



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Caracterización morfológica y molecular de  
especies de cianobacterias de la familia  
Rivulariaceae encontradas en dos lagos-cráter  
del estado de Puebla, México.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**CRISTHIAN EDUARDO TREJO HERNÁNDEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. ITZEL BECERRA ABSALÓN**

**Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **Hoja de Datos del jurado**

### **1. Datos del alumno**

Trejo  
Hernández  
Cristhian Eduardo  
15 17 92 78

**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Facultad de Ciencias**

Biología  
308292589

### **2. Datos del tutor**

Dra.  
Itzel  
Becerra  
Absalón

### **3. Datos del sinodal 1**

Dr.  
Gustavo Alberto  
Montejano  
Zurita

### **4. Datos del sinodal 2**

Biól.  
Claudia  
Peña  
Segura

### **5. Datos del sinodal 3**

Dra.  
Hilda Patricia  
León  
Tejera

### **6. Datos del sinodal 4**

Dr.  
Javier  
Carmona  
Jiménez

### **7. Datos del trabajo escrito**

Caracterización morfológica y molecular de especies de cianobacterias de la familia Rivulariaceae encontradas en dos lagos-cráter del estado de Puebla, México.

102 p.

2018.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE  
Directora General  
Dirección General de Administración Escolar  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Caracterización morfológica y molecular de especies de cianobacterias de la familia Rivulariaceae encontradas en dos lagos-cráter del estado de Puebla, México**

realizado por **Cristhian Eduardo Trejo Hernández** con número de cuenta **308292589** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Gustavo Alberto Montejano Zurita

Propietaria Biól. Claudia Peña Segura

Propietaria Dra. Itzel Becerra Absalón  
Tutora

Suplente Dra. Hilda Patricia León Tejera

Suplente Dr. Javier Carmona Jiménez

Atentamente

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 26 DE OCTUBRE DE 2018

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios, a quien amo y en quien confío, por darme la vida y salud, por guiarme en este camino, proveer todo lo que necesito y permitirme llegar a este punto con todo lo que he vivido. Sal. 16:8

Agradezco a mis padres Leonardo Trejo y Cristina Hernández por su tiempo invaluable, su vida y su trabajo, por haberme dado todo lo que necesité y la oportunidad de salir adelante y llegar a concluir mi carrera con su apoyo incondicional.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma mater, por darme una carrera, amigos, trabajo y por abrirme las puertas del mundo.

Agradezco mucho el apoyo y la confianza a la Dra. Itzel Becerra Absalón, por ser mi tutora en este gran trabajo, por la tolerancia, el conocimiento aportado y la experiencia.

Al Dr. Gustavo Montejano, la M. en C. Mariana Cartajena y el Dr. Javier Carmona por su gran apoyo durante mi formación en la psicología, gracias por sus conocimientos y clases durante mi carrera.

Este estudio fue posible por el apoyo económico del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT al proyecto IN228116.

## **Dedicatoria**

Esta tesis la dedico a mis padres Cristina Hernández y Leonardo Trejo, a quienes amo y nunca dudaron de mi capacidad y determinación para concluir esta etapa de mi vida.

A mi hermano Sebastian, eres mi gran motivo de vivir y estar preparado; el mundo es nuestro!

A toda mi familia, quienes siempre me han dado su cariño y apoyo, despertaron mi curiosidad, me enseñaron lo que sabían, me dieron lo que tenían y por ustedes llegué a este punto de mi vida.

A todos aquellos que el mundo ha rechazado y menospreciado, siempre venceremos el mal haciendo el bien.

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
1.- Introducción	5
1.1.- Los lagos salinos en México	5
1.2.- Las cianobacterias	8
1.2.1.- El enfoque polifásico en la taxonomía moderna de las cianobacterias	9
1.2.2.- La Familia Rivulariaceae KÜTZING EX BORNET ET FLAHAULT	11
1.2.3.- Especies de <i>Scytonematopsis</i> KISELEVA que se encontraban en la familia Rivulariaceae	12
2.- Antecedentes	13
3.- Justificación e importancia	16
4.- Hipótesis	17
5.- Objetivo general	17
5.1.- Objetivos particulares	17
6.- Área de estudio	18
7.- Materiales y método	19
7.1.- Toma de muestras y manejo de material Biológico	19
7.2.- Cultivos	20
7.3.- Observación y medición de las muestras naturales	21
7.4.- Biología molecular	22
7.4.1.- Extracción	22
7.4.2.- Amplificación de la secuencia del gen 16S de ARN ribosomal	22
7.4.3.- Clonación	23
7.4.4.- Secuenciación	24
7.4.5.- Alineamiento y Análisis filogenético	24
8.- Resultados	27

<b>Contenido</b>	<b>Pág.</b>
8.1.- Descripción de los morfotipos de cianobacterias con características de la familia Rivulariaceae encontradas en los lagos cráter	27
8.1.1.- Poblaciones de <i>Ankylothrix</i> gen. nov.	27
8.1.1.1.- <i>Ankylothrix</i> gen. nov.	28
8.1.1.2.- Morfotipo I, <i>Ankylothrix</i> sp.1	30
8.1.1.3.- Morfotipo II, <i>Ankylothrix</i> sp.2	34
8.1.2.- Poblaciones de <i>Rivularia</i>	38
8.1.2.1.- Características que presentan comunes a <i>Rivularia</i>	38
8.1.2.2.- Morfotipo III <i>Rivularia</i> sp. 1	39
8.1.2.3.- Morfotipo IV <i>Rivularia</i> sp. 2	43
8.1.3.- Poblaciones similares a <i>Scytonematopsis</i>	47
8.1.3.1.- Características similares a <i>Scytonematopsis</i>	47
8.1.3.2.- Morfotipo V <i>Scytonematopsis</i> sp. 1	47
8.2.- Análisis morfológico de las especies de cianobacterias heteropolares con heterocito encontradas en los lagos cráter	51
8.3.- Análisis moleculares	63
8.4.- Registro de las condiciones ambientales encontradas durante la colecta	68
9.- Discusión	70
10.- Conclusiones	83
Referencias	86
Apéndice I	95



## **1.- Introducción**

### **1.1.- Los lagos salinos en México**

Los lagos salinos están relacionados a la formación de cuencas endorreicas y se encuentran distribuidos en todo el país, sin embargo tienen un patrón de distribución que es inverso al de la precipitación siendo más abundantes en la parte noroeste, con características climáticas y geomorfológicas áridas y semiáridas, y decreciendo hacia el sureste, donde la precipitación y la humedad son mayores (Alcocer & Hammer, 1998). En la Faja Volcánica Transmexicana de existen varios lagos salinos en cuencas endorreicas generadas por la actividad volcánica y tectónica (Gómez, et al., 2005; Alcocer & Hammer, 1998). En esta región geológica con actividad volcánica se encuentra una zona conocida como La Cuenca Oriental y abarca un espacio entre los estados de Tlaxcala, Puebla y Veracruz (Gasca, 1982), en esta zona existen seis lagos cráter (Fuentes, 1972) y de estos, Alchichica y Atexcac son salinos (Tab. 1) (Arredondo et al., 1983).

Otra característica de los lagos cráter de Alchichica y Atexcac además de sus proporciones considerables (Tab. 2) es que de acuerdo a sus periodos de mezcla se clasifican como lagos monomícticos cálidos (Alcocer & Hammer, 1998) los cuales se mezclan en el periodo comprendido de finales de invierno a principios de primavera (tres meses) y se estratifican lo que resta del año.

**Tabla 1. Salinidad, conductividad específica, pH y temperatura media anual de los lagos cráter de Alchichica y Atexcac tomados de Kaźmierczak et al. (2011), Tavera & Komárek (1996) y Alcocer et al. (1998).**

Parámetro	Alchichica	Atexcac
Salinidad ( $\text{g l}^{-1}$ )	7.4-8.5	6.0-6.8
Conductividad específica ( $\text{mS cm}^{-1}$ )	13.35	11.7
Ph	8.88-9.5	8.2- 8.4
Temperatura media agua superficial	>18°C	>18°C

**Tabla 2. Dimensiones de los lagos cráter Alchichica y Atexcac, en el estado de Puebla, México. Datos recopilados de Arredondo et al. (1983).**

Medidas	Alchichica	Atexcac
Área Superficial ( $\text{km}^2$ )	2.3	0.29
Profundidad máxima (m)	62-64.9	39.1
Volumen total ( $\text{m}^3 \times 10^6$ )	69.9	6.1

Estos lagos cráter llamados axalapascos (del náhuatl xallapan que significa manantial en la arena) son de tipo Maars ya que se originaron por explosiones volcánicas cerca de acuíferos subterráneos que con el paso del tiempo se inundaron (Tavera & Komárek, 1996; Mancilla, et al., 2014). La región tuvo su origen en el Terciario por el plegamiento del lecho marino originado en el Cretácico y posteriormente por la actividad volcánica que inició en el Cenozoico y terminó en el Cuaternario lo cual le dio su conformación actual (Arredondo et al., 1983; Can et al., 2011). El agua de los lagos cráter de Alchichica y Atexcac presenta una concentración de cationes en el orden de  $\text{Na}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$  y de aniones  $\text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-}$  (Vilaclara et al., 1993; Can et al., 2011). Debido a la presencia de estos elementos existe la precipitación mineral en el agua y principalmente en el litoral del lago cráter de Alchichica se observan formaciones minerales llamadas estromatolitos (Tavera & Komárek, 1996) (Fig. 1) los cuales están habitados por comunidades de microorganismos entre

ellos las cianobacterias que al realizar la fotosíntesis, debido a que esta aumenta el pH promueve la precipitación mineral (Stal, 2012) y por lo tanto son los principales organismos litogénicos en esta localidad (Tavera & Komárek, 1996).

De acuerdo con Couradeau et al. (2011), los estromatolitos son estructuras laminares organosedimentarias formadas por la actividad directa o indirecta de los de microorganismos. En el registro fósil, el estromatolito más antiguo data del Arcaico temprano; estos estromatolitos antiguos encierran restos de microorganismos, los cuales se cree que estaban implicados en su formación es por ello que los estromatolitos modernos se utilizan como modelos análogos para entender la génesis y composición de los primeros estromatolitos (Kaźmierczak, et al., 2011; Gérard, et al., 2013).



**Figura 1. Vista del lago Alchichica desde la costa sureste, se observan estructuras minerales en la superficie conocidas como estromatolitos.**

## **1.2.- Las cianobacterias**

Un componente importante de la comunidad que cubre los estromatolitos (Stal, 2012) son las cianobacterias (Cyanobacteria STANIER EX CAVALIER-SMITH) las cuales son un subgrupo muy antiguo de procariontes gram-negativos, que desarrollaron un sistema fotosintético oxigénico, similar al de las algas y plantas, (Komárek, 2006; Rippka, et al., 1979; Berrendero et al. 2011). Este tipo de bacterias presentan una organización desde unicelulares a coloniales y filamentosas, además dentro de la organización filamentosa pueden o no tener células especializadas (heterocitos y acinetos principalmente) y tener ramificaciones falsas o verdaderas (Castenholz, 2001). Muchas especies filamentosas, en ausencia de nitrógeno disuelto en el agua, tienen la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en células especializadas llamadas heterocitos que cumplen con las características moleculares para realizar la transformación del nitrógeno diatómico ( $N_2$ ), que se encuentra en la atmosfera, en macromoléculas básicas para el desarrollo de la vida ( $NH_4$ ,  $NO_2$ ,  $NO_3$ ). Además, las cianobacterias cuentan con la capacidad para adaptarse a los ambientes iluminados más extremos del planeta, como desiertos, manantiales termales, lagos alcalinos y lagos salinos donde soportan grandes cantidades de radiación y desecación (Whitton & Potts, 2012; Komárek, 2006). Su medio de reproducción es asexual, por lo que su diversificación en el tiempo se atribuye a la transferencia horizontal de ácidos nucleicos y que combinada con su rapidez para adaptarse a distintos ambientes y aclimatarse han dificultado su clasificación (Komárek, 2016; Komárek et al. 2006).

### **1.2.1- El enfoque polifásico en la taxonomía moderna de las cianobacterias**

La taxonomía es la disciplina de la biología encargada de evaluar y clasificar la diversidad de todos los grupos de organismos, en sus inicios era solo un sistema jerárquico que reflejaba una posición de los organismos en relación a sus similitudes morfológicas, sin embargo en su transformación con el paso del tiempo y el uso de nuevas herramientas, también refleja las relaciones entre los grupos y sus historias de vida y los cambios que han tenido a lo largo del tiempo (Komárek, et al., 2014).

Por mucho tiempo la taxonomía de las cianobacterias se realizó bajo el Código internacional de Nomenclatura Botánica basándose principalmente en las descripciones morfológicas de las poblaciones naturales (Komárek, 2016). En el siglo XX muchos ficólogos importantes como Geitler (1925, 1932, 1942), Frémy (1929), Elenkin (1936-1949), Desikachary (1959), Prescott (1962), Starmach (1966) y Bourrelly (1970) realizaron guías ilustradas y claves taxonómicas para la identificación y clasificación de las cianobacterias bajo el código Botánico (Komárek, 2013; 2014). Posteriormente a partir de 1974 se intentó clasificar a las cianobacterias bajo el Código Internacional de Nomenclatura de Bacterias (Stanier, et al. 1974; Rippka, et al., 1979, Castenholz, 2001), el cual se basa principalmente en los análisis moleculares de ADN y las características morfológicas de cepas vivas aisladas en cultivos, siendo estas los tipos, otorgando un método que clasifica en subsecciones, familias y géneros forma y sustituye a las clásicas definiciones de órdenes, familias, géneros y especies. Es un método estable y conveniente a corto

plazo, sin embargo trajo nuevas problemáticas, como la designación de nombres o identificaciones erróneas y arbitrarias a las secuencias genéticas de las cepas aisladas debido a que los monocultivos específicos, por el tiempo prolongado de estar bajo condiciones regulares y a veces distintas a las de su medio natural, perdían características morfológicas de las poblaciones naturales y muchos trabajos perdieron valor y orientación (Komárek, 2016).

Debido a que tanto el código botánico como el código bacteriano no son compatibles varios especialistas en cianobacterias han abogado por un sistema taxonómico en donde se refleje la historia del cambio de los organismos a través del tiempo, la relación filogenética y que incluya taxones monofiléticos (Komárek, et al., 2014). Este sistema taxonómico se basa en el método de enfoque polifásico, el cual mediante la combinación de criterios derivados de diferentes áreas de conocimiento, nos lleva al reconocimiento de unidades genéticas, morfológicas y ecológicas en varios ambientes (Komárek, 2016). Utiliza la evaluación genética como base, principalmente la comparación de las secuencias del gen 16S de ARN ribosomal (16S ARNr) para la formación de árboles filogenéticos y matrices de similitud, siendo básico que reflejen grupos por lo menos con un 95% de similitud para el reconocimiento de géneros (Stackerbrandt & Goebel 1994); esta base se combina con los demás criterios de reconocimiento como: el análisis de las características morfológicas encontradas en las poblaciones naturales describiendo las características comunes de los géneros y las autoapomorfías para la generación de especies; y el análisis ecológico, como nichos ecológicos relacionados, tipos de suelo, minerales presentes, entre otros. Los criterios se eligen de acuerdo a la

naturaleza de las muestras ya que los marcadores y caracteres pueden tener diferentes significados taxonómicos (Komárek, 2016; Komárek, et al., 2014; Komárek, 2006).

### **1.2.2.- La Familia Rivulariaceae** KÜTZING EX BORNET ET FLAHAULT

De acuerdo a Komárek (2013) la familia Rivulariaceae (Orden Nostocales BORZI) se encuentra en el grupo de las cianobacterias heterocitosas, el cual es un grupo monofilético (Giovannoni, et al., 1988). Incluye los géneros *Calothrix* C. AGARDH EX BORNET ET FLAHAULT, *Dichothrix* ZANARDINI EX BORNET ET FLAHAULT, *Gardnerula* DETONI, *Gloeotrichia* C. AGARDH EX BORNET ET FLAHAULT, *Isactis* [THURET] EX BORNET ET FLAHAULT, *Rivularia* [ROTH] C. AGARDH EX BORNET ET FLAHAULT y *Sacconema* BORZI EX BORNET ET FLAHAULT. Esta familia representa un clado monofilético delimitada por secuencias de los géneros *Calothrix* y *Rivularia* (Vaccarino & Johansen, 2011; Domínguez-Escobar, et al., 2011). Esta familia se caracteriza morfológicamente por tener filamentos heteropolares con heterocitos basales, uniseriados, usualmente con la parte apical atenuada formando un pelo terminal y la ausencia de acinetos (estructuras de reproducción), salvo en unas cuantas especies de *Calothrix* y *Gloeotrichia*, siendo un caso especial ya que las secuencias obtenidas hasta el momento de estas especies se encuentran fuera del clado Rivulariaceae y se relaciona más con las secuencias de la familia Nostocaceae C. AGARDH EX KIRCHNER (Komárek, 2013; Domínguez-Escobar, et al., 2011). La familia Rivulariaceae es un gran reto para la reestructuración taxonómica a través del enfoque polifásico ya que los trabajos se han centrado en los géneros *Calothrix*, *Rivularia*, y *Gloeotrichia*, de los cuales se tienen secuenciadas y

caracterizadas varias especies pero no se tiene la secuencia de las especies tipo; además se han relacionado especies de géneros nuevos y géneros de otras familias como *Nunduva* GONZÁLEZ-RESÉNDIZ, LEÓN-TEJERA ET JOHANSEN (González Reséndiz et al., 2018), *Kyrtuthrix* ERCEGOVIĆ (León-Tejera, et al. 2017), *Microchaete* THURET EX BORNET & FLAHAULT, (Pamplona, et al., 2014), *Macrochaete* BERRENDERO, JOHANSEN ET KAŠTOVSKÝ (Berrendero, et al. 2016), *Phyllonema* ALVARENGA, RIGONATO, BRANCO, MELO ET FIORE (Oliveira-Alvarenga, et al., 2016) y por otro lado aún faltan las revisiones de los géneros *Isactis*, *Sacconema* y *Gardnerula*.

### **1.2.3.- Especies de *Scytonematopsis* KISELEVA que se encontraban en la familia Rivulariaceae**

Cabe resaltar que de acuerdo al enfoque morfológico especies que anteriormente se encontraban descritas en el género *Calothrix* fueron trasladadas al género *Scytonematopsis* con base en la presencia de características morfológicas de la familia Scytonemataceae RABENHORST EX BORNET ET FLAHAULT como talos en forma de tapetes cespitosos, filamentos con fases heteropolares cuando son jóvenes e isopolares cuando son maduros, con ramificaciones falsas simples o geminadas y con heterocitos intercalares y basales principalmente.

La problemática de delimitación del género *Scytonematopsis* se ha registrado en diferentes trabajos. Algunos ejemplos son: *Scytonematopsis crustacea* KOVÁČIT ET KOMÁREK anteriormente se encontraba descrita como *Calothrix crustacea* THURET EX BORNET ET FLAHAULT; *Scytonematopsis pilosa* UMEZAKI ET WATANABE tiene una sinonimia con *Calothrix pilosa* HARVEY (Komárek, 2013).



Otras especies con problemas en su clasificación y que están relacionadas a la morfología de *Scytonematopsis* son: *Calothrix polymorpha* LI, *Calothrix pulvinata* [MERTHENS] C. AGARDH EX BORNET ET FLAHAULT, *Calothrix vivípara* HARVEY EX SETCHELL ET GARDNER y *Calothrix dura* HARVEY Sinonimia con *Tildenia dura* (HARVEY EX BORNET ET FLAHAULT) POLJANSKIJ (Komárek, 2013).

## **2.- Antecedentes**

Se han realizado varios trabajos multidisciplinarios para la descripción geológica, y biológica de la zona de los lagos cráter de la cuenca oriental en el Estado de Puebla, México.

En cuanto a los estudios de la zona se encuentra el de Ordoñez que en 1906 describe la geología y el origen de los Axalapascos (lagos cráter) de Puebla; Fuentes (1972) en donde agrupa los lagos cráter en dos regiones naturales conocidas como Llanos de San Andrés y Llanos de San Juan. Describe clima, edafología y vegetación de la zona; Gasca en 1982 estudio la región para establecer su génesis a partir de la morfología y estratigrafía del lugar. Posteriormente Arredondo et al. (1983) realizaron estudios en la zona para determinar la batimetría y morfometría de los lagos cráter o lagos "maars" como parte de los trabajos geológicos más importantes para el estudio de la zona; Alcocer y Hammer (1998) hacen una descripción de los lagos salinos de México e incluyen los lagos de Atexcac y Alchichica; Can et al. (2011) describen la hidrología de la zona.

Falcón et al. (2002) analizaron los patrones de fijación de nitrógeno en el lago de Alchichica, estudiando las tasas de fijación de los organismos que se

encuentran en los estromatolitos (formaciones de toba) y los florecimientos de *Nodularia cf. spumigena*. Beltrán et al. (2012) analizaron y compararon las tasas de fijación de nitrógeno asociadas a los organismos que se encuentran en formaciones de tapetes y microbialitos, reportando relaciones filogenéticas con el uso de secuencias del gen *nifH*. Centeno et al. (2012) reportan la presencia de cianobacterias en los estromatolitos del lago Alchichica utilizando secuencias del gen 16S de ARNr y Alcántara-Hernández et al. (2017) reportaron la diversidad genética asociada a los ciclos de fijación del nitrógeno utilizando secuencias de varios genes, como el gen *NifH*, *amoA*, etc. en donde reportan secuencias de *Calothrix* y *Rivularia*.

El trabajo más importante para la presente tesis es el realizado por Tavera y Komárek en 1996 en el cual se describió la diversidad de cianobacterias encontradas de forma planctónica y en los estromatolitos del lago cráter Alchichica. Las especies de cianobacterias descritas en su trabajo, de acuerdo a su morfología, son dieciocho especies de las cuales tres pertenecen a la familia Rivulariaceae y son las de importancia para la presente tesis: *Calothrix* sp., *Calothrix cf. parietina* THURET EX BORNET & FLAHAULT y *Rivularia cf. haematities* C. AGARDH EX BORNET & FLAHAULT. Las demás especies descritas son: *Nodularia cf. spumigena* MERTENS EX BORNET & FLAHAULT, *Aphanocapsa* sp., *Aphanothece* sp., *Chroococcidium gelatinosum* GEITLER, *Chroococcus schizodermaticus* WEST, *Entophysalis atrata* TAVERA ET KOMÁREK, *Entophysalis* sp., *Entophysalis lithophila* TAVERA ET KOMÁREK, *Leptolyngbya* sp.1, *Leptolyngbya* sp. 2, *Trichormus* sp., *Chamaesiphon halophilus* TAVERA ET KOMÁREK, *Heteroleibleinia*

*profunda* TAVERA ET KOMÁREK, *Mantellum rubrum* TAVERA ET KOMÁREK, *Xenococcus candalariae* TAVERA ET KOMÁREK (Tavera & Komárek, 1996).

Sin embargo los autores mencionan que la identificación de las especies de cianobacterias fue difícil debido a que la mayoría de las poblaciones encontradas no coinciden con las especies descritas en la literatura tanto morfológica como ecológicamente. También mencionan que las poblaciones descritas como *Calothrix* cf. *parietina* y *Rivularia* cf. *haematities* requieren de una revisión profunda para definir su estatus taxonómico.

Otro estudio de importancia que da seguimiento a las caracterizaciones descritas anteriormente es la de Kaźmierczak et al. (2011) los cuales describen la composición química del lago y lo que denominan como microbialitos (estromatolitos), y la actividad biológica relacionada a la precipitación de los minerales. Además reportaron cianobacterias filamentosas con morfología parecida a *Calothrix* y *Rivularia* juntas en talos de diferentes tamaños cubiertas de un mucilago común y realizaron la secuenciación y filogenia de subunidades pequeñas de genes de ARN ribosomal, de muestras de cianobacterias encontradas en los microbialitos. En su árbol filogenético las secuencias generadas en su trabajo que se agruparon en clados en donde se encuentran secuencias de *Calothrix* y *Rivularia*.

Couradeau et al. (2011) realizaron un estudio ecológico para describir la estructura de la comunidad de eucariontes y procariontes, incluidas cianobacterias, en microbialitos de campo y cultivados en laboratorio. Reportaron la secuencia Alchichica\_AQ1\_1\_1\_B25 que se agrupa en el clado de

*Rivularia*. Posteriormente Gérard et al. (2013) bajo las mismas premisas analizaron la composición química de los estromatolitos y detectaron comunidades de cianobacterias entre las que se encontraban cianobacterias filamentosas con heterocitos parecidas a *Calothrix* y *Rivularia*.

### **3.- Justificación e importancia**

La clasificación de las cianobacterias está en una etapa de renovación y cambio debido al empleo del enfoque polifásico de la taxonomía moderna, principalmente a la introducción de los métodos moleculares para los análisis filogenéticos. Todas las familias y géneros de las cianobacterias están en revisión incluyendo a la familia Rivulariaceae que incluye a los géneros *Rivularia* y *Calothrix*.

En las poblaciones de cianobacterias de los lagos cráter se han identificado morfológicamente especies de *Rivularia* y *Calothrix* (Tavera y Komárek, 1996) los cuales aún no se tiene bien descrita su morfología y su caracterización molecular. En este trabajo encontramos que estas poblaciones presentan además de las características particulares de *Calothrix* y *Rivularia* otras características morfológicas que se relacionan con el género *Scytonematopsis*, por lo que se requiere aclarar su clasificación de acuerdo al enfoque polifásico.

#### **4.- Hipótesis**

En los lagos cráter de Alchichica y Atexcac existen especies de los géneros *Rivularia*, *Calothrix* y *Scytonematopsis* con ciclos de vida similares entremezclados en los mismos hábitats, que se podrán diferenciar claramente y reconocer utilizando el método polifásico de la taxonomía moderna.

#### **5.- Objetivo General**

Hacer una propuesta taxonómica a partir de análisis filogenéticos y morfológicos (enfoque polifásico) de las muestras naturales de las poblaciones de cianobacterias con características de la familia Rivulariaceae presentes en los lagos Alchichica y Atexcac.

##### **5.1.-Objetivos particulares**

- Describir y analizar morfológicamente las cianobacterias a partir de muestras naturales para que permita reconocer y delimitar a nivel de especie las poblaciones estudiadas.
  
- Realizar análisis filogenéticos de las secuencias del gen 16S de ARN ribosomal de los cultivos de las muestras naturales que permitan delimitar a nivel de género y entender las relaciones taxonómicas de las poblaciones estudiadas.
  
- Registrar las condiciones del hábitat de las poblaciones estudiadas.

## 6.-Área de estudio

El área de estudio son los lagos cráter Alchichica y Atexcac que se encuentran ubicados en la zona de los Llanos de San Juan en el estado de Puebla, México (Fig. 2) con una temperatura media anual en la zona de 12-14 °C, una precipitación anual de 425-656 mm, una evaporación anual de 500-600 mm (Arredondo, et al., 1983; Tavera & Komárek, 1996; Alcocer, et al. 1998).

Las coordenadas en donde se realizaron los muestreos del lago Atexcac son 19°19'57.8" Norte y 97° 27'15.4" Oeste con una elevación de 2366 msnm y del lago Alchichica las coordenadas donde se realizaron las colectas son 19°24'31.9" Norte y 97°23'50.5" Oeste con una elevación de 2322 msnm.



**Figura 2. Ubicación de los puntos de colecta en la zona conocida como Llanos de San Juan dentro del estado de Puebla, México.**

## **7.- Materiales y métodos**

### **7.1.- Toma de muestras y manejo de material Biológico**

El muestreo se llevó a cabo el día 8 de marzo del año 2014 y consistió en la detección de colonias de cianobacterias en las costas y estromatolitos de los lagos cráter, observando: forma de la colonia, color, consistencia y el sustrato en el cual se encontraban adheridas. Para su colecta se utilizaron frascos de plástico con capacidad de 25 y 50 mL, en campo se tomaron muestras accesibles a la capacidad de los frascos, estos se conservaron en una caja térmica con hielo para evitar la descomposición del material vivo. Posteriormente cada muestra se dividió en 3 muestras: una para conservación con formol al 4% en frasco de plástico blanco de 25 o 50 ml; la segunda como muestra viva en un frasco de 25 o 50ml conservada en hielo para su cultivo en laboratorio; y la tercera muestra en papel absorbente y perlas de sílice en bolsa hermética para una conservación a largo plazo.

Se registró el sustrato en el que se encontraban las muestras y su posición en el lago y exposición a la humedad: Fuera del nivel del agua, salpicado por el movimiento del agua, o sumergido. Y La exposición al sol: sombra, media sombra o expuesto por completo.

Las coordenadas y la elevación fueron tomadas con el receptor GPS eTrex® H GARMIN®

Durante el muestreo se realizaron mediciones de: alcalinidad, temperatura y conductividad electrolítica del agua con el equipo Portable pH/ EC/ TDS/ temperature meter HI991300 de HANNA® Instruments.

Se tomaron muestras de agua para el análisis químico, se filtró el agua y se depositó en envases de 500 ml de PET, se conservó en frío.

Se llevó a cabo la medición de la concentración en el agua de fosfatos, sulfatos, nitratos, nitritos, amonio y nitrógeno inorgánico disuelto con el equipo Espectrofotómetro UV-Visible Hach® DR 3900 en el laboratorio de Ecosistemas de Rivera de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

## **7.2.- Cultivos**

Los cultivos, observaciones y técnicas moleculares se llevaron a cabo en el laboratorio de Ficología de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

La siembra de cultivos se realizó a la llegada de la recolección en campo para evitar la descomposición del material vivo. Se observaron las muestras tanto en microscopio estereoscópico Olympus SZX7 como en microscopio con contraste diferencial Olympus BX51 con cámara digital Olympus DP-12 para identificar y separar las colonias y filamentos que se observaron con las características de la familia Rivulariaceae (Komárek, 2013).

Las muestras que presentaron filamentos con las características de la familia Rivulariaceae fueron: Ax#12, Ax#17, Ax#19, Ax#22, Ax#23, Ach#24,



Ach#25, Ach#26, de las cuales la clave Ax corresponde a Atexcac y la clave Ach corresponde a Alchichica, con números consecutivos.

Los manejos de las muestras vivas se realizaron en una cámara de flujo laminar; la siembra se realizó en medio de cultivo sólido BG11<sub>0</sub> (Allen, 1968) en caja Petri de 55mm por 15mm sembrando por el método de estriado en placa y se incubaron en una cámara de ambiente controlado Sanyo® MLR-350 a una temperatura de 20 °C y con periodos de luz de 12 horas x 12 horas de oscuridad y con una intensidad luminosa de 37.3 mmol/cm<sup>2</sup>/s.

### **7.3.- Observación y medición de las muestras naturales**

La observación las muestras naturales vivas y fijas en formol al 4% se realizó con un microscopio con contraste diferencial de la marca Olympus® modelo BX51. Se tomaron en cuenta las muestras en donde se presentaban filamentos con las características de la familia Rivulariaceae, la comparación e identificación morfológica de los géneros o especies se basó en la guía taxonómica de cianobacterias heterocitosas de Komárek (2013). Al observar los filamentos más característicos se tomaron fotografías con la cámara digital Olympus® DP-12. Posteriormente a partir de las fotografías tomadas en el microscopio se midieron varios parámetros con apoyo del software computacional SigmaScan Pro 5.0 de SPSS Inc. Para cada muestra las repeticiones de cada medición fueron mínimo de treinta veces para cada parámetro y se obtuvieron los mínimos y máximos de cada uno.

Los parámetros que se midieron fueron: Largo del filamento; en la parte más ancha: ancho del filamento, ancho del tricoma: largo de las células vegetativas; ancho y largo de los heterocitos.

Se observaron y se describieron: Forma y color del talo; forma y color del filamento, forma y color de la vaina; forma de las células vegetativas; forma y distribución del heterocito. Presencia y descripción de estructuras de reproducción y resistencia (contorsiones, necridios y hormogonios), presencia y tipo de ramificaciones, forma de los ápices.

#### **7.4.- Biología molecular**

##### **7.4.1.- Extracción**

De los cultivos monoclonales aislados de muestras naturales se realizó la extracción de ácidos nucleicos combinando varios procedimientos: La muestra se sometió a 5 ciclos de congelamiento con nitrógeno líquido y calentamiento en baño maría seco (AccuBlock de Labnet®) a 65°C y ruptura mecánica de las células con el uso de un pistilo de plástico como se describe en Palinska et al. (2006), posteriormente se usó el kit de extracción Ultraclean Microbial DNA isolation kit de MOBIO Lab. Inc. siguiendo su protocolo para finalizar la extracción.

##### **7.4.2.- Amplificación de la secuencia del gen 16S de ARN ribosomal**

Para la amplificación de la secuencia del gen 16S de ARN ribosomal (16S ARNr) se utilizó el kit para la Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final (PCR por sus siglas en inglés) *TaKaRa® Taq* de TaKaRa-Bio Inc., con los

siguientes reactivos: PCR Buffer 10X (Mg<sup>2+</sup>+plus), la mezcla de DNTP's (10mM) y la polimerasa *Taq* (con 2.5U) para someter a PCR utilizando los oligonucleótidos 27F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') con 10mM (Weisburg et al., 1991) y 23Sr (5'- GGGTTBCCCCATTCRG-3') con 10mM (Fisher et. al 1999; Kent et al, 2004).

Los ciclos térmicos usados para la reacción en cadena de la polimerasa son los siguientes: desnaturalización a 94°C por 7 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 s.; alineamiento a 63°C por 1 min. Y extensión a 72°C por 1 min; y por último un paso de extensión a 72°C por 7 min.

Posteriormente se realizó una purificación de la PCR realizando una electroforesis en gel de Agarosa al 0.1% con Red gel para revelar y una vez que se obtuvieron las bandas deseadas en el gel se cortaron y se purificaron con el kit de purificación Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System de Promega® siguiendo el protocolo del kit.

#### **7.4.3.- Clonación**

Con el producto de la PCR purificado se realizó la clonación utilizando el kit de ligación pGEM-T® Easy Vector System de Promega® siguiendo para la reacción con los siguientes reactivos por muestra: Rapid Ligation Buffer 2X, pGEM-T Easy Vector 25ng y T4 DNA Ligase 3U y 3.5µL de producto de PCR; posteriormente se realizó la transformación utilizando la cepa competente de *E. coli DH5a* poniendo 100µL de la sepa en cada tubo de ligación y se incubaron durante 1 hora en hielo, posteriormente se agregaron 400µL de medio modificado LB líquido (Bertani, 1951) y se incubaron 1 hora a 37°C con

un movimiento circular a 150rpm en el equipo benchtop shaking incubator de LABNET INC. Las cepas transformadas se agregaron a una placa de medio modificado LB solido con Ampicilina (0.1 mg/mL) y Xgal (0.04 mg/mL) respectivamente y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Las colonias transformadas que se obtuvieron se revisaron por medio de la técnica de PCR punto final y posteriormente a través de electroforesis en gel de agarosa al 0.1% para verificar la presencia del inserto.

#### **7.4.4.- Secuenciación**

Las células competentes transformadas se cultivaron en medio modificado LB líquido con Ampicilina (0.1 mg/mL) a 37°C con un movimiento de 150 rpm durante 24 horas. Posteriormente se realizó la extracción y purificación de los plásmidos con ayuda del kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System de Promega®.

Los plásmidos obtenidos se enviaron a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM con los siguientes primers: T7, SP6, 684F para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con apoyo en los programas computacionales PhyDE-1 Phylogenetic Data Editor versión 0.9971 (Müller et. Al., 2010) y BioEdit V. 7.2.6.1 (Hall, 2005).

#### **7.4.5.- Alineamiento y Análisis filogenético**

En el análisis del gen 16S ARNr se usaron seis secuencias obtenidas en este trabajo, de las cuales 5 pertenecen a las muestras obtenidas del lago Atexcac y una pertenece a las muestras del lago Alchichica (Tab. 6), estas se

introdujeron a un análisis BLAST en el GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para obtener las secuencias más relacionadas. De cada secuencia se seleccionaron las secuencias de 95 a 100% de similitud y se seleccionaron otras secuencias de las familias más representativas de cianobacterias heterocitasas, (Tab. 3) y se utilizó a *Chroococidiopsis thermalis* GEITLER y *Chroococidiopsis cubana* KOMÁREK ET HINDÁK como grupo externo funcional obteniendo una matriz de 151 OTUs (Apéndice I).

A partir de la matriz de 151 OTUs las secuencias se alinearon a ojo a través del programa PhyDE-1 v0.9971 (Müller et. Al., 2010) siguiendo las siguientes reglas:

- 1) Inicios y finales de las secuencias que no fueran coherentes con la alineación se eliminaron de la matriz.
- 2) Se alinearon buscando la menor cantidad de eventos potenciales.
- 3) Los gaps generados se anidaron teniendo un mismo principio y fin.
- 4) Se prefirió introducir menos gaps, esto implicó generar más sitios variables.

Una vez que se alinearon las secuencias se guardaron en un archivo FASTA y se introdujeron en el programa MEGA V.7.0.26 (Kumar, et. Al., 2016) para la generación de los árboles filogenéticos, se realizaron análisis de Máxima verosimilitud (Maximum Likelihood =ML), unión de vecinos (Neighbor joining = NJ) y máxima parsimonia (Maximum parsimony = MP); para realizar el análisis ML se buscó el mejor modelo que fue el de Kimura con 2 parámetros (Kimura, 1980), con una distribución gamma discreta para modelar las tasas de velocidad evolutivas entre los sitios y sitios invariantes (G+I). En los tres

análisis se obtuvieron los soportes de bootstrap con 1000 repeticiones de bootstrap. La edición del árbol se realizó en el programa de diseño CorelDraw X8.

Posteriormente en el programa MEGA V.7.0.26 se realizó un análisis de similitud conducido por el modelo de Kimura de 2 parámetros, la tasa de variación entre los sitios fue modelado con una distribución Gamma (con parámetro de forma =1) entre las secuencias más cercanas y las secuencias obtenidas en este estudio, que en total fueron 35 secuencias del gen 16S de ARNr. Una vez obtenida la matriz se transformaron los datos en porcentaje.

**Tabla 3 Familias más representativas de cianobacterias heterocitasas, género y OTUs utilizados en los análisis filogenéticos.**

<b>Familias</b>	<b>Géneros</b>	<b>OTUs</b>
<b>Scytonemataceae</b>	<i>Brasilonema</i> <i>Petalonema</i> <i>Scytonema</i> <i>Scytonematopsis</i>	17
<b>Microchaetaceae</b> LEMMERMANN	<i>Microchaete</i>	2
<b>Nostocaceae</b>	<i>Cyanomargarita</i> <i>Desmonostoc</i> <i>Dolichospermum</i> <i>Gloeotrichia</i> <i>Nodularia</i> <i>Nostoc</i> <i>Sphaerospermopsis</i>	21
<b>Rivulariaceae</b>	<i>Calothrix</i> <i>Kyrtuthrix</i> <i>Macrochaete</i> <i>Nunduva</i> <i>Phyllonema</i> <i>Rivularia</i>	87
<b>Hapalosiphonaceae</b> ELENKIN	<i>Fischerella</i> <i>Hapalosiphon</i> <i>Mastigocladus</i>	8
<b>Stigonemataceae</b> BORZI	<i>Stigonema</i>	3
<b>Tolypothricaceae</b> HAUER, MAREŠ, BOHUNICKÁ, JOHANSEN ET BERRENDERO	<i>Coleodesmium</i> <i>Hassallia</i> <i>Rexia</i>	3
<b>Godleyaceae</b> HAUER, MAREŠ, BOHUNICKÁ, JOHANSEN ET BERRENDERO	<i>Godleya</i>	2

## 8.- Resultados

### 8.1.- Descripción de los morfotipos de cianobacterias con características de la familia Rivulariaceae encontradas en los lagos cráter

En las localidades de Alchichica y Atexcac se encontraron ocho poblaciones de cianobacterias, siete que pertenecen a la familia Rivulariaceae y una que pertenece a la familia Scytonemataceae de acuerdo a la morfología que presentan en su hábitat natural (Tab. 4). La revisión en la literatura de la morfología de las especies de *Calothrix*, *Rivularia*, y *Scytonematopsis* (Tabs. 5, 6 y 7) y apoyados en los resultados de los análisis filogenéticos de las secuencias obtenidas nos permitió reconocer y caracterizar un género nuevo y 5 morfotipos numerados en el siguiente orden: I, II, III, IV y V de cianobacterias filamentosas con heterocito que a continuación se describen.

**Tabla 4. Identificación de morfotipos en el análisis morfológico de las muestras naturales.**

MUESTRA NATURAL	MORFOTIPO
Ax#12	Morfotipo I <i>Ankylothrix</i> sp.1
Ax#17	Morfotipo II <i>Ankylothrix</i> sp.2
Ax#19	Morfotipo II <i>Ankylothrix</i> sp.2
Ax#22	Morfotipo V <i>Scytonematopsis</i> sp.1
Ax#23	Morfotipo III <i>Rivularia</i> sp.1
Ach#24	Morfotipo IV <i>Rivularia</i> sp. 2
Ach#25	Morfotipo III <i>Rivularia</i> sp.1
Ach#26	Morfotipo IV <i>Rivularia</i> sp. 2

#### 8.1.1.- Poblaciones de *Ankylothrix* gen. nov.

#### Figuras 3, 4, 5 y 6.

Las secuencias extraídas de los cultivos de las poblaciones morfotipos I y II de acuerdo a los análisis filogenéticos basados en la secuencia del gen 16S de

ARNr se posicionaron en un clado conocido como *Calothrix* salobres y marinos. Se comparó su morfología con las características de las especies del género *Calothrix* (Tab. 5) principalmente con la especie tipo *C. confervicola* y con *C. parietina* de ambientes tropicales. Como resultado son similares en: la organización de los filamentos en colonias esponjosas de color verde oscuro, vainas firmes no lameladas (*C. confervicola*) y estratificadas (*C. parietina*), y hialinas a amarillentas o marrón; el ancho del filamento y el ancho del tricoma es similar al de *C. parietina*; las células más anchas que largas y ramificación falsa común. Además se compararon con las características de las especies *C. castelli*, por su similitud en la forma de las colonias esponjosas y parecidas a un cojín y filamentos densamente aglomerados y enroscados en la base; con *C. elsteri* por tener los filamentos arreglados en racimos y *C. scopulorum* por tener los filamentos arreglados en forma de arbusto (como tipo II).

Sin embargo las características morfológicas de los morfotipos I y II no coincidieron con alguna de las especies antes mencionadas, además apoyados por los análisis filogenéticos se tiene la evidencia de que el clado *Calothrix* salobres y marinas que incluye las secuencias de los morfotipos I y II se trata de un nuevo género genética y morfológicamente distinto a *Calothrix* el cual proponemos a continuación.

#### **8.1.1.1.- *Ankylothrix* gen. nov.**

**Talo** en forma de tapete, acojinado, sin mucilago, de color verde oscuro a negruzco, adherido al sustrato rocoso, compuesto de filamentos densamente agrupados en paralelo, erectos, formando estratos, en la parte basal del talo



más largos, a veces enroscados y enredados y en la parte superior más cortos.

**Filamentos** erectos, más o menos largos en la base a cortos en los extremos del talo, densamente agrupados en paralelo, a veces formando racimos.

**Vainas** delgadas a gruesas, flexibles, ligeramente estratificadas, a veces con estrías transversales, hialinas a amarillentas-marrón con las puntas abiertas ligeramente en forma de embudo dejando salir el ápice atenuado. **Tricomas**

principalmente heteropolares y con fases largas isopolares, cilíndricos, que presentan una atenuación gradual a lo largo del tricoma hasta formar un pelo hialino, con las paredes celulares constreñidas a ligeramente constreñidas.

**Células vegetativas** generalmente más anchas que largas y en ocasiones isodiamétricas o ligeramente más largas que anchas en el extremo atenuado, verde-azules a verde olivo.

**Heterocitos** basales cónicos en filamentos jóvenes, hemisféricos en filamentos maduros, y heterocitos intercalares muy comunes en filamentos maduros, isodiamétricos a más largos que anchos.

Ramificaciones falsas sencillas y geminadas, originadas principalmente por contorsión y rompimiento del tricoma en las zonas meristemáticas (ubicadas entre la base y el heterocito intercalar principalmente).

**Reproducción** por fragmentación de los tricomas, principalmente hormogonios.

Especie Tipo: Morfotipo I, *Ankylothrix* sp.1

Ocurrencia: Sobre rocas sumergidas o humedecidas por aguas del lago salobre de Atexcac, en el estado de Puebla, México.

Etimología: *Ankýlos* (Gr., masculino) Torcido; *Thríx* (Gr., masculino) Cabello. *Ankylothrix* cabello torcido, hace referencia a las contorciones que se presentan en algunos filamentos maduros y de la cual surgen ramas falsas y hormogonios.

#### **8.1.1.2.- Morfotipo I, *Ankylothrix* sp. 1:**

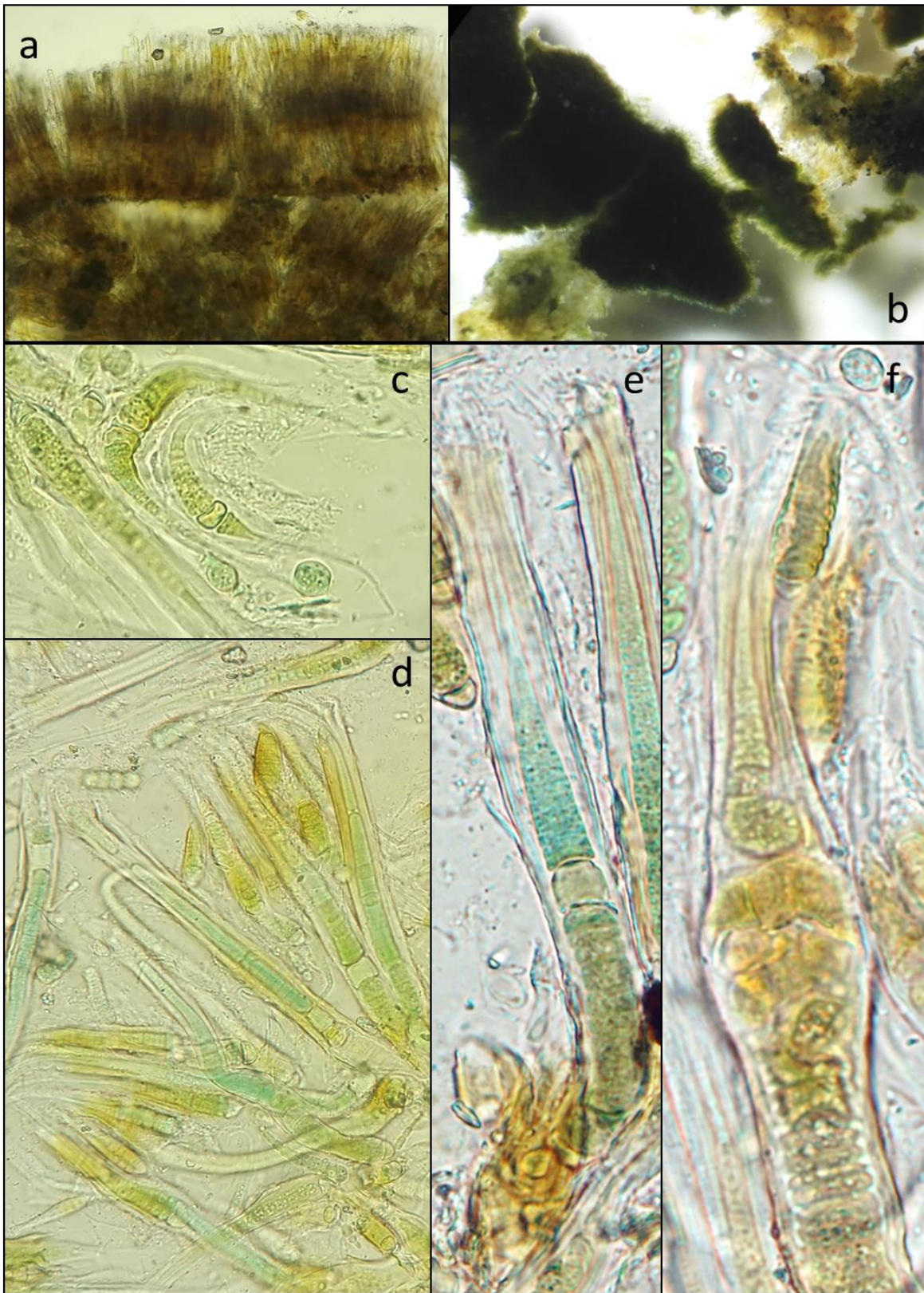
##### **Figuras 3 y 4.**

Talo cespitoso sin mucilago común, color verde oscuro a negro. Filamentos erectos, paralelos, en la base más largos, en la superficie más cortos, formando una estratificación vertical en 2 niveles (Fig. 3 a y b). Filamentos con vainas gruesas, flexibles, estriadas transversalmente, lisas en la superficie y abiertas en la punta ligeramente en forma de embudo, incoloras, amarillentas a marrón (Fig. 3 c), miden hasta 160µm de largo y en la parte más ancha del filamento de 10.4 a 19.1 µm. Tricomas heteropolares, rara vez isopolares (Fig. 3 c), uniseriados con células vegetativas más anchas que largas cerca de la base, con las paredes constreñidas, después se atenúan, siendo isodiamétricas y con las paredes poco constreñidas a no constreñidas hacia el extremo formando cabello, en la parte más ancha miden 4.7 a 9.6 µm y 1.4 a 5.9 µm de largo. Heterocitos basales cónicos, en filamentos jóvenes, hemisféricos, en filamentos maduros; e intercalares muy comunes, más largos que anchos, redondeados, miden 6.5 a 9.9 µm de ancho y 4.8 a 13.9 µm de largo. Se

observan tricomas contorsionados dentro de la vaina (Fig. 3 f). Presencia de ramas falsas simples tipo *Dichothrix*. Presencia de hormogonios adheridos a la vaina de los filamentos.

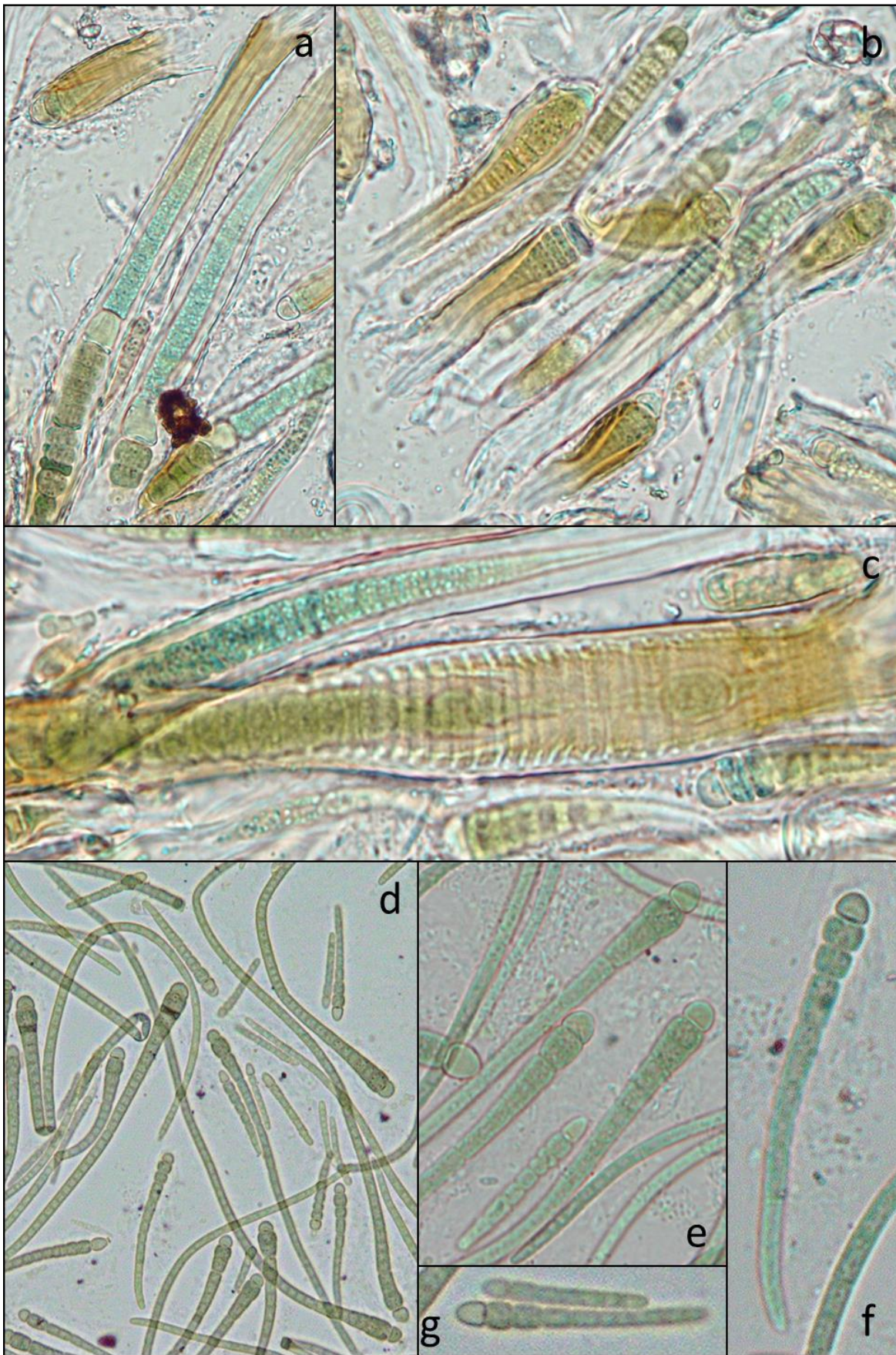
Estas características observadas en la muestra Ax#12.

En cultivo UNAM\_775\_Atexcac los filamentos se desarrollaron de manera libre, heteropolares, sin vaina, en la parte más ancha miden de 7.8 a 10.7  $\mu\text{m}$ . Presentan un heterocito basal en forma ovalada; células vegetativas más anchas que largas y con forma isodiamétrica acercándose al ápice, teniendo un largo de 2.2 a 3.9  $\mu\text{m}$ ; se atenúan hacia el ápice sin formar cabello; ligeras constricciones en la pared (Fig. 4 d-g).



**Figura 3. Muestra natural Ax#12: talo forma cespitosa (a y b); división de heterocitos formando un filamento casi isopolar (c); filamentos heteropolares con heterocito intercalar isodiamétrico y filamentos con un heterocito basal hemisférico (d y e); contorsión del tricoma dentro de la vaina (f).**





**Figura 4. Muestra natural Ax#12 a, b y c; cultivo UNAM\_775\_Atexcac d, e, f y g; filamentos maduros con heterocitos intercalares (a); filamentos jóvenes heteropolares con heterocito basal (b); vainas engrosadas y con estrías transversales (c); filamentos heteropolares dispersos en medio, sin vaina con heterocito basal ovalado (d, e y f) heterocitos basales cónicos (e y g).**

### 8.1.1.3.- Morfotipo II, *Ankyllothrix* sp. 2:

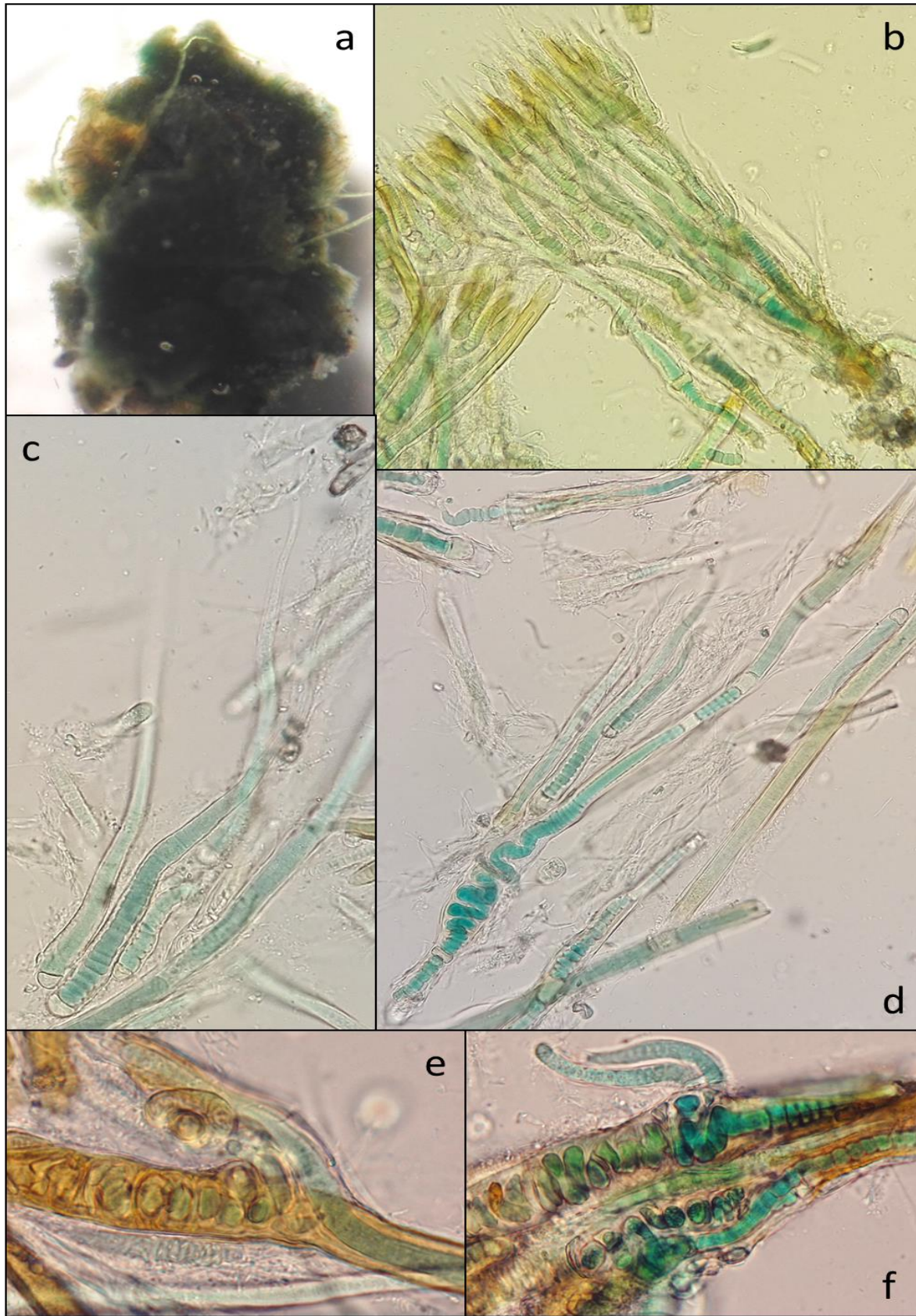
#### Figuras 5 y 6.

Talo en forma de tapete grueso, compuesto de filamentos en racimos, color verde oscuro, con filamentos erectos adheridos de la base al sustrato rocoso (Fig. 5 a). Filamentos agrupados en racimos, unidos en la base, con filamentos largos, enroscados y enredados en la base y filamentos más cortos y erectos en las puntas; (Fig. 5 b). Filamentos con vaina delgada a gruesa, flexible, ligeramente estratificada, lisa en la superficie, se abre en las puntas, en ocasiones hialina a amarillenta o marrón (Fig. 5 c y d), miden hasta 420  $\mu\text{m}$  de largo y en la parte más ancha miden de 9.2 a 18.9  $\mu\text{m}$  Tricomas heteropolares, y algunas fases isopolares en filamentos largos, uniseriados, con células vegetativas más anchas que largas cerca de la base (Fig. 6 a y c), con las paredes constreñidas, después isodiamétricas, con las paredes ligeramente o no constreñidas, se atenúan gradualmente hacia el extremo y forman un pelo hialino y corto; en la parte más ancha miden de 4 a 11.5  $\mu\text{m}$  y un largo de 2 a 5.5  $\mu\text{m}$ . Los heterocitos basales con forma cónica o hemisférica, y comúnmente intercalares con forma hemisférica a isodiamétrica o más largo que ancho que va de 6.9 a 13.8  $\mu\text{m}$  y un largo de 4.7 a 15.8  $\mu\text{m}$ . Se observan ramificaciones falsas geminadas tipo *Scytonema* (Fig. 5 e y f). Se observan tricomas contorsionados dentro de la vaina y ruptura mecánica de este (Fig. 6 e y f). Hormogonios heteropolares con forma de *Calothrix* (Fig. 6 b) más cortos que los filamentos maduros.

Características observadas en las muestras Ax#17 y Ax#19.

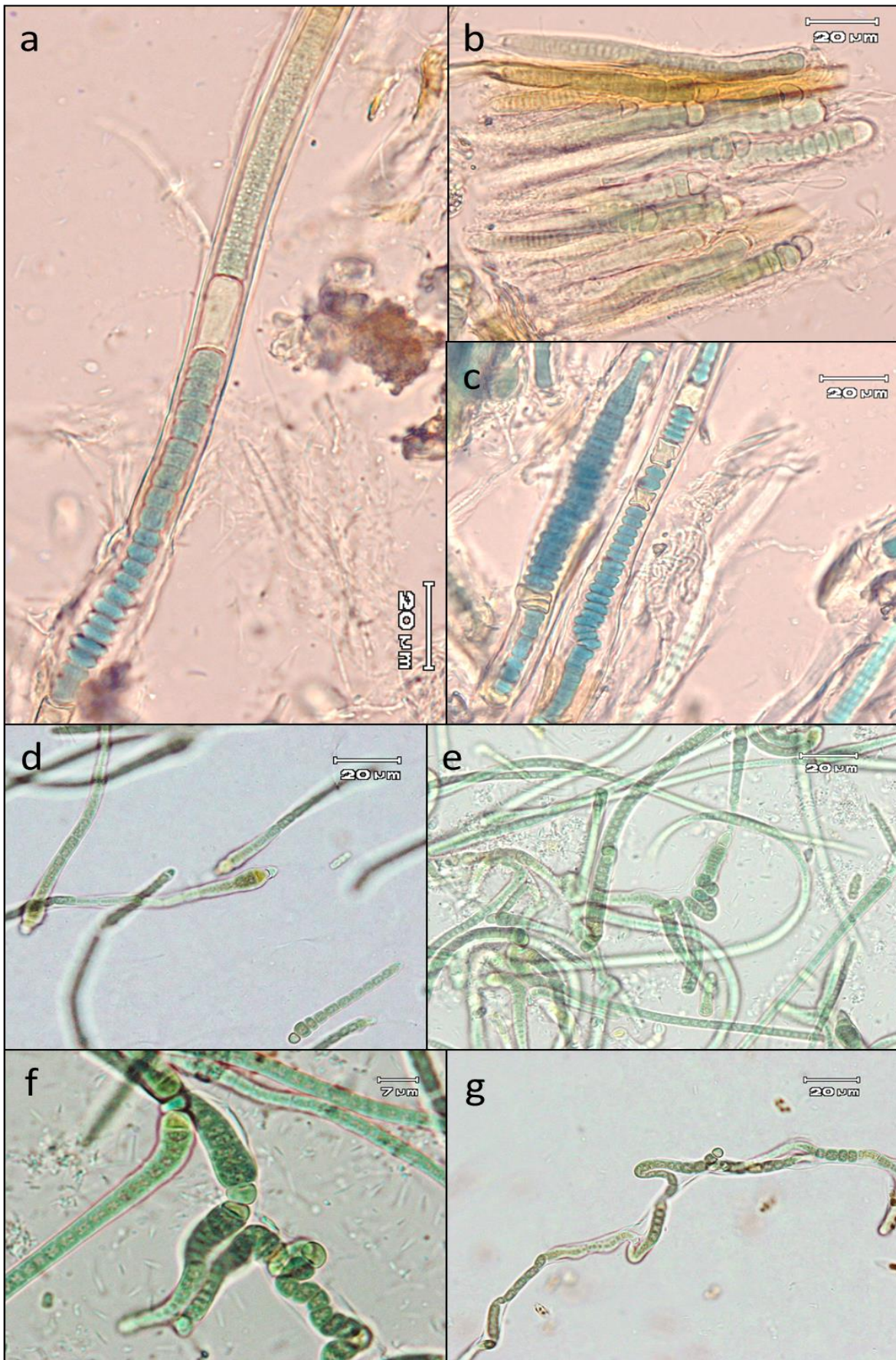
En los cultivos UNAM CR1 Atexcac (derivado de Ax#17) y UNAM CR2 Atexcac (derivado de Ax#19) filamentos segregados en el medio en forma de red; cubiertos de vaina delgada y hialina; en la parte más ancha miden de 5.4 a 12.6  $\mu\text{m}$ . Tricomas uniseriados, con células vegetativas más anchas que largas a forma isodiamétrica, con paredes constreñidas, en la parte más ancha miden de 4 a 8  $\mu\text{m}$  y el largo de 2 a 4.9  $\mu\text{m}$ . Con heterocito basal e intercalar. Ramas falsas geminadas formadas por rompimiento del filamento por contorsión. Presencia de hormogonios más cortos que los filamentos maduros con heterocitos basales (Fig. 6 c-f).





**Figura 5. Muestras naturales Ax#17 y Ax#19; talo grueso en forma de tapete grueso (a); filamentos formando racimos (b); filamentos basales más largos y curvados y con heterocitos intercalares comunes (c y d); contorsiones del tricoma y ramas falsas (e y f).**





**Figura 6.** Muestras naturales Ax#17 y Ax# 19 a, b y c; Cultivos UNAM\_CR1\_Atexcac y UNAM\_CR2\_Atexcac d, e, f, y g; filamentos maduros con heterocitos intercalares (a y c); filamentos jóvenes heteropolares con heterocito basal hemisférico (b); filamentos formando una red en el medio con vaina hialina y delgada (d y e) ramas falsas y rompimiento a partir de heterocito (f y g).

### **8.1.2.- Poblaciones de *Rivularia***

**Figuras 7, 8, 9 y 10.**

#### **8.1.2.1.- Características que presentan comunes a *Rivularia***

Los morfotipos III y IV fueron definidos por su posición en la filogenia como poblaciones de especies del género *Rivularia*, y se compararon con las características morfológicas de la especie tipo *Rivularia dura* y de acuerdo a Tavera y Komárek (1996) con *R. haematites* (Tab. 6). Las características que presentan *R. dura* y *R. haematites* relacionadas a nuestras poblaciones son, la formación de un talo con un mucilago común y hemisférico, la posición de los filamentos de manera radial, la presencia de partículas calcareas en el mucilago, la atenuación del tricoma y la formación de pelo y las células cercanas a la base con mayor constricción en la pared celular. También se compararon con *R. litorea* con las similitud de la presencia de heterocitos intercalares. Y en la comparación con *R. lapidosa* por la formación de colonias esféricas incrustadas de  $\text{CaCO}_3$ , células más anchas que largas cerca de las bases y la ramificación falsa de los filamentos (Komárek, 2013). Finalmente se comparó con la morfología de *R. atra*, debido a la relación de las secuencias con secuencias descritas como esta especie coincidiendo en la forma del talo, radial y con filamentos densamente arreglados (parecido al morfotipo III) vainas hialinas a amarillentas oscuras, estratificadas.

### 8.1.2.2.- Morfotipo III *Rivularia* sp. 1

#### Figuras 7 y 8.

Talo radial, hemisferico, mucilaginoso, incrustado de  $\text{CaCO}_3$ , incoloro a amarillento o marrón, los filamentos unidos de la base al sustrato rocoso (Fig. 7 a-d). Filamentos cortos, más anchos en la parte central, arreglados radialmente, erectos y densamente unidos en paralelo. Filamentos con vainas gruesas, estratificadas, lameladas, deshilachadas y abiertas en forma de embudo en la punta, hialinas a amarillentas y marron (Fig. 7 e, f y h); miden hasta  $170\mu\text{m}$  de largo y en la parte más ancha de  $9.9$  a  $18.8\ \mu\text{m}$ . Tricomas heteropolares y algunas veces isopolares, uniseriados, células vegetativas cerca de la base a veces ligeramente isodiamétricas y cerca de los heterocitos intercalares más anchas que largas con paredes constreñidas, después  $\pm$  isodiamétricas con paredes lisas no constreñidas, se atenuan al extremo formando un cabello que sobresale de la vaina; en la parte más ancha miden de  $5.4$  a  $11.1\ \mu\text{m}$  y un largo de  $1.9$  a  $4.6\ \mu\text{m}$ . Heterocitos basales elipsoidales o alargados en forma de barril; también se observaron intercalares isodiamétricos a rectangulares, con un ancho de  $6.0$  a  $11.6\ \mu\text{m}$  y un largo de  $4.1$  a  $10.8\ \mu\text{m}$ . Se observan contorsiones en los tricomas dentro de la vaina (Fig. 7 g). Formación de ramas falsas simples tipo *Dichothrix* (Fig. 7 i) hormogonios con forma heteropolar y un heterocito basal parecido a un filamento de *Calothrix* (Fig. 8 a y b).

Características observadas en las muestras Ax #23 y Ax#25.

En cultivos UNAM\_CR3\_Atexcac filamentos dispersos, postrados, color verde azul; presentan vaina delgada y hialina; en la parte más ancha miden de 8.9 a 12.6  $\mu\text{m}$ . Tricomas heteropolares con células vegetativas más anchas que largas a isodiamétricas, en la parte más ancha miden de 6.9 a 11  $\mu\text{m}$  y un largo de 3 a 5  $\mu\text{m}$ . Los tricomas se alargan y forman hormogonios arreglados en forma de trenza (Fig. 8 c-h).



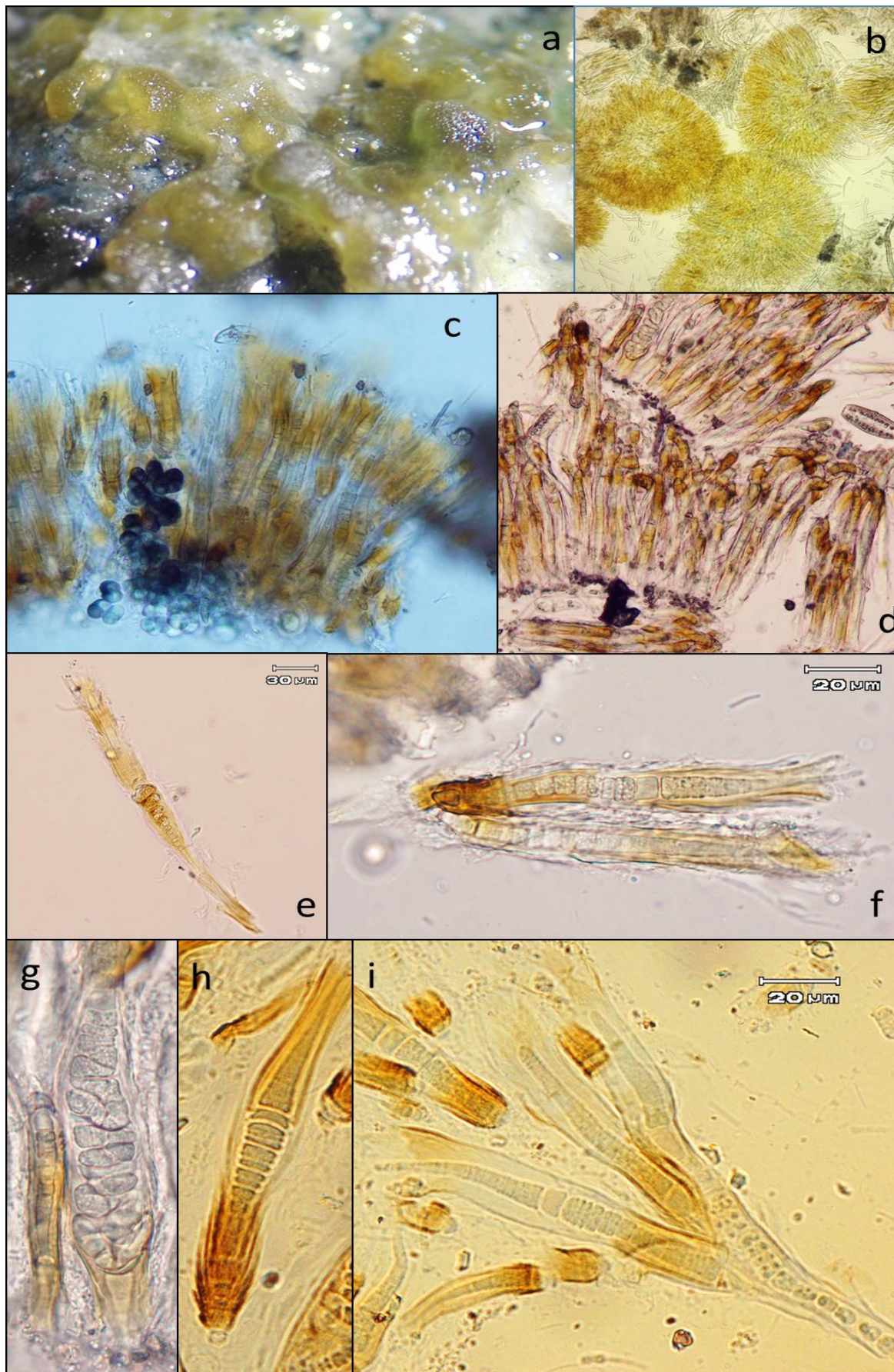


Figura 7. Muestras naturales Ax#23 y Ax#25; talo circular con un mucilago común (a y b); filamentos erectos y paralelos (c y d); filamentos con vainas gruesas, estratificadas y lameladas, abiertas en forma de embudo (e, f, h); contorsiones del tricoma dentro de la vaina (g); ramificaciones falsas (i).



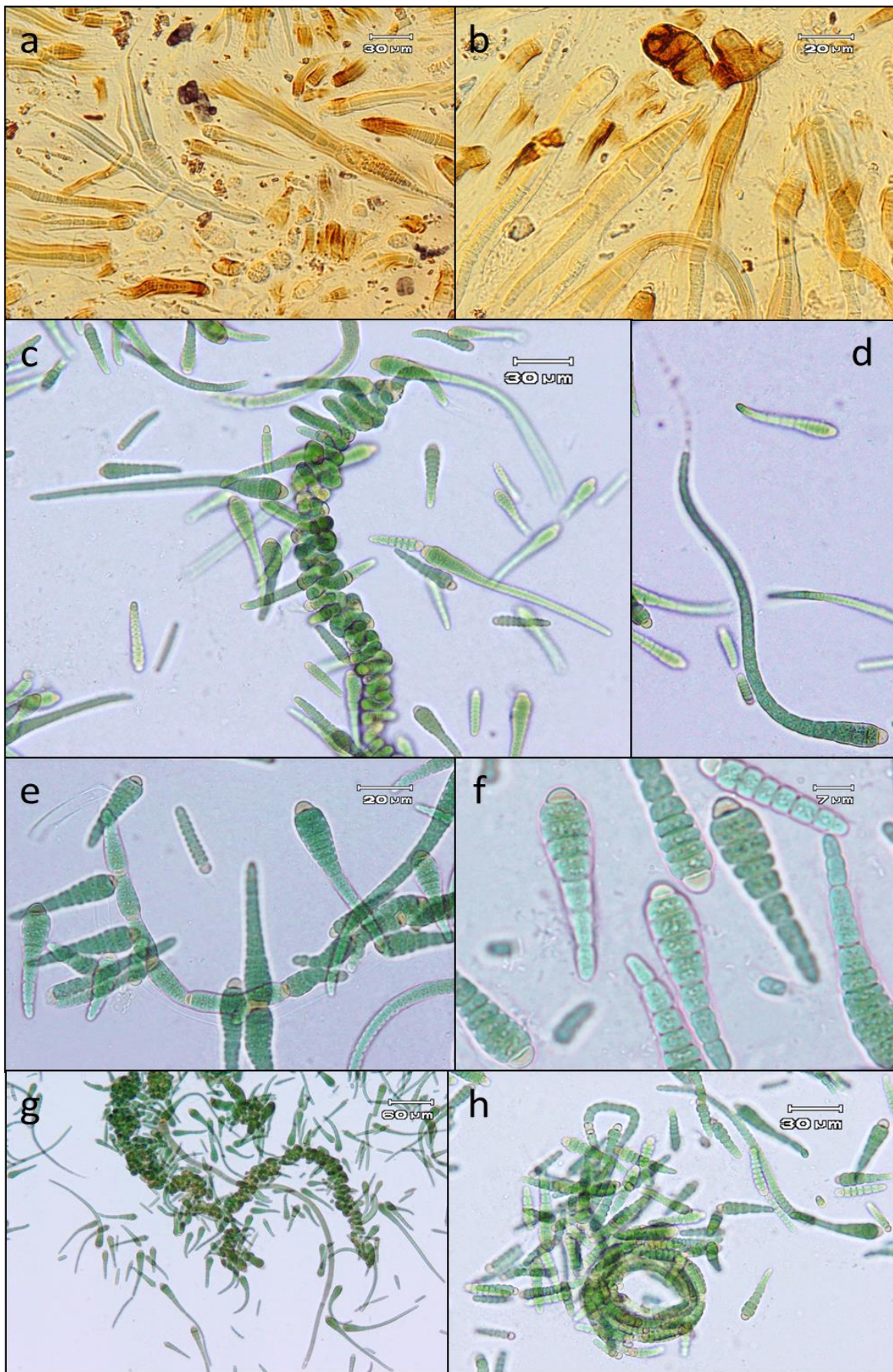


Figura 8. Muestras naturales Ax#23 y Ax# 25 a y b; cultivo UNAM\_CR3\_Atexcac c-h; filamentos más anchos en la parte central, con vainas gruesas y ramas falsas (a y b); tricomas unidos en forma de trenza (c, e, g y h) filamentos con células más anchas que largas en la base y luego isopolares atenuándose hacia el ápice (d y f).

### 8.1.2.3.- Morfotipo IV *Rivularia* sp. 2

#### Figuras 9 y 10.

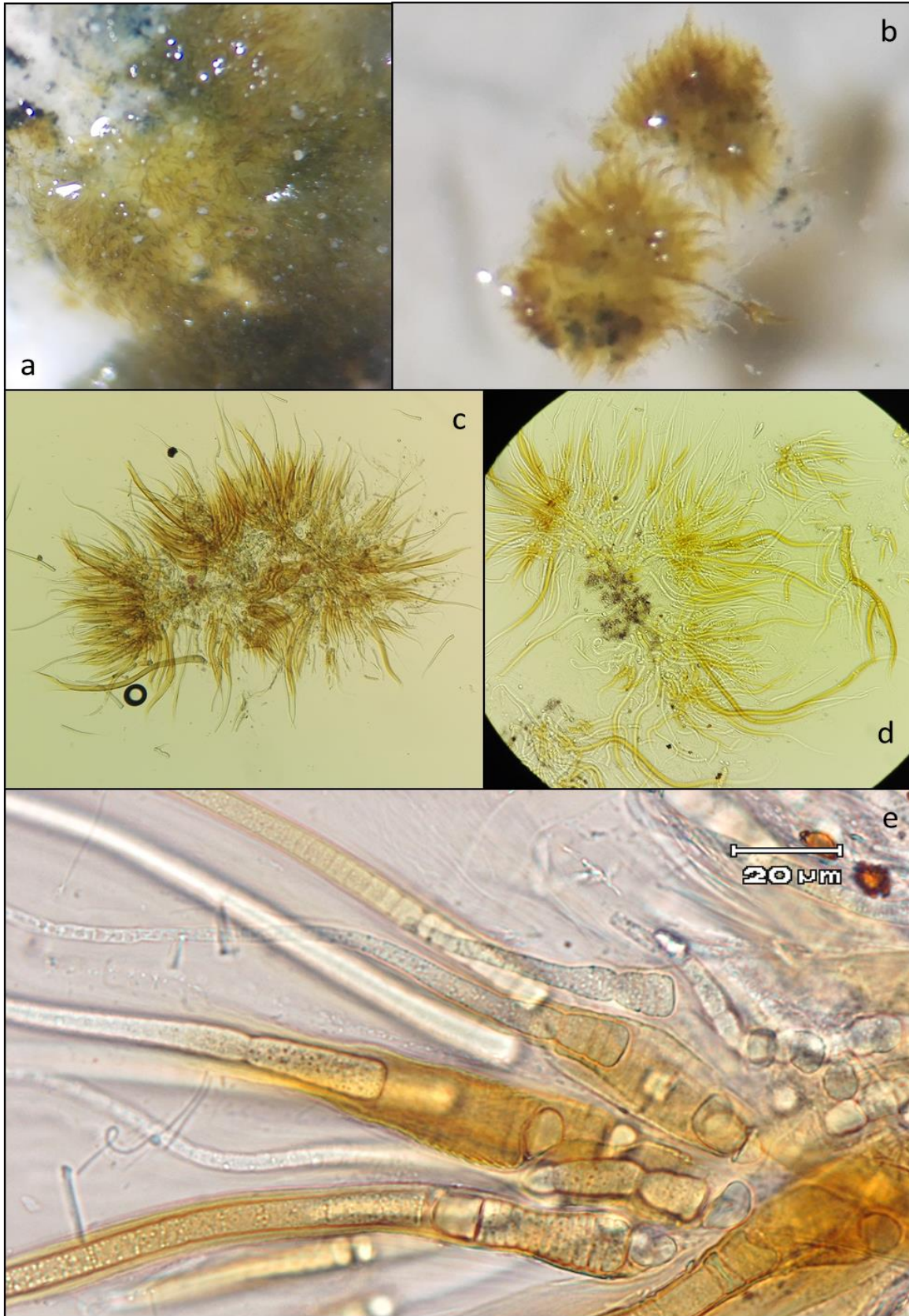
Talo radial, forma de penacho, mucilaginoso, incrustado de  $\text{CaCO}_3$ , incolora a amarillenta o marrón (Fig. 9 a-d). Filamentos arreglados radialmente, dispersos en un mucilago común, unidos al sustrato calcáreo.; Filamentos con vaina gruesa, estratificada, lisa en la superficie, con estrías transversales como marcas de crecimiento, se abre ligeramente en la punta, de color amarillento a marrón (Fig. 10 c) miden hasta  $478\mu\text{m}$  de largo y la parte más ancha miden de  $8.4$  a  $16.4\ \mu\text{m}$ . Tricomas maduros, uniseriados, heteropolares, con células vegetativas muy cortas cerca de la base, con la pared constreñida, después casi isodiamétricas, con paredes no constreñidas; en la parte más ancha del tricoma miden de  $4.5$  a  $9.9\ \mu\text{m}$  y un largo de  $2.0$  a  $5.7\ \mu\text{m}$ . Heterocitos basales elipsoidales, forma de barril a isodiamétrico, a veces 2 en fila y muy común heterocitos intercalares con forma isodiamétrica, con un ancho de  $6.3$  a  $10.4\ \mu\text{m}$  y un largo de  $4.2$  a  $11.8\ \mu\text{m}$  (Fig. 9 e). Presentan ramificaciones simples (tipo *Dichothrix*) (Fig. 10 b) o geminadas (tipo *Scytonema*) (Fig. 10 a). Hormogonios heteropolares con un solo heterocito parecido a *Calothrix*.

Características observadas en las muestras Ach#24 y Ach#26.

En UNAM\_777\_Alchichica y UNAM\_CR5\_Atexcac filamentos dispersos en largas redes, alargados, heteropolares con vaina delgada y hialina; en la parte más ancha miden de  $11.3$  a  $14.7\ \mu\text{m}$ . Tricomas uniseriados, heteropolares, con heterocito basal y células vegetativas de color verde olivo a verde azul, más anchas que largas a isodiamétricas, se atenúan hacia el extremo, con un ancho

de 7.4 a 12.3  $\mu\text{m}$  y un largo de 5 a 11.4  $\mu\text{m}$ ; cerca de la base constreñidas. Heterocitos basales ovalados y heterocitos intercalares más largos que anchos. Tricomas contorsionados dentro de la vaina y ramificaciones falsas geminadas; con hormogonios heteropolares de menor tamaño (Fig. 10 d-h).





**Figura 9. Muestras naturales Ach#24 y Ach#26; filamentos agrupados en un talo en forma de penacho (a-d); filamentos heteropolares con heterocito en la parte basal y ápices atenuados formando cabello, con vainas amarillentas a marrón (e).**



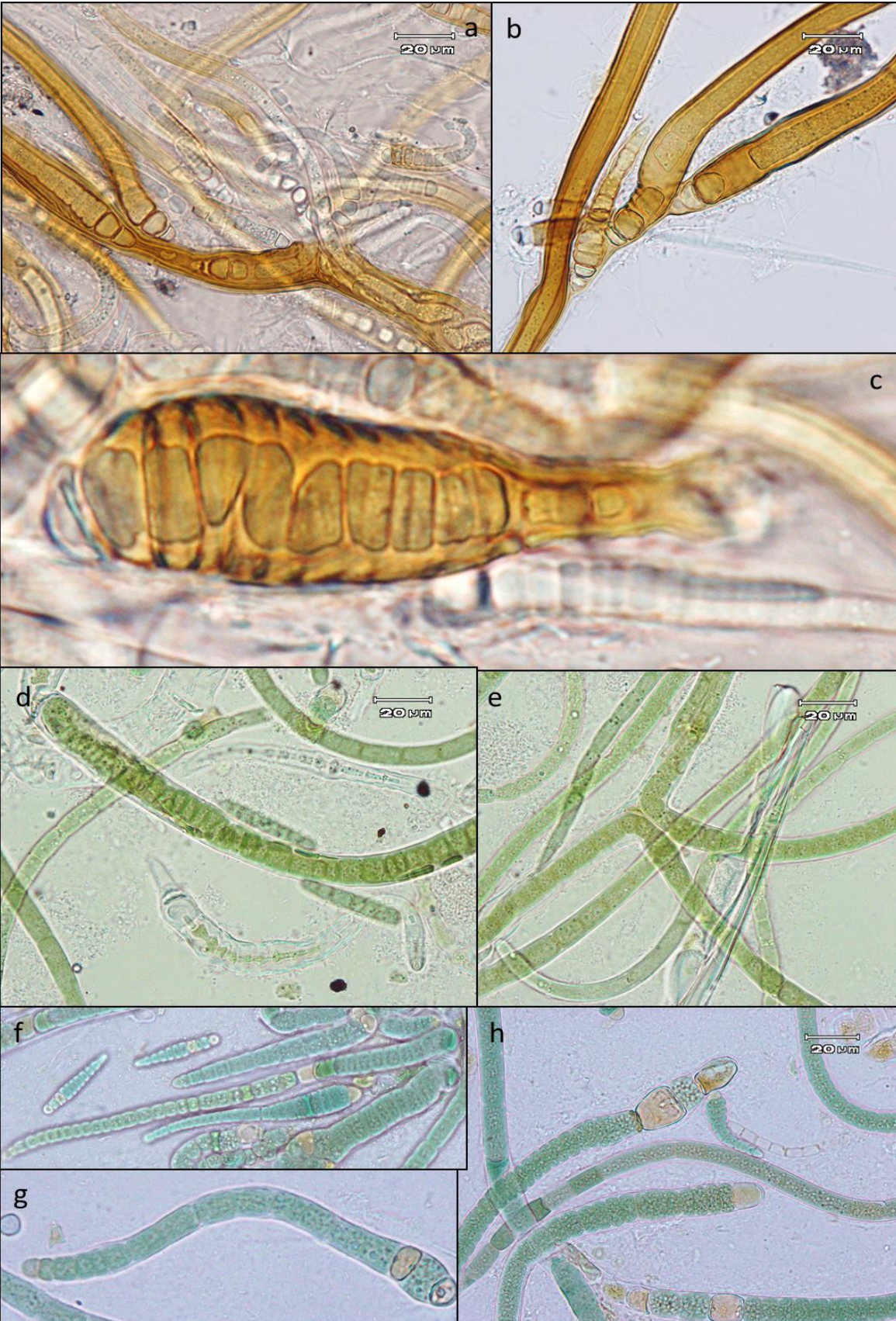


Figura 10. Muestras naturales Ach#24 y Ach#26 a, b y c; cultivos UNAM\_777\_Alchichica y UNAM\_CR5\_Atexcac d-h; ramificaciones falsas sencillas tipo *Dichothrix* (a y b) contorsión de tricoma dentro de vaina (c); contorsión del tricoma dentro de la vaina (d), ramas falsas geminadas (e), hormogonios (f), filamentos maduros con heterocitos intercalares (g y h).

### **8.1.3.- Poblaciones similares a *Scytonematopsis***

**Figuras 11 y 12.**

#### **8.1.3.1.- Características similares a *Scytonematopsis***

El morfotipo V comparado con las características de las especies de *Scytonematopsis* *S. fuliginosa* y *S. pilosa*, (Tab. 7) coincide con la forma del talo en forma de arbusto y un arreglo irregular de filamentos paralelos, filamentos heteropolares e isopolares y asimétricos, la forma de las células vegetativas, muy cortas, más anchas que largas, las paredes ligeramente constreñidas, la atenuación de los tricomas de forma abrupta en las últimas células formando una célula cónica o puntiaguda y la formación de heterocitos intercalares.

#### **8.1.3.2.- Morfotipo V *Scytonematopsis* sp. 1**

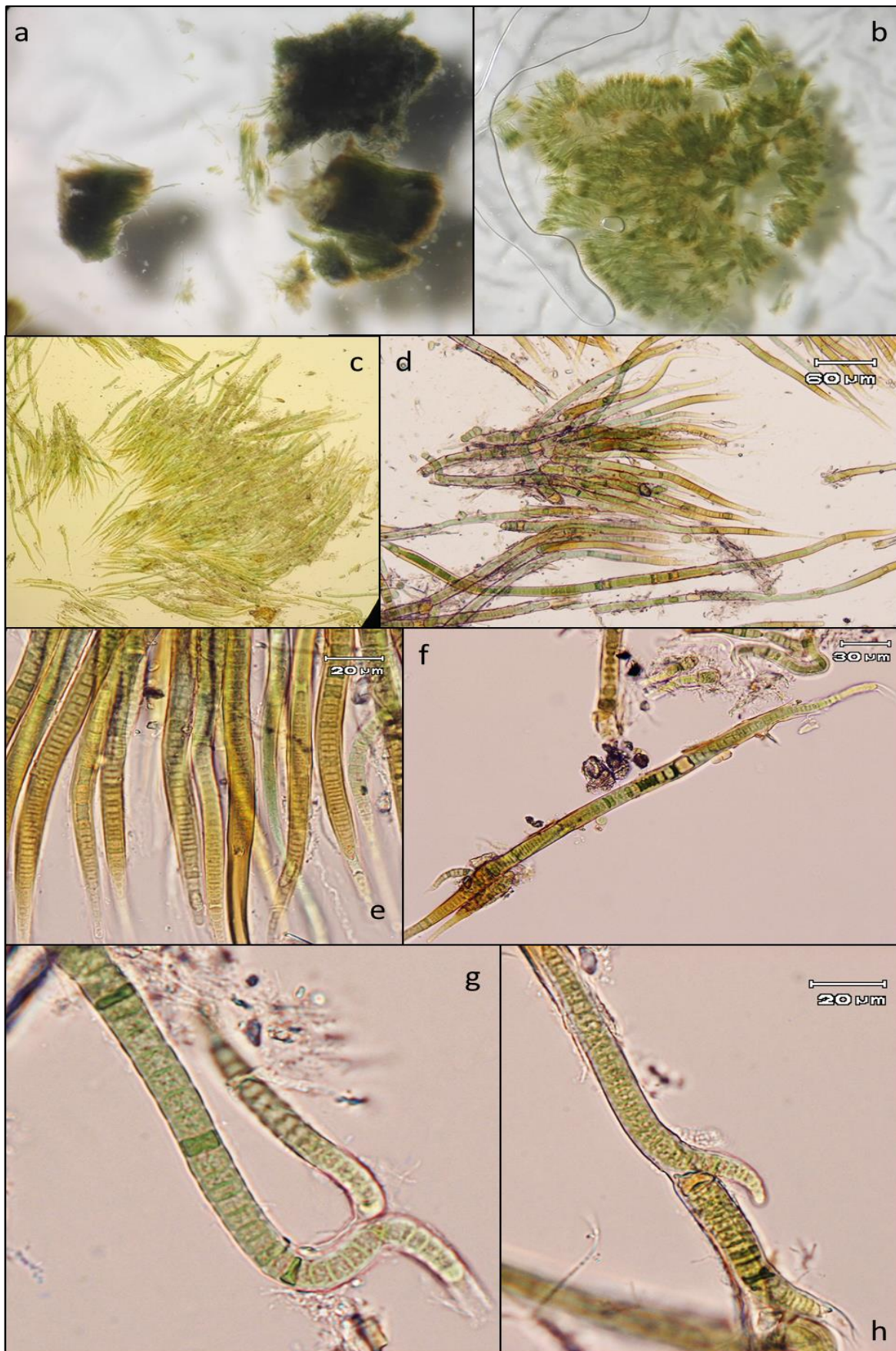
**Figuras 11 y 12.**

Talo cespitoso, grueso, de color verde oscuro a negruzco, y filamentos adheridos en la base al sustrato rocoso (Fig. 11 a) y densamente agrupados de manera paralela, erectos (Fig. 11 c). Filamentos con vaina delgada, firme, sin lamelas hialina a amarillenta, y se atenúa al igual que el tricoma y se abre en la punta (Fig. 11 d-f); miden hasta 600µm de largo y en la parte más ancha del filamento mide de 8.4 a 17.2 µm. Tricomas de color verde olivo a verde azul, isopolares y heteropolares, uniseriados; células vegetativas muy cortas con las paredes ligeramente constreñidas a lo largo de todo el tricoma y atenuándose en las últimas 10 células rara vez formando cabello; tienen un ancho de 4.5 a

10.6  $\mu\text{m}$  e ancho y 1.3 a 5.6  $\mu\text{m}$  de largo. Heterocitos, basales en forma hemisférica e intercalares con forma ovalada a rectangular redondeado (Fig. 12 b) con un ancho de 10.1 a 14.0  $\mu\text{m}$  y un largo de 8.1 a 11.7  $\mu\text{m}$ . Se observan contorsiones del tricoma dentro de la vaina (Fig. 13 c), necridios a lo largo de los filamentos (Fig. 12 a) y ramificaciones simples (Fig. 11 g y h). Se observan hormogonios en forma heteropolar con un heterocito en la base y un extremo atenuado formando un cabello (Fig. 12 d).

Características observadas en la muestra Ax#22.





**Figura 11. Muestra natural Ax#22; talo compacto en forma de tapete con filamentos densamente agrupados (a-b), los filamentos se encuentran erectos y paralelos (c y d), atenuación en las ultimas 10 células (e), los filamentos isopolares (f) y ramificaciones falsas formando hormogonios heteropolares (g y h).**





Figura 12. Muestra natural Ax# 22; Tricomas con células más anchas que largas y atenuados en las últimas 10 células aproximadamente (a) filamentos largos e isopolares con heterocitos intercalares y necridios a lo largo del tricoma (b), tricomas contorsionados dentro de la vaina (c) y filamentos jóvenes posiblemente hormogonios en forma heteropolar con heterocito basal (d).

## **8.2.- Análisis morfológico de las especies de cianobacterias heteropolares con heterocito encontradas en los lagos cráter**

Durante la revisión morfológica fue necesario apoyarnos en los resultados moleculares para corroborar las identificaciones basadas en las descripciones morfológicas de nuestras muestras naturales. Se revisaron las descripciones de los géneros y especies relacionadas a nuestras secuencias en la literatura para hacer la comparación y obtener la evidencia morfológica para separar y delimitar los géneros y especies nuevas descritas en la presente tesis.

Se elaboraron las tablas comparativas (5, 6 y 7) donde se describen las características morfológicas de las especies similares en el siguiente orden: forma de talo, forma y organización de los filamentos, forma de la vaina, medidas del filamento, ancho del tricoma, largo de las células vegetativas, forma de las células vegetativas, presencia o ausencia de constricciones en las paredes celulares, forma y posición del heterocito, ancho y largo del heterocito, forma del ápice, presencia o ausencia y tipo de ramificación y ambiente en el cual se encontraron las especies descritas.

**Tabla 5. Características morfológicas de especies del género *Calothrix* y de los morfotipos encontrados en los lagos cráter de Puebla, México. La información se obtuvo de las observaciones de las poblaciones de los lagos cráter de los morfotipos I y II, y de las descripciones de especies hechas por Komárek (2013).**

Características	<i>Calothrix</i>					Morfotipo	
	<i>C. castelii</i>	<i>C. confervicola</i> (tipo)	<i>C. elsteri</i>	<i>C. parietina</i> (regiones tropicales)	<i>C. scopulorum</i>	I	II
<b>Forma del talo</b>	Colonias esponjosas parecidas a un cojín o postradas.	Filamentos en grupos y colonias.	Filamentos solitarios o en grupos y racimos.	Solitarios o en grupos.	Postrado en sustrato rocoso, parecido a un arbusto o fascículos.	Talo cespitoso, sin mucilago común.	Talo parecido a un tapete grueso compuesto de filamentos en racimos, densamente agrupados, adheridos de la base al sustrato de roca calcarea.
<b>Color del talo</b>	Verde Azul grisáceo.	Verde oscuro.	-	-	Verde olivo a verde oscuro.	Verde oscuro a negro.	Verde oscuro a negro.
<b>Filamentos</b>	Densamente aglomerados, irregularmente enroscados. Cerca de la base están postrados, después ± erectos.	Ligeramente anchos en las bases.	Flexibles, continuamente atenuados hacia el ápice, con la base ancha.	-	Irregularmente enroscados y flexibles	Erectos, paralelos, en la base más largos, en la superficie más cortos. Formando una estratificación vertical en 2 niveles.	Agrupados en racimos, unidos en la base, con filamentos largos, enroscados y enredados en la base y filamentos más cortos y erectos en las puntas.
<b>Vaina</b>	± Delgadas, estrechas, hialina a amarillenta, no estratificada.	Firme, no engrosada, no lamelada, hialina a amarillenta-marrón.	Firme, delgada a gruesa, ligeramente lamelada, amarillenta a negruzca, raramente	Delgada a gruesa, estratificada, lamelada, amarillenta a marrón.	Compuesta de capas tipo embudo, lameladas, hialinas a marrón.	Vaina gruesa, flexible, estriada transversalmente, lisa en la superficie y abierta en la punta	Vaina delgada a gruesa, flexible, ligeramente estratificada, lisa en la superficie, se abre en las puntas. Incolora



Características	<i>Calothrix</i>					Morfotipo	
	<i>C. castelii</i>	<i>C. confervicola</i> (tipo)	<i>C. elsteri</i>	<i>C. parietina</i> (regiones tropicales)	<i>C. scopulorum</i>	I	II
			deshilachada en las puntas.			ligeramente en forma de embudo. Incolora a amarillenta o marrón.	a amarillenta a marrón.
<b>Largo filamento</b>	4-8mm	2-3mm	360µm	15 células	1mm	160µm	420µm
<b>Ancho filamento (µm)</b>	12.0-23.0	12.0-25.0	11.0-16.0	7.0-20.0	10.0-18.0	10.4-19.1	9.2-18.9
<b>Ancho tricoma (µm)</b>	8.0-18.5	10.0-18.0	-	4.0-12.0	8.0-15.0	4.7-9.6	4.0-11.5
<b>Largo células (µm)</b>	-	-	-	-	-	1.4-6.0	2.0-5.5
<b>Forma de las células vegetativas</b>	Distintivamente más anchas que largas, solo acercándose hacia el extremo isodiamétricas a cilíndricas y más largas que anchas en el pelo.	Células muy cortas, largo menos de un tercio del ancho.	Cilíndricas, más anchas que largas hasta isodiamétricas, cerca del extremo, alargadas y hialinas.	Más cortas que anchas, en hormogonios y tricomas jóvenes ± isodiamétricas.	Más anchas que cortas, hasta isodiamétricas.	Cerca de la base más anchas de largas, después ligeramente isodiamétricas.	Cerca de la base más anchas que largas, después ligeramente isodiamétricas.
<b>Paredes celulares</b>	Paredes constreñidas.	Sin paredes constreñidas.	Con las paredes constreñidas.	No o ligeramente constreñidas.	En la parte baja constreñidas, después sin constreñir en segmentos cilíndricos.	Constreñidas hasta la mitad del tricoma, después ligeramente o no constreñidas.	Cerca de la base, muy constreñidas. De la parte media al ápice ligeramente constreñidas o no constreñidas.

Características	<i>Calothrix</i>					Morfotipo	
	<i>C. castelii</i>	<i>C. confervicola</i> (tipo)	<i>C. elsteri</i>	<i>C. parietina</i> (regiones tropicales)	<i>C. scopulorum</i>	I	II
<b>Ápice</b>	Atenuado formando un largo pelo.	Solo en las puntas atenuado formando un largo pelo.	Atenuación continua hasta formar un largo pelo con un ancho de 0.8 a 1.0 $\mu\text{m}$ .	Solo cerca del ápice en pelo alargados.	Atenuado y formando un pelo largo.	La mayoría se atenúa continuamente desde la mitad del tricoma y forma un pelo largo y hialino.	Se atenúa después de la parte media y en el ápice forma un pelo hialino y corto. Rara vez ápice redondeado sin pelo.
<b>Forma del Heterocito</b>	Basal, hemisférico. A veces con 2 o 3 en fila en la base.	Basal, solitario o en pares.	Basal, subesférico a oval, uniporo, raramente dos juntos, raramente intercalar.	Basal, raramente intercalar, hemisféricos, más anchos que las células basales.	Basales y a veces unos cuantos en fila. Escasamente intercalares.	Basal, en filamentos jóvenes forma cónica, en filamentos maduros forma hemisférica. Intercalar más largo que ancho, redondeado.	Basal forma cónica a hemisférica. Intercalar de forma hemisférica, a isodiamétrico o más largo que ancho.
<b>Ancho heterocito (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	2.7-10.5	-	-	-	-	6.6-9.9	6.9-13.8
<b>Largo heterocito (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	11.5-15	-	-	-	-	4.8-13.9	4.7-15.8
<b>Tipo ramificación</b>	-	-	-	Falsa común.	Escasamente ramificado.	Falsa, sencilla.	Falsa geminada tipo <i>Scytonema</i> .
<b>Ambiente</b>	Sumergida en aguas dulces. Norteamérica, Venezuela, Europa, Bangladesh, Nueva Caledonia.	Marina, común en costas calcareas, en dentrito o epifítica o con otras algas.	Litoral rocoso de lagos o en filtraciones; costa del mar, Antártica.	África (Chad), Acuática, Mozambique, suelos de El Salvador, Nueva Caledonia.	En mares árticos, en rocas en la zona de oleaje, costas de Europa, Mar Negro, Mar Báltico.	En canto rodado, sumergido en la orilla del lago Atexcac, Puebla, México.	En roca ígnea y roca calcarea, sumergidas o recibiendo salpicadura de oleaje en la orilla del lago Atexcac, Puebla, México.

	<b>Calothrix</b>					<b>Morfotipo</b>	
<b>Características</b>	<b><i>C. castelii</i></b>	<b><i>C. confervicola</i></b> <b>a (tipo)</b>	<b><i>C. elsteri</i></b>	<b><i>C. parietina</i></b> (regiones tropicales)	<b><i>C. scopulorum</i></b>	<b>I</b>	<b>II</b>
		Cosmopolita.			Cosmopolita.		

**Tabla 6. Características morfológicas de especies del género *Rivularia* y de los morfotipos encontrados en los lagos cráter de Puebla, México La información se obtuvo de las observaciones de las poblaciones de los lagos cráter de los morfotipos III y IV, y de las descripciones de especies hechas por Komárek (2013).**

Características	<i>Rivularia</i>					Morfotipo	
	<i>R. atra</i>	<i>R. dura</i> (tipo)	<i>R. haematites</i>	<i>R. litorea</i>	<i>R. lapidosa</i>	III	IV
<b>Forma del talo</b>	Colonias ± esféricas, hemisférico, o en forma de almohada. Muy duras.	Colonias esféricas. Después forma una capa dura de 1mm de espesor o más, con partículas calcáreas, formando una masa calcificada compacta.	Inicialmente hemisférica, después confluyente, en forma postrada, ancho, irregular, o costras pequeñas en el sustrato, intensamente incrustadas de carbonato de calcio.	Colonias hemisféricas, a menudo gregarias. Con mucilago amarillento en la superficie, hialino en el centro.	Duras, hemisféricas, o casi esféricas, intensamente incrustadas CaCO <sub>3</sub> . De 1.5mm de diámetro, estratificado.	Talo radial, hemisférico, mucilaginoso, incrustado de CaCO <sub>3</sub> .	Talo radial, forma de penacho, mucilaginosa, incrustado de CaCO <sub>3</sub> .
<b>Color del talo</b>	Negrusco, a verde oscuro o negro.	Verde oscuro a blanquecina, marrón, o negruzca.	Mayormente marrón, verde azul o verde olivo.	Verde-azul oscuro.	Marrón oscuro, rara vez verde azul.	Incoloro, amarillento a marrón, verde olivo.	Incoloro, amarillento a marrón.
<b>Filamentos</b>	Radial, densamente compactados repetidamente ramificados.	No se separan tan fácil uno de otro. Primero ± radial, densamente unidos en paralelo.	Densamente paralelos, y aglomerados radialmente.	Estrechamente arreglados, ± en paralelo.	Confluentes y formando capas gruesas y postradas en el sustrato.	Arreglados radialmente, erectos, densamente unidos en paralelo.	Arreglados radialmente, dispersos en un mucilago común.

Características	Rivularia					Morfortipo	
	<i>R. atra</i>	<i>R. dura</i> (tipo)	<i>R. haematites</i>	<i>R. litorea</i>	<i>R. lapidosa</i>	III	IV
<b>Vaina</b>	Relativamente delgada, incolora, amarillenta a oscura, en la capa superior del talo más dilatada; y en capas.	Delgada a gruesa, incolora o amarillenta, irregularmente estratificada hasta lamelada, las terminaciones ligeramente en forma de embudo.	Delgadas, confluentes, estratificada, incolora a marrón, termina abierta en forma de embudo.	Delgada, no lamelada.	Fina, indistinta, amarillo pálido.	Gruesa, estratificada, lamelada, deshilachada y abierta en las puntas ligeramente en forma de embudo, hialinas a amarillentas o marrón.	Vaina gruesa, estratificada, lisa en la superficie, ligeramente abierta en la punta amarillenta a marrón. Presenta estrías transversales como marcas de crecimiento.
<b>Largo filamento</b>	-	-	-	-	Largo.	170 µm	478µm
<b>Ancho filamento (µm)</b>	-	15.5-20	14.0 - 18.0	7.0-10.0	-	9.9-18.8	8.4-16.4
<b>Ancho tricoma (µm)</b>	Cerca de la base a veces más delgado 2-5 (6)	4-9.0	3.0-11.0	2.9-9	7.5 a 9.8	5.4-11.1	4.5-9.9
<b>Largo células (µm)</b>	7.5-18	-	-	7.5-9.0	2.1-11.2	1.9-4.6	2.0-5.7
<b>Forma de las células vegetativas</b>	Ligeramente más largas que anchas cerca de la base, pero más cortas en zonas meristemáticas, y en el pelo más largas que anchas. Cilíndricas.	± Cuadráticas, y ligeramente en forma de barril cerca de las bases, o ligeramente más larga que ancha o más cortas que anchas en parte meristemática.	Varían en la base más cortas que anchas, después se alargan.	Largas cerca de las bases.	Más largas que anchas o isodiamétricas en las bases, en las partes intermedias menos anchas y en zonas meristemáticas cortas.	Cerca de las bases a veces isodiamétricas, y luego más anchas que largas cerca de los heterocitos basales, más adelante atenuándose	Cerca de las bases muy cortas, después casi isodiamétricas.

Características	Rivularia					Morfortipo	
	<i>R. atra</i>	<i>R. dura</i> (tipo)	<i>R. haematites</i>	<i>R. litorea</i>	<i>R. lapidosa</i>	III	IV
						en forma isodiamétrica.	
<b>Paredes celulares</b>	Constreñidas en las partes bajas del tricoma, en los pelos atenuados sin constreñir.	Ligeramente constreñidas cerca de la base, en la parte media y en el extremo no constreñidas.	Ligeramente constreñidas o no constreñidas.	Ligeramente constreñidas.	Ligeramente constreñidas.	Cerca de las bases y hasta la parte media constreñida, más adelante no constreñida hasta el pelo.	Cerca de la base están constreñidas, después sin constreñir.
<b>Ápice</b>	Atenuado formando pelo	Atenuando hacia el ápice.	Atenuado hacia el ápice.	Gradualmente atenuado hasta formar un pelo largo.	atenuación continua y formación de pelos cortos	Atenuado a partir de la zona media del tricoma formando un pelo largo.	Atenuación continúa a partir del heterocito intercalar hasta formar un pelo.
<b>Forma del Heterocito</b>	Basal, solo, esférico, a veces elipsoidal.	Basal, solitario, ± hemisférico, raramente ligeramente alargado.	Basal, solitario, poco frecuente 2 o 3 en fila,	Basal hemisférico a esférico; intercalar cilíndrico.	Basales, esféricos o más cortos que anchos, raramente en pares. solitarios	Basal puede ser, elipsoidal, alargado o isodiamétrico; intercalar en forma isodiamétrica a rectangular.	Basal, diferentes formas, elipsoidal o isodiamétrico, a veces 2 en fila. Intercalar en forma ligeramente isodiamétrica.
<b>Ancho heterocito (µm)</b>	4.8-15.5 diametro	4	5.5 a 18.5	5.0-15.0	5.5-6	6.0-11.6	6.3-10.4
<b>Largo</b>	-	-	4.5 a 14	5.0-12.5	3.5-5.5	4.1-10.8	4.2-11.8

	<b>Rivularia</b>					<b>Morfotipo</b>	
<b>Características heterocito (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><i>R. atra</i></b>	<b><i>R. dura</i> (tipo)</b>	<b><i>R. haematites</i></b>	<b><i>R. litorea</i></b>	<b><i>R. lapidosa</i></b>	<b>III</b>	<b>IV</b>
<b>Tipo de ramificación</b>	Falsa.	-	-	-	Falsa	Falsa, simple.	Falsa, simple tipo <i>Dichothrix</i> y geminada tipo <i>Scytonema</i> .
<b>Ambiente</b>	Marinas, en rocas, Océano Pacífico, Europa, Mar Báltico, Mar Negro, Mar Mediterráneo, Australia.	Sumergido en aguas duras en Europa, Japón y Norteamérica.	En piedras en cuerpos de agua calcáreos, Europa, Japón y Norteamérica.	Marino, en rocas del litoral, Corea del Norte.	En rocas calcáreas en las orillas del lago Ohrid.	En roca conglomerada, sumergido en la orilla del lago Atexcac, y en estromatolito sumergido en orilla del lago Alchichica, Puebla, México.	En estromatolito, sumergido en la orilla de los lagos Atexcac y Alchichica, Puebla, México.

**Tabla 7. Características morfológicas de especies del género *Scytonematopsis* y el morfotipo V encontrado en el lago cráter de Atexcac Puebla, México. La información se obtuvo de las observaciones de las poblaciones de los lagos cráter del morfotipo V y de las descripciones de especies hechas por Komárek (2013).**

Características	<i>Scytonematopsis</i>					Morfotipo
	<i>S. contorta</i>	<i>S. fuliginosa</i>	<i>S. maxima</i>	<i>S. pilosa</i>	<i>S. woronichinii</i> (tipo)	V
<b>Forma del talo</b>	Colonias que se extienden desde el centro con algunos filamentos erectos (en agar).	En forma de fascículos con un arreglo irregular de filamentos paralelos.	-	Talo en forma de arbusto, ligeramente incrustado por CaCO <sub>3</sub> .	Extensamente postrado, en forma de tapete.	Cespitoso, con filamentos densamente agrupados.
<b>Color del Talo</b>	Verde grisáceo no brillante.	Verde-Azul.	-	-	Verde-azul, verde olivo, marrón.	Verde olivo, verde oscuro a negro.
<b>Filamentos</b>	Densamente enredados, ondulados, con un solo tricoma por filamento, y con doble falsa ramificación.	Filamentos isopolares y heteropolares, asimétricos.	Filamentos postrados en el sustrato, curvados, raramente enroscados.	Usualmente simétricos, isopolares, raramente heteropolar, enroscado, enredado en la parte central, después erecto.	Rectos o enroscados, simétricos, enredados, común en fascículos.	Agrupados densamente, paralelos y erectos.
<b>Vaina</b>	Delgada, hialina, siendo marrón dorada en luz alta, no lamelada.	Lamelada, en ocasiones anchos en las puntas. Inicialmente incolora, después marrón oscuro.	Dorada-marrón.	Firme, ancha, no o ligeramente en capas, amarillentas a marrón, incoloras hacia los extremos.	Delgada, firme, no lamelada, o con capas paralelas, amarillenta a marrón, en partes externas hialina.	Vaina delgada, firme, sin lamelas, se atenúa igual que el tricoma hasta la punta, hialina a amarillenta.
<b>Largo filamento</b>	-	4.5mm	-	10mm	-	600µm
<b>Ancho filamento (µm)</b>	14-30	20.0-46.0 (70)	-	19.5-43.7	5.0-12.0	8.4-17.2
<b>Ancho tricoma (µm)</b>	9-12 (13)	10.0-20.0	20-42	6.9-20.7	4.8-8.1	4.5-10.6
<b>Largo células (µm)</b>	1.5-3 (6)	-	6.0-13.0	-	6.5-16.0	1.3-5.6



	<b>Scytonematopsis</b>					<b>Morfotipo</b>
<b>Características</b>	<b><i>S. contorta</i></b>	<b><i>S. fuliginosa</i></b>	<b><i>S. maxima</i></b>	<b><i>S. pilosa</i></b>	<b><i>S. woronichinii</i></b> (tipo)	<b>V</b>
<b>células vegetativas</b>	En medio del tricoma más anchas que largas, activamente creciendo. En la parte atenuada, más isodiamétrica a largas.	Muy cortas 0.2-0.25 más largo que ancho, cilíndricas, de la misma longitud hasta los extremos.	Células más cortas que largas.	Muy cortas, más anchas que largas.	Cilíndricas o en forma de barril, usualmente más largas que anchas.	Muy cortas, más anchas que largas.
<b>Paredes celulares</b>	No constreñidas a ligeramente constreñidas.	Sin constricciones.	Constreñidas.	No o ligeramente constreñidas.	± Constreñidas.	Ligeramente constreñidas en todo el tricoma.
<b>Ápice</b>	Atenuado gradualmente sin formar un pelo.	Atenuación corta en los extremos, sin pelo. Células apicales en forma de cono o puntiaguda, o hemisférico parecido a una caliptra.	Células atenuadas hacia los ápices. Célula apical redondeada.	Atenuado hacia los extremos, a menudo con una célula terminal en forma de caliptra.	Atenuación continua hacia los extremos.	Atenuado cerca del ápice a veces formando un pelo hialino corto.
<b>Heterocitos</b>	Heterocitos raros, intercalares o terminales, amarillento, redondeado, comprimido, forma crecida o irregular.	Basales o intercalares, esféricos o ligeramente complanados.	Intercalares, bipoos.	Basal o intercalar	Esféricos a cilíndricos.	Basales forma hemisférica. Intercalares forma ovalada a rectangular más largo que ancho redondeado.
<b>Ancho heterocito (µm)</b>	7.5-11	9.0-16.9	-	6.9 a 36.8	5.8-9.7	10.1-14.0
<b>Largo heterocito (µm)</b>	4-8.5	9.0-19.0	-	9.2 a 23	8.6-16.2	8.1-11.7
<b>Tipo de ramificación</b>	Falsas ramificaciones dobles, rara vez ramificaciones sencillas.	Falsas sencilla o geminada.	Falsa, geminada, empezando en un loop en forma de U que emerge de la	Ramas falsas solitarias o en pares	Falsas	Falsa, simple tipo <i>Dichothrix</i> .

	<i>Scytonematopsis</i>					<b>Morfotipo</b>
<b>Características</b>	<i>S. contorta</i>	<i>S. fuliginosa</i>	<i>S. maxima</i>	<i>S. pilosa</i>	<i>S. woronichinii</i> (tipo)	<b>V</b>
			vaina a una buena distancia del heterocito.			
<b>Ambiente</b>	Zona de caída de agua, en cascadas (Hawái).	Marina, en rocas en la zona de marea.	Suelos alpinos a 1640msnm en Nueva Zelanda.	Marino, en rocas y arena. Antillas, Centroamérica, Brasil, Japón, Filipinas y Sudáfrica.	En campos de arroz, en Turkmenistán, de la India.	En canto rodado, sumergido en la orilla del lago Atexcac, Puebla, México.

### 8.3.- Análisis moleculares

De los monocultivos, la extracción, replicación, clonación de ADN se obtuvieron secuencias del gen 16S de ARN ribosomal (ARNr) (Tab. 8) las cuales se procesaron y se alinearon junto con otras secuencias para la realización de los análisis filogenéticos. Posteriormente los tres análisis filogenéticos realizados (ML, NJ y MP) mostraron topologías similares, en particular para los clados que corresponden a la familia Rivulariaceae.

**Tabla 8. Secuencias caracterizadas de cianobacterias de la familia Rivulariaceae de los lagos cráter de Alchichica y Atexcac, en Puebla, México.**

CULTIVO	SECUENCIA
Ax#12	UNAM 775 Atexcac tipo I
Ax#17	UNAM CR1 Atexcac tipo II
Ax#19	UNAM CR2 Atexcac tipo II
Ax#23-1	UNAM CR3 Atexcac tipo III
Ax#23-3	UNAM CR5 Atexcac tipo IV
Ach#24	UNAM 777 Alchichica tipo IV

De los análisis filogenéticos se muestra el árbol de máxima verosimilitud (Fig. 13). En el árbol se incluyen los valores de Bootstrap obtenidos en los tres análisis filogenéticos realizados. En el árbol, las secuencias derivadas de este trabajo se insertaron en el clado que correspondería a la familia Rivulariaceae. Este clado se dividió en dos grandes clados A y B. El clado A incluye a todas las secuencias identificadas como *Calothrix* y *Macrochaete*, en el clado B están las secuencias de los géneros *Phyllonema*, *Nunduva*, *Kyrtuthrix* y *Rivularia*.

En el clado A se puede observar que el género *Calothrix* forma varios subclados que no son hermanos, por un lado se agrupan los *Calothrix* de agua dulce o suelo y este contiene secuencias de *Calothrix desertica* SCHWABE, y

varias secuencias de *Rivularia*, que posiblemente estén mal identificadas, como su clado hermano se observan 13 secuencias de *Macrochaete*, posteriormente se observa el clado de los *Calothrix* marinos que contienen secuencias de *Calothrix parietina* THURET EX BORNET & FLAHAULT, después se observa una secuencia de *Calothrix eisteri* KOMÁREK, NEDBALOVÁ & HAUER y un clado formado por 4 secuencias de *Macrochaete*, por último se observa un clado hermano a todos los anteriores formado por secuencias de *Calothrix* salobres y marinos, en donde se insertan nuestras secuencias UNAM 775 Atexcac, UNAM CR1 Atexcac y UNAM CR2 Atexcac.

El clado B lo forman el clado de *Phyllonema aviceniicola* ALVARENGA, RIGONATO, BRANCO, MELO ET FIORE, que forma un clado hermano con *Nunduva*, *Kyrtuthrix* y *Rivularia*; *Nunduva* se agrupa con varias secuencias identificadas como *Calothrix* que posiblemente necesiten revisión taxonómica. Después *Kyrtuthrix* forma un clado hermano con las secuencias de *Rivularia*, en donde se alojaron las secuencias UNAM CR3 Atexcac, UNAM CR5 Atexcac y UNAM 777 Alchichica.

El análisis de matriz de similitud de las secuencias del gen 16S RNAr se muestra que las secuencias UNAM CR1, CR2 Y 775 Atexcac son muy similares entre ellas y con las secuencias *Calothrix* sp. (KT336444, KT336445, AM230679, AM230680, AM230681, AM230682, AM230683 Y AM230684) con un porcentaje mayor a 95.2% (Tab. 9), mientras que la similitud con los otros géneros como *Nunduva*, *Kyrtuthrix*, *Macrochaete* y *Rivularia* y las secuencias UNAM CR3, CR5 Atexcac y 777 Alchichica es menor al 95% (Tab. 9). Por otro lado las secuencias UNAM CR3, CR5 Atexcac y 777 Alchichica son muy similares entre sí y con las secuencias *Calothrix* sp. HM751843, *Calothrix*

*contarenii* KT740998, *Calothrix parasitica* LC322121, *Calothrix scopulorum* LC322120, *Rivularia* sp. AM230666, AM230665, AM230667, AM230672, AM230673, AM230676, KY296608, *Rivularia atra* AM230674 y AM230675, *Kyrtuthrix huatulcensis* KT936560 y con el clado de *Nunduva* con un porcentaje mayor al 95%.

ML/NJ/MP

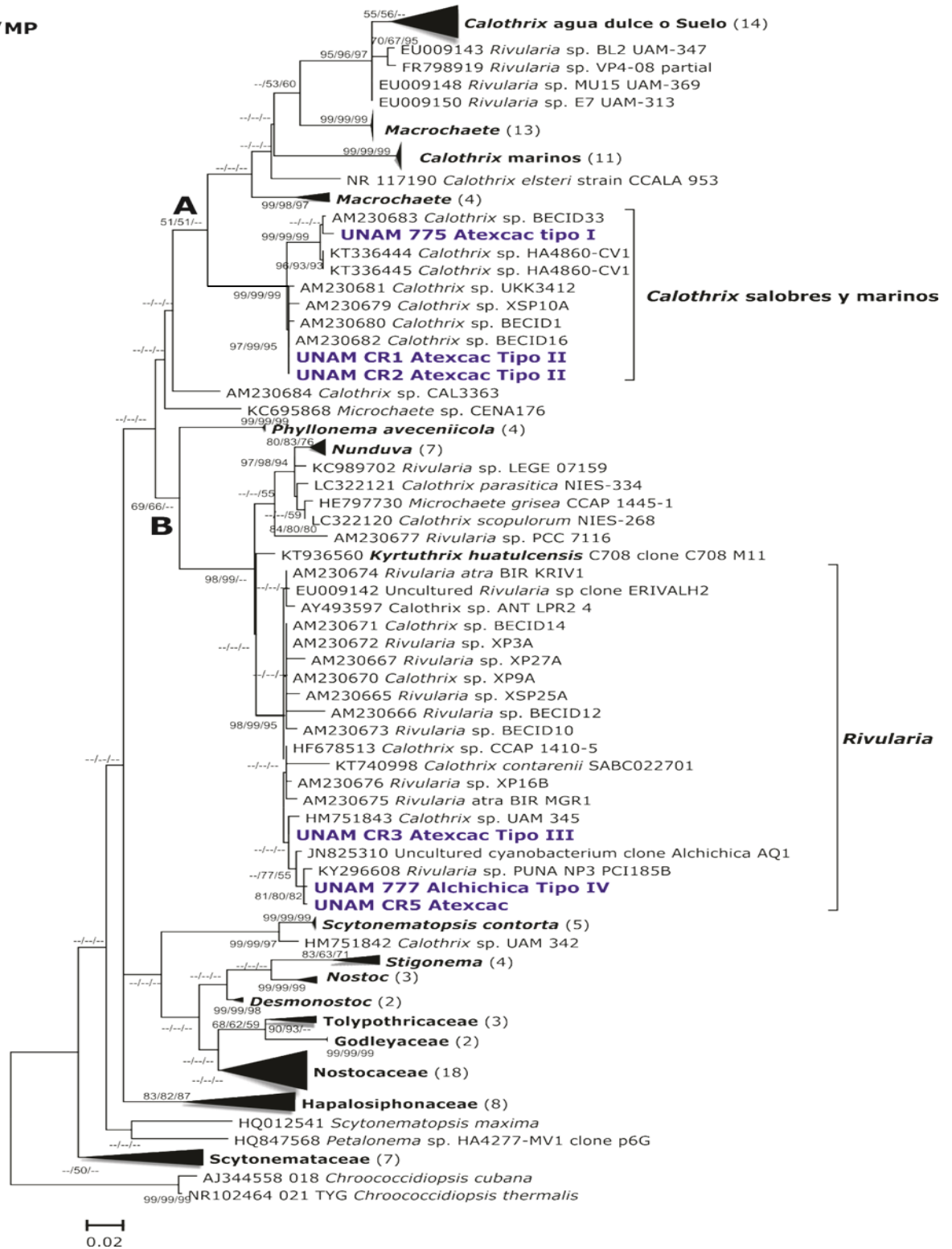


Figura 13. Posición filogenética de las secuencias: UNAM 775 Atexcac, UNAM 777 Alchichica, UNAM CR1 Atexcac, UNAM CR2 Atexcac, UNAM CR3 Atexcac y UNAM CR5 Atexcac, en los clados *Calothrix* salobres y marinos y *Rivularia* basados en un análisis filogenético de Máxima verosimilitud (ML) de las secuencias del gen 16S ARNr. Los soportes de bootstrap de ML, NJ y MP se encuentran reportados en los nodos respectivamente (>50), los nodos sin soporte se muestran como "- -".

**Tabla 9. Matriz con porcentaje de similitud; se conforman dos clados, en amarillo similitudes de las secuencias UNAM 775 Atexcac, UNAM CR1 Atexcac y UNAM CR2 Atexcac con muestras marcadas para el género *Calothrix*; en verde similitudes de las secuencias UNAM 777 Alchichica, UNAM CR3 Atexcac y UNAM CR5 Atexcac con muestras del género *Rivularia*, *Nunduva* y *Kyrtuthrix*.**

NOMBRE	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35				
1 UNAM 775 Atexcac																																							
2 UNAM CR1 Atexcac	98.5																																						
3 UNAM CR2 Atexcac	98.5	100																																					
4 UNAM CR3 Atexcac	91.7	92.9	92.9																																				
5 UNAM CR5 Atexcac	91.3	92.6	92.6	98.8																																			
6 UNAM 777 Alchichica	91.2	92.5	92.5	98.7	99.9																																		
7 AM230679 <i>Calothrix</i> sp.	98.1	99.6	99.6	92.6	92.1	92																																	
8 AM230680 <i>Calothrix</i> sp.	98.3	99.8	99.8	92.7	92.4	92.3	99.4																																
9 AM230681 <i>Calothrix</i> sp.	98.3	99.8	99.8	92.7	92.4	92.3	99.4	99.6																															
10 AM230682 <i>Calothrix</i> sp.	98.5	100	100	92.9	92.6	92.5	99.6	99.8	99.8																														
11 AM230683 <i>Calothrix</i> sp.	99.5	98.7	98.7	92	91.6	91.5	98.3	98.5	98.5	98.7																													
12 AM230684 <i>Calothrix</i> sp.	94.8	95.2	95.2	94.5	94.1	94	94.8	95	95	95.2	95.1																												
13 FR798917 <i>Calothrix parietina</i>	92.5	93.1	93.1	90.8	90.3	90.2	92.7	92.9	93	93.1	92.6	92.8																											
14 HM751843 <i>Calothrix</i> sp.	91.3	92.7	92.7	99.8	99.2	99	92.3	92.4	92.4	92.7	91.6	94	90.2																										
15 KT336444 <i>Calothrix</i> sp.	99.4	98.7	98.7	91.9	91.5	91.4	98.3	98.5	98.5	98.7	99.7	94.8	92.6	91.5																									
16 KT336445 <i>Calothrix</i> sp.	99.4	98.7	98.7	91.9	91.5	91.4	98.3	98.5	98.5	98.7	99.7	94.8	92.6	91.5	100																								
17 KT740998 <i>Calothrix contarenii</i>	89.9	91.1	91.1	97.9	97.1	97	91	90.9	90.9	91.1	90.2	93	89.3	97.8	90.1	90.1																							
18 AM230699 <i>Calothrix desertica</i>	92.6	92.9	92.9	90	89.4	89.3	92.5	92.7	92.8	92.9	92.8	92.2	98.6	89.5	92.8	92.8	88.4																						
19 LC322121 <i>Calothrix parasitica</i>	91.8	92.7	92.7	97.5	97.2	97.1	92.4	92.5	92.5	92.7	92.2	94.4	90.4	97.5	92	92	96.2	89.8																					
20 LC322120 <i>Calothrix scopulorum</i>	91.8	92.8	92.8	97.6	97.3	97.2	92.3	92.6	92.6	92.8	92.3	94.9	90.5	97.2	92.1	92.1	96.3	89.9	99.2																				
21 AM230665 <i>Rivularia</i> sp.	91.2	92.5	92.4	99.1	98.2	98.1	92.1	92.2	92.2	92.5	91.5	94.4	90.5	98.9	91.4	91.4	97.6	89.6	97.3	97.4																			
22 AM230666 <i>Rivularia</i> sp.	90.7	91.9	91.9	98.3	97.4	97.3	91.6	91.8	91.7	91.9	91	93.9	89.7	98	90.9	90.9	96.8	88.8	96.9	96.9	98.3																		
23 AM230667 <i>Rivularia</i> sp.	90.9	92.1	92.1	99	98.1	98	91.9	92	91.9	92.1	91.2	94.1	90.4	98.7	91.1	91.1	97.6	89.5	97.2	97.3	98.8	98																	
24 AM230672 <i>Rivularia</i> sp.	91.5	92.8	92.8	99.5	98.7	98.6	92.4	92.6	92.6	92.8	91.9	94.7	90.8	99.4	91.8	91.8	98	90	97.7	97.8	99.3	98.6	99.3																
25 AM230673 <i>Rivularia</i> sp.	91.6	92.9	92.9	99.3	98.8	98.7	92.6	92.7	92.7	92.9	92	94.6	90.7	99	91.9	91.9	97.8	89.9	97.5	97.7	99.1	98.3	99	99.5															
26 AM230674 <i>Rivularia atra</i>	91.6	92.9	92.9	99.6	98.8	98.7	92.6	92.7	92.7	92.9	92	94.9	90.9	99.5	91.9	91.9	98.1	90.1	97.7	97.7	99.3	98.5	99.2	99.7	99.4														
27 AM230675 <i>Rivularia atra</i>	91.4	92.7	92.7	99.3	98.8	98.7	92.3	92.5	92.5	92.7	91.8	94.5	90.5	99	91.6	91.6	97.9	89.6	97.5	97.6	98.9	98.1	98.8	99.4	99.3	99.6													
28 AM230676 <i>Rivularia</i> sp.	91.5	92.8	92.8	99.5	98.7	98.6	92.4	92.6	92.6	92.8	91.9	94.6	90.8	99.4	91.8	91.8	98.1	90	97.7	97.8	99.1	98.3	99	99.5	99.3	99.6	99.4												
29 KY296608 <i>Rivularia</i> sp.	91.5	92.8	92.8	99	99.3	99.2	92.3	92.6	92.6	92.8	91.8	94.4	90.5	99	91.7	91.7	97.3	89.6	97	97.3	98.2	97.5	98.1	98.7	98.8	99	99	98.9											
30 JN825310 Uncultured cyano Alchichica	91.4	92.9	92.9	99.4	99	98.9	92.6	92.7	92.7	92.9	91.8	94.6	90.6	99.3	91.7	91.7	97.6	89.8	97.3	97.4	98.9	98.1	98.8	99.3	99.3	99.4	99.3	99.2	99										
31 KR350574 <i>Macrochaete psychrophila</i>	92.2	93.2	93.2	92.4	92.4	92.3	92.8	93	93	93.2	92.5	93.3	94.7	91.6	92.6	92.6	91	94.2	91.2	91.8	92.1	91.6	92	92.4	92.5	92.7	92.7	92.6	92.6	92.6	92.6	92.6	92.6	92.6	92.6	92.6	92.6	92.6	
32 KT336440 <i>Macrochaete santanae</i>	93.2	93.4	93.4	92.3	92.1	92	93	93.2	93.2	93.4	93.3	94.1	93.1	91.7	93.3	93.3	90.6	92.4	91.2	91.9	92.2	91.7	91.9	92.5	92.6	92.5	92.3	92.3	92.2	92.4	95.2								
33 KT936560 <i>Kyrtuthrix huatulcensis</i>	92.8	93.7	93.7	97.9	97.5	97.4	93.3	93.5	93.5	93.7	93.2	94.9	91.7	98	93	93	96.5	91	98	97.9	97.6	97.1	97.5	98	97.9	98.1	97.7	98	97.7	97.6	92.5	92.8							
34 C458 <i>Nunduva kania</i>	91.7	92.7	92.7	96.9	96.8	96.7	92.2	92.5	92.5	92.7	92.2	94.4	90.4	97	92	92	95.6	89.8	98.8	99.1	96.7	96.2	96.6	97.2	97.1	97.1	96.9	97.2	96.6	96.7	91.3	91.2	97.9						
35 HQ847557 <i>Scytonematopsis contorta</i>	90.8	91.9	91.9	91.9	91.3	91.2	91.4	91.7	91.7	91.9	91.1	92.7	91.8	91.4	91	91	90.2	91.6	91	91.6	91.8	90.8	91.3	92	91.9	92.1	91.7	92	91.8	91.7	91.8	90.2	91.7	91.2	91.2	91.2	91.2	91.2	

#### **8.4.- Registro de las condiciones ambientales encontradas durante la colecta**

El muestreo se llevó a cabo en el mes de marzo del año 2014 durante la temporada de mezcla de los lagos (Alcocer & Hammer, 1998).

Los sitios de colecta se encontraban en las costas de los lagos: en la zona de salpicadura en esa época del año o sumergidos a una profundidad menor a un metro y expuestos al sol y el tipo de sustrato registrado por muestra fueron cantos rodados, rocas ígneas y precipitados (roca calcarea suave) y sobre estromatolitos (Tab. 10).

**Tabla 10. Tipos de sustrato en donde se encontraban adheridas las muestras tomadas para este estudio.**

<b>MUESTRA</b>	<b>TIPO DE SUSTRATO</b>
Ax#12	Adherida a canto rodado sumergida en la orilla del lago.
Ax#17	Adherida a roca ígnea, sumergida en la orilla del lago.
Ax#19	Adherida a roca suave (precipitado de calcio) en la orilla recibe salpicadura del oleaje.
Ax#22	Adherida a canto rodado sumergido en la orilla del lago.
Ax#23	Adherida a conglomerado de rocas sumergido en la orilla del lago.
Ach#24	Creciendo sobre estromatolito sumergido en la orilla del lago.
Ach#25	Creciendo sobre estromatolito, sumergido en la orilla del lago.
Ach#26	Creciendo sobre estromatolito, sumergido en la orilla del lago.



Se reportan los siguientes parámetros físico-químicos del agua que se tomaron durante la colecta (temperatura, conductividad específica y pH) y los resultados de los análisis de espectrofotometría realizados en el laboratorio para medir la cantidad de nutrientes disueltos en el agua (Fosfatos, sulfatos, nitratos, nitritos, amonio y Nitrógeno inorgánico) (Tab. 11).

**Tabla 11. Resultados de la medición de los parámetros físico químicos del agua superficial de los lagos cráter de Alchichica y Atexcac.**

<b>Parámetro</b>	<b>Alchichica</b>	<b>Atexcac</b>
Temperatura del agua °C	21	19.8
Conductividad específica (mS cm <sup>-1</sup> )	10.1	9.46
pH	8.86	8.46
Fosfatos (PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> ) Fósforo Reactivo Soluble mg l <sup>-1</sup>	0.16	0.66
Sulfatos (SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> ) mg l <sup>-1</sup>	>3.5	1.205
Nitratos (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) mg l <sup>-1</sup>	0.015	0.01
Nitritos (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) mg l <sup>-1</sup>	0.0075	0.0035
Amonio (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) mg l <sup>-1</sup>	0.02	0.06
Nitrógeno Inorgánico Disuelto mg l <sup>-1</sup>	0.0425	0.0735

## 9.- Discusión

Los estudios moleculares y filogenéticos realizados en las últimas 2 décadas en el lago cráter de Alchichica han dado grandes resultados para detectar la riqueza de microorganismos de diferentes órdenes, clases y phyla en estos ambientes. En el caso de las cianobacterias (Cyanobacteria) las descripciones morfológicas y moleculares no se encuentran relacionados unos con otros por lo cual este estudio es novedoso ya que se implementó la caracterización molecular del gen 16S de ARNr para conocer la relación filogenética de las cianobacterias heterocitas encontradas en los lagos cráter de Alchichica y Atexcac junto con la descripción de la morfología de las muestras naturales y una descripción de su hábitat, que se complementan como estudios taxonómicos modernos.

En las poblaciones de los lagos cráter Atexcac y Alchichica se detectaron cianobacterias filamentosas con características principales de la Familia Rivulariaceae que son: Heteropolaridad de los filamentos, ápices atenuados y formación de colonias radiales. Resultados similares son los reportados por Tavera y Komárek (1996), en donde describen filamentos de las especies *Calothrix* sp., *C. cf. parietina* y *Rivularia cf. haematites*; con los reportados por Couradeau et al., (2011) y Gérard et al., (2013) que observaron filamentos parecidos a *Calothrix* y *Rivularia*. Y con los resultados de Kaźmierczak et al. (2011) en donde reportan filamentos parecidos a *Calothrix* y *Rivularia* encontrados en las comunidades que viven en los estromatolitos y además obtuvieron 10 secuencias de subunidades pequeñas de genes de ARN ribosomal que se agrupan en el orden de las Nostocales: 6 secuencias

formando un sub-clado junto con una secuencia de *Rivularia atra* y 4 secuencias formando un sub-clado hermano junto con una secuencia de *Calothrix* sp., sin embargo no hay una descripción de la morfología de muestras naturales de las poblaciones que se utilizaron para los análisis filogenéticos.

De manera general se puede observar en el árbol filogenético de máxima verosimilitud (Fig. 13) que las secuencias derivadas de este trabajo se agrupan en el clado de la familia Rivulariaceae junto con secuencias del GenBank de los géneros *Calothrix* (siendo este polifilético), *Macrochaete*, *Microchaete* (aunque morfológicamente pertenece a la familia Microchaetaceae) *Phyllonema*, *Nunduva*, *Kyrtuthrix huatulcensis* y *Rivularia*. Topologías similares de análisis filogenéticos de la familia Rivulariaceae fueron reportados por Berrendero et al., (2008; 2011; 2016) Sihvonen et al., (2007), Domínguez-Escobar et al., (2011).

La utilización del enfoque polifásico fue una buena herramienta para separar los morfotipos presentados. En el enfoque molecular, en los análisis filogenéticos y de similitud de las secuencias de los morfotipos (Tab. 9), estos se agrupan en clados distintos y con un porcentaje de similitud de entre el 91.2 y el 92.9% por lo que se tratan de dos géneros molecularmente distintos.

El enfoque morfológico fue útil para diferenciar las muestras de las poblaciones del tipo *Calothrix* (morfotipos I y II) con las poblaciones del tipo *Rivularia* (morfotipos III y IV) las cuales morfológicamente difieren en la forma y composición del talo (en forma de tapete en el caso I y II o radial mucilaginoso

en el caso III y IV), el color del talo y ausencia/presencia de un mucilago común que envuelva los filamentos, el largo de los filamentos, el ancho de los filamentos y el ancho del tricoma (de mayor tamaño en el tipo *Calothrix*).

Al analizar la morfología de las muestras naturales de las poblaciones filogenéticamente relacionadas a *Calothrix* de aguas salobres y marinas se observaron características que distinguían a una población de otra. Clasificadas como morfotipo I y II, la primera diferencia morfológica se ubica en la forma del talo y organización de los filamentos, siendo en el morfotipo I filamentos paralelos, formando un tapete estratificado con filamentos más largos en la base y más cortos en las puntas y en el morfotipo II filamentos en forma de racimos, con filamentos más largos y enroscados en la base y más cortos en las puntas. Presentan una diferencia en la forma del tricoma ya que en el morfotipo I es más corto y presentan un heterocito intercalar, y en el morfotipo II los tricomas son más largos y con dos o más heterocitos intercalares. Los heterocitos son de mayor tamaño en el morfotipo II y más frecuentes. Por lo tanto morfológicamente se trata de dos especies distintas del mismo género.

Por otro lado de acuerdo a lo reportado por Tavera y Komárek (1996) y con el resultado filogenético, se compararon las descripciones morfológicas de las muestras naturales Ax#12 (Morfotipo I) y Ax#17 y Ax#19 (Morfotipo II) con las descripciones de la especie *Calothrix parietina* de ambientes tropicales (Compère 1974; Rino 1972; Bourrelly 1984; en Komárek, 2013) (Tab. 5). Los morfotipos coincidieron con las descripciones de *Calothrix parietina* en el ancho del filamento, el ancho de las células vegetativas en la parte más ancha y la

forma de estas células, además, la atenuación del extremo y la constricción en las paredes celulares.

Sin embargo el morfotipo I se diferenció en la forma del talo (cespitoso, filamentos agrupados formando estratos), la vaina que se observaba lisa, no lamelada y con estrías transversales, filamentos más largos (filas de más de 15 células de largo) y por la presencia común de heterocitos intercalares.

En el caso del morfotipo II las diferencias frente a *Calothrix parietina* tropical se presentó por un talo parecido a un tapete compuesto de filamentos de mayor longitud en la base, agrupados y formando racimos, además presentan una vaina lisa en su superficie con las estrías longitudinales en los filamentos maduros, filamentos largos, y la presencia común de heterocitos intercalares dentro de los filamentos.

También se compararon las características con las especies, *C. castelii*, *C. elsteri* y *C. scopulorum* debido a su parecido en los esquemas encontrados en la literatura (Komárek, 2013) sin embargo no concuerdan con la mayoría de los caracteres de alguna de las especies.

Otro punto a discutir, es que revisando las descripciones para la especie *C. parietina* (Komárek, 2013) estas se dividen en una variedad de morfotipos descritas para zonas y ambientes distintos por lo que *C. parietina* variedad de zonas tropicales podrían tratarse de una especie distinta a la descrita como morfotipos de zonas templadas, por lo que se sugiere que en futuros trabajos se analicen estas poblaciones desde el enfoque polifásico.

Finalmente se compararon con las características de la especie tipo, *C. confervicola*, pero no coincidieron con la forma de los talos, el largo de los filamentos, el ancho del tricoma, las paredes no constreñidas y la presencia de heterocitos intercalares muy comunes en los morfotipos de los lagos cráter, además del ambiente ya que *C. confervicola* es marina. Todas estas evidencias morfológicas indican que las poblaciones encontradas podrían tratarse de un género nuevo.

En el árbol filogenético obtenido de los análisis estadísticos (Fig. 13) nos muestra que *Calothrix* es un género polifilético ya que este se divide en 3 clados separados, el primero formado por especies de agua dulce y suelo, el segundo formado por especies de origen marino y el tercero formado por las secuencias UNAM 775 Atexcac (Morfotipo I), UNAM CR1 Atexcac y UNAM CR2 Atexcac (Morfotipo II) junto con las descritas como *Calothrix* sp., encontradas en el mar Báltico y en Hawái. Estos resultados concuerdan con los reportados por Berrendero et al., (2008; 2011; 2016), por Shvonen et al., (2007) y Komárek et al., (2012).

El clado *Calothrix* salobres y marinos tiene el soporte de bootstrap del 99 en los análisis estadísticos (ML, NJ y MP). Las secuencias del morfotipo I y II tienen una similitud del 98.5% en el análisis estadístico (Tab. 9). Sin embargo las secuencias del morfotipo I se agruparon junto con secuencias *Calothrix* sp. descritas en muestras del río Olowalu, isla Maui, Hawái en un sub-clado hermano de otro formado por el morfotipo II y otras secuencias igualmente marcadas como *Calothrix* sp., descritas en muestras epilíticas de la costa de

Finlandia en el Mar Báltico, dándonos evidencia molecular de que las poblaciones relacionadas a las secuencias pueden tratarse del mismo género.

Secuencias de *Calothrix parietina* obtenidas del GenBank se agruparon en el clado de *Calothrix* de agua dulce o suelo y en el clado de *Calothrix* marinos y presentan un porcentaje de similitud con las secuencias de este trabajo menor al 93.1% (Tab. 9). Las secuencias de otras especies de *Calothrix*: *C. contarenii*, *C. desertica*, *C. parasitica* y *C. scopulorum* se agrupan en otros clados y el porcentaje de similitud con las secuencias del morfotipo I y II están por debajo del 92.9%.

Tanto la evidencia morfológica como molecular sugiere que las poblaciones relacionadas a las muestras naturales Ax#12, Ax#17 y Ax#19 pertenecen a un clado distinto a *Calothrix* marinos y *Calothrix* de agua dulce y de suelo, por lo que consideramos que es un género nuevo al cual llamaremos *Ankylothrix* gen. nov., que se caracteriza por formar talos en forma de tapete, esponjosos, sin mucilago común, filamentos con vainas delgadas a gruesas, flexibles y ligeramente estratificadas y algunas con estrías transversales; tricomas principalmente heteropolares y con fases largas isopolares, cilíndricos y que se atenúan en un pelo largo y hialino; presentan heterocitos basales hemisféricos y comúnmente heterocitos intercalares en los tricomas maduros; ramificaciones falsas geminadas y simples y estas se generan por la contorsión del tricoma dentro de la vaina; y reproducción por hormogonios.

Siguiendo con los resultados se analizaron las muestras naturales Ax#23, Ach#24, Ach#25 y Ach#26 que presentan características de *Rivularia* y de las

cuales derivaron dos morfotipos y tres secuencias: morfotipo III (secuencia UNAM CR3 Atexcac) y morfotipo IV (secuencia UNAM CR5 Atexcac y secuencia UNAM 777 Alchichica). En el análisis filogenético las secuencias se agruparon con secuencias identificadas como especies del género *Rivularia* (Fig. 13).

Al analizar la morfología de las muestras naturales de las poblaciones filogenéticamente relacionadas a *Rivularia* se observaron características que distinguían a una población de otra. El morfotipo III se distinguió del morfotipo IV principalmente por la forma del talo, siendo en el primero un talo radial de filamentos ordenados en paralelo, densamente agrupados y el segundo tiene un talo radial con filamentos desarreglados y poco aglomerados. Los filamentos se diferencian en cuanto a tamaño, presentándose en el morfotipo III más cortos. Otra diferencia radica en la forma de la vaina, el morfotipo III tiene una vaina gruesa, estratificada, muy lamelada, deshilachada y abierta en embudo en las puntas, y en el morfotipo IV se presenta una vaina gruesa, estratificada, lisa en la superficie y ligeramente abierta en las puntas. Los tricomas difieren, el morfotipo III presenta un tricoma más corto que el del morfotipo IV, y en la disposición de los heterocitos, ya que en el morfotipo III se presentan un heterocito basal y un intercalar, mientras que en el morfotipo IV se pueden presentar dos o tres heterocitos basales en fila y un intercalar. La formación de ramas falsas, en el morfotipo III encontramos ramas simples y en el morfotipo IV encontramos simples y geminadas. Estos caracteres diferentes dan evidencia morfológica que separan dos especies distintas del mismo género.

Siguiendo con los reportado por Tavera & Komárek, (1996) las descripciones de estos morfotipos fueron comparadas con las características de *Rivularia*



*haematites* (Tab. 6) encontradas en la literatura (Komárek, 2013), el morfotipo III comparado con *Rivularia haematites* presenta diferencias en los tricomas que se observan adelgazados en la base, más anchos en la parte media, y atenuados en el ápice, heterocitos intercalares encontrados muy frecuentemente en donde es más ancho el filamento y contorsiones del tricoma dentro de la vaina en la parte media del filamento.

En el caso del morfotipo IV comparado con *Rivularia haematites* la diferencia se marcó en la presencia de heterocitos intercalares de manera frecuente, ver comúnmente la presencia de ramas falsas simples y geminadas en el mismo filamento y contorsiones del tricoma dentro de la vaina.

Las descripciones morfológicas de los morfotipos III y IV se compararon con las descripciones hechas de *Rivularia dura* (especie tipo) para determinar las características pertenecientes a este género y coincide en la forma del talo y el arreglo de los filamentos que se encuentran de manera radial y unidos en paralelo, las partículas calcareas que se encuentran adheridas al talo, tricomas heteropolares y formación de pelo.

Y por último se compararon las descripciones morfológicas de los morfotipos III y IV con las características de las especies *R. lapidosa*, *R. maillardii* y *R. manginii* por su similitud en la forma del talo (radial y con partículas calcareas adheridas, forma heteropolar de los filamentos; con la especie *R. atra* debido a que en los análisis filogenéticos se agrupan con secuencias descritas de esta especie y con *R. litorea*, la cual se describe con heterocitos intercalares; la morfología de los morfotipos III y IV no coincidieron con las descripciones, en

la forma de la vaina, tamaño y la presencia de heterocitos intercalares. Con estas evidencias morfológicas, los morfotipos III y IV son dos nuevas especies del género *Rivularia* (Tab. 6).

Nuestros análisis filogenéticos comprueban que en el árbol filogenético (Fig. 13), las poblaciones del morfotipo III (UNAM CR3 Atexcac) y morfotipo IV (UNAM CR5 Atexcac y UNAM 777 Alchichica) pertenecen al género *Rivularia*, con soportes de bootstrap altos (98/99/95). El clado *Rivularia* obtenido en nuestros análisis filogenéticos coincide con los reportados por Shalygin et al., (2017) y por González-Reséndiz et al., (2018).

La secuencia del morfotipo III, UNAM CR3 Atexcac, se agrupó con una secuencia nombrada *Calothrix* sp. (Identificación HM751843) que proviene de una muestra del río de agua salobre Amir, Murcia, España y tienen una similitud del 99.8% (Tab. 9). Esta secuencia nombrada como *Calothrix* sp., requiere de una revisión taxonómica profunda, porque la identificación taxonómica parece ser errónea.

Las secuencias del morfotipo IV, UNAM CR5 Atexcac y UNAM 777 Alchichica, se agruparon con una secuencia nombrada *Rivularia* sp. (KY296608), proveniente del raspado de una roca en Argentina y tienen un soporte de Bootstrap del 81/80/82 de los análisis ML/NJ/MP respectivamente y una similitud con la secuencia de 99.2 y 99.3% (Tab. 9).

Además una secuencia que se encuentra entre estos dos sub-clados nombrada como *Uncultured\_Cyanobacterium\_Clone\_Alchichica*, resultado de las investigaciones de Couradeau et al., (2011), se sitúa entre estas secuencias

teniendo un porcentaje de similitud del 99.4% con el morfotipo III y entre el 98.9 y 99% de similitud con las secuencias del morfotipo IV.

En el clado de *Rivularia* se agrupan secuencias con el nombre de *Calothrix* sp., y *Calothrix contarenii* las cuales requieren de revisión taxonómica profunda ya que podría tratarse de especies del género *Rivularia* mal identificadas.

Se cuenta con la evidencia morfológica para determinar a los morfotipos III y IV como dos especies nuevas del género *Rivularia*, además las secuencias de estos morfotipos tienen una similitud del 98.7 y 98.8% entre el morfotipo III y IV de las secuencias del gen 16S de ARNr por lo cual la evidencia molecular nos indica que se tratan de morfoespecies del género *Rivularia*. Se requiere corroborar si se trata de especies genéticamente distintas con evidencia molecular del análisis de la secuencia ITS entre el gen 16S y 23S de ARNr que otros autores han utilizado como evidencia para distinguir entre especies (Vaccharino et. Johansen, 2011; Shalygin, et. Al, 2017; León-Tejera, et- Al., 2016; González-Reséndiz, 2018).

En la matriz de similitud (Tab. 9) las secuencias de los morfotipos III y IV contenidas en el clado de *Rivularia* tienen un porcentaje de similitud de 96.7% al 97.9% con secuencias de *Kyrtuthrix huatulcensis* y *Nunduva cania*, que de acuerdo a los principios básicos del enfoque polifásico (Komárek, 2016; 2006) en donde se especifica que las secuencias con porcentajes de similitud mayores al 95% (Stackebrandt & Goebel 1994), pertenecen al mismo género, sin embargo los autores González-Reséndiz et al., (2018) y León-Tejera et al., (2016) coinciden que serían el mismo género si se tratara solo de la similitud

de las secuencias del gen 16S de ARNr, sin embargo morfológicamente son diferentes por lo que se sugiere en un futuro contar con las descripciones morfológicas de cada secuencia, así como otros enfoques moleculares (análisis de estructuras secundarias de la secuencia ITS entre los genes 16S y 23S de ARNr), y si es el caso del enfoque de ultraestructura y ecología para determinar géneros y especies.

En cuanto a las características del hábitat, las secuencias agrupadas en el clado de *Calothrix* marinas y salobres y la mayoría de las secuencias agrupadas en el clado *Rivularia* se encontraron en Finlandia en el Mar Báltico o en ambientes salobres como el Río Amir (Apéndice I). De acuerdo con Snoeijs-Leijonmalm et al., (2017) la salinidad promedio de las aguas superficiales en el golfo de Finlandia es de 1.2 a 5.6 g/L y en todo el mar Báltico es de 1.8 a 11.3 g/L. Esto nos muestra un ambiente similar a la salinidad de los lagos cráter la cual es según lo reportado por Kaźmierczak et al., (2011), Tavera & Komárek (1996) y Alcocer et al., (1998) es de 7.4 a 8.5 g/L para Alchichica y la de Atexcac es de 6.0 a 6.8 g/L (Tab. 1), nivel considerado como salobre, por lo cual tienen condiciones similares en cuanto a salinidad. Se requiere de una descripción morfológica de muestras naturales y del hábitat de las poblaciones secuenciadas del mar Báltico y del Río Amir para ser comparadas desde el enfoque morfológico.

Las características del hábitat como tipo de sustrato, humedad (Tab. 10) y exposición al sol, se registraron en este trabajo con el fin de proveer información de importancia taxonómica para futuras comparaciones entre las

poblaciones filogenética y morfológicamente similares de otras regiones del mundo.

Además de encontrar los morfotipos con características de la familia Rivulariaceae descritos en los estudios anteriores hechos en los lagos cráter, también se caracterizó un morfotipo con características del género *Scytonematopsis*, el cual se encuentra en la familia Scytonemataceae. El morfotipo V fue comparado principalmente con las especies *S. fuliginosa*, *S. pilosa* (Tab. 6) y coincide con la morfología del talo, en forma de fascículos, incrustado de partículas de  $\text{CaCO}_3$ , filamentos arreglados de manera paralela, isopolares y heteropolares irregulares, vainas firmes, sin lamelas, abiertas en las puntas, células más anchas que largas, con paredes ligeramente constreñidas y con un ancho continuo hasta las últimas células donde se atenúan y forman a veces un pelo hialino, heterocitos basales e intercalares y ramificaciones sencillas tipo *Dichothrix*. Esta evidencia muestra una relación morfológica del morfotipo V con las especies del género *Scytonematopsis* por lo cual se considera una especie de este género.

Sin embargo el largo de los filamentos no coincide con las descripciones encontradas en la literatura debido a que las especies como *S. fuliginosa* y *S. pilosa* sobrepasan el largo, siendo 6 a 15 veces más largo el filamento que el morfotipo V; en cuanto al ancho del filamento difieren los demás siendo el del morfotipo menor a  $18\mu\text{m}$  de ancho máximo y el ancho del filamento de las especies *S. fuliginosa* y *S. pilosa* se estima de 19 a  $46\mu\text{m}$ ; en cuanto al ancho del tricoma coincide ligeramente con el ancho del tricoma de *S. pilosa*; y el largo de las células no se describe sin embargo suelen ser más anchas que

largas al igual que el morfotipo V. Por lo cual se trata de una especie morfológicamente distinta a las ya descritas por lo que se considera una especie nueva, por lo cual se requiere de futuros trabajos de caracterización molecular para definir su estatus taxonómico de acuerdo al enfoque polifásico.

El género *Scytonematopsis* es muy complejo, debido a que las descripciones morfológicas de las especies no concuerdan totalmente con la especie tipo *S. woronichinii*, y en cuanto a la filogenia se tienen pocas secuencias del gen 16S de ARNr (solo de *S. contorta* y *S. maxima*) que en los análisis filogenéticos muestran un género polifilético, por lo que se sugiere estudios de mayor profundidad para caracterizar molecularmente la especie tipo y aclarar la posición filogenética.

Y finalmente, las observaciones hechas en este trabajo reportan filamentos con fases isopolares (Morfotipos I, II, III y V), lo cual no se considera como carácter propio de la familia Rivulariaceae, sin embargo al presentarse en dos géneros genéticamente distintos (*Ankylothrix* gen. nov. y *Rivularia*) además de *Kyrtuthrix huatulcensis* reportado por León-Tejera et al., (2016) y *Nunduva* reportado por González-Reséndiz et al., (2018) se tendría la evidencia morfológica para decir que el carácter de isopolaridad se presenta y es común en la Familia Rivulariaceae y no puede ser tomado como carácter único de la familia Scytonemataceae.

## **10.- Conclusiones**

Este trabajo muestra un acercamiento exitoso a través del enfoque polifásico a las poblaciones de cianobacterias heterocitas encontradas en los litorales de los lagos cráter de Alchichica y Atexcac permitiéndonos reconocer diferentes especies de cianobacterias de la familia Rivulariaceae con ciclos de vida similares entremezclados en el mismo hábitat. A pesar de que otros trabajos antes descritos hayan tenido una identificación de estos organismos, ya sea a través del enfoque morfológico o del enfoque molecular, no hubo un trabajo que contara con ambos enfoques para describir las poblaciones y definir las taxonómicamente, por lo que este trabajo resulta ser novedoso.

El enfoque polifásico en este trabajo consistió en clasificar a las poblaciones a través de análisis morfológicos estableciendo una hipótesis de identificación y clasificación, posteriormente los análisis moleculares del gen 16S del ARNr nos permitieron corroborar esas hipótesis y reinterpretar los datos observados morfológicamente y finalmente la descripción del ambiente en el que se encuentran las poblaciones dio coherencia al agrupamiento de las poblaciones de Alchichica y Atexcac con otras poblaciones distantes (Mar Báltico y Rio Amir principalmente).

Las descripciones de la morfología de las poblaciones de los lagos cráter de Alchichica y Atexcac, reportaron características que concuerdan con lo antes reportado (Tavera & Komárek, 1996; Kaźmierczak et. al. 2011; Couradeau, et. al. 2011).

La secuenciación y los análisis de la información molecular del gen 16S de ARNr en este trabajo mostraron ser una herramienta básica y confiable para la definición del estatus taxonómico de las poblaciones objetivo. En este trabajo el árbol filogenético mostró resultados que concuerdan con lo antes reportado para las secuencias de las poblaciones existentes en Alchichica (Couradeau et. al. 2011; Kaźmierczak et. al., 2011; Alcántara-Hernández et. al. 2012) dentro de los géneros *Rivularia*, como género monofilético y *Calothrix* como un género polifilético (del cual se originan nuevos géneros), y delimitación de la familia Rivulariaceae (Berrendero, et. al. 2008, 2011, 2016; Sihvonen et. al. 2007; Domínguez -Escobar, et. al. 2011).

A su vez el enfoque molecular con la posición dentro del árbol filogenético como los porcentajes de similitud aportó las evidencias para delimitar al género *Ankylothrix* gen. nov., como un género separado de *Calothrix*.

La delimitación de cinco morfotipos concordó con los resultados filogenéticos por lo que reforzó las evidencias para delimitar las poblaciones de los lagos Alchichica y Atexcac dentro de los géneros *Rivularia* y *Ankylothrix* gen. nov., tanto genéticamente como morfológicamente y morfológicamente una población dentro del género *Scytonematopsis*, la cual requiere de análisis moleculares para completar el análisis polifásico.

La descripción del hábitat, como los reportes de salinidad de los lagos cráter de Alchichica y Atexcac, concuerda con los ambientes en los que se encuentran otras poblaciones que en el análisis filogenético resultaron tener una similitud muy cercana a las secuencias reportadas en este trabajo. Se requiere en un



futuro contar con las descripciones morfológicas y del hábitat de las especies secuenciadas encontradas en el GenBank asociadas a las poblaciones reportadas en este trabajo para tener una mayor certeza de que se tratan de especies del mismo género y concretar las características que los definan molecular, morfológica y ecológicamente

Finalmente se define a través del enfoque polifásico (análisis molecular y morfológico) de muestras naturales y secuencias de cultivos derivados de estas, que las poblaciones de cianobacterias filamentosas con heterocito encontradas en el litoral de los lagos de Alchichica y Atexcac pertenecen a cuatro especies distintas y nuevas de dos géneros diferentes (*Rivularia* y *Ankylothrix*) de la familia Rivulariaceae y una morfoespecie nueva del género *Scytonematopsis*, de la familia Scytonemataceae. Se realizará en un futuro el análisis molecular de otras estructuras (como el ITS de los genes 16S y 23S de ARNr) para tener evidencias más específicas que delimiten molecularmente el género y las especies nuevas y su publicación.

## Referencias

- Allen, M. (1968) Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. *Journal of Phycology*, 4 (1): 1-4.
- Alcántara-Hernández, R., Valdespino-Castillo, P., Centeno, C., Alcocer, J., Merino-Ibarra, and Falcón, L. (2017) Genetic diversity associated with N-cycle pathways in microbialites from Lake Alchichica, Mexico. *Aquatic microbial ecology*, 7: 121–133.
- Alcocer, J., Hammer, U. (1998) Saline lake ecosystems of Mexico; *Aquatic Ecosystem Health and Management* 1: 291-315.
- Alcocer, J., Escobar, E., Lugo, A., Peralta, L., (1998) Littoral benthos of the saline crater lakes of the basin of Oriental, Mexico. *International Journal of Salt Lake Research*, 7: 87-108.
- Arredondo, J., Borrego-Enríquez, L., Castillo-Domínguez, R., Valladolid-Laredo, M., (1983) Batimetría y morfometría de los lagos Maars de la Cuenca Oriental, Puebla, México. *BIOTICA*, 8 (1): 37-47.
- Beltrán, Y., Centeno, C., García-Oliva, F., Legendre, P., Falcón, L., (2012) N<sub>2</sub> fixation rates and associated diversity (nifH) of microbialite and mat-forming consortia from different aquatic environments in Mexico. *Aquatic microbial ecology*, 67: 15–24.
- Berrendero, E., Perona, E., Mateo, P., (2008) Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria)

- from running water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58: 447–460.
- 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.
- Berrendero, E., Johansen, J., Kaštovský, J., Bohunická, M., Čapková, K., (2016) *Macrochaete* gen. nov. (Nostocales, Cyanobacteria), a taxon morphologically and molecularly distinct from *Calothrix*. *Journal of Phycology*, 52: 638–655.
- Bourelly, P., (1970) *Les algues d'eau douce III*. N. Boubée & Cie.; Paris.
- Can, Á., Ortega, H., García, N., Reyes, A., González, V., Flores, D., (2011) Origen y calidad del agua subterránea en la cuenca oriental de México. *Terra Latinoamericana*, 29 (2): 189-200.
- Castenholz, R. (2001) Phylum BX. *Cyanobacteria: Oxygenic photosynthetic bacteria*. In: Boone, D. & Castenholz, R. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Springer-Verlag 1 (2nd ed.): 473 – 599.
- Centeno, C., Legendre, P., Beltrán, Y., Alcántara-Hernández, R., Lidström, U., Ashby, M., Falcón, L., (2012) Microbialite genetic diversity and composition relate to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology*, 82: 724–735.

- Couradeau, E., Benzerara, K., Moreira, D., Gérard, E., Kaźmierczak, J., Tavera, R., López-García, P., (2011) Prokaryotic and Eukaryotic Community Structure in Field and Cultured Microbialites from the Alkaline Lake Alchichica (Mexico). *PLoS ONE*, 6 (issue 12): e28767.
- Desikachary, T., (1959) *Cyanophyta*. I.C.A.R. Monographs on Algae, New Delhi.
- Dominguez-Escobar, J., Beltrán, Y., Bergman, B., Díez, B., Ininbergs, K., Souza, V., Falcón, L., (2011) Phylogenetic and molecular clock inferences of cyanobacterial strains within Rivulariaceae from distant environments. *FEMS Microbiology Letters*, 316: 90–99.
- Elenkin, A., (1936–1949) *Monografía algarum cyanophycearum aquidulcium at terrestrium in finibus URSS inventarum [Blue-green algae of the USSR]*. Izdat. Akademii Nauk, SSSR.
- Falcón, L., Escobar-Briones, E., Romero, D., (2002) Nitrogen fixation patterns displayed by cyanobacterial consortia in Alchichica crater-lake, Mexico. *Hydrobiologia*, 467: 71-78.
- Fisher, M., Triplett, E., (1999) Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10): 4630- 4636.
- Frémy, P., (1929) *Les Nostocacées de la Normandie*. Not. Mem. Doc. Soc. Agric. Archéol. Hist. Nat. Manche, 41: 197–228.

- Fuentes, A., (1972) Regiones naturales del Estado de Puebla. Universidad Nacional Autónoma de México, 143 p..
- Gasca, D., (1982) Algunas notas de la génesis de los lagos-cráter de la Cuenca Oriental. Colección Científica del Instituto de Antropología, 47 p.
- Geitler, L., (1925) Cyanophyceae. In: Pascher A. (ed.), Süßwasserflora 12, Gustav Fischer Verl., Jena, 481 p.
- Geitler, L., (1932) Cyanophyceae. In: Rabenhorst's Kryptogamen Flora von Deutschland, Akad. Verlagsges., Leipzig, 14: 1196 p.
- Geitler, L., (1942) Schizophyta (Klasse Schizophyceae). In: Engler A. & Prantl K. (eds), Natürliche Pflanzenfamilien, Duncker & Humblot, Berlin, 1b: 1–232.
- Giovannoni, S., Turner, S., Olsen, G., Barns, S., Lane, D., Pace, N., (1988) Evolutionary Relationships among Cyanobacteria and Green Chloroplasts. JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 170 (8): 3584-3592
- Gérard, E., Ménez, B., Couradeau, E., Moreira, D., Benzerara, K., Tavera, R., López-García, P., (2013) Specific carbonate–microbe interactions in the modern microbialites of Lake Alchichica (Mexico), The ISME Journal, 7: 1997–2009.
- Gómez, A., Orozco, M., Luca, F., (2005) Petrogénesis ígnea de la Faja Volcánica Transmexicana. Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana, Vol. Conmemorativo del Centenario, Temas Selectos de la Geología Mexicana, Tomo LVII, (3): 227-283.

González-Reséndiz, L., Johansen, J., Alba-Lois, L., Segal-Kischinevzky, C., Escobar-Sánchez, V., Jiménez, L., Hauer, T., León-Tejera, H., (2018) *Nunduva*, a new marine genus of Rivulariaceae (Nostocales, Cyanobacteria) from marine rocky shores. *Fottea, Olomouc*, 18 (1): 86-105.

Google, INEGI, (2018) Mapa de la región Cuenca Oriental, Llanos de San Juan, estado de Puebla, México. Última consulta septiembre 2018 en <https://www.google.com/maps/@19.35599,-97.44775,94223m/data=!3m1!1e3>

Hall, T., (2005) BioEdit. Ibis Therapeutics, disponible en: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>

Kaźmierczak, J., Kempe, S., Kremer, B., López-García, P., Moreira, D., Tavera, R., (2011) Hydrochemistry and microbialites of the alkaline crater lake Alchichica, Mexico. *Springer, Facies* 57: 543-570.

Kent A., Jones S., Yannarell A., Graham J., Lauster G. Kratz T., Triplett E., (2004) Annual patterns in bacterioplankton community variability in a humic lake. *Microbial Ecology*, 48: 550-560.

Kimura, M., (1980) A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 111-120.

- Komárek, J., (2006) Cyanobacterial Taxonomy: Current Problems and Prospects for the Integration of Traditional and Molecular Approaches. *Algae*, 21(4): 349-375.
- 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. *Springer-Verlag, Polar Biology* 35: 759–774.
- Komárek, J., (2013) Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/3: Cyanoprokaryota: 3. Teil / 3rd part: Heterocytous Genera; Springer Spektrum, 19/3: 1131 p.
- Komárek, J., Kaštovský, J., Mareš, J., Johansen, J., (2014) Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera), using a polyphasic approach. *Preslia*, 86: 295–335.
- Komárek, J., (2016) A polyphasic approach for the taxonomy of cyanobacteria: principles and applications. *European Journal of Phycology*, 51 (issue 3): 346-353.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- León-Tejera, H., González-Reséndiz, L., Johansen, L., Segal-Kischinevzky, C., Escobar-Sánchez, V., Alba-Lois, L., (2016) Phylogenetic position

- reevaluation of *Kyrtuthrix* and description of a new species *K. huatulcensis* from Mexico's Pacific coast. *Phytotaxa*, 278 (1): 001–018.
- Mancilla, O., Bautista, A., Ortega, H., Sánchez, E., Can, Á., Guevara, R., Ortega, Y., (2014) Hidrogeoquímica de salinas Zapotitlán y los lagos-cráter Alchichica y Atexcac, Puebla. *IDESIA* 32 (1): 55-69.
- Müller, J., Müller, K., Neinhuis, C., Quandt, D., (2010) PhyDE. Disponible en: <http://www.phyde.de/>
- Ordoñez, E., (1906) Los Xalapazcos del Estado de Puebla. *Parergones del Instituto Geológico de México*, 1 (8): 348-405.
- Palinska, K., Thomasius, C., Marquardt, J., Golubic, S., (2006) Phylogenetic evaluation of cyanobacteria preserved as historic herbarium exsiccate. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56: 2253-2263.
- Prescott, G., (1962) *Algae of the western Great Lakes area*. Wm. C. Brown, Dubuque, Iowa.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., Stanier, R., (1979) Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria, *Journal of General Microbiology*, 111: 1-61.
- Shalygin, S., Shalygina, R., Johansen, J., Pietrasiak, N., Berrendero, E., Bohunická, M., Mareš, J., Sheil, C., (2017) *Cyanomargarita* gen. nov. (Nostocales, Cyanobacteria): Convergent evolution resulting in a cryptic



genus. Phycological Society of America, Journal of Phycology 53: 762–777.

Sihvonen, L., Lyra, C., Fewer, D., Rajaniemi-Wacklin, P., Lehtimäki, J., Wahlsten, M., Sivonen, K., (2007) Strains of the cyanobacterial genera *Calothrix* and *Rivularia* isolated from the Baltic Sea display cryptic diversity and are distantly related to *Gloeotrichia* and *Tolypothrix*; FEMS; Microbiology Ecology 61: 74–84.

Snoeijs-Leijonmalm, P., Andrén, E., (2017) Why is the Baltic Sea so special to live in?, pp. 23-84. En: Snoeijs-Leijonmalm P., Schubert H., Radziejewska T. (2017) Biological Oceanography of the Baltic Sea. Springer, Dordrecht.

Stackerbrandt, E., Goebel, B., (1994) Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, 44 (4): 846-849.

Stal, L., (2012) Cyanobacterial Mats and Stromatolites. pp. 65-126; en Whitton, B., (2012) Ecology of Cyanobacteria II: Their diversity in space and time. Springer, 760 pp.

Stanier, R., Sistrom, W., Hansen, T., Whitton, B., Castenholz, B., Pfennig, N., Gorlenko, V., Kondratieva, E., Eimhjellen, Whittenbury, K., Gherna, R.,

- Trüper, H., (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) Cyanophyta –sinice, Glaucophyta – glaukofity. Vol. 2 In: *Flora słodkowodna Polski [Freshwater microflora of Poland]*. Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warsaw.
- Tavera, R., Komárek, J., (1996) Cyanoprokaryotes in the volcanic lake of Alchichica, Puebla State, Mexico. *Algological Studies*, Vol. 83: 511-538.
- Vaccarino, M., Johansen, J., (2011) *Scytonematopsis contorta* sp. nov. (Nostocales), a new species from the Hawaiian Islands. *Fottea*, 11 (1): 149–161.
- Vilaclara, G., Chávez, M., Lugo, A., González, H., Gaytán, M., (1993) Comparative description of the crater-lakes basic chemistry in Puebla State, México. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 25: 435-440.
- Weisburg, W., Barns, S., Pelletier, D., Lane, D., (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173 (02): 697-703.
- Whitton, B., & Potts, M., (2012) Introduction to the Cyanobacteria. pp. 1-14, En Whitton, B., (2012) *Ecology of Cyanobacteria II: Their diversity in space and time*. London, Springer, 760 pp.

## Apéndice I

Secuencias utilizadas en este estudio para la generación de los árboles filogenéticos en donde se muestra la clave de identificación en el GenBank.

#	NOMBRE	CEPA	GENBANK	AMBIENTE	LOCALIDAD
1	<i>Brasilonema angustatum</i>	HA4187-MV1	NR125582	Banco de musgo.	Moleka Trail, Oahu, Hawaii.
2	<i>B. angustatum</i>	HA4187-MV1	NR125583	Banco de musgo.	Moleka Trail, Oahu, Hawaii.
3	<i>B. bromeliae</i>	SPC 951	DQ486055	-	-
4	<i>Calothrix contarenii</i>	SABC02 2701	KT740998	-	-
5	<i>C. desertica</i>	PCC710 2	AM230699	Arena.	Antofagasta, Chile.
6	<i>C. elsteri</i>	CCALA_953	NR117190	Tapete microbiano, Lago.	Isla James, Ross, Antartida.
7	<i>C. parasitica</i>	NIES-334	LC322121	-	-
8	<i>C. parietina</i>	144-1A+159-4	AF334695	-	-
9	<i>C. parietina</i>	2T10	FR798917	Pedestal de mármol en fuente Tacca.	Piazza SS. Annunziata, Firenze, Italia.
10	<i>C. parietina</i>	CCAP 1410-11	HE974991	-	Hallenslev Mose, Zelandia, Dinamarca.
11	<i>C. parietina</i>	CCAP 1410-10	HF678479	-	Durham, Inglaterra. Reino Unido.
12	<i>C. scopulorum</i>	NIES-268	LC322120	-	-
13	<i>Calothrix</i> sp.	PCC 7714	AJ133164	-	-
14	<i>Calothrix</i> sp.	XP9A	AM230670	Epilítico, litoral.	Mar Báltico, Kirkkonummi, Finlandia.
15	<i>Calothrix</i> sp.	BECID1 4	AM230671	Epilítico, litoral.	Mar Báltico, Helsinki, Finlandia.
16	<i>Calothrix</i> sp.	XSP10A	AM230679	Epilítico, litoral.	Mar Báltico, Kirkkonummi, Finlandia.
17	<i>Calothrix</i> sp.	BECID1	AM230680	Perifítica.	Mar Báltico, Helsinki, Finlandia.
18	<i>Calothrix</i> sp.	UKK341 2	AM230681	Agua del Mar Báltico.	Mar Báltico, Helsinki, Finlandia.
19	<i>Calothrix</i> sp.	BECID1 6	AM230682	Epilítico, litoral.	Mar Báltico, Helsinki, Finlandia.
20	<i>Calothrix</i> sp.	BECID3 3	AM230683	Epilítico, litoral.	Mar Báltico, Helsinki, Finlandia.
21	<i>Calothrix</i> sp.	CAL336 3	AM230684	Agua de lago Enaejaervi.	Vihti, Finlandia.
22	<i>Calothrix</i> sp.	BIR LS5	AM230686	Epilítico, Sublitoral del Mar Báltico.	Isla de Jurmo, Korppoo, Finlandia.
23	<i>Calothrix</i> sp.	BECID9	AM230688	Epilítico, litoral.	Mar Báltico, Helsinki, Finlandia.
24	<i>Calothrix</i> sp.	BECID6	AM230691	Perifítica.	Mar Báltico,

#	NOMBRE	CEPA	GENBANK	AMBIENTE	LOCALIDAD
					Helsinki, Finlandia.
25	<i>Calothrix</i> sp.	XP4B	AM230692	Perifítica.	Mar Báltico, Kirkkonummi, Finlandia.
26	<i>Calothrix</i> sp.	PCC 8909	AM230693	Agua del Mar Báltico.	Agua del Mar Báltico.
27	<i>Calothrix</i> sp.	AHLA9	AM230694	Sedimento del Mar Báltico.	Bahía Ahvenkoskenlahti, Golfo de Finlandia, Finlandia.
28	<i>Calothrix</i> sp.	CAL336 1	AM230697	Agua de lago Enaejaervi.	Vihti, Finlandia.
29	<i>Calothrix</i> sp.	PCC 7103	AM230700	-	-
30	<i>Calothrix</i> sp.	PCC771 5	AM230701	Fuente Termal.	Dax, Francia.
31	<i>Calothrix</i> sp.	ANT LPR24	AY493597	-	-
32	<i>Calothrix</i> sp.	MU27 UAM 315	EU009152	Epilítico en río calcáreo.	Río Muga, Girona, España.
33	<i>Calothrix</i> sp.	TJ12 UAM 372	EU009154	Epilítico en arrollo silíceo.	Arrollo Tejada, Madrid, España.
34	<i>Calothrix</i> sp.	CCAP 1410-5	HF678513	-	-
35	<i>Calothrix</i> sp.	UAM 342	HM751842	Epilítico en río calcáreo con aguas salobres.	Río Amir, Murcia, España.
36	<i>Calothrix</i> sp.	UAM 345	HM751843	Superficie roca calcareo en un río de agua salobre.	Río Amir, Murcia, España.
37	<i>Calothrix</i> sp.	UAM 373	HM751855	Epilítico en arrollo silíceo.	Arrollo Tejada, Madrid, España.
38	<i>Calothrix</i> sp.	UAM 374	HM751856	Epilítico en arrollo silíceo.	Arrollo Tejada, Madrid, España.
39	<i>Calothrix</i> sp.	HA4395 -MV3 clone B3-4 p5E	HQ847571	Entre briofitas en la pared.	Jardín Nacional Botánico Tropical McBryde, Kauai, Hawaii.
40	<i>Calothrix</i> sp.	HA4186 -MV5 clone B2 p10AB	HQ847580	Raspado de zona sombreada.	Sendero Moleka, Oahu, Hawaii.
41	<i>Calothrix</i> sp.	SAG_14 10-3	KM019954	-	-
42	<i>Calothrix</i> sp.	PCC 6303 clone operon1	KT336442	Agua dulce.	Lago Mendota, Madison, Wisconsin.
43	<i>Calothrix</i> sp.	PCC 6303 clone operon2	KT336443	Agua dulce.	Lago Mendota, Madison, Wisconsin, EUA.
44	<i>Calothrix</i> sp.	HA4860 -CV1 clone	KT336444	Raspado de roca en arrollo cerca del océano.	Olowalu, Maui, Hawái.

#	NOMBRE	CEPA	GENBANK	AMBIENTE	LOCALIDAD
		operon1			
45	<i>Calothrix</i> sp.	HA4860 -CV1 clone operon2	KT336445	Raspado de roca en arrollo cerca del océano.	Olowalu, Maui, Hawái.
46	<i>Calothrix</i> sp.	SEV5-4- C5 c-o1	KT336446	Costra de suelo.	Socorro Co., Nuevo México, EUA.
47	<i>Calothrix</i> sp.	SEV5-4- C5 c-o2	KT336447	Costra de suelo.	Socorro Co., Nuevo México, EUA.
48	<i>Chroococcidiopsis cubana</i>	SAG39. 79	AJ344558	-	Cuba.
49	<i>C. thermalis</i>	PCC 7203	NR102464	-	Greifswald, Alemania.
50	<i>Coleodesmium wrangelli</i>	144-2C + 159-2	AF334703	-	-
51	<i>Cyanomargarita calcarea</i>	GSENOs 1204C	KY296606	Pared calcarea húmeda en drenaje de la formación Carmel.	Monumento nacional, Gran Staircase-Escalante, Utah, EUA.
52	<i>C. calcárea</i>	GSENOs 1204C	KY296607	Pared calcarea húmeda en drenaje de la formación Carmel.	Monumento nacional, Gran Staircase-Escalante, Utah, EUA.
53	<i>C. melechinii</i>	APA- RS9	KY296603	Musgos y piedras en agua de manantial.	Península Kola, Rusia.
54	<i>C. melechinii</i>	APA- RS9	KY296604	Musgos y piedras en agua de manantial.	Península Kola, Rusia.
55	<i>C. melechinii</i>	APA- RS9	KY296605	Musgos y piedras en agua de manantial.	Península Kola, Rusia.
56	<i>Demonostoc muscorum</i>	Lukesov a 2/91	AM711524	Muestra de suelo agrícola.	Pizensky, Kraj, Nezamyslice, República Checa.
57	<i>D. geniculatum</i>	HA4340 -LM1 clone 37A	KU161660	Pared de cueva.	Cueva Maniniholo, Kauai, Hawaii.
58	<i>Dolichospermum circinalis</i>	1tu30s1 1	AJ630416	Lago Tuusulanjarvi.	Finlandia.
59	<i>D. planctonicum</i>	71	AJ293108	-	-
60	<i>Fischerella muscicola</i>	PCC 7414	AB075986	-	-
61	<i>F. thermalis</i>	PCC 7521	AB075987	-	-
62	<i>Gloeotrichia echinulata</i>	PYH6	AM230703	Lago Pyhaejaervi	Saekylae, Finlandia.
63	<i>G. echinulata</i>	PYH14	AM230704	Lago Pyhaejaervi	Saekylae, Finlandia.
64	<i>G. echinulata</i>	URA3	AM230705	Lago Urajaervi.	Finlandia.
65	<i>G. pisum</i>	SL6-1-1	KY296602	Epífita, zona costera, lago Stump.	Parque estatal Punderson, Ohio, EUA.
66	<i>Godleya alpina</i>	LCR-	HQ012539	-	-

#	NOMBRE	CEPA	GENBANK	AMBIENTE	LOCALIDAD
		CYTOL			
67	<i>G. alpina</i>	LCR-CY2	HQ012540	-	-
68	<i>Hapalosiphon delicatulus</i>	IAM M-266	AB093484	-	-
69	<i>H. hibernicus</i>	BZ-3-1	EU151900	-	-
70	<i>H. welwitschii</i>	-	AY034793	Muestra de suelo.	Australia.
71	<i>Hassallia byssoidea</i>	CCALA 823	AM905327	Tapete en roca granítica.	Moravia del Sur, República Checa.
72	<i>Kyrtuthrix huatulcensis</i>	C708_M 11 clone_1 -2-3	KT936560	Tapete epilítico en zona supramareal.	Bahía de San Agustín, Oaxaca, México.
73	<i>Macrochaete lichenoides</i>	SAG_32 -92	KU559618	Roca, ficobionte del líquen <i>Placynthium nigrum</i> .	Lanzarote, Punta del Papagayo, España.
74	<i>M. lichenoides</i>	SAG_32 -92	KU559619	Roca, ficobionte del líquen <i>Placynthium nigrum</i> .	Lanzarote, Punta del Papagayo, España.
75	<i>M. psychrophila</i>	TS40B-09 clone operon1	KR350574	Costra de suelo.	Sudoeste de la Meseta Tibetana, Ladakh, India.
76	<i>M. psychrophila</i>	TS40B-09 clone operon2	KR350575	Costra de suelo.	Sudoeste de la Meseta Tibetana, Ladakh, India.
77	<i>M. psychrophila</i>	TS40B-09 clone operon3	KR350576	Costra de suelo.	Sudoeste de la Meseta Tibetana, Ladakh, India.
78	<i>M. psychrophila</i>	CCALA_1092 clone operon1	KR350577	Costra de suelo.	Sudoeste de la Meseta Tibetana, Ladakh, India.
79	<i>M. psychrophila</i>	CCALA_1092 clone operon2	KR350578	Costra de suelo.	Sudoeste de la Meseta Tibetana, Ladakh, India.
80	<i>M. psychrophila</i>	CCALA_1092 clone operon3	KR350579	Costra de suelo.	Sudoeste de la Meseta Tibetana, Ladakh, India.
81	<i>M. psychrophila</i>	NU16B-09 clone operon1	KR350580	Costra de suelo.	Cordillera Karakoram Oriental, Valle Nubra, Ladakh, India.
82	<i>M. psychrophila</i>	NU16B-09 clone operon2	KR350581	Costra de suelo.	Cordillera Karakoram Oriental, Valle Nubra, Ladakh, India.
83	<i>M. psychrophila</i>	NU16B-09 clone operon3	KR350582	Costra de suelo.	Cordillera Karakoram Oriental, Valle Nubra, Ladakh, India.
84	<i>M. psychrophila</i>	NU16B-	KR350583	Costra de suelo.	Cordillera

#	NOMBRE	CEPA	GENBANK	AMBIENTE	LOCALIDAD
		09 clone operon4			Karakoram Oriental, Valle Nubra, Ladakh, India.
85	<i>M. psychrophila</i>	ANT SPH 13 96	KT336438	Costra de suelo.	Isla King George, South Shetlands, Antartida.
86	<i>M. psychrophila</i>	CCALA 32	KT336439	Pared de roca húmeda.	Traunstein Mountain, Austria.
87	<i>M. psychrophila</i>	ANT SPH 1396	KU559617	Costra de suelo.	Isla King George, South Shetlands, Antartida.
88	<i>M. santannae</i>	CCALA 1093 clone operon1	KT336440	Pared de roca húmeda.	Rodovia dos Tamoios, Caraguatatuba, Sao Paulo, Brasil.
89	<i>M. santannae</i>	CCALA 1093 clone operon2	KT336441	Pared de roca húmeda.	Rodovia dos Tamoios, Caraguatatuba, Sao Paulo, Brasil.
90	<i>Mastigocladus laminosus</i>	CALU 987	EU116033	Suelo tropical.	Guinea, África.
91	<i>M. laminosus</i>	1987/7 B	EU116034	Aguas termales.	Piestany, Eslovaquia.
92	<i>M. laminosus</i>	SAG 4.84	EU116035	Aguas termales.	Reyhijanes, Isafjord, Islandia.
93	<i>Microchaete grisea</i>	CCAP 1445-1	HE797730	Estuario salobre	Reino Unido.
94	<i>Microchaete</i> sp.	CENA17 6	KC695868	Suelo.	Bertioga, Brasil.
95	<i>Nodularia spumigena</i>	PCC 73104	DQ185241	-	-
96	<i>Nostoc calcicola</i>	III	AJ630447	Campo.	Ceske Budejovice, República Checa.
97	<i>N. carneum</i>	UAM 389	JQ070065	Epilítico, en río silíceo.	Río Guadarrama, Madrid España.
98	<i>N. commune</i>	EV1-KK1	AY577536	Suelo.	Ceske Budejovice, República Checa.
99	<i>Nunduva biana</i>	C708 M10	KT936561	Tapete epilítico en zona supramareal.	Bahía de San Agustín, Oaxaca, México.
100	<i>N. fasciculata</i>	C1290 CL1	KT936569	Tapete epilítico en zona supramareal.	Bahía Tangolunda, Oaxaca, México.
101	<i>N. fasciculata</i>	C57 M6	KT936565	Tapete epilítico en zona supramareal.	Bahía de San Agustín, Oaxaca, México.
102	<i>N. fasciculata</i>	C694 M8	-	-	-
103	<i>N. kania</i>	C58 M5	KT936572	Tapete epilítico en zona supramareal.	Bahía de San Agustín, Oaxaca, México.
104	<i>Petalonema alatum</i>	CBFS A-035 clone SK-12	KM047022	Roca húmeda.	Slovensky raj National Park, Slovaquia.
105	<i>P. alatum</i>	TY629	-	-	-
106	<i>Petalonema</i> sp.	ANT.LG	AY493624	-	-

#	NOMBRE	CEPA	GENBANK	AMBIENTE	LOCALIDAD
		2.8			
107	<i>Petalonema</i> sp.	HA4277 -MV1 clone p6G	HQ847568	Raspado de rocas en la zona de salpicaduras de cascada.	Palolo Valley Trail, Oahu, Hawaii.
108	<i>Phyllonema aviceniicola</i>	CENA32 4	KT731145	Epifilica en <i>Avicennia schaueriana</i> .	Bertioga, Brasil.
109	<i>P. aviceniicola</i>	CENA32 5	KT731146	Epifilica en <i>Avicennia schaueriana</i> .	Bertioga, Brasil.
110	<i>P. aviceniicola</i>	CENA33 0	KT731150	Epifilica en <i>Avicennia schaueriana</i> .	Bertioga, Brasil.
111	<i>Rexia erecta</i>	CAT 1M	AY452533	-	-
112	<i>Rivularia atra</i>	BIR KRIV1	AM230674	Perifítica, zona litoral.	Mar Báltico, Korppoo, Island of Jurmo, Finlandia.
113	<i>R. atra</i>	BIR MGR1	AM230675	Costra epilítico	Mar Báltico, Korppoo, Island of Jurmo, Finlandia.
114	<i>Rivularia</i> sp.	XSP25A	AM230665	Sedimento, zona Sublitoral.	Mar Báltico, Kirkkonummi, Finlandia.
115	<i>Rivularia</i> sp.	BECID1 2	AM230666	Epilítico, zona litoral.	Mar Báltico, Helsinki, Finlandia.
116	<i>Rivularia</i> sp.	XP27A	AM230667	Epilítico, zona litoral.	Mar Báltico, Kirkkonummi, Finlandia.
117	<i>Rivularia</i> sp.	XP3A	AM230672	Perifítica, zona litoral	Mar Báltico, Kirkkonummi, Finlandia.
118	<i>Rivularia</i> sp.	BECID1 0	AM230673	Epilítico, zona litoral.	Mar Báltico, Helsinki, Finlandia.
119	<i>Rivularia</i> sp.	XP16B	AM230676	Epilítico, zona litoral.	Mar Báltico, Kirkkonummi, Finlandia.
120	<i>Rivularia</i> sp.	PCC 7116	AM230677	Marina.	La Paz, Baja California, México.
121	<i>Rivularia</i> sp.	BL2 UAM 347	EU009143	Epilítico en río calcáreo.	Río Blanco, Teruel, España.
122	<i>Rivularia</i> sp.	MU15 UAM 369	EU009148	Epilítica en río calcáreo.	Río Muga, Girona, España.
123	<i>Rivularia</i> sp.	E7 UAM 313	EU009150	Epilítica en río calcáreo.	Río Endrinales, Río Albacete, España.
124	<i>Rivularia</i> sp.	VP408	FR798919	Biofilm a nivel del agua en fuente de concreto con agua estancada.	Villa La Pietra, Firenze, Italia.
125	<i>Rivularia</i> sp.	LEGE_0 7159	KC989702	Zona Itermareal.	Portugal.
126	<i>Rivularia</i> sp.	PUNA_N P3_PCI1 85B	KY296608	Epilítico	Argentina
127	<i>Scytonema</i>	PCC	AB075996	-	-



#	NOMBRE	CEPA	GENBANK	AMBIENTE	LOCALIDAD
	<i>hofmanni</i>	7110			
128	<i>S. hofmanni</i>	PCC 7110	AF132781	-	-
129	<i>Scytonematopsis contorta</i>	HA4267 -MV1 clone B35 p2	HQ847557	Barro de cascada.	Sendero Palolo Valley, Oahu, Hawaii.
130	<i>S. contorta</i>	HA4267 -MV1 clone B35 p3	HQ847558	Barro de cascada.	Sendero Palolo Valley, Oahu, Hawaii.
131	<i>S. contorta</i>	HA4292 -MV4 clone B2 p2	HQ847559	Pared mojada debajo de las cataratas de Maunawili.	Oahu, Hawaii.
132	<i>S. contorta</i>	HA4292 -MV4 clone B2 p3	HQ847560	Pared mojada debajo de las cataratas de Maunawili.	Oahu, Hawaii.
133	<i>S. contorta</i>	HA4292 -MV4 clone B2 p4	HQ847561	Pared mojada debajo de las cataratas de Maunawili.	Oahu, Hawaii.
134	<i>S. maxima</i>	LCR- FBC	HQ012541	-	-
135	<i>Scytonematopsis operon 1</i>	C708 M10 CL2	KT936563	Tapete epilítico en zona supramareal.	Bahía de San Agustín, Oaxaca, México.
136	<i>Scytonematopsis operon 2</i>	C708 M10 CL1	KT936562	Tapete epilítico en zona supramareal.	Bahía de San Agustín, Oaxaca, México.
137	<i>Sphaerospermopsis aphanizomenoides</i>	1LT27S 09	FM177473	Lago Trasimeno.	Umbria, Italia.
138	<i>S. reniformis</i>	06-01	FM161348	Estanque de peces, agua eutrófica.	Pesak, Sur de Bohemia, República Checa.
139	<i>S. reniformis</i>	ACCS 105	HQ700833	Muestra planctónica.	Cuenca del río Yenissei, Este de Siberia, Rusia.
140	<i>S. torques-reginae</i>	ITEP- 024	HQ730086	Tapacura reservoir.	Recife, Pernambuco, Brasil.
141	<i>Stigonema ocellatum</i>	CBFS-A- 032 clone NRO 1	KM047015	Barandal de madera.	Gatlinburg, EUA.
142	<i>S. ocellatum</i>	CBFS-A- 032 clone NRO 2	KM047016	Barandal de madera.	Gatlinburg, EUA.
143	<i>S. panniforme</i>	CBFS A- 026 clone Hawaii- 3	KM047020	Epilítica.	Oahu, Hawaii.
144	Uncultured cyanobacterium clone Alchichica	AQ1/1/1 /B25	JN825310	Microbialito en acuario,	Lago alcalino de Alchichica, Puebla, México

#	NOMBRE	CEPA	GENBANK	AMBIENTE	LOCALIDAD
<b>145</b>	Uncultured <i>Rivularia</i> sp.	ERIVAL H2	EU009142	Epilítico, río calcáreo.	Río Alharabe, Murcia, España.
<b>146</b>	UNAM 775	Ax12	-	Adherida a canto rodado sumergida en la orilla del lago.	Lago de Atexcac, Puebla, México
<b>147</b>	UNAM 777	Ach24	-	Creciendo sobre estromatolito sumergido en la orilla del lago.	Lago de Alchichica, Puebla, México
<b>148</b>	UNAM CR1	Ax17	-	Adherida a roca ígnea, sumergida en la orilla del lago.	Lago de Atexcac, Puebla, México
<b>149</b>	UNAM CR2	Ax19	-	Adherida a roca suave (precipitado de calcio) en la orilla recibe salpicadura del oleaje.	Lago de Atexcac, Puebla, México
<b>150</b>	UNAM CR3	Ax23	-	Adherida a conglomerado de rocas sumergido en la orilla del lago.	Lago de Atexcac, Puebla, México
<b>151</b>	UNAM CR5	Ax23	-	Adherida a conglomerado de rocas sumergido en la orilla del lago.	Lago de Atexcac, Puebla, México