



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

SISTEMÁTICA DE LA FAMILIA SCYTONEMATACEAE
(CYANOPROKARYOTA / CYANOBACTERIA)

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA:
ITZEL BECERRA ABSALÓN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. GUSTAVO MONTEJANO ZURITA
FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ TUTOR:
DRA. HELGA OCHOTERENA BOOTH
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO DF, ENERO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

SISTEMÁTICA DE LA FAMILIA SCYTONEMATACEAE
(CYANOPROKARYOTA / CYANOBACTERIA)

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
PRESENTA:
ITZEL BECERRA ABSALÓN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:
DR. GUSTAVO MONTEJANO ZURITA
FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ TUTOR:
DRA. HELGA OCHOTERENA BOOTH
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO DF, ENERO 2014



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/019/14

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **7 de octubre de 2013**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **BECERRA ABSALÓN ITZEL** con número de cuenta **93305259** con la tesis titulada: "**Sistemática de la familia Scytonemataceae (Cyanoprokaryota/Cyanobacteria)**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. GUSTAVO ALBERTO MONTEJANO ZURITA**:

- Presidente: DR. EBERTO NOVELO MALDONADO
- Vocal: DR. VÍCTOR MANUEL RIVERA AGUILAR
- Secretario: DRA. HELGA OCHOTERENA BOOTH
- Suplente: DRA. HILDA PATRICIA LEÓN TEJERA
- Suplente DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 9 de enero de 2014.

Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/mmm

AGRADECIMIENTOS:

- Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada con número de becario/CVU 42731.
 - Al proyecto de investigación PAPIIT IN207709, por el apoyo que permitió realizar el trabajo de campo y los métodos moleculares de este estudio.
 - A mi tutor el Dr. Gustavo Montejano Zurita, por su asesoría y apoyo incondicional en el desarrollo del proyecto de investigación.
 - A los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Helga Ochoterena Booth y el Dr. Arturo Carlos II Becerra Bracho, por los comentarios, recomendaciones y conocimientos brindados durante todo este proceso de aprendizaje.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL:

- Al Dr. Gustavo Montejano por aceptar ser mi tutor y permitirme entrar de lleno al mundo de las cianobacterias y por apoyar mi desarrollo profesional en todos los ámbitos.
 - A la Dr. Helga Ochoterena por sus invaluable conocimientos en la realización de los análisis filogenéticos y por el tiempo y paciencia que me brindó para que yo aprendiera todos sus trucos, es una de las personas más generosas que conozco en el ámbito académico.
- A Beatriz Rodarte que fue la que montó las técnicas moleculares empleadas en este estudio.
- A los miembros del Laboratorio de Molecular de la Facultad de Ciencias por prestar la infraestructura en la que se realizaron los métodos moleculares: Lichi, Claudia y Aristides, gracias por su tiempo, fueron momentos muy gratos.
 - A la Dra. Esther Berrendero y a la M. en C. Guadalupe Bibriesca por su colaboración en los aspectos moleculares de este estudio.
- Al Biol. Oscar A. López y la M. en C. Karina Osorio por su ayuda en el trabajo de campo.
 - A Rosa Luz Tavera y Eberto Novelo, por aceptarme como su alumna durante la licenciatura y Maestría, me enseñaron a amar a las algas.
 - A “ Willi Henning Society” por hacer de acceso libre el programa de software TNT.
- A mi esposo e hijo por su amor, comprensión, apoyo y paciencia incondicionales, los amo mucho.
Emiliano eres la luz que ilumina mi camino.
- A mis papás, por el apoyo y educación que me brindaron, ustedes sentaron las bases que me permitieron llegar hasta este momento.
 - A mi hermano, por el apoyo y cariño, te admiro mucho.
- Especial agradecimiento a mi mamá que sin su ayuda para cuidar a Emiliano no habría podido terminar el doctorado.

• *A mi familia, Oscar y Emiliano, los amo*

A Nicté, siempre estas conmigo

A Beatriz, dejaste un gran vacío en todos los que te conocimos

*A todos los que caminan siguiendo a su corazón,
que se encuentra siempre abajo y a la izquierda •*

ÍNDICE:

9	Resumen
10	Abstract
11	Introducción:
11	1. Problemática de la sistemática de Cianobacterias
16	2. Concepto de especie en cianobacterias
19	3. Historia Taxonómica y definición de la familia <i>Scytonemataceae</i>
24	4. Historia Taxonómica y definiciones de los géneros de la familia <i>Scytonemataceae</i>
28	Objetivos
29	Antecedentes
30	Material y Métodos:
30	1. Colecta y área de estudio
31	2. Caracterización morfológica y cultivos
33	3. Aislamiento de DNA y amplificación por PCR
33	4. Alineamiento y análisis filogenético
42	Resultados:
42	1. Análisis molecular
44	2. Análisis morfológico de los géneros de la familia <i>Scytonemataceae</i>
47	3. Análisis morfológico de las poblaciones de <i>Brasilonema</i> , <i>Scytonema</i> y <i>Petalonema</i> de la región central de México
53	4. Descripción de las especies estudiadas en este trabajo
64	Discusión
74	Conclusiones
75	Referencias
84	Apéndice I. Artículo requisito para la obtención del grado
98	Apéndice II. Matriz alineada del gen 16S ARN ribosomal

RESUMEN

La taxonomía de la familia Scytonemataceae es problemática en todos los niveles. A lo largo de su historia ha sufrido varios cambios en su composición y definición. Actualmente se reconocen 5 géneros en esta familia: *Scytonema* (incl. los subgéneros *Scytonema* y *Myochrotes*), *Petalonema*, *Brasilonema*, *Scytonematopsis* y *Kyrtuthrix*. A partir del empleo de estudios polifásicos en la taxonomía de las cianobacterias que incluyen análisis moleculares, morfológicos y del hábitat, se ha observado que varias familias y géneros de Nostocales (orden al que pertenece la familia Scytonemataceae) no son monofiléticos. Con la intención de aclarar las relaciones filogenéticas en Scytonemataceae; se ha secuenciado el gen 16S ARN ribosomal de poblaciones mexicanas de 9 diferentes especies de Scytonemataceae. 5 especies de *Brasilonema*: *B. tolantongensis*, *B. roberti-lamii* y 3 especies nuevas; 3 especies de *Scytonema*: *S. mirabile* y 2 nuevas especies; *Petalonema alatum*. *Kyrtuthrix* sp. fue la única que no pudo ser secuenciada. Estas secuencias las combinamos con las disponibles en GenBank para producir una matriz de 269 terminales y 499 caracteres potencialmente informativos. Además se estudiaron caracteres morfológicos para identificar las especies y para delimitar los géneros.

El análisis molecular muestra que la familia Scytonemataceae y los géneros *Petalonema* y *Scytonema* no son monofiléticos. Al parecer el género *Scytonematopsis* y algunas especies de *Petalonema* no pertenecen a Scytonemataceae mientras las especies tipo *Scytonema hofmannii* y *Petalonema alatum* quedan incluidas en el clado de la familia y se observa que algunos géneros con ramificaciones tipo-Y y ramas falsas, como *Mastigocladopsis*, *Symphyonema* y *Symphyonemopsis*, están cercanamente relacionadas con los géneros de Scytonemataceae.

En los resultados se describen morfológicamente a las poblaciones estudiadas y se comparan entre los géneros de la familia los caracteres: polaridad del filamento maduro, tipo de ápices en el filamento, tipo de vaina, Forma de tricoma, zonas meristemáticas, tipo septos, talla de las células en tricomas maduros y tipo de ramificaciones. En el trabajo se discute que géneros como *Scytonematopsis*, *Petalonema* y *Kyrtuthrix* muestran estados de caracteres compartidos con otras familias como Rivulariaceae, Microchaetaceae y Nostocaceae respectivamente. Además en *Scytonema* se observaron varios morfotipos.

En vista de los resultados obtenidos en este trabajo se propone incluir en Scytonemataceae a los géneros *Mastigocladopsis*, *Symphyonema*, *Symphyonemopsis*, *Brasilonema*, *Myochrotes*, *Petalonema*, *Scytonema* y un nuevo género por describir (revelado a partir de este estudio); además de una posible redefinición de los caracteres diagnósticos de la familia.

ABSTRACT

The Scytonemataceae taxonomy is problematic. Through the taxonomic history, the family has undergone several changes in its composition and definition. Currently five genera are recognized within this family: *Scytonema* (incl. subgenera *Scytonema* and *Myochrotes*), *Petalonema*, *Brasilonema*, *Scytonematopsis* and *Kyrtuthrix*. Since the polyphasic studies (molecular, morphological and ecological methods) started in the taxonomy of cyanobacteria, it has been observed that several families and genera of Nostocales (order) are not monophyletic. With the aim of clarifying the phylogenetic relationships within Scytonemataceae, populations of nine species were sequenced for the 16S rRNA gen: five species of *Brasilonema* (*B. tolantongensis*, *B. roberti-lamii*, and three new species); three species of *Scytonema* (*S. mirabile*, and two new species); and *Petalonema alatum*. *Kyrtuthrix* sp. could not be sequenced, but it was morphologically studied.

Our sequences were combined with those available through GenBank to produce a matrix of 269 terminals and 499 parsimoniously potentially informative characters. Also morphological characters were studied to provide tools for the identification of species and to circumscribe genera. The characters filament polarity, filament apex, sheath type, trichome form, position of the meristematic zones, cross walls type, cells form and branching type are compared among the Scytonemataceae genera.

The molecular analysis shows that Scytonemataceae and the genera *Petalonema* and *Scytonema* are not monophyletic. Apparently *Scytonematopsis* and some *Petalonema* species do not belong in Scytonemataceae while the type species, *Scytonema hofmannii* and *Petalonema alatum* are included in the Scytonemataceae clade. Some genera of Symphyonemataceae with type-Y and false branching were closely related to Scytonemataceae genera.

The morphological results reveal that genera such as *Scytonematopsis*, *Petalonema* and *Kyrtuthrix* share character states with Rivulariaceae, Microchaetaceae and Nostocaceae respectively. In addition in *Scytonema* several morphotypes were observed.

In this work, we propose to include the genera *Mastigocladopsis*, *Symphyonema*, *Symphyonemopsis*, *Brasilonema*, *Myochrotes*, *Petalonema*, *Scytonema* and one new genus in Scytonemataceae. In view of the results it is also proposed a possible redefinition of the diagnostics characters of the family.

INTRODUCCIÓN

1. Problemática de la sistemática de Cianobacterias

La sistemática es la disciplina de la biología que se encarga del estudio de la diversidad de seres vivos y sus relaciones, se dedica a identificar, clasificar y nombrar especies y taxones supraespecíficos (MORRONE, 2013). Las relaciones entre las especies se pueden entender de diferente manera (relaciones evolutivas, tocogenéticas, ontogenéticas, filogenéticas, etc.), pero en la sistemática moderna se prefieren las relaciones filogenéticas o cladísticas para clasificar los seres vivos (MORRONE, 2013). Las relaciones filogenéticas son de ancestría común entre las especies, y una filogenia es la representación de estas relaciones. Las filogenias se pueden construir con diferentes tipos de datos: morfológicos, ecofisiológicos, ecológicos (principalmente ambientales), moleculares, etc.; aunque generalmente se han utilizado los datos morfológicos y moleculares.

Las cianobacterias cuentan con pocos caracteres morfológicos para realizar filogenias, es por esto que se utilizan las secuencias de genes para realizarlas. En vista de que las filogenias de las cianobacterias son solo moleculares, se toman como una parte del análisis sistemático y se contrastan con otro tipo de datos como los morfológicos y ecológicos (ambientales), para reconocer los grupos monofiléticos.

Cómo una primera aproximación a la sistemática de la familia Scytonemataceae, en este trabajo, se eligió realizar una filogenia molecular con el gen 16S ARNr, porque es el gen más utilizado en el estudio de las cianobacterias y por tanto existen más secuencias de diferentes especies de esta familia.

La clasificación tradicional de las cianobacterias fue elaborada a partir de caracteres morfológicos. Bajo estos criterios se han descrito una gran cantidad de especies; GEITLER (1932) reconoció 1300 especies en 145 géneros, 20 familias y 3 órdenes. Estas especies fueron descritas principalmente de hábitats templados; sin embargo, aun falta explorar muchos otros tipos de ambientes, por ejemplo, se estima que se han registrado aproximadamente 10% de todas las morfoespecies de microorganismos reconocibles de los hábitats tropicales (WATANABE, 1999; KOMÁREK, 2006). Las revisiones más recientes bajo esta tradición son las de KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1998, 2005).

La clasificación tradicional de cianobacterias ha sido cuestionada debido al uso exclusivo de caracteres morfológicos, los críticos argumentan que este método ha llevado a la sobre estimación de especies. En ese sentido mencionan que el enfatizar ciertas características fenotípicas como la forma celular, tamaño de las células, ancho de los filamentos, presencia de vainas, pigmentación y tipo de ramificaciones, es subjetivo porque se ha visto que varias de estas características frecuentemente son variables (WARD, 1998) o se presentan como convergencias evolutivas (KOMÁREK, 2003; PALINSKA ET AL., 2006) y que el rango de variación morfológica puede no corresponder a diferencias genéticas en las cianobacterias (PALINSKA ET AL., 1996). Por otra parte, se ha comprobado la existencia de especies crípticas (CASA-

MATTA *ET AL.*, 2003); WATERBURY & RIPPKA (1989) mencionan que la clasificación de formas simples, como unicelulares cocoides, requiere del uso de distintos criterios, porque no hay suficientes caracteres morfológicos para delimitar los taxa.

La introducción de métodos modernos de análisis taxonómico y filogenético en las últimas décadas del siglo 20 cambió sustancialmente la forma de entender a estos organismos. El microscopio electrónico, las investigaciones ecológicas y sobre metabolitos secundarios y especialmente los métodos moleculares, estimularon el desarrollo de la investigación de cianobacterias e influenciaron su taxonomía. Consecuentemente con toda esta nueva información, los criterios para su clasificación están siendo reevaluados (KOMÁREK, 2006).

Los datos moleculares actualmente han sido aceptados como un criterio básico de clasificación; sin embargo, la correcta clasificación es imposible sin la cuidadosa combinación de datos genéticos, con la variación morfológica y las características ecológicas principalmente, pero también se han tomado en cuenta estudios ultraestructurales y características ecofisiológicas. Esta metodología combinada es usualmente presentada como acercamiento polifásico.

Muchas veces se observa congruencia entre algunos caracteres morfológicos, ultraestructurales con los análisis moleculares. Varios de los problemas planteados desde la taxonomía tradicional se han resuelto usando este enfoque; sin embargo, a veces los diferentes datos cuando se comparan a la luz de la filogenia, han resultado en conflicto, como cuando la variación fenotípica (principalmente caracteres morfológicos) no corresponde con la variación genética. KOMÁREK (2006) demuestra que si bien algunos caracteres morfológicos (nivel de organización) no concuerdan con la filogenia, otros caracteres ultraestructurales (como la distribución de los tilacoides) si explican la conformación de los taxa a ciertos niveles, de ahí la importancia de comparar y evaluar múltiples grupos de datos.

La integración de todos estos datos sería el ideal en la clasificación, sin embargo la información de este tipo o está fragmentada o no existe en la mayoría de las especies, es por esto que se debe ir trabajando para generar el conocimiento que nos permita hacer una clasificación con un enfoque polifásico. En este sentido la aportación de este trabajo fue la obtención de 9 secuencias del gen 16S ARNr, el estudio morfológico y caracterización ambiental de 9 poblaciones naturales de géneros que pertenecen a la familia Scytonemataceae y la revisión en la literatura disponible de las características morfológicas y caracterización ambiental de seis especies de *Scytonematopsis*, ocho especies de *Brasilonema*, dos especies de *Kyrtuthrix*, dieciséis especies de *Scytonema* y ocho especies de *Petalonema*.

La nomenclatura de la sistemática de las cianobacterias actualmente se rige por dos códigos: el Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Hongos y Plantas (MCNEIL *ET AL.*, 2012) y el Código Internacional de Nomenclatura de Bacteria (LAPAGE *ET AL.*, 1992). Estos códigos fueron fundados sobre diferentes principios y prescriben distintos tratamientos, que no son compatibles.

Las cianobacterias fueron nombradas bajo el Código Internacional de Nomenclatura Botánico (GREUTER *ET AL.*, 2000), ahora denominado Código Internacional de Nomenclatura

para Algas, Hongos y Plantas (MCNEIL *ET AL.*, 2012). El tipo nomenclatural que requiere es un ejemplar preservado permanentemente (art. 8.4 del código), que deben ser depositados en una colección de herbario u colección pública (art. 7A.1), estos ejemplares sirven como referencia taxonómica para posteriores comparaciones lo que ha permitido registrar la diversidad cianobacterial natural (COMPÈRE, 2005; PALINSKA *ET AL.*, 2006). No se aceptan organismos vivos o cultivos, a menos que estén preservados en estado inactivo metabólicamente (art 8.4); por ejemplo, liofilizados o criopreservados (MCNEIL *ET AL.*, 2012), debido a que el material tipo preservado (seco, congelado o fijado) debe retener permanentemente las características del espécimen como ellas fueron expresadas en la naturaleza en el tiempo de la colecta (PALINSKA *ET AL.*, 2006).

Para describir nuevos taxa genéricos o infragenéricos de cianobacterias la diagnosis debía publicarse en latín (art. 39.2), pero de acuerdo a las nuevas reglas nomenclaturales establecidas en el artículo 39.2 del Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Hongos y Plantas ya no es necesario y puede hacerse en inglés (MCNEIL *ET AL.*, 2012). Además en el caso de las especies de algas, la diagnosis debe ir acompañada de una ilustración o figura que muestre los rasgos morfológicos distintivos (art. 44.2), esta ilustración puede ser el tipo nomenclatural (art. 40.5).

La taxonomía de cianobacterias bajo el Código Internacional de Nomenclatura de Algas, Hongos y Plantas (MCNEIL *ET AL.*, 2012), en el artículo 13.1, reconoce como punto de partida los trabajos de BORNET & FLAHAULT (1886) y GOMONT (1892 a y b), por tanto, los ficólogos que estudian a las cianobacterias han acumulado información valiosa sobre la distribución y ecología de este grupo desde hace más de 100 años.

Por otra parte STANIER (1978) junto con otros autores de formación bacteriológica, propusieron que la nomenclatura de este grupo fuera gobernada por el Código Internacional de Nomenclatura Bacteriológico (OREN, 2004; PALINSKA *ET AL.*, 2006). La revisión más reciente de este código se hizo en 1990 y fue publicada por LAPAGE *ET AL.* (1992) con el nombre de Código internacional de Nomenclatura de Bacteria. Este código ha sido usado para nombrar a microorganismos cultivados en laboratorio; las especies son definidas como grupos de cepas similares (PALINSKA *ET AL.*, 2006) y en el capítulo 4 reglas 18^a y 18f se establece que el tipo nomenclatural son cultivos puros vivos (LAPAGE *ET AL.*, 1992).

RIPPKA y colaboradores (1979) fueron los que diseñaron las primeras claves para la determinación de cianobacterias en cultivo. Posteriormente, en la primera y segunda edición del *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (BOONE *ET AL.*, 2005) se llevó a cabo una rigurosa revisión de los géneros establecidos por RIPPKA y colaboradores, en este manual se reconocen 5 subsecciones: la subsección I corresponde a cianobacterias unicelulares, la subsección II a cianobacterias coloniales, en la subsección III agruparon los filamentos simples, en la subsección IV se ubican los filamentos simples con heterocitos y ramificaciones falsas y en la subsección V a los filamentos simples y multiseriados con heterocitos y ramificaciones verdaderas (CASTENHOLZ, 2001).

Varios argumentos se han discutido en contra de la aplicación del Código de nomenclatura de Bacteria para las cianobacterias, por ejemplo: a la fecha, solo se han propuesto 13 nombres de especies de cianobacterias siguiendo este enfoque, en el *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology/International Journal of Systematic Bacteriology*, que de acuerdo al capítulo 4 regla 27 de este código, es la única revista reconocida para publicar y validar taxa. De estos 13 nombres propuestos, solo 5 se publicaron válidamente (OREN, 2004; PALINSKA ET AL., 2006).

Otro problema es que las descripciones deben hacerse en base a cultivos tipo y aunque los cultivos son una herramienta muy útil en los estudios taxonómicos de cianobacterias, al estar fisiológicamente activos, se espera que sigan evolucionando y con el tiempo pueden apartarse significativamente del tipo original; además, las cepas de cultivo llegan a mostrar poca semejanza con los organismos de las poblaciones naturales, debido a que pueden sufrir cambios morfológicos (ANAND, 1998; CASAMATTA ET AL., 2003) o bien, algunos de los rasgos fenotípicos no son expresados en las condiciones de cultivo (OTSUKA ET AL., 2001; PALINSKA ET AL., 2006), por lo que las cepas pueden ser superficialmente e incorrectamente determinadas (ANAND, 1998; KOMÁREK, 2010; PALINSKA ET AL., 1996). KOMÁREK Y ANAGNOSTIDIS (1989) han estimado que más del 50% de las cepas de las colecciones de cultivos existentes están mal identificadas. En vista de la argumentación anterior, las cepas de cultivo vivas no pueden, ni deben ser una referencia taxonómica permanente para las cianobacterias.

Otro inconveniente importante en la aplicación del Código de Nomenclatura de Bacteria es, que en éste no se establece como obligatorio que para cada cepa de cultivo sea necesario dar la referencia de la población natural de la cual se aisló, ni las condiciones ecológicas en que vivía esa población, debido a que la identificación de las cianobacterias no se basa en la determinación de las propiedades de las poblaciones naturales (GOLUBIC, 1979). Este es un problema fundamental en la sistemática si se piensa que esta disciplina puede ser una herramienta que permite relacionar todas las propiedades genéticamente codificadas y expresadas estructural y funcionalmente por un organismo, con su medio ambiente natural (GOLUBIC, 1979). El observar esta relación es fundamental para entender el papel ecológico y los procesos evolutivos de esos organismos, que son dos de los objetivos más importantes en los estudios biológicos y de los cuales se derivan muchos otros, como la conservación y bioremediación de ecosistemas, etc. Es decir el estudio de las poblaciones naturales es muy importante porque es el único medio de relacionar los cultivos con el ambiente natural.

Los bacteriólogos argumentan, que el estudio en cultivos es valioso y ha permitido aplicar varios métodos para el estudio de propiedades bioquímicas y fisiológicas como la cromatografía de gas, HPLC, espectrometría de masas, etc. (OREN, 2004). Además, de que los primeros estudios filogenéticos de cianobacterias se hicieron a partir del análisis de cultivos axénicos (PALINSKA ET AL., 2006); pero la discusión aquí no es sobre la utilidad de los cultivos en los estudios de cianobacterias, sino sobre, la conveniencia de que el tipo nomenclatura esté fisiológicamente activo, sin ninguna referencia preservada de la población natural que le dio origen.

En varios simposios se ha tratado el problema de cómo unificar la nomenclatura de las cianobacterias, a partir de la idea de incorporar reglas de nomenclatura especiales para este grupo que respeten las demandas de ambos códigos (KOMÁREK, 2010). En este sentido se han propuesto varias reglas y disposiciones que deben ser incluidas en ambos códigos. Se propone anexar varias reglas en el Código Internacional de Nomenclatura de Bacteria, donde se reconozcan a las especies publicadas bajo el código botánico y a los tipos botánicos como válidos. Se mantiene que los cultivos axénicos también son tipos válidos, pero tienen que tener referencias de las poblaciones y condiciones ambientales de las cuales fueron aislados y que cuenten con un tipo de herbario asociado. Estos esfuerzos son recientes y todavía la problemática en la taxonomía persiste, sobre todo, el tener dos tipos nomenclaturales sigue provocando confusión, porque las mismas especies se pueden describir como distintas dependiendo del tipo nomenclatural que se use.

Esta investigación rescata el valor del estudio de las poblaciones naturales para la identificación de las cianobacterias, observación de caracteres morfológicos y establecimiento de ciclos de vida y caracterización del hábitat, pero también hace uso de los cultivos puros para establecer ciclos de vida, observar caracteres que a veces no son evidentes en el material de campo, como la presencia de heterocitos y el desarrollo de los hormogonios y ramas, así como para obtener las secuencias moleculares. De esta forma, la información obtenida de las poblaciones naturales puede ser integrada con la obtenida de los cultivos logrando que la descripción de los taxa sea más completa.

2. Concepto de especie en cianobacterias

La unidad fundamental con la que trabajan los taxónomos son las especies, éstas se pueden observar en la naturaleza y son entidades que cambian y evolucionan a través del tiempo (BROOKS & MCLENNAN, 2002). En este sentido una de las preguntas relevantes para el taxónomo es ¿cómo reconocer a las especies? ¿Cuáles caracteres se deben tomar en cuenta para definir las? Al responder estas preguntas es cuando se construye el concepto de especie y cuyos métodos para definir las son variables.

En el sistema botánico tradicional los ficólogos han usado dos conceptos de especie, el tipológico y el morfológico. El concepto tipológico es definido como un grupo de organismos que se asignan a una especie si comparten ciertos atributos fijos o esenciales (MORRONE, 2013). MORRONE (2013) argumenta algunas razones por las cuales se debería rechazar este concepto: la existencia de individuos de la misma especie aunque presentan diferencias en su estructura, ya sea por dimorfismo sexual, polimorfismo y otras formas de variación individual; y la existencia de especies crípticas que pese a ser indistinguibles morfológicamente, son especies biológicas.

Sin embargo el concepto de especie tipológico es el que se aplica en la nomenclatura cuando se asignan un tipo nomenclatural, ya sea un ejemplar de herbario preservado o una cepa viva.

El concepto de especie tipológico está muy relacionado con el concepto de especie morfológico, por que los atributos fijos o esenciales a los que se refiere el concepto tipológico, generalmente son morfológicos. El concepto morfológico de especie se podría definir de la siguiente manera: conjunto de individuos morfológicamente similares, generalmente separados de otros conjuntos de individuos por discontinuidades morfológicas (CRISCI, 1994).

CASTENHOLZ (1992) define a las especies de cianobacterias como un conjunto de cepas similares que tienen discontinuidades reconocibles con otros grupos conocidos. Este concepto sigue siendo un concepto morfológico de especie, pero al mencionar que solo las cepas son la unidad para reconocer a las especies, entonces quedan fuera de esta definición, las especies que pueden ser reconocidas a partir de las poblaciones naturales y pierde importancia la relación de las especies con sus condiciones ecológicas.

Se ha estudiado la posibilidad de aplicar otros conceptos de especie, por ejemplo, WARD (1998), explora la aplicabilidad del concepto biológico en procariontes, porque las bacterias experimentan cruzamiento en el sentido que ellos intercambian cantidades limitadas de información genética vía transformación, transducción y conjugación. A pesar de este esfuerzo, la mayoría de los cianobacteriólogos consideran que el concepto de especie biológico es inaplicable cuando examinamos organismos asexuales (CASAMATTA ET AL., 2003). Para CASAMATTA ET AL. (2003) son más importantes las características genotípicas por tanto, retoman el concepto de MISHLER Y THERIOT (2000) que dicen que una especie debe ser definida por monofilia y consideran que la mejor manera de establecer grupos monofiléticos es a través del análisis de secuencias de ADN. CASAMATTA ET AL. (2003) mencionan que poblaciones

o cepas que presenten un porcentaje de variación genética por arriba del 97% de similitud en secuencias de 16S DNA ribosomal pueden o no ser la misma especie, pero poblaciones o cepas con secuencias por debajo del 97% de similitud definitivamente deben ser reconocidas como especies diferentes.

Algunos autores pueden tomar esta posición como reduccionista, por ejemplo, KOMÁREK (2003) dice que si bien los datos moleculares nos permiten reconocer las relaciones filogenéticas, conocer la expresión fenotípica del genotipo es muy importante porque nos ayuda a entender los procesos de especiación; además, el marcador molecular más usado en cianobacterias (el gen 16S ARN ribosomal), que es un buen marcador para mostrar las relaciones filogenéticas en taxa supraespecíficos, no permite reconocer la variación genotípica a nivel de especie (KOMÁREK, 2003; KOMÁREK, 2010); por eso, actualmente se están probando otros marcadores como la región *cpcBA*-IGS del operón de la ficocianina (BERRENDERO *ET AL.*, 2008; NEILAN *ET AL.*, 1995, 1997; TENEVA *ET AL.*, 2005) o la estructura secundaria de la región del ITS entre los genes 16S y el 23S del ARNr (BOYER *ET AL.*, 2001; ERNST *ET AL.*, 2003). De la región *cpcBA*-IGS del operón no se ha generado suficiente información para confirmar si es un buen marcador, pero según JOHANSEN *ET AL.*, 2011 el ITS si puede ayudar al reconocimiento de los límites intragenéricos e intergenéricos.

Con base en lo anterior, KOMÁREK (2003) plantea que las especies en cianobacterias se deben definir usando caracteres combinados, no sólo en términos genéticos, siempre y cuando estos caracteres sean estables.

Es así que KOMÁREK (2003) propone que una especie es un grupo de poblaciones (y cepas) que tienen el mismo genotipo, con características fenotípicas estables y con demandas ecológicas similares. Para definir a las especies y otros taxa propone seguir un enfoque polifásico que pretende integrar caracteres de diferente tipo (ciclos de vida, morfología, ultraestructura, fisiología, biología molecular, ecología, etc.). Los primeros trabajos usando un enfoque polifásico en la elaboración de un nuevo esquema de clasificación a partir principalmente de caracteres morfológicos, ultraestructurales y de etapas del desarrollo, fueron de ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK (1986, 1988, 1990) y KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1986, 1998) que incluyeron la redefinición de taxa de cianobacterias desde orden hasta género. A pesar de que poco se ha avanzado a nivel de especie, existe el consenso de integrar caracteres morfológicos con técnicas moleculares e información ecológica para definir a las especies (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1998; KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 2005; KOMÁREK, 2006).

Las especies crípticas, aquellas que sólo pueden reconocerse a nivel molecular, parecen ser muy comunes, por lo que para definir a las especies en cianobacterias es esencial el uso de caracteres moleculares junto con las características ecológicas (CASAMATTA *ET AL.*, 2003). Los caracteres ecológicos cada vez son más importantes para definir a las especies de cianobacterias. Si bien el uso de estos caracteres podría traer problemas como considerar a una misma especie con distribuciones amplias (es decir que abarquen diferentes nichos) como diferentes o por el contrario, podría agrupar a dos especies diferentes compartir el nicho ecológico.

Para el caso de las especies de bacterias en general, y de las cianobacterias en particular, se ha propuesto que la principal forma de especiación es a partir de ecotipos (especiación simpátrica): “la evolución de nuevos ecotipos podría ser un proceso ineludible en el mundo bacterial” (COHAN, 2002). Además de que KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1998) y CASAMATTA *ET AL.* (2003) concluyen que las especies no son cosmopolitas sino que sus hábitats son mucho más restringidos de lo que antes se pensaba.

El concepto y método que defiende KOMÁREK (2003), que podríamos llamar concepto polifásico de especie, pretende ser integrador y es importante actualmente debido a que no se conoce mucho de las relaciones filogenéticas en las cianobacterias, ni de los caracteres que pueden reflejar su historia evolutiva (CASAMATTA *ET AL.*, 2005), se deben tomar en cuenta la mayor cantidad de evidencia y ponerla a prueba comparándola entre si y analizar la información que nos brindan, sólo así podremos avanzar en la taxonomía de este grupo.

3. Historia Taxonómica y definición de la Familia Scytonemataceae

En su monografía “Nostocacées heterocystées”, BORNET & FLAHAULT (1886 – 1888) clasificaron a la tribu Scytonemaceae RABENHORST dentro del orden Hormogoniales (formado por todas las cianobacterias, Cyanophyta, que forman hormogonios, fig. 1 f), en la familia Hormogoneae, subfamilia Heterocystées (tabla 1), que incluye a todas las especies que tienen heterocitos (fig.1 a, e y h) y las separa de las que no los tienen (Hormocystées). En esta tribu incluyeron a los géneros *Microchaete* THURET, *Scytonema* AGARDH, *Hassallia* BERKELEY, *Tolypothrix* KÜTZING, *Desmonema* BERKELEY & THWAITES, *Hydrocoryne* SCHWABE y *Diplocolon* NAEGELI. Los mismos autores clasificaron al género *Scytonema* en tres secciones (tabla 1) *Euscytonema* (vaina homogénea a veces lamelada con estrías paralelas y doble ramificación, fig.1 b), *Myochrotes* (vaina lamelada con estrías divergentes y doble ramificación, fig.1 c), *Petalonema* (vainas gruesas lameladas, plumosas, con ramificación doble o solitaria a partir de heterocito, fig.1 c y e).

GEITLER (1925) separó al orden Hormogoneae (todas las cianobacterias con formas multicelulares organizadas en tricomas) en Nostocales y Stigonematales (tabla 1) porque enfatiza la distinción entre ramificación falsa (Fig.1 c, y e) y verdadera, (ver figura 1, d). El autor incluyó a la familia Scytonemataceae dentro de las Nostocaceae por tener ramificaciones falsas. Por otro lado, no hizo la distinción como BORNET & FLAHAULT (1886 – 1888) entre cianobacterias con heterocitos y sin heterocitos.

En 1932, GEITLER eliminó los órdenes Stigonematales y Nostocales restableciendo otra vez el orden Hormogoniales. En la familia Scytonemataceae mantuvo los géneros *Scytonema*, *Tolypothrix*, *Hydrocoryne* y *Desmonema* de la clasificación de BORNET & FLAHAULT (1886 – 1888), pero transfirió a *Microchaete* a la familia Microchaetaceae, la única especie de *Diplocolon* sinomiza con *Scytonema crassum*, separó a la sección III de *Scytonema* y la elevó a categoría de género (*Petalonema* BERKELEY); también fusionó a *Hassallia* con *Tolypothrix* (tabla 1). Además incorporó géneros como *Plectonema* THURET (filamentos sin heterocitos, clasificado por BORNET & FLAHAULT dentro de Hormocystées), *Diplonema* BORZÌ, *Spelaeopogon* BORZÌ, *Seguenzaea* BORZÌ, *Scytonematopsis* KISELEVA, *Camptylonema* SCHMIDLE, y *Tildenia* KOSSINSKAJA.

FRITSCH (1945), DESIKACHARY (1959), STARMACH (1966) y BOURRELLY (1970) retomaron a GEITLER (1925) y dividieron a las hormogoniales en Stigonematales y Nostocales (tabla 1) e incluyeron a la familia Scytonemataceae en las Nostocales (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS, 1989).

DESIKACHARY (1959) mantuvo dentro de Scytonemataceae a los géneros *Plectonema*, *Hydrocoryne*, *Scytonematopsis*, *Petalonema*, *Scytonema* y *Tolypothrix* (tabla 1). Pero propuso al género *Diplonema* como sinónimo de *Borzinema* DE TONI y a *Camptylonema* de *Schidleinema* DE TONI. El autor pasó *Borzinema*, *Spelaeopogon*, *Seguenzaea* y *Schmidleinema* (fig. 1 d) al orden Stigonematales, en la familia Borzinemaceae, por tener ramificaciones verdaderas. *Desmonema* se volvió sinónimo de *Coleodesmium* BORZÌ EX GEITLER y lo clasificó en la

familia Microchaetaceae. Además, incluyó dos nuevos géneros: *Pseudoscytonema* ELENKIN (filamentos sin heterocitos) y *Camptylonemopsis* DESIKACHARY (tabla 1).

STARMACH (1966) consideró dentro de Scytonemataceae a los géneros *Plectonema*, *Hydrocoryne* y *Tolypothrix* (que incluye a *Hassallia*) y fusionó los géneros *Scytonema* y *Petalonema* (tabla 1). También incluyó el género *Coleodesmium*. Las especies del género *Scytonematopsis* las clasificó en otros géneros como, *Calothrix*, *Tolypothrix* y *Scytonema*. Los géneros *Pseudoscytonema* y *Camptylonemopsis* no fueron contemplados en su Flora Slodkowodna Polski (tabla 1).

BOURRELLY (1970), igual que los autores anteriores, incluyó en la familia Scytonemataceae a *Plectonema*, *Tolypothrix*, *Scytonema* e *Hydrocoryne*, así como *Scytonematopsis* (tabla 1). El consideró que *Camptylonemopsis* no debe aceptarse porque está formado por fases juveniles de otras especies. Además trasladó nuevamente el género *Coleodesmium* a la familia Scytonemataceae (tabla 1).

DROUET (1973), en su revisión de la Nostocaceae concluyó que sólo 4 especies constituyen las Nostocaceae (tabla 1), todas con tricomas cilíndricos (= Scytonemataceae y Rivulariaceae) *Scytonema hofmannii*, *Calothrix parietina* (NÄG) THURET, *C. crustaceae* SCHOUSBOE EX THURET y *Rhaphidopsis curvata* FRITSCH ET RICH. El autor consideró que cada una de estas especies representa un grupo polimórfico de ecotipos.

En la escuela de los Bacteriólogos: CASTENHOLZ & WATERBURY (1989) en la sección 19 del Bergey's manual of Systematic Bacteriology, dentro de la subsección IV que correspondería al orden Nostocales, incluyó solo tres familias Nostocaceae, Scytonemataceae y Rivulariaceae. En Scytonemataceae el autor solo reconoce un género, *Scytonema*, que lo convirtió en sinónimo de *Petalonema* y *Tolypothrix*. CASTENHOLZ (2001), en la última versión del Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, desaparece la familia Scytonemataceae e incluye al género-forma (es decir descritos a partir de caracteres morfológicos) *Scytonema* dentro de la subsección IV.I, junto con los géneros-forma *Anabaenopsis*, *Cyanospira*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Cylindrospermum*, *Cylindrospermopsis*, *Anabaena* y *Nostoc*. Por último JOHN ET AL. (2002), en la flora algal de agua dulce de las Islas Británicas retomaron la clasificación de Castenholz & Waterbury (1989) pero en Scytonemataceae reconocen dos géneros *Scytonema* (que es sinónimo de *Petalonema*) y *Tolypothrix*.

KOMÁREK Y ANAGNOSTIDIS (1989), siguiendo con la tradición botánica, consideraron en su revisión del orden Nostocales (en donde solo incluyeron géneros que no tienen ramas verdaderas, división celular exclusivamente perpendicular al eje y producción de heterocitos) a la familia Scytonemataceae en un sentido estricto (tabla 1); definiéndola por tener filamentos isopolares (fig. 1 g) compuestos por un sólo tricoma con ramificaciones falsas dobles (fig. 1 c), que se forman entre células vegetativas. Sólo incluyen 3 géneros dentro de esta familia: *Scytonema*, *Scytonematopsis* y *Kyrtuthrix* ERCEGOVIC. Sacaron al género *Hydrocoryne* por tener varios tricomas en una misma vaina (fig. 1 i) y lo clasificaron dentro de las Nostocaceae. Por considerar que los tricomas son heteropolares (fig. 1 h) clasifican a *Tolypothrix*, *Petalonema*, *Coleodesmium*, *Hassallia* y *Camptylonemopsis* dentro de la familia Microchae-

Tabla 1 | Resumen de la historia taxonómica de la familia Scytonemataceae

Autor	Clasificación	Géneros que contiene	Definición de Scytonemataceae o Scytonemataceae	Notas
BORNET & FLAHAULT (1886 – 1888)	Orden: Hormogoniales Suborden: Phycochromophyceae Familia: Hormogoneae Subfamilia: Heterocystées Tribu: Scytonemataceae	<i>Microchaete</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Hassallia</i> , <i>Tolypothrix</i> , <i>Desmonema</i> , <i>Hydrocoryne</i> , <i>Diplocolon</i> .	Tricomas con heterocitos, Ramas solitarias o germinales, iguales o desiguales, se originan por debajo de un heterocito o en el intervalo entre dos heterocitos. Filamentos solos o reunidos dentro de una vaina común. Vaina tubular, continua, homogénea o lamelosa, membranosa o gelatinosa, nunca sin color, amarilla a café. Heterocitos intercalares o basales, solitarios o en serie.	El género <i>Scytonema</i> lo dividen en tres secciones: <i>Euscytonema</i> , <i>Myochrotes</i> y <i>Petalonema</i>
GEITLER (1925 – 1932)	En 1925: Orden: Nostocales (con ramas falsas). Familia Scytonemataceae. En 1932: Orden: Hormogoneae Subsección: Mediotenuiores Familia: Scytonemataceae	<i>Scytonema</i> , <i>Tolypothrix</i> , <i>Hydrocoryne</i> , <i>Desmonema</i> , <i>Petalonema</i> , <i>Plectonema</i> , <i>Diplonema</i> , <i>Spelaeopogon</i> , <i>Seguenzaea</i> , <i>Scytonematopsis</i> , <i>Camptylonema</i> , <i>Tildenia</i>	Tricomas siempre en hilera, mismo ancho en toda su longitud, a veces ligeramente estrecho en el extremo y a veces con diferenciación sutil en base y punta (sin formación de pelo). Ramificación falsa simple o doble que surge de heterocitos intercalares o en un bucle entre dos heterocitos. Heterocitos intercalares rara vez ausentes.	<i>Microchaete</i> en Microchaetaceae, <i>Diplocolon</i> = <i>Scytonema crassum</i> , <i>Hassallia</i> dentro de <i>Tolypothrix</i> .
DESIKACHARY (1959)	Orden Nostocales (con ramas falsas). Familia Scytonemataceae.	<i>Scytonema</i> , <i>Tolypothrix</i> , <i>Hydrocoryne</i> , <i>Petalonema</i> , <i>Plectonema</i> , <i>Scytonematopsis</i> , <i>Tildenia</i> <i>Pseudoscytonema</i> , <i>Camptylonemopsis</i>	Filamentos con una vaina firme, delgada, frecuentemente lamelada. Rama falsa sola o germinal, tricomas con una sola hilera de células; heterocitos, intercalares, basales o terminales, hormogonios presentes.	<i>Diplonema</i> = <i>Borzinema</i> , <i>Camptylonema</i> = <i>Schidleinema</i> , <i>Desmonema</i> = <i>Coleodesmium</i> . <i>Borzinema</i> , <i>Spelaeopogon</i> , <i>Seguenzaea</i> y <i>Schmidleinema</i> en Stigonematales.
DROUET (1973)	Orden: Nostocales	<i>Scytonema</i> , <i>Calothrix</i> y <i>Rhaphidopsis</i>	Tricomas cilíndricos, con ramificaciones falsas y heterocitos.	Grupo polimórfico de ecotipos.
CASTENHOLZ (1989)	Subsección :IV Familia: Scytonemataceae	<i>Scytonema</i>	Tricomas uniseriados, usualmente no ahusados, con vaina, ramas falsas simples o dobles, heterocitos intercalares y asociados con las ramas falsas, regiones meristemáticas usualmente cerca del ápice, hormogonios sin heterocitos se forman en los ápices de los tricomas y son liberados posteriormente, pueden formar un heterocito basal.	<i>Scytonema</i> = <i>Petalonema</i> , <i>Scytonema</i> = <i>Tolypothrix</i>

Autor	Clasificación	Géneros que contiene	Definición de Scytonemaceae o Scytonemataceae	Notas
JOHN <i>ET AL.</i> (2002)	Orden: Nostocales Familia: Scytonemataceae	<i>Scytonema</i> y <i>Tolypothrix</i>	Tricomas con ramas falsas, puede haber tricomas atenuados pero no es la forma preponderante.	Scytonema = Petalonema
KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1989)	Orden: Nostocales. Familia Scytonemataceae	<i>Scytonema</i> , <i>Scytonematopsis</i> y <i>Kyrtuthrix</i>	Tricomas isopolares, ramas falsas después de la división entre células vegetativas, ramas generalmente en pares, células terminales redondeadas o en pelo, facultativamente ocurren acinetos, zonas meristemáticas terminal o sub terminal; germinación del hormogonio por ambos lados.	<i>Plectonema</i> y <i>Pseudoscytonema</i> en Oscillatoriales. <i>Tolypothrix</i> , <i>Petalonema</i> , <i>Coleodesmium</i> , <i>Hassallia</i> , <i>Camptylonemopsis</i> en Microchaetaceae.
KOMÁREK (2010)	Nostocales que incluyen todas las heterocitosas	<i>Scytonema</i> dos subgéneros, <i>Scytonematopsis</i> , <i>Kyrtuthrix</i> , <i>Brasilonema</i> , <i>Petalonema</i> .	Misma definición que en KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1989)	

taceae y a los géneros *Plectonema* y *Pseudoscytonema*, que no tienen heterocitos, los clasificaron dentro del orden Oscillatoriales.

En varias filogenias se ha observado que se forma un sólo clado con todas las secuencias que pertenecen a especies heterocitosas, incluyendo a géneros de la familia Scytonemataceae, por lo que en la propuesta más reciente de clasificación de las cianobacterias (HOFFMANN ET AL., 2005) se contempla incluir a todas las heterocitosas en un mismo orden.

En la última clasificación de las Nostocales que hace KOMÁREK (2010), además de los 3 géneros mencionados, incluyó a *Brasilonema* y *Petalonema* (tabla 1).

La familia Scytonemataceae según KOMÁREK Y ANAGNOSTIDIS (1989) está definida por tener filamentos y tricomas isopolares largos, su vaina siempre cerrada, con ramas falsas características que inician entre 2 células vegetativas, algunas veces después de la muerte de una o varias células vegetativas; ramas generalmente en pares, raramente una; células terminales redondeadas o como cabellos, facultativamente ocurren acinetos, las zonas meristemáticas son terminales o subterminales y la germinación del hormogonio es por ambos lados.

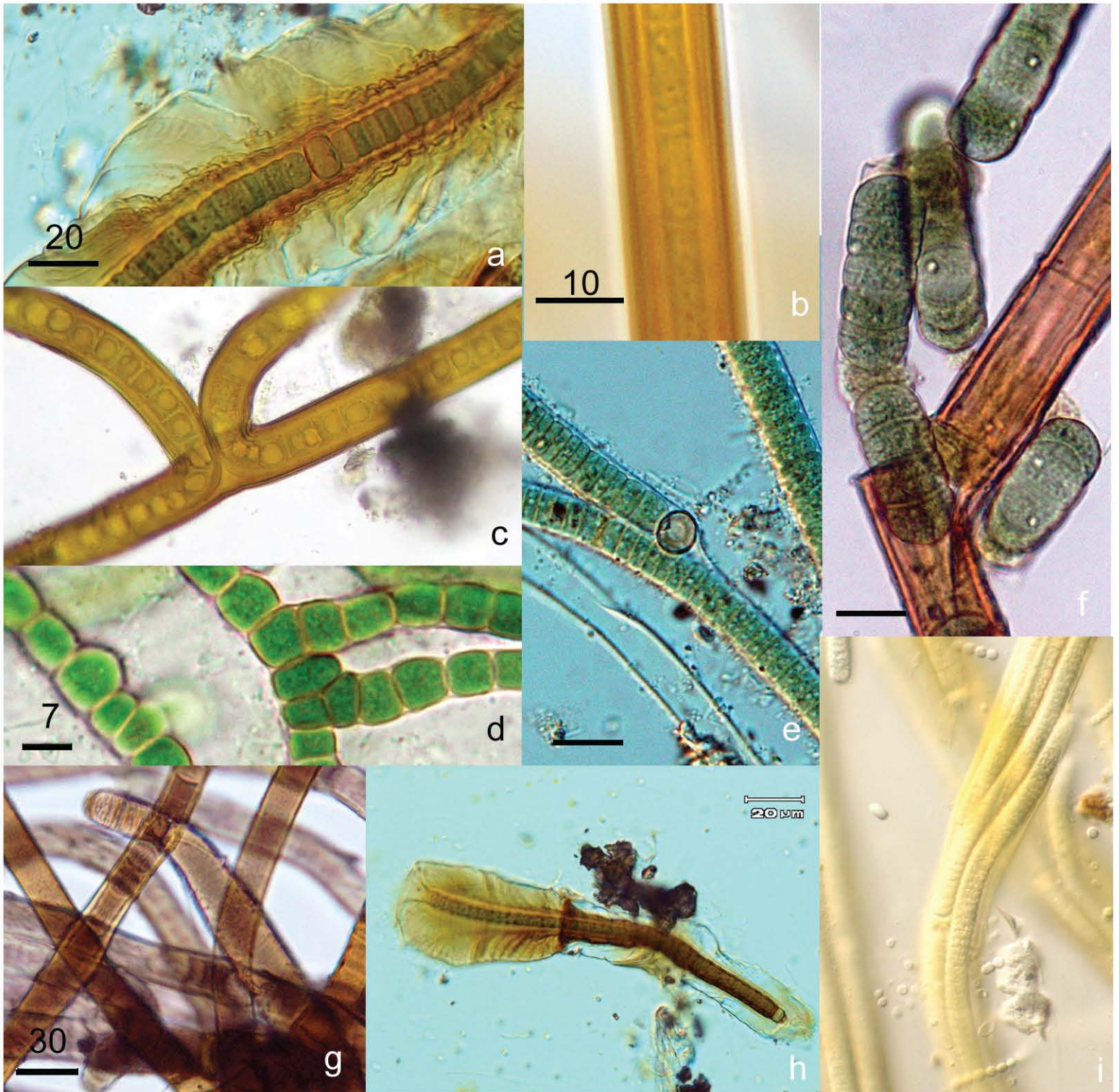


Figura 1

Características morfológicas en las Nostocales:

- a) filamento con vaina divergente, se observa tricoma con heterocito, b) filamento con vaina paralela, c) rama falsa doble, e) rama falsa simple a partir de heterocitos, f) hormogonios, g) filamentos simples isopolares, h) filamento simple heteropolar, i) filamentos con varios tricomas

4. Historia Taxonómica y definiciones de los géneros de la Familia Scytonemataceae

KOMÁREK (2010) reconoció 5 géneros dentro de la familia Scytonemataceae, *Brasilonema*, *Scytonema*, *Petalonema*, *Kyrtuthrix* y *Scytonematopsis*.

El género *Scytonema* fue descrito por primera vez por AGARDH en 1824 y desde entonces su circunscripción se ha mantenido con pocos cambios. Según KOMÁREK (en KOMÁREK & HAUER, 2013) *Scytonema* tiene 106 especies aproximadamente, la mayoría de las cuales, fueron descritas para el género y no tienen sinónimos, salvo algunas como *S. mirabile*, que fue separada de *S. figuratum*, y especies que fueron excluidas y transferidas a *Petalonema*. KOMÁREK (2010) clasificó a *Scytonema* en dos subgéneros; el subg. *Scytonema* tiene las vainas sin o con lamelación paralela y el subg. *Myochrotes* tiene vainas con lamelación divergente.

Scytonema se caracteriza morfológicamente por formar talos filamentosos, con filamentos ramificados solitarios o formando tapetes en el sustrato. Los filamentos se encuentran libres o en fascículos, algunas veces densamente enredados y postrados en el sustrato con ramas erectas. Los filamentos comúnmente tienen ramificaciones falsas con una o dos ramas laterales. Las ramificaciones inician después de la desintegración del tricoma por ayuda de células de sacrificio entre dos heterocitos y crecen paralelas o cruzadas. Los filamentos generalmente hacen bucles laterales antes de la ramificación, en donde los tricomas se rompen. Los tricomas son isopolares, cilíndricos, uniseriados y no diferenciados en partes basales y apicales. Los septos generalmente son constreñidos. Las vainas son firmes, con lamelación paralela o divergente, usualmente de color amarillo-marrón. Las células son verde olivo a verde pálido, usualmente con gránulos solitarios, dispuestos irregularmente. Las células apicales algunas veces tienen vacuolas grandes. Los Heterocitos son intercalares, solitarios, rara vez en pares y pueden presentar forma cilíndrica o de barril. Los hormogonios germinan por ambos extremos (KOMÁREK & HAUER, 2013)

El género *Petalonema* BERKELEY EX CORRENS fue descrito en 1833; actualmente tiene nueve especies: *P. alatum* BERKELEY EX KIRCHNER *P. crassum* (NÄGELI) MIGULA, *P. crustaceum* AGARDH EX KIRCHNER, *P. densum* (A. BRAUN) MIGULA, *P. incrustans* (KÜTZING) KOMÁREK, *P. involvens* (A. BRAUN) MIGULA, *P. pulchrum* (FRÉMY) GEITLER, *P. velutinum* (RABENHORST) MIGULA, *P. fluminalis* ZHAO.

P. alatum es la especie tipo; fue descrita por GREVILLE (1825) como *Oscillatoria alata* y por KÜTZING (1845) como *Arthrosiphon grevillei*. BERKELEY (1833) transfirió la especie *Oscillatoria alata* a *Petalonema* y la especie quedó registrada entonces como *P. alatum*. A su vez, RABENHORST (1865) la transfirió a *Arthrosiphon*, como *A. alatus*, en donde también hizo la sinonimia con *A. grevillei*. Por otro lado Borzì (1879) la transfirió al género *Scytonema*, donde quedó registrada como *S. alatum*. BORNET & FLAHAULT (1886-1888) incluyeron a varias especies que tenían la vaina gruesa y con lamelación divergente en la sección III de *Scytonema*: *S. alatum*, *S. crustaceum*, *S. crustaceum* var. *incrustans*, *S. velutinum*, *S. involvens*, *S. crassum* y *S. densum*. KIRCHNER (1898) retomó el género de BERKELEY, incluyendo a

la especie *P. alatum*, y transfirió a *S. crustaceum*; posteriormente MIGULA (1907) transfirió al género a *S. crassum*, *S. densum*, *S. involvens* y *S. velutinum*. GEITLER (1932) retomó el género con las siguientes especies: *P. alatum*, *P. velutinum*, *P. involvens*, *P. densum* y transfirió la especie *S. pulchrum*, que fue descrita por FRÉMY en 1929. *P. fluminiales* es la única especie que fue descrita originalmente en *Petalonema* y recientemente KOMÁREK (2012) elevó a la categoría de especie a la variedad *incrustans* de *P. crustaceum*.

Como se puede ver en los párrafos anteriores, *Petalonema* ha sufrido varios cambios en su circunscripción debido a las características similares con el género *Scytonema*, como la apariencia general de los tricomas, las ramificaciones dobles, los heterocitos intercalares y las vainas firmes y cilíndricas. Sin embargo, siempre se mantuvieron dentro de la familia Scytonemataceae hasta que KOMÁREK Y ANAGNOSTIDIS (1989), transfirieron el género *Petalonema* a la familia Microchaetaceae, posteriormente KOMÁREK (2010) retornó *Petalonema* a Scytonemataceae.

Recientes trabajos que incluyeron secuencias de *Petalonema* en análisis moleculares del 16S ARNr muestran que especies de este género no forman parte del clado de Scytonemataceae (TATON ET AL., 2006, VACCARINO & JOHANSEN, 2011), pero la información morfológica de las poblaciones de las cuales las secuencias fueron obtenidas no está detallada o no está disponible.

Petalonema se caracteriza morfológicamente por la presencia de talos filamentosos. Los filamentos se observan libres, usualmente solitarios o en pequeños grupos ligeramente enroscados, también pueden estar postrados sobre el sustrato o poco erectos. Los filamentos son heteropolares, algunas veces con un heterocito basal. La ramificación es falsa, puede ser lateral, solitaria o en pares. La formación de las ramas se lleva a cabo por ruptura del tricoma a partir de un heterocito. Las vainas son firmes, muy gruesas, sin color o de color amarillo marrón, claramente tienen lamelación divergente y forman unas estructuras como infundibuliformes. Los tricomas son cilíndricos en las partes medias y basales. Las células tienen forma de barril o cilíndricas y elongadas. En las partes terminales las células son más cortas, con forma de barril y usualmente más anchas que el resto del tricoma. Las células apicales están siempre redondeadas, los heterocitos son intercalares, solitarios, más o menos esféricos y usualmente más anchos que las células vegetativas. No hay acinetos (KOMÁREK & HAUER, 2013).

Kyrtuthrix, género descrito en 1929 por ERCEGOVIC, tiene tres especies: *K. dalmática* ERCEG., la especie tipo, *K. maculans* (GOMONT) UMEZAKI y *K. sinensis* CHU & WU. *K. maculans* fue transferida al género *Kyrtuthrix* desde *Brachytrichia* ZANARDINI EX BORNET & FLAHAULT, debido a la diferencia en el tipo de ramificación. *Brachytrichia* tiene ramificaciones tipo-Y, que se forman a partir de un bucle y posteriormente un cambio en el plano de división mientras que en *Kyrtuthrix* sólo se forman bucles, que aparentemente no forman ramas. *Kyrtuthrix* fue ubicado taxonómicamente en la familia Mastigocladaceae (ERCEGOVIC, 1929) o en la familia Stigonemataceae (UMEZAKI, 1958), hasta que KOMÁREK Y ANAGNOSTIDIS (1998) lo transfirieron a Scytonemataceae.

Kyrtuthrix se caracteriza por la presencia de un talo endolítico que es irregular, está compuesto por filamentos que son más o menos paralelos, sin ramificaciones, pero forman

dobleces laterales. Los tricomas son uniseriados, isopolares y claramente constreñidos en los septos. Las terminaciones de los tricomas se atenúan como pelos. Las células son más o menos isodiamétricas aunque las células terminales están atenuadas. Las vainas son firmes, incolores, ligeramente ampliadas, no gelatinizadas. Los heterocitos son intercalares y no tiene acinetos (KOMÁREK & HAUER, 2013).

El género *Scytonematopsis* fue descrito por KISELEVA (1930); la especie tipo es *S. woronichii* KISELEVA. Existen 15 especies descritas, de las cuales la mayoría fueron descritas originalmente para el género y solo cuatro fueron transferidas de otros géneros: *S. crustaceae* (THURET EX BORNET & THURET) KOVÁČIK & KOMÁREK y *S. pilosa* (HARVEY EX BORNET & FLAHAULT) UMEZAKI & WATANABE desde *Calothrix*, así como *S. fuliginosa* (TILDEN) COPELAND y *S. kashyapii* (BHARADWAYA) GEITLER transferidas de *Scytonema* y *Spelaeopogon* respectivamente.

Scytonematopsis tiene un talo filamentosos con filamentos solitarios, ramificados, o formando agrupaciones irregulares o paralelas o en forma de tapetes sobre el sustrato. Los filamentos se observan libres o densamente enrollados, postrado sobre el sustrato, o unidos él por las partes medias, mientras las terminaciones y las ramas se mantienen libres. Las ramas falsas generalmente son dobles, rara vez simples y la ramificación se inicia por desintegración del tricoma con ayuda de células de sacrificio, pocas veces se forman bucles y nunca se forman a partir de heterocitos. Los tricomas son isopolares, pero algunas veces se forman estados heteropolares tipo *Homoeothrix*; las terminaciones de los tricomas jóvenes y las ramas son cilíndricas con células redondeadas, pero posteriormente distintamente reducidos y algunas veces con células apicales y subapicales vacuolizadas, cilíndricas y elongadas. Los septos del tricoma pueden ser constreñidos o no constreñidos. Las vainas firmes, lameladas paralelamente y hialinas o en los especímenes viejos de color amarillo marrón. Los heterocitos son intercalares, usualmente solitarios, cilíndricos o con forma de barril (KOMÁREK & HAUER, 2013).

Recientemente FIORÉ y colaboradores (2007) usaron evidencia morfológica y molecular para definir un nuevo género dentro de la familia Scytonemataceae llamado *Brasilonema* FIORÉ ET AL. Este género está caracterizado morfológicamente por el desarrollo de crecimientos macroscópicos compuestos de fascículos densamente arreglados; la isopolaridad de los filamentos, la presencia de ramificaciones falsas; los ápices redondeados, no atenuados y el desarrollo isopolar en los hormogonios (FIORÉ ET AL., 2007).

Brasilonema está constituido hasta ahora por nueve especies (FIORÉ ET AL., 2007, AGUIAR ET AL., 2008, SANT' ANNA ET AL., 2011). De estas especies seis fueron descritas originalmente de Brasil: *B. bromeliae* (FIORÉ ET AL., 2007) la especie tipo, *B. octagenarum* (AGUIAR ET AL., 2008), *B. epidendron*, *B. ornatum*, *B. terrestre* y *B. sennae* (SANT' ANNA ET AL., 2011). Esta última fue originalmente descrita como *Camptylonemopsis sennae* (KOMÁREK, 2003) y posteriormente transferida a *Brasilonema* (AGUIAR ET AL., 2008; SANT' ANNA ET AL., 2011). *Brasilonema roberti-lamii* fue descrita originalmente de las Antillas como *Tolypothrix roberti-lamii* (BOURRELLY & MANGUIN, 1952) y transferida, primero al género *Shmidleinema* por KOMÁREK (1989) y posteriormente a *Brasilonema* (SANT' ANNA ET AL., 2011), esta especie

ha sido observada en poblaciones mexicanas. *Brasilonema angustatum* fue aislada de la isla de Oahu en Hawaii (VACCARINO & JOHANSEN, 2012) y *B. tolantongensis* fue observada en Tolantongo Hidalgo, México. (BECERRA ET AL., 2013). La descripción de esta última especie forma parte de los resultados de este estudio (ver apéndice).

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Realizar un estudio sistemático de la familia Scytonemataceae *sensu* KOMÁREK (2010).

Objetivos particulares:

- Analizar morfológicamente a las 9 poblaciones mexicanas de la familia Scytonemataceae que serán utilizadas en este trabajo.
- Analizar morfológicamente a los géneros de la familia Scytonemataceae *sensu* KOMÁREK (2010).
- Realizar una filogenia molecular para poner a prueba la monofilia de Scytonemataceae y la pertenencia de algunas especies mexicanas a los géneros de la familia.

ANTECEDENTES

En México existen amplias regiones tropicales y zonas calcáreas muy importantes como la zona de manantiales de Hidalgo, la Huasteca (que incluyen los estados de SLP, Tamaulipas, parte de Veracruz, Hidalgo y Querétaro), los manantiales de Morelos, la zona árida de Tehuacán, Puebla y la Península de Yucatán, etc.

El estudio de este tipo de ambientes es fundamental para el conocimiento de las cianobacterias, porque se ha comprobado que en estos ambientes las cianobacterias son dominantes, además que los hábitats tropicales no son muy conocidos. Para la familia Scytonemataceae se han observado diferentes poblaciones en varias localidades de las regiones tropicales y calcáreas de México, por ejemplo: Se han registrado 2 poblaciones de *Petalonema* una en Noaalco S.L.P. y otra en Quintana Roo identificada como *P. densum* (BECERRA, 2002, BECERRA & TAVERA 2003); mientras que de *Scytonema* se han registrado 16 especies: *S. arcangelii*, *S. cincinatum* y *S. simplex* para la Huasteca Potosina (CANTORAL, 1993; CARTAJENA, 2004, MONTEJANO ET AL., 2005); *S. bohneri*, *S. chiasmum*, *S. javanicum* y *S. ocellatum* en Tehuacán Puebla (NOVELO, 2011; ÁVILA, 1989; RIVERA-AGUILAR ET AL., 2006), *S. coactile* en Morelos (VALADEZ ET AL., 1996; MONTEJANO ET AL., 2005), *S. guyanense*, *S. millei*, *S. mirabile*, *S. myochrous*, *S. shmiditii* y *S. stuposum* en Chiapas (RAMÍREZ, 2006; TORRES 1993), por último *S. hofmannii* reportada para varias localidades (ORTEGA, 1984).

También se han reportado *Kyrtuthrix* cf. *maculans* en las costas del Pacífico tropical de México (LEÓN-TEJERA ET AL., 2005) y *Brasilonema tolantongensis* (BECERRA-ABSALÓN ET AL., 2013) en Tolantongo Hidalgo. El único género de Scytonemataceae que no ha sido registrado en México es *Scytonematopsis*.

Algunas localidades de la región central de México han sido estudiadas desde hace años, como la Huasteca potosina y la contribución que se ha hecho, con varios trabajos publicados, al conocimiento de la diversidad de cianobacterias ha sido muy importante (KOMÁREK & MONTEJANO, 1994; KOMÁREK ET AL., 1996; MONTEJANO ET AL., 2000; MONTEJANO ET AL., 2004; MONTEJANO ET AL., 2005). En este trabajo se estudiarán muestras de 9 poblaciones que provienen de las siguientes localidades de esta región: Micos y Xilitla de la Huasteca potosina; Tolantongo y Molango de Hidalgo; Los manantiales de Morelos y Valle de Zapotitlán de Puebla. En estas localidades la diversidad de cianobacterias es muy alta y de su estudio, se han descrito nuevas especies (BECERRA-ABSALÓN ET AL., 2013; GOLD-MORGAN ET AL., 1994, 1996; KOMÁREK & MONTEJANO, 1994; MONTEJANO ET AL., 1993), o se han publicado nuevos registro de especies raras (MONTEJANO ET AL., 2000, 2005) que han contribuido al estudio taxonómico de géneros poco estudiados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Colecta, y área de estudio

Las muestras de cianobacterias de los géneros *Scytonema*, *Brasilonema* y *Petalonema* utilizadas en este trabajo, se colectaron durante el 2009 al 2011 en diferentes localidades de la región central de México (fig. 2): Tolantongo, Hidalgo, a 20° 38' 38.3" N y 98° 59' 34" O y una altitud de 1422 msnm; Nonoalco Hidalgo, a 20° 41' 59.5" N y 98° 42' 09.6" O, Micos SLP, a 22° 06' 00.3" N y 99° 09' 08.1" O; Xilitla SLP a 21° 23' 46.1" N y 98° 59' 52.6" O, Los manantiales Morelos a 18° 55.39' N y 99° 00.37' O a una altitud de 800 msnm y el Valle de Zapotitlán, Puebla a 17° 39' y 18° 53' N y 96° 55' y 97° 44' O. De las cuales se tomaron dos tipos de muestras: las muestras de herbario que se fijaron con formol al 4% y las muestras para cultivar que se mantuvieron vivas y fueron transportadas en hielo.

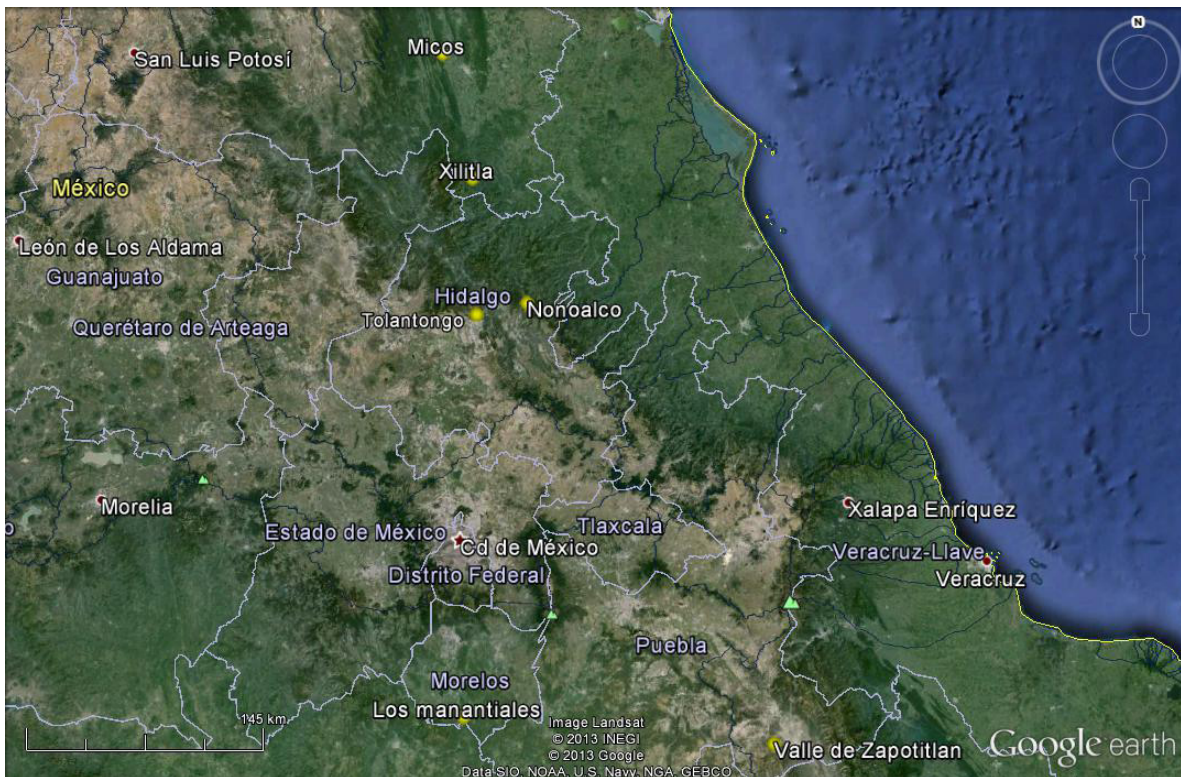


Figura 2 | Mapa de las localidades colectadas
Las localidades se señalan con puntos amarillos

2. Caracterización morfológica y cultivos

La variabilidad morfológica y el ciclo de vida fueron observados de material vivo (fresco y cultivos) y de material fijado en formol al 4%. Para analizar los caracteres morfológicos de las poblaciones de la región central de México, se revisaron las siguientes muestras: de *Petalonema*, PA4606, PA4609, PA4636 y PA4641; *Brasilonema*, PA4261, PA4255, T64, T91, T166, Z90, A15 y A44 (las referencias que empiezan con T son de *B. tolantongensis*); *Scytonema*, PA4562, T5 y Z92 (el prefijo PA es del Pánuco, A es del Amacuzac, T es de Tolantongo y Z del Valle de Zapotitlán). Sólo las muestras de herbario con registro PA están depositadas en la colección FCME, del Herbario María Agustina Batalla de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Las observaciones se hicieron en un microscopio óptico Olympus BX51 equipado con una cámara digital Olympus mod. Dp-12. Para la caracterización morfológica e identificación de las poblaciones se usó el esquema de clasificación de KOMÁREK (2010) y las descripciones de AGUIAR ET AL. (2008), DESIKACHARY (1959), FIORÉ ET AL. (2007), GARDNER (1927a), GARDNER (1927b), GEITLER (1932), SANT' ANNA ET AL. (2011), TILDEN (1910), UHER (2010), VACCARINO & JOHANSEN (2012).

También se hizo una revisión en la literatura para estudiar la morfología de especies de Scytonemataceae: *Scytonematopsis contorta* en VACCARINO & JOHANSEN (2011), *S. hydroides* en COPELAND (1936), *S. starmachii* en KOVÁCIK & KOMÁREK (1988), *S. máxima* en NOVIS & VISNOVSKY (2011), *S. calotrichoides* y *S. incerta* en Geitler & Ruttner (1935), *Brasilonema bromeliae* en FIORÉ ET AL. (2007), *B. octagenarum* en AGUIAR ET AL. (2008), *B. sennae*, *B. terrestre*, *B. epidendron*, *B. roberti-lamii*, *B. ornatum* en SANT'ANNA ET AL. (2011), *B. angustatum* en VACCARINO & JOHANSEN (2012), *Kyrtuthrix dalmatica* en HALPERIN (1970), *K. maculans* en UMEZAKI (1958), las siguientes especies de *Scytonema* en GEITLER (1932) y DESIKACHARY (1959): *S. hyalinum*, *S. javanicum*, *S. mirabile*, *S. bewsii*, *S. tolypothrichoides*, *S. amplium*, *S. myochrous*, *S. austinii*, *S. tenue*, *S. hofmannii*, *S. varium*, *S. ocellatum*, *S. schmidtii*, *S. chiastum*, *S. crispum*, también se revisó *S. hyalinum* en GARDNER (1927a) y ALWATHNANI & JOHANSEN (2011), *S. capitatum* en GARDNER (1927b), *S. javanicum* en ÁVILA (1989) ALWATHNANI & JOHANSEN (2011) y TILDEN (1910), *S. mirabile* en TILDEN (1910) y en TORRES (1993), *S. tolypothrichoides*, *S. austinii*, *S. amplium*, *S. hofmannii* y *S. varium* en TILDEN (1910); por último las 8 especies de *Petalonema* descritas en GEITLER (1932), además también se revisaron para *P. alatum*, TILDEN (1910), UHER (2010), para *P. incrustans*, KOMÁREK (2012) y para *P. crassum* MIGULA (1907).

Para evaluar a la familia Scytonemataceae se utilizaron los siguientes caracteres a nivel de género:

- a) **Polaridad del filamento maduro:** 1) isopolar, 2) heteropolar, 3) isopolar y heteropolar.
- b) **Tipo de ápices del filamento:** 1) redondeados, cerrados, sin engrosamiento, 2) redondeados, cerrados con engrosamiento, 3) redondeados, cerrados o abiertos,

- sin engrosamiento, 4) abiertos, 5) sin ápices, 6) atenuados, abiertos o cerrados.
- c) **Tipo de Vaina en filamentos maduros:** 1) firme, cilíndrica, lisa, delgada, sin lamelación, 2) firme, cilíndrica, lisa, delgada a gruesa, sin lamelación o lamelación paralela, 3) firme, cilíndrica, ondulada, gruesa, lamelación divergente. 4) Firme, en forma de saco, mucilaginosa, 5) firme, cilíndrica, lisa, gruesa, lamelación divergente.
- d) **Forma del tricoma:** 1) mismo ancho en todo el filamento, 2) ligeramente más ancho en los extremos, por una célula apical esférica, 3) más ancho en los extremos que en la zona media, 4) atenuados en los extremos, formando uno o varios dobleces, 5) más ancho en uno de los extremos. 6) Uno o ambos extremos atenuados, a veces con un heterocito basal, 7) mismo ancho o más ancho en uno de los extremos.
- e) **Zonas meristemáticas:** 1) en los extremos del tricoma, 2) en todo el tricoma, 3) en la parte media.
- f) **Tipo de septos:** 1) no constreñidos, 2) no constreñidos a ligeramente constreñidos, 3) ligeramente constreñidos, 4) ligeramente constreñidos a constreñidos, 5) constreñidos.
- g) **Talla de las células en tricomas maduros:** 1) más anchas que largas en los extremos e isodiamétricas a más largas que anchas en el resto del tricoma, 2) más anchas que largas en los extremos e isodiamétricas en el resto del filamento, 3) isodiamétricas a más largas que anchas, 4) más anchas que largas.
- h) **Tipo de ramificación:** 1) simples y dobles paralelas, por ruptura del tricoma entre células vegetativas, 2) Simples y dobles cruzadas, ruptura del tricoma por células de sacrificio, 3) simples y dobles paralelas, por ruptura del tricoma entre células vegetativas y a partir de hormogonios, 4) simples y dobles paralelas, por ruptura del tricoma entre células vegetativas, 5) No hay ramificaciones, solo formación de bucles, 6) Simples por ruptura del tricoma a partir de heterocitos y dobles cruzadas por ruptura del tricoma entre células vegetativas, 7) Forma bucles y ramas simples, por ruptura del tricoma entre células vegetativas, 8) Forma bucles, rara vez ramas dobles o simples por ruptura del tricoma a partir de un heterocito, 9) Dobles paralelas, por ruptura del tricoma entre células vegetativas, 10) Simples y dobles paralelas o cruzadas, por ruptura del tricoma entre células vegetativas.

Y en la comparación entre especies las características que se tomaron en cuenta fueron: 1) forma del talo, 2) color del talo, 3) ancho de los filamentos, 4) ancho de los tricomas, 5) forma de los ápices, 6) color de las vainas, 7) color de las células, 8) medidas de los heterocitos, 9) hábitat y 10) distribución. Además se tomaron otras características particulares: en *Brasilonema* se tomó en cuenta la ornamentación de la vaina y la presencia de caliptra, en las especies de *Scytonema* de la tabla 6 la ornamentación de la vaina y forma de los ápices y por último en *Petalonema* se tomaron en cuenta el hábito y la talla del ápice.

Del material vivo de cada población estudiada se aislaron filamentos que fueron usados

para establecer cultivos monoclonales en medio BG 11 con o sin nitrógeno, tanto sólidos como líquidos (ALLEN, 1968). Los cultivos crecieron en una cámara de ambiente controlado Sanyo a 25 °C, 37.3 mmolcm⁻²S⁻¹ de luz y 12 – 12 horas de fotoperiodo.

Petalonema creció sobre papel filtro humedecido por capilaridad con medio líquido formado por proporciones iguales de agua de la localidad (esterilizada por filtración) y BG 11, en una cámara de ambiente controlado Sanyo a 20 °C, 37.3 mmolcm⁻²S⁻¹ de luz y 12 – 12 horas de fotoperiodo.

Las cepas aisladas no fueron depositadas en ninguna colección reconocida internacionalmente.

3. Aislamiento de DNA y amplificación por PCR:

De los cultivos monoclonales se extrajo el DNA combinando varios procedimientos: 1) primero la muestra se sometió a 5 ciclos de congelamiento y calentamiento como se describe en PALINSKA *ET AL.* (2006), junto con la ruptura mecánica de la muestra por medio de un pistilo; 2) después se usó el Kit UltraClean Microbial DNA Isolation de MO-BIO laboratories para concluir la extracción.

El gen 16S del ARN ribosomal fue amplificado por PCR usando los oligonucleótidos 106F (NÜBEL *ET AL.*, 1997) y 1494Rc (NEILAN *ET AL.*, 1997). La reacción de amplificación se llevó a cabo con Buffer 1x, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM de dNTP's, 0.7 µM de cada oligonucleótido, 1U de polimerasa Amplificasa (Biogénica).

El programa de PCR fue el mismo para ambas amplificaciones y consistió de una desnaturalización a 94°C por 7 min; 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg., alineamiento a 63°C por 1 min. y extensión a 72 °C por 1 min; por último un paso de extensión a 72 °C por 7 min.

Los productos de la amplificación fueron purificados usando el Kit Quiaquick PCR (Quiagen) y se enviaron a secuenciar al Instituto de Biología de la UNAM con los siguientes primers 106 F, 1449Rc, Cya781 R, VRF2 y VRF7. Los fragmentos fueron ensamblados con el programa Bioedit versión 7.0.9.0 (HALL, 1999).

4. Alineamiento y análisis filogenético:

Los taxa usados en el análisis de 16S ARNr incluyeron un total de 268 OTUs (Tabla 2), de las cuales 9 son secuencias obtenidas para este trabajo, correspondientes a dos especies de Tolantongo (*Brasilonema tolantongensis* y *Scytonema mirabile*); una especie de Los manantiales (*Brasilonema* sp.); una especie de Micos (*Scytonema* sp.), una especie de Xilitla (*Brasilonema* sp. 2), 2 especies del Valle de Zapotitlán (*Brasilonema* sp. 3, *Scytonema* sp. 2) y 2 especies de Nonoalco (*Petalonema alatum*, *Tolythrix* sp.) y 260 OTUs fueron obtenidos del GenBank (tabla 2).

Se hizo un análisis de blast para seleccionar las secuencias del GenBank más relacionadas con las nuestras pero también utilizamos criterios de clasificación morfológica para seleccio-

nar secuencias de todas las familias de Nostocales: Scytonemataceae, Microchaetaceae, Nostocaceae, Rivulariaceae, Symphyonemataceae, Hapalosiphonaceae y Stigonemataceae. De todas las secuencias posibles con los dos criterios anteriores, se escogieron las secuencias que fueran mayores a 500 pp, pero en el caso de las secuencias pertenecientes a Scytonemataceae sensu Komárek 2010, se incluyeron a todas las secuencias de especies identificadas, aunque fueran cortas (<500pp).

En el análisis se utilizó a *Gloeobacter violaceus* como grupo externo funcional. Se realizó un primer alineamiento con Clustal W (HIGGINS ET AL., 1994) y posteriormente se revisó y corrigió el alineamiento a ojo en el programa PhyDE-1 v0.9971 (MÜLLER ET AL., 2010), de acuerdo a los lineamientos de GloCSA (ARENAS-DÍAZ ET AL., 2009) y siguiendo las reglas que a continuación se enlistan:

- 1) Inicios y finales de las secuencias que no fueran coherentes con la alineación se eliminaron.
- 2) Siempre se alineó buscando el menor número de eventos potenciales.
- 3) Se prefirió que los gaps tuvieran un mismo principio y/o fin o que estuvieran anidados.
- 4) Se permitió aumentar el número de eventos cuando se identificó un patrón de repetición (SSR).
- 5) En el alineamiento se dio preferencia a las transiciones sobre las transversiones.
- 6) En alineamientos ambiguos:
 - Se prefirió introducir menos gaps, aunque ello implique incrementar el número de sitios variables.
 - Se trató de no introducir sitios variables.
 - Se prefirió alinear en posiciones donde había las mismas bases para reducir eventos potenciales.
 - Donde haya inversiones y sustituciones, se prefirió la opción que consideró menos inversiones, aunque se postulen más sustituciones.
 - Cuando se generan mutaciones autopomórficas se prefieren sobre los gaps.
 - Se prefirieron gaps sin variación interna.
 - Al alinear a ojo se detectaron algunas secuencias problemáticas (matriz en apéndice III):
 - 1) Secuencias que no se pudieron alinear: AY007688, AY493596
 - 2) Secuencias muy cortas al inicio: EU532189, JN216876, FR822750, AF334695, AY452534, FR822751, FR822753, FR822752, AM905327, HQ906640, EF544991, AY452533, HQ011541, HQ149684, EF545643.
 - 3) Secuencias muy cortas al final: EF066607, JF190484, JN705688
 - 4) Secuencias cortas tanto al inicio como al final: JQ687044, HQ172906
 - 5) Secuencias muy diferentes con respecto a otras del mismo género: AY878902,

AF516748, AJ630454, HQ012541, JN605003, GU434226, FJ939127,
EF544992,

6) Secuencias que son tanto cortas, como muy diferentes: AJ8971989, JQ001838,
AF527470.

Los gap fueron codificados como eventos potenciales de inserción o delección en una matriz de ausencia – presencia (SIMMONS & OCHOTERENA, 2000) y posteriormente se fusionaron ambas matrices, la de bases de nucleótidos con la de gaps, ambos procedimientos se realizaron en el programa WinClada (NIXON, 2002). Los gaps de una sola posición y autopomórficos fueron considerados como errores potenciales y por tanto no se codificaron.

También se utilizó el programa WinClada para eliminar los datos no informativos de la matriz fusionada (matriz en apéndice III).

Se utilizó el programa TNT (GOLOBOFF, *ET AL.*, 2008) para obtener los árboles más parsimoniosos posibles, por medio de una búsqueda heurística combinando los métodos sectoriales, ratchet, Drift y tree fusing (Nixon, 1999; Goloboff 1999) sobre 100 árboles iniciales y reteniendo 500 árboles con la longitud más corta en cada iteración. Se retuvieron todos los árboles más parsimoniosos. La búsqueda se repitió hasta que se observó que el número de nodos colapsados y la longitud del árbol consenso no cambió (en total 5 veces), se guardaron todos los árboles obtenidos en cada búsqueda y se utilizaron para calcular el árbol de consenso estricto en WinClada.

El apoyo a los clados se obtuvo con 1000 repeticiones de bootstrap usando los métodos Drift, y Tree fusing, sobre 5 árboles iniciales y reteniendo 1 árbol con la longitud más corta en cada iteración y guardando los árboles consenso de cada perturbación de la matriz; por último las frecuencias de los nodos se mapearon sobre el consenso estricto de los árboles con mayor parsimonia con el programa WinClada. La edición del árbol consenso se realizó en el programa CorelDraw X3.

Tabla 2

Información asociada a las secuencias depositadas en GenBank que fueron usadas en el análisis molecular con el marcador 16S ARNr

	Cepa o clon	GenBank Accession No
<i>Anabaena aequalis</i>	ACCS 089	GU434230
<i>A. augstumalis</i>	Scmidke Jahnke/4a	AJ630458
	A802	EF488830
<i>A. cylindrica</i>	PCC 7122	AF091150
	XP6B	AJ630414
	DC-3	EU780157
	UTAD_A212	GQ443447
<i>A. elliptica</i>	TAC453	AB551450
<i>A. iyengarii</i>	RPAN70	GQ466504
	RPAN6	GQ466520
<i>A. laxa</i>	RPAN56	GQ466508
	RPAN63	GQ466509
	RPAN8	GQ466518
<i>A. oscillarioides</i>	BO HINDAK 1984/43	AJ630428
	BECID22	AJ630426
	RPAN69	GQ466516
<i>A. sedovii</i>	ACCS 058	GU434227
<i>A. sp.</i>	90	AJ133156
	PCC7108	AJ133162
<i>Anabaenopsis abijatae</i>	AB2002/08	AM773295
	AB2002/09	AM773296
<i>An. circularis</i>	NIES21	AF247595
	LMECYA 205	EU078528
	PMC 191.03	GQ859629
<i>An. elenkinii</i>	AB2002/16	AM773299
	NIVA-CYA 494	AM773308
<i>An. nadsonii</i>	2LT27S11	FM177481
	2LT27S06	FM177482
<i>An. sp</i>	1A	AF516747
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	1tu26s2	AJ630443
	-	AY038035
	GG	EF175744
	1042	EU157989
	Z3	FJ424567
	1474	FJ424570
<i>Aph. gracile</i>	1tu26s16	AJ630445
	1039	EU157983
	1	FJ424575
	2	FJ424576
<i>Aph. sp.</i>	202	AJ133153
	PCC 7905	AJ133154
	Tr183	AJ133155
<i>Aulosira bohemensis</i>	ISB-2	EU532189
<i>Au. fertilissima</i>	LCR4	EF066607
<i>Au. pseudoramosa</i>	LCRSM-NDb	JN705705
<i>Au. sp.</i>	BHU005	JQ001838
<i>Brasilonema angustatum</i>	HA4187-MV1-B2 + p1F	HQ847566

	Cepa o clon	GenBank Accession No
	HA4187-MV1-B2 + p1H	HQ847567
<i>B. bromeliae</i>	SPC 951	DQ486055
<i>B. octagenarum</i>	UFV-OR1	EF150855
	UFV-E1	EF150854
	HA4187-MV1-p1F	HQ847562
<i>B. roberti-lamii</i>	Los manantiales	GQ443308
<i>B. sennae</i>	CENA114	EF117246
<i>B. terrestre</i>	CENA116	EF490447
<i>B. tolantongensis.</i>	Tolantongo	JN676147
<i>Cal. brevissima</i>	-	AB074504
	Ind9	HM573459
	Ind 10	JN216876
<i>Cal. desertica</i>	PCC 7102	AB075980
	PCC 7102	AM230699
	PCC 7102	AF132779
<i>Cal. elsteri</i>	CCALA 953	FR822750
<i>Cal. elenkinii</i>	RPC1	GU292083
<i>Cal. membranacea</i>	-	AF527470
<i>Cal. parietina</i>	144-1 + 159-4	AF334695
	2T10	FR798917
<i>Cal. sp.</i>	PCC7714	AJ133164
	UAM 342	HM751842
<i>Camptylonemopsis sp.</i>	HA4241-MV5 clone B2-3 + p3	HQ847564
	HA4241-MV5	JN385292
<i>Capsosira lowei</i>	HWF3-JJ1	AY452534
<i>Chlorogloeopsis fritschii</i>	PCC 6912	AB093489
<i>Ch. sp.</i>	Greenland_5	DQ431000
	PCC 7518	X68780
	Greenland_4	DQ430999
<i>Chrysochlorium bergii</i>	AB2008/43	FR822615
	AB2008/48	FR822622
	09-02	JQ237772
<i>Coleodesmium wrangeli</i>	144-2C + 159-2	AF334703
	144-2B + 159-2	AF334702
<i>Col. sp.</i>	ANT.L52B.5	AY493596
<i>Cuspidothrix issatschenkoi.</i>	1311	EU157977
	Otu37s7	AJ630446
	PMC210.03	GQ859624
<i>Cyanospira capsulata</i>	CC87E	FR774775
	oNAT	FR774776
<i>Cy. rippkae</i>	-	AY038036
	5NR8	FR774769
<i>Cylindrospermum sp.</i>	PCC 7417	AJ133163
<i>Fischerella ambigua</i>	ISC 4	JN605003
<i>Fi. muscicola</i>	PCC7414	AB075986
	SAG2027	AJ544077
<i>Fi. thermalis</i>	PCC7521	AB075987
<i>Fi. sp.</i>	1711	AJ544076

	Cepa o clon	GenBank Accession No
	CENA 19	AY039703
	MV11	DQ786170
	CR_18M	EF545608
	CENA 161	EU840724
	HKAR-5	GQ375051
	JSC-11	HM636645
	HA4357-MV3	JN385293
<i>Fortiea</i> sp.	HA4221-MV2 Ba + p3C	HQ847569
	HA4221-MV2 B4 + p3D	HQ847570
<i>Gloeobacter violaceus</i>	PCC7421	NC_005125
<i>Gloeotrichia echinulata</i>	PYH14	AM230704
	PYH6	AM230703
	URA3	AM230705
<i>Hapalosiphon delicatulus</i>	IAM M-266	AB093484
<i>H. hibernicus</i>	BZ-3-1	EU151900
<i>H. welwtschii</i>	-	AY 034793
	Ind21	HM573460
<i>H.</i> sp.	804-1	AJ544078
	IAM M-264	AB093485
	SAMA 45	GQ354274
<i>Hassallia andreassenii</i>	CCALA 954	FR822751
<i>Has. antarctica</i>	CCALA 955	FR822752
	CCALA 956	FR822753
<i>Has. byssoidea</i>	CCALA 823	AM905327
<i>Has.</i> sp.	CM1-HA08 p7F	HQ847554
	CM1-HA08 p7B	JQ083648
<i>Hydrocoryne spongiosa</i>	HA4387-MV2	JN385287
<i>Iphinoe spelaeobios</i>	LO2-B1	HM748317
<i>Loriellopsis cavernicola</i>	LF-B5	HM74831
<i>Mastigocladopsis repens</i>	MORA	AJ544079
<i>Mast.</i> sp.	CCG2	DQ235802
<i>Mastigocladus laminosus</i>	Higa	AB607198
	Saku	AB607203
	Ja	AB607204
	LSI	AB607205
	LSII	AB607206
	CALU 987	EU116033
	SAG 4.84	EU116035
	OniI	AB607194
	OniII	AB607195
	Oya	AB607196
	Ginza	AB607197
	Ono	AB607199
	ShioI	AB607200
	ShioII	AB607201
	Shioteyu	AB607202
<i>Mastigocoleus testarum</i>	BC008	HQ906640
<i>Microchaete tenera</i>	-	AJ438184

	Cepa o clon	GenBank Accession No
<i>Mi. sp.</i>	LCRSM-2426b	JN705688
<i>Moljavia pulchra</i>	JT2-VF2	AY577534
<i>Nodularia harveyana</i>	CDAC1983/300	AF268020
	UTEX-B2093	AF268021
<i>Nod. sphaerocarpa</i>	-	AF268018
<i>Nod. spumigena</i>	L575	AF268006
		DQ185241
<i>Nodularia sp.</i>	PCC9350	AY038034
<i>Nostoc calcicola</i>	III	AJ630447
<i>N. edaphicum</i>	X	AJ630449
<i>N. ellipsosporum</i>	V	AJ630450
<i>N. sp.</i>	PCC73102	AF027655
	152	AJ133161
	DM103	AJ344563
	8916	AY742447
<i>Nostochopsis lobatus</i>	92.1	AJ544080
<i>Nos. sp.</i>	89-45	AJ544081
	HA4207-MV1	JN385294
<i>Petalonema crustaceum</i>	BDU 40142	EF544991
<i>Petalonema sp.</i>	ANT.GENTNER2.8	AY 493624
	HA4277-MV1 p6G	HQ847568
<i>Rexia erecta</i>	CAT 1M	AY452533
<i>Rivularia atra</i>	BIR KRIV1	AM230674
	BIR MGR1	AM230675
<i>Ri. sp.</i>	1PA1	FJ660972
	1PA10	FJ660984
	1PA12	FJ660985
<i>Scytonema bohnerii</i>	Ind24	HQ172906
<i>Scy. chiasmum</i>	UCFS19	JN565280
<i>Scy. crispum</i>	UCFS15	JN565279
	UCFS16	JN565276
	UCFS17	JN565277
	UCFS21	JN565278
<i>Scy. cf. fritschii</i>	UCFS22	JN565281
	UCFS23	JN565282
<i>Scy. hofmannii</i>	PCC7110	AB075996
	PCC7110	AF132781
<i>Scy. hyalinum</i>	144-3C + 159-3	AF334700
	144-3A + 159-3	AF334698
	144-3B + 159-3	AF334699
<i>Scy. javanicum</i>	FACHB-887	JQ697044
<i>Scy. cf. ocellatum</i>	HTT-U-KK4 p6B	HQ847552
<i>Scy. sp.</i>	U-3-3	AY069954
	HAF2-B2-c1 p11A	HQ847553
	HA4185-MV1 p2	HQ847565
	IAM M-269 } CCG1	AB093483
	FGP-7A	DQ235801
		DQ531698

	Cepa o clon	GenBank Accession No
	HKA-3	FJ939127
	UCFS10	HM629428
	HAF2-B2-c1 p11c	JQ083659
<i>Scytonematopsis contorta</i>	HA4267-MV1 B3-5+p2	HQ847557
	HA4267-MV1 B3-5+p3	HQ847558
	HA4292-MV4 B2+p2	HQ847559
	HA4292-MV4 B2+p4	HQ847561
	HA4292-MV4 B2+p3	HQ847560
<i>Scyto. maxima</i>	LCR-FBC	HQ012541
<i>Sphaerospermopsis aphanizomenoides</i>	1LT27S09	FM177473
	CHAB1306	GU197654
	PMC641.10	HQ157698
	09-03	JQ237771
<i>Sp. kisseleviana</i>	CHAB332	GU197636
	TAC33	AY701557
<i>Sp. raciborskii</i>	Brazil 1	AF516733
	Brazil 2	AF516734
	Florida F	AF516745
<i>Sp. reniformis</i>	06-01	FM161348
	ACCS 105	HQ700833
<i>Sp. torques-reginae</i>	ITEP-024	HQ730086
	ITEP-026	HQ730087
<i>Spirirestis rafaensis</i>	SRS6 143-2C + 159-1	AF334692
	SRS6 143-2B + 159-1	AF334691
	WJT-71-NPBG6 p1A	JQ083655
<i>Stigonema ocellatum</i>	SAG 48.90	AJ544082
	SAMA 35	GQ354275
<i>St. sp.</i>	WI53	JQ435860
<i>Symphyonema sp.</i>	1517	AJ544084
	1269-1	AJ544083
<i>Symphyonemopsis sp.</i>	VAPOR1	AJ544085
	TRK15	AY874099
	TRK35	AY876902
<i>Tolypothrix campylonemoides</i>	F15-MK38 p10A	JQ083653
	F15-MK38 p10D	JQ083654
<i>Tolypothrix distorta</i>	163-5A + 163-8	AF334693
	163-5B + 163-8	AF334694
	159-2	AJ871989
	SAG 93.79	GQ287651
<i>To. noose</i>	Ind17	HQ149684
<i>To. tenuis</i>	UFS-BI-NPMV-1 ^a 2-F06	JQ083651
	UFS-BI-NPMV-1 ^a 2-F06	JQ083652
	Ind16	GU563893
<i>To. sp.</i>	CCMP 1185	AB075998
	PCC 7415	AM230668
	PCC 7504	FJ660995
	UAM 332	HM751847
	HA4266-MV1	JN385291

	Cepa o clon	GenBank Accession No
	CNP3-B1-C1	JQ083657
<i>Toxopsis calypsus</i>	PLF 1	JN695681
	PLF 4	JN695684
<i>Trichormus azollae</i>	Kom BAI/1983	AJ630454
<i>Tr. doiliolum</i>	RPAN53 1	GQ466506
	Doliolum 1	AJ630455
<i>Tr. variabilis</i>	Greifswald	AJ630457
	KCTC AG10008	DQ234829
<i>Umezakia natans</i>	TAC611	AB608023
	TAC101	AF516748
<i>Westiellopsis prolifica</i>	CR_L32	EF545643
	SAG23.96	AJ544087
	VBCCC 022	GQ866912
<i>Westiellopsis</i> sp.	1590-1	AJ544089
	89-785/4	AJ544222
	Ar73	DQ786168
	Ind19	HM573464
<i>Wollea saccata</i>	ACCS 045	GU434226

RESULTADOS

1. Análisis molecular:

En el análisis molecular se obtuvieron 1,500 árboles más parsimoniosos con $L=4090$, $Ci=0.21$ y $Ri=0.79$, el árbol de consenso estricto presentó 24 nodos colapsados con respecto a los más parsimoniosos (fig. 3); tuvo $L=4224$, $Ci=0.21$ y $Ri=0.78$.

Las secuencias analizadas que pertenecen a la familia Scytonemataceae forman 7 clados distintos (A-G), distribuidos en todo el árbol filogenético (fig. 3). El clado A está conformado por *Scytonematopsis máxima*. El clado B está formado por 3 clados de una politomía, en el clado I se encuentran secuencias del género *Mastigocladopsis*, el clado II se forma por secuencias de *Symphyonema* y el clado III por varias secuencias de *Scytonema*, entre las cuales está la de la especie *S. hyalinum*. El clado C es hermano al clado B y está formado por 7 clados (IV-X), en el clado IV observamos a *Petalonema crustaceum*, junto con *Aulosira* sp. y *Symphyonemopsis* sp., el clado V está formado por secuencias de *Scytonema*, entre las cuales está *S. cf. ocellatum*, en el clado VI observamos secuencias de *Symphyonemopsis* e *Iphinoe*, el clado VII está formado por *Scytonema mirabile*, el clado VIII por *Petalonema alatum* y el clado IX por varias secuencias de *Scytonema*, en donde se encuentra la especie tipo *S. hofmannii* y, por último, en el clado X se encuentran todas las secuencias del género *Brasilonema*. El clado D está formado por secuencias de *Scytonematopsis contorta* y *Calothrix*. En el clado E se observa a *Petalonema* sp. y *Scytonema chiastum*, el clado F está formado por *Petalonema cf. involvens* y por último el clado G formado por secuencias de *Scytonema crispum*.

Resumiendo, las secuencias de la familia Scytonemataceae incluidas en este análisis forman distintos linajes (son polifiléticas); lo mismo pasa con los géneros *Scytonema*, *Petalonema* y *Scytonematopsis*. Varios clados de Scytonemataceae son hermanos de clados conformados por géneros de la familia Symphyonemataceae (fig. 3, clado B y C): *Symphyonemopsis*, *Mastigocladopsis* y *Symphyonema*.

En cuanto a las secuencias de nuestras poblaciones, la evidencia molecular confirma la pertenencia de las especies identificadas como *Brasilonema* a este género, *Brasilonema* sp. de Cascada encantada, es especie hermana de *B. bromeliae* y *B. sennae*; mientras que *B. sp.* de Xilitla y *B. sp.* del Valle de Zapotitlán se encuentran en un clado no resuelto junto con *B. terrestre* y *B. tolantongensis*.

También se observa que las tres especies que fueron identificadas como *Scytonema* se encuentran en diferentes linajes. *Scytonema* sp., del Valle de Zapotitlán, es especie hermana de *Scytonema* sp., de Nuevo México, U.S.A., que forman un clado junto con *S. hyalinum*, *S. javanicum* y otras secuencias de *Scytonema* sp.; *S. sp.*, de Micos, es la especie hermana de otras especies no identificadas del mismo género que forman un linaje junto con *S. hofmannii* la especie tipo, mientras que *S. mirabile* y *Petalonema alatum* se ubican como linajes hermanos al clado de *S. hofmannii*.



Figura 3

Árbol filogenético que muestra las relaciones entre cianobacterias del orden Nostocales, basado en análisis de secuencias del gen 16S ARNr, con *Gloeobacter violaceus* como grupo externo funcional. Se muestran el porcentaje de Bootstrap (>50%) y en negritas las secuencias obtenidas para este trabajo de poblaciones de la región central de México. Los clados y ramas en naranja señalan a las especies y géneros de Scytonemataceae sensu KOMÁREK (2010) y el clado en verde incluye a los distintos géneros que de acuerdo a nuestros resultados conformarían Scytonemataceae, señalados también con números romanos.

2. Análisis morfológico de los géneros de la familia Scytonemataceae:

La comparación de las características evaluadas para los géneros (tabla 3 y 4): nos permitió reconocer dos morfotipos diferentes en *Petalonema*, que se diferencian en el tipo de vaina en filamentos maduros, forma del tricoma, zonas meristemáticas, tipos de septos, talla de las células en tricomas maduros y tipo de ramificación (Tabla 3). Los morfotipos son: 1) las especies que se parecen a *P. alatum* (*P. pulchrum*, *P. velutinum*, *P. involvens*, *P. crassum*) y 2) las especies parecidas a *P. crustaceum* (*P. incrustans*, *P. densum*).

También se observaron cinco morfotipos de *Scytonema* que se diferencian en el tipo de ápices, tipo de vaina, forma del tricoma, zonas meristemáticas, Talla de las células y tipo de ramificación (tabla 4). Estos son: 1) las especies parecidas a *S. hofmannii* (*S. coactile*, *S. fitchii*, *S. arcangelii*, *S. tenellum*, *S. guyanense*, *S. ocellatum*, *S. varium*, *S. amplium*, *S. caldarium*, *S. sp.* de Micos; 2) las especies parecidas a *S. hyalinum* (*S. capitatum*, *S. sp.* de Tehuacán); 3) *S. chiastum*; 4) las especies parecidas a *S. myochrous* (*S. tolypothrichoides*, *S. bewsii*, *S. mirabile*, *S. caldarium* var. *terrestre*; 5) las especies parecidas a *S. crispum* (*S. stuposum*, *S. millei*, *S. schmidtii*, *S. hansgirgi*).

Al analizar las características diagnósticas evaluadas de estos géneros (tabla 3) se observó que algunas de ellas difieren de las características de la familia según KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1989), como es la presencia de filamentos heteropolares en *Petalonema* y *Scytonematopsis*, el cual a veces presenta heterocitos basales; ramas falsas a partir de heterocitos como en *Petalonema* o la ausencia de ramas como en *Kyrtuthrix* (tabla 3). Existe diversidad en el tipo de septos, dentro de Scytonemataceae, que va de los no constreñidos, ligeramente constreñidos a constreñidos, un ejemplo de este último estado es *Kyrtuthrix* que tiene células como rosario (tabla 3). La mayoría de los géneros presentan vainas cilíndricas, excepto *Kyrtuthrix*, en el cual, la vaina es como un saco (tabla 3). El género *Brasilonema* y los morfotipos de *Scytonema* que corresponden a *S. hofmannii*, *S. hyalinum* y *S. myochrous*, se mantienen dentro de la circunscripción de Scytonemataceae.

Tabla 3 Características de los géneros de *Scytonemataceae*

La información se obtuvo de observaciones a las poblaciones mexicanas de *Brasilonema*, *Kyrtuthrix* y *Petalonema* y de las descripciones de especies hechas por Ercegović (1929), Migula (1907), Geitler (1932), Copeland (1936), Umezaki (1958), Desikachary (1959), Tilden (1910), Fioré et al. (2007), Aguiar et al. (2008), Sant' Anna et al. (2011), Vaccarino et al. (2011), Kováčik & Komárek (1988), Komárek (2012)

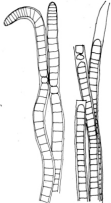
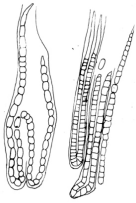

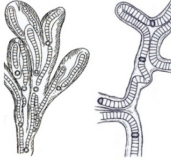
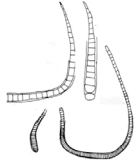
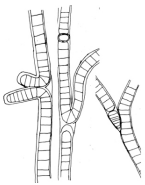


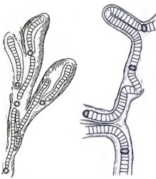
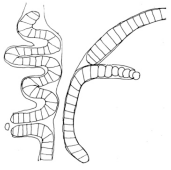
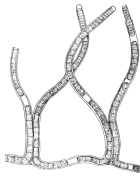

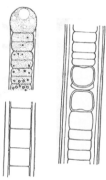

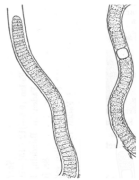

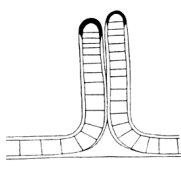
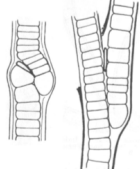
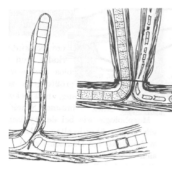
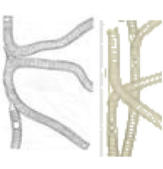
	<i>Brasilonema</i>	<i>Kyrtuthrix</i>	<i>Petalonema</i> , tipo <i>P. alatum</i>	<i>Petalonema</i> , tipo <i>P. crustaceum</i>	<i>Scytonematopsis</i>
					
Polaridad del filamento maduro	Isopolares	Isopolares.	Isopolares y heteropolares	Isopolares y heteropolares	Isopolares y heteropolares
Tipo de ápices del filamento	Redondeados, cerrados o abiertos, sin engrosamiento	Sin ápices	Redondeados o atenuados, cerrados, sin engrosamientos	Sin ápices	Atenuados, abiertos o cerrados
Tipo de vaina en filamentos maduros	Firme, cilíndrica, lisa, delgada, sin lamelación	Firme, en forma de saco, mucilaginoso	Firme, cilíndrica, ondulada, Gruesa, lamelación divergente	Firme, cilíndrica, lisa, gruesa, lamelación divergente	Firme, cilíndrica, lisa, delgada, sin lamelación
Forma del tricoma	mismo ancho en todo el filamento	Atenuados en los extremos, formando uno o varios dobleces.	Mismo ancho o más ancho en uno de los extremos.	Mismo ancho o más ancho en uno de los extremos	Uno o ambos extremos atenuados, a veces con un heterocito basal.
Zonas meristemáticas	En los extremos del tricoma	En todo el tricoma	En los extremos del tricoma	En los extremos del tricoma	En la parte media
Tipo de septos	No constreñidos	Constreñidos	No constreñidos a ligeramente constreñidos	Ligeramente constreñidos	No constreñidos a ligeramente constreñidos
Talla de las células en tricomas maduros	Isodiamétricas a más anchas que largas	Isodiamétricas a más largas que anchas.	Isodiamétricas a más largas que anchas.	Más anchas que largas	Isodiamétricos a más anchas que largos
					
Tipo de Ramificación	Simples y dobles paralelas, por ruptura del tricoma entre células vegetativas o a partir de hormogonio	No hay ramificaciones, solo formación de bucles	Simples por ruptura del tricoma a partir de un heterocito y dobles cruzadas por ruptura del tricoma entre células vegetativas.	Forma bucles, rara vez ramificaciones dobles o simples por ruptura del tricoma a partir de heterocitos.	Forma bucles y ramas simples por ruptura del tricoma entre células vegetativas.
Especies revisadas	Todas las especies descritas, <i>B. sp.</i> Tehuacán, <i>B. sp.</i> cascada encanta, <i>B. sp.</i> Valle de Zapotitlán, <i>S. javanicum</i> .	<i>K. dalmatica</i> , <i>K. maculans</i>	<i>P. alatum</i> , <i>P. pulchrum</i> , <i>P. velutinum</i> , <i>P. involvens</i> , <i>P. crassum</i>	<i>P. crustaceum</i> , <i>P. incrustans</i> , <i>P. densum</i>	<i>S. contorta</i> , <i>S. hydroides</i> , <i>S. starmachii</i> , <i>S. calotrichoides</i>

Tabla 4 | Caracteres de diferentes especies del género *Scytonema*

La información se obtuvo de las observaciones hechas a las poblaciones mexicanas de *Scytonema* y de las descripciones y esquemas de Geitler (1932) y Prescott (1962)

<i>Scytonema</i>					
	<i>Tipo hofmannii</i>	<i>Tipo hyalinum</i>	<i>Tipo chiasmum</i>	<i>Tipo myochrotes</i>	<i>Tipo crispum</i>
					
Polaridad del filamento maduro	Isopolar	Isopolar	Isopolar	Isopolar	Isopolar
Tipo de ápices del filamento	Redondeados, cerrados, sin engrosamiento	Redondeados, cerrados, con engrosamiento	Redondeados, cerrados, sin engrosamiento	Redondeados, cerrados, sin engrosamientos	Abiertos
Tipo de vaina	Firme, cilíndrica, lisa, delgada a gruesa, sin lamelación o con lamelación paralela	Firme, cilíndrica, lisa, delgada, sin lamelación	Firme, delgada a gruesa, sin lamelación o con lamelación paralela	Firme, cilíndrica, ondulada, gruesas, lamelación divergente	Firme, cilíndrica, lisa, delgada, sin lamelación
Forma del tricoma	Mismo ancho en todo el Filamento	Mismo ancho en todo el filamento	Ligeramente más ancho en los extremos por la presencia de una, célula apical esférica	Más anchos en los extremos que en la zona media.	Mismo ancho en todo el filamento
Zonas meristemáticas	En los extremos del tricoma	En los extremos del tricoma	En los extremos del tricoma	En los extremos del tricoma.	En todo el tricoma
Tipo de septos	No constreñidos	No constreñidos	ligeramente constreñidos a constreñidos	No constreñidos	Constreñidos
Talla de las células en tricomas maduros	Más anchas que largas en los extremos e isodiamétricas a más largas que anchas en el resto del tricoma	Más anchas que largas en los extremos e isodiamétricas a más largas que anchas en el resto del tricoma	Más anchas que largas en los extremos e isodiamétricas en el resto del filamento	Isodiamétricas a más largas que anchas	Más anchas que largas
Tipo de ramificación					
	Simples y dobles paralelas por ruptura del tricoma entre células vegetativas	Dobles paralelas, por ruptura del tricoma a partir de célula de sacrificio o entre células veg.	Simples y dobles cruzadas. Ruptura del tricoma por células de sacrificio	Simples y dobles paralelas, por ruptura del tricoma entre células vegetativas.	Simples y dobles paralelas o cruzadas, por ruptura del tricoma entre células vegetativas.
Especies revisadas	<i>S. hofmannii</i> , <i>S. coactile</i> , <i>S. fitschii</i> , <i>S. arcangelii</i> , <i>S. tenellum</i> , <i>S. guyanense</i> , <i>S. ocellatum</i> , <i>S. varium</i> , <i>S. amplium</i> , <i>S. caldarium</i> , <i>S. sp.</i> de Micos.	<i>S. hyalinum</i> , <i>S. capitatum</i> , <i>S. sp.</i> de Tehuacán.	<i>S. chiasmum</i>	<i>S. myochrous</i> , <i>S. tolypotrichoides</i> , <i>S. bewsii</i> , <i>S. mirabile</i> , <i>S. caldarium</i> var, <i>terrestre</i>	<i>S. crispum</i> , <i>S. stuposum</i> , <i>S. millei</i> , <i>S. schmidtii</i> , <i>S. hansgirgi</i>

3. Análisis morfológico de las poblaciones de *Brasilonema*, *Scytonema* y *Petalonema*

En las localidades de estudio se observaron poblaciones de 9 especies que pertenecen a Scytonemataceae: 5 especies del género *Brasilonema*, una identificada como *B. roberti-lamii* y 4 nuevas especies, una de ellas descrita como *B. tolantongensis* en el artículo BECERRA- ABSALÓN ET AL., (2013) y que se anexa en el apéndice I. 3 especies del género *Scytonema*, dos de ellas son nuevas especies y una identificada como *S. mirabile*; por último una especie de *Petalonema* que se identificó como *P. alatum*.

Brasilonema sp., de Cascada encantada presenta rangos de ancho de filamento y ancho de tricoma mayores a todas las demás especies de *Brasilonema* (tabla 5).

El talo de *Brasilonema* sp. de Xilitla tiene fascículos laxos y postrados (tabla 5) esto lo diferencia de *B. terrestre* y *B.* sp. del Valle de Zapotitlán, así como de *B. epidendron*. De las especies que también tienen fascículos postrados, se distingue de *B. tolantongensis* en que los ápices de los tricomas jóvenes no se atenúan, además de que las vainas pueden llegar a ser amarillas pardas y no presenta caliptra (figs. 4 h; 5 f, h-i; tabla 5) y de *B. ornatum* por que tiene la vaina lisa (fig. 4 f; tabla 5).

Los filamentos de *Brasilonema* sp., del Valle de Zapotitlán no están fasciculados como la mayoría de las especies (figs. 6 a; 7 a; tabla 5), solo *B. angustatum* comparte esta característica (tabla 5) pero en *Brasilonema* sp. del Valle de Zapotitlán los ápices no están atenuados y los filamentos y tricomas son más anchos (figs. 6 a; 7 b; tabla 5). Además esta especie se caracteriza por la presencia de heterocitos basales esféricos y cuando son intercalares están ligeramente aplanados (figs. 6 e; 7 d).

La especie de *Scytonema* de Tolantongo fue identificada como *S. mirabile* porque presenta filamentos tortuosos, intrincados, la lamelación es ligeramente divergente, los septos son ligeramente constreñidos, las células apicales tienen forma de barril, características que están acorde a las descripciones de la especie (tabla 6; figs. 8 y 9).

Scytonema sp., del Valle de Zapotitlán, presenta un engrosamiento en los ápices de las vainas que a veces forma capas (figs. 6 y 7), otras especies que presentan esta característica son *S. hyalinum* y *S. capitatum* (tabla 6). *Scytonema* sp., del Valle de Zapotitlán, tiene medidas de los filamentos y tricomas similares a *S. hyalinum* además ambas presentan un engrosamiento apical de la vaina que puede tener capas, mientras que *S. capitatum* tiene filamentos y tricomas más anchos. Aunque las medidas de *Scytonema* sp., del Valle de Zapotitlán, se traslapan con *S. hyalinum* se puede observar en la tabla 6 que los tricomas de *Scytonema* sp., el Valle de Zapotitlán son más angostos y las vainas más gruesas, además la vaina tiene apariencia escamosa y los intervalos en el ancho y largo de las células son mayores (figs. 6 y 7).

Scytonema sp., de Micos, se comparó con otras especies subaéreas de ambientes terrestres que tienen medidas similares en el ancho de los tricomas (tabla 7). *S. austinii* y *S. amplium* tienen filamentos más anchos que la especie de Micos y por el otro lado *S. tenue* y *S. hof-*

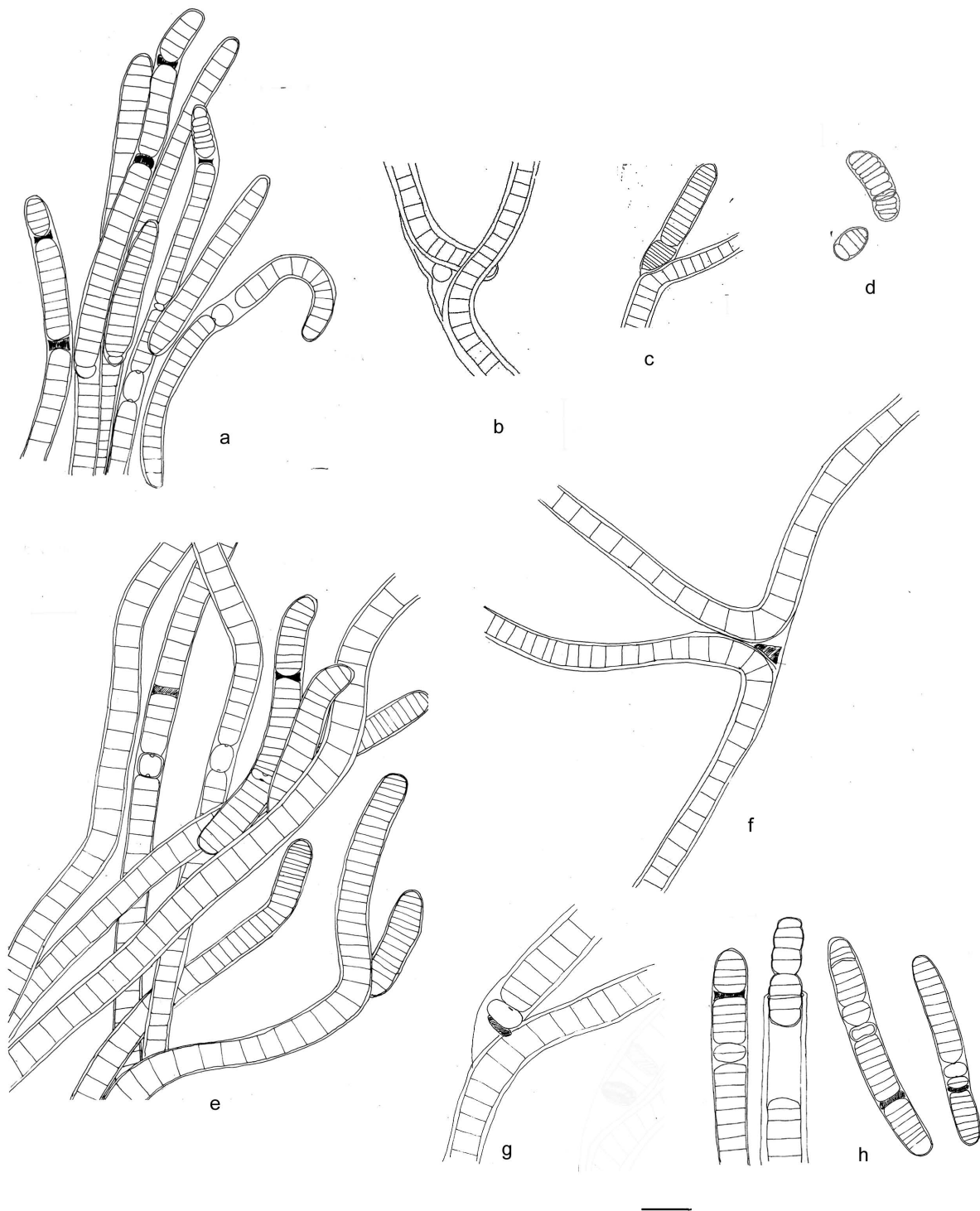


Figura 4

Características morfológicas de dos poblaciones de *Brasilonema*: a – d, *Brasilonema*. sp. de los manantiales Mor: a) apariencia de los filamentos fasciculados, b) ramificación doble, c) ramificación a partir de un hormogonios, d) desarrollo asimétrico de los hormogonios. e – h, *B.* sp. de Xilitla: e) apariencia de los filamentos fasciculados, f) rama falsa doble a partir de célula necridial, g) rama simple a partir de célula necridial, h) desarrollo asimétrico de los hormogonios.

mannii tienen filamentos más delgados. *Scytonema* sp., de Micos se diferencia de *S. varium* en que presentó tricomas más delgados, las células fueron más largas y la vaina más gruesa (figs. 8 y 9).

La especie de *Petalonema* de Nonoalco fue identificada como *P. alatum*, especie tipo del género *Petalonema*, debido a que es muy similar a la diagnosis de la especie (GEITLER, 1932; DESIKACHARY, 1959) en medidas de filamento y tricoma, tipo de vaina y ápices (Tabla 8, fig. 10 y 11).

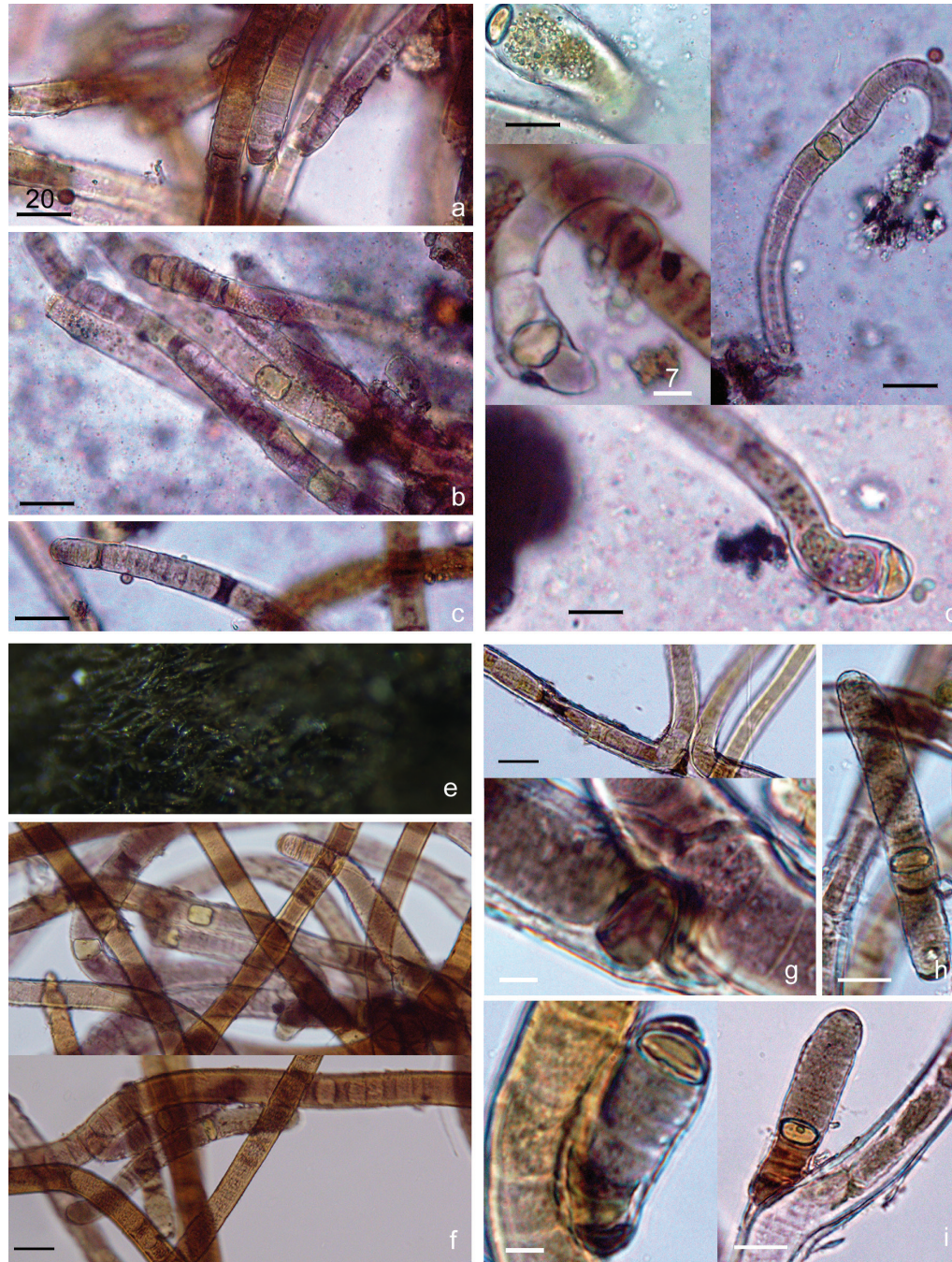


Figura 5

Características morfológicas de dos poblaciones de *Brasilonema*: a - d. *Brasilonema* sp. de Cascada encantada: a y b) fascículos de Filamentos, c) formación de hormogonios, d) desarrollo asimétrico de los hormogonios (hormogonios con heterocito basal. e - i, *B.* sp. de Xilitla: e) apariencia del talo, f) filamentos y heterocitos, g) ramas falsas dobles, y simples a partir de necridios, h) desarrollo de hormogonios, i) ramas falsas a partir de hormogonios.

Tabla 5 | Características de las especies de *Brasilonema*

En negritas las especies de este estudio, la información de las demás especies fue obtenida de Aguiar et al. (2008), Becerra-Absalón et al. (2013), Fioré et al. (2007), Santa' Anna et al. (2011), Vaccarino & Johansen (2012)

	<i>B. bromeliae</i>	<i>B. octagenarum</i>	<i>B. sennae</i>	<i>B. roberti-lamii</i>	<i>B. epidendron</i>	<i>B. ornatum</i>	<i>B. terrestre</i>	<i>B. tolantongensis</i>	<i>B. angustatum</i>	<i>B. sp. Los manantiales</i>	<i>B. sp. Xilitla</i>	<i>B. sp. Valle de Zapotitlán</i>
Forma del talo	Fascículos libres	Tapetes de fascículos irregulares, fascículos postrados.	Fascículos erectos paralelos regulares.	Tapete de fascículos erectos	Fascículos erectos irregulares	Fascículos postrados	Tapetes de fascículos erectos irregulares	Tapetes de fascículos postrados.	Filamentos largos, erecto, no fasciculados	Tapete de fascículos densos	Tapete aterciopelado, fascículos laxamente, postrados	Tapete costroso
Color del talo	Verde negruzco a violeta negruzco	Marrón o verde negruzco	Marrón o verde negruzco	Pardo negruzco	Verde oscuro a negro	Verde grisáceo	Verde negruzco	Violeta negruzco	Café	Negro	Café parduzco	Negro a negro grisáceo
Ancho de filamentos (µm)	15 -17	9.8-18.5	10-20	11-14(18)	(7)10.9-12(14)	20-23	12-17	17-25, = 21.	9.8 – 17.8	12.5 – 37, =	18 – 23, =	15.2 – 22.3, = 18.8
Ancho de tricomas (µm)	14.4-16.8	9.5-18.4	6-12.5	9.5-11.5	(5.5)8.2-10(11)	17-18	9-15	12.5-20, = 17	(5.5) 9.8 – 17	11.5 – 22.5, =	11.7 – 15.5, =	12.6 – 16.4, =
Forma de los ápices	No atenuadas	No atenuado	No atenuado	No atenuado, forma de barril o redondos	No atenuado	No atenuado	No atenuado	No atenuados, atenuados en tricomas jóvenes.	Atenuados	No atenuados	No atenuados	No atenuados
Ornamentación de la vaina	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Ornamentada	Ornamentada	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Color de las vainas	Sin color a Amarillo pardo	Sin color	Amarillo pardo a sin color	Sin color a Amarillo pardo	Sin color	Sin color	Sin color a Amarillo pardo	Sin color	Sin color	Sin color	Sin color a amarillas parduzcas	Amarilla a café
Color de las células	Azul grisáceo, marrón, verde olivo o violeta	Marrón, verde olivo, rara vez violeta	Azul verde o verde olivo	Violeta	Verde azul brillante	Verde azul oscuro	Verde grisáceo o verde azul	Violeta o marrón	Café a violeta grisáceo	Violeta a marrón	Violeta a marrón	Verde olivo a marrón
Heterocitos (µm)	4—19 x 15-16.8	5.4-15.6 x 10-17.6	6.8-15.4 x 10.2-11.2	11-13.5 x 10.5-13	(7)8-10(11.5) x 7-9	3-6 x 17-18	6-17 x 13-14	7-15.5 x 12.5-16.5	10 – 17 x 2.8 – 17.4	10.8 – 18.1 x 10 – 21, =	15.5 – 20 x 14.5 – 21, =	14 – 15 x 10 – 12.7
Caliptra	Presente	Presente	-	Ausente	-	-	-	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Hábitat	Subaéreo y epífito, sobre hojas vivas y muertas de Bromelias	Epífito sobre <i>Eucalyptus grandis</i>	Subaéreo sobre Madera, piedra y hierro húmedo en muelles	Aerofítico sobre rocas y paredes.	Subaéreo, sobre madera vieja en bosques húmedos	Subaéreo, sobre cortezas de árboles viejos, musgos y líquenes	Subaéreo sobre piedra periódicamente humedecida.	Subaéreo sobre paredones con infiltraciones de agua	Terrestre, subaéreo, entre musgos	Subaéreo, sobre roca calcárea, húmeda con escurrimientos	Subaéreo, sobre paredón húmedo	Subaéreo, sobre suelo, en desiertos
Distribución	Brasil, São Paulo (Jardín botánico)	Brasil, Timóteo, (Clonal Nursery Graden)	Brasil, Parana-piacaba	Guadalupe and México (Los manantiales, Morelos)	Brasil, Parana-piacaba	Brasil, campos do Jordão	Brasil, São Pedro, Cardoso Island	México, Tolantongo, Hgo.	U.S.A., Valle Manoa, Oahu, Hawaii	México, Cascada encantada, Los manantiales Mor.	México, Xilitla, S.L.P	México, Valle de Zapotitlán, Puebla.

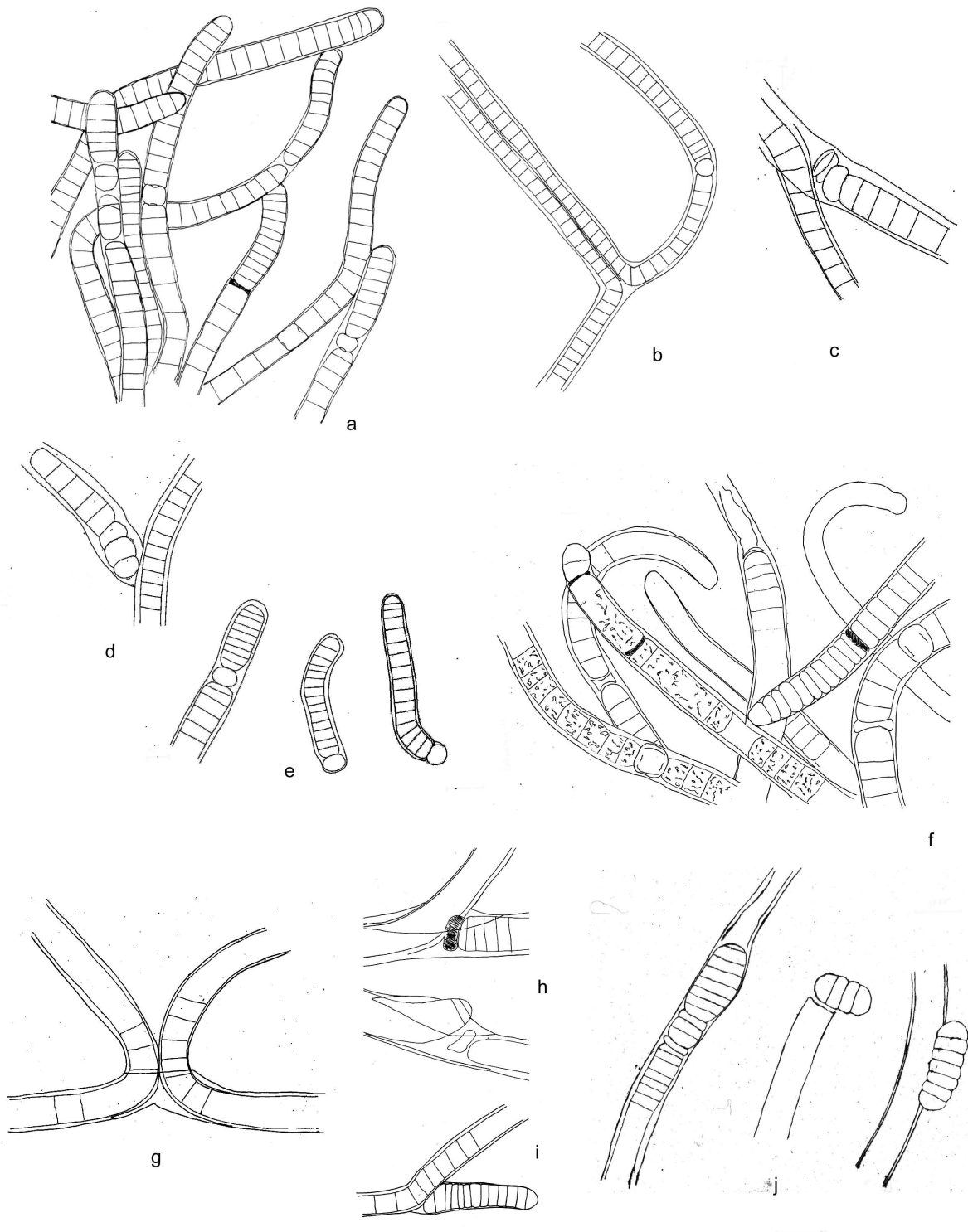


Figura 6

Características morfológicas de poblaciones de *Brasilonema* y *Scytonema*: a – e, *B. sp. 3* del Valle de Zapotitlán: a) apariencia de los filamentos, b) Ramas falsas dobles, c) Ramas falsa simple a partir de célula vegetativa, d) Rama falsa a partir de hormogonio, e) Desarrollo de hormogonios; f – j, *Scytonema sp.* del Valle de Zapotitlán: f) Apariencia de los filamentos, g) Rama falsa doble, h) Rama simple a partir de célula necridial, i) rama falsa a partir de hormogonios, j) Formación de hormogonios.

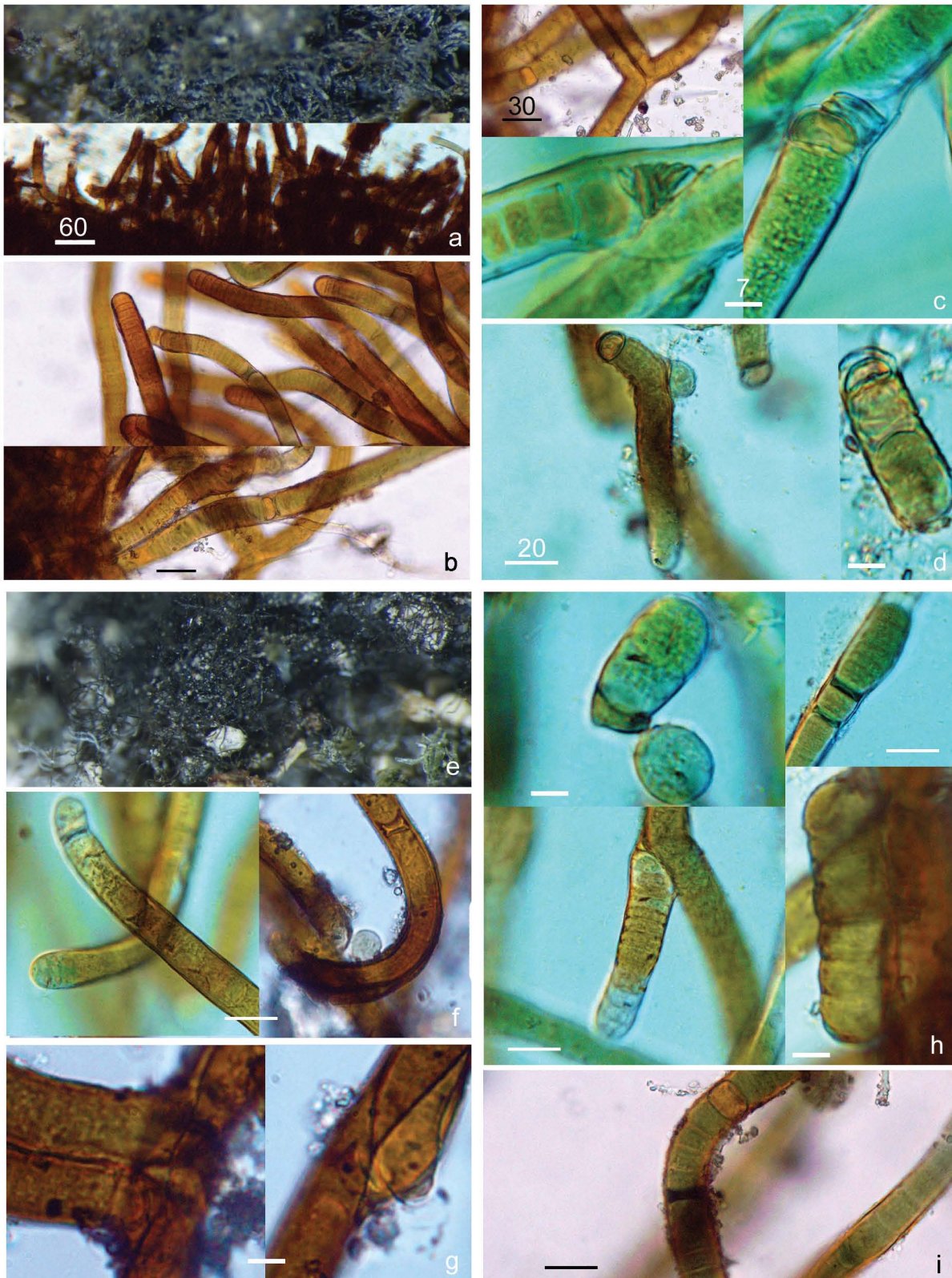


Figura 7

Características morfológicas de poblaciones de *Brasilonema* y *Scytonema*: a – d. *Brasilonema* sp. 3 de Tehuacán: a) apariencia del talo, b) apariencia de los filamentos, c) ramas falsas dobles y simples por necridios, d) desarrollo de los hormogonios; e – i, *Scytonema* sp. 1 Tehuacán: e) apariencia del talo, f) ápices, g) ramas falsas dobles y simples, h) desarrollo de los hormogonios, i) apariencia del filamento y heterocitos.

4. Descripciones de las especies estudiadas en este trabajo

B. sp. de Cascada encantada (figs. 4 a-d y 5 a-d)

Talo macroscópico negro; filamentos fasciculados, postrados, 12.5 – 37 μm de ancho. Vaina fina, delgada, lisa, transparente. Ramificaciones dobles a partir de células de sacrificio y por hormogonios adheridos a la vaina de filamentos. Tricomos generalmente curvados, 11.5 – 22.5 μm de ancho, septos no constreñidos, ápices redondeados. Células más anchas que largas, 4 – 14 μm de largo. Heterocitos en forma de barril, 10.8 – 18.1 μm de ancho por 10 – 21 de largo. Hormogonios con heterocito basal, generalmente pegados a las vainas de filamentos. **Hábitat**, Subaéreo, lugares húmedos o con escurrimientos de agua y roca calcárea. **Referencia de muestra**: A15 y A44. **Localidad Tipo**: En una cascada dentro de Los Manantiales Mor.

B. sp. de Xilitla (figs. 4 e-h y 5 e-i)

Tapete filamentosos, aterciopelado, café parduzco; filamentos fasciculados laxamente, generalmente postrados, 18 – 23 μm de ancho. Ramas falsas dobles y sencillas a partir de células de sacrificio. Vaina firme, delgada, lisa, sin color a amarillas parduzcas, generalmente cerradas en los ápices. Tricomos 11.7 – 15.5 μm de ancho, septos sin constricciones, ápices redondeados; tricomas jóvenes curvados ligeramente sigmoide. Células de tamaño variable, en los ápices muy cortas, mientras que en zonas intermedias más largas que anchas, 6.5 – 19 μm de largo, violeta a café parduzco. Heterocitos cuadrados o con forma de barril, 15.5 – 20 μm de ancho por 14.5 – 21 μm de largo. Hormogonios rectos con heterocitos basales o intercalares. **Hábitat**: Aerofítico, sobre paredón húmedo. **Referencia de muestra** PA4261 y PA4255. **Localidad tipo**: Las pozas, Xilitla, SLP.

B. sp. de Valle de Zapotitlán (figs. 6a-e y 7a-d)

Talo macroscópico, costroso, negro a negro grisáceo. Filamentos fasciculados laxamente, 13.8 – 18.7 μm de ancho, erectos. Ramas falsas dobles y simples a veces a partir de células de sacrificio y ramas a partir de hormogonio adherido a un filamento. Vaina delgada, firme, lisa, amarilla a café, generalmente cerrada, ápices redondeados. Células cuadradas, solo en los meristemas, más anchas que largas en el resto del tricoma, 4.6 – 12.6 μm de largo. Heterocitos redondos, 14 – 15 μm de ancho por 10 – 12.7 de largo μm . Hormogonios con heterocito basal redondo. **Hábitat**: Aerofítico, sobre suelo, en el desierto. **Referencia de muestra**: Z90. **Localidad tipo**: Valle de Zapotitlán, Puebla.

Anotaciones del ciclo de vida de Brasilonema

a partir de las poblaciones estudiadas: Tricomos con ápices cerrados forman hormogonios en los ápices, generalmente a partir de una célula de sacrificio (Figs. 4a, e, h; 5c; 6a; 7b); los hormogonios después de ser liberados se mantienen entre los filamentos y generan uno o dos heterocitos, que dividen al tricoma asimétricamente (un lado con más células que

el otro) y posteriormente se rompen justo en donde se localiza el o los heterocitos, de tal forma, que quedan hormogonios con heterocitos basales (figs. 4d, h; 5d, h; 6e; 7d). El desarrollo de los hormogonios es asimétrico, porque las células de solo uno de los extremos comienzan a dividirse (sobre todo, si hay heterocitos basales); a veces, también ese extremo se atenúa (figs. 4d, h; 5d, h; 6e; 7d); posteriormente, se restablece la condición isopolar y los tricomas maduros tienen el mismo ancho en toda su longitud. Las ramas dobles o simples se forman entre células vegetativas o células de sacrificio (figs. 4b, f, g; 5g; 6b, c; 7c). Los hormogonios pegados en la vaina de los filamentos, cuando se desarrollan, también pueden formar ramas falsas, a veces, parece que se formaron a partir de heterocitos, pero en realidad, fue a partir de un hormogonio con heterocito basal (figs. 4c; 5i; 6d, i)

Scytonema sp. del Valle de Zapotitlán (figs. 6f-j y 7e-i)

Talo costroso, negro; filamentos isopolares, entremezclados, sin formar haces, 13 – 18.7 μm de ancho. Ramificaciones falsas dobles, simples y por hormogonios adheridos a las vainas. Ápices con engrosamiento en la vaina, transparente y estriaciones horizontales como cicatrices, a veces curvados como J. Vainas generalmente delgadas a gruesas, no lameladas pero con apariencia escamosa, incoloras a pardas. Tricomas del mismo ancho en todo el filamento, 9.4 – 14.2 μm de ancho, de color verde azul a verde olivo, a veces amarillento; septos no constreñidos, hay zonas donde no se distinguen los límites celulares; células más anchas que largas a cuadradas o ligeramente más largas que anchas 6.5 – 15.3 μm .

Heterocitos más anchos que largos a cuadrados, 12.5 – 15.3 μm de ancho y 9.6 – 13 μm de largo. **Hábitat:** Aerofítico, en desierto sobre suelo. **Referencia de muestra:** Z92. **Localidad tipo:** El Valle de Zapotitlán, Puebla.

Anotaciones del ciclo de vida: Los tricomas forman hormogonios por células de sacrificio (figs. 6f, h; 7h), los hormogonios se mantienen entre los filamentos, pueden quedar pegados a las vainas, y formar ramas falsas al desarrollarse (figs. 6j; 7h); el desarrollo del hormogonio es simétrico, no hay formación de heterocitos intercalares (figs. 6j; 7h). Las ramas falsas dobles o simples se forman a partir de células de sacrificio; la ruptura de la vaina cuando salen las ramas, parece ser mecánica y al parecer intervienen en este proceso el engrosamiento de la vaina en el ápice (figs. 6g, h; 7g).

Scytonema mirabile (figs. 8a-e y 9a-f)

Colchón negro compuesto de filamentos isopolares, 8.5 – 15.8, ramificaciones falsas dobles. Vainas delgadas a gruesas sobre todo en los extremos del filamento, generalmente firmes, cuando presenta lamelación es paralela a ligeramente divergente, transparentes a amarillo pardo. Tricomas ligeramente más estrechos en la parte media que los extremos, 4 – 10 μm de ancho; célula apical diferenciada, esférica, sobre sale de la vaina, con una envoltura más delgada; células de color verde azul a verde olivo, más anchas que largas a cuadradas, menos en las partes viejas del filamento que son ligeramente más largas que anchas, 4 – 16 μm de

largo. Heterocitos cuadrados a rectangulares 7 – 14 de ancho por 7.5 – 25 μm de largo. Reproducción por hormogonios o por liberación de una célula. **Hábitat:** Subaéreo, sobre pared de cascadas. **Referencia de muestra:** T5. **Localidad tipo:** Tolantongo, Hidalgo.

Anotaciones del ciclo de vida: Los tricomas forman hormogonios por células de sacrificio, también pueden liberar una sola célula (esto solo se observó en cultivo, figs. 8e; 9f); Los hormogonios no se mantienen entre los filamentos. Una vez que se liberan los hormogonios, la célula apical se vuelve esférica y se recubre por una capa de vaina delgada (figs. 8a; 9b). Las ramas se generan por ruptura entre células vegetativas (figs. 8d; 9e).

Scytonema sp., de Micos (figs. 8f-j y 9g-l)

Tapete filamentososo de color verde bandera a negruzco compuesto de filamentos maduros isopolares, 10 – 14 μm de ancho; ramificaciones falsas dobles paralelas, a veces a partir de células de sacrificio; vainas gruesas sobre todo en los extremos del filamento, firme pero flexuosa, con lamelación paralela, transparente (principalmente en los extremos) a amarilla parda (en partes más viejas). Tricomas más estrechos en la parte media que en los extremos, 2.6 – 7 μm de ancho, septos generalmente rectos, solo ligeramente constreñidos en las zonas meristemáticas; células de color verde azul, verde grisáceo o verde olivo, generalmente cuadradas, menos en la parte media del filamento o en las células viejas que son más largas que anchas, 7 – 14, con contenido muy granuloso distribuido uniformemente. Heterocitos cuadrados a rectangulares (cilíndricos), 4.7 – 6.4 ancho por 11 – 13 de largo. **Hábitat:** Aerofítico, sobre paredón húmedo. **Referencia de muestra:** PA4562. **Localidad tipo:** Micos S.L.P.

Anotaciones del ciclo de vida: La formación de hormogonios en las poblaciones naturales no se observó, solo pudo observarse en los cultivos y es rara; lo común fue observar a los filamentos fragmentados en su totalidad, como si hubieran sido contados con tijeras (figs. 8h; 9i). Las ramas se forman por células de sacrificio o ruptura entre células vegetativas (figs. 8i; 9k). Los tricomas cuando viejos suelen adelgazarse en la parte media del tricoma, generalmente tienen el mismo ancho (figs. 8h; 9h).

Petalonema alatum (figs. 10 y 11)

Cojín esponjoso, naranja a café pardo. Filamentos isopolares y heteropolares, una parte postrada o entre sedimento y el extremo o ramas erectas, 22 – 90 μm de ancho. Vainas gruesas, muy estratificadas en los márgenes, divergentes, en el centro no estratificado, amarillo marrón a naranja marrón, el color más intenso en el centro se diluye hacia el margen. Ápices cerrados, más gruesos que el resto del filamento. Ramas falsas simples a partir de heterocitos, algunas veces dobles a partir de células vegetativas, al principio las ramas cruzadas, después paralelas. Tricomas cuando heteropolares más anchos en uno de los extremos y degenera hacia la base, septos ligeramente constreñidos 3 – 12.8 μm de ancho. Células casi cuadradas a más largas que anchas, verde azul a verde olivo 2.7 – 17.5 μm de largo. Heterocitos más anchos que largos 8.4 – 15 de ancho por 4 – 10.8 de largo. **Hábitat:**

Subaéreo, sobre paredones de roca calcárea, húmedos o con escurrimientos. **Referencia de muestra:** PA4606, PA4609, PA4636, PA4641. **Localidad Tipo:** Nonoalco, Hidalgo.

Anotaciones del ciclo de vida: La formación de hormogonios es rara en poblaciones naturales, además, no se mantienen entre los filamentos y por eso tampoco se pudo observar el desarrollo de los hormogonios de material de campo, pero sí se observaron en cultivo y se forman por ruptura del tricoma entre células vegetativas, que se deslizan lateralmente, el desarrollo es simétrico (fig. 10c); lo mismo ocurre en la formación de las ramas dobles, por eso en su inicio se observan cruzadas (también observado sólo en cultivo), puede tener ramas dobles o simples pero estas últimas siempre se forman por la ruptura del tricoma a partir de un heterocito (figs. 10d; 11h). Los tricomas pueden estar adheridos al sustrato por uno de los extremos, cuando esto sucede existe heteropolaridad y generalmente el tricoma se adelgaza y desintegra hacia la base (figs. 10b, 11k).

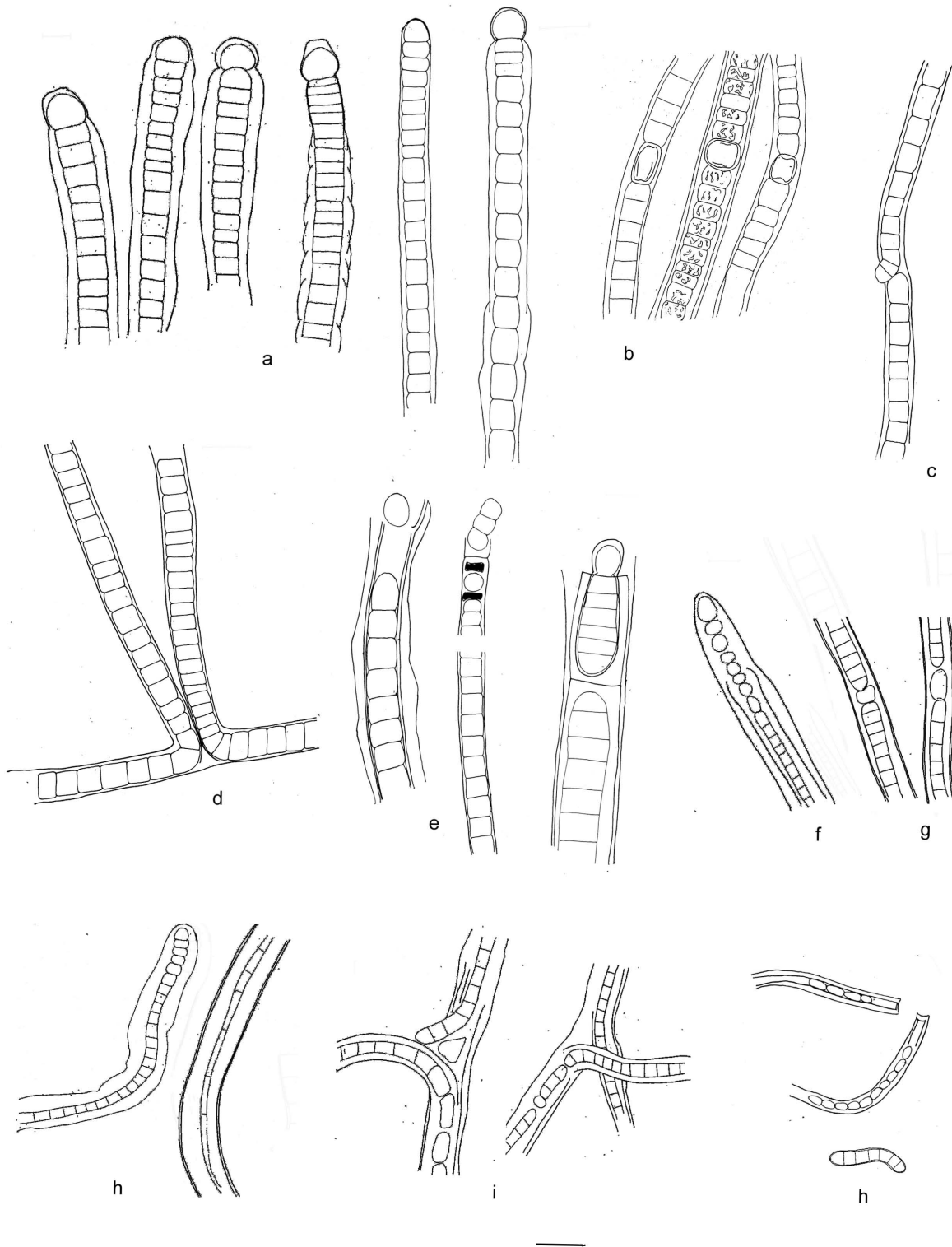


Figura 8

Características morfológicas de dos poblaciones de *Scytonema*: a – e, *Scytonema mirabile*: a) Diferencias en los ápices de los filamentos, b) heterocitos, c) formación de ramas falsas, d) ramas falsas dobles, e) formación de hormogonios; f – j, *Scytonema* sp. de Micos: f) ápices del filamento, g) heterocitos, h) tricomas, i) ramas falsas, j) hormogonios y fragmentación de filamentos.

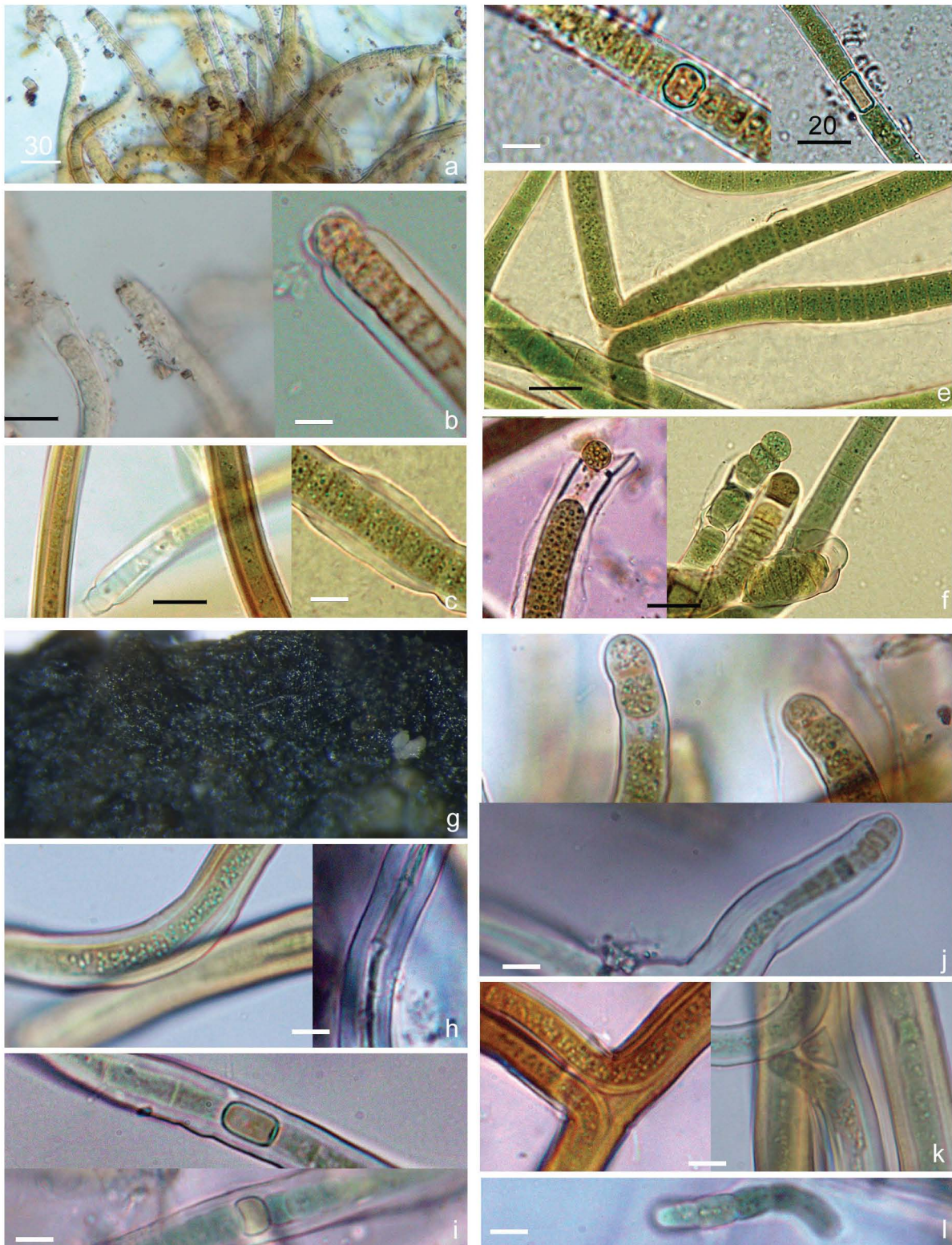


Figura 9

Características morfológicas de dos poblaciones de *Scytonema*: a – f, *Scytonema mirabile*: a) apariencia de los filamentos, b) ápices, c) vainas, d) heterocitos, e) ramas, f) formación de hormogonios; g – l, *Scytonema* sp. de Micos: g) apariencia del talo, h) apariencia de los filamentos y degradación del tricoma, i) heterocitos, j) ápices, k) ramas falsas dobles, l) hormogonios.

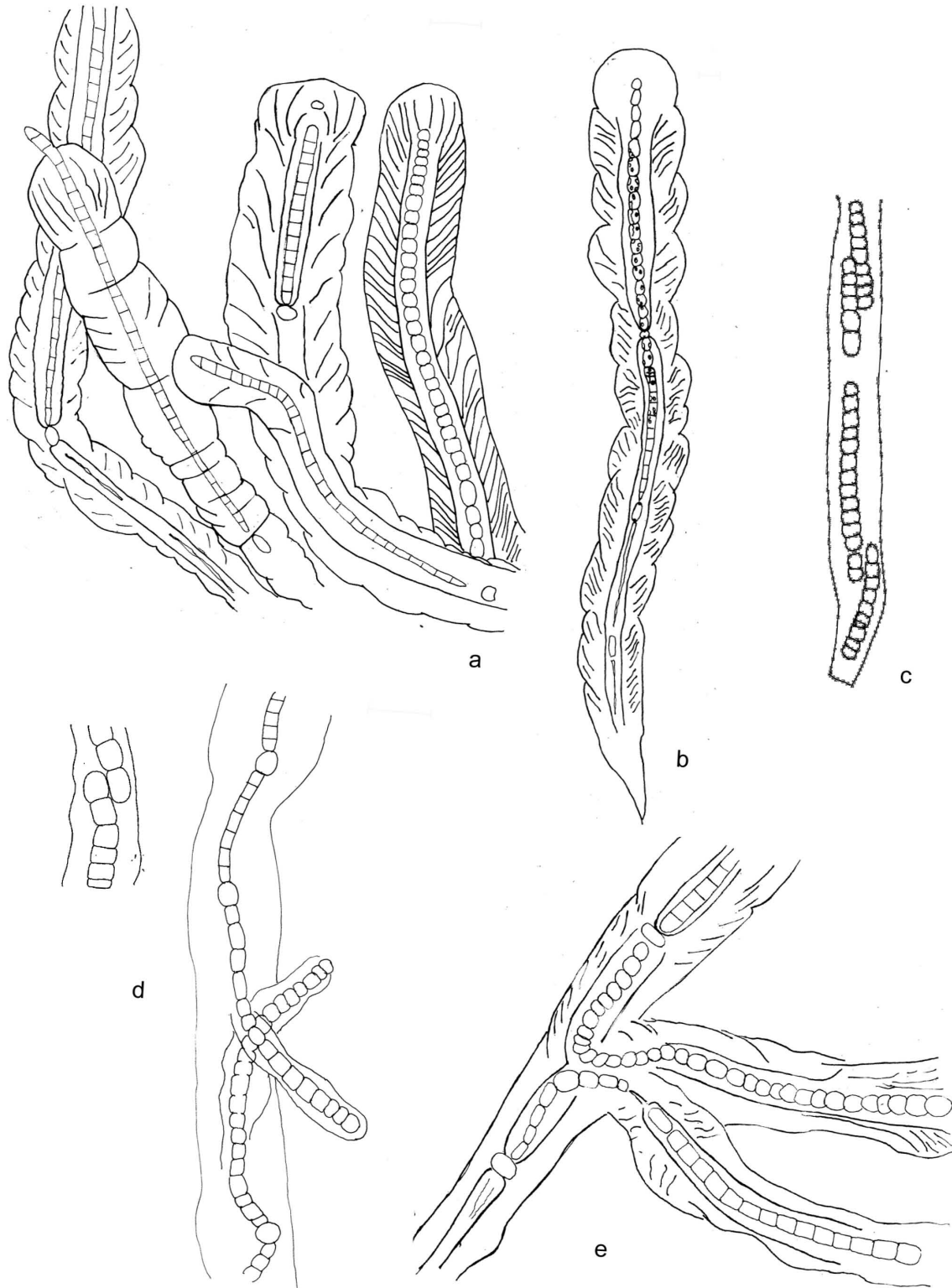


Figura 10

Características morfológicas de *Petalonema alatum* de Nonoalco: a) apariencia de los filamentos, se muestra también rama falsa simple a partir de heterocito, b) filamento heteropolar con tricoma degenerado, c) formación de hormogonios (en cultivo), d) formación de ramas dobles por deslizamiento de células vegetativas, al principio las ramas cruzadas, e) ramas dobles.

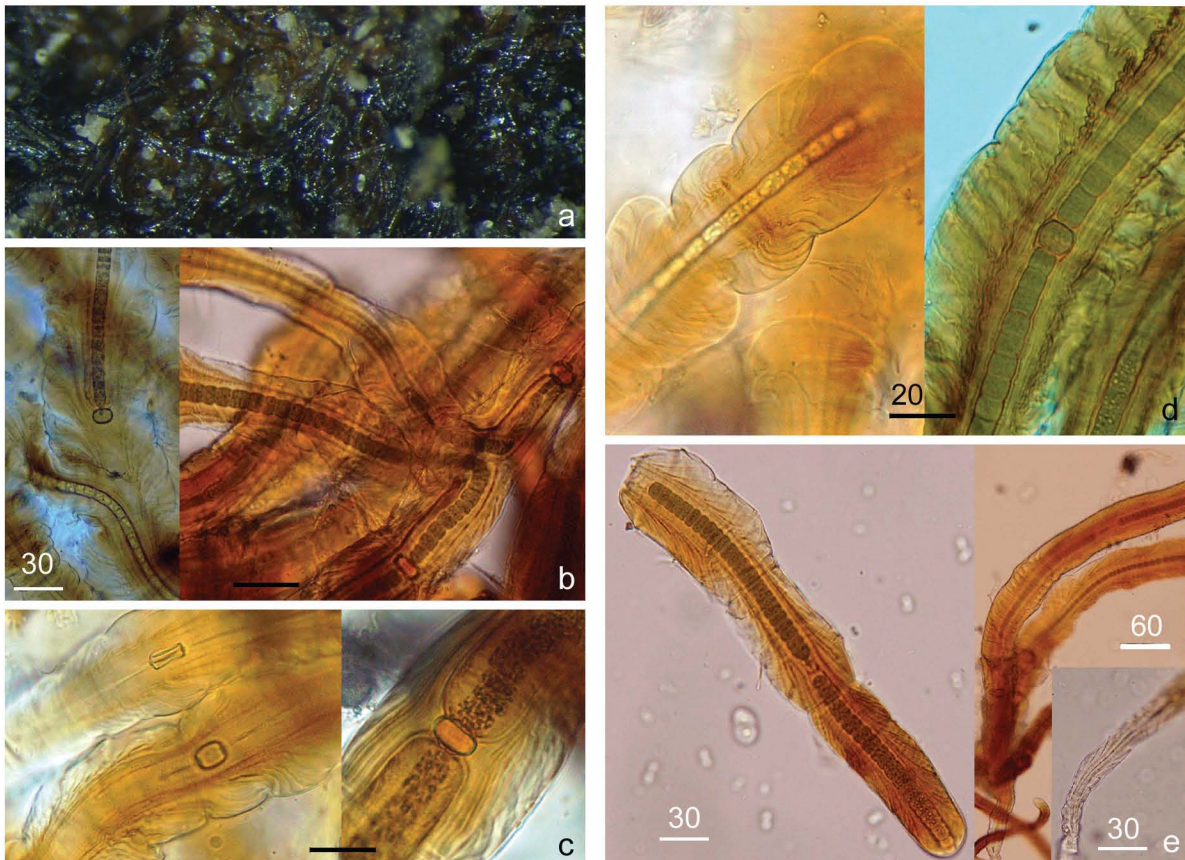


Figura 11

Características morfológicas de *Petalonema alatum* de Nonoalco: a) apariencia del talo, b) ramas falsas, c) apariencia de los tricomas y heterocitos, d) vainas con lamelación divergente en los márgenes, e) filamentos isopolares y heteropolares.

Tabla 6 | Características de especies de *Scytonema* de ambientes terrestres que tienen un engrosamiento en el ápice o con lamelación divergente

En negritas las especies de la región central de México, la información de las demás especies fue obtenida de Ávila (1989), Alwathanani & Johansen (2011), Desikachary (1959), Gardner (1927a), Gardner (1927b), Geitler (1932), Tilden (1910), Torres (1993)

	<i>S. sp. del Valle de Zapotitlán</i>	<i>S. hyalinum</i>	<i>S. capitatum</i>	<i>S. javanicum</i>	<i>S. mirabile de Tolantongo</i>	<i>S. mirabile</i>	<i>S. bewsii</i>	<i>S. tolypothrichoides</i>
Forma del talo	Costroso	Amplio, escamoso	Aterciopelados, rígido, inflexible	Cojín	Colchón	Tomentoso, esponjoso	Filamentos mezclados con otras algas, libre flotante	Cespitosos, flotante
Color del talo	Negro			azul verde brillante a rojizo o morado negruzco	Negro	Marrón negruzco, verde negruzco o verde azul		Verde parduzco
Ancho filamentos	13.8 – 18.7, = 16.3	12 – 16	22 – 26 (30)	12 – 15	8- 15.8, =12	10 – 21	13 - 19	10 – 15
Color de la vaina	incolora a parda	Incolora a parda	amarilla	incolora a parda oscura	transparente a amarillo pardo	amarillo pardo, por fuera sin color	sin color cuando joven, después marrón amarillento	Hialina, incolora
Ornamentación de la vaina	Apariencia escamosa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
Ápices del filamento	Con engrosamiento, en capas	Con engrosamiento, a veces en capas,	Con engrosamiento,	Sin engrosamiento	Sin engrosamiento	Sin engrosamiento	Sin engrosamiento	Sin engrosamiento
Ancho tricomata	9.4 – 14.2, = 11.6	10 – 14	18 - 22	9 – 14	4- 10, = 7.5	6 – 12	3.5 - 6	8 – 12
Forma células	Más anchas que largas a cuadradas	Más cortas que anchas a cuadradas, más largas que anchas cuando viejos	Más cortas que anchas a cuadradas	Comprimidas, cuadradas o cilíndricas	Más anchas que largas a cuadradas o ligeramente más largas que anchas en partes viejas	Cilíndrica, cel. Apical, discoidal o como tonel	-	Subcuadradas o más largas
Color células	Verde azul, verde olivo a amarillo	Verde olivo	-	Verde oliva, café a violeta	Verde azul, verde olivo	Verde azul, verde olivo a amarillo	-	Amarillo olivo
Largo células	6.5 – 15.3, = 9.5	2.8 – 7.2	½ a ¼ veces más largo que ancho a cuadradas	2.4 – 7.6	4 – 16, = 8.3	-	-	-
Heterocitos	Más anchos que largos a cuadrados 12.5 – 15.3, = 13.9 x 9.6 – 13, = 11.1	10.4 x 2.4	Redondos comprimidos a cuadrados	6.8-9 x 9-13	Cuadrados a rectangulares 7 – 14, = 10.7 x 7.5 – 25, = 16	Cuadrados o más largos que anchos	5 – 7 X 16 - 19	Diversos, a veces cortos, a veces largos
Hábitat	Subaérea en desiertos	Fuentes de roca, entre musgos, manantiales, desiertos	Sobre rocas	Tierra húmeda, entre musgos, en hojas, trocos de arboles,	Subaérea, sobre roca calcárea húmeda.	Sobre suelo, paredes y rocas húmedas, en géiseres, ríos, lagos, pantanos, campos de arroz	Sobre barro o rocas cerca de embalses	En termales, en cortezas de arboles, pantanos de turba, en agua estancada
Distribución	Valle de Zapotitlán Pue., México	China; Sierra Leona, África, Mojave, U.S.A.	Puerto Rico; Brasil	Massachusetts, USA; Jamaica, India, Rumania, España, Tehuacán, Pue, México	Tolantongo, Hgo., México	Australia; Puerto Rico; India; España; U.S.A; Rep. Dominicana, Hawaii, Chiapas, México.	Brasil, Sur de África	Rumania; Arkansas, USA; Australia; Nueva Zelanda, Hawaii.

Tabla 7 | Características de especies de *Scytonema* de ambientes terrestres que tienen filamentos sin lamelación o lamelación paralela.

En negritas la especie de este estudio, la información de las demás especies fue obtenida de Geitler (1932), Tilden (1910), Desikachary (1959)

	<i>S. sp. micos</i>	<i>S. austinii</i>	<i>S. amplium</i>	<i>S. tenue</i>	<i>S. hofmannii</i> / var calcicolum	<i>S. varium</i>
Talo	Tapete filamentoso	Cojín, lanoso	Pequeño, lanoso	Aterciopelada	Como cojín ampliamente expandido, a veces con incrustaciones de calcio	Tomentoso
Color talo	Verde bandera a negruzco	Marrón oscuro	Café		Azul verde negruzco, verde amatista o gris azulado	Verde azul a café
Ancho filamentos	10 – 14, = 11.9	15 – 20	19 – 24	6 – 8	7 – 8 / 12	9 – 15
Vainas	Gruesas sobre todo en los extremos, firme, flexuosa, lamelación paralela. Transparente en los extremos amarilla en partes más viejas	Firme estratificación indistinta, con una superficie rugosa, marrón, incolora en el ápice.	Ancha, lamelación paralela, por fuera gelatinosa, sin color a amarillento, en la parte interna amarillo café. Ápices anchos.	Ligeramente gelatinosa, incolora, no estratificada	Firme, membranácea	Gelatinosa, en la porción baja sin color o pelúcida, en la porción alta amarilla
Ancho tricoma	2.6 – 7, = 5	4 – 20	3.5 – 4	5.5 – 6.5	5 – 6 / 4 – 6	5 – 7
Forma células	Cuadradas a más largas que anchas	Más cortas o más largas que anchas	Cortas, rara vez 2 veces tan largas como anchas	Cilíndricas, en partes viejas 2 a 2 ½ más largas que anchas, cel. apical con forma de barril	Desiguales en longitud	Subcuadradas y densamente granuladas
Color células	Verde azul, verde grisáceo o verde olivo		Verde amarillento		Verde azul a olivo	Verde azul a amarillas
largo células	7 – 14, = 9.5	-	-	-	-	-
Heterocitos	Cuadrados a cilíndricos. 4.7 – 6.4 = 5.3 x 11 – 13, = 11.6	Cilíndricos, cuadrados o esféricos a menudo comprimidos	Oblongo, 3 a 31/5 veces tan largo como ancho	Cilíndrico, cuadrados a dos veces más largo que ancho	Oblongo	subcuadrados o más largos que anchos
Hábitat	Subaérea sobre pared húmeda	Sobre rocas, poco conocida	Sobre roca, con rocío de agua, sobre troncos	Sobre roca	Sobre piedra, suelo y arboles	Sobre superficies húmedas
Distribución	Micos, México.	U.S.A.	Rep. Dominicana	Puerto rico, China	Inglaterra, Rumania, España, Islas canarias, USA, Jamaica, Israel, China, México/USA.	Nueva Zelanda U.S.A., Hawaii

Tabla 8 | Características de especies de *Petalonema*

En negritas la especie de este estudio, la información de las demás especies fue obtenida de Desikachary (1959), Geitler (1932), Komárek (2012) y Komárek & Hauer (2007), Tilden (1910)

	<i>P. alatum</i> de Nonoalco	<i>P. alatum</i>	<i>P. densum</i>	<i>P. crassum</i>	<i>P. crustaceum</i>	<i>P. incrustans</i>	<i>P. involvens</i>	<i>P. pulchrum</i>	<i>P. velutinum</i>
Forma del Talo	Cojín esponjoso	Cespitoso, mucilaginoso	Como cojín o césped	Césped esponjoso	Costra	Negra	Grandes mechones esponjosos	Entre otras algas	Cojín, 3 – 6 mm de grosor
Color talo	Naranja a café pardo	Café negruzco		Verde negruzco	Marrón oscuro a negro	-	Verde azul a marrón	-	Negro marrón
Hábito	un aparte postrada y el extremo erecto	Flexuosos, procumbentes o erectos	Mas o menos enredados	Entrelazados	Postrados en la base, erecto en los extremos y ramas	Ascendentes	Estrechamente entremezclados	-	Forman haces verticales
Ancho filamentos	22 – 90 = 49	24 – 66 (115)	24 – 40	27 – 45	16 – 24	-	15 – 30	65	12 – 30 a veces más ancha
Color de la Vaina	Amarillo-marrón a naranja-marrón, en el centro, en el exterior más pálido	Incoloras, cuando viejas amarillas a cafés	Amarillo a amarillón, hinchada	Amarillo en el medio marrón y en el exterior más pálido	Amarillo pardo a café	Amarilla dorada	Dentro marrón, amarillento a incoloro hacia el exterior	Amarillo a marrón	Amarillo marrón.
Talla del ápice	más gruesos que el resto del filamento	Mucho más ancho que el resto del filamento	Más ancho que el resto del filamento		Más anchos que el resto del filamento	Mismo ancho que el resto del filamento	Mismo ancho que el resto del filamento	Mismo ancho que el resto del filamento	Mismo ancho que el resto del filamento
Ancho tricoma	3 – 12.8, = 7.7	9 – 15	6 – 12	9 – 15 (20)	7 – 11	-	6 – 12	15-20	9 – 15
Forma células	Casi cuadradas a más largas que anchas.	En meristemos cortas o en barril hasta cilíndricas y largas: 2 veces más largas que anchas	En meristemos cortas y partes viejas más largo que ancho	En meristemos cortas discoidales, en partes más viejas casi cuadradas	Más anchas que largas. Cel. Terminal ampliamente redondeada	Globulares, granuladas	Casi cuadradas a más cortas o más largas que anchas		Más cortas que anchas en forma de barril
Color células	Verde azul a verde olivo	Verde azul a verde, Café			Verde olivo	-	Verde azul		Verde azul
Largo células	2.7 – 17.5 = 7.7					-		6 – 7	
Heterocitos	8.4 – 15.4, = 11.8 x 4 – 10.8 = 7	Esféricos truncados o cilíndricos			11 x 5 – 7	-	Casi esféricas u oblongas	Esférico a ligeramente comprimido	Esférico comprimido
Hábitat	Sobre paredones húmedos	Rocas con escurrimientos de agua y ríos tranquilos	Sobre rocas y suelos húmeda	Sobre rocas entre musgos	Sobre roca calcárea, húmeda	Entre musgos, rocas expuestas a Spray	Acuático, sobre plantas acuáticas, Pantanos	Sobre rocas húmedas	Aerofítico, en la tierra húmeda, a veces cerca de agua termal
Distribución	Nonoalco, Hidalgo, México	Cascadas Niágara, Minnesota, U.S.A., Ecuador, Europa	Cascadas Niágara y Twin Oaks, U.S.A., Rep. dominicana, Jamaica.	Sri. Lanka	U.S.A, Sur Bohemia y Podyjí, Rep. Checa	Cascadas Niágara, U.S.A.	Alemania, California, U.S.A., Australia	Francia-Aquat, África	Norteamérica, Europa

DISCUSIÓN

Hay muy pocos trabajos donde se analiza la sistemática de la familia Scytonemataceae a partir de filogenias moleculares y caracteres morfológicos, algunos tratan de entender las relaciones filogenéticas de manera general en las Nostocales (KORELUSOVA, 2008) y la mayoría de ellos están enfocados a la descripción de nuevos géneros o especies (AGUIAR *ET AL.*, 2008; BECERRA-ABSALÓN *ET AL.*, 2013; FIORÉ *ET AL.*, 2007; SANT' ANNA *ET AL.*, 2011; UHER, 2010; VACCARINO & JOHANSEN, 2011; VACCARINO & JOHANSEN, 2012;). En este sentido, este estudio es novedoso, porque el objetivo principal es hacer un análisis sistemático de la familia Scytonemataceae según KOMÁREK (2010). Esta familia es una de las más grandes con aproximadamente 126 especies y solo están secuenciadas 17 especies aproximadamente, es decir falta mucho por investigar y revisar, pero este estudio aporta conocimiento que puede servir de base para continuar los esfuerzos en definir a esta familia.

En el análisis molecular con el gen 16S ARNr donde se incluyeron secuencias disponibles de la familia Scytonemataceae del GenBank, además de 8 secuencias que se obtuvieron para este trabajo, los valores de bootstrap en los nodos más inclusivos del árbol fueron menores a 50 (fig. 3), parece ser que el gen del 16S ARNr evoluciona rápido, por tanto se debería intentar hacer matrices combinadas con otros marcadores como los genes *rbclX* y *rpoB*, para los cuales se ha reportado que tienen tasas de evolución más lentas (RAJANIEMI *ET AL.*, 2005), esto quizá nos permitirá obtener clados soportados en los diferentes niveles de inclusividad. Sin embargo, la aportación de este trabajo a la sistemática de Scytonemataceae es sólida; la mayoría de los clados menos inclusivos tienen valores altos de bootstrap (>50 %) y la topología del árbol consenso es consistente con topologías e información parcial publicada en otros trabajos (AGUIAR *ET AL.*, 2008; BECERRA *ET AL.*, 2013; FIORÉ *ET AL.*, 2007; SANTA' ANNA *ET AL.*, 2011).

La familia Scytonemataceae según KOMÁREK (2010) está conformada por cinco géneros: *Scytonema*, *Petalonema*, *Kyrtuthrix*, *Scytonematopsis* y *Brasilonema*. Estos géneros tienen en común la presencia de tricomas isopolares, con heterocitos intercalares y ramas falsas dobles. El análisis filogenético revela que la familia Scytonemataceae es polifilética, es decir, se forman al menos seis linajes distintos en el árbol filogenético (fig. 3).

Con base en nuestros resultados, la familia Scytonemataceae podría estar conformada por los géneros de los clados hermanos B y C o sólo por el clado C (fig. 3). En el clado B se encuentran especies de géneros que actualmente pertenecen a Symphyonemataceae: *Symphyonema* y *Mastigocladopsis*, además de especies de *Scytonema* que presentan el morfotipo de *S. hyalinum* (fig. 3, tabla 3). En el clado C (fig. 3) encontramos el clado de *Brasilonema*, el clado de *S. hofmannii*, el clado de *S. mirabile*, el clado de *S. cf. ocellatum*, el clado de *Petalonema alatatum* y el de *Petalonema crustaceum*, junto con especies de *Symphyonemopsis* que actualmente pertenece a la familia Symphyonemataceae y la especie de *Iphinoe* de la familia Loriellaceae. También se agrupa una cepa de *Aulosira*, para la cual no hay información disponible sobre su morfología por lo que no es posible verificar la identificación, además es una secuencia (número GenBank JQ001838) con varios problemas: es muy corta, le faltan

bases tanto al principio como al final y es muy diferente a otras secuencias del mismo género, por tanto no se tomará en cuenta esta secuencia en la discusión.

De acuerdo con los caracteres morfológicos estudiados, no hay elementos para separar a estos clados hermanos en familias diferentes. En ambos clados hay morfotipos con ramas verdaderas tipo-Y y morfotipos scytonematoides (tablas 3 y 4), GUGGER & HOFFMANN (2004) observaron similitudes en el desarrollo de estos dos tipos de ramificación en cepas de *Symphyonema*, *Symphyonemopsis* y *Mastigocladopsis*. En ambas ramificaciones el desarrollo de la rama es asociado con la activación de un meristemo intercalar que forma un doblez (bucle). Es muy posible que las ramas tipo Y que presentan las especies de estos géneros, se hayan derivado de las ramificaciones falsas scytonematoides; además la mayoría de las especies de estos géneros también presentan ramas falsas Scytonematoides (JAO en KOMÁREK & HAUER, 2013; CHADHA & PANDEY, 1981; ANAGNOSTIDIS & KOMÁREK, 1990; GUGGER & HOFFMANN, 2004).

Es importante mencionar que faltaron géneros por evaluar en la filogenia molecular como por ejemplo *Kyrtuthrix* y géneros de Symphyonemataceae que también tienen ramificación tipo-Y como *Handeliella* SKUJA, que además presenta ramas scytonematoides y de acuerdo a nuestros resultados se esperaría que formaran parte de Scytonemataceae. Mientras que otros géneros de Symphyonemataceae como *Bachytrichia*, *Herpyzonema* WEBER-VAN BOSSE, *Iyengariella* DESIKACHARY, *Spelaeopogon* y *Umezakia* WATANABE que no presentan ramas scytonematoides, se esperaría que estuvieran en otra familia; como es el caso de *Umezakia natans* WATANABE que de acuerdo a NIYAMA ET AL., (2011), aunque esta especie presenta ramificaciones verdaderas tipo-Y y tipo-T, en realidad pertenece a Nostocaceae.

Sí los clados B y C conformaran a la familia Scytonemataceae, entonces en ella existirían todos los tipos de ramificación: ramas simples a partir de células vegetativas (Tabla 3 y 4) como en la mayoría de las especies de *Brasilonema*, en los morfotipos de *S. hofmannii* y *S. myochrous*, y en *Symphyonema sinense* JAO, *Symphyonemopsis katniensis* TIWARI & MITRA e *Iphinoe spelaeobios* LAMPRINOU ET AL (AGUIAR ET AL., 2008; GEITLER, 1932; JAO en KOMÁREK & HAUER, 2013; LAMPRINOU ET AL., 2011; SANTA' ANNA ET AL., 2011; TIWARI & MITRA en KOMÁREK & HAUER, 2013); en *P. alatum* se observaron ramas simples a partir de heterocitos (Tabla 8, figs. 9 a, 10 h) y al parecer también se presentan en *Symphyonemopsis katniensis* (TIWARI & MITRA en KOMÁREK & HAUER, 2013). En *Symphyonema sinense*, *Symphyonemopsis katniensis* y *S. panti* CHADHA & PANDEY, *Mastigocladopsis repens* HERNÁNDEZ-MARINÉ ET AL., *M. jogensis* IYENGAR & DESIKACHARY y *M. fremyi* IYENGAR & DESIKACHARY e *Iphinoe spelaeobios* están representados los tipos de ramas verdaderas-Y (CHADHA & PANDEY 1981; FRÉMY, 1930; GUGGER & HOFFMANN, 2004; HERNÁNDEZ-MARINÉ ET AL., 1992; IYENGAR & DESIKACHARY, 1946; JAO en KOMÁREK & HAUER, 2013; LAMPRINOU ET AL., 2011; TIWARI & MITRA en KOMÁREK & HAUER, 2013). Además, en las tres especies de *Mastigocladopsis* se observa la rama tipo-T y en *M. jogensis* también se presenta la ramificación verdadera tipo-V (FRÉMY, 1930; HERNÁNDEZ-MARINÉ ET AL., 1992; JAO en KOMÁREK & HAUER, 2013). Es importante mencionar que aunque discuto sobre todas las especies de

Mastigocladopsis descritas hasta ahora, la cepa secuenciada y que se incluye en la filogenia, está identificada como *M. repens*.

Al parecer la ramificación falsa doble es un carácter que podría ser común a todos los géneros de Scytonemataceae (tabla 3 y 4). Sin embargo, hay muy poca información sobre el tipo de ramificación falsa que se observa en las especies o cepas de los géneros *Symphyonemopsis*, *Mastigocladopsis* e *Iphinoe*. GUGGER & HOFFMANN (2004) no aclaran si en las cepas que estudiaron de *Symphyonemopsis* y *Mastigocladopsis* se observaron ramas falsas dobles, sólo mencionan que en algunas de ellas, se observaron ramas falsas dobles, pero no especifican de cuales géneros eran. CHADHA & PANDEY (1981) cuando describen *Symphyonemopsis pantii*, presentan en su esquema que la especie tiene ramas falsas dobles. DESIKACHARY (1959), en el esquema de *Mastigocladopsis jogensis*, representa ramas falsas dobles, aunque no consideró este carácter en la descripción de la especie, pero al parecer *M. repens* no tienen ramas falsas; en el trabajo de HERNÁNDEZ-MARINÉ ET AL. (1992) no se aprecia, en las láminas, si *M. repens* tiene ramas falsas y los autores no describen este carácter en la descripción de la especie. Mientras tanto, en la lámina de *Iphinoe spelaeobios*, que presentan LAMPRINO ET AL. (2011), ponen un ejemplo de rama falsa simple a partir de células vegetativas, pero no se aclara si solo presentan este tipo de rama falsa o también se presentan ramas dobles.

Al parecer Scytonemataceae podría caracterizarse por la presencia de filamentos maduros isopolares: los filamentos maduros de las especies de *Brasilonema*, de todos los morfotipos de *Scytonema* y *Petalonema crustaceum*, son isopolares; *Symphyonema sinense*, *Symphyonemopsis katniensis* y *S. pantii*, *Mastigocladopsis repens*, *M. jogensis* y *M. fremyi* e *Iphinoe spelaeobios* también tienen filamentos isopolares (CHADHA & PANDEY, 1981; FRÉMY, 1930; HERNÁNDEZ-MARINÉ ET AL., 1992; IYENGAR & DESIKACHARY, 1946; JAO en KOMÁREK & HAUER, 2013; LAMPRINO ET AL., 2011; TIWARI & MITRA en KOMÁREK & HAUER, 2013). En *Petalonema alatum* se observaron filamentos isopolares, aunque también heteropolares con desintegración del tricoma en la base.

Todos las especies analizadas de los géneros incluidos en el clado B y C (Fig. 3) presentan vainas firmes, cilíndricas (tabla 7 y 8); pueden ser lameladas paralelas, divergentes o sin lamelación. Al igual que *Symphyonema sinense*, *Symphyonemopsis katniensis* y *S. pantii*, *M. repens* e *Iphinoe spelaeobios* (CHADHA & PANDEY, 1981; HERNÁNDEZ-MARINÉ ET AL., 1992; JAO en KOMÁREK & HAUER, 2013; LAMPRINO ET AL., 2011; TIWARI & MITRA en KOMÁREK & HAUER, 2013), en este sentido *Mastigocladopsis fremyi* que tiene una envoltura mucilaginosa donde los contornos están mal limitados (FRÉMY, 1930) y *M. jogensis* que solo en algunas fases se observa una vaina cilíndrica (IYENGAR & DESIKACHARY, 1946), no cumplirían con esta condición. *Kyrtuthrix* es el único género que se ha incluido en Scytonemataceae que no tiene una vaina cilíndrica, sino como un mucilago en forma de saco generalmente abierto por un extremo (ERCEGOVIC, 1929). Esta vaina mucilaginosa es más parecida a la que se presenta en la familia Nostocaceae. De este género aún no existen secuencias para poner a prueba su pertenencia a Scytonemataceae.

En cuanto al tipo de tricomas, existen cuatro estados de carácter; pueden ser del mismo ancho en todo el tricoma como en las especies de *Brasilonema* y las que son parecidas a *Scytonema hofmannii* (tabla 5), así como *Symphyonema sinense*, *Symphyonemopsis katniensis*, *S. pantii* y la especie de *Iphinoe*, las dos especies de *Mastigocladopsis*, *Petalonema crustaceum* (CHADHA & PANDEY, 1981; JAO en KOMÁREK & HAUER, 2013; LAMPRINO ET AL., 2011; TIWARI & MITRA en KOMÁREK & HAUER, 2013; GEITLER, 1932; DESIKACHARY, 1959; KOMÁREK & HAUER, 2013), o más angostos en la parte media que en los extremos como *S. mirabile* y las otras especies que se parecen a *S. myochrous* (tabla 5), o más anchos en uno de los extremos como en *P. alatum* (tabla 4) o más angosto en las ramificaciones que en el tricoma central como en *Mastigocladopsis repens* (HERNÁNDEZ-MARINÉ ET AL., 1992). Todos estos taxones tienen heterocitos intercalares, aunque las especies de *Mastigocladopsis* también presenta heterocitos laterales en las ramas cortas (FRÉMY, 1930; IYENGAR & DESIKACHARY, 1946; KOMÁREK & HAUER, 2013).

De acuerdo con las observaciones, la mayoría de las especies analizadas de los géneros que conforman los clados B y C presentan tricomas con septos no constreñidos a ligeramente constreñidos (tablas 3 y 4, figs. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11), excepto las tres especies de *Mastigocladopsis*, que tienen septos constreñidos (FRÉMY, 1930, IYENGAR & DESIKACHARY, 1946); *M. repens*, además, presenta septos no constreñidos en las ramas (HERNÁNDEZ-MARINÉ ET AL., 1992). El tipo de septo es una característica que no se ha utilizado mucho en la clasificación de las Nostocales pero podría ser importante porque refleja la forma en la que se separan las células hijas en la división celular. Se han descrito dos estrategias en la formación del septo: 1) Cuando se forman septos no constreñidos participan la membrana plasmática y la capa de mureína y 2) Cuando se forman septos constreñidos participan todas las capas de la pared celular (Drews, 1973), sin embargo que pasa con el estado intermedio, es decir los que son ligeramente constreñidos. Al parecer, en la familia Scytonemataceae las células se dividen principalmente a partir de la primera estrategia, lo que se ve reflejado en que la mayoría de las especies analizadas en la filogenia presentan septos no constreñidos, la excepción es *M. repens*. Si esto es así y *Kyrtuthrix*, no fuera otra excepción, se esperaría que no pertenezca a Scytonemataceae porque sus especies tienen septos constreñidos (tabla 3).

Al parecer todas las especies analizadas (tabla 3 y 4) de los clados B y C tienen los ápices redondeados y cerrados así como *Symphyonema sinense*, *Symphyonemopsis katniensis*, *S. pantii*, *Mastigocladopsis repens* y la especie de *Iphinoe* (CHADHA & PANDEY, 1981; HERNÁNDEZ-MARINÉ ET AL., 1992; JAO en KOMÁREK & HAUER, 2013; LAMPRINO ET AL., 2011; TIWARI & MITRA en KOMÁREK & HAUER, 2013); mientras que *Mastigocladopsis jogensis* y *M. fremyi* analizadas no cumplen con esta condición (FRÉMY, 1930; IYENGAR & DESIKACHARY, 1946).

Las otras características morfológicas (tipo de ápices del filamento y talla de las células en tricomas maduros) tuvieron variabilidad dentro de la familia (tabla 3 y 4).

En resumen las especies de los clados de *Brasilonema*, de todos los morfotipos de *Scytonema*, de *Petalonema alatum*, *Petalonema crustaceum*, de *Symphyonema*, de *Symphyonemopsis* e

Iphinoe speleaobios, constituyen un linaje y comparten características morfológicas. La excepción sería *M. repens*, que aunque, forma parte del linaje, varios caracteres analizados no son compartidos por esta especie, ni por las otras del género; al parecen no tiene ramas falsas y presenta ramas verdaderas tipo-V y tipo-T, tiene septos constreñidos; es necesario revisar la cepa MORA de esta especie que está depositada en la Colección de cultivo de micro-organismos del “Environment and Biotechnologies Research Unit of the Public Research Centre – Gabriel Lippmann”, en Luxemburgo, para corroborar la identificación y la morfología de la cepa.

En los clados B y C que en nuestro análisis molecular son hermanos, en el trabajo de VACCARINO & JOHANSEN (2012), los linajes se observan separados; el muestro de especies entre los dos análisis es distinto, porque el de VACCARINO & JOHANSEN (2012), no incluye la secuencia de *Mastigocladopsis*, ni de todas las Scytonemataceae disponibles en el GenBank, así como las secuencias que obtuvimos para realizar este estudio. Lo que implica que el resultado del análisis molecular de Scytonemataceae depende del muestreo de especies, así que conforme se obtengan más secuencias de las especies de la familia, los resultados podrían cambiar o si en este análisis se logró un muestreo adecuado, podría estabilizarse.

En nuestros análisis también se puede observar que varios géneros son polifiléticos, como: *Scytonema*, *Petalonema* y *Scytonematopsis*.

Scytonema se divide en seis linajes independientes, uno de estos seis linajes (el III del clado B) está conformado por *Scytonema hyalinum*, *S. javanicum*, varias especies de *Scytonema* no identificadas y una de las poblaciones del Valle de Zapotitlán. Este linaje, de acuerdo a la evidencia morfológica (tabla 4) y molecular podría ser un nuevo género de Scytonemataceae, que se caracterizaría por la presencia de ápices cerrados con un engrosamiento de la vaina, que puede formar varias capas (parecido a una caliptra), así como por vainas firmes no lameladas, tricomas del mismo ancho en todo el filamento y ramificaciones falsas dobles y simples a partir de células vegetativas. Con base en estas características otra especie que podría pertenecer a este género es *S. capitatum* que también presenta el engrosamiento en el ápice de las vainas. Para poder circunscribir este género adecuadamente y que sea aceptado, es necesario más evidencia molecular y morfológica, como estudios de la estructura secundaria del ITS que se encuentra entre los genes 16S ARNr y 23S ARNr y ultraestructura de los tilacoides.

En otros trabajos también se ha observado que *S. hyalinum* es un linaje hermano del clado de *Scytonema hofmannii*, la especie tipo (VACCARINO & JOHANSEN, 2011; SANTA' ANNA ET AL., 2011; VACCARINO & JOHANSEN, 2012).

La secuencia de *S. javanicum* (JQ697044) forma un clado monofilético con secuencias de *S. hyalinum*, por tanto, a la luz de la filogenia molecular (y si esta no tuvo errores), no se corrobora la identificación de la secuencia o la circunscripción de la especie, es decir o está mal identificada o *S. hyalinum* y *S. javanicum* son la misma especie. La secuencia no cuenta con información morfológica disponible de la cepa o población de origen, por lo que no puedo confirmar su identificación, en cuanto a la circunscripción GEITLER (1932) menciona que *S. hyalinum* y *S. javanicum* son muy similares y que podrían ser una misma especie (tabla 4),

pero el autor considera que el engrosamiento en la vaina de *S. hyalinum* no es un carácter válido taxonómicamente. ALWATHNANI & JOHANSEN (2011), si consideran este carácter como válido e identifican a cepas con engrosamiento en el ápice de la vaina como *S. hyalinum* y a las que no los presentan con *S. javanicum*. De acuerdo al estudio morfológico de este trabajo, *S. javanicum* además de que no presenta el engrosamiento en la vaina, que para mí es un carácter importante (podría definir un género), esta especie presenta características parecidas a las especies de *Brasilonema*, como la formación de fascículos erectos y la coloración de las células de verde olivo a violeta (GEITLER, 1932); es evidente a partir de esta discusión que esta especie necesita un estudio detallado de su circunscripción.

Para el linaje formado por las secuencias de *Scytonema* cf. *ocellatum* y otras especies de *Scytonema* no identificadas (fig. 3), no existe información morfológica de las cepas o poblaciones de las cuales se obtuvieron las secuencias, por tanto, no hay confirmación de la identidad de estas especies y no puedo saber si el problema es de identificación o circunscripción. Es posible que este linaje corresponda a un nuevo género basado en la evidencia molecular, pero la morfología de la especie *S. ocellatum* corresponde a una típica *Scytonema* (GEITLER, 1932), muy parecida a *S. hofmannii*. Es necesario obtener más información sobre este clado para clarificar su estatus.

Los linajes VII y IX del clado C corresponden morfológicamente a los dos subgéneros de *Scytonema* que KOMÁREK (2010) reconoce en su clasificación: sub. *Scytonema* y sub. *Myochrotes*. El subgénero *Scytonema* se caracteriza por presentar vainas sin lamelación o lamelación paralela y el mismo ancho en todo el tricoma. Esta morfología está presente en la especie tipo del género *S. hofmannii*, en nuestra especie *Scytonema* sp. de Micos *S. bohneri* y *S. fritschii* que conforman este linaje; otras especies con morfología similar que se esperaría que fueran de este linaje son *S. coactile*, *S. arcangelii*, *S. tenellum*, *S. guyanense*, *S. ocellatum*, *S. varium*, *S. amplium*, *S. caldarium*.

Mientras que en el subgénero *Myochrotes* la lamelación es divergente y el tricoma es más estrecho en medio que en los extremos. *Scytonema mirabile* por sus características morfológicas pertenece a este subgénero y en este estudio es la especie que conforma este linaje; aunque en nuestras poblaciones la lamelación no es tan evidente como se muestra en los esquemas de GEITLER (1932) y DESIKACHARY (1959). De acuerdo a nuestra evidencia molecular y morfológica este subgénero podría ser elevado a género y se definiría por las características morfológicas arriba mencionadas; pero se necesitan más secuencias de especies que tengan esta morfología y otros estudios moleculares y ultraestructurales para poder asegurar que es un género diferente. Este clado es hermano del clado de *Petalonema* y en ambos clados se presentan las vainas divergentes. Otras especies que por sus características morfológicas se espera que formen parte de este linaje son *S. myochrous*, *S. tolypothricoides*, *S. bewsii* y *S. caldarium* var. *terrestre*.

Los linajes de *S. chiastum* (junto con *Petalonema* sp.) y el de *S. crispum*, estuvieron más relacionados con linajes de Stigonemataceae y Microchaetaceae, respectivamente, que con Scytonemataceae (fig. 3). Los linajes de Microchaetaceae hermanos a *S. crispum* se encuen-

tran más relacionados con linajes de Nostocaceae que con otras Microchaetaceae (al parecer la familia Microchaetaceae es polifilética también). No puedo saber si la separación de estos dos clados del clado del *Scytonema* se deba a un problema de identificación o circunscripción, porque no hay información morfológica de las cepas o poblaciones de origen de las secuencias. Aunque en ambos linajes (el de *S. chiastum* y el de *S. crispum*), se observaron características scytonematoides, como la presencia de ramas dobles y filamentos isopolares, difieren morfológicamente de los linajes incluidos en Scytonemataceae por la presencia de septos constreñidos en los tricomas, por cómo se forman las ramas falsas y en el caso de *S. crispum* al parecer todo el tricoma es zona meristemática. Existen otras especies que presentan una morfología similar a *S. crispum*, como son *S. stuposum*, *S. millei*, *S. schmidtii* y *S. hansgirgi* que se esperaría que se agruparan juntas.

Scytonema es el género más grande de Scytonemataceae y uno de los más grandes de Nostocales, tiene 106 especies de las cuales sólo hay 21 cepas secuenciadas y sólo ocho de estas cepas o poblaciones están identificadas; es decir, es muy probable que conforme se estudien otras especies de este género se formen nuevos linajes hermanos, porque la variación fenotípica interna en *Scytonema* es grande (tabla 4) y hasta ahora se ha observado que esto corresponde con variación genotípica (fig. 3).

Petalonema forma cuatro linajes independientes, de los cuales sólo dos forman parte de Scytonemataceae. El linaje de *P. crustaceum*, de acuerdo a la literatura (ya que no se cuenta con información de la cepa o población que dio origen a la secuencia) tiene una morfología muy particular, normalmente el talo es postrado y se forman bucles erectos, muy largas y rara vez se rompen para formar ramas falsas dobles (tabla 3), posiblemente corresponda a un género nuevo, pero hace falta más evidencia para describirlo. Otras especies que tienen estas características morfológicas son *P. incrustans* y *P. densum* (GEITLER, 1932; KOMÁREK, 2012).

El linaje de *P. alatum*, especie tipo, correspondería al género *Petalonema* (fig. 3), en esta especie existe variación entre diferentes poblaciones descritas. Por ejemplo, las poblaciones mexicanas se parecen mucho a las poblaciones de las cascadas del Niágara y de Piecky Gorge del parque Nacional Slovenský raj (Eslovaquia) descritas por TILDEN (1910) y UHER (2010) respectivamente. Estas poblaciones tienen el mismo tipo de hábitat, subaéreo sobre paredones húmedos. Sin embargo, UHER (2010) menciona que las cepas que él estudio (a partir de cultivo) presentaban heterocitos basales en los tricomas, y en los hormogonios; además, los hormogonios tenían un desarrollo heteropolar (asimétrico), características que no fueron observadas en las poblaciones de Nonoalco (fig. 10 y 11; tabla 8). Hay otras poblaciones que son diferentes en cuanto al ancho y la lamelación de las vainas, así como en la forma de los ápices, que son mucho más anchos que el resto del filamento, como por ejemplo, las poblaciones fotografiadas por GEITLER (1932) y por HINDÁK (2008). También hay caracteres que no se habían tomado en cuenta para la diagnosis del género (salvo por KOMÁREK en KOMÁREK & HAUER, 2013) que fueron observadas en las poblaciones de Nonoalco y en las de Piecky Gorge (UHER, 2010), como la heteropolaridad de los filamentos en ciertas etapas de su ciclo de vida, la presencia de

ramas simples a partir de heterocitos. El adelgazamiento y degeneración de los tricomas hacia la base en filamentos heteropolares, fue sólo observado en la población de Nonoalco. Estos caracteres no solo se encuentran en *P. alatum*; por ejemplo: GEITLER (1932) en la ilustración que utiliza para ejemplificar a *P. involvens* se observa una rama simple a partir de heterocitos.

UHER (2010) propuso que este género debería estar incluido en la familia Microchaetaceae, debido a la presencia de filamentos heteropolares y heterocitos basales en los tricomas de *P. alatum* cultivada, hipótesis que no es sustentada por nuestros resultados moleculares (fig. 3). Los medios de cultivo pueden modificar caracteres morfológicos y fisiológicos (ANAND, 1998; CASAMATTA ET AL., 2003; OTSUKA ET AL., 2001; PALINSKA ET AL., 2006). Sin embargo los otros dos linajes donde se encuentra *P. sp.* (clado E) y el formado por una cepa de la Antártida identificada como *Petalonema cf. involvens* (clado F) están más relacionados con las familias Stigonemataceae y Microchaetaceae (fig. 3). La cepa de la Antártida tiene un ambiente diferente a la especie descrita como *P. involvens*, que se encuentra sobre plantas acuáticas, además los septos de los tricomas de la cepa de la Antártida están muy constreñidos (TATON ET AL., 2006). Es muy posible que esta cepa no sea *P. involvens*, para determinar su estatus de esta cepa hacen falta más estudios taxonómicos.

Petalonema está conformado por nueve especies descritas, solo dos de ellas están secuenciadas (*P. alatum* y *P. crustaceum*), las otras dos secuencias provienen de cepas que tiene una identificación dudosa o no está identificada. Sólo dos de las cuatro cepas cuentan con datos morfológicos de las poblaciones de las cuales fueron obtenidas, por tanto se debe seguir estudiando este género para poder tener mayor certidumbre de que especies lo conforman y cuál sería su delimitación morfológica.

Las secuencias de *Scytonematopsis* utilizadas en el análisis molecular forman dos linajes independientes que no están relacionados con Scytonemataceae (fig. 3). El clado A formado por *Scytonematopsis maxima* y el clado D formado por *Scytonematopsis contorta*. *Scytonematopsis* presenta fases de su ciclo de vida (tabla 3) con tricomas heteropolares y heterocitos basales que recuerdan a *Calothrix* (GEITLER & RUTTNER, 1935; VACCARINO & JOHANSEN, 2011). Justo en nuestro análisis *Scytonematopsis contorta* es hermana de uno de los clados formado por secuencias de *Calothrix* (fig. 3).

La secuencia de *Scytonematopsis maxima* es hermana a la mayoría de las Nostocales, esta secuencia es muy diferente a las otras secuencias del género y del orden. La morfología de esta especie descrita en el trabajo de NOVIS & VISNOVSKY (2011), no es la típica del género *Scytonematopsis*, no se observa fases ammatoideas, como describen KOVÁCIK & KOMÁREK (1988), ni tampoco fases heteropolares, como se menciona en GEITLER (1932), GEITLER & RUTTNER (1935), KOVÁCIK & KOMÁREK (1988) y en VACCARINO & JOHANSEN (2011).

No se puede decir si este género pertenece o no a la familia Scytonemataceae, porque sólo hay dos especies secuenciadas de 15 descritas, además su morfología presenta fases scytonematoides y fases parecidas a las Rivulariaceae, por tanto se necesita una revisión tanto morfológica como molecular de este género.

En contraparte, el género *Brasilonema* forma un clado muy consistente, la evidencia molecular confirma las observaciones ecológicas y morfológicas. Todas las especies que conforman este género tienen filamentos maduros isopolares y la mayoría de las especies son del mismo ancho en todo el filamento (solo *B. angustatum* presenta ápices atenuados pero la descripción se hizo a partir de cultivos), los ápices se encuentran cerrados hasta que se forman los hormogonios, las vainas son delgadas generalmente sin color a amarilla parduzca (figs. 3. a, e; 4 a-c, f; 5 a; 7 b, f, i) y el color de los tricomas casi siempre es marrón o violeta (AGUIAR ET AL., 2008; SANTA'ANNA ET AL., 2011; VACCARINO & JOHANSEN, 2012; BECERRA-ABSALÓN ET AL., 2013). Los hormogonios se observan con heterocitos basales y el desarrollo es asimétrico, característica que no está incorporada en la diagnosis del género pero que se ha mencionado en varios trabajos (VACCARINO & JOHANSEN, 2012, BECERRA ET AL., 2013) que es un caracter importante (Figs. 4. b-d, f-h; 5. d, g-i; 6. b-e; 7 c-d), además las ramas falsas son dobles o simples a partir de células vegetativas o de hormogonios adheridos a la vaina (BECERRA-ABSALÓN ET AL., 2013). Todas las especies hasta ahora son aerofíticas y con una distribución tropical (tabla 5).

De acuerdo a los análisis moleculares y morfológicos las especies de *Brasilonema* no identificadas de este estudio, son nuevas especies (figs. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y tablas 5, 6 y 7):

Brasilonema sp. de Cascada Encanta es especie hermana de *B. bromeliae* y *B. sennae* y principalmente se distingue de éstas por tener los tricomas y filamentos más anchos, esto también la diferencia de *B. epidendron* y *B. ornatum*, que son especies que aún no han sido secuenciadas (tabla 5). Además se desarrolla en un hábitat diferente al de sus especies hermanas, *Brasilonema* sp. de Cascada Encantada vive sobre roca calcárea húmeda, mientras que *B. bromeliae* es epifito y *B. sennae* crece sobre madera y hierro de embarcaciones (tabla 5).

Brasilonema sp. del Valle de Zapotitlán, *Brasilonema* sp. de Xilitla, *B. tolantongensis* y *B. terrestre* son especies hermanas dentro de un clado no resuelto (fig. 3). *Brasilonema* sp. del Valle de Zapotitlán presenta un hábitat muy particular que lo distingue de todas las demás especies del género, crece formando costras sobre suelo desértico, es la primera especie de este género descrita para zonas áridas (tabla 5). Además se distingue de sus especies hermanas porque los filamentos no están fasciculados y por la presencia de heterocitos esféricos sobre todo cuando estos son basales (en los hormogonios), sin embargo cuando son intercalares a veces están ligeramente aplanados (figs. 6a, e; 7a, b, d).

Brasilonema sp. de Xilitla tiene fascículos laxos y postrados, los hormogonios no se atenúan y son del mismo ancho del tricoma y las vainas son lisas y pardas, estos caracteres la diferencian de sus especies hermanas porque *B. terrestre* tiene fascículos erectos y *B. tolantongensis* tiene vainas incoloras y presenta hormogonios que pueden ser más anchos que el tricoma y atenuados en uno de sus extremos. También es diferente a *B. epidendron* que tiene fascículos erectos y sus filamentos y tricomas son más angostos y a *B. ornatum* que presenta vainas ornamentadas.

Scytonema sp. del Valle de Zapotitlán es un linaje hermano (dentro del mismo clado) de *S. hyalinum*. Morfológicamente *Scytonema* sp. del Valle de Zapotitlán es similar a *S. hyalinum*;

el color de la vaina es similar, las medidas se traslapan; pero se puede observar en la tabla 6 que los tricomas de *Scytonema* sp., del Valle de Zapotitlán son más angostos y las vainas más gruesas, además la vaina tiene apariencia escamosa y los intervalos en el ancho y largo de las células son mayores (figs. 6 y 7). Otra especie que podría formar parte de este clado (aún no secuenciada) porque presenta engrosamiento en el ápice de la vaina es *S. capitatum*, pero esta especie tiene filamentos mucho más gruesos que la especie del Valle de Zapotitlán.

Scytonema sp. de Micos es especie hermana de especies no identificadas. La especie de de Micos es subaérea y crece sobre sustratos húmedos, lo que la diferencia de todas las especies de *Scytonema* acuáticas, además es muy delgada (tabla 7), por eso se comparó solo con especies que tienen medidas similares en el ancho de los tricomas. Algunas especies como *S. austinii* y *S. amplium* tienen filamentos más anchos que la especie de Micos, lo que significa que sus vainas son más gruesas, mientras que otras especies como *S. tenue* y *S. hofmannii* tienen filamentos más delgados, es decir que la especie de Micos tiene vainas más gruesas que estas especies. *Scytonema* sp. de micos se parece a *S. variium* en que los filamentos son tortuosos (figs. 8 y 9) pero se diferencia en que *Scytonema* sp. de micos puede presentar tricomas más delgados, las células pueden ser más largas y la vaina al parecer es más gruesa.

CONCLUSIONES

Este trabajo es un primer acercamiento al estudio sistemático de la familia Scytonemataceae, a pesar de que es una de las familias más grandes de Nostocales, existen pocos trabajos relacionados con la sistemática del grupo, la mayoría para circunscribir, géneros y/o especies nuevas. Hay muy pocas secuencias disponibles, la mayor parte no están identificadas o no cuentan con información morfológica que respalde la identificación, en este sentido este trabajo aporta información nueva y valiosa de algunas especies mexicanas que se trabajaron tanto de ambientes naturales como en cultivos, que están bien caracterizadas y documentadas y el análisis en conjunto de este trabajo, tanto morfológico como molecular, apuntan a que el método polifásico empleado sí nos permitió evaluar la sistemática de Scytonemataceae sensu KOMÁREK (2010); mostrando que esta familia es polifilética.

Al parecer está conformada por los géneros *Brasilonema*, algunos morfotipos de *Scytonema*, algunos morfotipos de *Petalonema*, es posible que especies de *Symphyonema* y *Scytonematopsis*, *Mastigocladopsis repens* e *Iphinoe spelaebios*. Hay varios géneros por confirmar como *Kyrtuthrix* y otros géneros de Symphyonemataceae que también tienen ramificaciones tipo-Y.

Si aceptamos esta hipótesis, entonces la familia Scytonemataceae estaría definida por la presencia de tricomas isopolares (aunque en algunos géneros como *Petalonema* tengan fases heteropolares), con heterocitos intercalares (aunque *Mastigocladopsis* también tenga heterocitos laterales) y septos no constreñidos a ligeramente constreñidos. Vainas firmes y cilíndricas siempre presentes y ramificaciones falsas dobles, aunque pueden presentar cualquier otro tipo de ramificación falsa o verdadera. Es necesario seguir poniendo a prueba esta hipótesis con nuevas evidencias tanto morfológicas (análisis de nuevos caracteres que podrían ser ultra estructurales, como la distribución de los tilacoides), como moleculares (obtener más secuencias del 16S ARN ribosomal de las especies de la mayoría de las especies de Scytonemataceae y Symphyonemataceae) y comenzar a formar un acervo de secuencias con nuevos marcadores como rbcLX y rpoB.

Este método también nos permitió observar que varios géneros de Scytonemataceae sensu KOMÁREK (2010) como *Scytonema*, *Petalonema* y *Scytonematopsis* son polifiléticos. Algunos de estos linajes se pudieron caracterizar morfológicamente, por lo que se proponen como nuevos géneros.

Además de acuerdo a los análisis moleculares, morfológicos y la caracterización del hábitat, se reconocieron 5 nuevas especies que son descritas.

REFERENCIAS

- AGARDH, C.A. (1824): *Systema Algarum*. - Lundae [Lund]: Literis Berlingianis [Berling]. [i]-XXXVII, [1]-312.
- AGUIAR, R., FIORÉ, M. F., FRANCO, M. W., VENTRELLA, M. C., LORENZINA, A., VANETTI, C. & ALFENAS, A. C. (2008): A novel epiphytic cyanobacterial species from the genus *Brasilonema* causing damage to *Eucalyptus* leaves. – *J. Phycol.* **44**: 1322-1334.
- ALLEN, M.B. (1968): Simple conditions for growth of unicellular blue-green algae on plates. – *J. Phycol.* **4**: 1-4.
- ALWATHNANI, H. & JOHANSEN, J.R. (2011): Cyanobacteria in soils from a Mojave Desert ecosystem. - *Monogr. West. N. Am. Nat.* **5**: 71-89.
- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. (1985): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1. Introduction. – *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **71**: 291-302.
- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. (1988): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 3. Oscillatoriales. – *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **80**: 327-472.
- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. (1990): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 5. Stigonematales. – *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **86**: 1-73.
- ANAND N. (1998): Culture studies and taxonomy of blue-green algae – Certain identification problems. - *Algol. Stud.* **53**: 141-147.
- ARENAS-DÍAZ, E.D., OCHOTERENA, H. & RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, K. (2009): Multiple Sequence Alignment Using a Genetic Algorithm and GLOCSA. – *J. Artif. Evol. Appl.* doi: 10.1155/2009/963150.
- ÁVILA, J. (1989): Ficoflora potencial de suelo húmedo Del Valle de Tehuacán, Puebla. - Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 39p.
- BECERRA, I. (2002): Cambios en la comunidad algal relacionados con el ciclo hídrico en un tinal inundable en Quintana Roo. - Tesis de Licenciatura, Facultad de ciencias, UNAM, México. 89p.
- BECERRA-ABSALÓN, I. & TAVERA, R. (2003): Cambios de la comunidad algal (perifiton) relacionados con el ciclo hidrológico en un tinal anegable en quintana Roo. - *Mexican studies / Estudios Mexicanos.* **19**(2): 263-275.
- BECERRA-ABSALÓN, I., RODARTE, B., OSORIO, K., ALBA-LOIS, L., SEGAL-KISCHINEVZKY, C. & MONTEJANO, G. (2013): A new species of *Brasilonema* (Scytonemataceae, Cyanoprokaryota) from Tolantongo, Hidalgo, Central Mexico. - *Fottea*: **13**(1): 25-38.
- BERKELEY, M. J. (1833): *Gleening of British Algae: being an Appendix to the Supplement to English Botany*. – C.E. Sowerby, London. 50p.
- BERRENDERO, E. PERONA, E. & MATEO, P. (2008): Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. - *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1-14.

- BOONE, D.R., CASTENHOLZ, R.W., GARRITY, G.M., BRENNER, D.J., KRIEG, N.R. & STALEY, J.T. (2005): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. - Springer, 1388p.
- BORNET, É. & FLAHAULT, C. (1886-1888): Revision des Nostocacés Hétérocistées contenues dans les principaux herbiers de France. - *Ann. Sci. Nat. Bot. (Sér. 7)* 3.4.5.7: 323-381, 343-373. 51-129, 177-262.
- BORZÌ, A. (1879): Note alla morfologia e biologia delle Alghe ficocromacee. Fam. II^a. Scytonemataceae. - *Nuovo Giorn. Bot. Ital.* 11: 347-388.
- BOURRELLY, P. (1970): Les Algues d'eau douce. Initiation à la systematique. Tome III: Les algues bleues et rouges. Les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines. - N. Boubée & Cie, Paris. 512p.
- BOURRELLY, P. & MANGUIN, E. (1952): Algues d'eau douce de la Guadeloupe et dependances recueillies par la Mission P. allorge em 1936. - Societé D'Edution d'Enseignement Supérieur, Paris. 280p.
- BOYER, S.L., FLECHTNER, V.R. & JOHANSEN, J.R. (2001): Is the 16S-23S rRNA internal transcribed Spacer Region a Good Tool for use in Molecular Systematics and Population Genetics? A case Study in Cyanobacteria. - *Mol. Biol. Evol.* 18(6): 1057-1069.
- BROOKS, D.R. & MCLENNAN, D.A. (2002): The nature of diversity an evolution voyage of discovery. - The University of Chicago, Press. 668p.
- CANTORAL, E.A. (1993): Ecología de comunidades algales del sistema hidrológico El Salto, en la Huasteca Potosina. - Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM, México. 97p.
- CARTAJENA, M. G. (2004): Taxonomía y distribución de cianofitas filamentosas de la Huasteca, México. - Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 211p.
- CASAMATTA, D.A., VIS, M.L. & SHEATH, R.G. (2003): Cryptic species in cyanobacterial systematic: a case study of *Phormidium retzii* (Oscillatoriales) using RAPD molecular markers and 16S rDNA sequence data. - *Aquatic Bot.* 77: 295-309.
- CASAMATTA, D.A., JOHANSEN, J.R., MORGAN, L.V. & BROADWATER, S.T. (2005): Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). - *J. Phycol.* 41: 421-438.
- CASTENHOLZ, R.W. (1992): Species usage, concept and evolution in the Cyanobacteria (blue-green algae). - *J. Phycol.* 28: 737-745.
- CASTENHOLZ, R.W. (2001): Oxygenic photosynthetic bacteria. - In: BOONE, D.R. & CASTENHOLZ, R.W. (eds.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. - Springer-Verlag, New York, 2nd ed. 1, 473 – 600.
- CASTENHOLZ, R.W. & WATERBURY, J.B. (1989): Oxygenic Photosynthetic Bacteria.- In Stanley J.T., Bryan, M.P., Pfennig, N. & Holt, J.H., eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins. 1710-1728pp.
- CHADHA, A. & PANDEY, D.C. (1981): Observations on a new species of *Symphyonemopsis* Tiwary & Mitra, *Viz. S. pantii* n. sp. (Cyanophyta, Stigonematales). - *Hydrobiol.* 77: 209-215.

- COHAN, F.M. (2002): What are Bacterial Species? - *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 457-487.
- COMPÈRE, P. (2005): The nomenclature of Cyanophyta under the Botanical Code. - *Arch. Hydrobiol. /Algol. Stud.* **117**: 31-37.
- COPELAND, J.J. (1936): Yellowstone thermal Myxophyceae. - *Annals N.Y. Acad. Sci.* **34**: 1-232.
- CRISCI, J. (1994): La especie: realidad y conceptos. - En: Llorente Bousquets J & Luna Vega I (comps.), *Taxonomía Biológica*. Ediciones Científicas Universitarias. 53-64pp.
- DESIKACHARY, T.V. (1959): Cyanophyta. I.C.A.R. Monographs on algae. - Indian Council of Agricultural Research. New Delhi. 686p.
- DREWS, G. (1973): Fine structure and chemical composition of the cell envelopes -In: Carr, N. G. & Whitton, B.A. (eds.), *The biology of blue-green algae*. - Bot. Monogram. Blackwell SCI Publ. Oxford-London-Edinburg-Boston-Melbourne. **9**: 99-116.
- DROUET, F. (1973): Revision of the Nostocaceae with cylindrical tricomas. - Heffner Press, New York - London.
- ERCEGOVIĆ, A. (1929): Sur quelques nouveaux types des cyanophycées lithophytes de la côte adriatique. - *Arch. F. Protistenk.*, **66**: 164-174.
- ERNST, A., BECKER, S., WOLLENZIEN, U.I.A. & POSTIUS, C. (2003): Ecosystem-dependent adaptative radiations of picocyanobacteria inferred from 16S rRNA and ITS-1 sequence analysis. - *Microbiol.* **149**:217-228.
- FIORÉ, M.F., SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P., KOMÁREK, J., KAŠTOVSKÝ, J., SULEK, J. & LORENZI, A.S. (2007): The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation. - *J. Phycol.* **43**: 789-98.
- FRÉMY, P. (1929): Les Myxophycées de l'Afrique équatoriale française. - *Arch. Bot.* **2**: 1-507.
- FRÉMY, P. (1930): Les Stigonemacées de la France. - *Rev. Algol.* **5**: 147-215.
- FRICTSCH, F.E. (1945): The structure and reproduction of algae II. - The University Press, Cambridge. 939p.
- GARDNER, N.L. (1927a): On a collection of Myxophyceae from Fukien Province, China. - *Univ. Californ. Publ. in Botany.* **14**(1): 1-20.
- GARDNER, N.L. (1927b): New Myxophyceae from Porto Rico. - *Mem. NY Bot. Garden.* **7**: 1-144.
- GEITLER, L. (1925): Cyanophyceae. - Pascher's Süßwasserflora, Fischer-Verl., Jena. **12**: 1-450
- GEITLER, L. (1932): Cyanophyceae. - In KOLKWITZ, R. (ed.): *Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig, Germany. 1-1196 pp.
- GEITLER, L. & RUTTNER, F. (1935): Die Cyanophyceem der Deutschen limnologischen Sunda-Expedition. - *Arch. Hydrobiol /Suppl.* **14** (Tropische Binnengew. 6): 308-369, 371-483pp.
- GOLD-MORGAN, M., MONTEJANO, G. & KOMÁREK, J. (1994): Freshwater epiphytic cyanoprokaryotes from central Mexico. 2. Heterogeneity of the genus *Xenococcus*. - *Arch. F. Protistenk.* **144**: 398-411.

- GOLD-MORGAN, M., MONTEJANO, G. & KOMÁREK, J. (1996): Freshwater epiphytic Chamaesiphonaceae from Central Mexico. - Arch. Hydrobiol./Algolog. Stud. **83**: 267-271.
- GOLOBOFF, P.A. (1999): Nona (NO NAME) ver. 2. - Published by the author, Tucumán, Argentina.
- GOLOBOFF, P.A., FARRIS, J. S. & NIXON, K. C. (2008): TNT, a free program for phylogenetic analysis. – Cladistics. **24**: 774-786.
- GOLUBIĆ, S. (1979): Cyanobacteria (Blue-Green Algae) under the Bacteriological Code? An ecological objection. - Taxon. **28**(4): 387-389.
- GOMONT, M. (1892a): Monographie des Oscillariées. - Ann. Sci. Nat. Bot. Paris. **15**:263-368.
- GOMONT M. (1892b): Monographie des Oscillariées. - Ann. Sci. Nat. Bot. Paris. **16**:91-264.
- GREUTER, W., NEILL, J., BARRIE, F.R., BURDET, H.M., DEMOULIN, V., FILGUEIRAS, T.S., NICOLSON, D.H., SILVA, P.C., SKOG, J.E., TREHANE, P., TURLAND, N.J. & HAWKSWORTH, D.L. (2000): International Code of Botanical Nomenclature. - Regnum Veg. **138**:1-474.
- GREVILLE, R.K. (1825): Scottish cryptogamic flora, or coloured figures and descriptions of cryptogamic plants, belonging chiefly to the order Fungi; and intended to serve as a continuation of English Botany. - Edinburgh & London: MacLachlan & Stewart; Bladwin, Craddock & Joy. **3**(31-36).
- GUGGER, M. & HOFFMANN, L. (2004): Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). - Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **54**: 349-357.
- HALL, T.A. (1999): Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. - Nucl. Acids. Symp. Ser. **41**: 95-98.
- HALPERIN, D.R. (1970): Cianoficeas marinas del Chubut (Argentina), I. Golfo San Jose, Golfo Nuevo y alrededores de Rawson. - PHYSIS. **30** (80): 33-96.
- HERNÁNDEZ-MARINÉ, M. C., FERNÁNDEZ, M. & MERINO, V. (1992): *Mastigocladopsis repens* (Nostochopsaceae), a new cyanophyte from Spanish soils. –Cyptogamie, Algol. **13**(2): 113-120.
- HIGGINS, D., THOMPSON, J., GIBSON, T., THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. (1994): Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. – Nucleic Acids Res **22**: 4673-4680.
- HINDÁK, F. (2008): Colour Atlas of cyanophytes. - Veda, Bratislava. 256 p.
- HOFFMANN, L., KOMÁREK, J. & KASTOVSKÝ, J. (2005): System of cyanoprokaryotes (cyanobacteria) - state in 2004. - Arch. Hydrobiol. Suppl./Algol. Stud. **159**: 95-115.
- IYENGAR, M.O. & DESIKACHARY, T.V. (1946): *Mastigocladopsis jogensis* gen. *et* sp. nov. A new member of the Stigonemataceae. – Proc. Ind. Acad. Sci. B. **24**: 55 -59.
- JOHANSEN, J.R., KOVACIK, L., CASAMATTA, D.A., FUČIKOVÁ, K. & KAŠTOVSKÝ, J. (2011): Utility of 16S-23S ITS sequences and secondary structure for recognition of intrageneric and intergeneric limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya cortical* sp, nov, (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria). - Nova Hedwigia. **92**(3-4): 283-302.

- JOHN D.M., WHITTON, B.A. & BROOK, A.J. (2002): The freshwater algal flora of the British Isles, The Natural History Museum, - Cambridge. 702p.
- KIRCHNER, O. (1898): Schizophyceae. In Die natürlichen Pflanzenfamilien I. Teil, Abt. 1a. – Engler, A. & Prantl, K. eds. Leipzig: Wilhelm Engelmann. 45-92 pp.
- KISELEVA, E. (1930): About a new bluegreen algae *Scytonematopsis woronichinii*. – Zhurn. Russk. Bot. Obshch. 15: 169-174.
- KOMÁREK, J. (1989): Studies on the Cyanophytes of Cuba 7-9. - Folia Geobot. Phytotaxon. 24: 171-206.
- KOMÁREK, J. (2003): Two *Camptylonemopsis* species (Cyanoprokaryotes) from Mata Atlántica in coastal Brazil. – Preslia. 75: 223-232.
- KOMÁREK, J. (2006): Cyanobacterial taxonomy: Current Problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches, - Algae. 21(4): 349-375.
- KOMÁREK, J. (2010): Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). – Hydrobiol. 639: 245-259.
- KOMÁREK, J. (2012): Nomenclatural changes in heterocytous Cyanoprokaryotes (Cyanobacteria, Cyanophytes). – Fottea. 12(1): 141-148.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1986): Modern approach to the classification system of cyanophytes. 2. Chroococcales. - Arch Hydrobiol, Suppl. 73/Algological Studies. 43: 157-226.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1989): Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 – Nostocales. - Arch. Hydrobiol. /Algol. Stud. 56: 247-345.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1998): Cyanoprokaryota: Chroococcales. - Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm: Gustav Fisher.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (2005): Cyanoprokaryota 2. Oscillatoriales. - München: Elsevier.
- KOMÁREK, J. & HAUER, T. (2007): Three rare cyanobacterial species in the Podyjí National Park. - THAYENSIA(ZNOJMO). 7: 75-83.
- KOMÁREK, J. & HAUER, T. (2013): CyanoDB.cz – On-line database of cyanobacterial genera. - Word-wide electronic publication, Univ. of South Bohemia & Inst. Of Botany AS CR, <http://www.cyanodb.cz>
- KOMÁREK, J. & MONTEJANO, G. (1994): Taxonomic evaluation of several *Chlorogloea* species (Cyanoprokaryota) from inland biotopes. - Arch. Hydrobiol./Algolog. Stud. 74: 1-26.
- KOMÁREK, J., MONTEJANO, G., GOLD-MORGAN, M. & TAVERA, R. (1996): Taxonomic identity and distribution of tropical cyanoprokaryotes (Cyanophyta, Cyanobacteria): An example from central Mexico. - Nova Hedwigia, Beiheft. 112:49-54.
- KORELUSOVÁ, J. (2008): Phylogeny of heterocytous Cyanobacteria (Nostocales and Stigonematales). – University of South Bohemia in Ceske Budejovice Faculty of Science. 33 pp.

- KOVÁČIK, L. & KOMÁREK, J. (1988): *Scytonematopsis starmachii*, a new cyanophyte species from the High Tatra Mts. (Czechoslovakia). - Arch. Hydrobiol./Algological studies 50-53: 303-314.
- KÜTZING, F.T. (1845): *Phycologia germanica*, d. i. Deutschlands Algen in bürdigen Beschreibungen. - Nebst einer Anleitung zum Untersuchen und Bestimmen dieser Gewächse für anfänger. pp. i-x, 1-340.
- LAMPRIKINOU, V., HERNÁNDEZ-MARINE, M., CANALS, T., KORMAS, K., ECONOMOU-AMILLI, A. & PANTAZIDOU, A. (2011): Morphology and molecular evaluation of *Iphinoe spe-laebios* gen. nov., sp. nov. and *Loriellopsis vacernicola* gen. nov., sp. nov. two stigone-matalean cyanobacteria from Greek and Spanish caves. - Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61: 2907-2915.
- LAPAGE, S.P., SNEATH, P.H.A., LESSEL, E.F., SKERMAN, V.B.D., SEELIGER, H.P.R & CLARK, W.A., eds. (1992): International code of Nomenclature of Bacteria: Bacteriological Code, 1990 Revision. Washington (DC): ASM Press. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8817/>
- LEÓN-TEJERA, H., MONTEJANO, G. & GOLD-MORGAN, M. (2005): Description of two interesting Scytonematacean populations from supratidal biotopes of the Mexican Pacific. - Algol. Stud. (Cyanobact. Res. 6). 117: 307-313.
- MCNEIL, J., BARRIE, F.R., BUCK, W.R., DEMOULIN, V., GREUTER, W., HAWKSWORTH, D.L., HERENDEEN, P.S., KNAPP, S., MARHOLD, K., PRADO, J., PRUDHOMME W.F., SMITH, G.F., WIERSEMA, J.H. & TURLAND, N.J., Eds. (2012): International Code of Nomenclature for Algae, Fungi and Plants (Melbourne Code adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. - Disponible en: <http://www.iapt-taxon.org/nomen/main.php>.
- MISHLER, B.D. & THERIOT, E.C. (2000): The phylogenetic species concept (*sensu* Mishler and Theriot): monophyly, apomorphy and phylogenetic species concepts. - In: Wheeler QD & Meier R (Eds.), Species concepts and Phylogenetic Theory, A Debate. Columbia University Press, New York. 44-54 pp.
- MIGULA, W. (1907): Kryptogamen-Flora von Deutschland, Deutsch-Österreich und der Schweiz. Band II. - Algen. 1. Teil. Cyanophyceae, Diatomaceae, Chlorophyceae. Berlin: H. Bergmühler. 1-914 pp.
- MONTEJANO, G. GOLD-MORGAN, M. & KOMÁREK, J. (1993): Freshwater epiphytic cyanoprokaryotes from Central México. 1. *Cyanocystis* and *Xenococcus*. Arch. F. Protistenk. 143: 383-405.
- MONTEJANO, G., CARMONA-JIMÉNEZ, J. & CANTORAL-URIZA, E. (2000): Algal communities from calcareous springs and streams in La Huasteca, central México: A Synthesis. - En: Munawar M S Lawrence, LF Monamuar & D Malley (Eds.) Aquatic Ecosystem of Mexico: Status & Scope. Ecovision World Monograph Series. Backhuys Publishers, Holanda. 435pp.

- MONTEJANO, G., CANTORAL-URIZA, E. & CARMONA-JIMÉNEZ, J. (2004): Algas de ambientes lóticos en la cuenca baja del río Pánuco. - En: Luna I, Morrone JJ y Espinosa D (Eds.). Biodiversidad de la Sierra Madre Oriental. CONABIO, Las prensas de Ciencias.
- MONTEJANO, G., GOLD-MORGAN, M., LEÓN-TEJERA, H. (2005): Surveying the diversity of Cyanoprokaryotes in poorly known regions: the case of the central region of Mexico. - *Archiv. Hydrobiol. / Algol. stud.* **117**:329-338.
- MORRONE, J.J. (2013): Sistemática. Fundamentos, métodos, aplicaciones. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D.F. 505p.
- MÜLLER, J., MÜLLER, K., NEINHUIS, C. & QUANDT, D. (2010): PhyDE. - Disponible en: (www.Phyde.de/). Último acceso.
- NEILAN, B., JACOBS, D. & GOODMAN, E.A. (1995): Genetic Diversity and Phylogeny of Toxic Cyanobacteria Determined by DNA Polymorphisms within the phycocyanin locus. - *Appl. Environm. Microbiol.* **61**(11): 3875-3883
- NEILAN, B.A., JACOBS, D., DEL DOT, T., BLACKALL, L.L., HAWKINS, P.R., COX, P.T. & GOODMAN, A.E. (1997): rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. - *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 693-697.
- NIYAMA, Y., TUJI, A. & TSUJIMURA, S. (2011): *Umezakia natans* M. Watan. Does not belong to stigonemataceae but to Nostocaceae. - *Fottea (Praha)*. **11**: 163-169.
- NIXON, K. C. (1999): The Parsimony Ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. - *Cladistics*. **15**: 407-414.
- NIXON, K.C. (2002): Winclada Ver. 1.00.08. - Published by the autor, Ithaca, NY.
- NOVELO, E. (2011): Flora Del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 90. - Facultad de Ciencias, Instituto de Biología, UNAM, México.
- NOVIS, P.M. & VISNOVSKY, G. (2011): Novel alpine algae from New Zealand: Cyanobacteria. - *Phytotaxa*. **22**: 1-24.
- NÜBEL, U., GARCÍA-PICHEL, F. & MUYZER, G. (1997): PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. - *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3327-3332.
- OREN, A. (2004): A proposal for further integration of the cyanobacteria under the Bacteriological Code. - *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 1895-1902.
- ORTEGA, M.M. (1984): Catálogo de algas continentales recientes de México. - Coordinación de la investigación científica, Instituto de Biología, UNAM, México. 565 p.
- OTSUKA, S., SUDA, S., SHIBATA, S., OYAIZU, H., MATSUMOTO, S. & WATANABE, M.M. (2001): A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code. - *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**:873-879.
- PALINSKA, K.A., LIESACK, W., RHIEL, E. & KRUMBEIN, W.E. (1996): Phenotypic variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on Merismopedia-like isolates. - *Arch. Mikrobiol.* **166**: 224-233.

- PALINSKA, K.A., THOMASIU, C.F., MARQUARDT, J. & GOLUBIĆ, S. (2006): Phylogenetic evaluation of cyanobacteria preserved as historic herbarium exsiccate. - *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2253-2263.
- PRESCOTT, G.W. (1962): *Algae of the Western Great Lakes area*. - W.M. C. Brown Company Publishers. Dubuque, Iowa, U.S.A. 977p.
- RABENHORST, L. (1865): *Flora Europea Algarum*. - Leipzig. **2**: 1-319.
- RAJANIEMI, P., KOMÁREK, J., HOFFMANN, L., HROUZEK, P., KAŠTOVSKÁ, K. & SIVONEN, K. (2005): Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. - *Algolog. Stud.* **117**: 371-91.
- RAMIREZ, M. (2006): Caracterización de los crecimientos algales causantes del biodeterioro en la zona arqueológica de Palenque (Chiapas, México). - Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J.B., HERDMAN, M. & STAINER, R.Y. (1979): Generic assignments, strain histories, and properties of pure cultures of cyanobacteria. - *J. Gen. Microbiol.* **111**: 1-61.
- RIVERA-AGUILAR, V., MONTEJANO, G., RODRÍGUEZ-ZARAGOZA, S. & DURÁN-DÍAZ, A. (2006): Distribution and composition of cyanobacteria, mosses and lichens of the biological soil crusts of the Tehuacán Valley, Puebla, México. - *Journal of Arid Environments*. **67**: 208-225.
- SANT'ANNA, C.L., AZEVEDO, M.T.P., FIORÉ M.F., LORENZI, A.S., KAŠTOVSKÝ, J. & KOMÁREK, J. (2011): Subgeneric diversity of *Brasilonema* (Cyanobacteria, Scytonemataceae). - *Revista Brasil. Bot.* **34**(1): 51-62.
- SIMMONS, M.P. & OCHOTERENA, H. (2000): Gaps as characters in Sequence-Based Phylogenetic Analyses. - *Syst. Biol.* **49**(2): 369-381.
- STAINER, R.Y., SISTROM, W.R., HANSEN, T.A., WHITTON, B.A., CASTENHOLZ, R.W., PFENNING, N., GORLENKO, V.N., KONDRATIEVA, E.N., EIMHJELLEN, K.E., WHITTENBURY, R., GHERNA, R.L. & TRÜPER, H.G. (1978): Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the international code of nomenclature of bacteria. - *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**: 335-336.
- STARMACH, K. (1966): *Cyanophyta-Since, Glaucophyta- Glaukofity*. Flora Slodkowodna Polski, - Warszawa. **2**: 807 pp.
- TATON, A., GRUBISIC, S., ERTZ, D., HODGSON, D.A., PICARDI, R., BIONDI, N., TREDICI, M., MAININI, M., LOSI, D., MARINELLI, F. & WILMOTTE, A. (2006): Polyphasic study of Antarctic cyanobacterial strains. - *Journal of Phycology*. **42**(6): 1257-1270.
- TENEVA, I., DZHAMBASOV, B., MLADENOV, R. & SCHROMER, K. (2005): Molecular and phylogenetic characterization of *Phormidium* species (Cyanoprokaryota) using the *cpcB-IGS-cpcA* locus. - *J. Phycol.* **41**(1): 188-194.
- TILDEN, J. (1910): *Minnesota Algae. I. The Myxophyceae of North America and Adjacent Regions*. - University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota. 302 pp.

- TORRES, P. (1993): La Ficoflora de la zona arqueológica de Palenque, Chiapas. - Serie Conservación y Restauración, INAH, México.
- UHER, B. (2010): Cyanobacterium *Petalonema alatum* BERK. ex KIRCHN. – Species variability and diversity. - *Fottea*. **10**(1): 83-92.
- UMEZAKI, I. (1958): Revision of *Brachytrichia* ZANARD. and *Kyrtuthrix* ERCEG. - Memoirs of the College of Agriculture, Kyoto University, Fisheries series Special number: 55-67.
- VACCARINO, M.A. & JOHANSEN, J.R. (2011): *Scytonematopsis contorta* sp. nov. A new species from the Hawaiian Islands. - *Fottea*. **11**(1): 149-161.
- VACCARINO, M.A. & JOHANSEN, J.R. (2012): *Brasilonema angustatum* sp. nov. (Nostocales), a new filamentous cyanobacterial species from the Hawaiian Islands. - *Journal of Phycology*. **48**(5): 1178-1186.
- VALADEZ, F., Carmona, J. & Cantoral, E. (1996): Algas de ambientes lóticos en el estado de Morelos, México. - *Anales Inst. Biol. UNAM, Ser. Bot.* **67** (2): 227-282.
- WARD, D.M. (1998): A natural species concept for prokaryotes. – *Curr. Opin. Microbiol.* **1**(3): 271-277.
- WATANABE, M.M. (1999): Network approach to make biodiversity information accessible worldwide-as an example of microorganisms. - In: *Species 2000, Abstr. Internat. Joint Workshop for studies on Biodiversity, Tsukuba*. 13p
- WATERBURY, J.B. & RIPPKA, R. (1989): Subsection I. Orden Chroococcales. - In: Staley JT, Bryant MP, Pfennig & Holt JG (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. **3**:1728-1746. Baltimore: Williams & Wilkins.
- ZHAO, X. & CHEN, X. (1991): Two new species of Cyanophyta from Southern Zhejiang. - *Acta hydrobiol. Sin.* (1): 79-81.

APÉNDICE I

Artículo requisito para la obtención del grado

Fottea, Olomouc, 13(1): 25–38, 2013

25

A new species of *Brasilonema* (Scytonemataceae, Cyanoprokaryota) from Tolantongo, Hidalgo, Central Mexico

Itzel BECERRA–ABSALÓN^{1*}, Beatriz RODARTE², Karina OSORIO¹, Luisa ALBA–LOIS², Claudia SEGAL–KISCHINEVZKY² & Gustavo MONTEJANO^{1*}

¹*Departamento de Biología Comparada, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Coyoacán, Código Postal 04510, P.O. Box 70–474, México, Distrito Federal (D.F.), México; * Corresponding author e-mail: iba@ciencias.unam.mx, gmz@ciencias.unam.mx*

²*Biología Celular, Facultad de Ciencias, UNAM, México D.F., México*

Abstract: New approaches in taxonomy and the introduction of molecular tools have substantially changed the taxonomy of cyanobacteria, leading to new genera and species being defined based on genetic and morphological investigations. In addition, molecular tools have confirmed several previously defined cyanobacteria genera, including some based on morphological and ecological features. Several of them have also been split into new generic entities, such as *Brasilonema*. In the central region of Mexico, several populations have been identified to share some traits with this new genus. In the region of Tolantongo, Hidalgo (Hgo), we found cyanobacteria populations that correspond to *Brasilonema* description (FIORE et al. 2007), however the development of trichomes and hormogonia did not agree with the diagnosis of *Brasilonema*. We describe and analyze the cyanobacteria populations that we found in Tolantongo, and compare their features with the diagnostic generic features and those of several *Brasilonema* species. The results of morphological analyses were tested using molecular phylogenetic data derived from 16S RNA gene sequencing and the use of marker *cpcBA*–IGS for phycocyanin operon. From our analyses we conclude that the strain from Tolantongo belongs to the genus *Brasilonema*, and the differences observed are sufficient to propose a new species.

Key words: *Brasilonema*, cyanobacteria, life cycle, molecular phylogenetic, new species, phenotypic analyses, systematic

Introduction

Cyanobacterial taxonomy has changed considerably during the last few decades, due to the study of this group in previously uninvestigated regions and the introduction of modern tools in physiology, biochemistry, ecology and more recently the application of molecular methods (RAJANIEMI et al. 2005; KOMÁREK 2006, 2010). This resulted in numerous modifications to cyanobacterial taxonomy (CASTENHOLZ 2001; GUGGER et al. 2002; GUGGER & HOFFMANN 2004; HROUZEK et al. 2005; WILLAME et al. 2006; KOMÁREK 2010). In this way numerous new genera and species have been defined (ABED et al. 2002; FLECHTNER et al. 2002; CASAMATTA et al. 2006; KOMÁREK 2010; VACCARINO & JOHANSEN 2011), some genera resulting from splitting, others have been confirmed (KOMÁREK 2010).

The classification of several genera into families has changed and will continue changing as their diagnostic characteristics are being re-evaluated (FLECHTNER et al. 2002; KOMÁREK 2010).

We agree with the approach of the species concept proposed by KOMÁREK (2003a), which says that genetically stable and morphologically recognizable populations exist in nature and that these populations represent discontinuities which we could refer to as species. We also agree that the appropriate way to study them is correlating morphological, molecular and ecological features (KOMÁREK 2011), and this is our methodological approach in this paper.

The family Scytonemataceae FRANK (order Nostocales HOFFMANN, KOMÁREK et KAŠTOVSKÝ) has been defined on the presence of *Scytonema*-type false branching and isopolar trichomes. *Scytonema* AGARDH ex BORNET et FLAHAULT,

Scytonematopsis KISELEVA, *Kyrtuthrix* ERCEGOVIĆ and *Petalonema* BERKELEY ex CORRENS were the genera traditionally included in this family (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1989). Recently FIORE and collaborators (2007), using morphological and molecular evidence, defined a new genus within the family Scytonemataceae named *Brasilonema* FIORE et al. (2007).

Morphologically *Brasilonema* has macroscopic growths, development comprised of densely packed fascicles, isopolar filaments, rare false branching, rounded unattenuated apical cells, and isopolar hormogonial development (FIORE et al. 2007). Currently, seven species are included in *Brasilonema* (FIORE et al. 2007; AGUIAR et al. 2008; SANT'ANNA et al. 2011). Six were described from Brazil: *B. bromeliae* (FIORE et al. 2007), *B. octagenarum* (AGUIAR et al. 2008), *B. epidendron*, *B. ornatum*, *B. terrestre* and *B. sennae* (SANT'ANNA et al. 2011). *B. sennae* was first described as *Camptylonemopsis sennae* (KOMÁREK 2003b) but later was reclassified as *Brasilonema* (AGUIAR et al. 2008; SANT'ANNA 2011). Whereas *Brasilonema roberti-lamii*, originally described in the Antilles as *Tolypothrix roberti-lamii* (BOURRELLY & MANGUIN 1952), was later added to the genus *Shmidleinema* by KOMÁREK (1989) and recently moved to *Brasilonema* (SANT'ANNA et al. 2011). During our floristic studies on cyanobacteria in the central region of Mexico, we found several populations showing certain *Brasilonema*'s characteristics. Nevertheless these populations showed trichome and hormogonial structures among other characteristics that distinguish it from the *Brasilonema* species described. For this reason we decided to investigate these populations more thoroughly so as to assign them to the appropriate genus with greater certainty.

Analyzing the morphological and phylogenetic properties using 16S rRNA and the *cpcBA*–IGS phycocyanin region described in this paper, we conclude that the populations indeed belong to *Brasilonema*. Furthermore we consider that the variations observed in our populations indicate that they should be considered as new species.

Materials and Methods

Studied area and sample collection. Our investigation took place in Tolantongo – a valley at the end of a ravine in the municipality of Cardonal, in Hidalgo state, Mexico. This locality has a diverse mineral content and travertine springs with varying temperatures (about 20

– 40 °C); It is located at 20°38'38.3" N and 98°59'34" W, and 1422 m above sea level.

Cyanobacteria populations were found inhabiting on wet limestone walls near runoffs within a system of waterfalls (Fig. 1a). Where temperature ranged from 30 – 32 °C, pH 7.4, conductivity was 984 – 1011 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, and radiance was 45 – 424.5 $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$.

We collected samples for two types of preparation: 1) herbaria samples fixed with 4% formaldehyde and 2) live samples transported on ice. We recorded the environment luminosity, temperature and pH.

Morphological characterization and cultures.

Morphological variability and life cycles were studied on live material (fresh and cultured), and on 4% formaldehyde fixed material. We observed the samples using an Olympus BX51 microscope with DIC equipped with an Olympus DP-12 digital camera. Morphological characterizations were made according to the classification scheme proposed by KOMÁREK (2010) and the descriptions of FIORE et al. (2007), AGUIAR et al. (2008), SANT'ANNA et al. (2011), MONTEJANO et al. (2010), and RODARTE et al. (unpublished).

We isolated filaments from live material to establish monoclonal cultures in BG11 media, with and without a nitrogen source, both in solid and liquid media (ALLEN 1968). Cultures were grown in a Sanyo chamber in a controlled environment at 25 °C, 37.3 $\text{mmol}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ irradiance and a 12:12 h light–dark cycle. Due to environmental variations of temperatures in Tolantongo, we had to choose the temperature at which most cultures grew well (25 °C). Although it was not the ideal temperature for culturing our populations like *Brasilonema*, we found no significant morphological changes.

DNA isolation and PCR amplification. DNA was extracted from monoclonal cultures by freeze–thawed sample 5 cycles as described by PALINSKA and coworkers (2006), followed by the mechanical rupture of the sample using a pestle. We completed the extraction using an UltraClean Microbial DNA Isolation Kit (MO–BIO Labs, Carlsbad, CA, USA).

PCR amplification of the 16S RNA ribosomal gene was performed using the primers 106F (NÜBEL et al. 1997) and 1494Rc (NEILAN et al. 1997); the *cpcBA*–IGS region was amplified using primers reported by NEILAN and colleagues (1995). The amplification reaction was performed using MgCl_2 buffer (1 × 2.5 mM), 10 mM solution of dNTP's, 0.5 μM of each oligonucleotide and 1 U of DNA polymerase (Amplificasa, Biogénica Mexico City, Mexico). Both amplification reactions were conducted as follows: one denaturation cycle at 94 °C for 7 min; 30 cycles of denaturation at 94 °C for 30 sec, annealing at 63 °C for 1 min and an extension at

72 °C for 1 min; final extension at 72 °C for 7 min. The amplification products were purified with a GeneClean III Kit (Bio 101 Systems, La Jolla, CA, USA) and submitted for bidirectional sequencing to the Instituto de Biología, UNAM. Fragments were assembled using the software Bioedit version 7.0.9.0 (HALL 1999).

Alignment and phylogenetic analysis. Phylogenetic analysis was based on two sequences of DNA, 16S rRNA gene (bp106–1494), and *cpcBA*–IGS region of the phycocyanin gene. The taxa used in 16S rRNA and *cpcBA* sequences analyses included a total of 43 and 25 OTUs respectively, both with one novel sequences from Tolantongo Hgo, México and OTUs from GenBank.

We made a BLAST search to select more related sequences with the Tolantongo sequence. We also selected sequences based on morphological classification criteria, so we could include sequences from all the Nostoclean families: Scytonemataceae, Microchaetaceae, Nostocaceae, Rivulariaceae, Symphyonemataceae, Hapalosiphonaceae and Stigonemataceae. In both analyses the external group was *Gloeobacter violaceus*. The sequences were aligned using Clustal W (HIGGINS et al. 1994). Gaps were coded for missing information.

The trees were constructed using parsimony and maximum likelihood analyses in TNT (GOLOBOFF et al. 2008) and Mega version 5 (TAMURA et al. 2011) programs, respectively. Parsimony analyses were performed using a heuristic search combining sectorial, ratchet, drift and tree fusing methods with 10 addition sequences; all trees generated were retained. Bootstrapped of 500 replicates was used. The non-informative matrix data were eliminated with WinClada (NIXON 2002).

The best models for analysis with maximum likelihood were found with Mega version 5 (TAMURA et al. 2011). Maximum likelihood was performed using the Kimura 2 –parameter with gamma distribution and sites evolutionarily invariable to 16S rRNA and Tamura 3 – parameter with gamma distribution to *cpcBA*–IGS analysis. Bootstrapping was conducted with 500 replicates.

Results

Taxonomic observations

Brasilonema tolantongensis BECERRA–ABSALÓN et MONTEJANO sp. nov.

Thallus macroscopic, blackish–violet mats, densely fasciculated and prostrate on substrate. Mature filaments isopolar, cylindrical, 17.5 – 24.5 μm wide (\bar{x} = 21 μm), closed at rounded ends, open after hormogonia are released. Sheaths thin, not lamellated when young, slightly lamellated

with age, colorless. Mature trichomes 12.5 – 20 μm wide (\bar{x} = 7 μm), not attenuated, not or slightly constricted, generally of same width along the whole length, becoming wider at the ends when forming hormogonia; sometimes calyptras are found in apical cells. Young trichomes attenuated in single or both ends. False branching rare, predominantly double, although sometimes single, or in some filaments growing from an attached hormogonium. Cells violet to brown, variable in length, shortest in hormogonia, apical cells and meristematic zones; longer in older parts, 5.25 – 18.7 μm in length (\bar{x} = 11.4 μm), with granular content mainly in older cells; vacuole-like structures were found in rows of neighboring cells. Heterocytes solitary, intercalary, discoidal to rectangular, wider than long in trichomes 12.48 – 16.4 μm wide (\bar{x} = 14.85 μm) by 7.4 – 15.6 μm long (\bar{x} = 9.6 μm); solitary, basal, hemispherical in hormogonia. Hormogonia with asymmetrical growth becoming heteropolar, wider than trichomes 16.2 – 41.5 μm wide (\bar{x} = 23 μm).

Habitat: Populations from Tolantongo, in subtropical, subaerophytic environments, on wet limestone walls near runoffs (Fig. 1a) where temperatures range from 30 – 32 °C, pH 7.4, conductivity 984 – 1011 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, and irradiance 45 – 424.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$.

Iconotype: Fig. 2.

Type locality: Tolantongo in the state of Hidalgo, México.

The populations studied shared the following characteristics with the genus *Brasilonema*: 1) a subaerophytic habitat, attached to solid substrates (Fig. 1 a); 2) macroscopic thallus comprised of densely packed fascicles; 3) mature filaments end rounded, remaining closed until hormogonia were released (Figs 1 b–c, 2 a–c); 4) calyptra occasionally observed (Figs 1 b, 2 a); 5) Solitary, discoidal to cylindrical, intercalary heterocytes in mature trichomes were identified (Figs 1 b, 2 a); 6) Vacuole – like structures and granulation in the cells (Figs 1 b, 2 a); 7) false branching, single and double (Figs 1 d, 2 b).

On the other hand, populations from Tolantongo differed from the genus *Brasilonema* in that: 1) mature filaments lost their isopolarity temporarily when hormogonia were formed (Figs 1 c, 2 c); 2) hormogonia were observed to be heteropolar, with one basal heterocyte, while the other end was attenuated (Figs 1 f, 2 d); 3) hormogonia had asymmetrical growth, such that

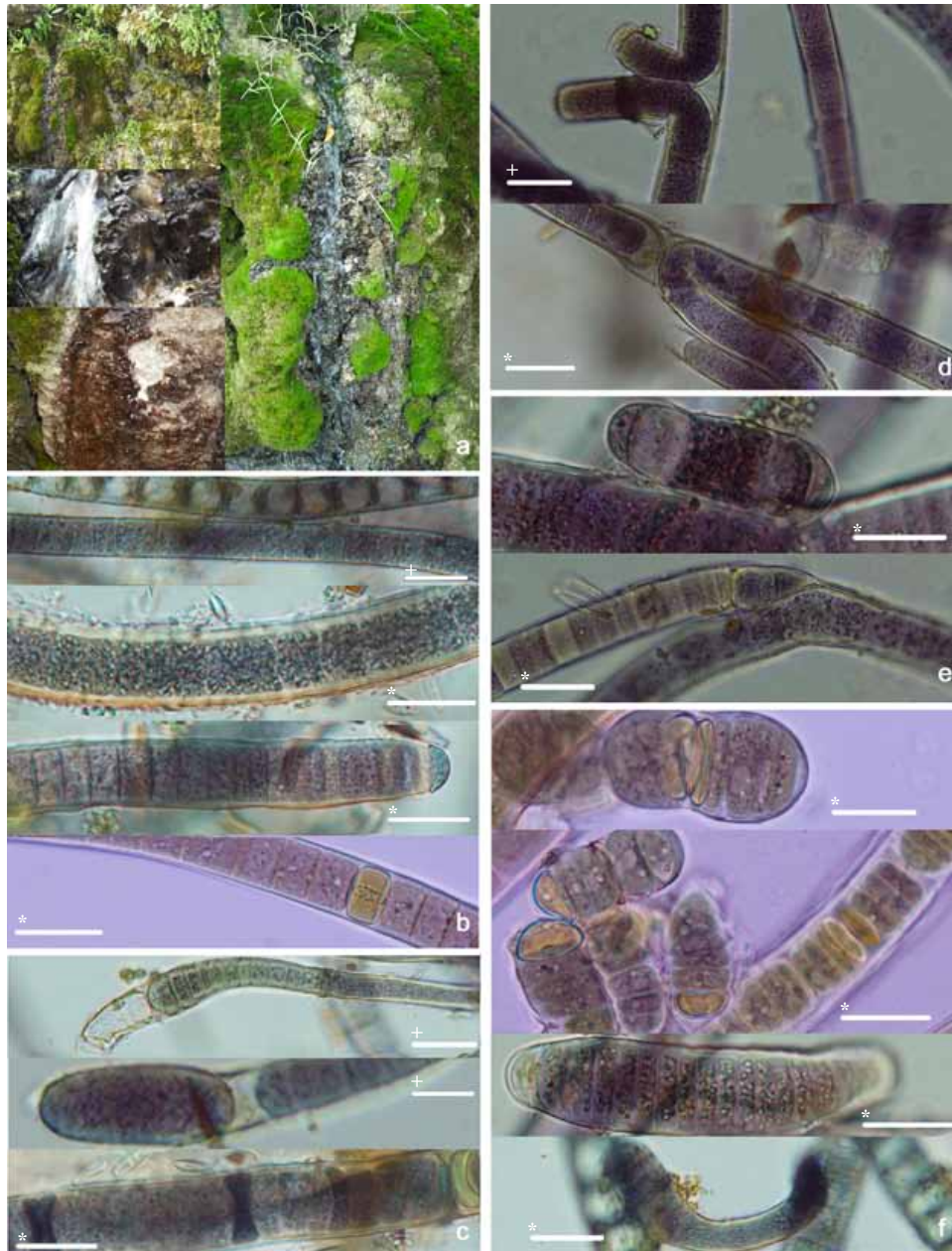


Fig. 1. Primary characteristics of *Brasilonema tolantongensis*: (a) habitat and type of thallus; (b) mature filaments features (from top to bottom: vacuole-like structures, granulation, calyptra, and heterocyst); (c) hormogonia formation (from top to bottom: widening of apical cells, hormogonia wider than trichomes, necridic cells); (d) false branching (top, double branching and bottom, single branching); (e) branch formed from hormogonia; (f) hormogonia development (from top to bottom: basal heterocyst formation; initial asymmetric division and young trichomes with attenuation at one of the apical cells, and characteristic letter "J" shape). Scale bar 20 μm (+), 30 μm (*).

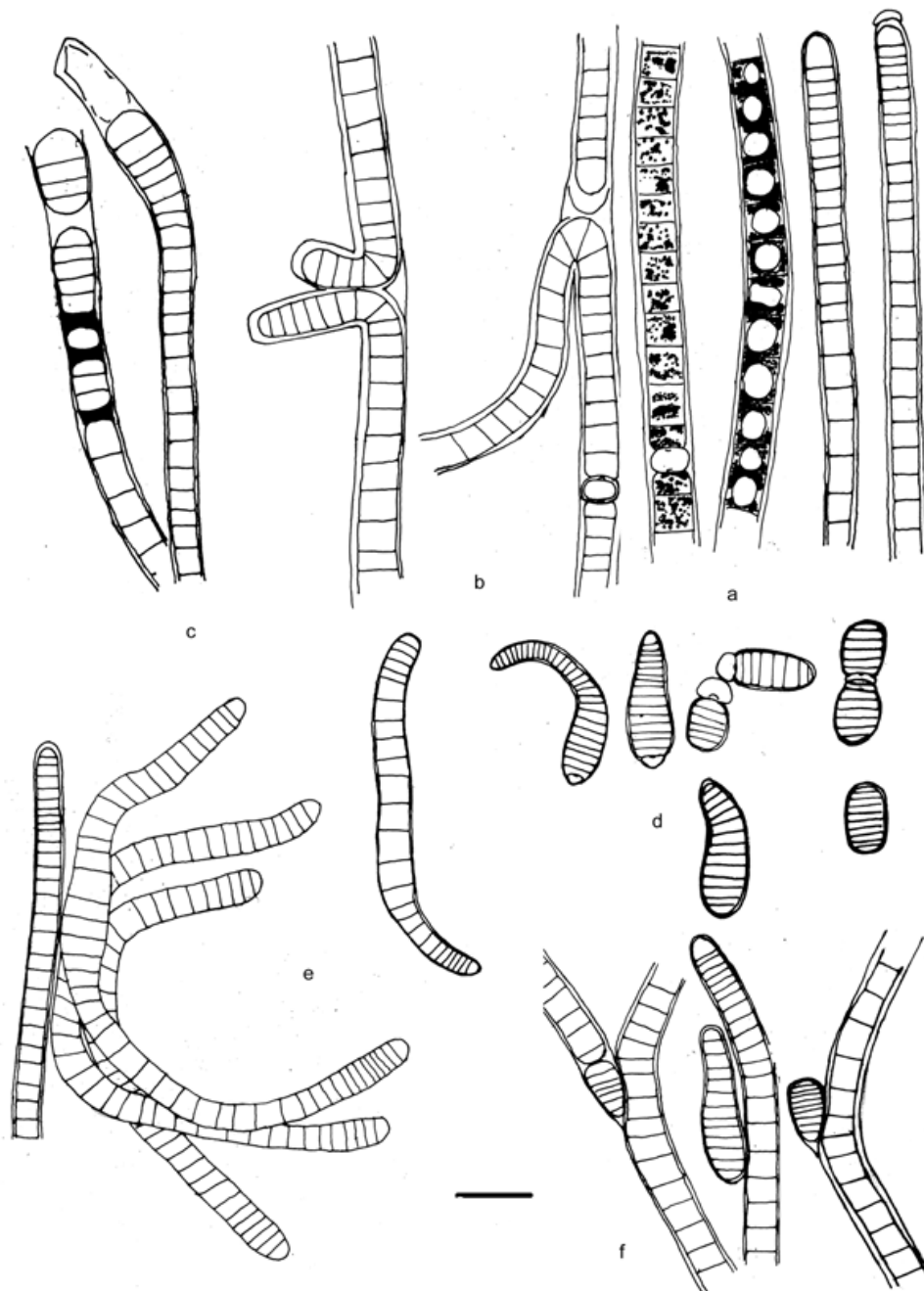


Fig. 2. Drawing of *Brasilanema tolantogensis* (Iconotype): (a) mature trichomes; (b) false branching; (c) hormogonia formation; (d) hormogonia development and germination; (e) young trichomes development; (f) formation of false branching initiating from one hormogonium. Scale bar 20 μm .

Table 1. Comparison of some general and specific characteristics of 5 species of *Brasilonema*. The hyphens mean no description was available [(1) FIORE et al. 2007; (2) AGUIAR et al. (2008); (3) SANT'ANNA et al. 2011; (4) this paper].

Characteristics	<i>B. bromeliae</i> ¹	<i>B. octagenarum</i> ²	<i>B. sennae</i> ³	<i>B. roberti-lamii</i> ³	<i>B. epidendron</i> ³	<i>B. ornatum</i> ³	<i>B. terrestre</i> ³	<i>B. tolantongensis</i> ⁴
Thallus shape	Free fascicles	Mats of irregular, creeping fascicles	Erect, parallel, regular fascicles	Mats of erect fascicles	Erect, irregular fascicles	Creeping fascicles	Mats of erect, irregular fascicles	Mats of prostrated fascicles
Thallus color	Blackish-green to blackish violet	Dirty green, brown or blackish-green	Dirty green, brown or blackish-green	Greyish-black	Blackish-green to black	Greyish-green	Dirty green	Blackish-violet
Filament width (µm)	15–17	9.8–18.5	10–20	11–14 (18)	(7)10.9–12(14)	20–23	12–17	17–25, \bar{x} = 21
Trichomes width (µm)	14.4–16.8	9.5–18.4	6–12.5	9.5–11.5	(5.5) 8.2–10 (11)	17–18	9–15	12.5–20, \bar{x} = 17
Apical cells Shape	Not attenuated	Not attenuated	Not attenuated	Not attenuated; barreled rounded	Not attenuated	Not attenuated	Not attenuated	Not attenuated on adult trichomes; attenuated on young trichomes
Sheath morphology	Firm, thin, slightly lamellated	Firm, thin, later lamellated	Firm, thin, later lamellated	Thick, finely lamellated	Thin, firm	Thick, lamellated, ornamented	Firm, thin, slightly ornamented	Thin, firm
Sheath color	Colorless, sometimes greyish-yellow	Colorless	Greyish-yellow, sometimes colorless	Colorless to greyish-yellow	Colorless	Colorless	Colorless to greyish-yellow	Colorless
Cell color	Greyish-blue, brown, olive green or violet	Brown, olive green, occasionally violet	Bluish-green or olive green	Violet	Bright green–blue	Dark green–blue	Greyish-green or green–blue	Violet or brown
Heterocytes (µm)	4–19 × 15–16.8	5.4–15.6 × 10–17.6	6.8–15.4 × 10.2–11.2	11–13.5 × 10.5–13	(7)8–10(11.5) × 7–9	3–6 × 17–18	6–17 × 13–14	7–15.5 × 12.5–16.5
Calyptra	Present	Present	–	Absent	–	–	–	Present
Hormogonia growth	–	With basal heterocytes	–	With basal heterocytes and asymmetric growth initially	–	–	–	With basal heterocytes and growth largely asymmetrical

Table 1 Cont.

Characteristics	<i>B. bromeliae</i> ¹	<i>B. octagenarium</i> ²	<i>B. seniae</i> ³	<i>B. roberti-lamii</i> ³	<i>B. epidendron</i> ³	<i>B. ornatum</i> ³	<i>B. terrestre</i> ³	<i>B. tolantongensis</i> ⁴
Hormogonia width (µm)	–	4.8–12.6	–	–	–	–	–	16.2–41.5, x̄ = 23
Ecology	Subaerophytic and epiphytic, on live bromeliad and dead leaves	Epiphytic, on live and dead leaves, stems and buds of <i>Eucalyptus grandis</i>	Subaerophytic, on wet wood, stone or iron,	Aerophytic, on rocks and walls	Subaerophytic, on old wood in humid forests	Subaerophytic, on bark of old trees, among lichens and mosses	Subaerophytic, on occasionally wet rock	Subaerophytic, on walls near runoff
Distribution	Brazil, São Paulo city, Paranapiacaba village	Brazil, Timóteo	Brazil, Paranapiacaba village	Guadeloupe, French Antilles and Los Manantiales, Morelos	Brazil, Paranapiacaba village	Brazil, campos do Jordão	Brazil, São Pedro, Cardoso Island	México, Tolantongo, Hidalgo

growth began at one end (Figs 1 f, 2 d); 4) young filaments had attenuated apical cells (Figs 1 f, 2 e).

A comparison of characteristics used to determine the species of the genus *Brasilonema* are shown in Table 1. We analyzed all species of *Brasilonema*, and the strains from Tolantongo. There are several features that distinguish the populations studied from those of species previously assigned to this genus: 1) filaments and mature trichomes were wider (Table 1); 2) hormogonia were wider than trichomes (Figs 1 c, 2 c); 3) hormogonia and young trichomes had asymmetric growth (Figs 1 f, 2 d); 4) apical cells on hormogonia and young trichomes were attenuated and when a basal heterocyte was observed, only the end opposite to the heterocyte was attenuated (Figs 1 f, 2 d–e).

Life cycle observations

In mature trichomes, meristematic zones were found on apical cells. Apical cells were rounded and sometimes formed calyptras (Figs 1 b, 2 a, e). Cell content was highly granular on the oldest parts of filaments, found at the center (Fig. 1 b).

Hormogonia were formed by fragmentation, generally only at one end of the filament, and almost always by necridic cells. Prior to their release, hormogonia attained a greater width than trichomes (Figs 1 c, 2 c) making filaments heteropolar in this stage of their life cycle. When hormogonia were released, they almost always formed a basal heterocyte (Figs 1 f, 2 d). In culture, we observed that the basal heterocyte of hormogonia could form one or two intercalary heterocytes, followed by fragmentation of heterocytes (Figs 1 f, 2 d).

Meristematic zones of hormogonia were observed at the apical cells, which became attenuated as the cells divided. Cell division initiated growth of hormogonia at one end, particularly in the presence of a basal heterocyte. This asymmetric growth continued until heteropolar young trichomes were formed. Later, the opposite end started to divide and became attenuated causing the middle portion to appear wider than the ends (resembling worms). In the final stages, cells reached normal width and trichomes became isopolar, with the same width throughout the length of the trichome (Figs 1 f, 2 d–e). Young trichomes were commonly curved, resembling the letter “C” or “J” (Figs 1 f, 2 d–e).

Most false branching was formed from

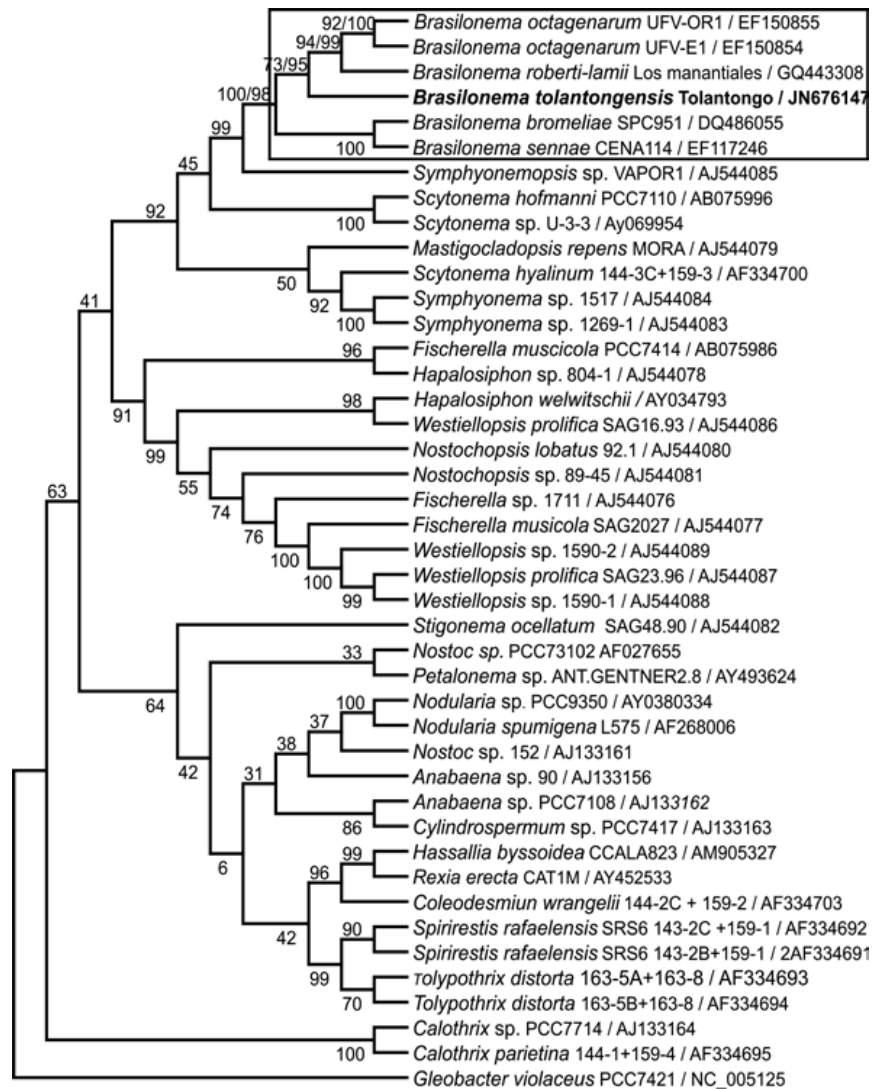


Fig. 3. Phylogenetic tree showing relationships between *Brasilonema* species and cyanobacteria of the same order (Nostocales), based on sequence analyses of the 16S rRNA gene, with *Gloeobacter violaceus* as the external functional group.

the rupture of trichomes between two vegetative cells, generally forming two branches (double branching) (Figs 1 d, 2 b), however single branches were also formed occasionally (single branching). In addition, although less frequently, single branches were formed from hormogonia attached to sheaths (Figs 1 e, 2 f).

Under natural conditions, heterocytes

on trichomes were rarely found. Therefore, observations and photos were made mainly from cultures. Heterocytes were observed as both solitary and intercalary (Figs 1 b, 2 a).

Molecular phylogenetic

The topology of parsimony and likelihood analyses was similar, particularly with reference

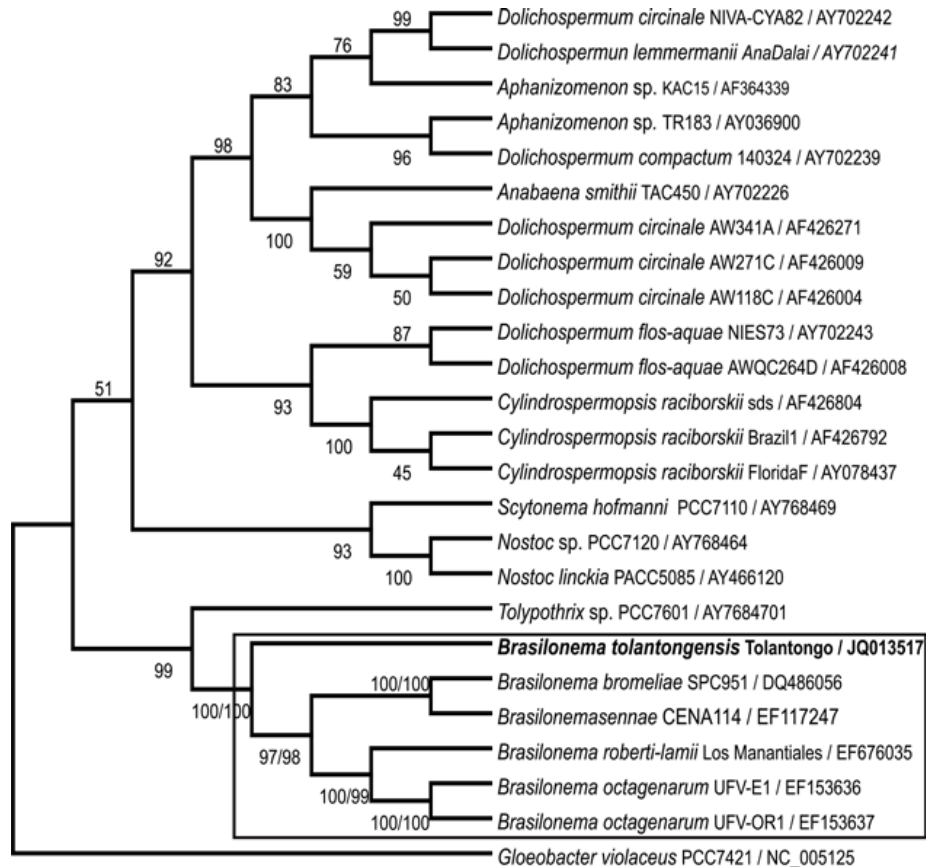


Fig. 4. Phylogenetic tree showing relationships among *Brasilonema* species and cyanobacteria of the same order (Nostocales), based on sequence analyses of the *cpcBA*-IGS gene, with *Gloeobacter violaceus* as the external functional group.

to the clade of the genus *Brasilonema* where the sequence of the strain of Tolantongo is located.

We show the maximum likelihood trees with node support (Figs 3, 4). Node support of the parsimony analysis is presented only for the clade of *Brasilonema*.

Parsimony analyses using 16S rRNA sequences resulted in two trees where branch length (L) was 1290, consistency index (Ci) was 40, and retention index (Ri) was 66. The strict consensus tree had L = 1295, Ci = 40, and Ri = 66. On the other hand, sequence analyses with the *cpcBA*-IGS operon yielded three trees (L=913, Ci=63, Ri=84); where the strict consensus tree had L = 915, Ci=63, and Ri=84.

In both phylogenetic trees, the sequence

of species from Tolantongo was grouped next the other species of *Brasilonema*, with suitable bootstrap values (Figs 3, 4). However, there were some differences between the two markers (Figs 3, 4). In the phylogenetic analyses using 16S rRNA, the sequence studied was included within the clade (Fig. 3), but when the *cpcBA*-IGS region was used the sequence of species from Tolantongo fell outside the clade formed by other species of *Brasilonema*, although they shared a close common ancestor (Fig. 4).

The similarity analysis revealed a 99% identity between *B. tolantongensis* and *B. octagenarum* (Table 2). The next similar strains based on this simple metric were *B. roberti-lamii* (98%), *B. sennae* (98%), *B. bromeliae* (98%)

Table 2. Similarity matrix for 16 strains comparing 43 nucleotide partial sequence of the 16S rRNA gene [Strain access numbers: (1) JN676147, (2) EF150855, (3) GQ443308, (4) EF117246, (5) DQ486055, (6) AJ544085, (7) AJ544079, (8) AJ544084, (9) AF334700, (10) AB075996, (11) AF334693, (12) AY493624, (13) AJ544080, (14) AJ133161, (15) AF334695, (16) AY452533].

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1 <i>Brasilonema tolantongensis</i>	–														
2 <i>Brasilonema octagenarum</i>	99	–													
3 <i>Brasilonema roberti–lamii</i>	98	99	–												
4 <i>Brasilonema sennae</i>	98	97	97	–											
5 <i>Brasilonema bromeliae</i>	98	97	97	99	–										
6 <i>Symphyonemopsis</i> sp.	97	96	96	96	96	–									
7 <i>Mastigocladopsis repens</i>	95	95	94	95	95	95	–								
8 <i>Symphyonema</i> sp.	95	94	94	95	94	94	96	–							
9 <i>Scytonema hyalinum</i>	94	95	95	94	94	94	95	97	–						
10 <i>Scytonema hofmanni</i>	93	93	93	93	93	93	93	93	93	–					
11 <i>Tolypothrix distorta</i>	93	93	92	93	93	94	94	95	93	94	–				
12 <i>Petalonema</i> sp.	93	93	93	93	93	93	94	94	94	93	96	–			
13 <i>Nostochopsis lobatus</i>	94	92	93	93	93	92	92	94	93	91	94	94	–		
14 <i>Nostoc</i> sp.	92	91	92	92	92	93	93	94	92	92	96	94	92	–	
15 <i>Calothrix parietina</i>	92	92	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	91	–
16 <i>Rexia erecta</i>	90	90	90	90	90	91	91	91	90	89	95	92	91	94	90

and *Symphyonemopsis* sp. (97%). All other representative taxa in Table 2 were at or below 95% similarity to our strains.

Discussion

Morphological comparisons between the populations studied and diagnostic characters of *Brasilonema* (FIORE et al. 2007) indicated that our samples correspond with this genus, including: 1) subaerophytic habitat, with organisms always attached to solid and wet substrates (Fig. 1 a); 2) thalli composed of fasciculated filaments, dark in color ranging from violet to blackish–violet, which is within the variability range for *Brasilonema* species (Fig. 1a); 3) rigid sheaths, generally colorless, although sometimes yellowish brown; 4) apical cells rounded and closed until hormogonia were released (Figs 1 b, 2 a); 5) cross walls ranging from not constricted to slightly constricted (Figs 1b, 2a); 6) trichomes isopolar but only in adult filaments not undergoing reproduction (Figs 1 b, 2 a); 7) Vacuole – like structures and granulation in the cells (Figs 1 b, 2 a). All these characteristics are found in all *Brasilonema* species (Table

1) making them critical to defining this genus. Since we identified all of these features in our populations, morphological studies indicate that they do indeed belong to the genus *Brasilonema*. Some important differences in morphology were also observed in comparison to other species described for *Brasilonema* including: 1) substrate type: our populations were attached to rock (Fig. 1 a); *B. terrestre*, *B. roberti–lamii* are also epilithic species, distinguishing them from the most common epiphytic types such as *B. bromeliae*, *B. octagenarum*, *B. epidendron*, *B. ornatum*, and *B. sennae*, which were found in both sets of conditions and also grew on wet iron substrates (Table 1); 2) the fasciculated filaments in the populations from Tolantongo were creeping, a characteristic shared with *B. octagenarum* and *B. ornatum*, and differing from *B. bromeliae*, *B. sennae*, *B. roberti–lamii*, *B. epidendron*, and *B. terrestre* which have erect fascicles (Table 1). In the generic diagnosis, creeping fascicles are not included (FIORE et al. 2007), indicating that the previously described characteristics do not reflect the variety of species regarding the arrangement of fascicles; 3) sheath morphology revealed three characteristics (Table 1): a) thin, non–lamellated

sheaths were found in our populations (Figs 1 b, 2 a), in *B. epidendron* and *B. terrestre*; b) thin sheaths with slightly late lamellation (only in older filaments) were observed in *B. octagenarum*, *B. sennae*, and probably also in *B. bromeliae* (FIORE et al. 2007); c) thick, lamellated sheaths were observed in *B. roberti-lamii* and *B. ornatum*; 4) filaments and trichomes were wider in strain from Tolantongo than in other species. Although filament measurements overlapped with those of *B. octagenarum*, *B. sennae*, and *B. ornatum*, and trichome measurements overlapped with those of *B. bromeliae*, *B. octagenarum*, *B. sennae*, and *B. ornatum*, in both cases the populations from Tolantongo has the largest dimensions (Table 1); 5) hormogonia were wider than trichomes (Figs 1 c, 2 c); to date only the species from Tolantongo has this feature, since it remains unreported for other species (however, hormogonia measurements are not always included in their descriptions); 6) hormogonia and young trichomes had asymmetric growth (Figs 1 f, 2 d); although, we found asymmetric growth described in the observations or descriptions of *B. octagenarum* and *B. roberti-lamii* (AGUIAR et al. 2008; RODARTE et al., unpubl.); it seems that in these species asymmetric growth occurred only during early stages of hormogonia growth, compared to our populations where it continued until young trichomes were formed (Figs 1 f, 2 e); 7) one or both apical cells were attenuated in hormogonia and young trichomes characteristic of this species (Figs 1 f, 2 d).

Morphological analyses of the species from *Brasilonema* showed that our populations had important differences, indicating the discovery of a new species.

In populations from Tolantongo, adult trichomes were generally isopolar, with the exception of those forming hormogonia; these structure were always wider than trichomes and generally grew only on one end (Figs 1 c, 2 c); giving them a heteropolar appearance.

Young trichomes had a highly characteristic shape, resembling the letter "C" or "J", and its early development phases were heteropolar as a result of the asymmetric germination of hormogonia (Figs 1 f, 2 d–e). The germination of hormogonia generally began with the formation of one or two heterocytes; the bond between these was a fragmentation point, which resulted in two hormogonia with basal heterocytes (observations in culture). Later, only the meristematic cells began dividing from one end (that opposite of the

basal heterocyte), and generally this end became attenuated (Figs 1 f, 2 d–e).

KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1989) showed that development of hormogonia is isopolar in the Scytonemataceae family. This isopolarity was defined by the symmetrical germination of hormogonia on both ends. However, germination of hormogonia was asymmetric in the populations we studied. When we consulted the descriptions, observations and images of the species of *Brasilonema* (FIORE et al. 2007; AGUIAR et al. 2008; SANT'ANNA et al. 2011), we found that some species, such as *B. bromeliae* and *B. octagenarum*, showed hormogonia with basal heterocytes, and the end opposite to the heterocyte was slightly attenuated (FIORE et al. 2007; AGUIAR et al. 2008), such as we observed in the strains from Tolantongo. The same observation was made in *B. roberti-lamii*, which RODARTE et al. (unpubl.) interpreted as early asymmetric growth; *B. terrestre*, *B. epidendron* and *B. ornatum* appeared to have symmetrical hormogonia growth during development (SANT'ANNA et al. 2011). In future studies of species from this genus, it will be important to observe how hormogonia develops. Perhaps previously described species should be reevaluated since most descriptions fail to include analysis of this characteristic. A more detailed investigation into the life cycle of all *Brasilonema* species could demonstrate that during the early stages of hormogonia and young trichomes the development may always be asymmetrical.

When describing hormogonial development in our populations, "symmetry" is a better term than "polarity" due to that at the beginning of hormogonia germination are divided the meristematic cells of only one of their ends. This asymmetric division causes the heteropolarity of the young trichomes. Although isopolarity was re-established in mature trichomes, they maintained their asymmetry, in the hormogonia formation that happens only at one end of trichomes.

In light of the above, "polarity" should be applied to only the terminal parts of trichomes. They should be considered isopolar when, they have similar ends and heteropolar when the ends are different, i.e. one with a heterocyte, and the other attenuated or wide. On the other hand, "symmetry" should be applied to describe the development of hormogonia. They should be considered symmetrical if both halves grow exactly the same manner, i.e. hormogonia divided in two equal portions, and asymmetrical if both

halves grow differently, i.e. one portion begins to grow before the other, or one end becomes attenuated while the other does not.

All *Brasilonema* species have intercalary heterocytes on mature trichomes. However, basal heterocytes on hormogonia were also reported in almost all *Brasilonema* species. For this reason, it is very important that features such as the presence of intercalary heterocytes and the polarity of trichomes be associated with the ontogenetic development (life cycle) of the species.

A main difference between *Brasilonema* species, including our populations and the species of other genera of Scytonemataceae, is the shape acquired by young trichomes (FIORE et al. 2007; AGUIAR et al. 2008; SANT' ANNA et al. 2011). Young trichomes were curved, resembling the letter "C" or "J" (Figs 1 f, 2 d, e). This trichome shape apparently contributes to thallus formation because it contributes to maintaining the fascicles of the filaments.

According to FIORE et al. (2007), *Brasilonema* shows two types of branching that we also observed in the populations from Tolantongo: 1) a typical branching formation that is characteristic of the Scytonemataceae family, which forms from the folding of trichome and the interruptions in the trichome between vegetative cells folded, resulting in two parallel branches (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1989; KORELUSOVÁ 2008); 2) a second type of branching, also due to an interruption in the trichome between vegetative cells, but in the absence of folding, where only one branch is formed (Figs 1 d, 2 b). This second type of branching is named as *Tolypothrix*-type by FIORE et al. 2007. However, according to KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS (1989), branching of the *Tolypothrix*-type is formed by an interruption in the trichome between a heterocyte and a vegetative cell, resulting in a single branch.

Regardless of the fact that both branching patterns result in a single branch, these two types of branching patterns (*Brasilonema* and *Tolypothrix*) are clearly different at the ontogenetic level. Furthermore we suggest that the previously identified branching pattern in *Brasilonema* (*Tolypothrix*-type) is incorrect. This observation should not be ignored because *Brasilonema* and *Tolypothrix* KUTZING ex BORNET et FLAHAULT belong to different families that are defined by their type of branching. In Scytonemataceae, branching is between vegetative cells (Figs 1 d, 2 b), while in the *Tolypothrix* family, Microchaetaceae

LEMMERMANN, branching is between heterocytes and vegetative cells (KOMÁREK & ANAGNOSTIDIS 1989).

We observed a third type of false branching in our populations: branches forming when a hormogonium attaches to a filament sheath and begin to germinate (Figs 1 e, 2f); this branching type was described earlier by PANDEY (1974) in *Scytonematopsis*. It appears that this type of branching is also found in other species of *Brasilonema*, including *B. sennae* and *B. terrestre* (SANT' ANNA et al. 2011). In images of *B. roberti-lamii* (SANT' ANNA et al. 2011), there is a branch with a basal heterocyte but was interpreted as tolypotrichoid branching. We consider that this corresponds to the third type of branching, where a hormogonium with a basal heterocyte is attached to the sheath of another filament, and begins to grow by forming a branch. This type of branching was observed in populations of *B. roberti-lamii* in Los Manantiales, in the state of Morelos, México (RODARTE et al., unpubl.).

Molecular phylogenetics (Figs 3, 4) and the similarity analyses (Table 2) were consistent with morphological results and support the hypothesis that the species from Tolantongo belongs to *Brasilonema*, and that it is in fact a new species. In phylogenetic analyses using both 16S rRNA gene and *cpcBA*-IGS sequences, The Tolantongo's strain had a close common ancestor with *Brasilonema* species. The differences observed with these two molecular markers (Figs 3, 4) can be explained by the nature of each one: the 16S rRNA gene is more conserved and it is the most widely accepted for phylogenetic studies which establish relationships between genera or superior taxa (KOMÁREK 2010); whereas the *cpcBA*-IGS region is chosen as a potentially highly variable one, useful for identifying cyanobacteria at the species level, in strains or populations (NEILAN et al. 1995). Therefore, phylogeny using 16S rRNA sequence demonstrated that our species belongs to *Brasilonema*, and phylogeny with the *cpcBA*-IGS sequence demonstrated that it is different from previously described species of this genus, showing it to be a new species.

In conclusion, based on morphological, and molecular analyses we consider that the strain from Tolantongo is a new species, which we name *Brasilonema tolantongensis* based on the name of the site where it was found.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Michele Gold for reviewing the English and their comments to improve the paper, Dr. Esther Berrendero and Biol. Guadalupe Bibriesca for their collaboration in the molecular aspects of this study; Biol. Oscar López Sandoval for his field work contribution; Dr. Helga Ochoterena for her invaluable assistance with phylogenetic analysis; PAPIIT for supporting project No. IN207709; and to The Willi Henning Society for making the software program TNT freely available. Itzel Becerra-Absalón is grateful to the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM for the training and support received during PhD studies and CONACyT for her doctoral scholarship.

References

- ABED, R.M.M.; GARCÍA-PICHEL, F. & HERNÁNDEZ-MARINÉ, M. (2002): Polyphasic characterization of benthic, moderately halophilic, moderately thermophilic cyanobacteria with very thin trichomes and the proposal of *Halomicronema excentricum* gen. nov. sp. nov. – Arch. Microbiol. 177: 361–70.
- AGUIAR, R.; FIORE, M. F.; FRANCO, M. W.; VENTRELLA, M. C.; LORENZINA, A.; VANETTI, C. & ALFENAS, A. C. (2008): A novel epiphytic cyanobacterial species from the genus *Brasilonema* causing damage to *Eucalyptus* leaves. – J. Phycol. 44: 1322–1334.
- ALLEN, M.B. (1968): Simple conditions for growth of unicellular blue–green algae on plates. – J. Phycol. 4: 1–4.
- BOURRELLY, P. & MANGUIN, E. (1952): Algues d'eau douce de la Guadeloupe et dependances recueillies par la Mission P. Allorge en 1936, Société D'Education d'Enseignement Supérieur, Paris.
- CASAMATTA, D.A.; GOMEZ, S.R. & JOHANSEN, J.R. (2006): *Rexia erecta* gen. et sp. nov. and *Capsosira lowei* sp. nov., two newly described cyanobacterial taxa from the Great Smoky Mountains National Park (USA). – Hydrobiologia 561: 13–26.
- CASTENHOLZ, R.W. (2001): Oxygenic photosynthetic bacteria. – In: BOONE, D.R. & CASTENHOLZ, R.W. (eds): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1 2nd ed. – pp. 473 – 600, Springer–Verlag, New York.
- FIORE, M.F.; SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; JOMÁREK, J.; KAŠTOVSKÝ, J.; SULEK, J. & LORENZ, A.S. (2007): The cyanobacterial genus *Brasilonema*, gen. nov., a molecular and phenotypic evaluation. – J. Phycol. 43: 789–98.
- FLECHTNER, V.R.; BOYER, S.L.; JOHANSEN, J.R. & DENOBLE, M.L. (2002): *Spirirestis rafaensis* gen. et sp. nov. (Cyanophyceae), a new cyanobacterial genus from arid soils. – Nova Hedwigia 74: 1–24.
- GOLOBOFF, P.A.; FARRIS, J. S. & NIXON, K. C. (2008): TNT, a free program for phylogenetic analysis. – Cladistics 24: 774–786.
- GUGGER, M.; LYRA, C.; HENRIKSEN, A.; COUTÉ, A.; HUMBERT, J.F. & STIVONE, K. (2002): Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. – Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 1–14.
- GUGGER, M. & HOFFMANN, L. (2004): Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales). – Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 349–357.
- HALL, T.A. (1999): Bioedit: A user–friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. – Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95–98.
- HIGGINS, D.; THOMPSON, J.; GIBSON, T.; THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. & GIBSON, T.J. (1994): Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position–specific gap penalties and weight matrix choice. – Nucleic Acids Res. 22: 4673–4680.
- HROUZEK, P.; VENTURA, S.; LUKEŠOVÁ, A.; MUGNAI, M.A.; TURICCHIA, S. & KOMÁREK, J. (2005): Diversity of soil Nostoc strains: phylogenetic and morphological variability. – Algological Studies (Cyanobact. Res. 6) 117: 251–264.
- KOMÁREK, J. (1989): Studies on the Cyanophytes of Cuba 7–9. – Folia Geobotanica Phytotaxonomica 24: 171–206.
- KOMÁREK, J. (2003a): Problem of the taxonomic category species in cyanobacteria. – Algological Studies (Cyanobact. Res. 4) 109: 247–345.
- KOMÁREK, J. (2003b): Two *Camptylonomopsis* species (Cyanoprokaryotes) from Mata Atlántica in coastal Brazil. – Preslia 75: 223–232.
- KOMÁREK, J. (2006): Cyanobacterial taxonomy: Current Problems and prospects for the integration of traditional and molecular approaches. – Algae 21: 349–375.
- KOMÁREK, J. (2010): Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). – Hydrobiologia 639: 245–259.
- KOMÁREK, J. (2011): Introduction to the 18th IAC Symposium in České Budějovice 2010, Czech Republic. Some current problems of modern cyanobacterial taxonomy. – Fottea 11:1–7.
- KOMÁREK, J. & ANAGNOSTIDIS, K. (1989): Modern approach to the classification system of cyanophytes 4 – Nostocales. – Algological Studies 56: 247–345.
- KORELUSOVÁ, J. (2008): Phylogeny of heterocytous Cyanobacteria (Nostocales and Stigonematales. – 33 pp., University of South Bohemia in Ceske

- Budejovice Faculty of Science.
- MONTEJANO G.; RODARTE, B.; LEÓN–TEJERA, H.; OSORIO, K.; ALBA–LOIS, L.; BECERRA, I. & SEGAL, C. (2010): Diversity of species of Scytonemataceae (Nostocales, Cyanoprokaryota) from different biotopes in Central Mexico. – In KOMÁREK, J.; HAUER, T. & KAŠTOVSKÝ, J. (eds): Book of abstracts, 18th symposium of the International Association for Cyanophyta Research. –27 pp., Institute of Botany the Academy of Science of the Czech Republic, Zámek 1, Průhonice, Czech Republic.
- NEILAN, B.; JACOBS, D. & GOODMAN, E.A. (1995): Genetic Diversity and Phylogeny of Toxic Cyanobacteria Determined by DNA Polymorphisms within the Phycocyanin Locus. – *Appl. Environm. Microbiol.* 61: 3875–3883
- NEILAN, B.A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L.L.; HAWKINS, P.R.; COX, P.T. & GOODMAN, A.E. (1997): rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. – *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 693–697.
- NIXON, K.C. (2002): Winclada Ver. 1.00.08, Published by the autor, Ithaca, NY.
- NÜBEL, U.; GARCÍA–PICHEL, F. & MUYZER, G. (1997): PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. – *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3327–3332.
- PALINSKA, K.A.; THOMASIUŠ, C.F.; MARQUARDT, J. & GOLUBIĆ, S. (2006): Phylogenetic evaluation of cyanobacteria preserved as historic herbarium exsiccate. – *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2253–2263.
- PANDEY, D.C. (1974): Observations on Reproduction in *Scytonematopsis ghazipurensis* Pandey & Mitra. – *Hydrobiologia* 44: 365–367.
- RAJANIEMI, P.; KOMÁREK, J.; HOFFMANN, L.; HROUZEK, P.; KAŠTOVSKÁ, K. & SIVONEN, K. (2005): Taxonomic consequences from the combined molecular and phenotype evaluation of selected *Anabaena* and *Aphanizomenon* strains. – *Algological Studies* 117: 371–91.
- SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; FIORE, M.F.; LORENZI, A.S.; KAŠTOVSKÝ, J. & KOMÁREK, J. (2011): Subgeneric diversity of *Brasilonema* (Cyanobacteria, Scytonemataceae). – *Revista Brasil. Bot.* 34: 51–62.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M & KUMAR, S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. – *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- VACCARINO, M.A. & JOHANSEN, J.R. (2011): *Scytonematopsis contorta* sp. nov. A new species from the Hawaiian Islands. – *Fottea*. 11: 149–161.
- WILLAME, R.; BOUTTE, C.; GRUBISIC, S.; WILMOTTE, A.; KOMÁREK, J. & HOFFMAN, L. (2006): Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg. – *J. Phycol.* 42: 1312 – 1332.

© Czech Phycological Society (2013)

Received February 29, 2012

Accepted October 10, 2012

{ 98 }



La matriz consta de 269 taxa y 499 caracteres potencialmente informativos (de la base 1 a la 445 los caracteres son nucleótidos, A-verde, T-rojo, C-azul, G-amarillo y de la base 446 a la 489 los caracteres son presencia-azul y ausencia-verde de gaps, reversiones y duplicaciones).



{ 100 }



