

Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores Iztacala



Caracterización morfológica y de compuestos fenólicos del
género *Mougeotia* (Charophyta) del Nevado de Toluca,
Estado de México



TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

Monserath Flores Calzada

DIRECTORA DE TESIS

M. en C. Gloria Garduño Solórzano

2016

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta investigación se realizó en diferentes laboratorios de la UNAM, entre ellos el herbario IZTA, UBIPRO e Instituto de Fisiología Celular. Esfuerzos mancomunados con la excelente colaboración del Programa para la Recuperación y Manejo Sustentable del Nevado de Toluca a cargo del Lic. Ignacio Pichardo Pagaza. Bajo la coordinación general del Biol. Rubén López Cano y colaboración especial del geógrafo Sergio Guadarrama Martínez por los mapas incluidos. Así mismo contó con el apoyo de la Comisión Estatal de Parques Naturales y de la Fauna (CEPANAF) a cargo de la Lic. Ana Sofía Manzur García Maass y de la Dirección del Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca (CONANP) a cargo del Biól. Luis Miguel Mandujano, por lo cual agradecemos ampliamente las gestiones administrativas para el mismo. Al Director General de ICAMEX, Ing. Pedro Mijares Oviedo, y su equipo Mtra. María Guadalupe González Castorena, Téc. Victoria Pulido Reyes y Téc. Dalia Benítez López por los análisis de algunas variables físico químicas del agua, que complementan la información integrada con la ficoflora estudiada.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero mencionar a Dios, por haberme acompañado y guiado a lo largo de este camino, por ser mi fortaleza en los instantes de angustia y debilidad, por brindarme lo necesario para cumplir lo que en un “momento” fue una ilusión y hoy es una realidad. Agradezco por todo lo bueno y malo que me ha dado, y pido por un buen futuro.

A mis queridos padres: con un gran sentimiento de gratitud, amor y admiración, por los esfuerzos realizados para lograr terminar mi carrera profesional, siendo para mí la mejor herencia.

A mi madre, que es el ser más maravilloso del mundo. Gracias por todo tu cariño y amor; así como el apoyo brindado incondicionalmente. Sin olvidar la comprensión, la educación y por guiar mi camino en todo momento de mi vida.

A mi padre, con respeto porque me ha dado cuanto ha estado en sus manos. Esto ha hecho que sea lo que soy.

De la misma manera a toda mi familia: abuelos, tíos y primos: ya que ustedes han contribuido con su granito de arena a este logro, no tengo palabras para cada uno de ustedes, por todo lo que me han dado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), que fue mi segundo hogar durante ocho años, desde mi ingreso al CCH y posteriormente en la licenciatura en la FES Iztacala.

A la M. en C. Gloria Garduño Solórzano por la oportunidad de ser un integrante de su equipo, por todos sus esfuerzos y tiempo invertido en mi formación; sobre todo por la paciencia. También sus atinadas observaciones que han contribuido para mi formación personal. Sólo me resta expresar el gran aprecio, admiración y respeto que le tengo.

A los profesores Dra. Martha Martínez García, Dr. Hugo Virgilio Perales Vera, M. en C. Luis Barbo Hernández Portillo y M. en C. Marisol Avila Romero por las aportaciones y sugerencias recibidas, así como por el tiempo, materiales y espacio en sus áreas de trabajo en donde desarrolle este trabajo. En especial para la Dra. Martha por compartir su conocimiento, regalarme de su tiempo y sobre todo de su paciencia y comprensión; por estar en el momento exacto y decir lo correcto. No queda más que mencionarle lo mucho que la quiero y admiro.

A los profesores que me auxiliaron en el trabajo de microscopía electrónica; Al M. en C. Rafael Quintanar Zúñiga de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES Iztacala y al Dr. Rodolfo Paredes de Instituto de Fisiología Celular. Asimismo, al M. en C. Héctor Barrera Escorcia por la ayuda en la interpretación de las imágenes de MET. Así como Dr. Gerardo García García y Dr. Eberto Novelo por su experiencia y referencias compartidas.

A todas mis amistades, en especial a: Dianita, Ivonne, Armando y Celina por la paciencia, tolerancia en esos momentos difíciles. Así como el abrazo y palabras de aliento cuando fueron necesarias.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
OBJETIVOS	5
ÁREA DE ESTUDIO	6
MATERIALES Y MÉTODOS	8
1. Trabajo de campo	8
1.1. Parámetros fisicoquímicos	8
2. Trabajo de laboratorio	8
2.1. Cultivo	8
2.2. Microscopia Óptica y Electrónica	9
2.2.1.1. Microscopia Electrónica de Barrido	9
2.2.1.2. Microscopia Electrónica de Transmisión	9
2.3. Extracción de pigmentos	9
2.4. HPLC	9
2.5. Análisis de fenoles totales y actividad antioxidante	10
2.6. Análisis de Correspondencia Canónica	11
RESULTADOS	12
1. Parámetros fisicoquímicos	12
2. Determinación taxonómica	12
3. Microscopia Electrónica de Transmisión	17
4. Pigmentos	21
5. Cuantificación de Fenoles Totales	22
6. Actividad antioxidante	23
7. Análisis de variables físico-químicas vs. población de <i>Mougeotia</i>	23
DISCUSIÓN	24
1. Análisis de variables ambientales	24
2. Morfología y ultraestructura	27
3. Pigmentos	29
4. Funciones y fuentes de taninos hidrolizables	31
CONCLUSIONES	32
REFERENCIAS	33

INDICE DE TABLAS, FIGURAS Y ABREVIATURAS

Tabla 1. Matriz de variables limnológicas del área de estudio a lo largo del periodo septiembre 2012 a octubre 2015.	13
Tabla 2. Caracteres vegetativos y reproductivos de <i>M. capucina</i> de dos poblaciones: campo y cultivada.	15
Fig. 1. Registro de área y perímetro de la Laguna La Luna, durante el periodo 2013-2015	7
Fig. 2. Imágenes de ML de <i>M. capucina</i> , en cultivo	14
Fig. 3. Conjugación escaleriforme de <i>M. capucina</i>	16
Fig. 4. Micrografías a MEB de muestras de cultivo de <i>M. capucina</i>	17
Fig. 5. Imágenes de ML de <i>M. capucina</i> en cultivo	18
Fig. 6. Micrografías a MET de <i>M. capucina</i> , morfo morado	19
Fig. 7. Micrografías a MET de <i>M. capucina</i> , morfo verde	20
Fig. 8. Cromatograma (663 nm) del extracto lipofílico de <i>M. capucina</i> , morfo morado	21
Fig. 9. Cromatograma (445 nm) del extracto lipofílico de <i>M. capucina</i> , morfo morado	21
Fig. 10. Cromatograma (280 nm) del extracto hidrofílico (20% metanol) de <i>M. capucina</i> , morfo morado	22
Fig. 11. Cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de <i>M. capucina</i> , morfo morado	22
Fig. 12. Análisis de Correspondencia Canónica	23

ACC	Análisis de Correspondencia Canónica	MET	Microscopia Electrónica de Transmisión
CA₅₀	Capacidad antioxidante media	ML	Microscopia Óptica
DPPH	Difenil picril hidracilo	Na₂CO₃	Carbonato de sodio
ERO	Especies reactivas de oxígeno	PAR	Radiación fotosintéticamente activa
FC	Folin-Ciocalteu	RUV	Radiación ultravioleta (200-400nm)
HEAT	Hexano-Etano-Acetona-Tolueno	RUV-A	Radiación ultravioleta A (320-400nm)
IUV	Indice de ultravioleta	RUV-B	Radiación ultravioleta B (280-320nm)
MEB	Microscopia Electrónica de Barrido	RUV-C	Radiación ultravioleta C (200-280nm)

RESUMEN

El género *Mougeotia* en México, sólo tiene tres especies citadas en los últimos 36 años de exploraciones ficológicas del país, sin datos sobre la ecología y ultraestructura. Por lo tanto el objetivo de este trabajo fue caracterizar las poblaciones de campo (morfo morado) y de cultivo (morfo verde), a partir del florecimiento de filamentos filamentosos bentónicos de la laguna La Luna, localizada en el Área de Protección de Flora y Fauna Nevado de Toluca, México. Por lo cual se describió la morfología celular a través de observaciones al microscopio óptico, de barrido y de transmisión. Además se registraron 14 variables ambientales a lo largo del estudio. Asimismo se cuantificó el contenido de pigmentos por HPLC del morfo morado, estos últimos se analizaron con pruebas de fenoles totales y actividad antioxidante. Nuestros resultados indican que las características morfológicas de los morfos morado y verde corresponden a *Mougeotia capucina*. Con base en los registros de cobertura, mayores al 50% durante el periodo de estudio, este taxón conformó un florecimiento algal en el área de estudio. La ultraestructura del morfo morado, mostró numerosas vacuolas en la periferia de la célula; en contraste, el morfo verde tenía vacuolas pequeñas. Los pigmentos mostraron diecisiete compuestos; resaltando luteína, β -caroteno y zeaxantina. Para el caso de los compuestos fenólicos, se indicó la presencia de nueve picos con absorción entre RUV-C y RUV-B. Probablemente la función de estos pigmentos es contribuir a la protección del organismo contra el aumento de la RUV y la luz visible. La cuantificación de fenoles totales fue de 18 μg de equivalente de ácido gálico/mg de extracto sin actividad antioxidante. El análisis de correspondencia canónica indicó que el florecimiento de *M. capucina* está relacionado con condiciones limnológicas en un ambiente bien oxigenado, con pH ácido y oligotrófico.

Palabras clave: Lagos de alta montaña, *Mougeotia capucina*, fotoprotección, metabolitos secundarios, ultraestructura.

INTRODUCCIÓN

Los ambientes lénticos localizados por encima del límite de crecimiento arbóreo son nombrados lagos de alta montaña o alpinos; estos se encuentran sometidos a elevadas altitudes, baja temperatura, pH ácido y pocos nutrientes. También el fotoperiodo y RUV, definen las características limnológicas, sumado al particular metabolismo de los productores primarios que ahí se desarrollan (Castillo *et al.*, 1989; Sommaruga, 2001; Delgado, 2008). Por ejemplo, Aigner *et al.* (2013) describieron diferentes morfos del fitobentos constituido de *Zygogonium ericetorum* de poblaciones de Austria, donde reconocen que la RUV genera organismos de color morado.

Asimismo, los productores primarios han desarrollado diversas estrategias para minimizar, evitar y neutralizar los efectos deletéreos de la RUV a través de varios mecanismos de fotoprotección, entre los que se encuentran, la síntesis de la esporopolenina, componente de la pared celular en *Scenedesmus* y *Pediastrum* (Chlorophyceae) la cual protege de la RUV-B y RUV-A, la Scytonemina, localizada en la vaina de algunas cianobacterias, la cual funciona como pantalla en longitudes de onda de 280-450 nm. También, los florotaninos, encontrados en fisoides de Phaeophyceae. Otros compuestos que absorben la RUV son los aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) y cumarinas descritas en cianobacterias, Rhodophyta, Dinophyta, Cryptophyta y Chrysophyceae (Holzinger y Lütz, 2006; Pichrtová *et al.*, 2013).

En México la topografía y las zonas biogeográficas (Neártica y Neotropical), han permitido la formación de una gran variedad de ambientes. Por ejemplo, El eje Neovolcánico corresponde a la barrera geográfica donde se separan de estas dos zonas y se localizan las montañas más altas del país, entre ellas el volcán Nevado de Toluca con 4,690 m en cuyo interior alberga dos lagunas de alta montaña, “El Sol y La Luna”, las más altas de Norteamérica (Banderas-Tarabay y González-Villela, 2002; Pichardo-Pagaza, 2015).

En la zona fótica de ambientes lénticos se desarrolla una comunidad conocida como fitobentos, con base de la naturaleza física del sustrato, son nombrados: haptobentos, epilíton, epifíton, endolíton y metafíton (Round, 1981). Esta última corresponde a la comunidad que carece de estructuras de adhesión y está representada en la laguna, La Luna, por algas verdes filamentosas del género *Mougeotia* Agardh, C. A (1824) que forma tapetes de color morado (Delgado, 2008). Graham *et al.* (1996a) mencionan que los florecimientos de este género son debidos a la precipitación de la lluvia ácida que afecta los sistemas acuáticos, siendo más común encontrarlos en aguas ácidas de Europa y

Norte América. En México se han citado tres especies: *Mougeotia scalaris*, *M. transeui* y *M. viridis* en el Estado de México e Hidalgo respectivamente en lagunas y charcos (Kennedy y Hoshaw, 1978; Ortega, 1984). En ninguna de las referencias, se indicó algún florecimiento de estos recursos.

La radiación electromagnética emitida por el Sol que llega a la Tierra se divide dependiendo de su longitud de onda, de las más cortas a las más largas en: rayos gamma, rayos X, luz ultravioleta (200-400nm), luz visible (400-760 nm), rayos infrarrojos (760 nm), microondas y las de radio. En referencia a la luz ultravioleta esta se divide en tres categorías: UV-A de 320-400 nm, UV-B de 280-320 nm y UV-C longitudes de menos de 280 nm. El tipo de radiación solar que llega a la superficie terrestre principalmente comprende longitudes de onda por encima de los 300 nm, por tanto se recibe luz ultravioleta, visible e infrarroja. La magnitud que mide la radiación solar que llega a la Tierra se conoce como irradiancia (Fligge *et al.*, 2001).

La intensidad de la RUV varía según la altitud, la latitud, las estaciones del año y la hora del día. En el país, llega una alta incidencia en la mayoría de su territorio, en particular en las zonas altas, donde la capa de ozono es menor, lo que provoca un incremento de RUV entre un 8 a 10% por cada 304.8 m de altura (Nehal y Lim, 1995). Para el Nevado de Toluca, el IUV es superior a 10, irradiancia que pasan a través de la columna de agua hasta al hipolimnion durante todo el año (Luna *et al.*, 2009). En contraste, con el volcán Lincancabur a 5,916 msnm y la laguna Blanca, 4,340 m en Bolivia donde se han registrado los niveles más altos de RUV en el mundo con un IUV de 43 (Delgado, 2008; Cabrol *et al.*, 2014).

La RUV daña las macromoléculas como el ADN, los lípidos y las proteínas de todos los seres vivos. Por ello algunos organismos, tienen la habilidad de producir compuestos capaces de absorber la RUV, antioxidantes, o desarrollar sistemas de reparación del ADN (Björn *et al.*, 2002). Los primeros, son producidos por compuestos cromóforos, como las micosporinas (MAAs), los cuales disminuyen la cantidad de radiación que reciben cianobacterias, algas y líquenes, entre otros organismos. Las plantas superiores, presentan compuestos fenólicos como flavonoides y fenilpropanoides, que se acumulan en vacuolas para actuar como filtros selectivos de la RUV (Oren y Gunde-Cimerman, 2007).

La RUV produce un incremento en el nivel de ERO que incluyen el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo y el oxígeno singulete (O_2). Las ERO tienen la capacidad de reaccionar con diversas biomoléculas causando una alteración en su función celular generando un estado de estrés oxidativo que conlleva daños celulares como la oxidación de las bases nitrogenadas, rompimiento y entrecruzamiento del ADN, la peroxidación de lípidos de las membranas celulares y la oxidación de proteínas (Carrillo *et al.*, 2008; Lavery, 2009; Pichrtová *et al.*, 2013).

La absorción de fotones de RUV por el ADN favorece la formación de dímeros de pirimidinas (DCP) que se forman por la interacción covalente de dos pirimidinas adyacentes en la misma cadena. También se crean pirimidin-piromidona 6-4 (6-4PP). Estos fotoproductos son mutagénicos e impiden la transcripción y replicación del ADN (Black *et al.*, 1997). La reparación del ADN se logra por escisión o por fotoreactivación. La escisión de nucleótidos de una sola base o una cadena de nucleótidos requieren en principio la ruptura del enlace fosfodiéster a cada lado de la zona dañada mediante endonucleasas, posteriormente la polimerasa sintetiza un nuevo fragmento y con ligasas se une el nuevo fragmento. En la fotoreactivación, las fotoliasas, revierte la dimerización de las bases nitrogenadas a la forma nativa (García, 2010).

La importancia de las comunidades del fitoplancton y fitobentos radica en que son la base de la red trófica, las cuales producen oxígeno, pigmentos y otros compuestos de valor agregado; así como, son buenos indicadores biológicos. Publicaciones, del género *Mougeotia* spp. indican su uso en la producción de carotenoides y luteína como compuestos antioxidantes (Muntean *et al.* 2007). También, Al-Mayaly (2011) comprobó la remoción de plomo en agua contaminada.

ANTECEDENTES

Investigaciones sobre aspectos ecofisiológicos y el ciclo de vida de las Zygnemataceae han sido poco desarrolladas en el mundo; en laboratorios de India, Estados Unidos de Norteamérica y Austria se han investigado la producción de morfos de diferente color así como la estructura química de estos compuestos fenólicos, sumado a conocer las condiciones ambientales y de cultivo que provocan los diferentes morfos.

Randhawa (1959) mencionó que algunas Zygnemataceae son capaces de producir compuestos de ficoporfirinas, por ejemplo en los morfos de color púrpura de *Zygonium ericetorum* y *Zygnema terrestre*. Por su parte, en Estados Unidos de Norteamérica Ralph

(1962) señaló que *Mougeotia capucina* y otras *taxa* de Zygnemataceae presentan en vacuolas compuestos de hierro y taninos que conforman pigmentos de color azul-morado y rojo-morado. También, Kennedy y Hoshaw (1978) investigaron el ciclo de vida de *Mougeotia transeaii*, donde describen las aplanosporas y zigospora del taxón. Así como, Graham *et al.*, (1996b) describen los efectos en el crecimiento de *Mougeotia* bajo diferentes pH y concentraciones de Al y Zn.

Holzinger *et al.* (2010) muestran que poblaciones de *Z. ericetorum* de Australia, crece en masas de color verde sobre el suelo; las cuales al ser expuestas al sol se tornan púrpuras; hecho que causo debate sobre la naturaleza y el papel de este pigmento. Remias *et al.* (2012) investigaron los pigmentos pardos de las poblaciones extremófilas sobre glaciares de *Mesotaenium berggrenii*; donde el principal compuesto fue el fenol purpurogalina-carboxílico ácido 6-O-β-D-glucopyranósida. Aigner *et al.* (2013) estudiaron dos morfotipos de *Z. ericetorum* en un arroyo. Estos diferían en su coloración (verde-morado), el último con fenoles y taninos hidrolizables, quienes podrían contribuir en la protección contra los rayos UV y la irradiación.

Para el área de estudio se han evaluado los cambios climáticos en relación a los fósiles, diatomeas y otros grupos taxonómicos (Caballero, 1996; Vilaclara *et al.*, 2005; Cuna *et al.*, 2014). Delgado (2008) reconoció por primera vez un florecimiento de *Mougeotia* spp. de color morado en el litoral de la laguna La Luna. El presente estudio señala las características de poblaciones de campo y cultivadas de *Mougeotia* mediante observaciones en ML, MEB y MET, así mismo se cuantificaron los pigmentos del morfo morado de la población de campo y se asocian las variables físico-químicas con el del florecimiento registrado.

OBJETIVOS

General. Contrastar taxonómicamente las poblaciones campo y de cultivo del género *Mougeotia* de la laguna La Luna, Nevado de Toluca, utilizando herramientas morfológicas, ecológicas y químicas.

Particulares. Obtener cultivos monoalgales del género *Mougeotia* para describir los caracteres morfológicos, de ultraestructura y de reproducción; que permitan la delimitación taxonómica específica.

Determinar los pigmentos del morfo morado en *Mougeotia* de la población de campo de la laguna La Luna, Nevado de Toluca.

Asociar la relación de las variables físico-químicas determinadas con el florecimiento algal en estudio.

ÁREA DE ESTUDIO

El Parque Nacional Nevado de Toluca (PNNT), alberga al volcán inactivo Nevado de Toluca o Xinantécatl (cuyo vocablo náhuatl significa “Hombre desnudo”); es considerado el cuarto volcán más grande de México. En una extensión de 51,000 hectáreas; se localiza en la Faja Volcánica Transmexicana.

El PNNT, de 1936-2015 fue catalogado como Parque Nacional, después de un estudio justificativo se logró recategorizado en 2015, como Área Natural Protegida (ANP), es un territorio con una actividad tectovolcánica que no ha sido homogénea, lo que implica la conformación de diferentes geofomas como: lavas andesíticas, domos y conos volcánicos (Pichardo-Pagaza, 2015).

El clima en la zona alpina es frío, con lluvias en verano y una precipitación total anual de 1, 227 mm. En el ANP, el 71.4% corresponde a diferentes tipos de bosque donde crecen principalmente *Pinus hartwegii*, *P. ayacahuite*, *P. pseudostrobus*, *P. moctezumae* y *Abies religiosa*. Arriba de los 4,200 m sobresale el pastizal de alta montaña y páramo de altura. La Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO (2014), indicó 288 especies de flora, 353 hongos en el área mencionada. Mientras 97 especies de algas, corresponden a la ficoflora conocida de la laguna del El Sol (Caballero, 1996; Delgado, 2008; Luna *et al.*, 2009, Pichardo-Pagaza 2015).

Se han encontrado huellas de glaciaciones ocurridas hace más de 32,000 años, de 11,500 años y la más reciente entre 2,000 y 3,500 años (Neoglaciación). Evidencias de que existieron glaciares rocosos activos en la Pequeña edad de Hielo de los siglos XV y XIX (Vazqu ez-Selem y Heine, 2004). Sin embargo, se sabe con mayor certeza que presentarán glaciares verdaderos hace más de 8 mil años (cuando se registró una nueva expansión de los hielos, los cuales se fund an un poco por debajo de los bordes del cráter, es decir, a una altitud de 4,100 a 4,200 m. Los lagos del cráter son producto de la fusión de un casquete de hielo que ocupó su fondo después de la formación de “El Ombligo”, una estructura d mica ubicada en el centro del mismo, la cual presenta microestr as por pulimiento del hielo. Entonces el espesor del manto glacial debió exceder los 150 m (Vazqu ez-Selem, 2009).

El cráter del volcán se ubica entre 4,200 a 4,680 m, es de origen Cuaternario, la morfología actual data de 60,000 años y en ella se localizan dos lagunas perennes y astáticas “El Sol y La Luna” (Luna *et al.*, 2009, Pichardo-Pagaza, 2015, García-Palomo *et al.*, 2000).

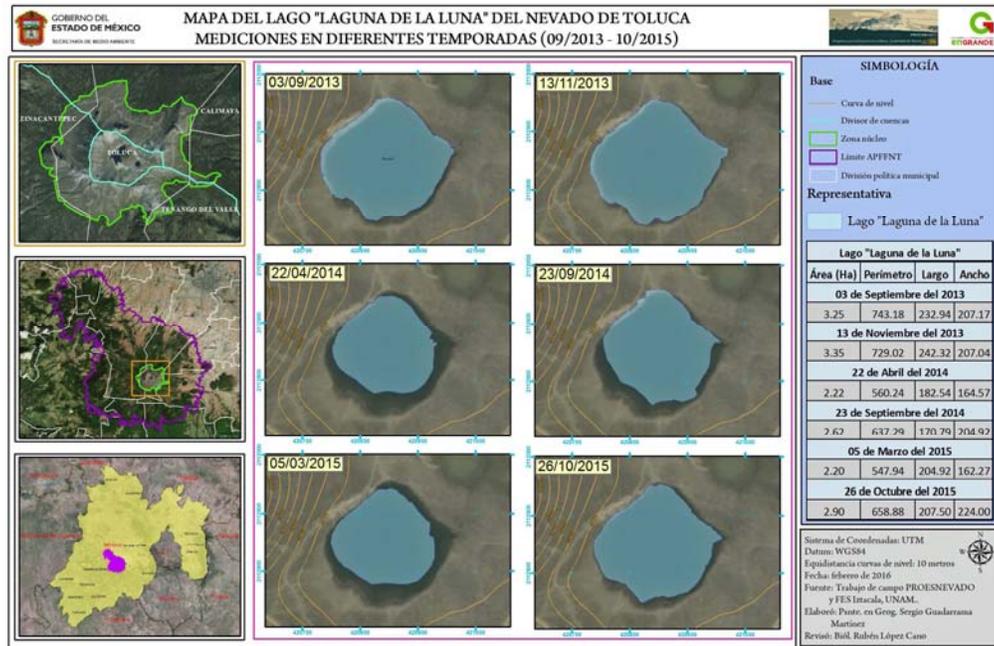


Fig. 1. Registro de área y perímetro de la Laguna La Luna, durante el periodo 2013-2015.

Para la laguna La Luna, se actualizan las siguientes características: longitud máxima (170 a 242 m) WSW-ENE, ancho máximo (224 m), área superficial de 2,20 a 3,25 Ha y perímetro de 548 a 744 m (Comisión Nevado, 2016). Con un volumen de 160 mil m³, profundidad máxima de 10 m, temperatura $8.8 \pm 1.7^{\circ}\text{C}$, oxígeno disuelto 6.9 mg l^{-1} , conductividad $6.2 \pm 2.7 \mu\text{S cm}$, pH 5.4 ± 0.7 , profundidad de disco de Secchi 8.4 ± 1.8 (Alcocer *et al.*, 2004). Armienta *et al.*, (2000) registraron bicarbonatos $2.3 \pm 0.5 \text{ mg l}^{-1}$, sulfatos 1.4 mg l^{-1} , cloruros 1.3 mg l^{-1} , calcio 2.0 mg l^{-1} , magnesio 0.6 mg l^{-1} , sodio 1.0 mg l^{-1} y potasio 0.5 mg l^{-1} . Por su parte, Flores *et al.*, (2008) indicaron NH_4 $2.79 \pm 1.53 \mu\text{mol l}^{-1}$, NO_2 $0.05 \pm 0.05 \mu\text{mol l}^{-1}$, NO_3 $22.6 \pm 2.4 \mu\text{mol l}^{-1}$, PO_4 $0.13 \pm 0.15 \mu\text{mol l}^{-1}$ y Si-SiO_4 $0.62 \pm 1.0 \mu\text{mol l}^{-1}$, por lo que se asocian en un ambiente oligotrófico. Los sedimentos varían en diámetro, los más gruesos y pesados se localizan cerca de la línea de costa y las arenas en otras zonas de la cuenca (Alcocer, 1980; Luna *et al.*, 2009).

MATERIALES Y METODOS

Trabajo de Campo. El material biológico se colectó en cuatro exploraciones: 17 de enero y 23 de septiembre del 2014, 5 de marzo y 27 de octubre del 2015. Para el muestreo (n=10) se utilizó un área de 24 cm² cerca de la línea de costa (Bojorge-Garcia *et al.*, 2014). El material se colocó en frascos de boca ancha con agua del sitio, mismos que se etiquetaron y se transportaron en contenedores en baja temperatura al laboratorio.

Parámetros fisicoquímicos. En cada muestreo las variables fueron registradas *in situ*, la temperatura con un termómetro de mercurio, marca Brannan, el pH registrado con un potenciómetro Conductronic, las coordenadas geográficas con el GPS Maguellan modelo Meridian. La profundidad con una sondaleza marca Speedtech. La concentración de oxígeno disuelto, la alcalinidad y dureza total fue determinada por titulometría (Franco *et al.*, 1985). Los nitratos y fosfatos fueron cuantificados mediante las técnicas de Nessler, reducción de cadmio y método de molibdovanato respectivamente utilizando un fotómetro marca HANNA instruments.

La intensidad lumínica, medida con un luxómetro marca Hansatech, solo el 23 de septiembre del 2014.

Paralelamente, la conductividad, bicarbonatos, calcio, cloruros, potasio, sulfatos, sodio, amonio, fueron cuantificados por el laboratorio de ICAMEX del Estado de México a cargo de la Mtra. María Guadalupe González Castorena.

Además de los datos de los muestreos de este trabajo, se agregan la información de los periodos 2012 y 2013, previamente evaluados por el Programa para la Recuperación y Manejo Sustentable del Nevado de Toluca, coordinado por el Biol. Lopez Cano.

Trabajo de Laboratorio. Con el material biológico colectado, en principio se eliminó la materia orgánica, de forma mecánica utilizando un microscopio estéreo y pinzas de punta fina. Posteriormente, se fraccionó en tres porciones; una de ellas se utilizó para el cultivo, otra para las observaciones microscópicas correspondientes y la última, para el desarrollo de las técnicas por HPLC, fenoles totales y actividad antioxidante.

Cultivo. En principio se lavó con carbón activado y agua destilada el material biológico (Andersen, 2005). Posteriormente se realizaron inóculos con algunos filamentos de *Mougeotia* en medio extracto de suelo utilizando un matraz Erlenmeyer de 1000 mL. El

cultivo se mantuvo en una cámara de cultivo con 18°C, 50 lux, en un ciclo 12:12 luz: oscuridad (Kennedy y Hoshaw, 1978).

Microscopia Óptica (ML) y Electrónica (MEB y MET). Se registraron los caracteres morfológicos de poblaciones de campo (morfo morado) preservadas en formol al 4% y filamentos en cultivo (morfo verde) en microscopia óptica (ML) marca Nikon YS2-T apoyándose en capturar imágenes en formato jpg, con una cámara digital Sony de 20.0 megapíxeles (Prescott, 1951; Randhawa, 1959; Brook y Johnson, 2002). Mismos que también se tiñeron con azul de cresil (Kumar y Sing, 1979). El material estudiado fue depositado en la colección ficológica del herbario IZTA 1886, 1887, 1888, 1889, 1890, 1891 y 1892.

Microscopia electrónica de Barrido. Los filamentos con zigosporas, se montaron sobre una cinta de doble cara y se cubrió con oro en un equipo Emitech k550 (Boltovskoy, 1976) para su observación en el equipo JEOL modelo JSM6380LV, localizado en el laboratorio de Fisiología Vegetal de la UBIPRO en la FES Iztacala, UNAM.

Microscopia electrónica de Transmisión. Cada uno de los morfos de campo (morado) y de cultivo (verde) fueron preservados con glutaraldehído al 2% posteriormente, se hizo una post-fijación en OsO₄ al 1%, seguido de un tren de deshidratación en etanol de 30-100% a 4°C. Más tarde, las muestras se transfirieron vía oxido de propileno al 100% para posteriormente hacer la infiltración en epon-óxido de propileno (1-1) durante 48 h; seguido de una inclusión epom freico y polimerización a 60°C por 48h (Holzinger *et al.*, 2010). Con estos bloques se realizaron cortes con un ultramicrotomo marca Leica de 5 µm de grosor y se observaron con el equipo marca JEOL modelo JEM 12000 EX II, localizado en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Extracción de pigmentos. A partir del morfo morado suspendido en agua del sitio, se eliminó el exceso de agua, se congelo inmediatamente y liofilizó por 48 h hasta secarse completamente. Con 50 g muestra se pulverizó con 10 mL de HEAT. Para mejorar la extracción de los compuestos se sónico por 15 min a temperatura ambiente y luego se diluyó 1:1 con 20% metanol. La suspensión se mezcló con un agitador orbital por 10 min a 2000 rpm y se enfrió en un congelador toda la noche a -20°C como resultado se obtuvo la separación de dos fases: la lipofílica (flotante) y la hidrofílica (Aigner *et al.*, 2013).

HPLC. El extracto lipofílico e hidrofílico se analizó separadamente usando diferentes métodos. La fase lipofílica (clorofilas y carotenoides) se evaporó y se suspendió con 500

μL de hexano y se agitó en vortex para después analizarla. Se usó una columna Allsphere ODS-15 (Altech, Length 250mm ID 4.6mm) y con una fase móvil: A, Acetonitrilo-Metanol-Buffer TRIS-HCL pH 8 0.1 molar (72-8-3 mL); B, Metanol-Hexano (80-20 mL). La detección se llevó a cabo en 440 y 663nm donde los picos fueron detectados a partir de los tiempos de retención. El gradiente de los solventes comenzó con 100% de A hasta el minuto 5, a partir de aquí la solución B comenzó a circular y así se mantuvo por 2.5 min para después seguir la corrida con 100% de B (Aigner *et al.*, 2013).

Para analizar los compuestos hidrofílicos (fenoles), se llevó a cabo según el método descrito por Aigner *et al.*, (2013) modificado. Primero, se centrifugó a 4000 rpm por 10 min, y después se tomó la lectura en un barrido de 200 a 400 nm. Se utilizó una columna Allsphere ODS-15 (Altech, Length 250 mm ID 4.6 mm) y con una fase móvil: A, agua-0.5% Ácido fórmico (v/v); B, Metanol- 0.5% Ácido fórmico (40:10 v/v). El gradiente de los solventes comenzó con 0% B, incrementando a 100% de B después de 40 min, seguido por 8 min después de la corrida con 100% de A, con un flujo de 0.5 mL/min.

Análisis de fenoles totales y actividad antioxidante. Para el análisis de estas pruebas se utilizó 1.68 g de *Mougeotia* (Avila, 2016). La cuantificación de fenoles totales (n=3) fue determinada usando el método de FC con ácido gálico como solución de referencia. A las muestras se les adicionó 500 μL del reactivo de FC, posteriormente se añadió Na_2CO_3 al 20% y se dejó reposar por 1 h. La lectura se tomó a 725 nm y los resultados se expresan en μg de equivalente de ácido gálico/mg de extracto (García, 2010 modificado).

La actividad antioxidante se determinó mediante el método DPPH; el cual produce una reacción del color violeta, característico del DPPH, hasta el cambio a un tono amarillo claro, que se lleva a cabo por la interacción del radical con un compuesto antioxidante.

Se usó el procedimiento descrito por Avila (2016) con algunas modificaciones y por triplicado; se disolvió 5 mg de DPPH en 50ml de MeOH. El análisis se llevó a cabo con material liofilizado. Los stock de la muestra fueron concentraciones de 500, 250, 125, 62.5 y 31.25 ppm, las cuales fueron colocadas en una microplaca de 96 pozos adicionadas con 150 μL de la solución de DPPH. Como control negativo se utilizaron pozos con 200 μL de MeOH. La reacción fue incubada por 30 min en la oscuridad y se midió en un lector de ELISA a 517 nm.

Par determinar la CA_{50} del extracto metanólico de *M. capucina* se obtuvo el porcentaje de decoloración del DPPH de cada una de las concentraciones. El porcentaje de reducción fue calculado usando la siguiente formula:

$$\% \text{ decoloración} = 1 - (\text{absorbancia del problema} / \text{absorbancia del blanco}) \times 100$$

La CA_{50} expresa la cantidad necesaria de un antioxidante para reducir en un 50% al radical DPPH. Valores bajos de CA_{50} indican un mayor potencial antioxidante (Avila, 2016).

Análisis de Correspondencia Canónica. Para realizar esta prueba se consideraron las variables físico-químicas y los porcentajes de cobertura registrados durante las exploraciones realizadas en las poblaciones de *Mougeotia*, por tanto se construyeron dos matrices en Excel; la primera, contenía los datos de cobertura de las poblaciones estudiadas en el periodo comprendido 2014-2015, y en la segunda los resultados de las variables físico-químicas cuantificadas; en ambas matrices fue necesario transformar en $\text{Log}_{10}+1$ los datos excepto para los valores del pH con la finalidad de homogenizar la información (Ter Braak y Smilauer, 2009).

Se utilizó el software CANOCO versión 4.5, con las matrices diseñadas para el ACC. Para evaluar la significancia estadística de la relación entre las variables ambientales y la especie estudiada. Se realizó la prueba de permutaciones Monte Carlo (4999 permutaciones, $\alpha = 0.05$) que incluye CANOCO.

RESULTADOS

Parámetros fisicoquímicos. En la tabla 1, se indican los datos de las variables limnológicas durante el periodo de 2012-2015, donde se observó de manera general que se trata de una laguna de agua fría, bien oxigenada y con pH ácido, un ambiente oligotrófico y poco mineralizado. En relación con los datos ambientales, la profundidad del margen de la laguna registró generalmente 0.4m excepto en los años 2014-2015; para la temperatura la fluctuación fue de 7 a 10.5°C, registrándose los valores más altos en meses cálidos y los más bajos en invierno. En cuanto a la conductividad se registró un promedio de 7.8 $\mu\text{S cm}^{-1}$, con una mínima de 0.1 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en 2012 y un máximo de 10 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en el año 2015. Con respecto al oxígeno disuelto, este ambiente se encontró bien oxigenado; por otro lado, el pH fue ácido durante el estudio.

El promedio de amonio fue de 0.15 mg/L y el de nitratos fue de 0.16 mg/L, ortofosfatos 1.023 mg/L con excepción del año 2014 que se registró 5,7 mg/L. Los bicarbonatos tuvieron un intervalo de 4.8 a 0 mg/L; el calcio obtuvo un promedio de 1.6 mg/L con 3.2 mg/L como máximo en enero-abril 2014 y un mínimo de cero en mayo 2013. Los cloruros son casi indetectables debido a su escases, exceptuando el periodo de septiembre 2012 donde fue 3.7 mg/L; para el potasio se registraron valores de 3.3 a 0.1 mg/L, este elemento es utilizado por la biota del ecosistema; el promedio de sulfatos fue de 1.6 mg/L donde el máximo se registró con 4.1mg/L en mayo 2013 y en algunos años fue de cero. El sodio, mostró 0.9 a 0.0 mg/L.

Determinación taxonómica. La delimitación taxonómica del material biológico se realizó con especímenes de campo (morfo morado) y en cultivo (morfo verde) donde se registraron los caracteres morfológicos vegetativos, reproductivos y la ultraestructura correspondiente a ML, MEB y MET.

La siguiente descripción reúne los intervalos de los estados de carácter taxonómicos de ambos morfos, con base en la mediciones de (n=100).

Tabla1. Matriz de variables limnológicas del área de estudio a lo largo del periodo septiembre 2012 a octubre 2015 (- sin información registrada).

VARIABLES	sep-nov 2012	may 2013	sep 2013	ene-abr 2014	sep 2014	mar-oct 2015	Promedio
Profundidad en el litoral (m)	0,4	0,4	0,4	0,50	0,50	0,60	0.46
Temperatura del agua (°C)	7,4	10,5	10	10	8	10	9.3
Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	0,1	9,6	9,9	8,5	9,1	10	7.8
Oxígeno disuelto (mg/L)	6,9	5,5	6,2	6,4	5,8	4,7	5.9
pH	5,6	5,9	5,1	5,9	5,6	5,5	5.6
Amonio (mg/L)	0,4	0,4	0,12	0	0	0	0.15
Nitratos (mg/L)	0,4	0,28	0	0,3	0	0	0.16
Ortofosfatos (mg/L)	0,35	0,01	0,07	0,01	5,7	0	1
Bicarbonatos (mg/L)	4,8	1,5	0	0	0	0	1
Calcio (mg/L)	2,5	0	1,2	3,2	2,4	0.20	1.6
Cloruros (mg/L)	3,7	0	0,91	0	0	0	0.76
Potasio (mg/L)	3,3	2,1	0,1	0,7	0,6	0.1	1.15
Sulfatos (mg/L)	0	4,1	1,4	2,9	0	1,16	1.6
Sodio (mg/L)	0	0,1	0	0,9	0,9	0,6	0.41
Intensidad lumínica ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	-	-	-	-	32	-	

Mougeotia capucina (Bory) C. Agardh

Filamentos no ramificados, constituidos por numerosas células cilíndricas con septos planos; células vegetativas de 12-31 μm de ancho, 78-427 μm de largo. El cloroplasto en forma de cinta y axial, con 3-18 pirenoides (Fig. 2a), un núcleo en la región central de la célula (Fig. 2b). La reproducción asexual por aplanosporas (Fig. 2c) y con reproducción sexual por conjugación escaleriforme, donde en principio se forma un canal que posteriormente permitirá la formación de una zigóspora cuadrada o rectangular de 30-68 μm de ancho por 24-63 μm de largo, con pared de color pardo morado-verde (Tabla 2).

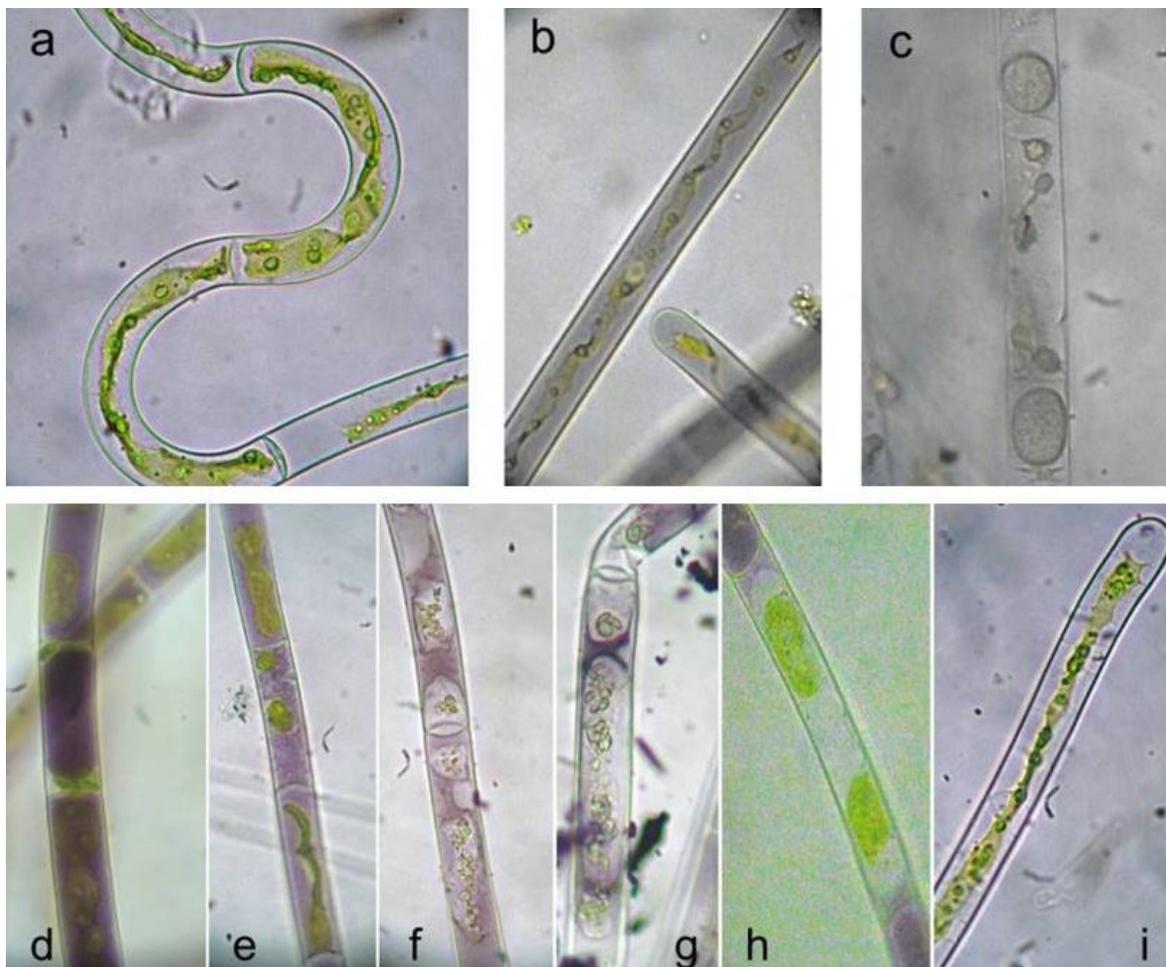


Fig. 2. Imágenes de ML de *M. capucina*, en cultivo: a) Célula vegetativa con un cloroplasto en forma de cinta rotando, en su interior los pirenoides y septos planos del filamento. b) El núcleo en posición central. c) Inicio de la formación de aplanospora. d) Inóculo al inicio del cultivo. e-h) Apariencia de los filamentos cuando van perdiendo el color morado a través de 4 meses. i) Morfotipo verde. Abreviaturas: Cl=cloroplasto, Pi= pirenoides, S=septo, N= núcleo (400X) originales.

Tabla 2. Caracteres vegetativos y reproductivos de *M. capucina* de dos poblaciones: campo y cultivada.

Población	Campo	Cultivo
Morfotipo	Morado	Verde
CÉLULA		
Ancho μm	12-17	12-31
Largo μm	115-387	78-427
Cloroplasto	Uno con forma rectangular, ocupa la mitad o poco más de la longitud de la célula	Uno con forma rectangular, ocupa más de la mitad de la longitud de la célula
Pirenoides	3-7	6-18
ZIGÓSPORA		
Ancho μm	30-55	36-68
Largo μm	30-57	24-63
Pared	Lisa	Lisa
Color	Pardo-morado	Verde
APLANOSPORA		
Ancho μm		20-36*
Largo μm		45-80*

* Medidas con base en Randhawa (1951)

En la población de campo, los filamentos crecen formando masas enmarañadas de color morado. En contraste, la población en cultivo, el inoculó fue de color morado, posterior a 3-4 meses este se observó como un morfo de color verde (Fig. 2 d-i).

Los cultivos presentaron reproducción sexual después de 1-5 meses, por isogamia a través gametos ameboideos en conjugación escaleriforme (dioicos, monoicos) y lateral. En todos los casos la unión ocurre a la mitad del canal de conjugación; formando zigosporas con márgenes cóncavas.

Conjugación escaleriforme en talos dioicos, donde inicialmente se producen pequeñas papilas, que usualmente ocurren entre células próximas que entran en contacto para dar

paso a la formación del tubo de conjugación en donde los gametos se fusionan y formarán la zigóspora (Fig. 3).

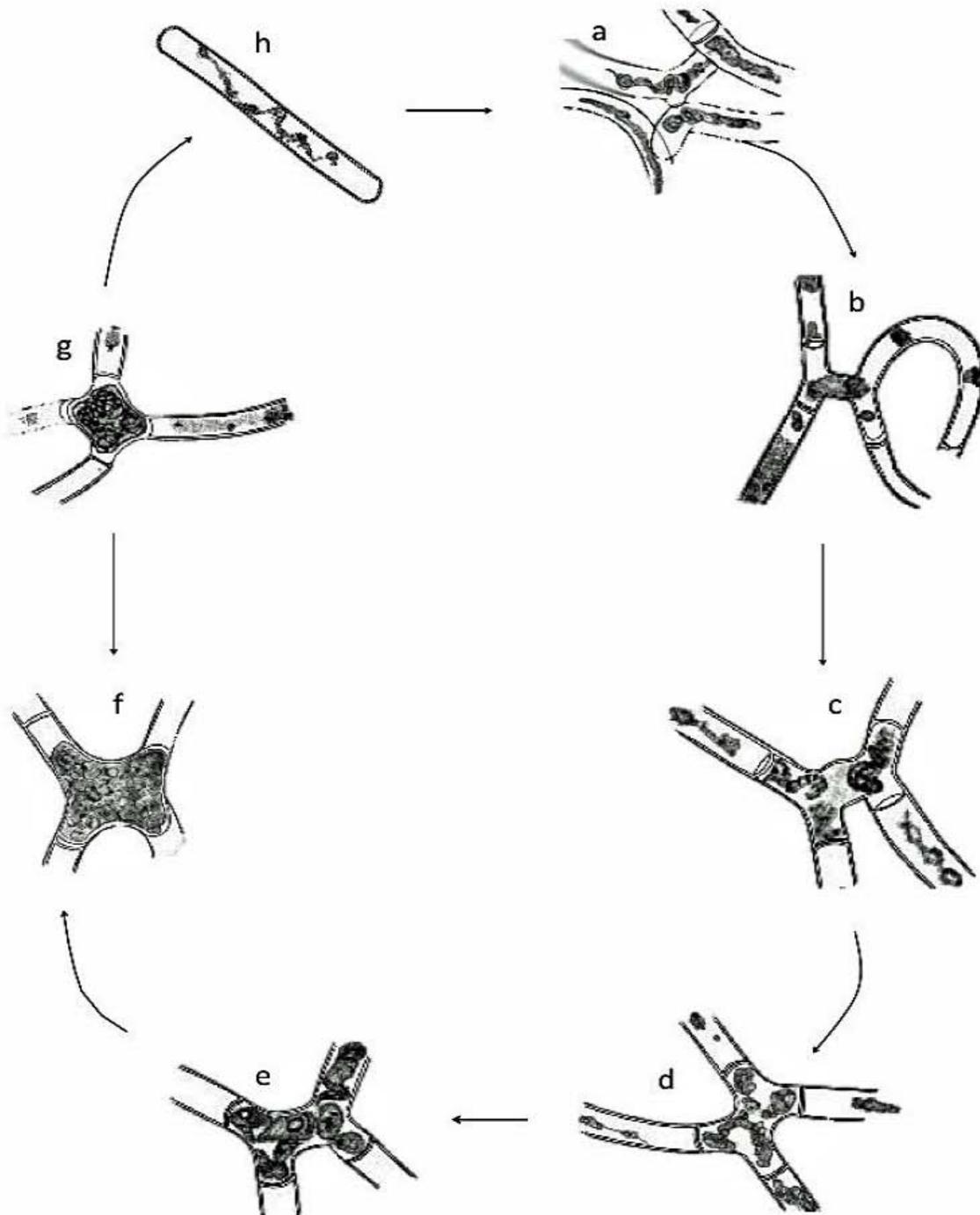


Fig. 3. Conjugación escaleriforme de *M. capucina*: a) inicio de la conjugación, con la formación y unión de dos papilas, b) tubo de conjugación, c-f) proceso de formación de la zigóspora, g) zigóspora madura, h) filamento nuevo.

En MEB, se observaron filamentos y papilas de pared lisa sin ornamentación (Fig. 4a), que al entrar en contacto entre ellas formaron un puente en forma de “H” (Fig. 4b). En este sitio madura el cigoto, abultándose para formar la zigóspora (Fig. 4c-e).

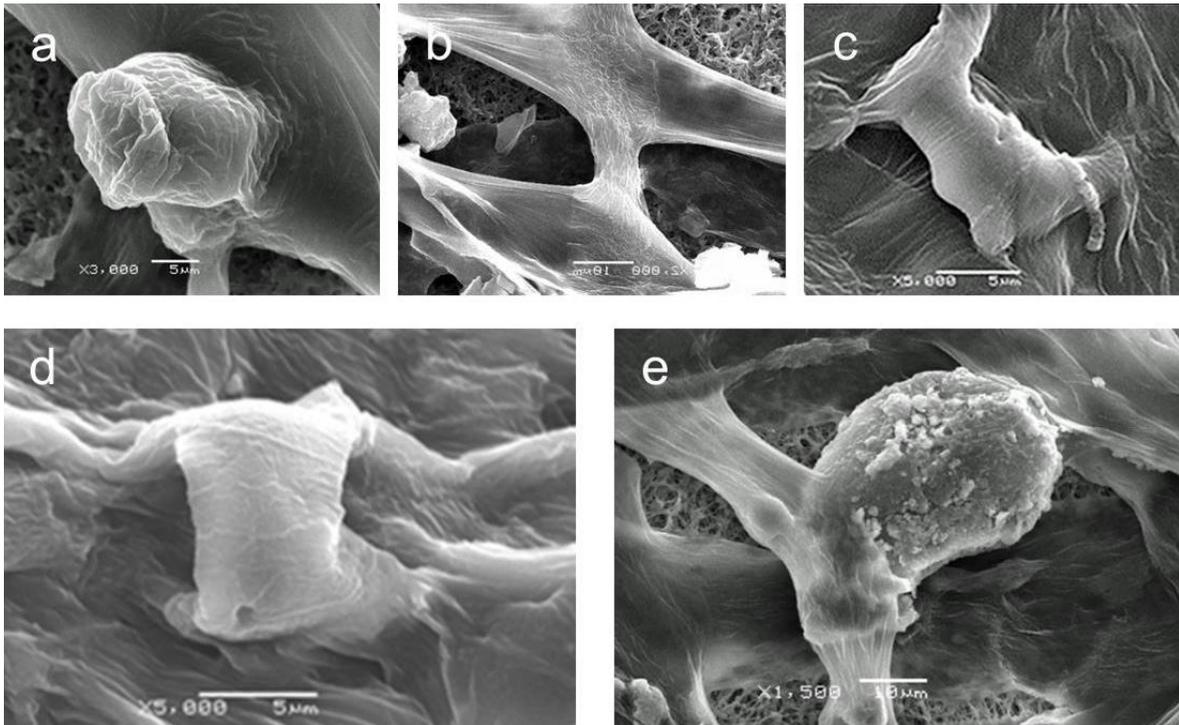


Fig. 4. Micrografías a MEB de muestras de cultivo de *M. capucina*. a) papila, b) contacto de las papilas (estadio temprano del tubo de conjugación, semeja a una “H”), c) abultamiento en la parte central del tubo y un poro, d) zigosporangio joven y el poro, e) zigosporangio maduro con engrosamiento de la pared.

Conjugación escaleriforme en filamentos monoicos, donde la conjugación ocurrió entre células del mismo filamento que se ponen en contacto una al lado de la otra mediante un enrollamiento del filamento (Fig. 5 a y b). La conjugación lateral, inicio con el aumento del diámetro de la célula, el septo de separación de la célula vecina se rompe, permitiendo que todo el contenido celular se mueva hacia la otra célula en línea recta, para fusionarse a la mitad y formar la zigóspora (Fig. 5 c y d).

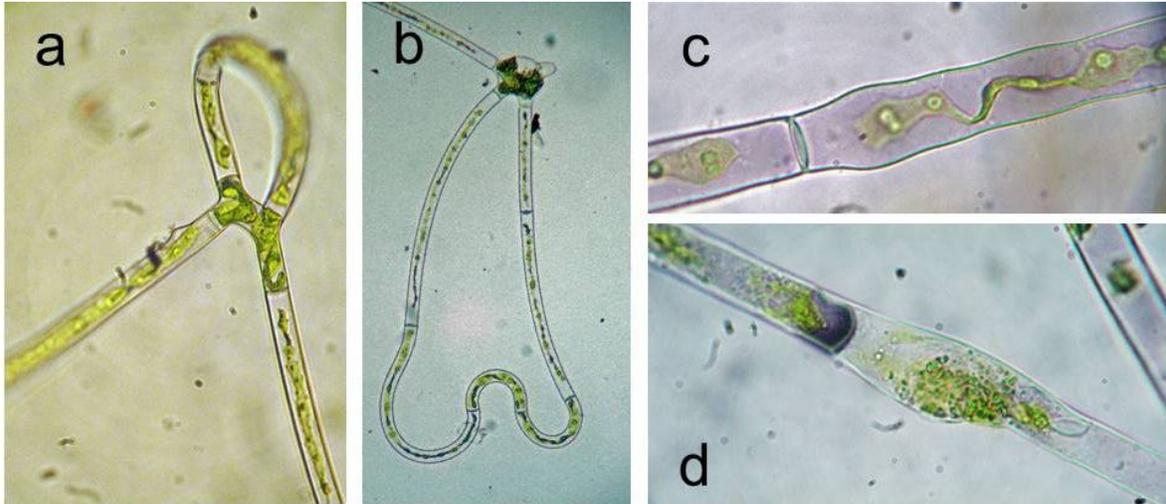


Fig. 5. Imágenes de ML de *M. capucina* en cultivo. a y b) conjugación entre células del mismo filamento formando un bucle de diferente tamaño. c y d) conjugación lateral.

Microscopia electrónica de Transmisión. Las ultraestructuras de *M. capucina* de los morfos fueron observadas, para el primero se reconocieron diez organelos, mientras para el morfo verde, fueron siete.

El morfo morado mostró: vacuolas, núcleo, nucléolo, cloroplasto, pirenoide, gránulos de almidón, plastoglóbulos, mitocondrias, Golgi y pared celular.

Las vacuolas de 0.94-6.6 μm de diámetro, fueron sacos polimórficos y prominentes, electron-opacas (de apariencia lisa) y electron-translúcidas (cristales), cubriendo una gran porción en la periferia y centro de la célula. El núcleo en forma ovoide y en su interior el nucléolo esférico. El cloroplasto contiene membranas tilacoidales y pirenoides electron-densos rodeados de grandes gránulos traslúcidos de almidón. El primero presenta tilacoides organizados en paquetes, y algunos de ellos, penetran al interior del pirenoide (Fig. 6 a-f).

En el interior del cloroplasto, se observaron formas globosas transparentes que podrían ser lípidos o gránulos de almidón (Fig. 6 c-b). Además fue posible apreciar la orientación paralela de estas membranas respecto del cloroplasto y de la separación que hay entre ellas así como de la abundancia de plastoglóbulos electron-densos, con un diámetro de 0.083-0.416 μm ; agrupados sobre el cloroplasto (Fig. 6 e-g).

El aparato de Golgi y las mitocondrias fueron identificados con base a su morfología típica (Fig. 6 h e i); observando en el lumen de la mitocondria cristales electron-opacos;

mientras que el aparato de Golgi se encontró rodeado de materiales electron-densos. La pared celular lisa de 0.43-0.86 μm de grueso.

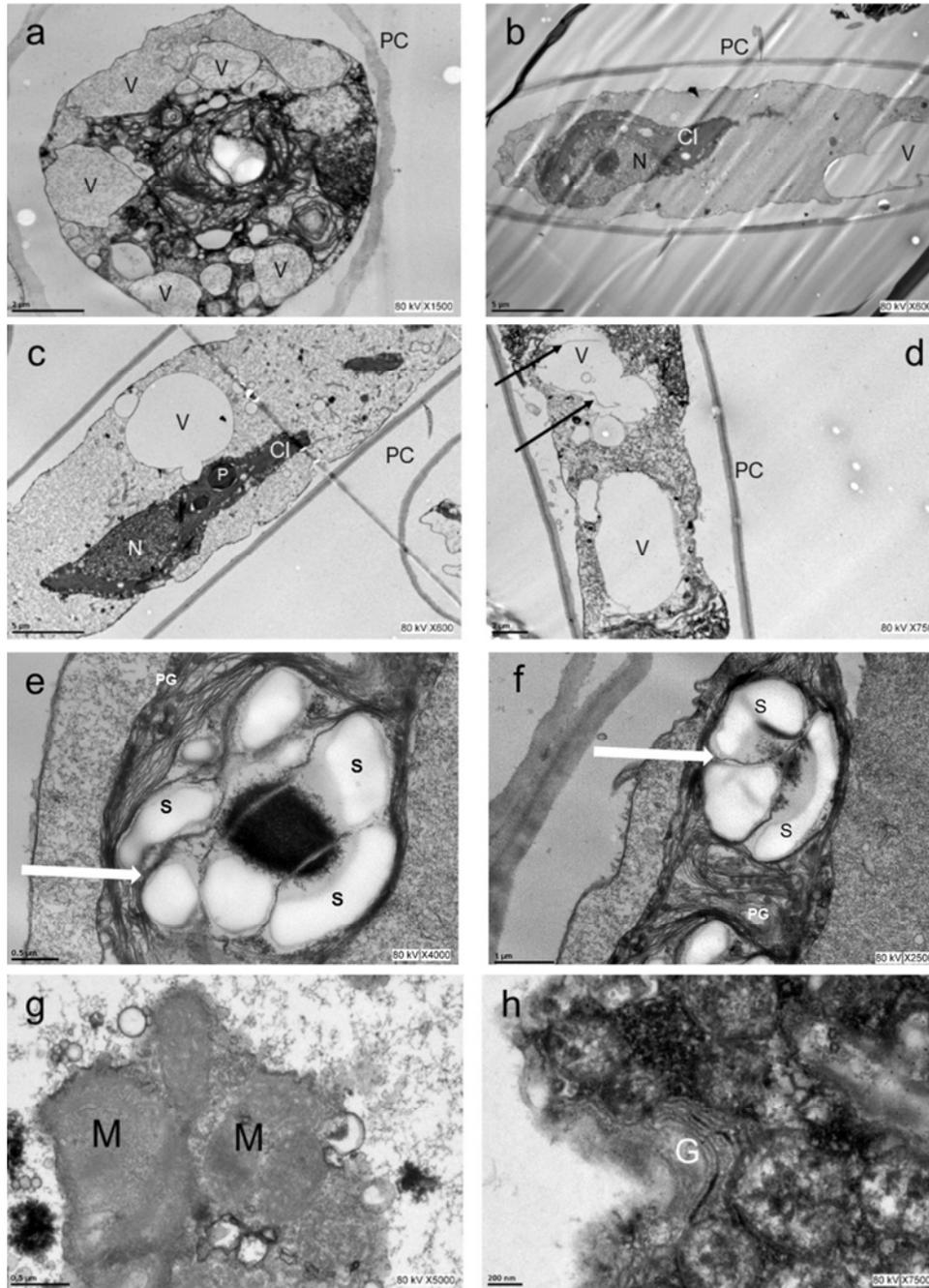


Fig. 6. Micrografías *M. capucina*, morfo morado en MET: a) corte transversal de la célula, con masas electron-densas acompañadas de un gran número de vacuolas, b y c) núcleo cerca del cloroplasto. Las membranas tilacoidales se distinguen en el cloroplasto. d) proyecciones citoplasmáticas (flecha) penetrando las vacuolas. e y f) pirenoide con invaginaciones de la membrana tilacoidal (flecha) con gránulos de almidón a su alrededor y numerosos plastoglóbulos de diferente tamaño sobre la membrana tilacoidal. g) mitocondrias con diferentes electron-densidades esto debido a los cristales presentados. h) aparato de Golgi rodeado de una masa electo-densa. Abreviaturas: Cl-cloroplasto, G-aparato de Golgi, M-mitocondria, N-núcleo, P-pirenoide, PC-pared celular, PG-plastoglóbulos, S-gránulos de almidón y V-vacuolas,

El morfo verde mostró: vacuolas, cloroplasto, pirenoides, gránulos de almidón, mitocondrias, peroxisoma, retículo endoplásmico; estos últimos fueron descritos solo para esta población, y la pared celular. Este morfo careció de plastoglobulos.

Las vacuolas fueron sacos pequeños y semicirculares, electron-translúcidos, localizados entre las membranas tilacoidales del cloroplasto; estas membranas penetran a los pirenoides, quienes son estructuras redondas electron-densas rodeadas de gránulos translúcidos de almidón. Las membranas tilacoidales de este organismo no mostró dilatación (Fig. 7 a-c).

Las mitocondrias con un lumen electron-translúcido, en donde es posible identificar las crestas (Fig. 7d). Los peroxisomas, fueron organelos con forma redonda, cerca del cloroplasto; en el centro se observa un contenido electron-denso (Fig. 7 e). El retículo endoplasmático fue reconocido por su característico aspecto membranoso el cual presenta una apariencia electron-densa y fue visto en diferentes partes del citoplasma (Fig. 7 f).

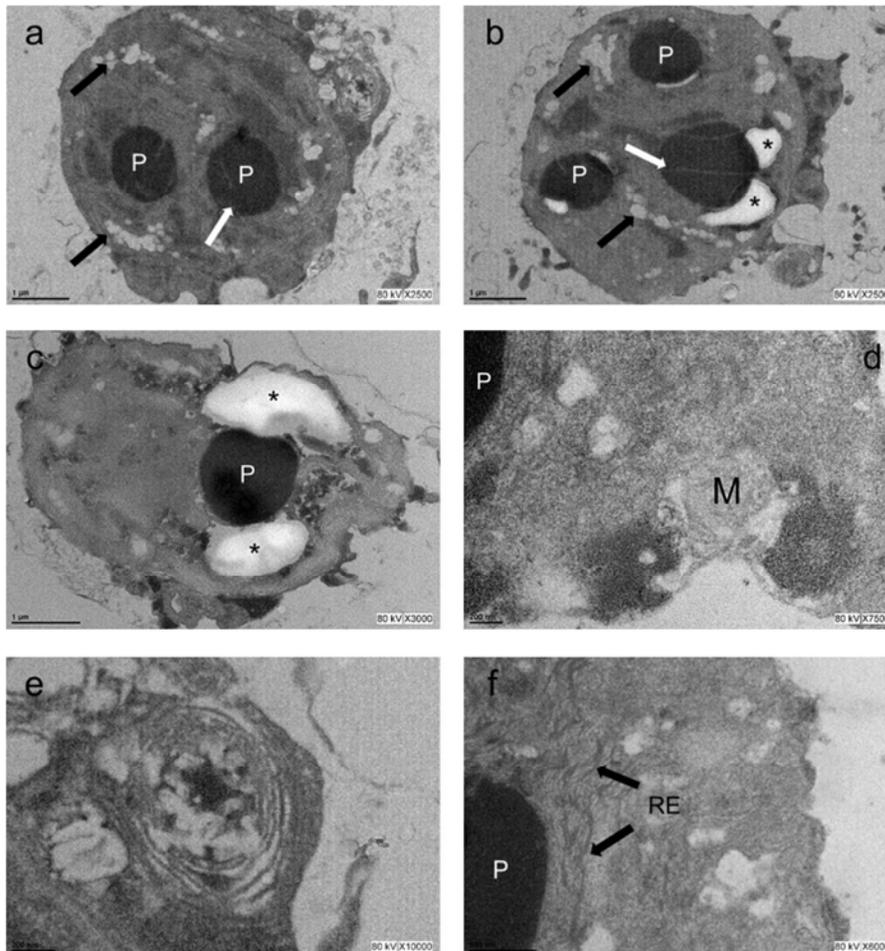


Fig. 7. Micrografías a MET de *M. capucina*, morfo verde: a-c) corte transversal de la célula en donde se distinguen pirenoides con invaginaciones de la membrana tilacoidal (flecha blanca). Los gránulos de almidón (asterisco) rodean al pirenoide. d) mitocondria cerca de pirenoide y a cada lado se aprecia masas con contenido electron-denso. e) peroxisoma con un centro electron-denso. f) retículo endoplasmático localizado a un lado del pirenoide. Abreviaturas: M mitocondria, P pirenoide y RE retículo endoplasmático.

Pigmentos. En la fase lipofílica de *Mougeotia*, morfotipo morado, se identificaron ocho compuestos, los cuales fueron categorizados en tres grupos: el primero, clorofila *a* y *b* (Fig. 8); en la segunda corrida se detectó: ciclo de las xantofilas, violaxantina, zeaxantina y anteraxantina; y el tercero, carotenoides, incluyendo luteína, siendo este el más evidente dentro del cromatograma con tiempo de retención 7.2 min; β -caroteno y licopeno (Fig. 9).

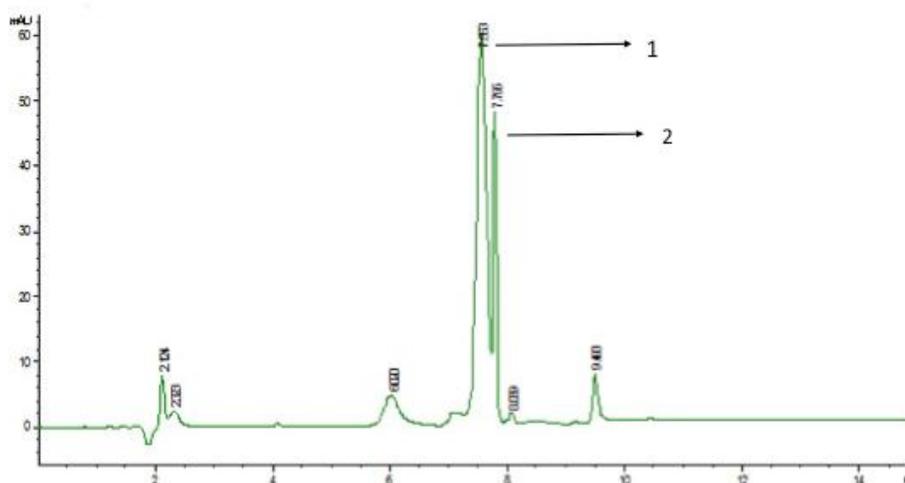


Fig. 8. Cromatograma (663 nm) del extracto lipofílico de *M. capucina*, morfo morado. 1: clorofila *a* y 2: clorofila *b*.

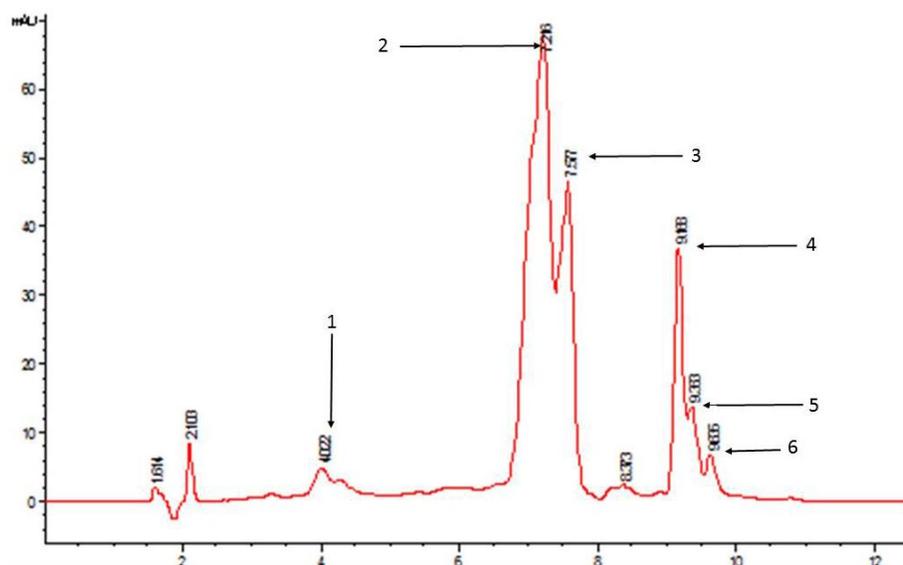


Fig. 9. Cromatograma (445 nm) del extracto lipofílico de *M. capucina*, morfo morado. 1: violaxantina, 2: luteína, 3: zeaxantina, 4: β -caroteno, 5: licopeno y 6: anteraxantina.

La fase hidrofílica del morfo morado mostró la presencia de varios compuestos, que podrían ser responsables de la protección contra radiación UV. La naturaleza fenólica de estos picos se deriva de su característica espectral con un máximo de absorción alrededor de 280 nm típico para compuestos aromáticos y también de su solubilidad en agua. Los espectros de absorción de esta fase, con nueve compuestos fenólicos se muestra en la Fig. 10. El pico más destacado del cromatograma, fue en el tiempo de retención 6.9 min en una absorción de 266 nm, valores que incluyen RUV-C y RUV-B. Los picos restantes tuvieron un espectro similar.

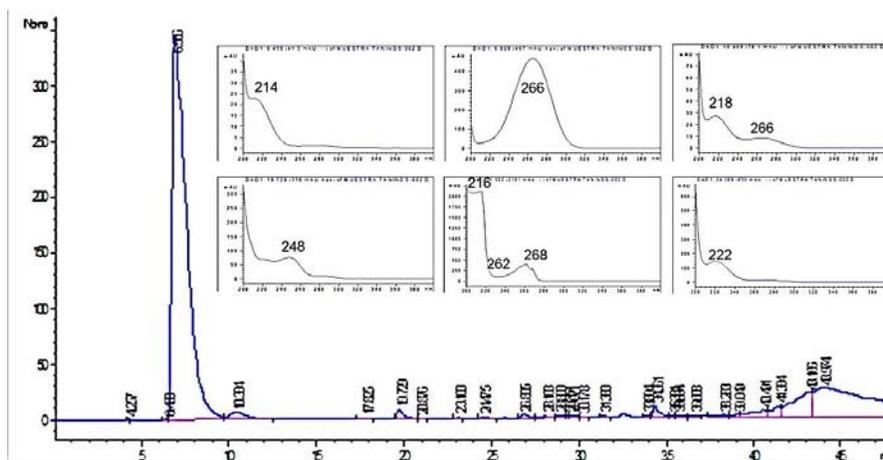


Fig. 10. Cromatograma (280 nm) del extracto hidrofílico (20% metanol) de *M. capucina*, morfo morado. Los picos tenían un máximo de absorción espectral en la región UV-C y UV-B.

Cuantificación de Fenoles Totales. El contenido total de fenoles en el extracto metanólico del *M. capucina* fue de 18 µg equivalente de ácido gálico/mg de extracto.

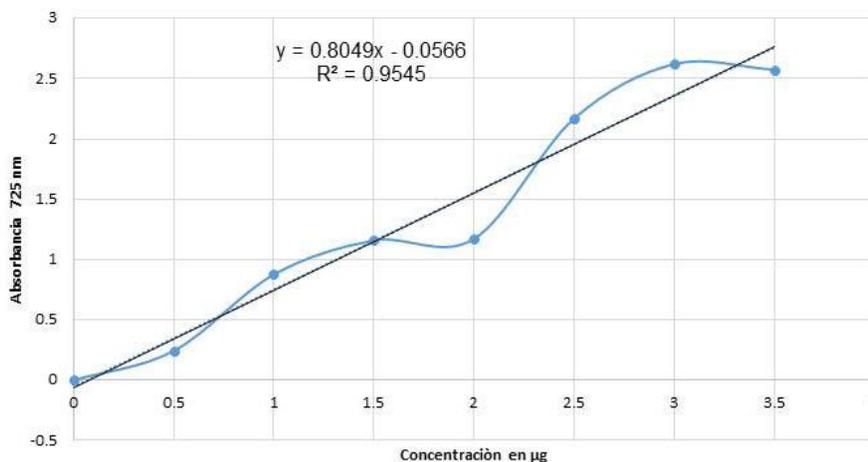


Fig. 11. Cuantificación de fenoles totales del extracto metanólico de *M. capucina*, morfo morado.

Actividad antioxidante. Los resultados de la prueba de DPPH del extracto metanólico del organismo indican que no presento actividad antioxidante frente al radical.

Análisis de variables físico-químicas vs. población de Mougeotia. Según el ACC los vectores que están relacionados con la población de *M. capucina* son oxígeno, pH y nitratos de forma positiva; factores que han sido identificados como clave para su desarrollo. En forma negativa se encontraron: potasio, ortofosfatos, cloruros, bicarbonatos y amonio, reafirmando así la susceptibilidad de esta alga a estos minerales y nutrientes (Fig. 12).

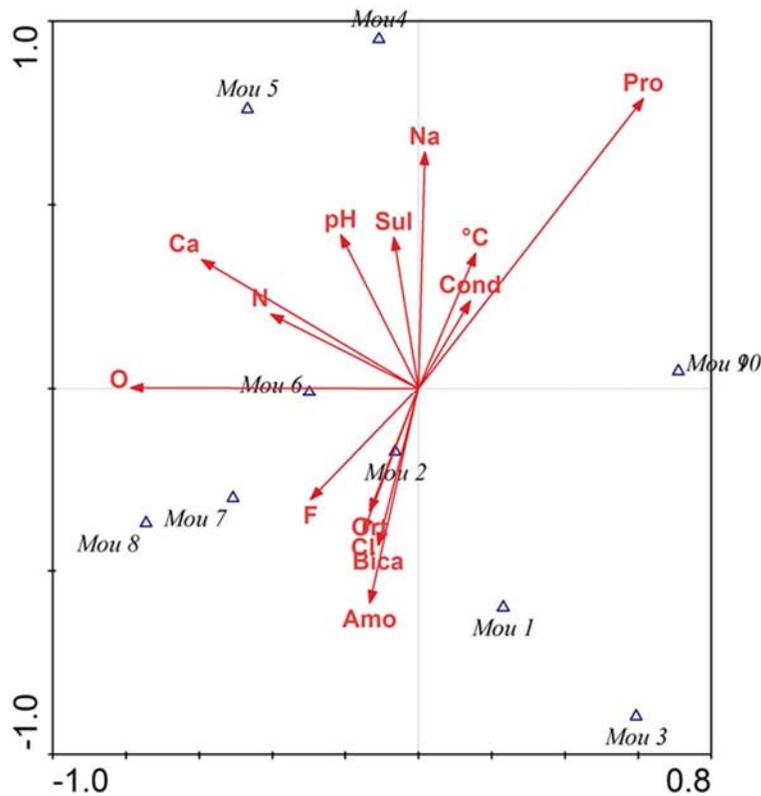


Fig. 12. ACC: Diagrama de ordenación con poblaciones de *M. capucina* (Δ) y variables ambientales (líneas) de correlación entre los ejes de ordenación de las variables cuantificadas: Pro (profundidad), Cond (conductividad), C° (temperatura), Na (sodio), Sul (sulfuros), pH, Ca (calcio), N (Nitratos), O (oxígeno), F (potasio), Bica (bicarbonato), Cl (cloruros), Amo (amoníaco) y Ort (ortofosfatos).

DISCUSIÓN

Análisis de variables ambientales. Con base a los registros de profundidad, se identificó un cambio desde el primer muestreo al actual esto debido a que la laguna es astática y depende del balance entre la precipitación y la evaporación (Luna *et al.*, 2009). Martínez (2009) menciona que la profundidad del cuerpo de agua favorece el crecimiento de las algas perifíticas, que a su vez contribuyen con una gran superficie colonizada, aunque existen reportes (Weidman *et al.*, 2005) de que Chlorophyta filamentosas y cianobacterias pueden formar blooms en lagos boreales oligotróficos en profundidades de 0.5-1.4 m. Lavery (2009) indicó que *Mougeotia* puede dominar las superficies de los estanques de poca profundidad. Esto se ha registrado también en *Zygnemopsis decussata* en un lago de alta montaña de España (Figuroa *et al.*, 2009). Con se explica el florecimiento permanente de la población de *M. capucina* registrada en La Luna en donde la profundidad fluctuó en 0,60 m y la transparencia fue tal que se ve el fondo. Esta medida se relaciona con el contenido bajo de materiales disueltos y partículas, por lo que la luz puede penetrar en la columna de agua, en especial la radiación UV obteniendo valores de $5,418 \pm 2,582 \text{ J m}^{-2} \text{ día}^{-1}$ en promedio (Luna *et al.*, 2008).

Durante el periodo de estudio en la laguna La Luna, los valores obtenidos de la temperatura del agua superficial fueron de 7.4 a 10.5°C, intervalo semejante a los señalados para otras décadas en el área de estudio por Caballero-Miranda (1996) y Alcocer *et al.*, (2004), variable importante de lagos de alta montaña en donde se han desarrollan especies como *Zigogonium ericeourm* (Aigner *et al.*, 2013); así como de ambientes donde se ha registrado el florecimiento de la familia Zignemataceae (Remias *et al.*, 2011, 2012). También se conoce que la estratificación fue un factor importante para la formación de blooms de *Mougeotia* spp. en los lagos Geneva, Garda, Maggiore y Kinneret (Tapolczai *et al.*, 2015). Aunque este taxon crece bajo estas condiciones, diferentes fuentes (Alcocer *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2009) mencionan que la capa de la superficie es ligeramente cálida a diferencia del fondo; permitiendo un buen mezclado en la columna de agua, considerándolo como lago polimíctico cálido.

Cabe mencionar la existencia de reportes de Kennedy (1976) indicando que para *M. transeauii* la temperatura de 15°C es buena ya que se observó a las células con una condición morfológica sana que no es visible a 22-31°C, en donde presentaron anomalías morfológicas, como la fragmentación de filamentos y cambio de color en el plasto; concluyendo que esta variable es importante en el desarrollo del organismo.

La laguna La Luna es un ambiente bien oxigenado (4.7-6,9 mg/L) llegando a puntos de saturación; estos resultados son similares a los publicados por Delgado (2008) y Cuna *et al.*, (2013). Así mismo el agua es poco mineralizada provocando una conductividad baja (Alcocer *et al.*, 2004).

Por otro lado, el pH fue ácido (5.1-5.9) indicando la poca solubilidad de algunos compuestos. Wyatt y Jan (2010) indican que lagos acidificados a menudo se ven reducidos en riqueza de especies, siendo dominantes filamentos de algas verdes de la familia Zygnemataceae. Graham *et al.*, (1996b) mencionan que *Mougeotia* tolera una amplia gama de pH (3-9), pero es dominante solo en condiciones con pH bajos cercanos a 5.6, a este mismo valor, se producen bloom alcanzando la mayor extensión a pH 5.2 en laboratorio, sugiriendo que este género posee plasticidad fisiológica, y se propone que la proliferación en estas condiciones se da por su capacidad de captar CO₂ y C orgánico e inorgánico disuelto (Turner *et al.*, 1991; Graham *et al.*, 1996b; Wyatt y Jan, 2010).

Los valores en la composición química del agua fueron bajos; Lavery (2009) indica que el metafiton afecta la ecología de un estanque, interceptando los nutrientes de los sedimentos. Los nitratos y el amonio presentaron valores de cero, semejantes a los obtenidos por Alcocer *et al.*, (2004), Cuna *et al.*, (2013), Sánchez *et al.*, (1989) y Wyatt y Jan (2010). Kennedy (1976) afirma que los integrantes de esta familia seleccionan la fuente de nitrógeno y que el estado vegetativo de *M. transeauii* puede alterarse dependiendo de la fuente de nitrógeno; ya que esta especie puede crecer rápidamente en medio con urea como fuente de nitrógeno, pero puede absorber preferentemente el amonio en vez del nitrato cuando ambos están presentes en el medio como prueba por una disminución de pH; aunque, cuando la única fuente es el nitrato, el organismo tiene un mejor crecimiento. También señala que esta alga absorbe nitrato y nitrito con igual facilidad.

A diferencia de otros compuestos, los ortofosfatos presentan un ciclo químico sedimentario, por lo que Alcocer *et al.*, (2004), Carrillo *et al.*, (2008) y Figueroa *et al.*, (2009) señalan que este tipo de ambientes están fuertemente limitados de fósforo; debido a que la principal entrada al ecosistema es a través de la nieve derretida y la lluvia (Sánchez *et al.*, 1989). Tapolczai *et al.*, (2015) indican *Mougeotia* spp. es un buen competidor en ambientes con niveles bajos de fósforo y que es dominante en lagos pre-alpinos de oligo-mesotróficos de Italia, Francia e Israel, cuando las concentraciones de

fósforo total están por debajo de $20 \mu\text{g L}^{-1}$; sugiriendo que este nutrimento juega un rol mayor en las masas del género.

Carrillo y colaboradores (2008) mencionan que la falta de N y P causan una alta sensibilidad a la RUV ya que necesitan estos elementos para sintetizar enzimas protectoras, pigmentos protectores y mecanismos de reparación.

El carbono también puede ser limitante en lagos ácidos debido a la transformación de bicarbonato en dióxido de carbono siendo el bicarbonato la principal fuente de carbono usada por algas filamentosas, aunque existen especies adaptadas a la acidificación como *Mougeotia* (Lavery 2009; Wyatt y Jan, 2010).

Las concentraciones de los iones Ca, Cl, K y Na son semejantes a los reportados por Caballero-Miranda (1996), Armienta (2000) y Luna *et al.*, (2009), destacando el rol que ejerce el ion Ca^+ , ya que hay evidencias que indican que el Ca^+ actúa como un segundo mensajero en la transducción de señales extracelulares en las plantas; de igual manera regula el metabolismo, el crecimiento y movilidad. Otros trabajos mencionan que este elemento también participa en la acción del fitocromo (P_{fr}) de *Mougeotia*, controlando el movimiento del cloroplasto, el cual se orienta conforme a la intensidad lumínica. Esta alga lo guarda en vesículas; incoloras, altamente refringentes, con una matriz osmofílica que está compuesta de derivados fenólicos. Se ha visto a estas estructuras asociadas al potasio, cloruros, sodio y sulfuros (Wagner y Klein, 1978; Trenty *et al.*, 1992). Por su parte, Lavery (2009) indica que este taxon se desarrolla poco, cuando hay un incremento de nutrimentos.

Por último, lo que respecta a la intensidad lumínica Donahue *et al.*, (2003) y Figueroa *et al.*, (2009) mencionan que la radiación solar es un elemento limitante en la estructura y función de las comunidades acuáticas; especialmente la radiación ultravioleta (RUV), dentro de esta fracción de luz la radiación UVB es naturalmente mayor en lagos de alta montaña, donde va aumentando aproximadamente de 8-10% cada 1,000 m. Tapolczai *et al.*, (2015) mencionan que el éxito de este género es debido a la estructura única del cloroplasto, quien puede girar maximizando la captura de la luz.

Morfología y ultraestructura. De las 168 especies registradas en el mundo por Guiry y Guiry (2016) para el género se encontró que el material biológico estudiado corresponde a *Mougetia capucina* (Bory).

De los dos morfotipos del organismo se obtuvo discrepancias entre las medidas registradas y señaladas por Prescott (1951), Randhawa (1959) y Brook y Johnson (2002), quienes mencionan que las células vegetativas miden 14-21 μm de ancho y de 70-340 μm de largo; el cloroplasto con 4-16 pirenoides. Con respecto a los reproductores los intervalos que indican son de 50-74 μm de ancho y 60-100 μm de largo. Mismas discrepancias han sido reportadas en el diámetro de *M. transeai* y *Zygnema*; Kennedy (1976) menciona que existe cierta plasticidad en el ancho y largo de la célula, Herburger *et al.*, (2014) mencionan que el ancho puede ser influenciado por factores poligénicos o por la edad y propone investigar si factores ambientales o fisiológicos tienen efecto sobre este carácter taxonómico; también se ha reportado que el pH es un parámetro influyente en el largo de la célula, Kennedy (1976) experimentó bajo condiciones de cultivo en diferentes pH, que el largo de las células se ve afectado; siendo más grandes a pH 7,0 que a pH 6,5 u 8,5. El cloroplasto fue típico del género (Randhawa, 1959 y Kennedy, 1976) aunque puede existir variabilidad en la morfología, debido a condiciones como: temperatura, pH, nutrición y duración, calidad e intensidad de la luz. Harvey (1976) menciona que la orientación del plasto en respuesta a la luz podría estar dada por filamentos de actina.

El número de pirenoides también mostró diferencias en relación con las claves, pero se ha reportado que en cultivos viejos, las células llegan a presentar doce a dieciséis pirenoides (Kennedy, 1976).

Al igual que Kennedy (1976) solo un núcleo en forma esferoidal a ovoide fue visible en material vivo; en donde se encuentra suspendido cerca del centro de la célula mediante hebras citoplasmáticas, igual que en otros miembros de la familia (Randhawa, 1959).

En cuanto a las características de la zigóspora se menciona que este género cuenta con solo dos paredes. Se señala que para inducir esta reproducción la deficiencia de nitrógeno es un factor condicional importante y que dependiendo de la fuente de nitrógeno, la forma de la zigóspora puede ser afectada (Randhawa, 1959 y Kennedy, 1976). Pichrtová *et al.*, (2013) mencionan que cigotos de *Zygnema* exhiben colores amarillos, pardusco o azulado, probablemente causado por pigmentos fenólicos. Las poblaciones analizadas mostraron zigósporas de color pardo-morado y verdes.

En cuanto a las estructuras de reproducción asexual Pichrtová *et al.*, (2013) indican que estos son formados cuando el organismo se encuentra en condiciones desfavorables, por lo que son considerados como estados de resistencia.

El *taxon* tiene una distribución en: Europa (Gran Bretaña), América (Estados Unidos, Hawaii y Brasil), África, Asia (Iraq) y Oceanía (Australia y Nueva Zelanda) (Prescott, 1951, Randhawa, 1959, Brook y Johnson, 2002, Guiry y Guiry, 2016.).

La pérdida de color morado observada en cultivos del organismo también fue registrada en *Zigogonum ericetorum*, en la cual su plasto también era verde (Holzinger *et al.*, 2010).

Este estudio representa el primer reporte de ultraestructura en *M. capucina*, por lo tanto los resultados se comparan con miembros de la familia Zygnematacea que se desarrollan en condiciones similares a este.

Holzinger y Lütz (2006) indicaron que solo longitudes de onda por debajo a 284 nm pueden causar daño a niveles de ultraestructura a las células y Pichrtová *et al.*, (2013) señalaron que daños en cloroplastos y mitocondrias son el primer signos de daños inducidos por la RUV.

La diferencia más marcada en la ultraestructura del morfo morado fueron el tamaño y número de vacuolas; varios trabajos (Ralph, 1962; Holzinger *et al.*, 2010; Remias *et al.*, 2011, 2012; Aigner *et al.*, 2013 y Pichrtová *et al.*, 2013) reportan que algas pertenecientes a la familia Zygnematacea producen y almacenan compuestos polifenólicos en ellas, para proteger otros organelos como el núcleo y los cloroplastos contra la RUV. También Pichrtová *et al.*, (2013) indican que el efecto protector de los fenoles almacenados en partículas electron-densas y vacuolas es mejorado porque se localizan en la periferia de la célula; otro ejemplo es el alga marina *Prasiola crispa* colectada en Sptisbergen (Noruega), en donde el número de gránulos citoplasmáticos con contenido electron-denso aumenta después de ser irradiada por 24 h con UV-B, sugiriendo que estos protegen contra la RUV (Holzinger y Lütz, 2006).

Daños ocasionados al cloroplasto por la RUV son reportados por Holzinger y Lütz (2006) en *P. crispa*, quien muestra una leve dilatación en los tilacoidales y una reducción en el número de plastoglóbulos. Sin embargo *Z. ericetorum* en condiciones de desecación también presenta dilatación en las membranas tilacoidales, pero no exhibe numerosos plastoglóbulos (Holzinger *et al.*, 2010).

Randhawa (1959) describe a los pirenoides como una estructura central proteica envuelta por almidón. Los pirenoides tiene un área electrón-densa penetrada por membranas tilacoidales. La acumulación de gránulos de almidón indica gran actividad celular (Remias *et al.*, 2011; Pichrtová *et al.*, 2013 y Herburger *et al.*, 2014). Aunque en condiciones de desecación *Z. ericetorum* no forma gránulos de almidón o que pueden estar modificados (Holzinger *et al.*, 2010)

Remias *et al.*, (2011) describen la ultraestructura de *Ancyclonema nordenskiöldii* (Zygnematales) encontrando numerosos cuerpos de Golgi, acumulación de retículo endoplasmático rugoso cerca del núcleo y muchas mitocondrias característico de actividad celular.

Pigmentos. La composición de clorofilas y carotenoides en *M. capucina* del morfo morado fue similar a los reportados por Aigner *et al.*, (2013) quienes mencionan que son equivalentes a otras algas verdes y plantas vasculares.

Respecto a los carotenoides Delgado (2008) menciona que pertenecen a los pigmentos rojo-anaranjado-amarillo, moléculas que absorben en el espectro de azul-violeta, incrementando de este modo la tolerancia a la RUV. Sommaruga (2001) indica que los carotenoides responsables del color rojo de *Chlamydomonas nivalis* tienen un rol fotoprotector a pesar de que no absorbe directamente a la RUV, puesto que son efectivos quelantes de especies reactivas de oxígeno.

Los pigmentos carotenoides, luteína β -carotenos, determinados en *M. capucina*, fueron similares a los citados en *Mougeotia* spp. (Muntean *et al.*, 2007 a, b, c). Giraldo *et al.*, (2014) mencionan el efecto fotoprotector que tienen estos compuestos junto con el licopeno en la reducción de la intensidad de eritema en la piel; resultados que permiten considerar el uso de los carotenoides de *M. capucina* como ingredientes para los alimentos como lo ha expresado Muntean *et al.*, (2007a).

Aunque cuando es expuesta a altas dosis de irradiación se provoca la activación del ciclo de las xantofilas el cual está conformado por: violaxantina, anteraxantina y zeaxantina, este último pigmento fue el segundo pico más alto de nuestros resultados. Giraldo *et al.*, (2014) reportan que pigmentos xantófilos como luteína y zeaxantina, protegen el sistema fotosintético en condiciones de estrés oxidativo, usando un mecanismo que consiste en eliminar la mayoría de la luz solar absorbida, disipándola en forma de calor.

Las xantofilas, zeaxantina y anteraxantina son necesarias no sólo para la disipación térmica inmediata, sino también para disipar la energía térmica persistente en plantas bajo estrés ambiental a largo plazo, proceso mediante el cual el ciclo de xantófila se detiene en forma de zeaxantina y anteraxantina. Asimismo, se ha observado que los carotenoides pueden facilitar diversos procesos de defensa, incluyendo la captura de residuos de clorofila triplete y de oxígeno singlete. Pichrtová *et al.*, (2013) mencionan que la presencia de estos compuestos van de la mano con altas concentraciones de fenóles.

Los nueve compuestos fenólicos determinados en el morfo morado de *M. capucina*, podrían ser los responsables de acumularse en las grandes vacuolas observadas del morfo morado y por ello explicar la protección de estos filamentos a la alta incidencia de RUV y con ello favorecer el florecimiento de esta población en el área de estudio. Aigner *et al.*, (2013) indicaron la misma coloración, morada, para *Z. ericetorum*, donde reconocieron diez compuestos fenólicos; el primero de ellos (TR 7.2 min) se denominado galoilo glucopiranososa.

Existen otros trabajos que también abordan pigmentaciones inusuales de esta familia como Holzinger *et al.*, (2010) encontraron en *Z. ericetorum* compuestos que absorben en la región RUV-A y RUV-B en tiempos de retención de 7.9 y 18.7 min. Pichrtová *et al.*, (2013) mencionan que los compuestos fenólicos en una cepa de *Zygnema* se localizaron en TRs 6.5, 8.3, 16.1 y 18.8 min. Remias *et al.*, (2011) indicaron que el color pardusco en *Ancylonema nordensköldii* (Zygnematales) es causado por pigmentos que absorben la luz visible y el ultravioleta. Otorgándole una protección contra la irradiación excesiva. También en *M. berggrenii* Remias *et al.*, (2012) reportan tres compuestos fenólicos con tiempos de retención de 6.57, 17.23 y 18.07 min.

Estos resultados son similares con los de *M. capucina*, sin embargo, la variación de los datos puede estar dada por la estimulación de la síntesis de compuestos fenólicos la cual se produce en función de la longitud de onda que incide sobre el organismo.

Han *et al.*, (2012) identificaron en *Spirogyra varians*, derivados del galoilo: galato de metilo, 1-O- β -galoil-D-glucosa, 1, 2, 3,6-tetra-O' galoil- β -D-glucosa y 1, 2, 3, 4,6 penta-O -galoil- β -D'Glucosa, intermedios en ciclo del ácido shikímico. En plantas, esta ruta se activa como respuesta al estrés ambiental a alta intensidad de luz, patógenos, heridas, nitrógeno, RUV y metales pesados (Han *et al.*, 2009).

Funciones y fuentes de taninos hidrolizables. Los resultados obtenidos del ensayo de FC fueron positivos, ya que hubo presencia de fenoles. Pichrtová *et al.*, (2013) indicaron que el contenido de compuestos fenólicos se incrementa significativamente después del tratamiento de RUV en *Zygnema*, aunque mencionan que las concentraciones de los compuestos son bajas a consecuencia del proceso de liofilización. Figueroa *et al.*, (2009) señalaron que el contenido de compuestos fenólicos, está relacionado con la profundidad del hábitat; debido a que cuando *Zygnemopsis decussata* crece de 0.5 y 0.25 m de profundidad el contenido de compuestos fenólicos es alto en comparación con zonas menos o más profundas. Han *et al.*, (2012) demuestran que en *S. varians* el contenido de fenoles es causado por la disminución de temperatura, obteniendo 500.6 µg, a diferencia, cuando crece a 20°C (28.5 µg). Estos compuestos han sido encontrados en miembros de esta familia quizá por la relación filogenética cercana con las plantas superiores. La acumulación de fenoles es desencadenada no solo por la RUV si no por diferentes factores ambientales como la salinidad y la temperatura (Pichrtová *et al.*, 2013).

En cuanto a la actividad antioxidante del extracto metanólico del alga, no mostró reducción al radical obteniendo que este compuesto no es antioxidante, sin embargo este tipo de compuestos también tienen la capacidad de absorber la RUV; éstos se acumulan preferentemente en las células de la superficie captando la radiación RUV-B nociva, sin interferir con la absorción de la PAR (Giraldo *et al.*, 2014).

Otros trabajos han estudiado diferentes propiedades que pueden tener este tipo de compuestos, como: 1, 2, 3, 4, 6 penta-O-galoil-β-D'Glucosa (PGG) precursor común e inmediato de dos clases de taninos hidrolizables: galotanino y elagitanino. Se ha encontrado en 70 tipos de plantas actividad anti-cáncer y anti-diabetes (Zhang *et al.*, 2009). Además se ha reportado que integrantes del Orden Conjugales producen inhibidores de α-glucosidasas; ejemplo es *S. varians* donde Cannell *et al.*, (1998) reportan que esta actividad podría ser causada por un polifenol denominado pentagaloilglucosa con actividad antibacteriana.

CONCLUSIONES

El fitobentos correspondió a *Mougeotia capucina*, donde las poblaciones de campo (morfo morado) y cultivo (morfo verde) mostraron diferencias en las dimensiones de los caracteres vegetativos y reproductivos; en general, las de cultivo fueron de mayor tamaño.

Los caracteres, como la formación de zigosporas y aplasnosporas fueron posibles observar a través del cultivo. Este estudio provee nuevos datos sobre la morfología en la reproducción y el proceso de conjugación de *M. capucina*. Así como, conocer que el morfo verde, se forma después de 4 meses bajo condiciones de cultivo señaladas.

La cobertura del fitobentos analizada durante el periodo del 2014 a 2015, registró porcentajes superiores al 50%, por lo que se indica por primera vez en México un florecimiento perene de algas filamentosas Zygnematales en un ambiente extremo de alta montaña para Latinoamérica.

Se observaron diferencias en la ultraestructura; el morfo morado, presentó gran cantidad de vacuolas grandes y plastoglobulos situados cerca de la periferia de la célula y del cloroplasto; en contraste, el morfo verde tenía menos vacuolas y de menor diámetro, sin plastoglobulos. Característica considerada clave, ya que se ha indicado que es donde se almacenan los compuestos fenólicos, los cuales actúan como pantallas contra la RUV dañina.

El análisis de pigmentos permitió reconocer clorofilas y carotenos; dentro de este último grupo se destaca luteína, β -caroteno y zeaxantina.

Los fenoles determinados fueron 18 μg de equivalente de ácido gálico/mg de extracto los cuales podrían ser responsables del morfo morado de *M. capucina*, los cuales pudiesen brindarle una fotoprotección contra el exceso de RUV del ambiente. Sin embargo, no se registró actividad antioxidante por el método de DPPH.

Las variables fisicoquímicas indicaron que la laguna es un ambiente oligotrófico, bien oxigenado, con pH ácido y poco mineralizado. Así como, el análisis de ACC señala que *M. capucina* está asociado principalmente con el pH y cantidad de nutrientes; información que coincide con publicaciones para otras regiones del mundo.

REFERENCIAS

- Alcocer, J. 1980. *Aportaciones limnológicas al estudio del lago del Sol y lago de La Luna, Nevado de Toluca, Estado de México*, Servicio Social, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México. pp 63-78.
- Alcocer, J., Oseguera, L. A., Escobar, E., Peralta, L. y Lugo, A. 2004. Phytoplankton Biomass and Water Chemistry in Two High-Mountains Tropical Lakes in Central Mexico. *Artic, Antarctic, and Alpine Research* 36(3):342-346.
- Al-Mayaly, K. I. 2011. Use of filamentous alga *Mougeotia* sp. to Remove Lead Ions from Contaminated Water under Laboratory Conditions. *International Journal of Basic & Applied Sciences* 11(6):110-118.
- Aigner, S., Remias, D., Karsten, U. y Holzinger, A. 2013. Unusual Phenolic Compounds Contribute to Ecophysiological Performance in the Purple-Colored Green *Zygogonium ericetum* (Zygnematophyceae, Streptophyta) from a High-Alpine Habitat. *Journal Phycology* 49:648-660.
- Andersen, R. 2005. Parameters of growth in cultures of microalgae. In: R. Andersen (Ed.), *Algal culturing techniques*. Academic Press, China.
- Armienta, M. A., De la Cruz-Reyna, S. y Macías, J. L. 2000. Chemical characteristics of the crater lakes of Popocatepetl, El Chichon, and Nevado de Toluca volcanoes, Mexico. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 97:105-125.
- Avila, R. M. 2016. Efecto de la actividad antimicrobiana y antioxidante de algunas macroalgas marinas del sistema arrecifal Veracruzano. Tesis de Maestría (Química Marina). UNAM. México.
- Banderas-Tarabay, A. y R. González-Villela, 2002. Limnología de El Sol, un lago alpino tropical. Guadalupe de la Lanza Espino y José Luis García Calderón (compiladores). *Lagos y presas de México*. pp. 51-64, AGT, México. D.F.
- Björn, L.O. Widell, S. y Wang, T. 2002. Evolution of UV-B regulation and protection in plants. *Adv. Space. Res.* 30:1557-1562.
- Black, H.S., De Gruijl, F.R., Forbes, P.D., Cleaver, J.E., Ananthaswamy, H.N., de Fabo, E.C., Ullrich, S.E., y Tyrrell, R.M. 1997. Photocarcinogenesis: An overview. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 40:29-47.
- Bojorge-Garcia, M., Carmona, J. y Ramírez, R. 2014. Species richness and diversity of benthic diatom communities in tropical mountain streams of Mexico. *Inland Waters* 4(3): 279-292.
- Boltovskoy, A. 1976. Técnica simple para la preparación de microinvertebrados tecados y loricados lábiles para su examen con el microscopio electrónico de barrido. Manual de métodos ficológicos. K. Alveal, E. Ferrario, C. Oliveira & E. Sar (Eds). 1995. Ed. Universidad de Concepción. Concepción, Chile. pp. 119-13
- Brook, A.J. y Johnson, L.R. 2002. Order Zygnematales. In: *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. (John, D.M., Whitton, B.A. y Brook, A.J. Eds), pp. 479-593. Cambridge: Cambridge University Press.
- Caballero Miranda, M. 1996. The Diatom Flora or two acid lakes in Central México. *Diatom Research* 11(2):227-240.
- Cabrol, N. A., Feister, U., Häder, D. P., Piazena, H., Grin, E. A., & Klein, A. 2014. Record solar UV irradiance in the tropical Andes. *Front Environ Sci* 2, 2.
- Cuna, E., Zawisza, E., Caballero, M., Ruiz-Fernandez, A, C, Lozano-Garcia, S. y Alcocer, J. 2014. Environment impacts of Little Ice Age cooling in central Mexico recorded in the sediments of a tropical alpine lake. *Journal Paleolimnol.* 51:1-14.

- Cannell, R. J., Farmer, P., y Walker, J. M. 1988. Purification and characterization of pentagalloylglucose, and alpha-glucosidase inhibitor/antibiotic from the freshwater green alga *Spirogyra varians*. *Biochem J.* 255(3):937-941.
- Carrillo, P., Delgado-Molina, J. A., Medina-Sánchez, J. M., Bullejos, F. J. y Villar-Argaiz, M. 2008. Phosphorous inputs unmask negative effects of ultraviolet radiation on algae in a high mountain lake. *Global Change Biology* 14:423-439.
- Donahue, F. W., Turner, A. M., Findlay, L. D. y Leavitt, R. P. 2003. The role of solar radiation in structuring the shallow benthic communities of boreal forest lakes. *Limnol. Oceanogr.* 48(1):31-47.
- Delgado, O. N. C. 2008. Estrategias de Fotoprotección a la Radiación UV en el Zooplacton de dos Lagos Tropicales de Alta Montaña. Tesis de Maestría (Biología). UNAM. México.
- Figueroa, F. L., Korbee, N., Carrillo, P., Medina-Sánchez, J. M., Mata, M., Bonomi, J. y Sánchez-Castillo, P. M. 2009 The effects of UV radiation on photosynthesis estimated as chlorophyll fluorescence in *Zygnemopsis decussata* (Chlorophyta) growing in a high mountain lake (Sierra Nevada, Southern Spain). *J. Limnol.* 68(2):206–216.
- Fligge, M., Solankib, S. K., Papc, J. M., Fröhlichd, C., Wehrlid, Ch. 2001. Variations of solar spectral irradiance from near UV to the infrared—measurements and results. *Journal of Atmospheric and Solar-Terrestrial Physics.* 63:1479–1487.
- Flores, D. N., Alcocer, J. y Ciro, P. J. 2008. The Structure of the Zooplankton Assamblages from Two Neighboring Tropical High Mountain Lakes. *Journal of Freshwater Ecology* 23(1):21-31.
- Franco, L., G. de la Cruz, A. Rocha, N. Navarrete, G. Flores, E. Kato, S. Sánchez, L. Abarca, C. Bedia e I. Winfield, 1985. *Manual de ecología*. Trillas. México. 166pp.
- García, B.M.A. 2010. Evaluación de la actividad fotoprotectora y antioxidante de *Yucca periculosa* Baker. Tesis de Doctorado (Biología). UNAM. México.
- García-Palomo, A., Macías J.L., Arce J.L. y Garduño, 2000. Miocene to Recent structural evolution of Nevado de Toluca Volcano region, central México: Tectonophysics, Special Volume, Post-Laramidemagmatism and tectonics in Mexico plate interaction. p. 281-302
- Giraldo, M, C, J., J. Atehortúa, L., y Puertas M., M., Á. 2014. Foto-protección: mecanismos bioquímicos, punto de partida hacia mejores filtros solares. *Dermatología CMQ.* 12(4):272-281.
- Graham, J. M., Arancibia-Avila, P. y Graham, L. E. 1996a. Physiological ecology of a species of the filamentous green alga *Mougeotia* under acidic conditions: light and temperatura effects on photosynthesis and respiration. *Limnol. Oceanogr.* 41(2):253-262.
- Graham, J. M., Arancibia-Avila, P. y Graham, L. E. 1996b. Effects of pH and selected metal ion growth of the filamentous green algae *Mougeotia* under acidic conditions. *Limnol. Oceanogr.* 41(2):263-270.
- Guiry, M. D. y Guiry, G. M. 2015. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 26 enero 2015.
- Han, W. J., Lee, K. P., Yoon, M., Kang, S. H., y Kim, G. H. 2009. Cold stress regulation of a bi-functional 3-dehydroquinase dehydratase/shikimate dehydrogenase (DHQ/SDH)-like gene in the freshwater green alga *Spirogyra varians*. *Botanica Marina* 52(2):178-185.
- Han, W. J., Yoon, M., Kupper, F. D., Klochkova, T. A., Oh, J. S., Rho, J. R. y Kim, G. H. 2012. Accumulation of galloyl derivatives in a green alga, *Spirogyra varians*, in response to cold stress. *J. Appl. Phycol.* 24:1279-1286.
- Harvey, J. M. 1976. Actin in the green algae *Coleochaete* and *Mougeotia*. *Planta (Berl.)* 131:119-120.

- Herburger, K., Lewis, L. A. y Holzinger, A. 2014. Photosynthetic efficiency, desiccation tolerance and ultrastructure in two phylogenetically distinct strains of alpine *Zygnema* sp. (Zygnematophyceae, Streptophyta): role of pre-akinete formation. *Protoplasma* 252(2):571-89.
- Holzinger, A. y Lütz, C. 2006. Algae and UV irradiation: Effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron* 37:190-207.
- Holzinger, A., Tschaikner, A. y Remias, D. 2010. Cytoarchitecture of the desiccation-tolerant green alga *Zygonium ericetorum*. *Protoplasma* 243:15-24.
- Kennedy, F. G. R. 1976. Biology of the green alga *Mougeotia transeui* Collins. Tesis de Doctorado. The University of Arizona, 143 pp.
- Kennedy, F. G. R. y Hoshaw, R.W. 1978. Culture Study of Reproductive Cycles and Systematics in *Mougeotia transeui* (Chlorophyta). *J. Phycology* 14:445-450.
- Kumar, D. H. y Singh, N. H. 1979. *A Textbook on Algae*. MacMillan Press LTD, Hong Kong, 216 pp.
- Lavery, S.L. 2009. Metaphyton Mat Conditions and their Effects on Filamentous Algal Communities and their Diatom Epiphytes. Tesis de Doctorado (Ph). Drexel University. Philadelphia.
- Luna, E. P., Montero, A. y Junco, R. 2009. *Las aguas celestiales El Nevado de Toluca*. México: Arqueología Subacuática, INAH. pp 1-15.
- Martínez, G.M. A. 2009. El perifiton del humedal en la Laguna de Zacapú, Michoacán, México. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Biología. Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo. México.
- Muntean, E., Bercea, V., Dragos, N. y Muntean, N. 2007a. Potential use of *Mougeotia* sp. Algae in food production, based on its carotenoid content. *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 1:143-148.
- Muntean, E., Bercea, V. y Muntean, N. 2007b. Small-scale batch technology for production of a natural food dye from green algae. *The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle IV-Food Technology. The International Symposium Euro-aliment*. pp 20-21.
- Muntean, E., Bercea, V., Dragos, N. y Muntean, N. 2007c. HPLC Assessment of violaxanthin cycle's function under excessive light in *Mougeotia* sp. Algae. *Boletín USAMV-CN* 63(64):142-147.
- Nehal, K. y Lim, H. 1995. Phototoxicity and Photoallergy. *Dermatology Nursing* 7:227-236.
- Oren, A. y Gunde-Cimerman, N. 2007. Micosporines and micosporine-like amino acids: UV protectants or multipurpose secondary metabolites?. *FEMS Microbiol Lett.* 269:1-10.
- Ortega, M. M. 1984. Catálogo de Algas Continentales recientes de México. UNAM. 249 pp.
- Pichardo-Pagaza, I. 2015. El Guardian del Valle. Hacia la Sustentabilidad del Nevado de Toluca. Consejo editorial de la Administración Pública Estatal. 323 pp.
- Pichtová, M., Remias, D., Lewis, L. A. y Holzinger, A. 2013. Changes in Phenolic Compounds and Cellular Ultrastructure of Arctic and Antarctic Strains of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) after Exposure to Experimentally Enhanced UV to PAR Ratio. *Microb. Ecol.* 65:68-83.
- Prescott, W.G. 1951. *Algae of the western great lakes area*. Otto Koeltz Science. Germany. 977 pp.
- Ralph, A. L. 1962. *Physiology and Biochemistry of Algae*. Academic Press. N. York. pp 440-441.
- Randhawa, M.S. 1959. Zygnemaceae. Indian Council of Agricultural Research. New Delhi. 478 pp.
- Remias, D., Holzinger, A., Aigner, S. y Lütz, C. 2011. Ecophysiology and ultrastructure of *Ancylonema nordenskiöldii* (Zygnematales, Streptophyta), causing brown ice on glaciers in Svalbard (high arctic). *Polar Biol.* 35:899-908.

- Remias, D., Schwaiger, S., Aigner, S., Leya, T., Stuppner, H. y Lütz, C. 2012. Characterization of an UV- and VIS-absorbing, purpurogallin-derived secondary pigment new to algae and highly abundant in *Mesotaenium berggrenii* (Zygnematophyceae, Chlorophyta), an extremophyte living on glaciers. *FEMS Microbiol Ecol* 79:638–648.
- Round, F. E. 1981. *The Ecology of Algae*. Cambridge University Press. Cambridge, pp 653.
- Sánchez, C, P, M., Cruz-Pizarro, L. y Carrillo, P. 1989. Caracterización del fitoplancton de las Lagunas de Alta Montaña de Sierra Nevada (Granada, España) en relación con las características fisicoquímicas del medio. *Limnética* 5:37-50.
- Sommaruga, R. 2001. The role of the UV radiation in the ecology of alpine lakes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 62:35-42.
- Tapolczai, K., Anneville, O., Padisák, J., Salmaso, N., Morabito, G., Zohary, T., Tadonlécé, R, D. y Rimet, F. 2015. Occurrence and mass development of *Mougeotia* spp. (Zygnemataceae) in large, deep lakes. *Hydrobiologia* 745:17-29.
- Ter Braak, C. J. F. y Smilauer P. 2009. CANOCO for Windows versión 4.5. Biometrics-Plant Research International, Wageningen.
- Trenty, A., Groling, F., Magdowski, G. y Wagner, G. 1992. Electron microscopic characterization of calcium-binding physodes in the green alga *Mougeotia scalaris*. *Histochemistry* 97:487-492.
- Turner, M. A., E. T. Howell, M. Summerby, R. H. Hesslein, D. L. Findlay y M. B. Jackson, 1991. Changes in epilithon and epiphyton associated with experimental acidification of a lake to pH 5. *Limnology and Oceanography* 36(7):1390-1405.
- Vazqu ez-Selem, L, 2009, "Las glaciaciones y el paisaje glacial", 7-9 pp. en *Las Aguas Celestiales, Nevado de Toluca*, Luna, Pilar, Arturo Montero y Roberto Junco (coordinadores), Instituto Nacional de Antropología e Historia (INAH), Arqueología Subacuática, México, D.F, 165 pp.
- Vazqu ez-Selem, L. y K, Heine, 2004, "Late Quaternary glaciation in Mexico", En: Ehlers, J, y P. L, Gibbard, (Eds.), *Quaternary Glaciations – Extent and Chronology, Part III: South America, Asia, Africa, Australia, Antartica*, J, Ehlers, and P.L, Gibbard, (eds.), pp. 233-242
- Vilaclara, G., Cuna, E. y Zeeb, B. 2005. Subfossil Chrysophyte morphotypes from two tropical, highmountain lakes in Nevado de Toluca volcano, Central México. *Nova Hedwigia Beih*, 128:309-335.
- Wagner, G. y Klein, K. 1978. Differential effect of calcium on Chloroplast Movement in *Mougeotia*. *Photochemistry and Photobiology* 27:137-140.
- Weidman, R. P., Turner, M. A. y Goldsborough, L. G. 2005. Limitations on the effects of ultraviolet radiation on benthic algae in a clear boreal forest lake. *J. N. Am. Benthol. Soc.* 24(4):820-831.
- Wyatt, H, K. y Jan, S, R. 2010. Effects of Acidification and Alkalinization on a Periphytic Algal Community in an Alaskan Wetland. *Wetlands* 30:1193-1202.
- Zhang, J., Li, L., Kim, S. H., Hagerman, A. E., y L , J. 2009. Anti-cancer, anti-diabetic and other pharmacologic and biological activities of penta-galloyl-glucose. *Pharmaceutical research* 26(9):2066-2080.

ANEXO

Coberturas registradas durante las exploraciones del periodo 2014-2015 de *M. capucina*.

ENERO-ABRIL 2014	SEPTIEMBRE 2014	OCTUBRE 2015
1/4	1/4	1/8
2/4	1/4	1/8
1/4	2/4	1/4
4/4	2/4	1/4
4/4	2/4	2/4
4/4	3/4	2/4
4/4	4/4	2/4
4/4	4/4	2/4
4/4	4/4	4/4
4/4	4/4	3/4