



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EL CICLO DE VIDA DE *Cyclotella alchichicana*
(DIATOMEA: THALASSIOSIRALES) EN EL LAGO
ALCHICHICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

JUDIT CORREA RIZO



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ELIZABETH ORTEGA MAYAGOITIA
LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, ESTADO
DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Grupo de Investigación en Limnología Tropical de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM y a la Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia que fungió como asesora de tesis, por proporcionarme el apoyo para la realización del proyecto de investigación, los materiales necesarios y tiempo para llevar a cabo la experimentación y la redacción del escrito.

A Catriona A. Zúñiga Ramos por proporcionarme sus datos de densidad de *Cyclotella alchichicana in situ*.

A los sinodales elegidos y asignados para la evaluación del proyecto y las correcciones durante el proceso.

Dr. Alfonso Lugo Vázquez

Dra. Gloria Vilaclara Fatjó

Dr. Jorge Ciros Pérez

Biól. María de los Ángeles García Gómez

A los proyectos PAPIIT IN222916 y CONACYT CB-255788 por los recursos materiales para llevar cabo la obtención de los datos y su procesamiento.

Contenido	
Resumen	5
Introducción.....	6
Antecedentes y justificación	12
Objetivo general.....	13
Objetivos particulares	13
Sitio de estudio	13
Material y Métodos.....	14
Inducción de la reproducción sexual.....	14
Abundancia, variación de tamaño celular y evidencias de reproducción sexual en el lago Alchichica	18
Resultados	20
Reproducción sexual en laboratorio.....	20
Abundancia y variación de talla de <i>C. alchichicana</i> in situ	23
Evidencia de reproducción sexual en el lago Alchichica.....	28
Discusión.....	30
Reproducción sexual en laboratorio.....	30
Evidencias del ciclo de vida de <i>C. alchichicana</i> en condiciones naturales	32
Reproducción sexual en el lago	33
Ciclo de vida de <i>C.alchichicana</i>	34
Implicaciones ecológicas del ciclo de vida de <i>C. alchichicana</i>	36
Conclusiones.....	37
Referencias	38

Resumen

El ciclo de vida de la mayoría de las diatomeas centrales es muy peculiar, ya que implica una reducción paulatina del tamaño celular a lo largo de múltiples divisiones vegetativas. Para restablecer el tamaño de las células, las diatomeas se reproducen sexualmente, con la formación de un cigoto o auxospora; la auxospora desarrollará una célula inicial de tamaño máximo, que reiniciará el ciclo de divisiones vegetativas. *Cyclotella alchichicana* es una diatomea central endémica del lago Alchichica, donde constituye la mayor parte de la biomasa fitoplanctónica durante el florecimiento de invierno y en el máximo profundo de clorofila durante la estratificación. A pesar de haber sido observada durante varios años, hasta la fecha no se tiene evidencia de su fase sexual en la naturaleza, como ocurre con la mayor parte de las especies de diatomeas. En este trabajo de investigación, se probó bajo condiciones de laboratorio si el incremento gradual en la salinidad desde la original de 8.7 gL^{-1} a 11 y 14 g L^{-1} inducía la formación de auxosporas. Además, se realizó una búsqueda de auxosporas y células iniciales en muestras de campo y se registró la frecuencia del diámetro de la frústula a lo largo de un ciclo anual. La auxosporulación se presentó únicamente en la salinidad natural de Alchichica cuando las células tuvieron el tamaño el adecuado, independientemente de la manipulación de la salinidad. La morfología de la célula inicial, la auxospora y el ciclo de vida de *C. alchichicana* son similares a otras especies de diatomeas como *C. menenginiana*, *C. quillensis* y *Thalassiosira punctigera*. El mecanismo por el que se formaron las auxosporas no pudo establecerse debido a que no se observaron los gametos porque el proceso fue rápido.

La distribución de tamaños a lo largo del ciclo anual y la presencia de células iniciales en campo, sugieren que la reproducción sexual se presenta de manera natural en la mayoría de los meses. Es probable que cuando las diatomeas presentan tamaños pequeños, el copépodo *Leptodiptomus garciai* se alimente de ellas interrumpiendo la fase sexual del ciclo, disminuyendo el número de células iniciales que pueden observarse en el lago Alchichica .

Introducción

Las diatomeas son algas microscópicas unicelulares que presentan como característica particular una pared celular de sílice que encierra una célula eucarionte. Los componentes de silicio comprenden una frústula, la cual consiste de dos mitades superpuestas llamadas tecas. Cada teca a su vez consiste en la valva y una pared lateral hecha de una serie de tiras o anillos llamada cingulo. La valva más antigua y su cingulo se denominan epiteca y la valva más joven con su cingulo se llama hipoteca (Figura 1). Las valvas pueden estar ornamentadas o perforadas. La función de la frústula es proteger, facilitar rutas para la captación de nutrientes, el intercambio gaseoso y la secreción de productos celulares (Seckbach y Kociolek, 2011).

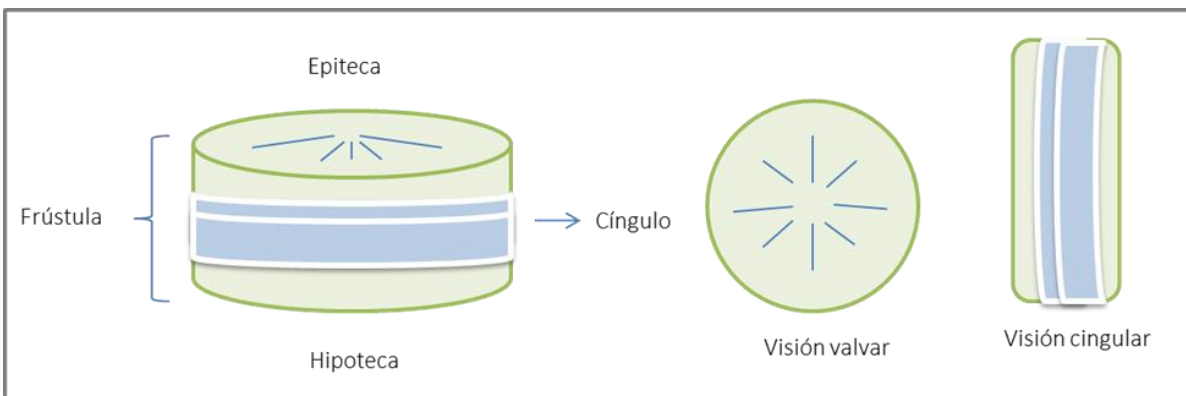


Figura 1. Estructura de la frústula en vista valvar y cingular.

La distribución de las diatomeas en los ambientes acuáticos es muy amplia debido a que toleran condiciones ambientales variadas en pH, salinidad, diferentes temperaturas e intensidades de luz, entre otras. Las diatomeas cumplen una importante función ecológica en los océanos y lagos, como fijar grandes cantidades de dióxido de carbono, intervienen en el ciclo del silicio (Cherpunov *et al.*, 2004), además de sintetizar carbohidratos y aceites como productos fotosintéticos de reserva que sirven como una fuente de alimento para el zooplancton dentro de la cadena alimenticia (Seckbach y Kociolek, 2011; Sadava *et al.*, 2009).

Por otra parte, se han realizado numerosos estudios acerca de la morfología del género *Cyclotella* para la descripción de nuevas especies; sin embargo, pocas especies han sido estudiadas a detalle en sus ciclos de vida (Meyer *et al.*, 2001), ya que durante la fase sexual del ciclo de vida de las diatomeas, la

morfología de las células es diferente a la de la fase vegetativa, por lo que es necesario realizar el seguimiento detallado de esta fase del ciclo en condiciones controladas.

Las diatomeas son organismos diploides en todas las etapas de su ciclo, excepto por sus gametos, que son haploides y deben combinarse con otro gameto sexualmente compatible para originar una nueva célula diploide (Kaczmarska *et al.*, 2013). Por lo tanto, el ciclo de vida se divide en dos fases principales:

1) Fase vegetativa: es larga y puede durar meses e incluso años. Durante esta fase la célula se divide por mitosis y con cada división se forman dos nuevas valvas mientras que la célula está totalmente rodeada de la pared intacta de la célula madre, por lo cual esas valvas nuevas son necesariamente más pequeñas (Figura 2). Por lo tanto, cada una de las células resultantes tendrá una de las valvas de la célula madre, que formará la epiteca, y una valva nueva más pequeña que será la hipoteca. A largo plazo, esta fase implica la producción de células cada vez más pequeñas y una reducción en el tamaño promedio de la frústula en la población.

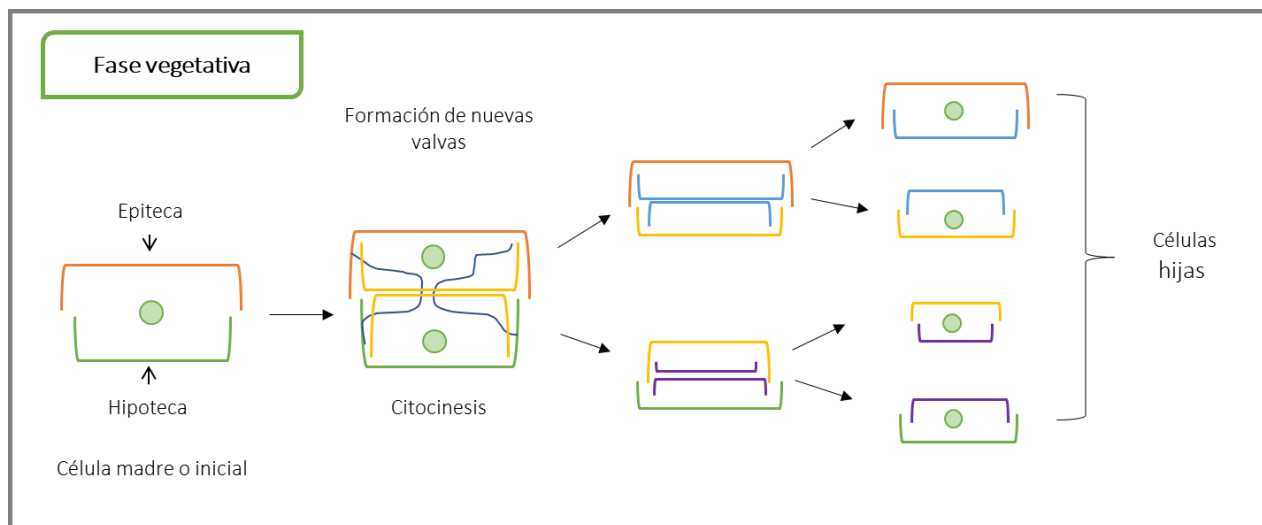


Figura 2. Fase vegetativa o asexual del ciclo de vida de una diatomea común. Esquemas basados en Seckbach y Kociolek (2011).

2) Fase sexual: esta dura unos cuantos días y normalmente involucra recombinación genética y el restablecimiento en el tamaño celular (Drebes, 1977). Durante esta fase, las células de menor talla producen gametos de ambos sexos para fecundarse y formar un cigoto llamado auxospora, que al terminar su desarrollo se convertirá en una célula inicial que reiniciará al ciclo (Figura 3).

Generalmente a la célula dentro de la cual se desarrolló la auxospora se le denomina preauxospora. La auxospora es la célula especializada que tiene la capacidad de expandirse de manera muy controlada. La forma de la auxospora depende de la forma de la célula vegetativa y en las diatomeas centrales tiene forma esférica y presenta escamas (Kaczmarska *et al.*, 2013).

La célula inicial es la primera célula vegetativa generada dentro de la auxospora madura, en donde se forma una nueva frústula con sus valvas iniciales. Normalmente, cada valva inicial se forma por mitosis acitocinética. La célula inicial es diploide y tiene hasta dos núcleos picnóticos, los cuales presentan la cromatina condensada y pueden fragmentarse. Las valvas de la célula inicial se diferencian morfológicamente de las preauxosporas debido a que las primeras se formaron dentro de la auxospora y las preauxosporas dentro de otra célula vegetativa (Kaczmarska *et al.*, 2013).

Una vez que ha terminado la formación de la célula inicial, comienza la fase de división vegetativa descrita antes. Hay un período refractario al comienzo del ciclo de vida en el cual las células de mayor tamaño serán incapaces de reproducirse sexualmente y formar auxosporas independientemente de las condiciones ambientales. Sólo cuando las células disminuyen de tamaño por debajo de un cierto umbral crítico pueden ser sexualizadas, llegar al umbral de tamaño sexual es una condición necesaria, pero no suficiente para que tenga lugar la reproducción sexual y puede estar sujeta a ciertas condiciones. Por ejemplo, se ha demostrado que alterando artificialmente el tamaño celular mediante manipulaciones nutricionales, estas disminuyen su tamaño e inician la reproducción sexual (Stoch, 1965 en Chepurnov *et al.*, 2004). Sin embargo, existe una gran cantidad de especies en las cuales no se ha observado la reproducción sexual y en muchos casos se desconoce el efecto de las condiciones ambientales en este proceso (Seckbach y Kociolek, 2011).

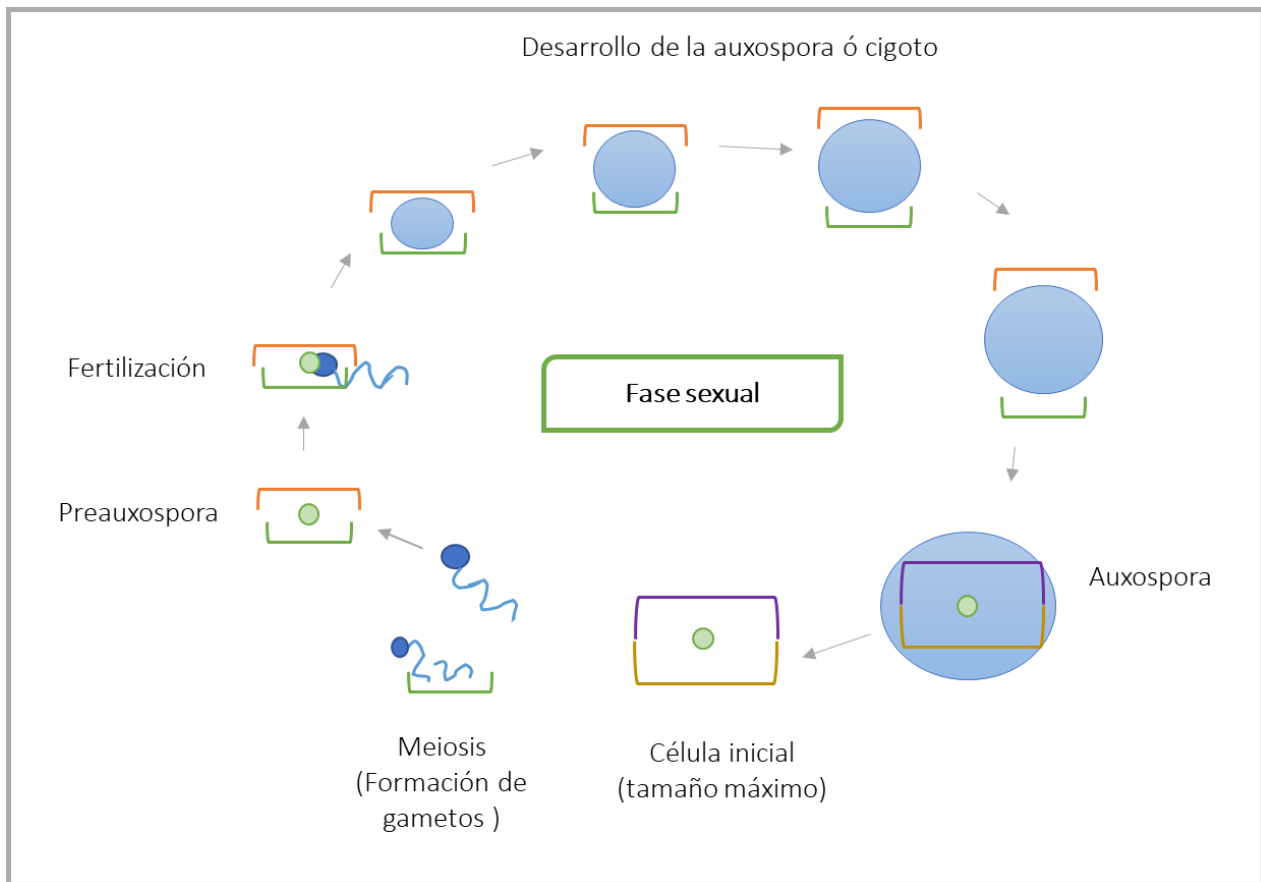


Figura 3. Fase sexual del ciclo de vida de una diatomea central. Esquema basado en Seckbach y Kociolek (2011).

Por otra parte, existe otro mecanismo por el cual la célula restaura su tamaño al máximo, conocido como agrandamiento celular vegetativo y se reporta en *Coscinodiscus wailesii*. Consiste en la expansión del protoplasto que encierra la frústula y una nueva formación de esta se considera un tipo de reproducción asexual, sin la formación de auxospora, ya que no ocurre meiosis dentro de la célula. La morfología de este tipo de célula no se diferencia del resto de las células vegetativas, salvo porque presenta un tamaño mayor (Kaczmarska *et al.*, 2013).

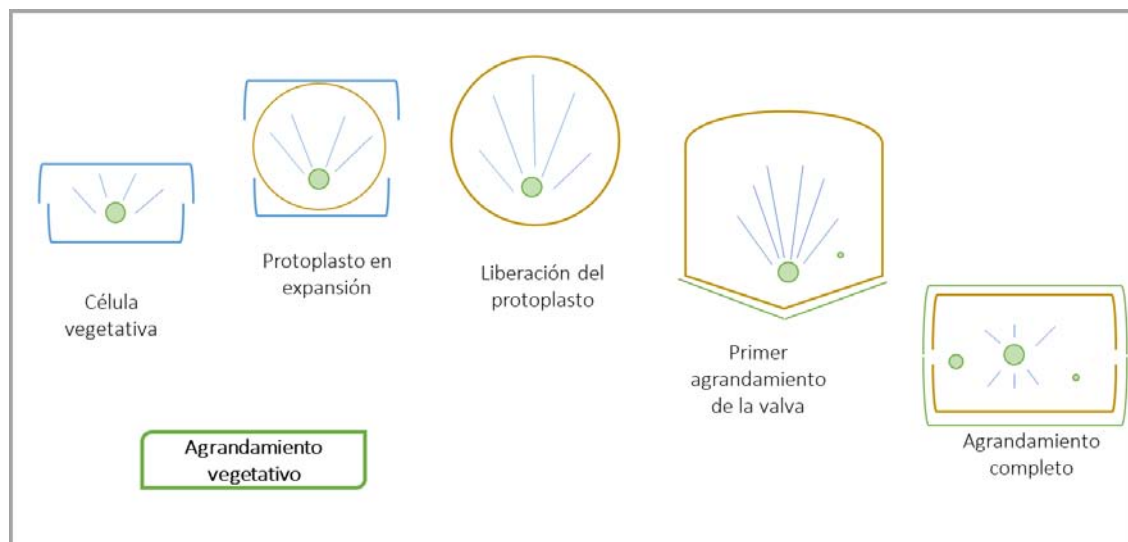


Figura 4. Agrandamiento vegetativo. Esquemas basados en Kaczmarska *et al.* (2013)

En la literatura se han registrado varios tipos de reproducción no vegetativa en diatomeas, en los que varía el origen de la auxospora:

1) Alomixis

Es un tipo de reproducción completamente sexual, donde la fecundación ocurre entre gametos provenientes de diferentes células individuales. Los gametos pueden derivarse de células de diferentes clones o del mismo clon, siempre y cuando los gametos sean compatibles. Dado que la fecundación se produce entre células distintas, los gametos son liberados al medio. Las diatomeas producen varios tipos de gametos: 1) los isogametos que son morfofisiológicamente idénticos, en el que la fecundación es isógama; 2) los anisogametos son morfológica y fisiológicamente distintos y la fecundación es oógama, por ejemplo, un espermatozoide móvil y pequeño con la capacidad de desplazarse con más facilidad hacia un óvulo grande (Kaczmarska *et al.*, 2013). En algunas diatomeas que forman anisogametos, el óvulo puede estar encerrado y solo una pequeña parte del óvulo está expuesto al exterior para permitir la fecundación, como ocurre en *Leptocylindrus danicus* y *Melosira moniliformis* (Kaczmarska *et al.*, 2013). También puede ocurrir que el oogonio esté abierto y exponga una gran área para la fecundación, por ejemplo, en *Atteya decora* (Drebes, 1977); o libere al medio los óvulos, haciendo que toda la superficie esté libre, como sucede en *Ditylum brightwellii* (Koester *et al.*, 2007).

2) Automixis

Es una forma de sexualidad reducida y la recombinación genética se produce por la fertilización entre gametos o núcleos haploides provenientes de la misma célula, se considera una forma extrema de endogamia. Este tipo de reproducción puede ser facultativa, o puede ser obligatoria (Cherpunov *et al.*, 2004).

Existen dos tipos de automixis: la autogamia y la pedogamia. La autogamia consiste en la fusión de dos núcleos gaméticos después de la meiosis II; los dos núcleos de fusión puede ser cualquier núcleo de los cuatro formados durante la meiosis II, como se ha observado en *Cyclotella meneghiniana* (Kaczmarska *et al.*, 2013). La pedogamia es la fusión de dos gametos producidos por un mismo gametangio; para que este proceso ocurra, la citocinesis debe ocurrir dentro del gametangio y esto aparentemente sucede en la meiosis I (Kaczmarska *et al.*, 2013).

3) Apomixis (asexual)

En este tipo de reproducción, la auxospora se forma de manera diferente, ya que la meiosis es remplazada por una pseudomeiosis; este proceso involucra la condensación de los cromosomas durante la profase de la meiosis, pero en este caso no se reduce el número de cromosomas. Después, la célula se divide por mitosis o por la diferenciación de un pseudocigoto (Kaczmarska *et al.*, 2013). Este tipo de reproducción se refiere así por analogía con plantas superiores, en donde el término apomixis generalmente se asocia con asexual, y la reproducción se da a través de semillas, por lo que la meiosis y la fecundación no ocurren; por ejemplo, *Achnanthes* cf. *subsessilis* presenta las mismas características de auxosporulación que hay en especies de *Achnanthes* sexuales, excepto que la fecundación y la meiosis han sido eliminadas de este proceso (Koen *et al.*, 2004).

4) Partenogénesis haploide

La partenogénesis haploide es un tipo de reproducción facultativa de algunas diatomeas penadas alógamas; en este tipo, algunos gametos haploides que no se fusionaron pueden convertirse en auxosporas, e incluso pueden formar una teca inicial, pero no se han observado en poblaciones naturales (Kaczmarska *et al.*, 2013); los ejemplos que mencionan Cherpunov *et al.* (2004) son: *Cymbella cesatii*, *Achnanthes longipes* y *Licmophora* sp., todas ellas bajo condiciones de cultivo.

Antecedentes y justificación

Cyclotella alchichicana Oliva, Lugo, Alcocer & Cantoral 2006 es una diatomea endémica del lago cráter Alchichica, ubicado en el estado de Puebla. Esta diatomea central constituye la mayor parte de la biomasa fitoplanctónica durante el invierno, mientras que en la época de estratificación forma un máximo profundo de clorofila metalimnético (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011). A pesar de que la población de *C. alchichicana* se ha estudiado continuamente desde hace varios años, hasta el momento no se han observado auxosporas u otros indicios de reproducción sexual *in situ* (MG. Oliva 2016, comunicación personal), aunque sí en condiciones de laboratorio en marzo del 2016 observación personal.

La auxosporulación se ha observado en distintas condiciones en especies del género *Cyclotella*. Por ejemplo, en *C. ocellata* se asocia a incrementos en la disponibilidad de nutrientes, produciendo cambios en el tamaño celular de la población a lo largo de un ciclo anual (Pérez-Martínez *et al.*, 1992). En *C. meneghiniana* ha sido posible inducir la producción de auxosporas con un incremento en la concentración de sales disueltas (Shirokawa y Shimada, 2013).

En los ambientes acuáticos, el tamaño de los organismos es importante dentro de las redes tróficas. La mayor parte de la biomasa de *C. alchichicana* no es depredada de manera significativa por el zooplancton presente, constituido por dos especies de rotíferos y el copépodo calanoide *Leptodiptomus garciai* (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2011) debido a su gran tamaño (diámetro 35 – 63 μm ; promedio 49 μm , n = 100; Oliva *et al.*, 2006), por lo que la mayor parte de su biomasa se sedimenta hacia el fondo (Ardiles *et al.*, 2012). Sin embargo, es probable que en invierno, cuando las hembras de *L. garciai* son más grandes (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2018) puedan alimentarse de algunas células de *C. alchichicana*, sobre todo de las de tamaños más pequeños (Ortega-Mayagoitia *et al.*, datos no publicados). Por lo tanto, la variación del tamaño de esta diatomea, debido a su ciclo de vida a lo largo del tiempo, puede influir en su destino en la red trófica del lago, pero hasta el momento no se ha investigado la variabilidad temporal en el tamaño de las frústulas.

En vista de lo anterior, es necesario realizar un seguimiento detallado de esta diatomea en el lago Alchichica, ya que se han observado auxosporas en condiciones de laboratorio, por lo que es necesario hacer seguimiento de experimentos, con miras a describir su ciclo de vida, incluyendo la descripción de la fase sexual y los cambios temporales en la distribución de tallas dentro de la población. A partir de esta información se tendrá un panorama más completo de la biología de la especie y sus posibles interacciones dentro de la comunidad pelágica del lago Alchichica.

Objetivo general

Describir el ciclo de vida de la diatomea central *Cyclotella alchichicana*.

Objetivos particulares

1. Inducir experimentalmente la reproducción sexual de *C. alchichicana* y describir las características de los gametos, preauxosporas y auxosporas.
2. Describir la abundancia y variación en el diámetro de las frústulas de *C. alchichicana* a lo largo de un ciclo hidrodinámico anual.
3. Documentar la ocurrencia de la reproducción sexual de *C. alchichicana* en el lago Alchichica.

Sitio de estudio

El lago Alchichica, es un lago cráter de la meseta Mexicana (19°24'22"N y 97°23'52", a 2300 m s.n.m.), tiene forma circular con un área de 2.3 Km², su profundidad máxima es de 62 m (Filonov *et al.*, 2006). El cuerpo de agua es hiposalino (media = 8.7 ± 0.9 g L⁻¹) (Ciros-Pérez *et al.*, 2015), presenta un pH= 9 ± 0.1) con una alcalinidad total de 37 meq l⁻¹ dominados por sodio, magnesio e iones de cloro-bicarbonato (Vilaclara *et al.*, 1993, Citado en Adame *et al.*, 2008). La temperatura del aire anual fluctúa de -5.5 a 30°C, con un valor medio de 14.4 °C (García, 1988). El lago es oligotrófico (Ramírez-Olvera *et al.*, 2009, Citado en Ardiles *et al.*, 2012) y monomítico cálido, presenta un periodo de mezcla durante los meses de enero a marzo (temperatura de 14.8 ± 0.4 °C) y otro de estratificación que va de junio a noviembre (epilimnion: 17.2 ± 1.4 °C; metalimnion: 16.1 ± 1.3 °C; hipolimnion: 14.7 ± 0.2 °C) (Adame *et*

al., 2008). Por otra parte y por las condiciones ambientales, el hipolimnion se vuelve anóxico durante la estratificación (Ciros-Pérez *et al.*, 2015).

El lago Alchichica cuenta con 18 especies de en el ambiente pelágico: 7 son estrictamente fitoplanctónicas y el resto ticoplactónicas (viven usualmente asociadas a sustrato, pero se encuentran en suspensión en la columna por azar) (Oliva *et al.*, 2001). Dentro de las especies de fitoplancton más importantes se encuentran dos que producen florecimientos; en invierno de *C. alchichicana* y en primavera la cianobacteria *Nodularia aff. spumigena*. El zooplancton se compone de un copépodo calanoide endémico *L. garciai*, y dos especies de rotíferos; *Brachionus sp. "México"* y *Hexarthra jenkiniae* (Ciros-Pérez *et al.*, 2015).

Material y Métodos

Inducción de la reproducción sexual.

El diseño experimental se realizó con el objetivo de probar si el aumento de la salinidad original del lago de Alchichica (8.7 g L^{-1}) a concentraciones mayores favorecía la auxosporulación en cultivos de *C. alchichicana*, tal como ha sido observado en otras especies del género *Cyclotella* (Meyer *et al.*, 2001).

Se realizó una colecta de organismos en marzo de 2016 con una red de arrastre de $80 \mu\text{m}$ en el epilimnion del lago Alchichica. Se retiró el zooplancton con un tamiz de $120 \mu\text{m}$ y las diatomeas se recuperaron en un contenedor de 5 L para posteriormente transportarlas al laboratorio en condiciones de oscuridad. En laboratorio, la muestra concentrada se homogeneizó mezclándola lentamente; se tomó una submuestra de 100 ml, de la cual se tomaron alícuotas de 8 ml con una micropipeta automática y se colocaron en tres placas multipocillos de seis pocillos de 10 ml (Evergreen Scientific), para que las 18 poblaciones de diatomeas se multiplicaran. Las cajas se mantuvieron en una cámara ambiental a $18 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y con $74.06 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ de luz continúa sobre un agitador orbital Bigger Bill a 30 rpm durante una semana. Siguiendo las recomendaciones de Watanabe (2005) no se agregaron nutrientes para evitar el crecimiento de especies oportunistas de crecimiento rápido. Se eligieron las poblaciones que tuvieran un mínimo de 100 células para iniciar los experimentos.

Para el experimento, se preparó medio de cultivo con agua natural del lago, que se obtuvo directamente del epilimnion, se filtró con un tamiz de $20 \mu\text{m}$ y se almacenó en un garrafón de 20 litros,

el cual se mantuvo en una cámara ambiental a 18°C. Se filtró aproximadamente 1 litro de esta agua con membranas Millipore de fibra de vidrio GF/F (0.2 μm) Whatman para retirar la mayor cantidad de organismos vivos y residuos. Después se fertilizó con medio f/2 (Watanabe, 2005).

Se establecieron dos tratamientos para inducir la reproducción sexual y consistieron en incrementar gradualmente la salinidad hasta llegar a 11 g L⁻¹ o 14 g L⁻¹. La salinidad se incrementó agregando sal marina artificial (Instant Ocean) al agua natural del lago Alchichica (preparada como se explicó en el párrafo anterior) de acuerdo al esquema de cambios mostrado en la Figura 5. Las diatomeas iniciaron en su salinidad de origen (8.7 g L⁻¹) y diariamente se cambiaron a otro pocillo con 8 ml de medio de cultivo a una salinidad ligeramente más alta (incrementos de 0.3 y 0.5 g L⁻¹) hasta llegar a la salinidad objetivo (Fig. 5), de modo que el tratamiento de 11 g L⁻¹ se completó en 6 días y el de 14 g L⁻¹ en 12 días. Las poblaciones se cambiaron con ayuda de un microscopio estereoscópico Motic SMZ-161 de luz fría, traspasándolas con una pipeta Pasteur. Posteriormente las cajas se dejaron en observación durante tres días en una cámara de cultivo en las condiciones descritas para los cultivos pre-experimentales. Se realizaron controles de manipulación, que consistieron en poblaciones a las que se les cambió la solución de sales marinas diariamente a un pocillo nuevo con medio de cultivo fresco durante el mismo periodo, pero con la salinidad de origen. Cada tratamiento y los controles tuvieron 3 réplicas. El contenido de los pocillos se fijó con lugol al final del experimento.

Al final de los experimentos, se midió en cámaras de sedimentación el diámetro de las diatomeas en un microscopio invertido Leica DMIBR: diámetro de las preauxosporas, auxosporas y células vegetativas, tratando de alcanzar una n = 100 por pocillo de cada estructura. Para los pocillos donde no ocurrió la auxosporulación solo se registró el diámetro de las células vegetativas. El registro fotográfico se realizó con un microscopio invertido Leica DMRIB con una cámara Moticam 2500 de 5.0 Mega pixeles.

Se compararon los promedios de los diámetros de las células vegetativas, auxosporas y preauxosporas. Como los datos no tenían una distribución normal, se realizó un análisis de varianza de rangos de una vía de Kruskal-Wallis y una prueba post-hoc de Dunn (Dytham, 2011).

Debido a que cada tratamiento de salinidad tuvo una duración distinta, el efecto de cada salinidad sobre el tamaño de las células vegetativas se analizó por separado (salinidad alterada vs. control). Por otra parte, se analizó el efecto del tiempo combinando los datos de cada tratamiento con su control (tratamiento de 11 g L⁻¹ + su control que duraron 6 días, vs. tratamiento de 14 g L⁻¹ + su control que duraron 12 días). En total se realizaron 3 ANOVAs de una vía para evaluar: efecto de salinidad 11 g L⁻¹, efecto de salinidad 14 g L⁻¹ y efecto del tiempo. Todos los análisis se hicieron con el programa SPSS ver 17.0.

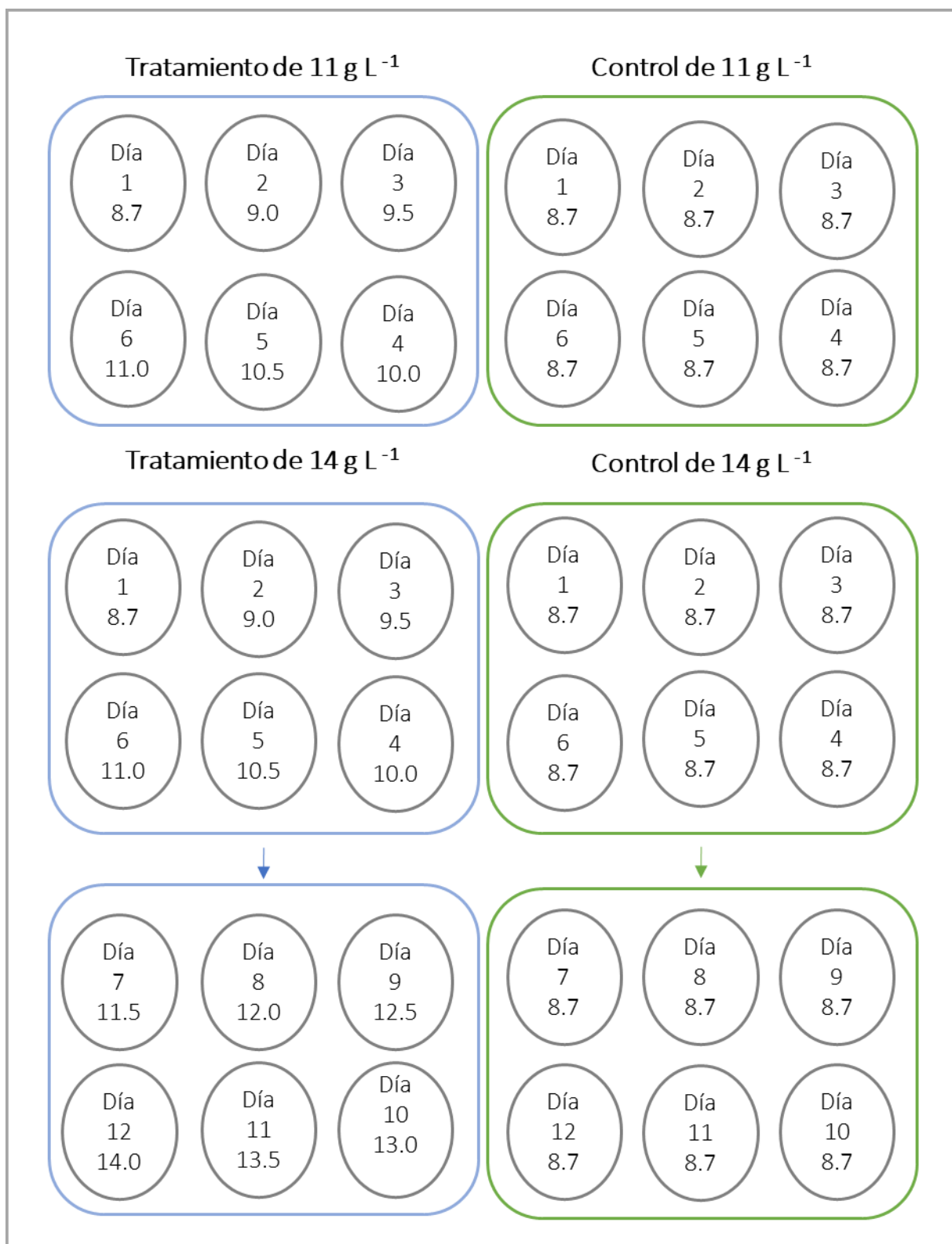


Figura 5. Diseño experimental que representa los tratamientos en salinidad de 11 g L⁻¹ (bloque superior) y de 14 g L⁻¹ (bloque inferior) cada pocillo representa el día de cambio y la salinidad del medio. Para cada tratamiento y control se realizaron 3 réplicas.

Abundancia, variación de tamaño celular y evidencias de reproducción sexual en el lago Alchichica

La información de la abundancia de *C. alchichicana* fue proporcionada por Biól. Catriona A. Zúñiga Ramos (Grupo de Investigación en Limnología Tropical, UIICSE), quien hizo los conteos correspondientes de muestras, que fueron colectadas cada mes en el lago durante el año 2016 con una botella tipo Niskin a diferentes profundidades (8-10 muestras cada mes). De todas las profundidades se fijaron 500 ml con lugol en botellas de PET. El conteo se realizó por el método de Utermöhl (Edler y Elbrächter, 2010), sedimentando de 50 a 100 ml de muestra, en un invertoscopio Zeiss con aumentos de 400x.

A partir de los datos de abundancia citados arriba, se eligieron las muestras que tuvieran la densidad más alta de cada mes -de una a tres profundidades (Tabla 1)- para describir la distribución de tamaños de las frústulas. Se sedimentaron 100 ml en cámaras de Utermöhl con el objetivo de medir al menos el diámetro de la valva de 100 individuos; sin embargo, en algunas muestras el material fue escaso (min.=30 y máx.=100 individuos). Las mediciones se realizaron en un microscopio invertido Leica DMIRB con un aumento de 400x. Para el análisis estadístico se hizo un submuestreo, se tomaron de cada profundidad las primeras mediciones, para homogenizar el tamaño de los grupos (número de mediciones por mes, de 30 a 60). Debido a que los datos no cumplieron con los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se optó por hacer un análisis de varianza de rangos de Kruskal-Wallis, tomando como variable dependiente el diámetro y como variable independiente los meses; posteriormente se realizó una comparación múltiple de rangos por el método de Dunn.

Tabla 1.-Muestras seleccionadas para las mediciones del diámetro de las diatomeas.

Mes	Profundidad (m)	Fases del lago
Enero	16 y 36	
Febrero	0, 25 y 50	Mezcla
Marzo	10, 40 y 60	
Abril	10, 30 y 60	
Mayo	50	Intermedia
Junio	50	
Julio	25	
Septiembre	30 y 60	Estratificación
Noviembre	40	
Diciembre	40	

Una vez terminado el proceso de medición de las valvas, se hizo un barrido de toda la cámara a un aumento de 200× para buscar células iniciales y auxosporas en cualquier fase de su desarrollo. Adicionalmente, se utilizó el registro fotográfico de una serie de muestras fijadas con lugol del mes de noviembre del 2010, para hacer una descripción completa sobre el ciclo de vida en sus condiciones naturales en profundidades de 0, 8.5, 20, 24 y 28 m, en el cual se encontraron células iniciales de *C. alchichicana*.

Resultados

Reproducción sexual en laboratorio

Se observó la formación de auxosporas en una réplica del control (8.7 g L⁻¹. i.e., salinidad nativa) del experimento que se analizaba la salinidad de 14 g L⁻¹ (véase, Fig. 5) Las auxosporas se observaron en 5 pocillos de una sola placa, de los días 7 al 11 del experimento de los 12 días programados. Se fijó el contenido de tres pocillos con lugol para hacer un registro fotográfico y mediciones del diámetro de preauxosporas, la auxosporas y células vegetativas que se encontraron, mientras que los otros pocillos se mantuvieron en observación. No se observaron gametos en ninguno de los pocillos.

Todas las auxosporas observadas tenían aún adheridas las valvas de la preauxospora (Fig. 6), y dado que cada preauxospora da origen a una sola auxospora, entonces el número de ambos tipos de célula es el mismo. El porcentaje de células implicadas en la reproducción sexual (pre-auxosporas + auxosporas) fue de 39 % contra el 61 % de células vegetativas (Tabla 2). El tamaño de las auxosporas fue muy variable, ya que son estructuras que se expanden a partir de las células más pequeñas de la población, pero su promedio fue significativamente mayor que el de las células vegetativas (prueba de varianza de rangos de una vía de Kruskal-Wallis $P < 0.001$; Tabla 2). De acuerdo con la prueba de Dunn $P < 0.05$, el tamaño de las distintas células se ordena de la siguiente manera: Preauxosporas < células vegetativas < auxosporas.

Considerando que el tamaño promedio ($38.4 \pm 5.4 \mu\text{m}$) de las preauxosporas el tamaño máximo de las células iniciales registradas en campo fue de $75 \mu\text{m}$ (ver más adelante), la reproducción sexual en esta especie probablemente se activa en células que han alcanzado en promedio el 51% del tamaño máximo observado. En el resto de las placas solamente se observaron células vegetativas ($43.1 \pm 4.3 \mu\text{m}$) véase Tabla 2.

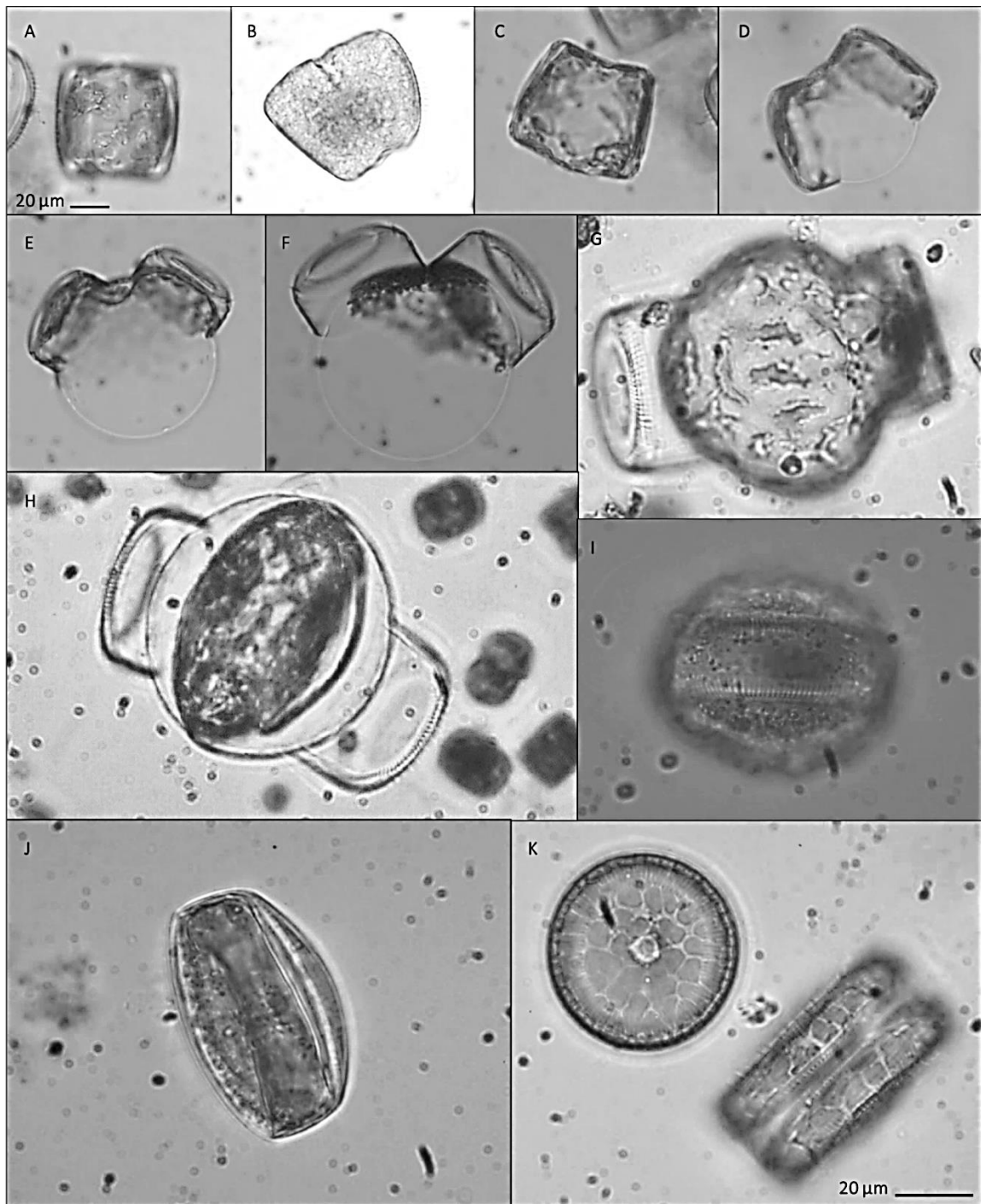


Figura 6. Se muestra en esta serie de fotografías, con diferentes individuos, las fases de formación de la auxospora. A) Célula que probablemente fue fecundada y que formará la auxospora, la cual aún no se expande; B-C) Fase inicial de separación de las valvas de la preauxospora; D-F) Crecimiento de la auxospora; G) Auxospora madura; H) Célula inicial formada, aún dentro de la auxospora; I-J) Vista cingular de distintas células iniciales; K) Dos células vegetativas, la de la izquierda en vista valvar y la de la derecha en vista cingular. Las fotografías A-F, fueron tomadas con el objetivo de 200x, y el resto con el de 400x, con microscopio invertido Leica DMIRB.

Tabla 2. Promedios (\pm desviación estándar) e intervalos del diámetro de la auxospora, células vegetativas, preauxospora, porcentaje de registros de auxosporas con respecto al de células vegetativas. *El porcentaje de auxosporas es el mismo que de preauxospora, ya que se midieron sobre la misma célula.

Diámetro	Células vegetativas (μm)	Preauxospora (μm)	Auxosporas (μm)
Promedio	43.1 \pm 4.3	38.4 \pm 5.4	56.17 \pm 8.6
Mínimo	30.8	29.5	34.4
Máximo	67.7	44.3	93.5
Porcentaje de la población	61%	*	39%

Los análisis de varianza de una vía indicaron que el tiempo y la salinidad tuvieron efecto sobre el diámetro de la diatomea. Las valvas tuvieron un tamaño mayor en el tratamiento de 11 g L⁻¹ con 43.9 \pm 5.9 μm (P < 0.001), pero disminuyeron en el de 14 g L⁻¹ (39.2 \pm 4.6 μm) (Tabla 3) (P < 0.001) con respecto a sus controles a salinidad nativa, por lo que el efecto de la salinidad en cada tratamiento fue opuesto. En cuanto al efecto del tiempo, se observó que a los 12 días el diámetro promedio de las fue menor que a los 6 días (40.2 \pm 5.3 vs. 42.9 \pm 4.7 μm ; P < 0.001).

Tabla 3. Diámetro de la valva (en μm , \pm desviación estándar) de las células vegetativas al día final de los experimentos, cada tratamiento con sus controles. El asterisco (*) indica la réplica donde sucedió la auxosporulación. Las (x) representan las réplicas en donde las poblaciones de diatomeas se deterioraron considerablemente y no llegaron al día final del experimento. n= número de mediciones en cada réplica.

Réplica	11 g L ⁻¹	n	Control	n	14 g L ⁻¹	n	Control	n
1	43.3 \pm 4.3	100	43.0 \pm 3.7	58	38.0 \pm 4.7	100	38.9 \pm 4.2	100
2	44.4 \pm 7.1	100	40.8 \pm 4.3	100	40.4 \pm 4.2	100	43.3 \pm 4.7 *	100
3	x		x		x		40.9 \pm 3.7	100
Promedio	43.9 \pm 5.9	200	41.8 \pm 4.3	158	39.2 \pm 4.6	200	40.9 \pm 4.5	300
Promedio total		6 días 42.9 \pm 5.3			12 días 40.2 \pm 4.7			

Abundancia y variación de talla de *C. alchichicana in situ*

La abundancia de *C. alchichicana* (celml^{-1}) se muestra en orden cronológico a lo largo del ciclo anual (Figura 7). El mayor número de células que se registró fue de 474 celml^{-1} durante septiembre a 35 m, porque que en esa profundidad se encuentra ya establecida la capa del metalimnion durante el periodo de estratificación. En los meses de febrero, marzo y abril la distribución de la abundancia a lo largo de la columna es homogénea dada la fase de mezcla del lago, en el que las condiciones ambientales como nutrientes, oxígeno y temperatura son homogéneas. De mayo a junio comienza a descender la abundancia, con un mínimo de 2 celml^{-1} a 20 m en junio, marcando la fase de transición del ciclo hidrodinámico del lago. De julio a diciembre, el mayor número de células se encuentran distribuidas entre los 30 a 40 m debido a que a esa profundidad se forma el máximo profundo de clorofila. Durante esta etapa se registraron en el epilimnion concentraciones menores a 1 celml^{-1} .

En cuanto a la variación del tamaño de las valvas de *C. alchichicana*, (véase Figura 8), la más pequeña tuvo un diámetro de $25.8 \mu\text{m}$ en el mes de septiembre y la de mayor tamaño de $72.0 \mu\text{m}$ en diciembre; el promedio general de toda la población fue de $45.0 \pm 6.5 \mu\text{m}$ ($n = 1,395$ células medidas).

A lo largo del tiempo, se observó un patrón claro en la variación del diámetro promedio de las valvas. En la primera mitad del año (enero a junio) se muestra un incremento paulatino de tamaño (Figura 8), una disminución brusca de junio a julio (de 52.0 a $41.6 \mu\text{m}$), y a partir de septiembre se mantuvo sin cambios significativos (en torno a $40.0 \mu\text{m}$). Los tamaños de las células más pequeña y más grande (que pueden indicar la presencia de preauxosporas y de células iniciales, respectivamente), siguieron una tendencia similar al promedio, aunque en la serie del tamaño máximo, en el último mes se observa un aumento muy notorio.

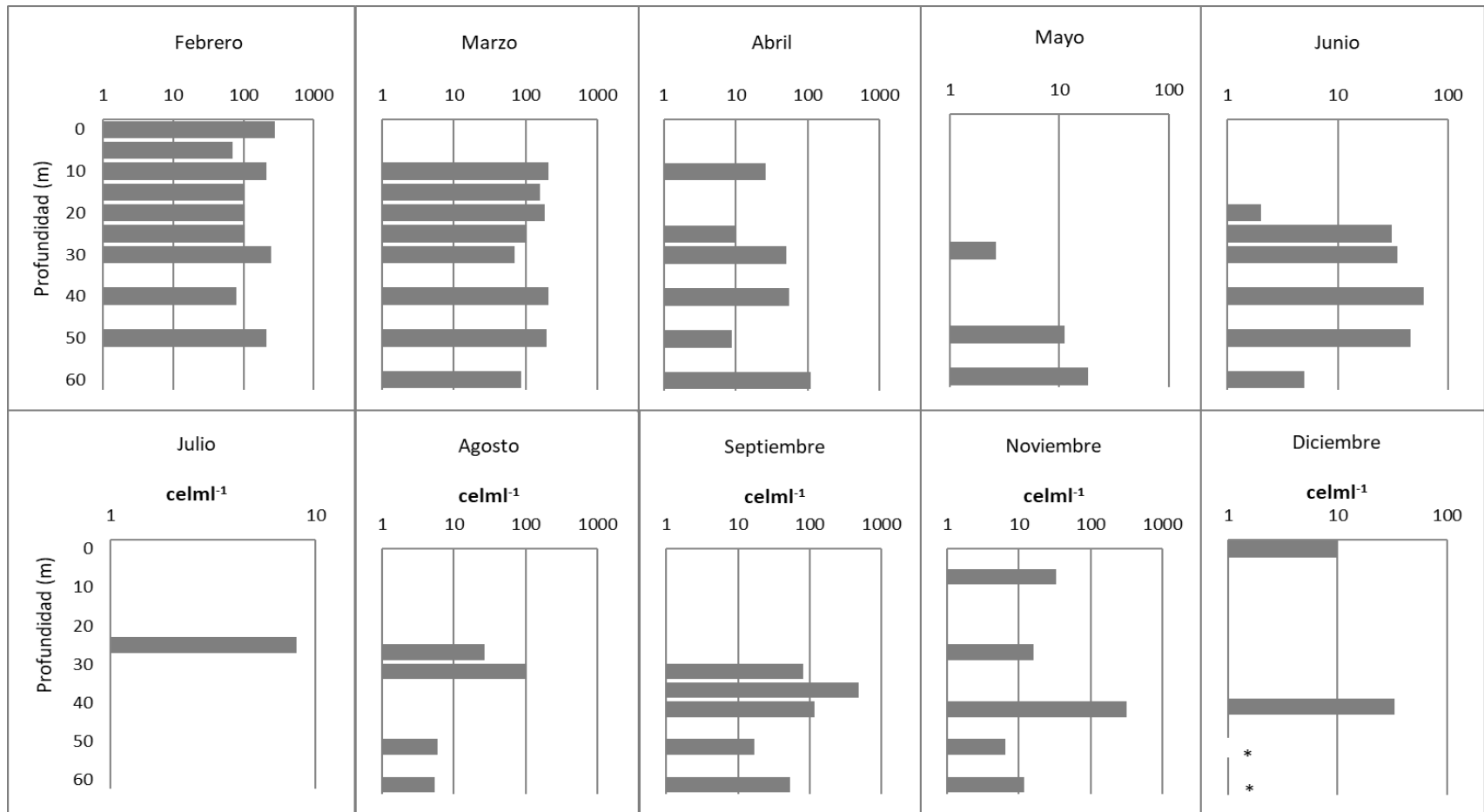


Figura 7. Abundancia de *C. alchichicana* a lo largo de la columna del lago Alchichica durante el ciclo anual 2016. Los (*) indican densidades menores a 1 celml⁻¹. Datos proporcionados por Biól. Catriona A. Zúñiga Ramos y procesados posteriormente.

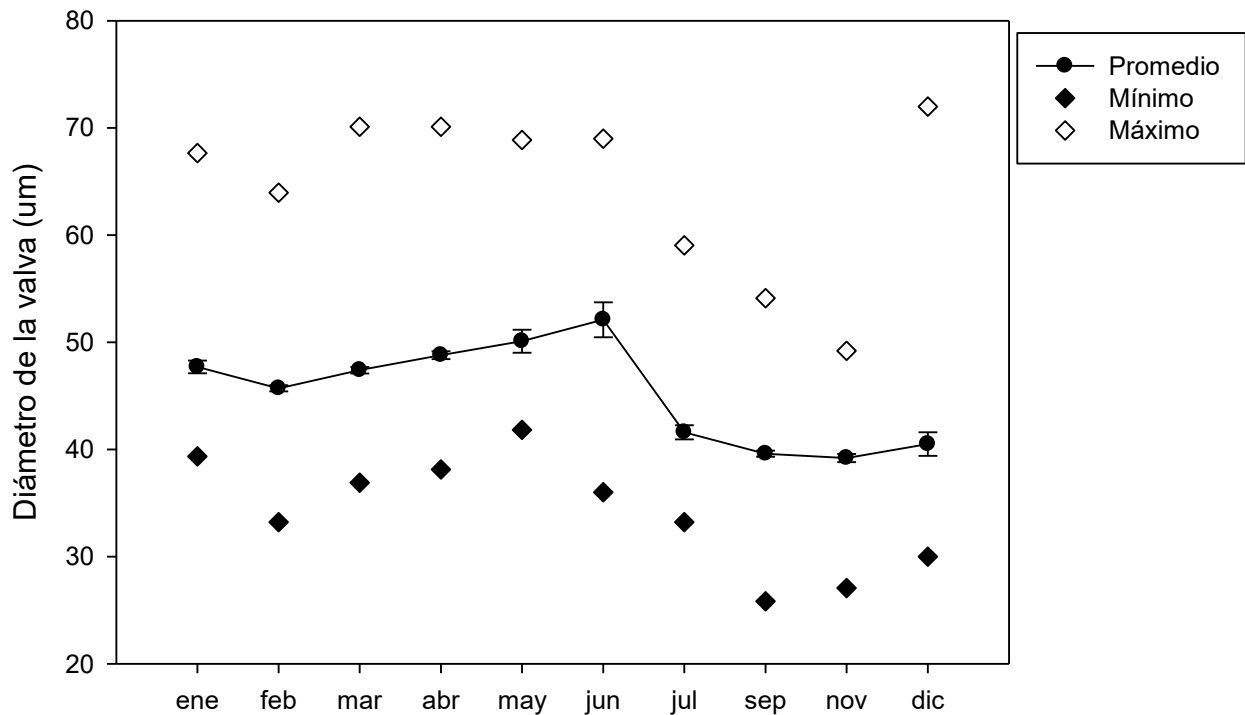


Figura 8. Representación del promedio, el valor máximo y mínimo del diámetro de las valvas de *C. alchichicana* cada mes a lo largo del ciclo anual 2016. Las barras verticales indican el error estándar del promedio.

Los resultados mostraron que existen diferencias entre las medias mensuales de los diámetros de las valvas (Kruskal- Wallis; $P < 0.001$). En la Tabla 4 se observa el resultado de la prueba de comparación múltiple de Dunn, la cual separó 2 grupos diferentes, uno que va del mes de enero a junio (con excepción de febrero) y otro que va de julio a diciembre más febrero, quedando las diatomeas de mayor tamaño más en el primer grupo que en el segundo.

Tabla 4. Resumen estadístico de la variación temporal del diámetro de la frústula de *C. alchichicana* y resultado de la comparación múltiple de medias por el método de Dunn. Los asteriscos indican que hay diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los meses comparados; ns = no significativo.

n	60	60	60	60	34	30	47	60	60	54
Promedio	46.8	43.1	47.0	49.4	50.1	53.1	41.6	39.2	38.9	40.5
Desv. Est.	5.3	4.7	3.8	6.6	6.3	9.0	4.5	4.5	4.4	8.1
Mediana	45.5	43.1	46.7	48.0	49.2	51.0	41.8	39.4	38.1	39.0
Mes	En	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Sep	Nov	Dic
En		*	ns	ns	ns	ns	*	*	*	*
Feb			*	*	*	*	ns	*	*	*
Mar				ns	ns	ns	*	*	*	*
Abr					ns	ns	*	*	*	*
May						ns	*	*	*	*
Jun							*	*	*	*
Jul								ns	ns	ns
Sep									ns	ns
Nov										ns

En la Figura 9 se muestra la distribución de tallas en cada muestreo. Se encontró que, en la primera mitad del año, las categorías de tamaño más frecuentes son las de 40 y 45 μm (40.0-44.9 y 45.0-49.9 μm , respectivamente), mientras que a partir de julio la categoría de 35 μm aumentó su frecuencia. Este tamaño fue el adecuado para formar auxosporas en el laboratorio, sin embargo, hubo meses con células de tamaño aún más pequeños, como septiembre, noviembre y diciembre. En lo que respecta a las células más grandes, entre las que pueden estar las células iniciales o las descendientes recientes de éstas, se observaron frústulas de más de 60 μm de enero a junio, mes en el que hubo una frecuencia muy alta en células de tallas mayores, con la desviación estándar más grande de todos los meses ($\sigma = \pm 9.0 \mu\text{m}$). De julio a noviembre, la mayor parte de las frústulas estuvo en las categorías inferiores a 50 μm , pero en diciembre volvieron a observarse células grandes.

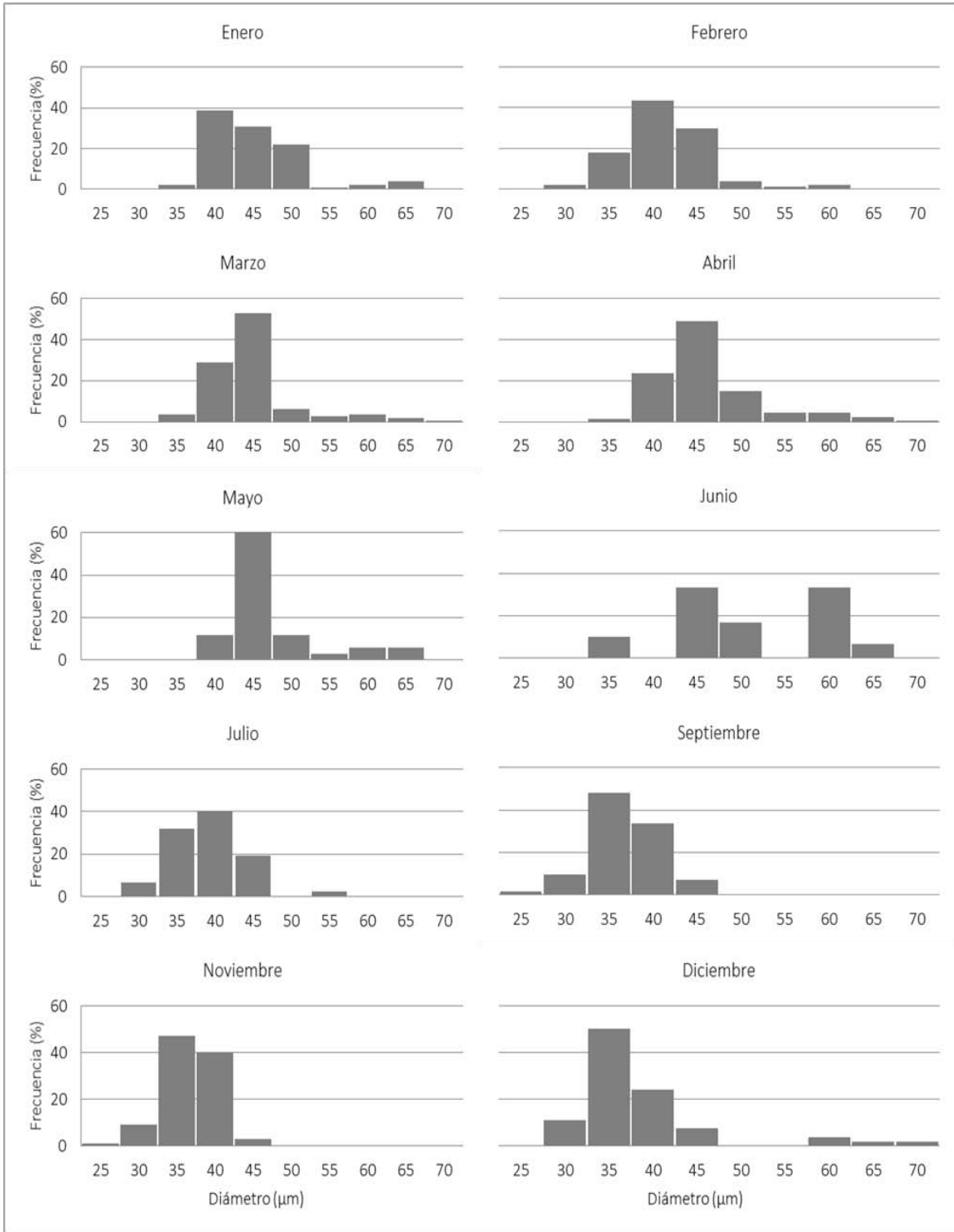


Figura 9. Histogramas de la distribución de tamaños de *C. alchichicana* a lo largo del ciclo anual 2016. Los números en el eje X indican el inicio de cada categoría (p.e., 40 corresponde al rango de 40.0-44.9 μm).

Evidencia de reproducción sexual en el lago Alchichica

En las muestras de columna de agua de noviembre de 2010 se identificaron plenamente algunas células iniciales ($n = 9$). Las células iniciales se hallaron a 0, 8.5, 20, 24 y 28 m, en una densidad de 0.02 cel ml^{-1} en cada profundidad (2 células en 100 ml) excepto a 24 m, donde la densidad fue de 0.01 cel ml^{-1} (Figura 11). A pesar de que se observaron muchas frústulas que por su tamaño podrían ser preauxosporas, no fue posible identificarlas como tales.

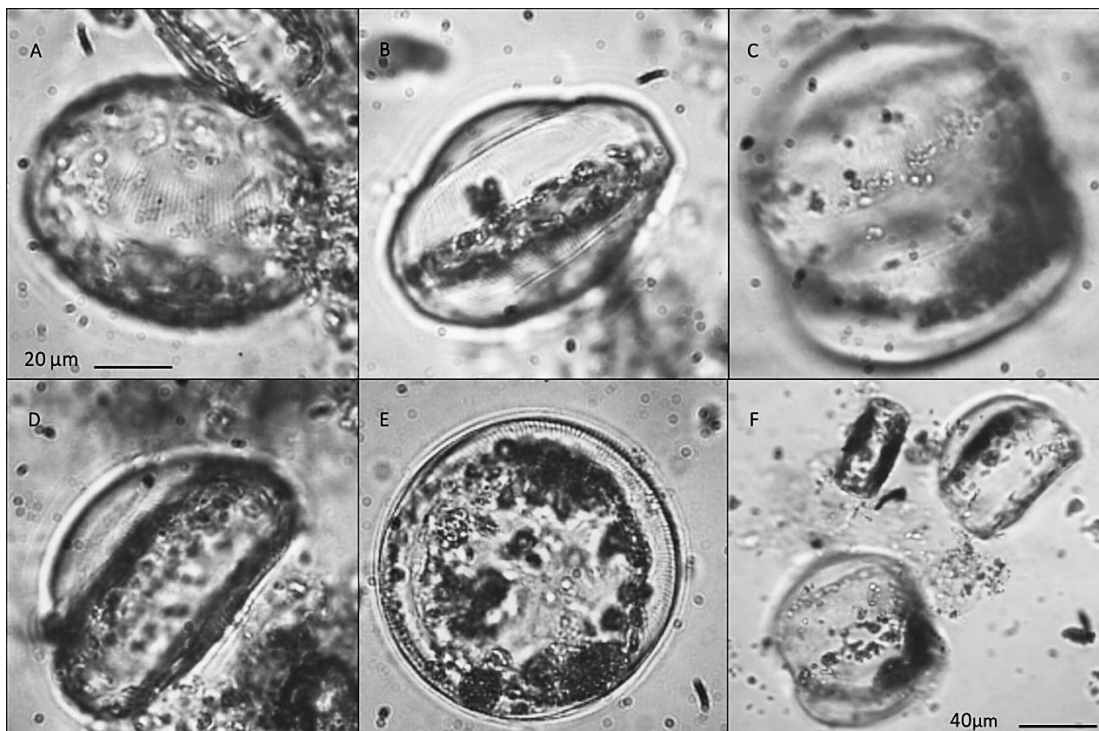


Figura 10. Células iniciales encontradas en la columna de agua del lago Alchichica en noviembre de 2010. A y B) célula inicial formada; C) división vegetativa de una célula inicial; D) célula vegetativa; E) Vista valvar de una célula inicial; F) de izquierda a derecha: célula inicial en división vegetativa, célula vegetativa y célula hija que resulto de la división de la célula inicial. La escala de $20 \mu\text{m}$ corresponde a las fotografías A-E. Las fotografías A-E, fueron tomadas con el objetivo de $400\times$, y F con el objetivo de $200\times$ con microscopio invertido Leica DMIRB.

Tabla 5. Diámetro promedio ($\pm \sigma$) de la frústula de *C. alchichicana* en las profundidades revisadas del mes de noviembre del 2010, junto con valor máximo y mínimo. La muestra de 28 m no fue medida.

Profundidad (m)	Células vegetativas				Células iniciales
	0	8.5	20	24	0 - 24
Promedio (μm)	47.5 \pm 5.5	46.8 \pm 7.0	46.9 \pm 9.9	45.7 \pm 13.1	70.4 \pm 4.5
Máximo (μm)	56.6	70.1	52.9	59.0	75.0
Mínimo (μm)	25.8	38.1	39.4	38.1	64.0
N	100	100	73	100	9

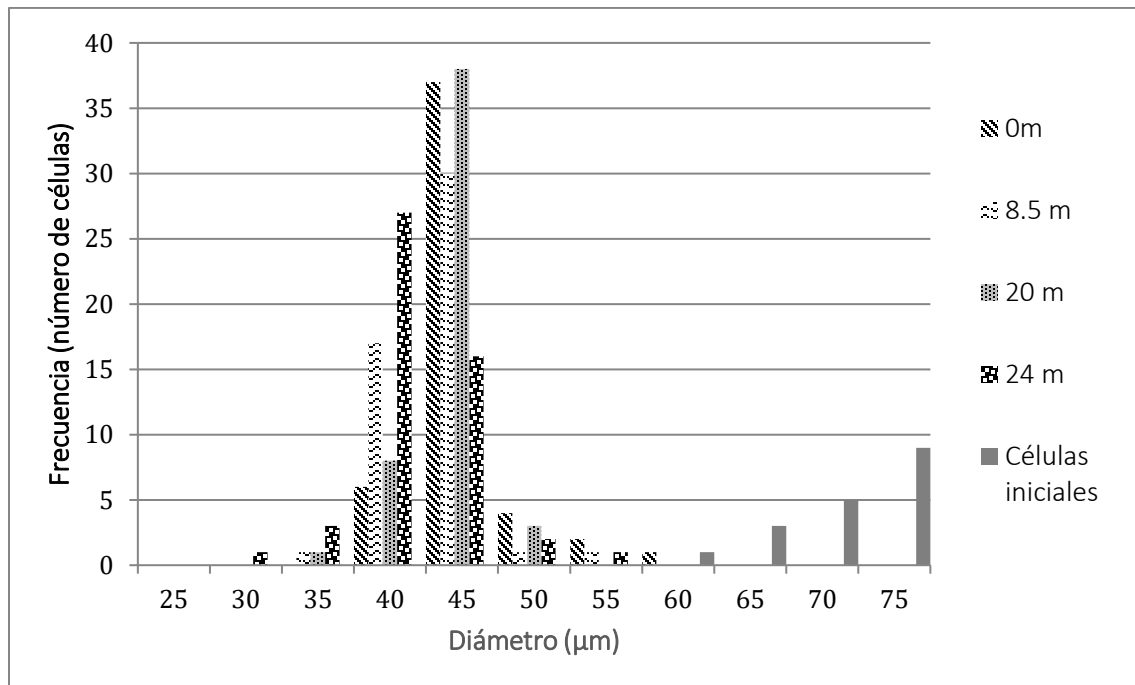


Figura 11. Distribución de tamaños de células vegetativas en el lago Alchichica durante el mes de noviembre del 2010 a diferentes profundidades, comparada con el diámetro y número de las células iniciales.

Discusión

Reproducción sexual en laboratorio

Los cambios graduales de salinidad (11 y 14 g L⁻¹) que se probaron en *C. alchichicana* no tuvieron un efecto directo en la producción de auxosporas, las cuales se produjeron en uno de los controles a la salinidad nativa (8.7 g L⁻¹).

Se conoce desde hace varias décadas que el incremento en la concentración de NaCl en el medio de cultivo favorece la inducción de la reproducción sexual en especies de diatomeas como *C. meneghiniana* y *C. cryptica* (Shultz y Trainor, 1968). En otro estudio con *C. meneghiniana* el cambio repentino de agua dulce a un medio de agua hiposalina (10.8 g L⁻¹) indujo el inicio de la meiosis dentro de las células, formando gametos femeninos y masculinos para la fertilización y, por lo tanto, la formación de auxosporas (Shirokawa y Shimada, 2013). Sin embargo, es probable que los incrementos en la salinidad no influyeran directamente sobre la inducción de la reproducción sexual en *C. alchichicana*, ya que esta especie habita de por sí en un lago hiposalino (8.7 g L⁻¹).

En otras especies de diatomeas se ha comprobado que un medio repleto de nutrientes favorece la formación de óvulos y espermatozoides para la formación de auxosporas dentro de un mismo clon en *D. brightwellii* (Koester et al., 2007). En *C. ocellata* la fertilización del medio con fósforo favorece la auxosporulación (Pérez-Martínez et al., 1992). Sin embargo, en el experimento llevado a cabo en esta tesis, todos los organismos se mantuvieron en la misma condición de nutrientes, es decir, con el medio de cultivo f/2, por lo cual es poco probable que este factor haya sido el inductor de la auxosporulación.

Por otra parte, se conoce que un requisito esencial para que ocurra la reproducción sexual en la mayoría de las diatomeas céntricas es la reducción en el tamaño de la frústula, como resultado de las divisiones consecutivas de la fase vegetativa, hasta llegar a un tamaño crítico (Chepurnov et al., 2004). De acuerdo con el tamaño de las preauxosporas encontradas en este mismo experimento, en el lago Alchichica hay células del tamaño adecuado para iniciar la reproducción sexual casi todo el año (aunque, si ocurre, puede ser en frecuencia baja), lo cual no fue la excepción en marzo de 2016 cuando se hizo la colecta de organismos para hacer el experimento (Figuras 8 y 9). Si la división de la muestra

de campo para fraccionarla en las 72 poblaciones iniciales no fue homogénea y había pocas células pequeñas, probablemente en los pocillos en los que se observó la auxosporulación, por azar hayan quedado células que por haber llegado al tamaño crítico, y/o en combinación con las condiciones del cultivo (luz, características químicas del medio f/2, etc.), comenzaron la reproducción sexual, como se ha observado en *C. ocellata* (Pérez-Martínez *et al.*, 1992).

En el experimento de laboratorio se registraron auxosporas en distintos grados de desarrollo, sin embargo no se observaron gametos en el medio de cultivo. El hecho de no observar gametos, pero sí auxosporas, tiene al menos dos posibles explicaciones. En la primera, aparecerían si la reproducción fuera alógama, es decir, que se produjeran gametos móviles que se liberan al agua para fecundar oogonios formados en células distintas, pero que la formación de gametos haya sido tan rápida que no fue posible detectarlos entre cada observación del experimento (cada 24 h). En algunas especies como *D. brightwellii*, la formación de gametos ocurre en un periodo muy corto (1 día) previo a la auxosporulación (Koester *et al.*, 2007). La segunda posibilidad es que la reproducción sea autógena, es decir, que una misma célula de *C. alchichicana* produzca ambos gametos y se autofecunde sin la necesidad de expulsarlos al medio, como ocurre en *Thalassiosira unguata* (Kelsey y Kamaczrska, 2006). Este tipo de reproducción también se ha observado en *C. meneghiniana*, considerándose un modo alternativo de reproducción a la alogamia predominante en esta especie (Chepurnov *et al.*, 2004). Ya que no se cuenta con la evidencia directa de ninguno de los dos mecanismos, no es posible establecer con claridad cómo ocurrió esta fase del ciclo de vida de *C. alchichicana*, por lo que es necesario realizar experimentos *ad hoc*.

Se observaron diferencias en el diámetro de las valvas de las células vegetativas entre los dos tratamientos aplicados, pero se debieron posiblemente a la duración diferente (tiempo) del periodo de incremento de salinidad, ya que debido a que el cambio fue gradual, el tratamiento de 14 g L⁻¹ duró 12 días y el de 11 g L⁻¹, solo 6 días. Durante ese tiempo, las células se dividieron y redujeron paulatinamente el tamaño promedio de la población, de manera que el tratamiento de 14 g L⁻¹ y su control, al haber permanecido más tiempo en condiciones experimentales, finalizaron con células de menor tamaño que el tratamiento de 11 g L⁻¹ y su control. Estas diatomeas aparentemente tienen una tasa de reproducción relativamente lenta, con una división aproximadamente cada 48 h (García-

Saldaña y Ortega-Mayagoitia, comunicación personal), por lo que en los seis días de diferencia que hubo entre la finalización de los dos tratamientos, probablemente ocurrieron unas tres divisiones por linaje, las cuales deberían explicar la diferencia de 2.6 μm en el promedio de las frústulas, lo cual equivale a 0.87 μm de reducción promedio por división. En *Aulacoseira baicalensis*, la división vegetativa ocurre cada 8 días y llega a reducir hasta 1 μm (Jewson y Ganin, 2015), el cual es un valor parecido al calculado para *C. alchichicana*.

En conclusión, se confirma la existencia de la reproducción sexual en *C. alchichicana*, pero el aumento de la salinidad empleada no tuvo efecto en su inicio, lo cual probablemente ocurrió cuando las células llegaron a su tamaño mínimo crítico, en conjunto con las condiciones durante los experimentos. Por lo comentado, hubiera habido mayor probabilidad de encontrar células sexuales, sí el tiempo de los experimentos hubiese durado unos días más.

Evidencias del ciclo de vida de *C. alchichicana* en condiciones naturales

De las muestras de la columna de agua del lago Alchichica se reunieron evidencias de dos tipos: de los cambios a lo largo del tiempo de las tallas de las frústulas de *C. alchichicana* y de células iniciales encontradas en campo en noviembre del 2010. Sin embargo, no se encontraron auxosporas ni gametos.

De acuerdo con los resultados, de enero a junio el diámetro promedio de las frústulas es mayor que el resto del año (de julio a diciembre y febrero) son más pequeñas. Se esperaba que la variación en el tamaño de las frústula fuera distinto, es decir, que disminuyera paulatinamente por las constantes divisiones vegetativas de cada generación que ocurren a lo largo del tiempo (Drebes, 1977) y después un aumento muy marcado en el diámetro de las frústulas como producto de la reproducción sexual, tal como se muestra en *C. ocellata* en condiciones naturales (Pérez-Martínez *et al.*, 1992).

El tamaño relativamente estable en los primeros meses puede deberse a que, por un lado, se presentaron, de manera constante, frústulas grandes de tamaño similar a las producidas por una reproducción sexual reciente, mientras que por el otro extremo, las células pequeñas (<30 μm) podrían ser eliminadas selectivamente por los copépodos (ver discusión más adelante) (Ortega-Mayagoitia *et*

al., 2018). En conjunto, estos dos mecanismos darían por resultado un promedio de tamaño de las frústulas más alto que el esperado solamente por las divisiones vegetativas.

De junio en adelante el tamaño máximo de las frústulas disminuye de manera continua, mientras que el tamaño promedio y el mínimo se mantienen casi constantes, lo cual coincide con la fase de estratificación plena. Las diatomeas tienen una alta tasa de sedimentación debido a que la frústula está compuesta de sílice, lo cual hace que las células tengan una densidad alta. Debido a ello, las diatomeas necesitan de la turbulencia de la columna de agua para mantenerse en suspensión (Reynolds, 2006), por lo que en la temporada de estratificación, las diatomeas tienden a sedimentarse y acumularse en el metalimnion. Es probable que dentro de la población de *C. alchichicana*, las células de mayor tamaño tengan una tasa de sedimentación más alta, por lo cual dichas células salen del metalimnion (son arrastradas por gravedad a aguas profundas), quedando los individuos más pequeños. Finalmente, en diciembre reaparecen células grandes, las cuales es posible que procedan de células iniciales formadas durante el mes anterior en donde las células vegetativas tenían el tamaño potencial para la reproducción sexual, como se ha mencionado anteriormente.

Reproducción sexual en el lago

En el lago Alchichica se encontraron células vegetativas que coinciden con el intervalo de tamaño de las preauxosporas observadas en el laboratorio (29.5 – 44.3 μm). Estas células de tamaño pequeño se encontraron la mayor parte del año, por ejemplo en febrero, septiembre, noviembre y diciembre (Figura 9), por lo cual existe el tamaño potencial para que se dispare la reproducción sexual de manera frecuente en Alchichica.

En las muestras mensuales revisadas de 2016 no se encontraron células iniciales ni auxosporas. Sin embargo, en una muestra aislada de noviembre de 2010 se observaron algunas células iniciales, con un intervalo de 64 a 75 μm . Suponiendo que las células vegetativas de mayor tamaño (categoría > 65 μm) son descendientes recientes de células iniciales (es decir, ha habido pocas divisiones vegetativas), entonces la presencia de células $\geq 65 \mu\text{m}$ puede considerarse una evidencia indirecta de que ha ocurrido la reproducción sexual en la población. Dado que en los meses de enero, marzo, abril, mayo, junio y diciembre se observaron células en esa categoría de tamaño y aunado a la presencia frecuente

de células pequeñas que potencialmente pueden ser preauxosporas, es probable que la reproducción sexual ocurra en distintas condiciones hidrológicas en el lago, desde la mezcla de invierno hasta el inicio y el final de la estratificación, es decir, en condiciones muy contrastantes de luz, nutrientes, turbulencia, etc. Esto contrasta con lo encontrado con otros autores, que reportan que la reproducción sexual está condicionada por la concentración de silicato (Jewson y Granin, 2015), fósforo y nitrógeno (Pérez-Martínez *et al*, 1992) o bajas temperaturas (Potapova y Snoeijs, 1997), en adición a alcanzar el tamaño adecuado.

Cabe mencionar que, es posible que en estudios anteriores del fitoplancton del lago Alchichica no se hayan encontrado evidencias de la reproducción sexual porque no se hicieron revisiones dirigidas a encontrar células de diferentes fases del ciclo de vida. Otra razón de no encontrar evidencia de la reproducción sexual es porque las células iniciales y las auxosporas que son de mayor tamaño, tienen altas tasas de sedimentación y tenderían a eliminarse rápidamente de la columna de agua. En efecto, no existen muchos registros del proceso de auxosporulación en condiciones naturales, ya que la mayoría de los estudios sobre la fase sexual de las diatomeas se han realizado en condiciones de laboratorio a través de las manipulaciones al medio de cultivo. Por otra parte, en ambientes oligotróficos como el lago Alchichica, es necesario realizar observaciones o colectas con mayor volumen de agua debido a que el mes que se encontraron células iniciales, su cantidad fue muy baja (2.35% del total).

Ciclo de vida de *C.alchichicana*

En la historia de vida de cada diatomea se han establecido tres puntos cardinales que reflejan los cambios de tamaño que pasan durante su ciclo de vida. Estas características morfométricas son estrictas y específicas de cada especie de acuerdo a varios autores (Drebes, 1977; Chepurnov *et al.*, 2004). En el caso de *C. alchichicana* son: tamaño máximo de las células iniciales: 75 μm ; el tamaño máximo de las células potenciales para la reproducción sexual: 44.3 μm ; el tamaño mínimo de las preauxosporas: 29.5 μm .

Fase vegetativa

Durante la fase vegetativa de *C. alchichicana*, una célula se divide generalmente para producir dos células nuevas; este patrón de división es similar en *C. gamma* (Meyer *et al.*, 2001) y *Stephanodiscus*

niagarae (Edlund y Stoermer, 1991). También puede llegar a formar trenes de divisiones vegetativas con más de 2 células unidas entre sí (datos no presentados), aunque fue raramente observado, pero es muy común en otras diatomeas céntricas como en *C. meneghiniana* (Meyer *et al.*, 2001), *S. marinoi* (Godhe *et al.*, 2014) y *Ellerbeckia arenaria* (Schmid y Crawford, 2001). Debido a la reducción paulatina de las frústulas en cada división vegetativa, el diámetro de las células observadas va de 25.8 a 72 μm , lo cual amplía el intervalo reportado por Oliva *et al.* (2006), que era de 35 a 63 μm .

El tiempo entre divisiones vegetativas es muy variable dentro de las diatomeas. Una célula de *C. alchichicana* se divide aproximadamente cada 48 horas (2 días), mientras que *A. baicalensis* que habita en un lago frío, se divide cada 8 días por lo que para llegar al umbral de diferenciación de gametos en esta especie puede tomar meses o años (Jewson y Granin, 2015). En el otro extremo, las células iniciales de *Diatoma monoliformis* tienen dos divisiones por día (Potapova y Snoeijs, 1997).

Reproducción sexual

La reproducción sexual en *C. alchichicana* se produjo cuando las células vegetativas alcanzaron un tamaño que va de 29.5 a 44.3 μm , lo cual implicó una reducción de 38.5 - 59 % tomando en cuenta el tamaño máximo de células vegetativas (72 μm). El porcentaje de reducción necesario para el inicio de la reproducción sexual es variable entre las especies. Por ejemplo, en *D. brightwellii*, se reduce cerca del 64% de su tamaño (Koester *et al.*, 2007), para *S. marinoi* se reporta el 50 % (Godhe *et al.*, 2014).

La morfología de las auxosporas de *C. alchichicana* tiene similitud con las de otras especies de diatomeas céntricas, como *Thalassiosira punctigera* (Cherapunov *et al.*, 2004), *Actinocyclus* sp. (Idei *et al.*, 2012), *C. meneghiniana*, *C. gamma* y *C. quillensis* (Meyer *et al.*, 2001). La auxospora es de forma esférica y porta dentro una célula inicial, con un tamaño máximo encontrado de 93 μm . El crecimiento de la auxospora hace que las valvas migren a los polos opuestos; la célula inicial se expande y finalmente libera las frústulas de la preauxospora; este proceso duró aproximadamente 4 días. En las células iniciales de *C. alchichicana* no se observan espinas marginales, probablemente porque se estaban formando o solo son visibles hasta la primera división vegetativa.

El tipo de reproducción de *C. alchichicana* no está clarificado aunque hay dos posibles mecanismos: autogamia o alogamia, aunque puede recurrir a ambos tipos de reproducción como se ha observado

en *C. meneghiniana*. Esta especie se ha comparado en muchos aspectos con *C. alchichicana*, ya que filogenéticamente es la diatomea con la que está relacionada más cercanamente (García-Saldaña, 2018).

Implicaciones ecológicas del ciclo de vida de *C. alchichicana*

La amplia variación del tamaño de estas diatomeas -debido a las sucesivas reducciones de las frústulas dadas durante la fase vegetativa y al aumento que se produce por la reproducción sexual- puede tener importantes implicaciones ecológicas, ya que se modifican los procesos de pérdida por la probable sedimentación de las células más grandes, lo que ya se ha discutido antes, y por la depredación sobre las más pequeñas. Por un lado, la sedimentación de *C. alchichicana* hacia el hipolimnion del lago Alchichica contribuye de manera importante a la acumulación de biomasa cuya degradación posteriormente contribuye a la anoxia de esta zona de la columna de agua (Ardiles *et al.*, 2012). Por otra parte, el copépodo calanoide *L. garciai* es la especie dominante del zooplancton a lo largo de todo el año y se alimenta de fitoplancton de tamaño $\leq 40 \mu\text{m}$ y tallas pequeñas de flagelados heterotróficos (Ciros-Pérez *et al.*, 2015), por lo que no podría alimentarse de las tallas más grandes de *C. alchichicana*. Recientemente se ha estudiado la plasticidad termal que tiene esta población de copépodos y se encontró que durante el invierno y primavera (noviembre-mayo), las hembras adultas son más grandes que durante el verano (Ortega-Mayagoitia *et al.*, 2018). De acuerdo a lo anterior, en nuestros resultados encontramos que las células pequeñas ($< 30 \mu\text{m}$) son potenciales candidatas para iniciar la reproducción sexual de *C. alchichicana* y se encuentran presentes durante la mayor parte del año, pero con menor frecuencia durante la primera parte, probablemente porque las hembras de *L. garciai* eliminan a las células más pequeñas de *C. alchichicana* al alimentarse. Por lo tanto, la reducción de tamaño de la diatomea implica que durante la primera mitad del año, esta especie puede convertirse en una fuente de alimento para el copépodo, mientras que por otra parte, la eliminación de las tallas pequeñas podría implicar que la fase sexual no sea observada con frecuencia en condiciones naturales. Sin embargo, falta hacer estudios a detalle sobre esta parte de la dinámica ecológica para tener datos concluyentes.

Conclusiones

1. La manipulación experimental de salinidad no provocó el inicio de la reproducción sexual en *C. alchichicana*; los resultados de esta investigación sugieren que el tamaño mínimo de la diatomea es el factor principal en este proceso.
2. El ciclo de vida de *C. alchichicana* es similar a otras especies de *Cyclotella* en cuanto a la morfología de las auxosporas y células iniciales. No se observaron gametos en condiciones experimentales ni en el lago, por lo cual no fue posible establecer el tipo de reproducción sexual.
3. Dados los tamaños extremos de las valvas observadas, es probable que la fase sexual del ciclo de vida de *C. alchichicana* ocurra en su hábitat natural a lo largo de todo el año.
4. La amplia variación del tamaño de estas diatomeas sugiere que los procesos de pérdida por sedimentación y depredación son variables. Las células de talla pequeña podrían ser consumidas por los copépodos, mientras que las más grandes podrían perderse por sedimentación, lo cual debe influir directamente en el tamaño y la estructura de la población y sus interacciones ecológicas.

Referencias

- Adame, M. F., Alcocer, J., y Escobar, E. 2008. Size-fractionated phytoplankton biomass and its implications for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshwater Biology*, 53: 22-31. Doi:10.1111/j.1365-2427.2007.01864.x
- Ardiles, V., Alcocer, J., Vilaclara, G., Oseguera, L. A., y Velasco, L. 2012. Diatom fluxes in tropical, oligotrophic lake dominated by large-sized phytoplankton. *Hydrobiologia*, 679: 77-90. Doi: 10.1007/s10750-011-0853-7
- Chepurnov, V. A., Mann, D. G., Sabbe, K., y Vyverman, W. 2004. Experimental studies on sexual reproduction in diatoms. *International Review of Cytology*, 237: 91-154. Doi: 10.16/S0074-7696(04)37003-8
- Ciros-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E., y Alcocer, J. 2015. The role of ecophysiological and behavioral traits in structuring the zooplankton assemblage in a deep, oligotrophic, tropical lake. *Limnology and Oceanography*, 60: 2158-2172. Doi: 10.1002/lno.10157
- Drebes, J. 1977. Sexuality. En Werner, B.D. (ed.). *The biology of diatoms* (pp. 253-283). Los Angeles, USA: University of California Press.
- Dytham, C. 2011. *Choosing and using statistics: A biologist's guide*. USA: Wiley-BlackWell.
- Edler, L. y Elbrächter, M. 2010. The Utermöhl method for quantitative phytoplankton analysis. En Karlson, B., Cusack, C., y Bresnan, E. (eds.). *Microscopic and molecular methods for quantitative phytoplankton analysis* (pp. 13-20). Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission.
- Edlund, B. M., y Stoermer, F. E. 1991. Sexual reproduction in *Stephanodiscus niagarae* (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 27: 780-793. Doi: 10.1111/j.0022-3643.1991.00780.x

- Filonov, A., Tereshchenko., y Alcocer, J. 2006. Dynamic response to mountain breeze circulation in Alchichica, a crater lake in Mexico. *Geophysical Research Letters*, 33: L07404. Doi: 10.1029/2006GL025901
- García Saldaña, E. A. 2018. Caracterización molecular de *Cyclotella alchichicana* (Diatomea: Thalassiosirales): delimitación específica y relaciones filogenéticas. Tesis de Licenciatura. Carrera de Biología. FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
- García, E. 1988. *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)* (217 p.). Mexico: Offset Larios.
- Godhe, A., Kremp, A., y Montresor, M. 2014. Genetic and microscopic evidence for sexual reproduction in the centric diatom *Skeletonema marinoi*. *Protist*, 165: 401-416. Doi: 10.10/j.protist.2014.04.006
- Idej, M., Osada, K., Sato, S., Toyoda, K., Nagumo, T., y Mann D. G. 2012. Gametogenesis and auxospore development in *Actinocyclus* (Bacillariophyta). *PLoS ONE*, 7 (8): e41890. Doi: 10.1371/journal.pone.0041890
- Jewson, H. D., y Granin, G. N. 2015. Cyclical size change and population dynamics of a planktonic diatom, *Aulacoseira baicalensis*, in Lake Baikal. *Journal of Phycology*, 50: 1-19. Doi: 10.1080/09670262.2014.979450
- Kaczmarska, I., Poulíčková, A., Sato, S., Edlund, M. B., Idej, M., Watanabe, T., y Mann, D. G. 2013. Proposals for a terminology for diatom sexual reproduction, auxosporas and resting stages. *Diatom Research*, 28: 263-294. Doi: 10.1089/0269249X.2013.191344
- Kelsey, E. M., y Kaczmarska, I. 2006. Autogamic reproductive behaviour and sex cell structure in *Thalassiosira angulata* (Bacillariophyta). *Botanica Marina*, 49: 417-430. Doi:10.1515/BOT.2006.053

- Koen, S., Chepurnov, V. A., Vyverman, W., y Mann, D. G. 2004. Apomixis in *Achnanthes* (Bacillariophyceae); development of a model system for diatom reproductive biology. *Journal of Phycology*, 39: 327-341. Doi: 10.1080/0967026042000236445
- Koester, J. A., Brawley, S. H., Karp-Boss L., y Mann, D.G. 2007. Sexual reproduction in the marine centric diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 42: 351-366. Doi: 10.1080/09670260701562100
- Meyer, B., Wulf, M., y Håkansson, H. 2001. Phenotypic variation of life-cycle stages in clones of three similar *Cyclotella* species after induced auxospore production. *Diatom Research*, 16: 343-361. Doi: 10.1080/0269249X.2001.9705525
- Oliva, M. G., Lugo, A., Alcocer, J., Peralta, L., y Sánchez, M. R. 2001. Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake. *Hydrobiologia*, 466: 299-306. Doi: 10.1023/A:101457802
- Oliva, M. G., Lugo, A., Alcocer, J., y Cantoral, E. A. 2006. *Cyclotella alchichicana* sp. nov. from a saline Mexican lake. *Diatom Research*, 21: 81-89. Doi: 10.1080/0269249X.2006.9705653
- Ortega-Mayagoitia, E., Ciro-Pérez, J., y Sánchez-Martínez, M. 2011. A story of famine in the pelagic realm: temporal and spatial patterns of food limitation in rotifers from an oligotrophic tropical lake. *Journal of Plankton Research*, 33: 1574-1585. Doi: 10.1093/plankt/fbr05
- Ortega-Mayagoitia, E., Hernández-Martínez, O., y Ciro-Pérez, J. 2018. Phenotypic plasticity of life-history traits of a calanoid copepod in a tropical lake: is the magnitude of thermal plasticity related to thermal variability? *PLoS ONE*, 13 (4): e0196496. Doi: 10.1371/journal.pone.0196496
- Potapova, M., y Snoeijs, P. 1997. The natural life cycle in wild populations of *Diatoma moniliformis* (Bacillariophyceae) and its disruption in an aberrant environment. *Journal of Phycology*, 33 : 924-937. Doi: 10.1111/j.0022-3643.1997.00924.x

- Pérez-Martínez, C., Cruz-Pizarro, L., y Sánchez-Castillo, P. 1992. Auxosporulation in *Cyclotella ocellata* Pantocsek (Bacillariophyceae) under natural and experimental conditions. *Journal of Phycology*, 28: 608-615. Doi: 10.1111/j.0022.3646.1992.00608.x
- Reynolds, C. 2006. *Ecology of phytoplankton*, New York, USA: Cambridge University Press.
- Sadava, D., Heller, G., Orians, G., Purves, W., y Hillis, D. 2009. *La ciencia de la biología*. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
- Schmid, M. A. M., y Crawford, M. R. 2001. *Ellerberckia arenaria* (Bacillariophyceae): formation of auxospores and initial cells. *Journal of Phycology*, 36: 307-320. Doi: 10.1080/09670260110001735468
- Schultz, M., y Trainor, F.R., 1968. Production of male gametes and auxospores in the centric diatoms *Cyclotella meneghiniana* and *C. cryptica*. *Journal of Phycology*, 4: 85-88. Doi: 10.1111/j1529-8817.1968.tb04681.x
- Seckbach, J., y Kociolek, J. P. 2011. Size and sex. En Mann, D. G (ed.). *Diatom world* (pp. 145-166). New York, USA: Springer.
- Shirokawa, Y., y Shimada, M. 2013. Sex allocation pattern of the diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Proceedings of the Royal Society B*, 280: 1-7. Doi: 10.1098/rspb.2013.0503
- Vilaclara G., Chávez M., Lugo A., González H., y Gaytán M. 1993. Comparative description of crater-lakes basic chemistry in Puebla State Mexico. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte limnologie*, 25: 435-440. Doi: 10.1080/03680770.1992.11900158
- Watanabe, M. M. 2005. Cultures as a means of protecting biological resources: ex situ conservation of threatened algal species. En Andersen, A. R. (ed.) *Algal culturing techniques* (p. 507). California, USA: Elsevier.