nearly spherical, hyaline to greenish or yellowish (Figs. 12, 15, 16) (2–4 µm long × 3–6 µm wide). Sheaths firm, stratified, slender, hyaline (Fig. 16) to thick and amber or dark yellowish-brown, often widening with pronounced, rounded terminals (3–7 µm in diameter) (Figs. 11, 12, 16), generally closed and rarely opened at the apex (Figs. 10, 14). Heterocytes spherical, ovoid to cylindrical (Figs. 4, 5, 9, 11), 4–6 µm in diameter, 4–8 µm long (Fig. 5), one basal (Figs. 4, 8, 11, 19), rarely two (Fig. 9), and less frequently intercalary. Akinetes not detected. Reproduction by hormogonia (Figs. 6, 7, 18, 22, 23).



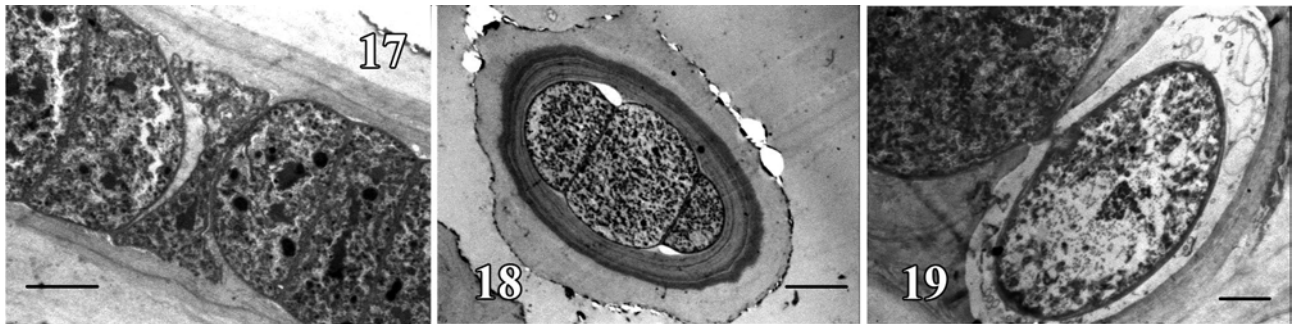


**FIGURES 1–9.** Morphological features of *Hassallia littoralis*. Fig. 1. Intermingled filaments as seen with epifluorescence. Fig. 2. Erect fascicle growth form with lighter terminal parts. Fig. 3. Straight or curved filament growth forms. Fig. 4. False branching with basal heterocytes. Fig. 5. Trichomes with evident intercalary heterocytes and polar nodules. Fig. 6. Release of short isopolar trichome with evident nodal constrictions. Fig. 7. Series of heteropolar and isopolar hormogones. Fig. 8. Divaricated pseudobranch with basal heterocyte and stratified sheath. Fig. 9. False branching with single and paired heterocytes. Scale bars: Figs 1–3: 30  $\mu$ m, Figs 4–9: 6 $\mu$ m.

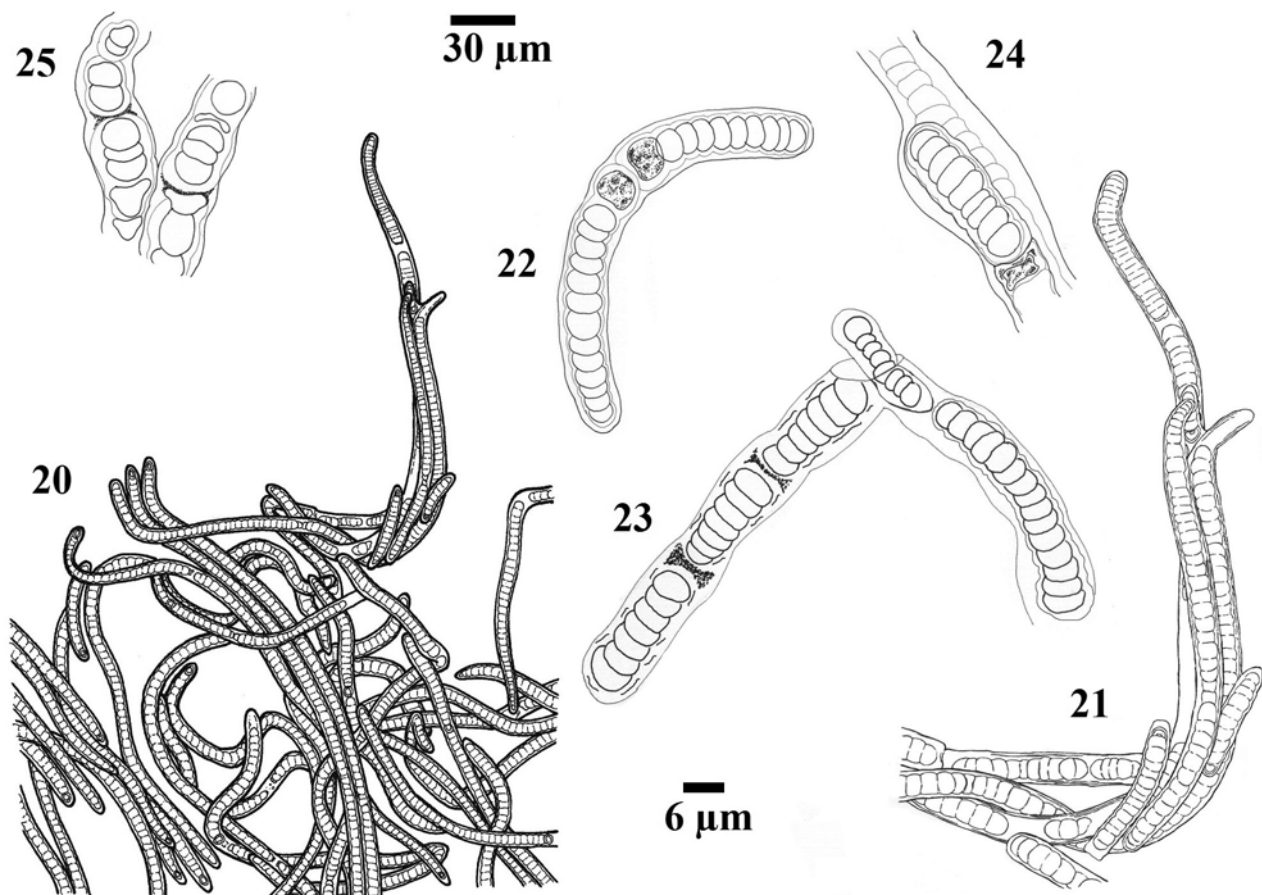


**FIGURES 10–16.** Morphological features of *Hassallia littoralis*. Fig. 10. Terminal widening of the sheath. Fig. 11. Branched filament with evident cytoplasmic granules. Fig. 12. A trichome with variations in diameter bearing a darker, shortened necridial cell. Fig. 13. Plane view of a cylindrical trichome and filament. Fig. 14. Intense terminal EPS production by highly granulosed trichome with an open sheath. Fig. 15. Darkening of hyaline sheath produced probably by gelatinization. Fig. 16. A trichome of a young filament with necridic cells and sheath widening. Scale bars: 6  $\mu$ m.

**Type:**—MEXICO. Oaxaca: Tangolunda bay, 15° 46' 24.79" N, 96° 5' 28.32" W. Marine supralittoral, *León-Tejera*, 2-2-2011 (holotype FCME! PTM9586, GenBank sequence access number KF017617, isotype UAMIZ! 1225, paratypes FCME! PTM9587, PTM9588).



**FIGURES 17–19.** *Hassallia littoralis* TEM images. Fig. 17. Hormogonia formation through a necridic cell. Fig. 18. Young isopolar hormogonium with a wide stratified sheath. Fig. 19. Evident polar nodule in a basal heterocyte. Scale bars: Fig. 17: 3  $\mu$ m, Fig. 18: 5  $\mu$ m, Fig. 19: 1  $\mu$ m.



**FIGURES 20–25.** *Hassallia littoralis* habitus. Figs 20, 21. Fasciculated growth form. Figs 22, 23. Formation of hormogonia. Fig. 24. Hormogonia and branch formation. Fig. 25. Production of monocyte-like cells. Scale bars: Figs 20, 21: 30  $\mu$ m, Figs 22–25: 6  $\mu$ m.

**Etymology:**—The species epithet was selected according to the specific environment (marine littoral).

**Habitat:**—In Tangolunda Bay, supralittoral black mats of *Hassallia* dominate this habitat and the three collected populations were epilithic mats from the rocky marine littoral. They were found growing on nearly vertical igneous rocks 7 m from the seaside and approximately 4–5 m above sea level, facing the sea. The rocks are only slightly wetted by the sea breeze and totally exposed to sunlight. Considering the maximal tidal heights of 2.4 m, probably they are never covered by the sea but grains of salt were found intermingled among filaments due to the sea breeze water evaporation. This species was found growing with several undescribed

cocoid and LPP species (Fig. 1) but not with common filamentous non-heterocystous (*Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Microcoleus*, *Phormidium*, *Schizothrix*) or heterocystous genera (*Rivularia*, *Calothrix*, *Scytonema*) typically described for intertidal biotopes (Brito *et al.* 2012).

**Observations:**—Cells appearing as monocytes and short hormogonia of 2 to 10 (15) cells long (Fig. 25), are sometimes liberated. Young filaments and hormogonia are either isopolar (Figs. 6, 7, 24) or heteropolar (Figs. 9, 22). Isopolar hormogonia formation through necridic cells (Fig. 23) develop later terminal/basal heterocytes (Figs. 6, 7, 9, 17, 18, 22). Sheath becomes lighter or darker toward the extremes, probably due to terminal gelatinization (Figs. 10, 14, 15). Populations morphologically characterized are C76 (PTM9586 and UAMIZ1225), C77 (PTM9587) and C78 (PTM9588). The sequence was obtained from sample C76.

**Molecular and phylogenetic analyses:**—A total of 24 sequences of representative taxa from available sequences of Microchaetaceae and Scytonemataceae deposited at GenBank were analyzed, including *Brasilonema bromeliae* DQ486055, *Scytonema* sp. AB093483 and *Brasilonema tolantongensis* JN676147 as outgroups and our strain. The three approaches used (MP, B and ML), produced similar clustering, therefore only the ML tree, with support values of ML, B and MP is shown in Fig. 26. Topology of the ML tree showed that the *Hassallia* assemblages including seven taxa are segregated into two clades supported by modest bootstrap values. The earliest diverging clade included *H. byssoidea*. The second clade included two sister groups: one defined by *H. antarctica* Komárek, Nedbalová *et al.* Hauer (2012: 770) assemblage, and the other by *H. littoralis*, *H. andreassenii* Komárek, Nedbalová *et al.* Hauer (2012: 768) and *Coleodesmium* sp. ANT (Fig. 26). *Hassallia littoralis* is moderately supported by bootstrap values in ML and MP topologies, but with a higher value in Bayesian analysis (0.97), forming a distinct sister clade to *H. andreassenii* and *Coleodesmium* sp. ANT. Molecular data confirmed the distinctiveness of our tropical populations that show similarity values of 98.4% with *H. andreassenii*, 97.8–98.1% with the *H. antarctica* assemblage, 97.8% with *H. byssoidea*, and finally 98.5% with *Coleodesmium* sp. ANT.

## Discussion

In the last decade the family Microchaetaceae has had important changes; the recent addition of new generic-level taxa indicates a great activity derived from the study of new or not well known habitats, such as tropical or extreme ones (Flechtner *et al.* 2002, Cassamata *et al.* 2006, Sant'Anna *et al.* 2010, Novis & Visnovsky 2011, Lamprinou *et al.* 2012, Hauer *et al.* 2013). These taxa were described mainly using a polyphasic approach including molecular methods, but when this was not possible new taxa description has been based on a detailed morphological and ecological characterization of populations (Sant'Anna *et al.* 2010). However, whenever possible, new species descriptions must be carried out with combined molecular, morphological and ecological data. The development of a logical and robust classification system is essential, this being a baseline for diversity estimations and ecological, taxonomical or ecophysiological interpretations (Komárek 2006, 2010). It is considering this recommendation that we describe this new species. According to the revised taxonomic classification system of Komárek & Anagnostidis (1989) and Komárek & Hauer (2013), in terms of morphology, our populations clearly belong to the family Microchaetaceae, and correspond phenotypically to genus *Hassallia*, as they show many typical characters attributed to this genus either in its original description or in recent studies (Komárek *et al.* 2012) such as growth form, cell morphology, trichome polarity, type of false branching, sheath type and color, as well as reproductive structures.

There are eleven valid and recognized *Hassallia* species (Table 1) (Komárek & Hauer 2013) including four new species described from Antarctica and desert soils biotopes (Flechtner *et al.* 2008, Komárek *et al.* 2012) but none had been recorded from a similar biotope (tropical marine supralittoral) and geographical area (Table 1). In general, the lack of reports of cyanobacterial genera such as *Hassallia* in many geographical regions, and specially in marine habitats from tropical zones, is not due to its rare distribution or low abundance in natural communities, but to the lack of studies in habitats of very specific environmental conditions where cyanobacteria form frequently dominant multispecific assemblages.

TABLE 1. Phenological characters of *Hasaallia* species. Information gathered from Bomet et Flahault (1886–1888), Frémy (1927, 1929–1933, 1930), Gleitler (1932), Gardner (1927), Fletchner *et al.* (2008), and Komárek & Hauer (2007). NA: Not available. \*: Data from drawings, not included in the original descriptions.

	<i>H. littoralis</i> sp. nov.	<i>H. byssoidea</i>	<i>H. houteillei</i>	<i>H. andreasenii</i>	<i>H. antarctica</i>	<i>H. californica</i>	<i>H. pseudoramossissima</i>	<i>H. granulata</i>	<i>H. discoidea</i>	<i>H. usambarensis</i>	<i>H. manginii</i>	<i>H. putvinata</i>
Ecology	Epilithic on marine supralittoral	Subaerophytic, epilithic, calcareous humid rocks, in fissures, mosses and humid soil and tree trunk	On wet rocks	Epilithic, calcareous precipitates (Antarctica)	Stone crevices, in water among stones, or on dripping rocks. (Antarctica)	Arid soil	Arid soil	Bark of tree	On rocks in association with Hepaticae	Bark of tree	On limestone rocks	On stones in streams
Thallus habit	Cespitose mats	Cespitose mats 1 mm	Rounded mat	Flat mats	Clusters of filaments	Bushy	Bushy on parallel filaments	Flocculent	Sparse filaments	Mat of filaments	Cushion crust	Cushion shaped rounded, semi-lenticular, reminiscent of <i>Rivularia</i> .
Thallus color	Brown to Black	Dark-green, Black	Dark-brown	Yellow brown to brown	Dark brown up to blackish	Dark brown	Green	Pale-green	NA	Dark-green	Black-brown	Blue-green or black-green
Filaments	Heteropolar, isolated straight and curved, or parallelly oriented filaments, 200–300 µm long	Heteropolar uniseriate	Heteropolar, filaments easily separated	Heteropolar, fasciculated	Heteropolar, fasciculated and cylindrical	Heteropolar, frequently singly pseudo-branched	Heteropolar, abundantly pseudo-branched	Heteropolar, straight or somewhat arcuate. Diameter uniform	Heteropolar, relatively short, comparably-tively straight	Heteropolar, fragile, slightly flexuous to nearly straight, 200–250 µm long	Heteropolar, straight-sided translucent regularly branched	Heteropolar, filaments radiating from the center, up to 2 cm long
Filament width (µm)	5–12	10–15	5–7	12.4–20	11.2–17.5	14–16	11–20	11–13.5	22–25	5–7	9–11	13–14
Sheath	Firm, stratified, slender, hyaline, to thick and amber or dark yellowish-brown	Thin without lamellation, yellow, gold to brownish	Thin, narrow, colorless or yellow gold	Firm, thick, laminated, dark brown, cylindrical	Firm, relatively thick, laminated, yellowish to yellow-brown	Firm, unlamellated, colorless	Sheath thin, colorless, unlamella-ted	Very thin, smooth, homogeneous, golden yellow	Smooth, homogeneous, yellowish, unlamella-ted	Thin, homogeneous and colorless	Gelatinous, colorless and cylindrical, yellow to brown and irregularly thickened	Gelatinous, narrow, thin, smooth outside, irregular
Sheaths at apex	Generally closed rarely opened, often with pronounced rounded terminal widenings	Closed, narrowing towards the ends	Closed*	Firstly closed, later open, or gelatinized at the ends	Closed	Open*	Open*	Closed	Closed	NA	Open*	Open*
False branching	Branches tightly joined or irregularly divaricated to the main filament	Irregular, solitary, short and fragile lateral branches	Short	Branches tightly joined to the main filaments	Slightly and irregularly divaricated	Fragmenting easily into very short filaments	Single, double	Sparse	Moderately frequent	Fragile	Branches erect spreading, moderately long, curved or rarely straight	Repeatedly branched translucent. Upright branches spreading

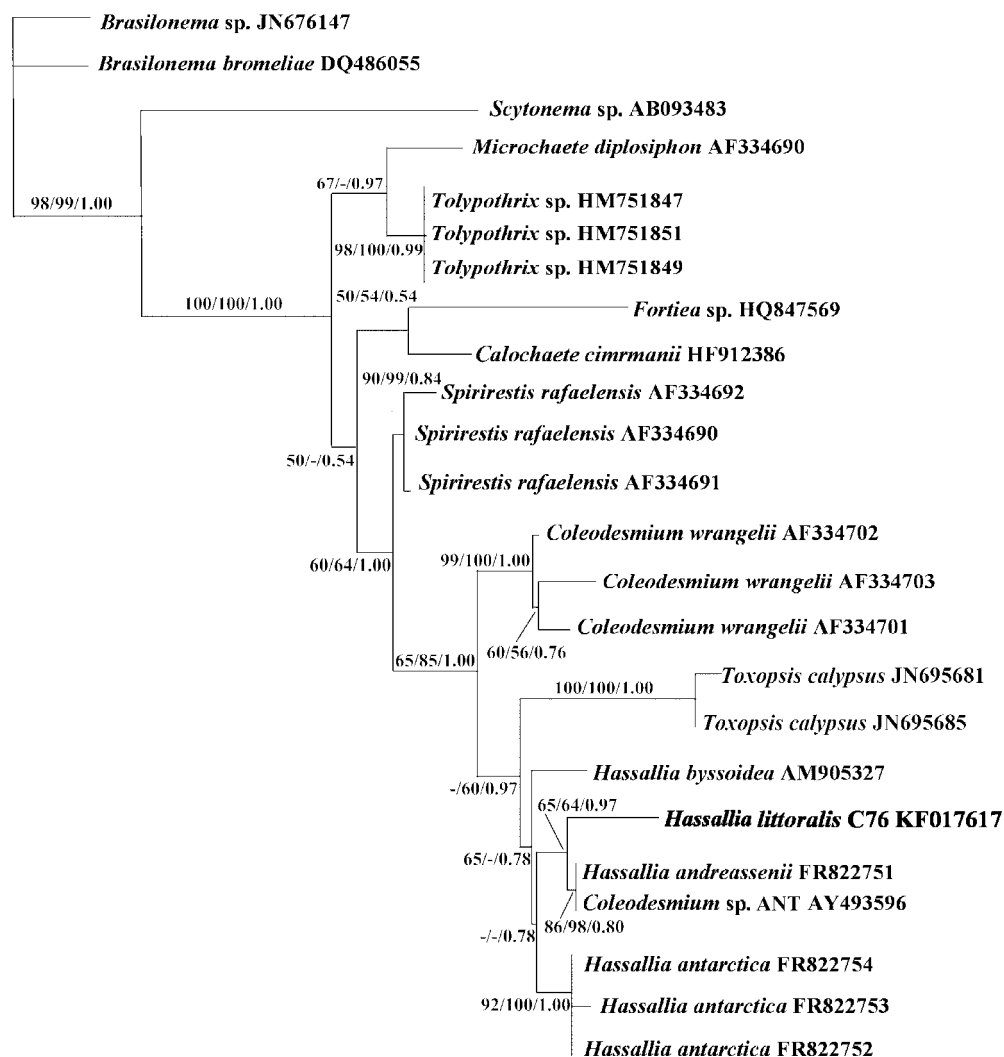
.....continued on the next page

TABLE 1. (Continued)

	<i>H. littoralis</i> sp. nov.	<i>H. byssoidea</i>	<i>H. bouteillei</i>	<i>H. andreassenii</i>	<i>H. antarctica</i>	<i>H. californica</i>	<i>H. pseudoramossima</i>	<i>H. granulata</i>	<i>H. discoidea</i>	<i>H. usambarensis</i>	<i>H. manginii</i>	<i>H. pulvinata</i>
Trichomes	Cylindrical, constricted at cross-walls	Constricted at the cross-walls, not attenuated towards ends	NA	Cylindrical, not constricted at cross-walls (very rarely slightly constricted) sometimes slightly narrowed at the ends	Cylindrical, not constricted up to slightly constricted at cross-walls	Constricted at the cross-walls	Constricted to very slightly constricted	Very slightly constricted	Constricted at the dissepiments, uniform throughout the entire length	NA	Slightly constricted at the cross-walls	Constricted at the cross-walls
Trichoma width (µm)	3–6	8–12	NA	7.5–13	(7.4) 8.6–12.3	11–12	8–14	10–12	17–20	NA	4–5	10–12
Cytological features	Cylindrical to barrel shaped, sometimes granulated	Short, barrel-shaped	Barrel-shaped, slightly shorter than wide	Cylindrical	Cylindrical to shortly barrel-shaped	One-seventh to one-fourth as long as broad	Shorter than wide	Densely granulated	Discoideal, finely granulated	Little shorter than the diameter or almost	Cells almost square	Barrel-shaped*
Cell color	Hyaline to greenish or yellowish	Olive-green	NA	Blue-green or olive-green	Blue-green or olive-green	Blue-green to dark olive	Bright blue-green	Golden yellow	Bright blue-green or methyl green	Green	Olive green	Pale blue-green or pale yellow-brown
Cell length (µm) or length/width rate	3–6 × 1–3	8–11 wide; 2–3 × wider than long	4–5	NA	NA	1.6–3.2	(2)–3–9	One-third to one-fourth the diameter long	4–6 or slightly longer in the oldest parts	4.5–6.0	Length is half the width	Cells 0.3–0.6 usually ½ times as long as wide
Heterocytes	Spherical, ovoid to cylindrical. Basal one, rarely two. Intercalary rare	Hemispherical to oval. Basal, one rarely two	Hemispherical to oval. Basal rare	Spherical, hemispherical, cylindrical, ovoid or slightly oval. Basal intercalary, solitary rarely up to 2 (3) in a row	Hemispherical, rarely up to oval sometimes slightly complanated. Mainly basal, intercalary, (usually before the false branching), solitary or in pairs	Oval. First developing intercalary, single or paired	Compressed rectangular. Basal and intercalary	Subglobose to compressed. Mostly terminal	Discoideal, golden yellow, numerous. Basal and intercalary*	Subglobose or depressed-globose	Solitary, rarely in pairs. Nearly spherical or hemispherical. Basal	Hemispherical or disc-shaped. Basal rarely intercalary
Heterocycle length × width (µm)	4–6 × 4–8	11 × 5–6	NA	NA	NA	NA	9–11 × 7–9	NA	Same size as the cells	Slightly larger than the vegetative cells	NA	NA

This new species of *Hassallia* is phenotypically distinguished from all other species of the genus (Table 1) mainly by growth form, cell and trichome dimensions and distinctive sheath features: terminal part widening, funnel-like or “wing-like” (Figs. 15, 16, 24, 25), with evident gelatinization. In addition, it differs from the rest of species of this genus in its specific habitat. Only few species of *Hassallia* had been sequenced to date (*H. byssoidea*, *H. andreassenii* and *H. antarctica* assemblage); the difference of 16S rRNA genetic similarity among these strains and our population was 1.6–2.2%. The morphological and biotope differences, as well as the high levels of genetic variation between our populations from those three species, support the proposal of our population as a new taxon within genus *Hassallia*.

In our tree topology, *H. littoralis* formed a distinctive and well-supported clade within the *Hassallia* genus using Bayesian analysis. *Hassallia byssoidea* (type species) appears as a basal group, and *H. andreassenii* and *Coleodesmium* sp. ANT, form a sister clade to *H. littoralis*. The phylogenetic position of *Coleodesmium* sp. ANT (Taton *et al.* 2006) is within the *Hassallia* cluster, and phylogenetically close to *H. andreassenii* (Fig. 26), similar to results obtained by Komárek *et al.* (2012). Interestingly, both *Coleodesmium* sp. ANT and *H. andreassenii* have been isolated from Antarctica, therefore further studies are needed to compare these two strains.



#### 0.1 Expected Substitutions per site

**FIGURE 26.** Maximum-likelihood tree based on the analysis of 16S rRNA gene of representatives of the families Scytonemataceae and Microchaetaceae showing the position of the sequence obtained in the present study (in bold). Numbers at nodes indicate bootstrap values  $\geq 50\%$  for Maximum Parsimony (left), Maximum Likelihood analysis (medium) and Bayesian posterior probabilities (right) values.

The identity of *H. littoralis* is moderately supported by bootstrap values in ML and MP topologies. Similar modest support values have been documented in Microchaetaceae by Cassamatta *et al.* (2006); Berrendero *et al.* (2011), Komárek *et al.* (2012), Lamprinou *et al.* (2012) and Hauer *et al.* (2013), the scarce number of sequences available in this group probably influences these values. According to Berrendero *et al.* (2011) and Hauer *et al.* (2013), the Microchaetaceae family needs a more detailed analysis of its members. Our analysis supports this opinion, we consider that further inventory studies are still necessary, particularly in tropical and extreme areas, which have shown to have a notorious diversity of previously undescribed cyanobacteria (Komárek & Komárková 2007).

## Acknowledgments

The authors thank M. Sc Alejandro Martínez Mena and Msc Reyna Lara Martínez for their extraordinary technical assistance with epifluorescence and TEM images respectively, Laura Márquez Valdelamar for sequencing products, UNAM-DGAPA-PAPIIT IN221410 for financing this research, Mónica Peralta Caballero for images edition, Cynthia Reyes Valdez and Alonso López Toledo for illustrations, and Itzel Becerra and Aristides Sampieri for helping in the molecular techniques. This paper constitutes a partial fulfilment of L. González-Resendiz within the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). The first author acknowledges financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) and UNAM. The authors would like to thank anonymous referees for their comments leading to improve the manuscript.



## 7. CAPÍTULO IV.

### **Análisis filogenético de especies heterocitosas de las costas rocosas de la región de Huatulco, Oaxaca, México.**

#### **Antecedentes**

Según Komárek *et al.*, (2014), los caracteres principales que definen a la familia Rivulariaceae son: la presencia de filamentos heteropolares, tricomas atenuados y ramas falsas facultativas. De esta manera y *sensu* Komárek *et al.*, (2014) esta familia comprende siete géneros: *Calothrix*, *Dichothrix*, *Gardnerula*, *Isactis*, *Microchaete*, *Rivularia* y *Sacconema*.

De estos géneros, *Calothrix* y *Rivularia* son los que muestran una mayor cantidad de especies, alrededor de 100 y 34 spp. respectivamente. En la base de datos del Genbank hay secuencias del gen 16SrRNA sólo de *Calothrix*, *Microchaete* y *Rivularia* de distintos ambientes terrestres y acuáticos. Del resto de los géneros no existe información molecular para comparar, lo que hace difícil la resolución de la taxonomía en esta familia. En trabajos previos se ha hecho notar que hay problemas en la delimitación genérica de algunos de sus componentes e incluso en la delimitación de la familia (Hauer *et al.*, 2014). Estos estudios han mostrado que las especies de los géneros *Calothrix*, *Rivularia* y *Microchaete* son polifiléticos. Este trabajo no pretende resolver la sistemática de la familia Rivulariaceae, sin embargo es necesario ubicar la problemática de dicha familia por que, en este capítulo se da cuenta de cuatro géneros nuevos y una nueva especie del género *Kyrtuthrix*, todos pertenecientes a la familia Rivulariaceae tal como esta definida actualmente (Komárek *et al.*, 2014). Este capítulo se plantea como un documento introductorio (preliminar) de una serie de publicaciones que están en preparación; la información contenida, es necesaria para el proyecto completo de tesis. Los resultados sobre la determinación taxonómica basada en la descripción morfológica y caracterización ecológica han sido presentados en el capítulo I, mientras que la finalidad de este capítulo es analizar la inferencia filogenética de los taxa de Rivulariaceae más representativos y comunes en la zona de estudio y su ubicación en la taxonomía de cianoprocariontes utilizando como marcador el fragmento del gen 16SrRNA obtenido de 10 poblaciones de heterocitosas.

## **Materiales y método**

La obtención de muestras se realizó como se indica en González-Resendiz *et al.*, (2015) donde se hace una descripción de los sitios de muestreo y se muestran imágenes de los gradientes ambientales (supra e intermareal) donde crecen estos organismos.

### **Procesamiento de las muestras y aislamiento en cultivo**

Las 56 muestras obtenidas se dividieron cada una en tres submuestras; una se fijó en formol (4% agua de mar neutralizado) para realizar el estudio morfológico; una segunda se colocó en cultivo para su aislamiento en medio marino SN (Waterbury *et al.*, 1986) y la tercera se mantuvo seca (silica gel) para extracción de ADN directo de las muestras de campo después de una minuciosa separación y limpieza. Para la caracterización molecular se utilizó tanto el material seco de campo como el material en cultivo sólo de las diez poblaciones que prosperaron en este medio; estas fueron obtenidas después de sucesivos aislamientos hasta obtener un cultivo monoclonal o mono algal.

### **Métodos moleculares y filogenia**

Se realizó la extracción de DNA de dos maneras: por un lado de cultivos unialgales o monoclonales aisladas y por otro directamente de poblaciones de campo (independiente de cultivo). De esta manera se obtuvo una referencia para otras poblaciones morfológicamente similares en las que no fue posible obtener un cultivo. Así se generó una comparación a nivel de secuencia (fragmento 16SrRNA) entre taxa de poblaciones morfológicamente similares y recurrentes en las muestras analizadas. En este sentido vale la pena destacar que otra problemática adicional, no resuelta en este trabajo, es el cambio en la morfología de nuestras poblaciones en cultivo con respecto de la observada en las mismas poblaciones naturales (muestra fijada en formalina). Para resolver esto se realizaban preparaciones semipermanentes y observación al microscopio previo a la separación del material seleccionado para realizar el análisis molecular.

La obtención de DNA, la amplificación y secuenciación del fragmento de gen 16SrRNA de las diez poblaciones utilizadas, se realizó acorde con el método descrito en González-Resendiz *et al.*, (2013), obteniéndose un total de 18 secuencias de clonas de diez poblaciones, las cuales fueron

consensadas para cada población en una secuencia que posteriormente fue utilizada en el análisis filogenético.

Los taxa utilizados en la construcción filogenética fueron 182 OTUs, 172 obtenidos del Genbank y 10 de cinco taxa diferentes de las 10 poblaciones. Para realizar la selección de taxa y alineamiento se empleó el mismo procedimiento descrito en González-Resendiz *et al.*, (2013), donde, además de un análisis del “blast” realizado para cada una de las secuencias obtenidas, se procuró un muestreo más amplio que representara a géneros distintivos de todas las familias de heterocitas actualmente conocidas y morfológicamente similares a nuestras poblaciones. En el caso de las Rivulariaceae se incluyó la mayor cantidad posible de terminales. Los géneros más representados en este análisis son *Calothrix*, *Microchaete* y *Rivularia* con 28, 3 y 5 OTUs respectivamente. Además de algunas secuencias de especies morfológicamente parecidas a las nuestras como *Scytonematopsis* y *Brasilonema* 5 y 5 OTUs respectivamente.

El análisis de la filogenia se realizó con el fragmento del gen 16SrRNA de entre 1434 a 1492 pb utilizando para la inferencia Máxima Parsimonia, Máxima Verosimilitud y Probabilidad Posterior de la misma manera que lo reportado en González-Resendiz *et al.*, (2013).

## Resultados

Con los capítulos de diversidad morfológica (I) y caracterización molecular (este capítulo IV), se cumple con el objetivo planteado sobre la comparación de las dos aproximaciones utilizadas para la caracterización taxonómica de cianoprocariontes bénticos de la región de Huatulco. Derivado de la información molecular y acorde con los resultados de la evidencia morfológica, ecológica y filogenética obtenida, se proponen en este trabajo cinco nuevos taxa marinos de la familia Rivulariaceae.

Las descripciones morfológicas de los nuevos taxa así como las anotaciones ecológicas se encuentran plasmados en el capítulo I (Diversidad morfológica). El tratamiento taxonómico de cada uno de estos taxa se realizará en documentos independientes a este capítulo y no están incluidos en la tesis.

Las figuras I y II representan el análisis filogenético (máxima parsimonia) realizado con las secuencias obtenidas del Genbank y las obtenidas de muestras marinas de Huatulco, los valores de soporte de los nodos son de izquierda a derecha máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) y probabilidad posterior (PP).

En la figura I, se puede observar que en niveles de inclusión mayores a nivel de familias algunas presentan un valor de soporte bajo, lo que indica que las relaciones filogenéticas de éstas aún están por resolverse. Este árbol (Fig. I) se presenta para indicar de manera más clara las relaciones que se presentan entre las Nostocales, así como ubicar a las Rivulariaceae, que forman un clado distinto de las demás familias de Nostocales, así mismo indicar los límites que nosotros consideramos para esta familia en este trabajo.

En la figura II, se presenta la topología desglosada dentro de las Rivulariaceae y se puede observar que en algunos géneros como *Calothrix*, *Microchaete*, *Rivularia* y *Scytonematopsis*, las relaciones de parentesco aún no están claramente definidas dentro de la familia y presentan problemas de parafilia y/o polifilia. Algunos de éstos como *Scytonematopsis* son los géneros morfológicamente más parecidos a nuestras poblaciones (Fig. II), adicionalmente en esta figura se pueden distinguir dentro de la familia dos grandes grupos (A y B). El grupo A incluye a la mayoría de los taxa del género *Calothrix* (24 OTUs), donde se encuentran tanto representantes de ambientes continentales, como algunos marinos, una especie de *Microchaete* (cepa CENA176) y una de *Calothrix* (cepa CAL3363). El grupo B muestra representantes de ambientes marinos y los cinco taxa que aporta este trabajo, en algunos casos con valores de soporte moderados pero suficientes para comprobar la afiliación a esta familia. Por otro lado, a pesar de que existen pocas secuencias de especies marinas disponibles en la base de datos (Genbank), con las aportadas en este trabajo la filogenia del grupo marino de la familia Rivulariaceae se presenta (hasta el momento) homogénea y se observa su clara inclusión dentro de la misma (Fig. II).

## Discusión

Es evidente que las especies que se determinaron en el trabajo de diversidad morfológica (Capítulo I) como *Brasilonema* sp., *Kyrtuthrix* cf. *maculans*, *Petalonema* cf. *incrustans* y *Scytonematopsis* sp. están relacionadas con la familia Rivulariaceae y no con Scytonemataceae (Fig. II), como morfológicamente las definimos en el capítulo referido.

Para cada uno de estos taxa es necesario un tratamiento por separado justamente por la problemática taxonómica que representa cada uno de ellos; además del análisis filogenético es necesario en algunos casos la comparación de la estructura secundaria del fragmento del espacio intergénico entre el 16-23S rRNA que aporte información de poblaciones de distintas localidades como *Brasilonema* sp. y *Petalonema* cf. *incrustans*. En este trabajo no se incluye esta información, la resolución de cada uno de estos taxones será tratada en documentos (en preparación) adicionales a este capítulo.

Uno de los primeros aportes de este capítulo es que, para algunas poblaciones de ambientes marinos, la delimitación morfológica y ecológica por si misma es insuficiente para realizar una adecuada determinación de su posición taxonómica. La convergencia morfológica y la plasticidad que presentan los cianoprocariontes de distintos géneros y aún distintas familias, hace necesario utilizar la aproximación de tipo polifásico propuesta por Komárek, (2012, 2006) para una adecuada delimitación y caracterización de especies en este tipo de ambientes poco trabajados. Se pone de manifiesto que existe la necesidad de evaluar y comparar con un mayor detalle y una perspectiva integral que involucre información sobre la morfología, ecología, ciclos de vida y filogenia de los taxa problemáticos taxonómicamente hablando o de ambientes poco trabajados.

En segundo lugar, este trabajo hace notar que la diversidad de especies de cianoprocariontes marinos bénticos de las costas rocosas de la región de Huatulco, aún está por completarse, sobre todo por la cantidad de nuevos taxa en un solo orden (Nostocales) por eso, creemos sería necesario aplicar métodos moleculares para el resto de ordenes de cianoprocariontes de esta región.

Y tercero se hace notar que es necesaria realizar una segunda evaluación morfológica a las especies que en este trabajo se presentan (ver en perspectivas de la tesis este punto más detallado).

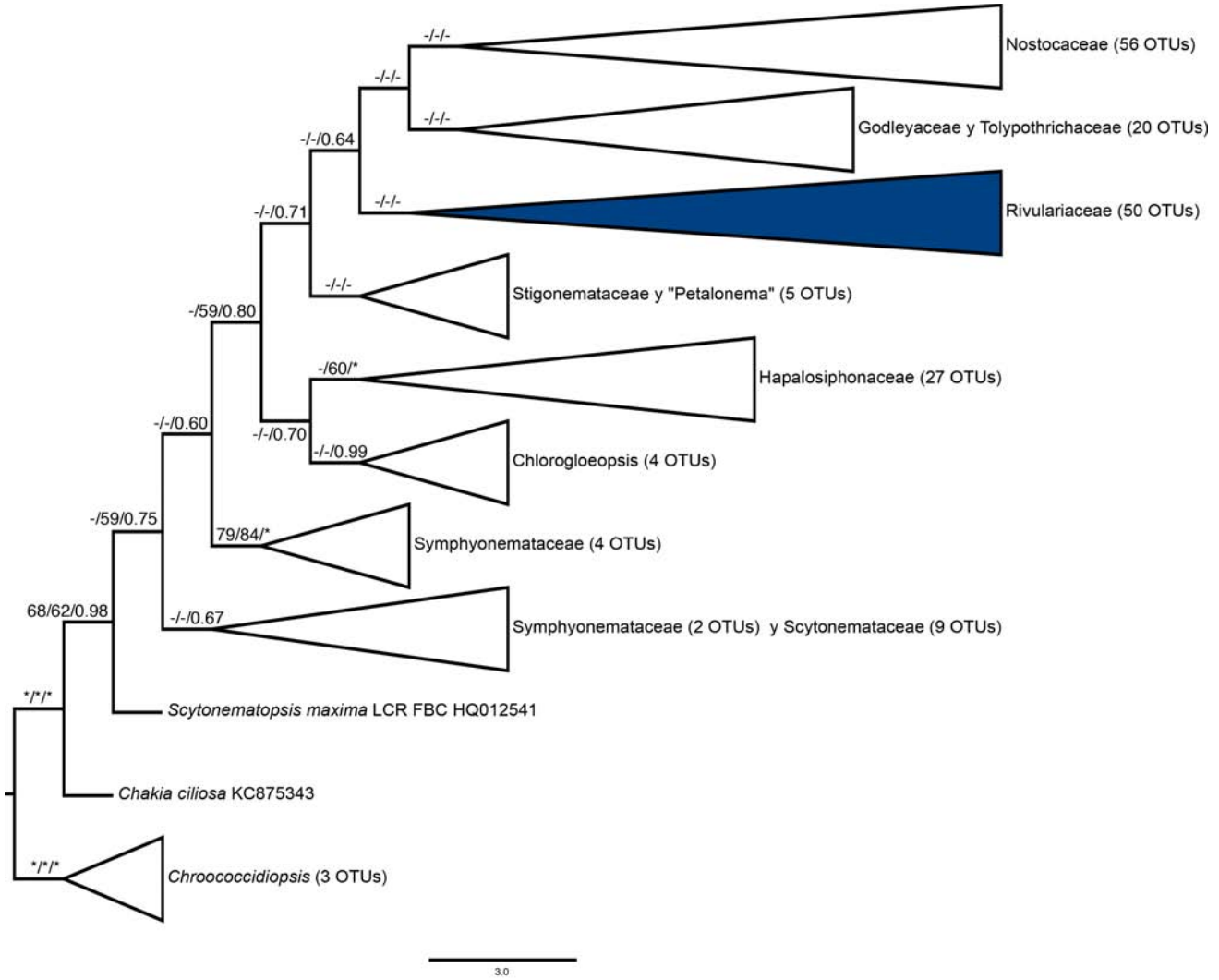


Figura I. Análisis filogenético (máxima parsimonia) de las principales familias de Nostocales los valores de soporte de los nodos son de izquierda a derecha máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) y probabilidad posterior (PP). Valores menores de 50/0.5 son indicados con (-); valores de 100/1.0 son indicados con (\*).

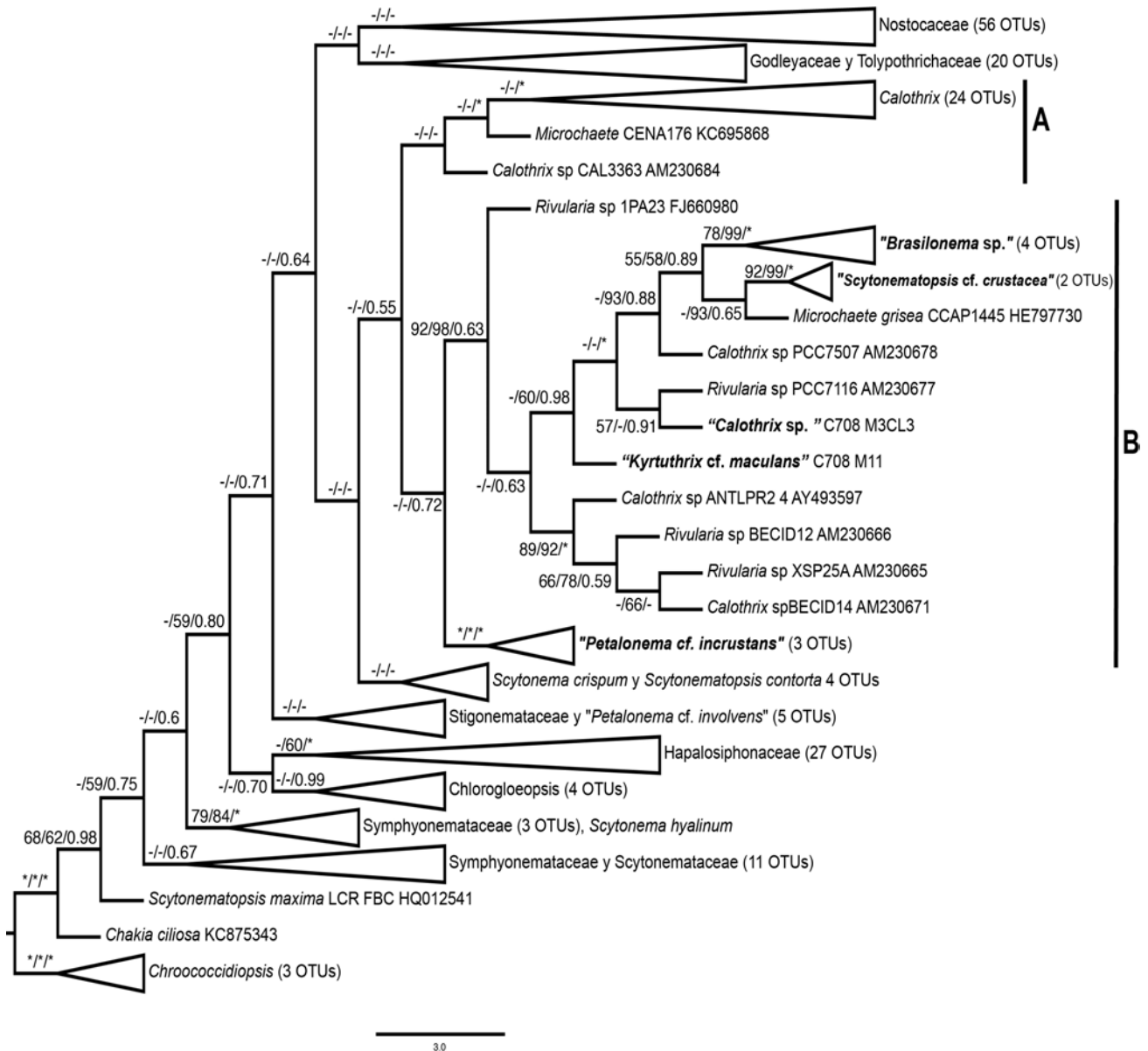


Figura II. Análisis filogenético (máxima parsimonia) de las principales familias de Nostocales los valores de soporte de los nodos son de izquierda a derecha máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) y probabilidad posterior (PP). Valores menores de 50/0.5 son indicados con (-); valores de 100/1 son indicados con (\*).

## 8. DISCUSIÓN GENERAL

Este trabajo es la primera aproximación de este tipo al estudio de las comunidades de cianoprocariontes bénticas del Pacífico Tropical Mexicano, resultado de varios años de investigación. Este trabajo ha permitido hacer un análisis de dos enfoques metodológicos a un mismo objeto de estudio y realizar una evaluación de las ventajas y desventajas de su uso en la

taxonomía de cianoprocariontes, aportando de esta manera una evaluación de las metodologías usadas para lograr el conocimiento de la diversidad de cianoprocariontes marinos.

### **Enfoque de delimitación taxonómica basado en morfología y ecología**

El primer enfoque, se presenta en los capítulos I y II: el primero es un documento que describe la diversidad de morfotipos heterocitosos de la zona litoral; el segundo es la descripción de un morfo-género característico de la zona. La delimitación taxonómica con este enfoque está basado en caracteres morfológicos, preferencia ecológica y descripción del ciclo de vida.

Este tipo de aproximación es utilizado y se considera actualmente un buen método para el reconocimiento de la diversidad de cianoprocariontes en ambientes especiales poco trabajados o ignorados, sobre todo cuando no es posible realizar estudios de tipo molecular, entre otras causas, por tener una población escasa con dificultad en su cultivo y/o dificultad técnica para la obtención de DNA de la muestra natural.

En los documentos de los capítulos I y II se destaca la importancia de la delimitación de taxa de la zona inter y supramareal, con el fin de dar a conocer una diversidad antes desconocida y por tanto poco documentada (Nagarkar, 2002).

En el capítulo I, se muestra que los crecimientos en forma de tapetes y costras presentan una alta diversidad de organismos heterocitosos. Estos fueron dominantes, e importantes tanto por formar la estructura física de sostén de las comunidades microbianas, como por su papel diazotrófico. Por tanto para este trabajo consideramos esencial su descripción y publicación aún sin el uso de marcadores moleculares en la delimitación de especies.

Este primer acercamiento en la caracterización de los crecimientos de la supra e intermareal se realizó utilizando información tanto ecológica como morfológica. Un problema adicional con el que nos enfrentamos en este capítulo y en el IV, fue la complejidad taxonómica y sistemática dada actualmente en estos grupos, debido a que varios de los géneros descritos de forma tradicional no han sido evaluados con marcadores moleculares, otros ya han sido



reevaluados con estas herramientas y están en medio de una reestructuración profunda, que está implicando el establecimiento de nuevos géneros, familias e incluso órdenes.

Por tanto, en el capítulo I se destacan las principales diferencias en taxa morfológicamente similares y se discute la problemática en el estatus taxonómico de estos géneros y/o especies, sobre todo los que anteriormente han sido reportados en ambientes similares. En este trabajo, encontramos que fue alta la diversidad taxonómica de morfotipos fenotípicamente distinguibles de poblaciones descritas anteriormente y en nuestro caso, todos son característicos del ambiente marino. Así lo demuestra la presencia de morfotipos similares reportados en las costas de Brasil (Sant'Anna, 1997, 1995), Perú (Montoya-Terreros, 2003), Hong Kong (Nagarkar, 2002) y Aldabra (Whitton & Potts, 1979) entre otros. Sin embargo, en nuestro documento en algunos casos la determinación a nivel de especie no fue posible ya que no existían coincidencias entre la morfología y ecología de las poblaciones con la reportada en la bibliografía, por lo que su situación taxonómica fue designada como "sp." y permanece como pendiente en este documento (artículo 1). Otras se asignaron por el nombre de las especies más parecidas pero con diferencias, sobre todo ambientales, con el calificativo de "cf."

En la publicación, se discuten además las relaciones existentes entre la morfología de las especies reportadas y las características de los microambientes y localidades en que fueron colectadas en diferentes épocas del año.

De manera general, con este documento podemos decir que los crecimientos colectados a lo largo de este proyecto en la costa litoral rocosa en esta región de Oaxaca, están dominados por heterocitosas, que constituyen comúnmente el elemento estructurador principal al cual se asocian siempre Oscillatoriales de tricomas muy delgados y sobre todo especies de Chroococcales. Es evidente que las heterocitosas son un componente ecológico importante en la estructura de estas comunidades principalmente de la zona de la supramareal, en donde son más abundantes respecto a la intermareal. Es importante destacar que, entre estas zonas y en las diferentes localidades, existe un gradiente donde la distribución y composición de especies

de los diferentes tipos de tapetes de cianoprocariontes ,está determinado posiblemente por las características ambientales dominantes en cada sitio y en cada nivel de marea; por ejemplo el tipo de roca, la altura sobre el nivel del mar, la frecuencia y duración de la exposición al aire, intensidad del oleaje y la marea, así como el tipo y cantidad de sedimento transportado por las corrientes; así, en las zonas de mayor exposición a la insolación y desecación, los crecimientos adquieren coloraciones más oscuras en la superficie de la vaina, o diferencia en la distribución de las cicales y heterocitosas en el gradiente de marea (supra e intermareal). Esto ha sido también reportado en los trabajos de Ortega-Morales *et al.*, (2005); Hoffmann, (1999), Nagarkar & Williams, (1997) y Whitton & Potts, (1979), se menciona una mayor abundancia de las heterocitosas en la supramareal.

Para la segunda publicación (capítulo II), nuestro grupo de trabajo describió una de las poblaciones más interesantes encontradas entre las costras de la supramareal. Se detectaron algunos crecimientos de cicales formando costras y entre éstas un crecimiento muy diferente a lo que se había reportado con anterioridad: una cocal con polaridad, tanto a nivel de colonia como en su construcción como individuo “seudofilamentoso”. Estas poblaciones presentaban además estructuras poco observadas en otros géneros descritos anteriormente, como una almohadilla y un estípite. Este trabajo es importante pues se propone, tomando como ejemplo las características particulares y por tanto únicas de este género, el uso y la importancia de la polaridad como carácter taxonómico de las Chroococcales y la reevaluación de los ciclos de vida complejos.

En ambos capítulos las descripciones se realizaron después del análisis minucioso de la morfología única de estos taxa y que presentan una distribución ecológica especial. La información taxonómica sobre poblaciones de cianoprocariontes bénticos de hábitats similares (marina rocosa) es muy escasa. Morfotipos equivalentes en localidades distantes, pero ecológicamente casi idénticas; por ejemplo, en las costas del intermareal y supramareal en Hong Kong Nagarkar, (2002) con el reporte de heterocitosas, indican la especificidad de estas

■ unidades taxonómicas a condiciones similares de alta insolación y salinidad. También, se ha observado que en las zonas inter y supramareal se encuentran algunas especies de Chroococcales, por ejemplo del género *Pleurocapsa*, que presentan adaptaciones morfológicas estructurales que le ayudan a retener humedad y disminuir el estrés provocado por la desecación (Ortega-Morales *et al.*, 2005); en este mismo trabajo se reporta sólo para la zona intermareal la presencia de heterocitosas.

Finalmente, en los artículos I y II se reconoce la necesidad e importancia de la caracterización de estas taxa con métodos moleculares, usando marcadores como el 16SrDNA y otros actualmente en uso (Osorio-Santos *et al.*, 2014), para reconocer y reevaluar el estatus taxonómico y las relaciones evolutivas de las taxa marinos, pero cuando no es posible hacerlo, debido al tamaño de la población, las dificultades en el establecimiento de cultivos u obtención del material genético necesario para su evaluación, sostenemos la necesidad de publicar este tipo de trabajos basados en morfología detallada y su ecología, como un primer paso para la comparación y comprensión de la diversidad biológica de este tipo de comunidades.

### **Enfoque de delimitación taxonómica polifásica**

En el capítulo III, se presenta la descripción de una nueva especie marina de la familia Microchaetaceae de la zona supramareal y en el capítulo IV, corresponde al avance preliminar del análisis filogenético realizado a cinco taxa a partir del gen 16SrRNA, que permitirán la descripción de cinco nuevas taxa de Nostocales con un enfoque polifásico. En las últimas décadas este enfoque ha tenido una fuerte aceptación por parte de los especialistas de cianoprocariontes. Sin embargo, a pesar de la cantidad de trabajos publicados y los avances logrados, la obra de revisión de la taxonomía de cianoprocariontes está todavía muy activa y con profundos cambios. El acercamiento que los especialistas están siguiendo para resolver los problemas taxonómicos en este grupo es a través de la caracterización polifásica de los géneros tipo tradicionales, redefiniendo así, los grupos base para después comparar las especies de dichos géneros. El problema es que no todos los géneros tipo han sido revisados

por técnicas moleculares, y por otro lado, la delimitación taxonómica ha resultado en el reconocimiento de polifilia y/o límites intergenéricos poco claros, generando más discusión en la necesidad de aplicar este enfoque. En los cianoprocariontes marinos la situación no es diferente, todavía se tienen muchos problemas taxonómicos que resolver, son escasos los géneros netamente marinos que se han caracterizado con herramientas moleculares; por ejemplo, el caso de *Lyngbya*, un género que se ha definido polifilético y de donde han resultado nuevas entidades como *Moorea* (Engene *et al.*, 2012).

En el capítulo III, se describe una especie del género *Hassallia*. Este género en general está poco representado en la literatura y actualmente está conformado por once especies descritas, en su mayoría para ambientes continentales (Komárek & Hauer, 2016), pero sólo cuatro de ellas, incluyendo la especie tipo, tienen información del gen 16SrRNA para hacer una comparación. Uno de los aspectos importantes que se demuestra en la publicación de nuestro trabajo, hasta ahora, es la naturaleza monofilética del género, con especies de ambientes tan distantes como los acuáticos en la Antártida y marino de Oaxaca, en el Pacífico Mexicano, o de ambientes continentales Europeos.

La morfología en este género es particularmente complicada, pues fenotípicamente forma un complejo con el género *Coleodesmium*. En este sentido este trabajo contribuyó a la ampliación de la descripción genérica, tomando en cuenta características como el crecimiento en haces y la variabilidad en la forma de ramificación, así como la presencia de heterocitos basales e intercalares.

Este es un buen ejemplo de cómo los análisis filogenéticos nos permitieron establecer la relación entre las poblaciones estudiadas y otras del género *Hassallia* sin lugar a dudas. Sin esta evidencia, es probable que la delimitación taxonómica con los elementos disponibles, ecológicos y morfológicos, no hubieran sido suficientes para decidir asignar a nuestras poblaciones entre el género *Hassallia* y no a *Coleodesmium*.

Finalmente, en ambos trabajos se plantea claramente la necesidad de realizar estudios en ambientes poco conocidos como son las zonas litorales marinas tropicales de México, ya que el tipo de poblaciones manifiestas en ellas, al menos en la costa oaxaqueña, son conspicuos bien diferenciados y ciertamente no se habían reportado o descrito anteriormente seguramente por la carencia de estudios enfocados en estos biotopos.

## 9. PERSPECTIVAS

Muchos taxónomos no están convencidos de la idea de la delimitación de taxa de cianoprocariontes basados únicamente en morfología y/o ecología. Esto se refleja en el hecho que en la actualidad son escasos los estudios donde se describen nuevos taxa por su morfología y donde se presentan inventarios de ficoflorísticos (Gamma *et al.*, 2014; Tavera *et al.*, 2013; Sant'Anna *et al.*, 2010; Nagarkar 2002). En comparación con aquellos trabajos en donde se hace uso de análisis moleculares y filogenia (Hentschke *et al.*, 2016; Bohunická *et al.*, 2015; Osorio-Santos *et al.*, 2014; Becerra *et al.*, 2013; Hauer *et al.*, 2013; Mares *et al.*, 2013; Komarek *et al.*, 2013; Komárek *et al.*, 2012, Komárek *et al.*, 2012; Fiore *et al.*, 2007; Rajaniemi *et al.*, 2005 entre muchos más), es verdad que el enfoque polifásico ha demostrado ser efectivo para explorar la diversidad de las cianoprocariontes, y en al menos los últimos 10 años, ha transformado profundamente nuestras ideas sobre su taxonomía. Muchos especialistas han defendido la adecuada delimitación de taxa basados en líneas adicionales de evidencia que incluya además de la morfología, la ultraestructura, la ecología y filogenia, entre otras. Sin embargo, en nuestra experiencia es perfectamente válido y recomendable la publicación de trabajos con el enfoque tradicional botánico, sobre todo para dar a conocer la diversidad fenotípica, cuando se trata de regiones o ambientes escasamente trabajados y con poblaciones que no ha sido posible caracterizar molecularmente, pero que sin embargo, presentan características morfológicas y/o ecológicas diacríticas que claramente las separan de otras entidades taxonómicas previamente descritas. Es en estos casos es cuando el trabajo del

taxónomo es importante y por ello, es fundamental que cuando ya se hayan delimitado los taxa morfológicamente, se intente, en lo posible, obtener el cultivo y en caso de tener éxito, se compare la morfología y fisiología y/o metabolismo conseguida bajo condiciones controladas, con la de poblaciones naturales. En este estudio se corroboró que bajo condiciones de cultivo controladas, las poblaciones examinadas, al igual que algunas previamente reportadas (Hindák, 2007), cambian considerablemente su fenotipo con respecto de las poblaciones naturales, por lo que creemos que es muy difícil hacer una correcta delimitación de este tipo de poblaciones, únicamente con las descripciones morfológicas obtenidas de los cultivos.

Por otro lado, la proporción relativamente pequeña de cianobacterias cultivables, crea una necesidad urgente para el desarrollo y aplicación de técnicas de cultivo independientes, tales como el análisis molecular de una sola célula o filamento (Mares *et al.*, 2015), sobre todo utilizando el material de poblaciones naturales.

Al final, muchos taxa esperan ser caracterizados o taxonómicamente redefinidos, demostrando la importancia de incrementar la inversión en la investigación sobre la diversidad de cianoprocariontes marinos, en particular en regiones geográficas no estudiadas, como lo son las costas tropicales.

## 10. CONCLUSIONES

Hasta este momento, la delimitación de los taxa marinos bénticos de Huatulco, ha sido posible realizarla con el uso de caracteres morfológicos, el análisis de los elementos del ciclo de vida y aspectos ecológicos que incluyen su manifestación morfológica a lo largo de distintas temporadas. Sin embargo en este estudio mostramos de modo claro, las ventajas de usar en lo posible un enfoque polifásico.

La clasificación taxonómica es una propuesta de orden y de relaciones entre taxones que utiliza una diversidad de métodos y que facilita la comprensión de la diversidad de organismos presentes. Dicha diversidad está basada en la historia genética, la variación morfológica y los

datos ecológicos. La aproximación polifásica debiera considerar todas las características diacríticas de las poblaciones-especies, sí en cultivo, pero es de suma importancia que también se haga en su ambiente natural y para ello se deben aplicar todos los procedimientos disponibles como criterio metodológico en el análisis de la taxonomía de los taxa del ambiente marino.

## 11. REFERENCIAS

Abed, R., Golubic, S., García-Pichel, F., Camoin, G. & Sprachta, S. (2003). Characterization of microbialite-forming cyanobacteria in a tropical lagoon: Tikehau Atoll, Tuamotu, French Polynesia. *Journal of Phycology* 39:862–873.

Abed, R., Palinska, K., Camoin, G. & Golubic, S. (2006). Common evolutionary origin of planktonic and benthic nitrogen-fixing oscillatoriacean cyanobacteria from tropical oceans. *FEMS Microbiology Letters* 260(2), 171-7.

Adams, D. & Duggan, P. (2008). Cyanobacteria–Bryophyte symbioses. *Journal of Experimental Botany* 59 (5 ), 1047–1058.

Anagnostidis, K. (1989). *Geitlerinema*, a new genus of oscillatoriacean cyanophytes. *Plant Systematics and Evolution* 164: 33-46.

Anagnostidis, K., & Komárek, J. (1985). Modern approach to the classification system of cyanophytes I Introduction. *Archiv für Hydrobiologie Supplement 71/Algological Studies* 38–39: 291–302.

Anagnostidis, K., & Komárek, J. (1988). Modern approach to the classification system of cyanophytes 3. Oscillatoriales. *Archiv für Hydrobiologie/ Algological Studies* 50–53: 327–472.

Anagnostidis, K., & Komárek, J. (1990). Modern approach to the classification system of cyanophytes 5. Stigonematales. *Archiv für Hydrobiologie/ Algological Studies* 59: 1–73.

Bárbara, I., Cremades, J., Calvo, S., López-Rodríguez, C. & Dosil, J. (2005). Checklist of the benthic marine and brackish Galician algae (NW Spain). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 62: 69–100.

Becerra-Absalon, I., Rodarte, B., Osorio, K., Alba-Lois, L., Segal, C. & Montejano, G. (2013). A new species of *Brasilonema* (Scytonemataceae, Cyanoprokaryota) from Tolantongo, Hidalgo, Central Mexico. *Fottea* 13(1): 25–38.

Bergman, B., Rai, A. N., & Rasmussen, U. (2007). *Cyanobacterial associations*. In: Elmerich, C. W. E. Newton (Eds.). *Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations* (257–301 pp.) Springer Netherlands. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

Berman-Frank, I., Lundgren, P. & Falkowski, P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology* 154:157–64.

Berrendero, E., Perona, E., Mateo, P. (2011). Phenotypic variability and phylogenetic relationships of the genera *Tolypothrix* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 3039–3051.

Björn, L. O. & Govindjee. (2009). The evolution of photosynthesis and chloroplasts. *Current Science* 96, 1466–1474.

Bohunická, M., Pietrasiak, N., Johansen, J., Berrendero-Gomez, E., Hauer, T., Gaysina, L., & Lukešová, A. (2015). *Roholtiella*, gen. nov. (Nostocales, Cyanobacteria) a tapering and branching cyanobacteria of the family *Nostocaceae*. *Phytotaxa* 197(2), 84–103.

Bornet, É. & Flahault, C. (1886–1888). Revision des Nostocacées hétérocystées contenues dans les principaux herbiers de France. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique, Troisième Série* 7: 51–129.

Bourrelly, P. (1969). Quelques remarques sur la classification des algues bleues: Stigonematales et Oscillatoriales. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie* 17: 757–760.



Bourrelly, P. (1970). *Les algues d'eau douce Initiation à la systématique. Tome III*. Boubée y Cie., Paris, 512 p.

Brito, A., Ramos, V., Seabra, R., Santos, A., Santos, C. L., Lopo, M., Ferreira, S., Martins, A., Mota, R., Frazão, B., Martins, R., Vasconcelos, V. & Tamagnini, P. (2012). Culture-dependent characterization of cyanobacterial diversity in the intertidal zones of the Portuguese coast: a polyphasic study. *Systematic and Applied Microbiology* 35: 110–119.

Buchanan, R. E., & Gibbons, N. E. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Biology*. Baltimore, MD. The Williams Wilkins Company.

Casamatta, D., Gomez, S. & Johansen, J. (2006). *Rexia erecta* gen. et sp. nov. and *Capsosira lowei* sp. nov., two newly described Cyanobacterial taxa from the great smoky mountains national park (USA). *Hydrobiologia* 561: 13–26.

Castenholz R. (2001). Phylum BX. *Cyanobacteria. Oxygenic Photosynthetic Bacteria*. - En: Boone, D. R. & Castenholz R. W. (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2<sup>nd</sup> edition, vol. 1: 473-599. Springer, New York.

Charpy, L. Palinska, K., Casareto, B., Langlade, M., Suzuki, Y., Abed, R., & Golubic, S. (2010). Dinitrogen-fixing cyanobacteria in microbial mats of two shallow coral reef ecosystems. *Microbial ecology* 59(1), 174–86.

CONANP (2003). *Programa de manejo Parque Nacional Huatulco*. CONANP (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas), México, 205 pp.

Correns, C. (1889). Ueber Dickenwachsthum durch Intussusception bei einigen *Algenmembranen*. *Flora Jena* 72: 298–347.

Criscuolo, A. & Gribaldo, S. (2011). Large-scale phylogenomic analyses indicate a deep origin of primary plastids within Cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 3019–3032.

Crispino, M. & Sant'Anna, L. (2006). Cianobactérias marinhas bentônicas de ilhas costeiras do Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 639–656.

Desikachary, T. V. (1959). *Cyanophyta*. Academic Press. Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. 686 p.

Dewapriya, P., & Kim, S. (2014). Marine microorganisms: An emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods. *Food Research International* 56, 115–125.

Díez, B., Bauer, K. & Bergman, B. (2007). Epilithic cyanobacterial communities of a marine tropical beach rock (Heron Island, Great Barrier Reef): diversity and diazotrophy. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 3656–68.

Dvořák, P., Casamatta, D. A., Poulíčková, A., Hašler, P., Ondřej, V. & Sanges, R. (2014). *Synechococcus*: 3 billion years of global dominance. *Molecular Ecology* (23): 5538–5551.

Elenkin, A. A. (1936-1949). *Monographia algarum Cyanophycearum aquidulcium et terrestrium in finibus URSS inventarum. I et II*. Izd. Akad. Nauk SSSR, Moskva-Leningrad. I: 684 p., II: 1908 p.

Engene, N., Gunasekera, S., Gerwick, W., & Paul, V. (2013). Phylogenetic inferences reveal large extent of novel biodiversity in chemically rich tropical marine Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1–30.

Engene, N., Rottacker, E., Kaštovský, J., Byrum, T., Choi, H., Ellisman, M., Komárek, J., & Gerwick, W. (2012). *Moorea producens* gen. nov., sp. nov. and *Moorea bouillonii* comb. nov., tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62(Pt 5), 1171–8.

Engler, A. & Prantl, K. (1892). *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. Wilhelm Engelmann, Leipzig, 45–92.

Engler, A. & Prantl, K. (1895) *Die Pflanzenwelt Ost-Afrikas und der Nachbargebiete*. Geographische Verlagshandlung Dietrich Reimer, Berlin, 523 p.

Engler, H. & Prantl, K. (1900). *Die Natürlichen Pflanzenfamilien nebst ihren Gattungen und wichtigeren Arten, insbesondere den Nutzpflanzen, unter Mitwirkung zahlreicher hervorragender Fachgelehrten begründet.* (W. Engelmann, Ed.) Leipzig. 192 p.

Ercegovic, A. (1929). Sur quelques nouveaux types des Cyanophycées lithophytes de la côte adriatique. *Archiv für Protistenkunde* 66: 164–174.

Hirose, E., Uchida, H., Murakami, A. (2009). Ultrastructural and microspectrophotometric characterization of multiple species of cyanobacterial photosymbionts coexisting in the colonial ascidian *Trididemnum clinides* (Tunicata, Ascidiacea, Didemnidae). *European Journal of Phycology* 44: 365-375.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.

Fiore, M., Sant'Anna, C., Azevedo, M., Komárek, J., Kaštovský, J., Sulek, J., & Sturion, A. (2007). The Cyanobacterial Genus *Brasilonema*, gen. nov. a molecular and phenotypic evaluation. *Journal of Phycology* 43: 789–798.

Flechtner, V., Boyer, S., Johansen, J. & De Noble, M. (2002). *Spirirestis rafaensis* gen. et. sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils. *Nova Hedwigia* 74: 1–24.

Flechtner, V., Johansen, J. & Belnap, J. (2008). The biological soil crusts of the San Nicolas Island: enigmatic algae from a geographically isolated ecosystem. *Western North American Naturalist* 68: 405–436.

Flombaum, P., Gallegos, J. L., Gordillo, R. A., Rincon, J., Zabala, L. L., Jiao, N. A. Z., Karl, D. M., Li, W. K. W., Lomas, M. W., Veneziano, D., Vera, C. S., Vrugt, J. A. & Martiny, A. C. (2013). Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:9824–29.

Frémy, P. (1927). Les Scytonématacées de la Normandie. *Bulletin de la Société Linnéenne de Normandie Caen* 9: 55–58.

Frémy, P. (1929–1933). Les Cyanophycées des Côtes d'Europe. *Memoires de la Societé Nationale des Sciences Naturelles et Mathématiques de Cherbourg* 41: 1–234.

Frémy, P. (1930). Les Myxophycées de l'Afrique équatoriale française. *Archives de Botanique, Mémoires* 3: 1–508.

Gama-Jr., W. A., Laughinghouse, D., & Sant'Anna, C. (2014). How diverse are coccoid cyanobacteria? A case study of terrestrial habitats from the Atlantic Rainforest (São Paulo, Brazil). *Phytotaxa* 178(2), 61–97.

Garbary, D. (2007). The margin of the sea: survival at the top of the tides. In: Seckbach, J. (ed.) *Algae and Cyanobacteria in extreme environments*. Springer, Berlin, pp. 175–191.

Gardner, N. L. (1927). New Myxophyceae from Porto Rico. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 7: 1–144.

Gaylarde, C. C., & Gaylarde, P. M. (2005). A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America. *International Biodeterioration y Biodegradation*, 55(2), 131–139.

Geitler, L. (1932). *Cyanophyceae*. in: Rabenhorst, L. (Ed.) *Kryptogamen Flora von Deutschland*, vol. 14. Akademische Verlagsges, Leipzig, 1196 p.

Geitler, L. (1942). Schizophyta: Klasse Schizophyceae. In: Engler, A. & Prantl, K. (eds.) *Die natürlichen Pflanzenfamilien, Sweite Auflage, Vol. 1b*. Wilhelm Engelmann, Leipzig, 232 p.

Gold-Morgan M. & González-González J. (2005). What is a species in cyanoprokaryotes? *Arch. Hydrobiology/Algological Studies* 117: 209-222.

Golubic, S., Le Campion-Alsumard., S. E. Campbell. (1999). Diversity of marine cyanobacteria. *Bulletin Institute Oceanography* 19(Special Issue): 53–76.

Gomont, M. (1892). Monographie des Oscillatoriées (Nostocacées homocystées). *Annales des Sciences Naturelles Botanique* 15, 263–368, 16, 91–264. Cramer, Germany.

Gomont, M. (1901). Myxophyceae hormogoneae. *Botanisk Tidsskrift* 24: 202–211.

González-Resendiz, L., León-Tejera, H. P., Díaz-Larrea, J., Alba-Lois, L. & C. Segal-Kischinevzky (2013) *Hassallia littoralis* sp. nov. (Cyanobacteria, Microchaetaceae) from Mexico's marine supralittoral based on morphological and molecular evidence. *Phytotaxa* 137: 35–47.

Govindjee & Shevela, D. (2011). Adventures with Cyanobacteria: A Personal Perspective. *Frontiers in Plant Science* 2–28.

Granja, M. & López-Pérez, A. (2008). Sedimentación en comunidades arrecifales de Bahías de Huatulco, Oaxaca, México. *Revista de Biología Tropical* 56: 1179–1187.

Gugger, M., Lyra, C., Henriksen, P. & Coute, A. (2002). Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1867–1880.

Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.

Hassall, A. H. (1845). *A History of the British Freshwater Algae*. Highley, London, 462 p.

Hauck, F. (1885). Die Meeresalgen Deutschlands und Österreichs. in: Rabenhorst, L. (Ed.) Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz. Zweite Auflage. Eduard Kummer, Leipzig, 513–575 p.

Hauer, T., Bohunická, M. & Mühlsteinová, R. (2013). *Calochaete* gen. nov. (Cyanobacteria, Nostocales), a new cyanobacterial type from the “páramo” zone in Costa Rica. *Phytotaxa* 109: 36–44.

Hauer, T., Bohunická, M., Johansen, J. R., Mareš, J., & Berrendero-Gomez, E. (2014). Reassessment of the cyanobacterial family Microchaetaceae and establishment of new families Tolypothrichaceae and Godleyaceae. *Journal of Phycology* 50: 1089–1100.

Hentschke, G., Johansen, J., Pietrasiak, N., Fiore, M., Rigonato, J., Sant'Anna, C., & Komárek, J. (2016). Phylogenetic placement of *Dapisostemon* gen. nov. and *Streptostemon*, two tropical heterocytous genera (Cyanobacteria). *Phytotaxa* 245(2): 129–143.

Hindák, F. (2007). Conspicuous forms of heterocytes and hormogonia in *Rivularia mesenterica* (Cyanophyta / Cyanobacteria ). *Phytologia*, 13(1) 21–27.

Hoffmann, L. (1999). Marine cyanobacteria in tropical regions: diversity and ecology. *European Journal of Phycology* (34): 371–379.

Hoffmann, L., Komárek, J. & Kaštovský, J. (2005). System of Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria): state in 2004. *Archiv für Hydrobiologie/Algological Studies* 117: 95–115.

Iteman, I., Rippka, R., Tandeau de Marsac, N. & Herdman, M. (2002). rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera *Anabaenopsis* and *Cyanospira*. *Microbiology* 148: 481–496.

Janczewski (1883). Nowy rodzaj sin. rozprawy Akademii umiejetnosci, Wydzial matematyczno-przyrodniczy, Akademia umiejetnosci, Krakow 11: 142–144.

Johansen, J. R., Kovacik, L., Casamatta, D. A., Fučíková, K., & Kaštovský, J. (2011). Utility of 16S-23S ITS sequence and secondary structure for recognition of intrageneric and intergeneric limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya corticola* sp. nov. (pseudanabaenaceae, cyanobacteria). *Nova Hedwigia* 92(3), 283–302.

Johansen J. R., Casamatta D. A. (2005). Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. *Algological Studies* 117:71–93

Kim, S. G., Rhee, S. K., Ahn, C. Y., Ko, S. R., Choi, G. G., Bae, J. W. & Oh, H. M. (2006). Determination of cyanobacterial diversity during algal blooms in Daechung Reservoir, Korea, on

the basis of cpcBA intergenic spacer region analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 72(5), 3252–3258.

Kiseleva, E. I. (1931). About a new bluegreen algae *Scytonematopsis woronichinii*. *Zhurnal Russkago Botanicheskago Obshchestva pri Akademii Nauk* 15: 169–174.

Komárek, J. (2006). Cyanobacterial taxonomy: current problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. *Algae* 21: 349–375.

Komárek, J. (2009). Modern taxonomic revision of planktic nostocacean cyanobacteria: a short review of genera. *Hydrobiologia* 639(1): 231–243.

Komárek, J. (2010). Recent changes (2008) in Cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* 639: 245–259.

Komárek, J. (2011). Introduction to the 18 th IAC Symposium in České Budejovice 2010, Czech Republic Some current problems of modern cyanobacterial taxonomy. *Fottea*, 11(1), 1–7.

Komárek, J. (2012). Nomenclatural changes in heterocytous Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria, Cyanophytes ). *Fottea* 12: 141–148.

Komárek, J. (2013). *Süßwasserflora von Mitteleuropa. Cyanoprokaryota: 3rd part: heterocystous genera* Vol. 19 pp. [i] –xviii, [1] –1130. Heidelberg: Springer Spektrum.

Komárek, J. (2014). *Modern classification of cyanobacteria*. En: *Cyanobacteria: An Economic Perspective* (eds N. K. Sharma, A. K. Rai & L. J. Stal), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. 21–40 p.

Komárek, J. & Anagnostidis, K. (1986). Modern approach to the classification system of cyanophytes, 2–Chroococcales. *Algological Studies* 43: 157–226.

Komárek, J. & Anagnostidis, K. (1989). Modern approach to the classification system of cyanophytes. 4. Nostocales. *Archiv für Hydrobiologie/Algological Studies* 56: 247–345.

Komárek, J. & Anagnostidis, K. (1998). *Cyanoprokaryota 1. Teil: Chroococcales*. In: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H. & Mollenhauer, D. (Eds.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa 19/1*. Gustav Fischer, Jena-Stuttgart-Lübeck-Ulm, 548 p.

Komárek, J. & Anagnostidis, K. (2005). *Cyanoprokaryota 2. Oscillatoriales*. In: Büdel, B., Gärtner, G., Krienitz, L. & Schagerl, M. [Eds.] *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Elsevier/Spektrum, Heidelberg, 759.

Komárek, J. & Kaštovský, J. (2003). Coincidences of structural and molecular characters in evolutionary lines of cyanobacteria. *Algological Studies* 148: 305–25.

Komárek, J. & Hauer, T. (2007). Three rare cyanobacterial species in the Podyjí National Park. *Thayensia (Znojmo)* 7: 75–83.

Komárek, J. & Hauer, T. (2016). *CyanoDB.cz - On-line database of cyanobacterial genera*. University of South Bohemia and Institute of Botany AS CR. Available at <http://www.cyanodb.cz>

Komárek, J., Montejano, G., Gold-Morgan, M. & Tavera, R. (1996). Taxonomic identity and distribution of tropical cyanoprokaryotes (Cyanophyta, Cyanobacteria): An example from central Mexico. *Nova Hedwigia* 112: 49–54.

Komárek, J. & Komárková-Legnerová, J. (2007). Taxonomic evaluation of the cyanobacterial microflora from alkaline marshes of northern Belize. 1. Phenotypic diversity of coccoid morphotypes. *Nova Hedwigia* 84: 65–111.

Komárek, J., Elster, J., & Komárek, O. (2008). Diversity of the cyanobacterial microflora of the northern part of James Ross Island, NW Weddell Sea, Antarctica. *Polar Biology*. 31(7), 853–865.

Komárek, J. Kaštovský, J. & Jezberova, J. (2011). Phylogenetic and taxonomic delimitation of the cyanobacterial genus *Aphanothece* and description of *Anathece* gen. nov. *European Journal of Phycology*. 46(3): 315–326.



- Komárek, J., Nedbalová, L. & Hauer, T. (2012). Phylogenetic position and taxonomy of three heterocytous cyanobacteria dominating the littoral of deglaciated lakes, James Ross Island, Antarctica. *Polar Biology* 35: 759–774.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J. & Johansen, J. R. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295–335.
- Komárek, J., Sant'Anna, C., Bohunická, M., Mareš, J., Hentschke, G., Rigonato, J., & Fiore, M. (2013). Phenotype diversity and phylogeny of selected Scytonema-species (Cyanoprokaryota) from SE Brazil. *Fottea*. 13(2): 173–200.
- Kováčik, L. & Komárek, J. (1988). *Scytonematopsis starmachii*, a new cyanophyte species from the High Tatra Mts. (Czechoslovakia). *Algological Studies* 50–53: 303-314.
- Lamprinou, V., Skaraki, K., Kotoulas, G., Economou-Amilli, A. & Pantazidou, A. (2012). *Toxopsis calypsus* gen. nov., sp. nov. (Cyanobacteria, Nostocales) from cave “Franchi”, Peloponnese, Greece: a morphological and molecular evaluation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62: 2870–2877.
- Leão, P. N., Engene, N., Antunes, A., Gerwick, W. H., & Vasconcelos, V. (2012). The chemical ecology of cyanobacteria. *Natural Product Reports*. 29(3), 372–391.
- Lemmermann, E. (1910). Algen I (Schizophyceen, Flagellaten, Peridineen). *Kryptogamenflora der Mark Brandenburg und angrenzender Gebiete* 3: 497–712.
- León-Tejera, H. & Montejano, G. (2000). *Dermocarpella* (Cyanoprokaryota/Cyanophyceae /Cyanobacteria) from the Pacific coast of Mexico. *Cryptogamie Algologie* 21: 259–272.
- León-Tejera, H., Montejano, G. & Cantoral-Uriza, E. (2003). Some little know Hydrococcaceae (Cyanoprokariota) from Central Mexico. *Archiv für Hydrobiologie/Algological Studies* 109: 363–374.

León-Tejera, H., Montejano, G. & Gold-Morgan, M. (2005). Description of two interesting Scytonematacean populations from supratidal biotopes of the Mexican Pacific. *Archiv für Hydrobiologie/Algological Studies* 117: 307–313.

León-Tejera, H., M. Gold-Morgan & G. Montejano. (2009). *Benthic Cyanoprokaryota (Cyanobacteria) of the Gulf of Mexico*. En: Felder, D.L. & D.K. Camp (eds.), *Gulf of Mexico—Origins, Waters, and Biota. Biodiversity*. Texas A&M Press, College Station, Texas. 47–56 p.

León-Tejera, H. González-Resendiz, L. & Gold-Morgan, M. (2016). *Diversidad de Cianoprocariontes en las Costas Oaxacaqueñas*. En: *Diversidad de Oaxaca CONABIO* (en prensa).

López-Cortés, A., Garcia-Pichel, F., Nübel, U. & Vázquez-Juárez, R. (2001). Cyanobacterial diversity in extreme environments in Baja California, Mexico: a polyphasic study. *International Microbiology* 4(4): 227–236.

Mareš, J., Hrouzek, P., Kaňa, R., Ventura, S., Strunecký, O., & Komárek, J. (2013). The Primitive Thylakoid-Less Cyanobacterium *Gloeobacter* Is a Common Rock-Dwelling Organism. *PloS One* 8(6).

Mareš, J., Lara, Y., Dadáková, I., Hauer, T., Uher, B., Wilmotte, A. & Kaštovský, J. (2015). Phylogenetic analysis of cultivation-resistant terrestrial cyanobacteria with massive sheaths (*Stigonema* spp. and *Petalonema alatum*, Nostocales, Cyanobacteria) using single-cell and filament sequencing of environmental samples. *Journal of Phycology* 51: 288–297

McFadden, G. (2014). *Origin and evolution of plastids and photosynthesis* En: Keeling, P. & Eugene, V. *The Origin and Evolution of Eukaryotes*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 9 pp.

McNeill, J., Barrie, F. R., Buck, W. R., Demoulin, V., Greuter, W., Hawksworth, D. L., Herendeen, P. S., Knapp, S., Marhold, K., Prado, J., Prudhomme Van Reine, W. F., Smith, G. F., Wiersema, J. H. & Turland, N. J. (2012). International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code). Adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. *Regnum Vegetabile* 154:1–240.

Milne, L., Lindner, D., Bayer, M., Husmeier, D., McGuire, G., Marshall, D. F. & Wright, F. (2009) TOPALi v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops. *Bioinformatics* 25: 126–127.

Mishler, B. D. & Theriot, E. C. (2000). *The phylogenetic species concept (sensu Mishler & Theriot): monophyly, apomorphy and phylogenetic species concepts*. In: Q. D., W. & R., M. [Eds.] *Species Concepts and Phylogenetic Theory, A Debate*. Columbia University Press, New York. 44–54.

Montejano, G. & León-Tejera, H. (2002). Reproduction and baeocyte formation in two species of *Dermocarpella* (Cyanophyceae). *European Journal Phycology* 37: 323–327.

Montoya-Terreros, H. (2003). Poblaciones naturales y de cultivo del alga marina *Kyrtuthrix maculans* (Gomont) Umezaki (Cyanophyta, Scytonemataceae), primer registro para la flora peruana. *Arnaldoa* 10(1): 7–18.

Mühlsteinová, R., Johansen, J. R., Pietrasiak, N., Martin, M. P., Osorio-santos, K., & Warren, S. D. (2014). Polyphasic characterization of *Trichocoleus desertorum* sp. nov. (Pseudanabaenales, Cyanobacteria) from desert soils and phylogenetic placement of the genus *Trichocoleus*. *Phytotaxa*, 163(5), 241–261.

Müller, K., Quandt, D., Müller, J. & Neinhuis, C. (2010) PhyDE® 0.983: Phylogenetic Data Editor. Available at <http://www.phyde.de>

Nabout, J.C., Silva-Rocha, B., Carneiro, F.M. & Sant'Anna, C.L. (2013). How many species of cyanobacteria are there? Using a discovery curve to predict the species number. *Biodiversity and Conservation* 22(12): 2907–2918.

Nagarkar, S. (2002). New records of heterocystous Cyanobacteria from Hong Kong rocky shores. *Nova Hedwigia*, 75: 189–200.

Nagarkar, S. & Williams, G. (1999). Spatial and temporal variation of cyanobacteria-dominated epilithic communities on a tropical shore in Hong Kong. *Phycologia* 5: 385–393.

Nagarkar, S. & Williams, G. (1997). Comparative techniques to quantify cyanobacteria dominated epilithic biofilms on tropical rocky shores. *Marine Ecology Progress Series* (154): 281–291.

Nagarkar, S., Williams, G., Subramanian, G., & Saha, S. (2004). Cyanobacteria-dominated biofilms: a high quality food resource for intertidal grazers. *Hydrobiologia* 512: 89–95.

Neilan, B., Jacobs, D., Del Dot, T., Blackall, L., Hawkins, P., Cox, P. & Goodman, E. (1997). rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 693–697.

Nixon, K. C. (1999–2002). *WinClada ver. 1.0000*. Ithaca.

Nixon, K.C. (1999). The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407–414.

Novis, P.M. & Visnovsky, G. (2011). Novel alpine algae from New Zealand: Cyanobacteria. *Phytotaxa* 22: 1–24.

Nübel, U., Garcia-Pichel, F. y Muzner, G. (2000). The halotolerance and phylogeny of cyanobacteria with tightly coiled trichomes (*Spirulina* Turpin) and the description of *Halospirulina tapeticola* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 1265–1277

Nübel, U., Garcia-Pichel, F. & Muzner, G. (1997). PCR Primers to amplify 16S rRNA genes from Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3327–3332.

Oren A. (2011). Cyanobacterial systematics and nomenclature as featured in the International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy /International Journal of Systematic Bacteriology /International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61(1):10–15

Oren, A. (2015). Cyanobacteria in hypersaline environments: biodiversity and physiological properties. *Biodiversity Conservation* 24:781–798

Ortega-Morales, B. O., Santiago-García, J. L. & López-Cortés, A. (2005). Biomass and taxonomic richness of epilithic cyanobacteria in a tropical intertidal rocky habitat. *Botanica Marina* 48: 116–121.

Osorio-Santos, K. Pietrasiak, N., Bohunicka, M., Miscoe, L., Kováčik, L., Martin, M., Johansen, J. R. (2014). Seven new species of *Oculatella* (Pseudanabaenales, Cyanobacteria): taxonomically recognizing cryptic diversification. *European Journal of Phycology* 49: 450–470.

Pope, P., Patel Bharat, K. C. (2008). Metagenomic analysis of a freshwater toxic cyanobacteria bloom. *FEMS Microbiology Ecology* 64: 9–27.

Potts, M. (1980). Blue-green algae (Cyanophyta) in marine coastal environments of the Sinai Peninsula: distribution, zonation, stratification and taxonomic diversity. *Phycologia* 19: 60–73.

Rabenhorst, L. (1864). *Flora europaea algarum aquae dulcis et submarinae*. Sectio i. Algae diatomaceas complectens, cum figuris generum omnium xylographice impressis. Apud Eduardum Kummerum, Leipzig, 359 p.

Rai AN, Söderbäck E, Bergman B. (2000). Cyanobacteria–plant symbiosis. *New Phytologist*. 116: 449–481.

Rajaniemi, P., Hrouzek, P., Kastovská, K., Willame, R., Rantala, A., Hoffmann, L., Komárek, J. & Sivonen, K. (2005). Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 11–26.

Ramírez-Reinat, E. (2010) *How Cyanobacteria Bore*. Arizona State University, Phoenix, 150 p.

Reynolds, E. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology* 17: 208–212.

Rippka R., Deruelles J., Waterbury J., Herdman M., Stanier R. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *Journal General Microbiology* 111:1–61.

Ritson-Williams, R., Paul, V. J., & Bonito, V. (2005). Marine benthic cyanobacteria overgrow coral reef organisms. *Coral Reefs* 24(4), 629.

Rodarte, B., Becerra-absalón, I., Montejano, G. a, Osorio-, K., Alba-lois, L., León-tejera, H., & Segal-kischinevzky, C. (2014). Morphological and Molecular Characterization of *Brasilonema roberti-lamii* (Cyanophyceae, Nostocales, Scytonemataceae), from Central Mexico. *Phytotaxa* 164(4): 255–264.

Rosselló-Mora, R. (2003). Opinion: the species problem, can we achieve a universal concept? *Systematic and applied microbiology* 26(3): 323–6.

Rosselló-Mora, R. (2005). Updating Prokaryotic Taxonomy. *Journal of Bacteriology*, 187(18): 6255–6257.

Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology reviews* 25(1): 39–67.

Rott, E. (2008). *Chamaesiphon komarekii* species nova, a new benthic freshwater chroococcalean species (Cyanophyta/Cyanobacteria) from western coniferous forest streams in British Columbia, Canada. *Algological Studies* 126: 37–46.

Sant'Anna, C. (1988). Scytonemataceae (Cyanophyceae) from the state of San Paulo, Southern Brazil. *Nova Hedwigia* 46: 519–539.

Sant'Anna, C. (1995). Cyanophyceae marinhas bentônicas do parque estadual da ilha do Cardoso, SP., Brasil. *Hoehnea* 22: 197–216.

Sant'Anna, C. (1997). Cyanophyceae marinhas bentônicas da Região de Ubatuba, SP, Brasil. *Hoehnea*, 24: 57–74.

Sant'Anna, C., Cordeiro, M., Almeida, M., & Beauclair, S. (1985). Cianofíceas marinhas bentónicas das praias de Peruíbe e Dos Sonhos, Município de Itanhaén, SP, Brasil, 1. *Rickia*, 12: 89–112.

Sant'Anna, C., Acevedo, T., Kaštovský, J. & Komárek, J. (2010). Two form-genera of aerophytic heterocytous cyanobacteria from Brazilian rainy forest, "Mata Atlântica". *Fottea* 10: 217–228.

Sant'Anna, C. L., Gama, J.R., Azevedo, M.T.P. & Komarek, J. (2011a) New morphospecies of Chamaesiphon (Cyanobacteria) from Atlantic rainforest, Brazil. *Fottea* 11: 1–6.

Sant'Anna, C., Azevedo, M., Fiore, M.; Lorenzini, A. Kaštovský, J. & Komárek, J. (2011b). Subgeneric diversity of Brasilonema (Cyanobacteria, Scytonemataceae). *Revista Brasileira de Botânica*. 34: 51–62.

Sapp, J. (2005a). *Microbial Phylogeny and Evolution: Concepts and Controversies*. New York: Oxford University Press.

Sapp, J. (2005b). The prokaryote- eukaryote dichotomy: meanings and mythology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69, 292–305.

Schopf J.W. (1993). Microfossils of the early Archean Apex period: new evidence of the antiquity of life. *Science* 260: 640–646.

Schopf, J. W. (2014). Geological evidence of oxygenic photosynthesis and the biotic response to the 2400-2200 Ma "Great Oxidation Event". *Biochemistry-Moscow* 79:165–77

Sciuto, K., & Moro, I. (2015). Cyanobacteria: the bright and dark sides of a charming group. *Biodiversity and Conservation* 24(4): 711–738.

Setchell, W. A. & Gardner, N. L. (1930). Marine algae of the Revillagigedo Islands Expedition in 1925. *Proceedings of the California Academy of Science*, Series 4. 19: 109–215.

Silva, S. M. F., & Pienaar, R. N. (2000). Some Benthic Marine Cyanophyceae of Mauritius. *Botanica Marina*, 43(1): 11–27.

Stanier, R. Y., & Van Niel, C. B. (1962). The concept of a bacterium. *Archiv für Mikrobiologie*. 42, 17–35.

Stanier, R. Y., Siström, W. R., Hansen, T. A., Whitton, B. A., Castenholz, R. W., Pfennig, N., Gorlenko, V. N., Kondratieva, E. N., Eimhjellen, K. E., Whittenbury, R., Gherna, R. L. & Truper, H. G. (1978). Proposal to Place the Nomenclature of the Cyanobacteria (Blue-Green Algae) Under the Rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28:(2)335–336.

Starmach, K. (1966). Flora Slodkowodna Polski. Cyanophyta Sinice Flora. Glaukophyta-Glaukofity. Polska Akademia Nauk. Paustwawe Yuudawnintwo Nankowe. Warszawa. *Slodkovodna Polski*. 808 p.

Strunecký, O., Komárek, J. & Šmarda, J. (2014). *Kamptonema* (Microcoleaceae, Cyanobacteria), a new genus derived from the polyphyletic *Phormidium* according to combined molecular and cytomorphological markers. *Preslia* 86: 193–207.

Swofford, D. L. (2002) *PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4*. Sinauer Associates, Sunderland.

Taton, A., Grubisic, S., Ertz, D., Hodgson, D., Piccardi, R., Biondi, N., Tredici, M., Mainini, M., Losi, D., Marinelli, F. & Wilmotte, A. (2006). Polyphasic study of antarctic Cyanobacterial strains. *Journal of Phycology* 42: 1257–1270.

Tavera, R., Novelo, E., López, S. (2013). Cyanoprokaryota (Cyanobacteria) in karst environments in Yucatán, Mexico. *Botanical Sciences* 91(1): 27–52.

Thajuddin, N. & Subramanian, G. (1992). Survey of cyanobacterial flora of the Southern East Coast of India. *Botanica Marina* 35: 305–314.

Thompson, J., Higgins, D. & Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 11: 4673–4680.



Thuret, G. (1875). Essai de classification des Nostochinées. *Annales des Sciences Naturelles Botanique Series* 6:372–82.

Tsuda, R., Fisher, J., Vroom, P., & Abbott, I. (2010). New records of subtidal benthic marine algae from Wake Atoll, Central Pacific. *Botanica Marina* 53(1):19–29.

Tsuda, R. (2002). Checklist and bibliography of the marine benthic algae from islands and atolls within Yap State, Federated States of Micronesia. *University of Guam Marine Laboratory*, (105), 22 p.

Tsuda, R. (2003). Checklist and bibliography of the marine benthic algae from the mariana islands (Guam and CNMI). *University of Guam Marine Laboratory*, (107): 1–49.

Umezaki, I. (1961). The marine blue-green algae of Japan. *Memoirs of the College of Agriculture, Kyoto University* 83: 1–149.

Vaccarino, M. & Johansen, J. (2012). *Brasilonema Angustatum* sp. nov. (Nostocales), a new Filamentous Cyanobacterial Species from the Hawaiian Islands. *Journal of Phycology* 48: 1178–1186.

Waterbury J. B. (2006). *The Cyanobacteria-Aislamiento, purificación e identificación. Prokaryotes*. En: Dworkin & Falkow, S. *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria. Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, chapter 2.1. (4): 1053–1073.

Wheeler, Q. D. & Platnick, N. I. (2000). *The Phylogenetic Species Concept (sensu Wheeler & Platnick)*. En: Wheeler, Q. D. & Meier, R. [Eds.] *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate*. Columbia University Press, New York, 55–69.

Whitton, B. & Potts, M. (1979). Blue-green algae (Cyanobacteria) of the oceanic Coast of Aldabra. *Atoll Research Bulletin* 238: 1–8.

Williams, G., Davies, M. & Nagarkar, S. (2000). Primary succession on a seasonal tropical rocky shore : the relative roles of spatial heterogeneity and herbivory. *Marine Ecology Progress Series* 203: 81–94.

Wilmotte, A. (1994). *Molecular evolution and taxonomy of the cyanobacteria*. In: The Molecular Biology of Cyanobacteria. (Ed. D. A. Bryant) Kluwe Academic Publishers, The Netherlands. 1–25.

Zapomělová, E., Skácelová, O., Pumann, P., Kopp, R. & Janeček, E. (2012). Biogeographically interesting planktonic Nostocales (Cyanobacteria) in the Czech Republic and their polyphasic evaluation resulting in taxonomic revisions of *Anabaena bergii* Ostefeld 1908 (*Chrysoosporum gen. nov.*) and *A. tenericaulis* Nygaard 1949 (*Dolichospermum tenericaule comb. nova*). *Hydrobiologia* (698): 353–365.

## 12. ANEXO I

### Clave de identificación genérica para las heterocitosas del capítulo I de este trabajo.

Referencias bibliográficas importantes para la taxonomía de este grupo son entre otras, Komárek, (2013); Komárek *et al.*, (2014).

Las heterocitosas son parte del orden Nostocales (Borzi) Geitler y el punto de partida de la sistemática de este grupo es Bornet & Flahault (1886-1888).

### Caracteres presentes en Nostocales

Filamentos con heterocitos que pueden ser según su posición terminales, laterales o intercalares. La polaridad del tricoma puede ser isopolar y heteropolar que implica que los extremos son similares o distintos. Los tricomas pueden ser uni o multiseriados. Pueden tener ramificaciones falsas, verdaderas o facultativas. Los acinetos pueden estar presentes, ausentes o ser facultativos.

La división celular puede ser perpendicular al eje principal del tricoma para aquellos grupos uniseriados pero si son multiseriados tienen la capacidad de dividirse en otras direcciones al eje principal es decir la división es irregular. Estructuras de multiplicación hormogonios y hormocitos con diferentes formas de formación y liberación. Monocitos conocidos sólo para unas pocas especies por ejemplo *Hassallia andreassenii* Komárek *et al.*, (2011) o *Stauromatonema nigrum* Geitler, (1932). Las zonas meristemáticas suelen localizarse en regiones apicales o subapicales.

De manera general, estos son los caracteres que definen a las Nostocales, pero es importante aclarar que, se puede presentar un sólo estado de carácter o una combinación de estados según las distintas familias del orden, así como otros caracteres por ejemplo, en el tipo de rama falsa que puede ser geminada, divaricada con o sin heterocito, etc..

- 1a. Tricomas principalmente heteropolares (con heterocitos basales)\_\_\_\_\_ **7**
- 1b. Tricomas principalmente isopolares (con heterocitos intercalares)\_\_\_\_\_ **2**
- 2a.- Tricomas atenuados o no atenuados en los extremos \_\_\_\_\_ **3**
- 2b. Tricomas en pequeños grupos cortos, presentan ramas falsas de tipo geminadas y divaricadas, tricomas rara vez con heterocitos basales.\_\_\_\_\_ **Ophiothrix**
- 3a. Tricomas en ambos extremos atenuados a menudo formando una estructura larga como un "pelo".\_\_\_\_\_ **4**
- 3b. Tricomas cilíndricos, más o menos del mismo ancho a todo lo largo del tricoma.\_\_\_\_\_ **5**
- 4a. Crecimientos formando céspedes verdes a negruzcos de filamentos erectos entremezclados, con ramas falsas simples o geminadas.\_\_\_\_\_ **Scytonematopsis**

4b. Crecimientos formando tapetes acojinados siempre planos color verde negruzco de filamentos sin ramas, que crecen en forma de “U” o de lazo, generalmente paralelos. \_\_\_\_\_ **Kyrtuthrix**

5a. Crecimientos formando céspedes verde negruzcos de filamentos creciendo en fascículos. Ramas falsas escasas. \_\_\_\_\_ **Brasilonema**

5b. Tricomas no del mismo ancho a lo largo del tricoma, vaina conspicuamente más ancha que el tricoma \_\_\_\_\_ **6**

6a. Crecimientos formando céspedes verde negruzco de filamentos a veces enmarañados, con una parte erecta y otra postrada, formando dobleces con bucles o lazos hacia las partes terminales \_\_\_\_\_ y \_\_\_\_\_ con \_\_\_\_\_ ramificaciones \_\_\_\_\_ geminadas. \_\_\_\_\_ **Petalonema**

6b. Crecimientos costrosos de color café-negruzco de filamentos densamente entremezclados, con \_\_\_\_\_ repetidas \_\_\_\_\_ ramificaciones \_\_\_\_\_ falsas \_\_\_\_\_ divaricadas \_\_\_\_\_ o geminadas. \_\_\_\_\_ **“Myochrotes”**

7a. Crecimiento formando céspedes verdes de filamentos siempre epifitos, sin ramificaciones, siempre con heterocitos basales atenuación hacia el ápice pero sin formar “pelo”. \_\_\_\_\_ **Calothrix**

7b. Crecimientos formando céspedes negruzcos de filamentos con ramas falsas divaricadas al filamento principal, hormogonios con heterocitos intercalares y basales. \_\_\_\_\_ **Hassallia**