



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

**ANÁLISIS POLIFACÉTICO DE LAS ESPECIES DE *MICROCYSTIS***  
**(CYANOPROKARYOTA, CHROOCOCCALES) EN TRES LAGOS**  
**URBANOS DEL CENTRO DE MÉXICO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:  
**MARTHA XÓCHITL SEGURA GUZMÁN**

TUTORA PRINCIPAL:  
DRA. ROSALUZ TAVERA SIERRA  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. HELGA OCHOTERENA BOOTH  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
DRA. GABRIELA VÁZQUEZ HURTADO  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, INECOL

CD. MX., ABRIL 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





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

**ANÁLISIS POLIFACÉTICO DE LAS ESPECIES DE *MICROCYSTIS***  
**(CYANOPROKARYOTA, CHROOCOCCALES) EN TRES LAGOS**  
**URBANOS DEL CENTRO DE MÉXICO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**MARTHA XÓCHITL SEGURA GUZMÁN**

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. ROSALUZ TAVERA SIERRA  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. HELGA OCHOTERENA BOOTH  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM  
DRA. GABRIELA VÁZQUEZ HURTADO  
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, INECOL

MÉXICO, CD. MX., ABRIL 2018

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

OFICIO FCIE/DEP/029/2018  
ASUNTO: Oficio de Jurado

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 23 de octubre de 2017 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en el campo de conocimiento de Sistemática del (la) alumno(a) SEGURA GUZMÁN MARTHA XOCHITL con número de cuenta 302578832 con la tesis titulada "Análisis polifacético de las especies de *Microcystis* (Cyanoprokaryota, Chroococcales) en tres lagos urbanos del centro de México", realizada bajo la dirección del (la) DRA. ROSA LUZ TAVERA SIERRA:

Presidente: DR. ARTURO CARLOS II BECERRA BRACHO  
Vocal: DRA. ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ  
Secretario: DRA. HELGA OCHOTERENA BOOTH  
Suplente: DRA. CLAUDIA ANDREA SEGAL KISCHINEVZKY  
Suplente: DRA. GABRIELA VÁZQUEZ HURTADO

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 19 de enero de 2018

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGNS/MMVA/ASR/grf\*

## **Agradecimientos institucionales**

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por su apoyo académico.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) el otorgamiento de la beca número 545500/294544 (CVU/Becario) para la realización de los estudios de Maestría en el programa de Maestría en el Posgrado de Ciencias Biológicas.

Agradezco a la Dra. Rosaluz Tavera Sierra y los miembros del Comité Tutor Dra. Helga Ochoterena Booth y Dra. Gabriela Vázquez Hurtado por sus observaciones y comentarios durante el planteamiento y desarrollo del proyecto.

## Agradecimientos personales

Agradezco a mi familia su apoyo, incluidos papás, hermanos y sobrinos, que traen felicidad incalculable y un impulso desconocido para hacer las cosas bien.

Agradezco a los titulares e integrantes del Laboratorio de Algas Continentales. Ecología y Taxonomía (LACET) de la Facultad de Ciencias, UNAM. A Rosi por el apoyo incondicional en la construcción y realización del proyecto, por su dedicación y paciencia para discutir y resolver dificultades; por el espacio y atención que siempre tiene para todos sus alumnos. A Eberto por recordarnos la importancia de cada uno de nosotros en la integración y funcionamiento del laboratorio y a Lupita por su calidez e instrucción en el laboratorio.

A Nonor y Ale por ser cercanas, compartir su pasión por la ficología y mantenerse atentas en construir una amistad honesta que trasciende el laboratorio. A Beatriz, Eva, Mari, por su retroalimentación en temas relacionados con mi trabajo y la grata experiencia en campo.

A los estudiantes que se han incorporado temporalmente al laboratorio y que nos impulsan a compartir nuestros conocimientos y experiencia.

Fuera del laboratorio, agradezco a un grupo de personas especialmente queridas e importantes para mí: Miguel, Hilda, Fabiola, Fernando, Alex y Luis, por seguir cercanos sin importar el tiempo y la distancia. Son mi segunda familia.

En el aspecto técnico, agradezco a Angélica por compartir su tiempo y experiencia en la parte molecular del proyecto. Agradezco también a la M. en C. Remedios Ramírez Rangel y M. en C. David Melquiades Medina Pérez por su apoyo durante el inicio del establecimiento de las técnicas moleculares.

**La mente es como un paracaídas... sólo funciona si la tenemos abierta.**

*Albert Einstein*



# Índice

Contenido	Página
Carátula	
Agradecimientos institucionales	
Agradecimientos personales	
Índice	
Lista de figuras y cuadros	
Resumen	
Abstract	1
Introducción	2
Aspectos taxonómicos del género <i>Microcystis</i>	2
Concepto de especie y fuentes de información taxonómica	4
La incorporación de la información genética al estudio de especies de <i>Microcystis</i> : historia del enfoque polifacético	5
Utilización de un acercamiento polifacético de <i>Microcystis</i> planteado en el estudio presente	6
Antecedentes	9
Estudios sobre florecimientos de <i>Microcystis</i> en México	9
Antecedentes de estudios polifacéticos de cianoprocariontes y en <i>Microcystis</i>	9
Sitios de estudio	10
Lago Mayor de la segunda sección de Chapultepec, CdMx	11
Embalse Valle de Bravo, Edo. Méx.	11
Lago de Chalco, CdMx / Edo. Mex.	12
Objetivos general y particulares	15
Material, equipo y métodos	13
Toma de muestras biológicas.	16
Determinación de factores ambientales, nutrimentos e iones principales	17
Recolección de material biológico y determinación taxonómica	18
Métodos moleculares	20
Extracción y cuantificación de DNA	20
Amplificación por PCR y electroforesis en gel por gradiente desnaturizante (DGGE)	20
Preparación de productos de PCR como muestras para los geles DGGE	23
Geles DGGE	23
Análisis de secuencias y estructuras secundarias	25

Resultados	27
Riqueza de especies de <i>Microcystis</i> .	31
Diversidad genética de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA en las poblaciones de <i>Microcystis</i> .	41
Análisis de secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de <i>Microcystis</i> .	45
Estructuras secundarias de la hélice D y caja B de la secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de <i>Microcystis</i> .	54
Determinación de las condiciones ambientales de los tres sitios estudiados.	59
Discusión	62
Riqueza de especies de <i>Microcystis</i> , variantes morfológicas y su relación con el ambiente	62
Diversidad genética y análisis de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i>	64
Importancia de la estructura secundaria de los sectores hélice D, caja B y temperatura	66
Perspectivas hacia la circunscripción de especies de <i>Microcystis</i>	68
Conclusiones	69
Literatura citada	70
Apéndice 1. Factores ambientales importantes para el crecimiento de <i>Microcystis</i> .	80
Apéndice 2. Estudio de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal en <i>Microcystis</i>	82
Apéndice 3. Resultados de los análisis de máxima parsimonia e inferencia bayesiana	83
Apéndice 4. Matriz de distancias <i>p</i> entre las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i> utilizadas en los análisis filogenéticos.	86
Apéndice 5. Tipologías de las estructuras secundarias de la hélice D y caja B de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i>	90
Apéndice 6. Análisis de Piper para la interpretación del tipo de agua de acuerdo con las concentraciones de los iones principales.	96

Figuras	Título
1	Representación esquemática y de estructura secundaria de un operón rDNA ribosomal de <i>Microcystis</i> .
2	Mapa de los tres sitios de estudio.
3	Esquema del diagrama de Piper.
4	Diagrama de flujo que resume el trabajo molecular.
5	Diversidad de especies y morfotipos de <i>Microcystis</i> en el Lago Mayor de Chapultepec.
6	Diversidad de especies y morfotipos de <i>Microcystis</i> en Valle de Bravo.
7	Diversidad de especies y morfotipos de <i>Microcystis</i> en el Lago de Chalco.
8	Datos gráficos de la tabla de contingencia.
9	Perfil del gel DGGE de la diversidad genética de secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i> en los tres sitios estudiados.
10	Alineamiento de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de las diez secuencias de <i>Microcystis</i> obtenidas en el presente trabajo.
11	Análisis de distancia Neighbor Joining inferido con secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i> .
12	Análisis de máxima verosimilitud obtenido con secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i> .
13	Secuencias que codifican para los sectores hélice D (a) y caja B (b) de la región ITS 16S-23S rDNA de algunas secuencias de <i>Microcystis</i> provenientes de bases de datos y de las secuencias obtenidas en el gel DGGE.
14	Árbol de máxima verosimilitud complementado con las topologías correspondientes de la hélice D (en verde) y caja B (en rosa) de cada secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i> .
15	Árbol de máxima verosimilitud complementado con la temperatura ambiental de la región y país de origen de cada secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i> .
16	Diagramas de Maucha que muestran la proporción relativa de cada ión cuantificado en los tres sitios.
17	Estructura secundaria de la hélice D, a partir del reconocimiento de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal.
18	Análisis de parsimonia inferido con secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i> .
19	Análisis de inferencia bayesiana obtenido con secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i> .
20	Diversidad de topologías de la hélice D y caja B presentadas en las secuencias de DNA que formaron cada clado del análisis de máxima verosimilitud.
21	Diagrama de Piper que representa el perfil iónico de los tres sitios.

Cuadros	Título
1	Ejemplos de especies de <i>Microcystis</i> documentadas en la literatura.
2	Condiciones climatológicas actuales de los tres cuerpos de agua estudiados.
3	Tipo de datos y muestras obtenidos y analizados en el trabajo presente.
4	Oligonucleótidos utilizados para la PCR anidada.
5	Presencia de las especies y morfotipos de <i>Microcystis</i> en Chapultepec, Valle de Bravo y Chalco en las temporadas de lluvia (LL) y seca (S).
6	Tabla de contingencia para Chi cuadrada.
7	Prueba de independencia entre las filas y columnas (Chi-cuadrada).
8	Frecuencias teóricas y proporciones por columna de la prueba Chi cuadrada.
9	Número de secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de las poblaciones de <i>Microcystis</i> para los tres lagos y las especies de <i>Microcystis</i> observadas y compartidas (sombreado gris claro) en las temporadas de lluvia (LL) y seca (S).
10	Bandas recortadas del gel DGGE y pertenecientes a la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i> .
11	Referencias de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de <i>Microcystis</i> utilizadas con fines comparativos.
12	Condiciones de los análisis de distancia, parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana para las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i> .
13	Relación entre la posible identidad de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de las poblaciones de <i>Microcystis</i> de los lagos mexicanos.
14	Datos de factores fisicoquímicos y concentración de iones de los tres sitios estudiados.
15	Condiciones del análisis de parsimonia realizado con el software PAUP4.0.
16	Matriz de distancias p entre las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de <i>Microcystis</i> analizadas en este trabajo.
17	Detalle de las topologías obtenidas del sector hélice D, a partir de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i> obtenidas en este trabajo y de GenBank.
18	Detalle de las topologías obtenidas del sector caja B, a partir de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de <i>Microcystis</i> obtenidas en este trabajo y otras en GenBank.

## Resumen

*Microcystis* (Chroococcales, Cyanoprokaryota) es un género de cianoprocariontes conocido a nivel mundial por formar florecimientos generalmente tóxicos en cuerpos de agua epicontinentales. La situación taxonómica de sus especies es problemática por la falta de congruencia entre la morfología y la información genética de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA. Con el objetivo de integrar las diferentes fuentes de información (morfológica, genética y ambiental) para las especies de *Microcystis* en México, en este trabajo se realizó un estudio polifacético de las poblaciones de *Microcystis* de tres lagos urbanos de la región central de México: Lago Mayor de Chapultepec, el embalse Valle de Bravo y el lago de Chalco, durante dos temporadas de muestreo, seca y de lluvias.

La determinación de especies se realizó con microscopía fotónica; la diversidad genética de las poblaciones de *Microcystis* se obtuvo con el marcador de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA a través de la amplificación por PCR acoplada a DGGE. Las secuencias obtenidas se utilizaron para construir filogenias por Máxima Verosimilitud y también para obtener las estructuras secundarias de los sectores internos de la región ITS 16S-23S rDNA hélice D y la caja B para complementar el análisis de las secuencias. Respecto a las condiciones ambientales, se determinaron los factores fisicoquímicos y el perfil hidroquímico para cada sitio.

Los resultados mostraron una riqueza de siete especies, de las cuales *M. ichthyoblabe* y *M. aeruginosa* presentaron variantes morfológicas o morfotipos. Se determinó un total de 10 secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de poblaciones de *Microcystis* en los tres sitios de estudio, las cuales no mostraron una correspondencia con el número de especies determinadas morfológicamente. La presencia de las especies, variantes morfológicas y la diversidad genética se relacionó con las condiciones ambientales particulares de cada lago y con la temporada de muestreo.

La filogenia construida con un tamaño de muestra de 40 secuencias, diez de ellas obtenidas en este trabajo y 30 de GenBank, presentó tres clados principales, en los cuales las secuencias de DNA mexicanas se asociaron con secuencias de *M. ichthyoblabe* y *M. aeruginosa* principalmente, lo cual coincidió con las especies identificadas morfológicamente en los tres sitios estudiados. Los sectores hélice D y caja B así como la temperatura, mostraron ser caracteres importantes a analizar las relaciones de parentesco entre las poblaciones de *Microcystis*. El valor de bootstrap soportó las relaciones de un número reducido de grupos, indicio de la necesidad de abarcar un mayor número de marcadores de distintos genes para fortalecer la circunscripción de las especies de *Microcystis*.

El estudio presente indica que el enfoque polifacético que contemple información morfológica y ambiental detalladas y un número mayor de marcadores moleculares es necesario para la circunscripción de especies de *Microcystis*. Es un trabajo complejo que se encuentra en proceso.

## Abstract

*Microcystis* (Chroococcales, Cyanoprokaryota) is a cyanoprokaryote genus known for developing toxic blooms in epicontinental waters worldwide. The lack of congruence between the morphological and genetic information of the 16S-23S ITS rDNA-codifying region in the species has derived in a problematic taxonomical status. The aim of this study was to elaborate a multifaceted approach integrating morphological, genetic and environmental aspects of *Microcystis* populations occurring in the three Mexican urban lakes Lago Mayor de Chapultepec, Valle de Bravo and Lago de Chalco during dry and rainy seasons.

The species determination was carried out under a photon microscope; the genetic diversity of *Microcystis* populations was analyzed using the 16S-23S ITS rDNA region sequences as the molecular marker through the PCR-DGGE technique. The resulting bands and sequences were used to construct phylogenies using maximum likelihood and also to obtain the secondary structure of the 16S-23S ITS rDNA region sectors D helix and B box to complement the sequence analysis. Physicochemical variables and hydrochemical profiles were obtained for each lake to analyse the environmental aspect of the study.

The results showed a species richness of seven species, of which *M. ichthyoblabe* and *M. aeruginosa* presented morphological variations or morphotypes. Ten 16S-23S ITS rDNA region coding sequences were obtained from the *Microcystis* populations in the three lakes, which showed no correspondence to the number of species morphologically determined. The presence of the species and morphotypes as well as the genetic diversity was influenced by the particular environmental conditions of each lake and also to the sampling season.

The phylogeny was constructed with 40 sequences, ten of them obtained in this study and 30 obtained from GenBank. The tree presented three principal clades where the Mexican DNA sequences were associated mainly to *M. ichthyoblabe* and *M. aeruginosa*, which was consistent with the species determination in the lakes. The consideration of D helix and B box sectors from the 16S-23S ITS rDNA region and the temperature as supporting features to the sequence analysis was important to analyze the relationships between *Microcystis* populations. The bootstrap value supported a reduced number of clades and reflected the need to include more molecular markers to strengthen *Microcystis* species circumscription.

The present study indicates the need for the application of a multifaceted approach that includes morphological and environmental detailed characters and more molecular markers to circumscribe the *Microcystis* species. It is a complex work in progress.

## Introducción

### Aspectos taxonómicos del género *Microcystis*

Los cianoprocariontes son microorganismos pertenecientes al reino monera, división Eubacteria, clase Cyanobacteria, que realizan fotosíntesis oxigénica y contienen clorofila *a*. Este grupo comprende organismos uni y multicelulares.

El género *Microcystis* pertenece al orden Chroococcales, de la clase Cyanobacteria y se encuentra dentro de la familia Microcystaceae Elenkin 1933 (Komárek & Anagnostidis, 1999). Las especies de este género, descrito por Kützing ex Lemmermann en 1907, crecen en colonias, tienen una forma de vida planctónica y habitan en cuerpos de agua no salinos templados y tropicales, en ambientes desde oligotróficos hasta hipereutróficos. Bajo condiciones ambientales particulares de cantidad de luz, alta concentración de nutrimentos, alta temperatura y concentración de oxígeno disuelto entre otras (ver Apéndice 1), las poblaciones de *Microcystis* aumentan de manera excesiva y forman florecimientos superficiales potencialmente tóxicos por la producción de microcistinas por algunas especies. Las microcistinas son un tipo de toxina que afectan al hombre y otros mamíferos si se ingieren o respiran.

La amplia variabilidad morfológica de las colonias es la base de la taxonomía de las especies de *Microcystis* bajo el Código Internacional de Nomenclatura para plantas, hongos y algas (International Code of Nomenclature for algae, fungi and plants, ICN), considerado en el trabajo presente. A continuación se proporciona la descripción del género de acuerdo con Komárek & Anagnostidis (1999):

#### ***Microcystis* Kützing**

*Microcystis* Kützing ex Lemmermann nom. cons.

Las colonias son de tamaño microscópico; cuando crecen mucho son visibles macroscópicamente; son de forma esférica, oval, lobada a irregulares o alargadas; en algunas especies son clatradas o compactas y en otras están compuestas por subcolonias; la disposición de las células en las colonias es irregular, densa o laxa. Las colonias están envueltas en una vaina mucilaginosa. Las células son de forma esférica o cocoide, con aerotopos en su interior. La división celular es por fisión binaria en tres planos perpendiculares entre sí y antes de la división celular alcanzan su tamaño original. La multiplicación de *Microcystis* es por desintegración de las colonias en pequeños grupos de células o por liberación de células individuales.

De las características morfológicas anteriores, la forma de las colonias, el tamaño de las células, su disposición dentro de las colonias y las características del mucílago, son algunos de los aspectos principales considerados para argumentar la taxonomía de las especies de *Microcystis* (Watanabe, 1996; Komárek & Anagnostidis, 1999). Bajo estos criterios, Komárek & Anagnostidis (1999) reconocieron diez especies en Europa y otras once especies para zonas fuera de Europa, y mencionaron otras diez especies

que debían ser revisadas aún. Posteriormente, Komárek *et al.* (2002) reconocieron dos especies para regiones tropicales de América, cuyas descripciones incluyeron información sobre la distribución geográfica y la condición trófica del sitio donde se registraron. Actualmente, se han reconocido con criterios morfológicos un total de 23 especies de *Microcystis* provenientes de sitios templados y tropicales, y que han sido registradas en el trabajo de revisión de *Microcystis* de Komárek & Komárková (2002) (Guiry & Guiry, 2017). Como ejemplo de su distribución, en el cuadro 1 se presentan algunas especies documentadas en trabajos taxonómicos y los países donde se han registrado, de acuerdo con AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2017) y la literatura.

**Cuadro 1.** Ejemplos de la amplia distribución de especies de *Microcystis*.

<b>Especie</b>	<b>País donde se ha registrado</b>
<b><i>Microcystis aeruginosa</i></b>	Suecia, Reino Unido, Alemania, España, Portugal, Estados Unidos, México, Brasil, Bolivia, Argentina, Turquía, China, Uganda, Kenia, Australia
<b><i>M. ichthyoblabe</i></b>	Vietnam, Japón, Bélgica, Marruecos, Israel, China, Australia, Nueva Zelanda
<b><i>M. wesenbergii</i></b>	Japón, Alemania, Cuba, Argentina, Brasil, Israel, China, Corea, Singapur, Australia, Nueva Zelanda, México (no publicado)
<b><i>M. novacekii</i></b>	Rumania, Arkansas, China, Nueva Zelanda, España, Alemania, Brasil, China
<b><i>M. flos-aquae</i></b>	Inglaterra, Alemania, Rumania, Estados Unidos, México, China, Japón, Singapur, Vietnam, Israel, Pakistán, Australia, Nueva Zelanda.
<b><i>M. viridis</i></b>	Alemania, Rumania, Israel, Korea, Japón, Australia, Nueva Zelanda.
<b><i>M. panniformis</i></b>	Brasil, México
<b><i>M. protocystis</i></b>	Brasil, México
<b><i>M. pseudofilamentosa</i></b>	Suroeste de Asia, Pakistán, Vietnam
<b><i>M. ramosa</i></b>	Vietnam
<b><i>M. robusta</i></b>	Vietnam

En algunas ocasiones el número de especies reconocidas en un sitio particular depende del criterio del investigador para evaluar las características morfológicas de los organismos, lo que modifica el entendimiento de la distribución geográfica para muchas especies. El criterio de los autores también resulta en controversia sobre el número de especies que deben reconocerse dentro del género. Por ejemplo, Komárek & Anagnostidis (1999) distinguieron diferencias precisas entre *M. ichthyoblabe* y *M. flos-aquae* en el diámetro celular y en la distribución de las células en las colonias, pero Watanabe (1996) consideró que se trataba solamente de *M. ichthyoblabe*, y que el reconocimiento de *M. flos-aquae*, se debe a una confusión por considerar colonias pequeñas de *M. ichthyoblabe* con una distribución celular homogénea.



A excepción del caso de *M. flos-aquae* antes mencionado, la taxonomía de *Microcystis* podría considerarse estable, pero los resultados con cultivos han mostrado un panorama diferente. Los trabajos de Kato *et al.* (1991) y Otsuka *et al.* (2001) reportaron el cambio morfológico de algunas especies al estar expuestas a condiciones de cultivo distintas, al grado de poder ser consideradas como especies diferentes, lo que representa una gran plasticidad fenotípica de dichas especies. Otsuka *et al.* (2000) plantearon con anterioridad que ha sido un problema que las especies existentes se hayan descrito basándose únicamente en muestras naturales y en características morfológicas, mientras que poco se ha hecho sobre el examen morfológico de cepas cultivadas.

La conclusión fue que una misma especie podía tener varios tipos de colonias que podían ser circunscritas como especies distintas (Otsuka *et al.*, 2000). Esta situación hizo evidente la necesidad de complementar la morfología con otras fuentes de información, como caracteres bioquímicos, fisiológicos o genéticos que sirvieran para circunscribir mejor a las especies de *Microcystis* (Otsuka *et al.*, 2001), lo cual también se reflejó en el concepto de especie y se retomó el concepto de “morfoespecie” (Komárek *et al.*, 1991), que empezó a ser más frecuente en la literatura. Tal vez porque el manejo del término no fue suficientemente explícito, ‘morfoespecie’ se utilizó algunas veces como equivalente de ‘especie’ principalmente para la descripción de especies nuevas, por ejemplo *Microcystis panniformis*, proveniente de Brasil (Komárek *et al.*, 2002).

La literatura sobre la identificación de especies de *Microcystis* es vasta, pero son pocos los trabajos que abordan con detalle la diversidad morfológica (Ngüyen *et al.*, 2012; Sanchis *et al.*, 2004; Otsuka *et al.*, 1999), útil para comparar distintas poblaciones de *Microcystis*. Paralelamente, los trabajos genéticos y las secuencias obtenidas y depositadas en bases de datos que han ido en aumento carecen de un respaldo morfológico más allá del epíteto asignado. Al sumar ambos factores, nos enfrentamos con poca información genética respaldada por una identificación morfológica confiable. Tal vez esta sea una de las razones por las que las secuencias de la base de datos GenBank (NCBI) remiten a varias especies en lugar de una sola.

### **Concepto de especie y fuentes de información taxonómica**

Como sucede con *Microcystis*, la utilización del concepto tipológico de especie resulta inadecuada para muchos más cianoprocariontes. La descripción de los organismos, basada en muestras de poblaciones naturales, frecuentemente excluye su variabilidad morfológica durante su ciclo de vida o como resultado de las condiciones ambientales a las que están expuestos. La intención reciente de abordar un acercamiento polifacético en la taxonomía y sistemática de los cianoprocariontes ha permitido que las fuentes de información morfológicas, ecológicas, fisiológicas y genéticas tengan la misma importancia para la circunscripción de especies (Johansen & Casamatta, 2005; Johansen *et al.*, 2011), y aún sin contar con todos estos elementos, exista la posibilidad de sugerir la existencia de especies distintas (Johansen & Casamatta, 2005). En *Microcystis*, Komárek & Anagnostidis (1999) reconocieron la importancia de considerar también las condiciones tróficas y situación latitudinal y climática de los lagos donde habitan distintas poblaciones de *Microcystis*, para distinguir especies. Actualmente, la intención de reunir todas

las características mencionadas para conformar una taxonomía integral (polifacética) podría ser la tendencia en la sistemática del género (Komárek *et al.*, 2014; Dvorák *et al.*, 2015).

Dentro del análisis genético, algunos estudios han mostrado que la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal y la estructura secundaria de los sectores internos que la componen, tienen valor taxonómico y parecen apoyar las hipótesis sistemáticas en combinación con la morfología, pero en ocasiones, las características morfológicas y genéticas son tan coincidentes, que la información ecológica se vuelve determinante para la distinción entre especies, por ejemplo en el género *Nostoc* (Johansen *et al.*, 2011).

Con estas consideraciones como contexto, en este trabajo se resaltó especialmente la morfología de cada colonia diferente observada y se comparó con las especies descritas originalmente (Komárek & Anagnostidis, 1999; Komárek *et al.*, 2002), para conocer los límites respecto a éstas. La información ecológica o ambiental, la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal y específicamente la estructura secundaria de la hélice D y la caja B, se tomaron como elementos igualmente importantes para esa delimitación. Esto es lo que consideramos un enfoque polifacético.

En el trabajo presente, se utilizará el término “riqueza de especies” para referirse al número de especies de *Microcystis* presentes en una localidad, resultado de la determinación morfológica realizada bajo el microscopio.

### **La incorporación de la información genética al estudio de especies de *Microcystis*: historia del enfoque polifacético**

Inició con Neilan *et al.* (1997) y Otsuka *et al.* (2000, 2001), con el uso de la secuencia que codifica para el gen 16S rDNA ribosomal, pero los resultados mostraron que era altamente conservado, los valores de hibridización eran muy altos y podría ser utilizado para distinguir solamente géneros y no especies; además, reconocieron que el gen no reflejaba las adaptaciones morfológicas, funcionales o geográficas de las cepas de *Microcystis*. Con estos resultados y la obtención de árboles filogenéticos (Neilan *et al.*, 1997; Otsuka *et al.*, 1998), estos autores propusieron la unificación de las cinco especies de *Microcystis* más comúnmente reportadas en la literatura (*M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii*, *M. viridis* y *M. wesenbergii*). En esta propuesta se apegaron al Código Internacional de Nomenclatura Bacteriológica, según el cual, si el porcentaje de hibridización en el gen 16S ribosomal entre dos especies potenciales es mayor al 70%, se considera una misma especie. Komárek & Komárková (2002) no apoyaron su propuesta, pues denotaron que esas cinco especies de *Microcystis* (‘morfoespecies’ para ellos) que estudiaron Otsuka *et al.* (2001) en realidad existen y ocurren en diferentes regiones geográficas, con la misma ecología, y poseen características fenotípicas y ecofisiológicas que no pueden simplemente eliminarse ante el argumento genético como criterio único. Además, sostuvieron que la unificación taxonómica con base en el parecido de algunas secuencias parece prematura, y deberá reservarse hasta que la diversidad fisiológica y morfológica sea explicada.

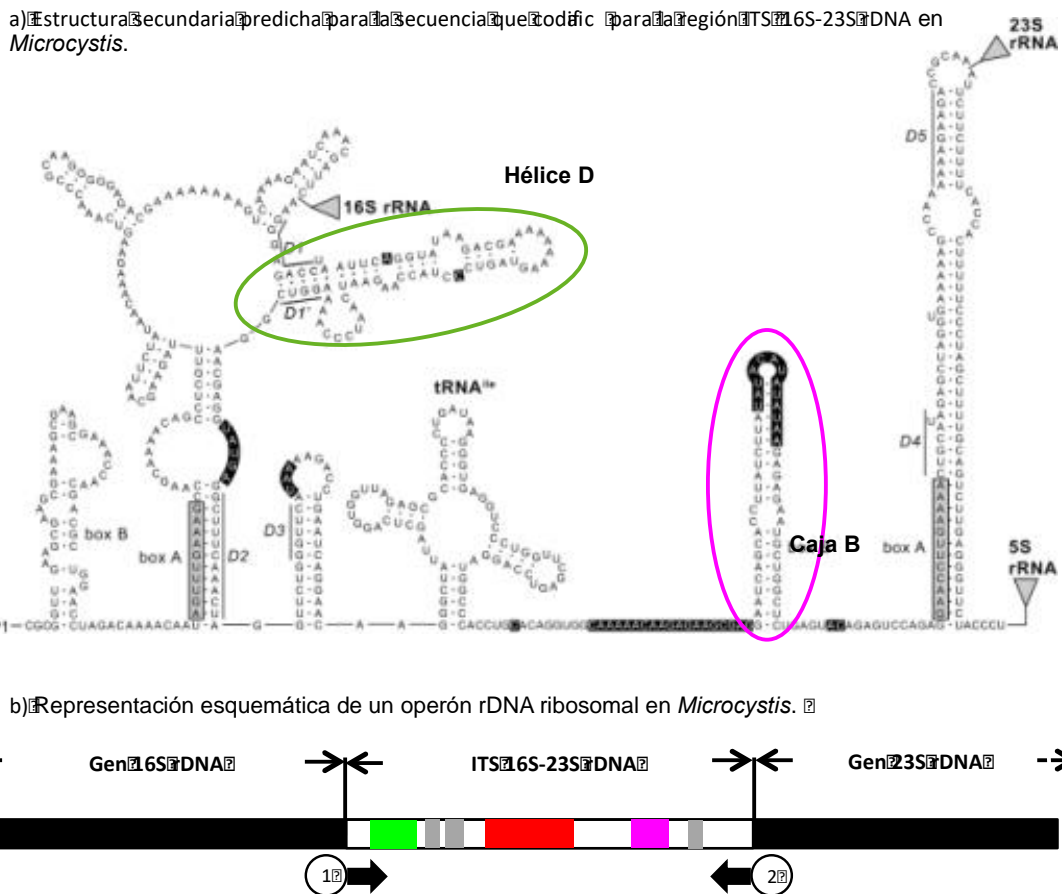
También Bittencourt-Oliveira *et al.* (2001) abordaron la genética del género, pero comparando las secuencias de los genes *cpcBA*, que codifican para las subunidades de los ficobilisomas, entre cepas de *M. aeruginosa* con varios morfotipos provenientes de Brasil, y otras secuencias de GenBank con nombres asignados de *M. aeruginosa*, *M. viridis* y *M. wesenbergii*. El análisis de distancia realizado con las secuencias de Brasil y de bases de datos mostró grupos distintos para *M. aeruginosa*, *M. viridis* y *M. wesenbergii*, es decir, que las características morfológicas que identificaron a cada especie fueron consecuentes con las secuencias que codifican para los genes *cpcBA*, lo que podría estar apoyando la circunscripción de las especies basada en la morfología. Desafortunadamente, el número de secuencias de este marcador son escasas en las bases de datos.

Otro marcador que se ha estudiado es la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal, que se encuentra entre las secuencias que codifican para los genes 16S y 23S rDNA ribosomales en procariontes. Esta región está constituida a su vez por sectores internos, algunos de los cuales presentan variación en sus secuencias que los hacen útiles como marcadores a nivel intraespecífico (Jonahsen *et al.*, 2011). Se han realizado estudios con la secuencia completa de esta región ribosomal y con secuencias parciales, utilizando algunos de los sectores internos, de menor longitud (Fig. 1). En *Microcystis*, el tamaño completo de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal es aproximadamente 550 pb y se han utilizado dos de los sectores internos denominados hélice D y caja B. Los estudios con la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis* han mostrado distintos resultados, como la falta de correspondencia entre la asignación de un epíteto y la identidad genética (Janse *et al.*, 2003; 2004), la falta de relación entre la diversidad genética y una regionalización geográfica (van Gremberghe *et al.*, 2011) y la falta de correspondencia entre el número de especies morfológicas y el número de secuencias detectadas, cuyo número puede ser mayor o menor. De acuerdo con el estudio realizado por Schirrmeister *et al.* (2012), *Microcystis* posee dos copias del operón *rrn*, es decir dos copias del sitio donde se encuentran los genes ribosomales, y aseguran que la variabilidad dentro de las secuencias que codifican para el gen 16S rDNA ribosomal no afectaría la confiabilidad de este gen como marcador taxonómico. Nosotros esperamos que la misma situación sea aplicable para la utilización de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal como marcador con valor taxonómico y sistemático, al considerar ambas copias de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal como secuencias homólogas.

### **Utilización de un acercamiento polifacético de *Microcystis* planteado en este estudio**

A través del interés en el desarrollo de florecimientos tóxicos en aguas recreativas, elaboramos un estudio previo sobre *Microcystis* en el Lago Mayor de Chapultepec (Segura, 2012), en el que fue necesario involucrarse en la definición y delimitación morfológica de especies de *Microcystis*. En este estudio se destacó la importancia de dictaminar con precisión cuáles especies componen un florecimiento tóxico, para tener certeza de las posibles medidas de control o de remediación. Se encontró que las especies de *Microcystis* determinadas no coincidieron en todos los aspectos con los registros de la literatura, y en el caso de *M. cfr. ichthyoblabe*, por ejemplo, su identidad no pudo ser confirmada por su distribución geográfica, puesto que no ha sido registrada anteriormente en sitios tropicales (Komárek & Anagnostidis, 1999; Komárek *et al.*, 2002; Sabour *et al.*, 2002).

En el trabajo de Segura (2012), realizado en octubre de 2010, correspondiente a la época seca, se distinguieron en total cinco especies en el Lago Mayor de la segunda sección de Chapultepec: *Microcystis* cfr. *ichthyoblabe*, *M. panniformis*, *M. flos-aquae*, *M. protocystis* y *M. aeruginosa* (Segura, 2012), pero observamos que los caracteres diacríticos fueron sumamente variables en nuestras poblaciones y de acuerdo con Otsuka *et al.* (1999, 2000), esto ocurre comúnmente tanto en condiciones naturales como de cultivo. Esta situación fundamentó nuestro planteamiento actual, que consideramos holístico, antes de profundizar solamente en los aspectos ecológicos relacionados con la bioquímica y fisiología de especies de *Microcystis* (por ejemplo, la producción de toxinas).



**Figura 1.** Representación esquemática y de estructura secundaria de un operón rDNA ribosomal de *Microcystis*. a) Estructura secundaria predicha de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA en procariontes. El operón transcrito mostrado es la secuencia líder 5' que va desde la secuencia 16S rRNA, el ITS 16S-23S rDNA y el espaciador 23S-5S rRNA de la cepa *Microcystis* NIES843 (EMBL número de acceso AP009552). La ubicación de las secuencias codificantes de los genes 16S rRNA, 23S rRNA y 5S rRNA se representa con triángulos color gris claro. Se indican los sectores internos del ITS, entre ellos la hélice D (verde), el gen tRNA<sup>le</sup>, la caja B (magenta), los motivos conservados (D1-D5) y las posiciones de las regiones hipervariables con fondo negro. Tomado de van Gremberghe *et al.* (2011). b) Representación esquemática de un operón rDNA, con la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal localizada entre las secuencias correspondientes a los genes 16S y 23S rDNA. Se indican con colores los sectores internos hélice D (verde) y caja B (magenta) de la región ITS 16S-23S rDNA (ver Figura 10 para más información) y la posición correspondiente de los oligonucleótidos 1 y 2 utilizados en la aplicación y secuenciación de las muestras obtenidas en el trabajo presente.

Proponemos el proyecto presente como un acercamiento polifacético al estudio de *Microcystis*, pues se realizaron estudios morfológicos, genéticos y ambientales de poblaciones naturales de dicho género de cianoprocariontes en dos temporadas climáticas distintas. La determinación de especies a nivel morfológico se trabajó cuidadosamente. Por otro lado, el estudio genético consistió en la realización de geles DGGE que permitieron la separación y obtención de secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis* a partir de muestras complejas de comunidad (Janse *et al.*, 2003; Tavera & Díez, 2009). Posteriormente, con las secuencias obtenidas se realizaron análisis filogenéticos comparando las secuencias de México con otras de distintos países. La utilización de secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA como marcador a nivel de especie está respaldada en varios trabajos de otros géneros de cianoprocariontes así como el análisis de su estructura secundaria (p. ej. Osorio-Santos *et al.*, 2014). El análisis de la situación ambiental consistió en la determinación de factores fisicoquímicos e hidroquímicos de cada sitio. Nuestro objetivo fue conocer la importancia de la aplicación de un análisis polifacético a un conjunto de especies problemáticas de *Microcystis*, ya que su circunscripción no está resuelta.

En los tres sitios existe una alta riqueza de especies que no corresponde con la diversidad de secuencias de DNA determinada en las temporadas de muestreo, lo que implica que la morfología de las colonias (y que lleva a la identificación de especies) no siempre responde de forma paralela a la información genética, es decir, que se trate de cambios en la morfología que son una respuesta ambiental. Se discute la importancia del estudio de las especies junto con su ambiente porque la información genética de estructura secundaria muestra una potencial relación de esta con los valores de temperatura de los lagos. El análisis de estructura secundaria de los sectores de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA es el primero que se realiza para *Microcystis*.

## Antecedentes

### Estudios sobre florecimientos de *Microcystis* en México

La presencia de florecimientos tóxicos de cianoprocariontes es un síntoma de deterioro o eutrofización de los cuerpos de agua, y en muchos casos es resultado de la actividad antropogénica. En la región central de nuestro país, se han estudiado diversos florecimientos tóxicos compuestos en parte o en su totalidad por especies de *Microcystis*. Dichos estudios se han centrado en la caracterización taxonómica y toxicológica de los florecimientos, al determinar morfológicamente las especies y al cuantificar la concentración intracelular o extracelular (en el agua) de microcistina-LR, una de las hepatotoxinas más peligrosas (Vasconcelos *et al.*, 2010; Segura, 2012, Ortiz, 2013).

Analizamos el caso del Lago Mayor de la Segunda Sección de Chapultepec, uno de los principales lagos artificiales de la Ciudad de México por su belleza estética, por su ubicación y por las actividades de recreación que en él se practican, que es afectado por florecimientos de *Microcystis*. En 2010, Vasconcelos *et al.* (2010) reportaron la presencia de un florecimiento tóxico dominado por *M. aeruginosa*, *M. panniformis* y *M. protocystis*, mientras que Segura (2012) reportó también la presencia de un florecimiento tóxico compuesto por las especies anteriores además de *M. ichthyoblabe* y *M. flos-aquae*. Ambos estudios podrían indicar que en un periodo de tres años, algunas especies permanecieron en el lago formando parte de los florecimientos, mientras que otras pueden estar presentes por temporadas. No obstante, no es posible obtener una conclusión por la falta de estudios entre ambas fechas.

Por otro lado, en el embalse Valle de Bravo se han reportado florecimientos tóxicos compuestos por *Microcystis aeruginosa* (Ramírez *et al.*, 2002) y recientemente por *M. wesenbergii* y *M. botrys*, de las cuales, *M. wesenbergii* había sido reportada como dominante por Vasconcelos *et al.* (2010).

Además, en el Lago de Chalco se está realizando un megaproyecto que integra por primera vez el estudio del fitoplancton, lo que nos ha permitido observar la presencia de florecimientos de *Microcystis* y determinar las especies.

De todos los trabajos antes referidos, Segura (2012) y Ortiz (2013) realizaron descripciones detalladas de cada especie de *Microcystis* observada y realizaron precisiones sobre las diferencias morfológicas respecto a las características morfológicas de los organismos originalmente descritos, los cuales provienen generalmente de regiones templadas y posiblemente se trate de especies distintas, como se aborda más adelante en este trabajo.

### Antecedentes de estudios polifacéticos de cianoprocariontes y en *Microcystis*

En México, existen al menos dos trabajos relacionados con la complementación de información morfológica para la determinación taxonómica y la información molecular aportada por la secuencia que codifica para el gen 16S rDNA ribosomal para cianoprocariontes. Tavera & Díez (2009) analizaron el fitoplancton en distintos canales de Xochimilco y obtuvieron la información de los datos ambientales,

determinaron a las especies con criterios morfológicos y obtuvieron información molecular a través de la técnica PCR-DGGE, que les permitió obtener un perfil de la diversidad de especies y corroborar la identidad determinada bajo el microscopio con la información molecular. Por otro lado, Pineda *et al.* (2009) estudiaron una cianoprocarionte filamentosa cuyas características morfológicas no variaron al ser cultivadas y tampoco entre una misma cepa. No obstante, en el caso de *Microcystis*, la secuencia que codifica para el gen 16S rDNA ribosomal se encuentra muy conservado y no es posible utilizarla para la distinción de especies, y por eso se recurrió al estudio de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal, la cual varía a nivel de especies en cianoprocariontes y ha probado ser útil para discriminar a nivel de especies.

El planteamiento original para el estudio presente y el correcto para abordar este problema de circunscripción de especies habría sido trabajar con especies individuales en cultivo, para así tener la información morfológica, genética y ambiental acotada a un solo tipo de organismo. Sin embargo, por problemas técnicos no fue posible tener cultivos y recurrimos a trabajar con poblaciones naturales de *Microcystis* tomadas de tres lagos urbanos que presentan florecimientos de *Microcystis*. Como consecuencia, lo anterior implicó no saber a qué especie o morfotipo en particular corresponden las secuencias de DNA obtenidas en el perfil genético con el gel DGGE.

### Sitios de estudio

El Lago Mayor de Chapultepec, Valle de Bravo y el Lago de Chalco son cuerpos de agua urbanos situados en latitud tropical que tienen en común la presencia de florecimientos de cianoprocariontes y la alteración de tipo antrópico. En Chapultepec y Valle de Bravo se ha documentado la presencia de florecimientos donde *Microcystis* es dominante pero para el Lago de Chalco no existe información al respecto. En Chapultepec, *Microcystis* es el único género de cianoprocariontes que forma el florecimiento y en Valle de Bravo y Chalco, estos se componen principalmente de *Microcystis* y otros cianoprocariontes de los géneros *Aphanizomenon*, *Woronichinia*, *Snowella*, *Merismopedia* y *Aphanothece* (Vasconcelos *et al.*, 2010; Segura, 2012; Valeriano-Riveros *et al.*, 2014). En los tres cuerpos de agua las muestras se recolectaron en un punto de la orilla de los lagos, donde el florecimiento de *Microcystis* fuera más abundante. Las orillas de los cuerpos de agua son un sitio particularmente adecuado para tomar muestras abundantes de los florecimientos porque allí se acumula la biomasa por acción del viento.

La alteración de tipo antrópica en los tres sitios es distinta, ya que el impacto de este factor estaría modulado por el volumen, profundidad y cercanía con la mancha urbana de cada uno. En Valle de Bravo, la actividad urbana está limitada a un área pequeña y específica a un costado del embalse que incluye el embarcadero donde se tomaron las muestras del florecimiento, mientras que Chapultepec y Chalco están inmersos en la Ciudad de México y Estado de México, respectivamente. La fuente de abastecimiento en Chapultepec y Valle de Bravo es agua tratada de segundo nivel, sumada al agua de lluvia que contribuye con una pequeña parte, mientras que Chalco depende de la lluvia y se encuentra dentro de una cuenta cerrada o endorreica (SEMARNAT - PAOT, 2009). Las actividades que se realizan en Chapultepec son recreativas, en Valle de Bravo recreativas y de abastecimiento, y en Chalco agrícolas y pecuarias.

### **Lago Mayor de la Segunda Sección de Chapultepec, Ciudad de México**

El Lago Mayor de la Segunda Sección de Chapultepec se ubica al poniente de la Ciudad de México, dentro de la Delegación Miguel Hidalgo, en las coordenadas 19°24'98''N, 99° 11'97''O y a una altitud de 2,314 m.s.n.m.. La temperatura media anual es de 15.3°C y la precipitación anual normal es de 922.2 mm (Sistema Meteorológico Nacional SMN, 2016) (tabla 2). El clima que presenta esta zona de la ciudad es templado subhúmedo.

El uso de este lago es de almacenamiento y recreativo y se alimenta con agua tratada de calidad terciaria a través de la planta de tratamiento de Chapultepec. En un principio, este sitio se destinó para la explotación de minas subterráneas de arena utilizada para la industria de la construcción, las cuales se cerraron después con otros materiales (Gobierno del Distrito Federal, Ciudad de México, 2006). A partir de su apertura al público en 1962, el Lago Mayor cobró una gran relevancia cultural y recreativa. A nivel de microambiente, el lago alberga florecimientos abundantes y anuales de *Microcystis* evidentes a simple vista (Segura, 2012).

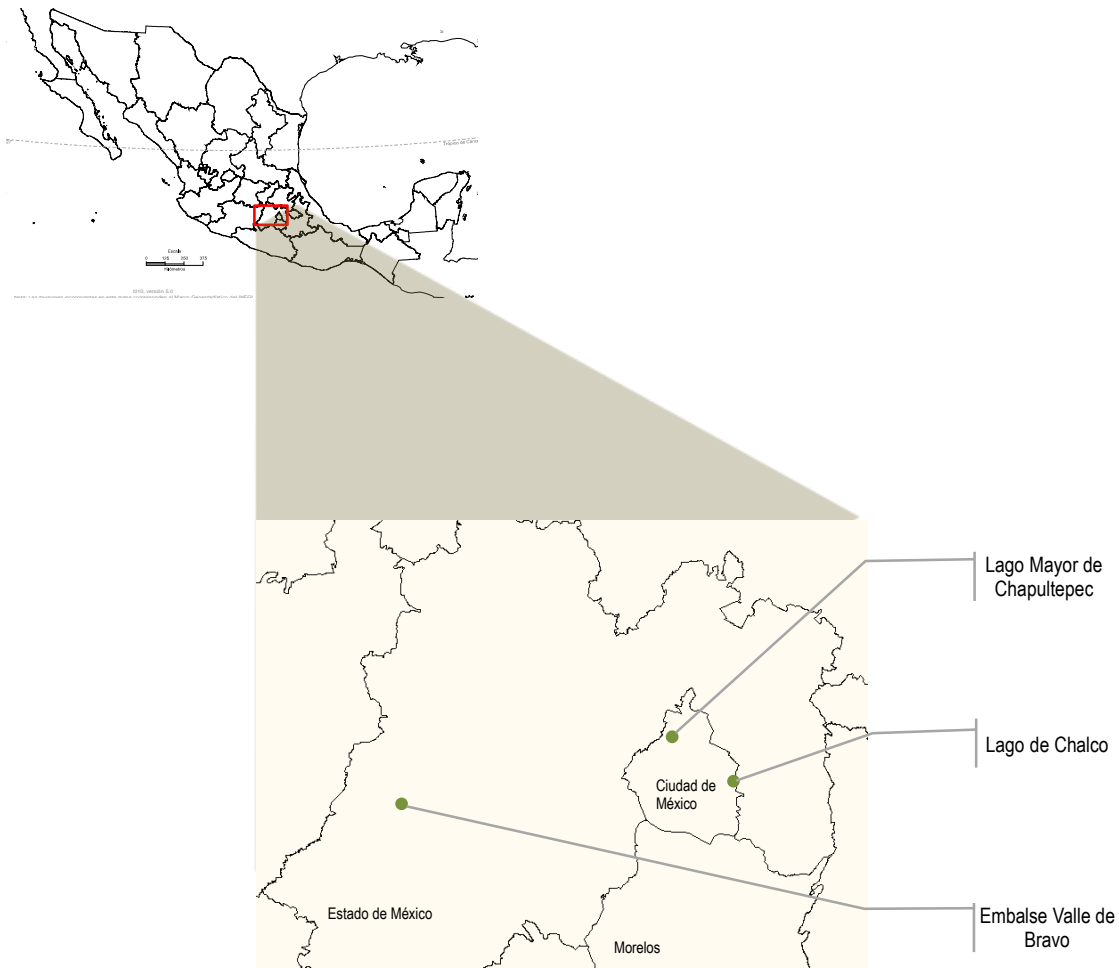
### **Embalse Valle de Bravo, Estado de México**

El embalse se localiza en el municipio de Valle de Bravo, en el Estado de México, en las coordenadas 19°21'30'' N y 100°11'00'' O, y a una altitud de 1,830 m.s.n.m. Tiene una superficie de 546.9 km<sup>2</sup>. La temperatura media anual mayor de 18° C y la del mes más frío, menor a 18° C, con lluvias en verano; la precipitación invernal se presenta entre 5% y 10.2% de la precipitación total anual (tabla 2). La temperatura promedio anual del embalse es de 15° C, lo que permite clasificarlo como cálido y también como monomítico de segundo orden (Olvera, 1992). El embalse de Valle de Bravo es una de las presas que suministra agua a la Ciudad de México, y está construida sobre basamento calcáreo, actualmente cubierto por material volcánico (Olvera, 1992).

El clima de la región es templado y semicálido húmedo con un verano fresco y prolongado. Presenta una temporada seca pronunciada (precipitaciones escasas de noviembre a mayo) y de lluvia (de junio a octubre). La temperatura media anual es de 19.3° C; las temperaturas más elevadas se registran durante el mes de mayo (hasta 22.0° C).

Las actividades realizadas en el embalse son abastecimiento, recreación y pesca, que representan recursos económicos para las poblaciones asentadas junto al embalse. El embalse ha evolucionado de oligotrófico a eutrófico (Merino-Ibarra *et al.*, 2008), y se ha reportado un nivel importante de acumulación de fósforo y un alto nivel de algas y cianoprocariontes que contribuyen con el mal olor y sabor del agua (Olvera, 1992). La presencia de florecimientos de *Microcystis* y otros cianoprocariontes, así como la presencia de microcistinas ha sido reportado anteriormente. Las muestras se recolectaron en un punto del embarcadero a orillas de Acámbaro, donde se realizan actividades turísticas y comerciales.





**Figura 2.** Mapa de los tres sitios de estudio.

### **Lago de Chalco, Ciudad de México/Estado de México**

El Lago de Chalco se sitúa en la periferia suroeste de la Ciudad de México, en las coordenadas 19°26'71''N y 98°98'25''O a una altitud de 2,240 msnm, y se encuentra rodeado de montañas de origen volcánico, entre ellas la Sierra Chichinautzin y al este los volcanes Popocatepetl e Iztláhuatl. Ocupa una superficie de 1000 ha. (Ortiz & Ortega, 2007). La temperatura media normal anual es 17.6°C y la precipitación anual normal es de 461.7 mm, de acuerdo con los registros de las normales climatológicas 1981-2010 para Tláhuac (SMN, 2016) (cuadro 2). Cuando se compararon los registros del clima de dos zonas distintas de la cuenca que datan de los años 1930 – 1990, no se observó ningún patrón en la distribución de años secos y húmedos. En la Cuenca de Chalco, las lluvias definen tres temporadas durante el año: la lluviosa, que se presenta entre los meses de junio a septiembre, que constituye el 71% de las lluvias anuales; la seca, entre los meses de noviembre a abril, que conforma un 12% de la lluvia anual; y la de transición en los meses de mayo y octubre, que representa el 17% de la lluvia anual (Bouvier *et al.*, 1993).

En la parte inferior de la cuenca de Chalco existía originalmente un lago con una superficie de 100 km y una profundidad cercana a los 2 metros, sin embargo, desde el inicio del siglo XX, el Lago de Chalco se ha secado progresivamente debido al desvío de canales y bombas; adicionalmente, en los últimos 50 años la cuenca de Chalco ha sufrido cambios en las zonas agrícolas y forestales y una expansión demográfica y urbana. Los recursos hídricos de la cuenca representan uno de los factores de mayor importancia para la Cuenca de Chalco y también para la Ciudad de México (Bouvier *et al.*, 1993).

En la actualidad, el sistema lacustre está reducido a un lago perenne de forma de C invertida de 1 a 2 metros de profundidad, cuyo origen muy probablemente se debe a la extracción de agua de catorce pozos, cuya operación inició en 1984 (Bouvier *et al.*, 1993; Ortega *et al.*, 2015) y el aumento en la superficie del lago ha tenido una tendencia a aumentar desde esa fecha, y especialmente entre 2005 a 2015, de acuerdo con datos de Aguirre (2011), quien también discute que la continua extracción de agua de los pozos de la zona influye directamente en el crecimiento del nuevo lago, y la sobreexplotación de los pozos hace que el suelo continúe compactándose y en proceso de hundimiento.

**Cuadro 2.** Condiciones climatológicas actuales de los tres sitios estudiados. <sup>a</sup>Tomado del Sistema Meteorológico Nacional (2016). Es importante resaltar que dependiendo del periodo de tiempo considerado para caracterizar la temperatura y precipitación, los registros de 1981 a 2010 fueron más altos que los de 1971 a 2000. <sup>b</sup>Tomado de Valeriano-Riveros *et al.* (2014).

	Lago Mayor de Chapultepec	Embalse Valle de Bravo	Lago de Chalco
<b>Coordenadas</b>	19°24'98''N 99° 11'97''O	19°12'26''N 100°10'51''O	19°26'71''N 98°98'25''O
<b>Altitud</b>	2,314 msnm	1,942 msnm <sup>b</sup>	2,240 msnm
<b>Profundidad promedio (m)</b>	2 m somero	21.1 <sup>b</sup> profundo	1-2 m somero
<b>Temperatura media anual<sup>a</sup></b>	15.3° C	19.0° C	17.6° C
<b>Meses con la temperatura más alta</b>	Abril - septiembre 16.5 - 17.0° C	Marzo - octubre 18.6 - 22.1° C	Abril - septiembre 17.6 - 20.0° C
<b>Mes con la temperatura más baja<sup>a</sup></b>	Enero 2.3° C	Enero 9.9° C	Enero 6.5° C
<b>Precipitación media anual<sup>a</sup></b>	922.2 mm	893.5 mm	461.7 mm
<b>Meses con la precipitación más alta<sup>a</sup></b>	Junio - septiembre 146.7 - 208.1 mm	Mayo - noviembre 44.4 - 185.0 mm	Junio - septiembre 50.0 - 112.9 mm
<b>Uso</b>	Recreativo	Recreativo y abastecimiento	Agrícola y pecuario

Se han realizado estudios de calidad de agua y se sabe que en la mayoría de los acuíferos, el catión Mg<sup>2+</sup> tiene una mayor concentración que el Ca<sup>2+</sup>; por otro lado, se han determinado concentraciones altas de amoníaco y nitrato, indicadores de que el agua está fuertemente contaminada. Se presume que la

principal fuente de contaminación son las aguas negras locales e importadas de la Ciudad de México (Bouvier *et al.*, 1993). En las orillas del Lago de Chalco, se han observado poblaciones abundantes de *Microcystis* en fechas de muestreo que abarcan un año completo, por lo que se presume que la presencia de florecimientos de cianoprocariontes que incluye a *Microcystis* es anual (observaciones personales), ya que no existen publicaciones previas sobre el fitoplancton de este lago.

## Objetivos

### Objetivo general

Realizar un acercamiento polifacético a la caracterización de la diversidad de las poblaciones de *Microcystis* de tres lagos urbanos de la región central de México, que considere los aspectos ecológico, morfológico y genético.

### Objetivos particulares

- Documentar la riqueza de especies y su variación morfológica (morfotipos) en las poblaciones de *Microcystis* de tres lagos urbanos de la zona central de México.
- Determinar las condiciones ambientales fisicoquímicas de los lagos donde se desarrollan dichas poblaciones de *Microcystis*.
- Determinar la diversidad genética con las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal presente en las poblaciones de *Microcystis* de cada lago a través de su separación en un perfil de geles DGGE y realizar análisis de las secuencias que conforman dicho perfil.
- Estudiar las secuencias obtenidas conforme a su estructura secundaria y reconocer la diversidad y diferencias entre ellas, en comparación con la estructura secundaria de otras secuencias depositadas en GenBank (NCBI).
- Reunir la información morfológica, genética y ambiental para realizar un análisis polifacético.

## Material, equipo y métodos

### Toma de muestras biológicas

En febrero de 2015 las muestras se tomaron del centro del lago, mientras que las de noviembre de 2015, se tomaron a orilla del lago, donde era evidente un florecimiento de cianoprocariontes. Los datos de factores ambientales pertenecen a un megaproyecto realizado en el lago de Chalco, del cual, la aportación del trabajo presente implica la descripción morfológica y la diversidad genética de las poblaciones de *Microcystis*.

En este trabajo se obtuvo el coeficiente de atenuación vertical para complementar la información fisiográfica de los sitios estudiados. Los valores determinados fueron 10.0 para Chapultepec, 4.5 para Valle de Bravo y 6.4 para Chalco, los cuales, al ser mayores a 1, indicaron que las columnas de agua son turbias.

**Cuadro 3.** Tipo de datos y muestras obtenidos y analizados en el trabajo presente. Las muestras de florecimiento se obtuvieron y analizaron para todas las fechas de muestreo (■) a diferencia de las muestras de agua utilizadas para la caracterización de los sitios estudiados (- -). Entre paréntesis se indica el número de muestras de biomasa (florecimiento de *Microcystis*) y agua utilizadas para los análisis genéticos, fisicoquímicos y de iones principales, respectivamente.

Sitio de estudio y fecha de recolección		Tipo de muestra, finalidad y número de muestras analizadas (entre paréntesis)			
		Florecimiento		Agua	
		Determinación de especies y variantes morfológicas	Muestra de DNA para el análisis genético	Determinación de factores fisicoquímicos	Determinación de iones principales
Cultivo de <i>M. ichthyoblabe</i>	Octubre 2013	■	■ (1)	--	--
	Octubre 2013	■	■ (1)	■ (1)	--
Chapultepec	Mayo 2015	■	■ (1)	--	■ (1)
	Noviembre 2014	■	■ (1)	■ (1)	--
Valle de Bravo	Junio 2015	■	■ (1)	--	■ (1)
	Febrero 2015	■	■ (1)	■ (1)	--
Chalco	Noviembre 2015	■	■ (1)	--	■ (1)
	<b>Número de muestras totales analizadas</b>		7	7	3

### Determinación de factores ambientales, nutrimentos e iones principales

La determinación de parámetros fisicoquímicos de los tres lagos se realizó *in situ*, dentro de un intervalo entre las 10 de la mañana y 12 del día. Se determinó la temperatura, pH y conductividad con un potenciómetro multiparamétrico de campo (Conductronic) y la irradianza con dos sensores HOBO, uno desde la superficie y otro a 30 cm de profundidad, cuyas lecturas permitieron calcular del coeficiente de atenuación vertical ( $K_d$ ) con la siguiente ecuación, donde  $k_d$  es el coeficiente de atenuación vertical,  $E_d(0)$  es la intensidad lumínica de la superficie,  $E_d(z)$  es la intensidad lumínica de cualquier profundidad y  $z$  es cualquier profundidad. El resultado de los cálculos para cada lago se menciona en el apartado de antecedentes.

$$k_d = \frac{\ln E_d(0) - \ln E_d(z)}{z}$$

Se recolectó una muestra de agua por lago para la determinación de nutrimentos (LACET, Facultad de Ciencias, UNAM) y para el análisis de los iones principales, se tomó una muestra de agua por lago en el año 2015 (Laboratorio de Química Ambiental, Instituto de Geofísica, UNAM) (es decir tres muestras para cada análisis, indicado en el cuadro 3). Previo al análisis de iones principales, las submuestras de Chapultepec, Valle de Bravo y Chalco se mantuvieron en refrigeración durante su transporte al laboratorio.

La determinación de los nutrimentos se realizó con el equipo HACH DR1900 y los procedimientos establecidos por el fabricante. Se utilizó el método de diazonización 8507 para la determinación de nitrito (concentración baja, 0.002-0.300 mg L<sup>-1</sup>); el método del salicilato 8155 para la determinación de amonio (concentración 0.01 a 0.50 mg L<sup>-1</sup>); el método de reducción de cadmio 8171 para la determinación de nitrito (concentración media, 0.1 a 10 mg L<sup>-1</sup>); el método de digestión de persulfato ácido 8190 para la determinación de fósforo total (0.06 a 3.50 mg L<sup>-1</sup>).

La cuantificación de los iones y cationes principales de los tres lagos se realizó para conocer el perfil iónico de cada localidad y de esta manera realizar su caracterización hidroquímica. Las muestras analizadas correspondieron a la temporada de lluvias de 2015, y se analizaron en el Laboratorio de Química Analítica, Instituto de Geofísica UNAM, con el apoyo de la Dra. Aurora Armienta.

Los iones determinados se utilizaron para caracterizar los tipos de agua de acuerdo con su concentración: CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Las lecturas de concentración dadas en mg L<sup>-1</sup> se convirtieron a mili equivalentes L<sup>-1</sup> (meq L<sup>-1</sup>) y su expresión porcentual (%meq L<sup>-1</sup>) para realizar la caracterización iónica y representaciones gráficas del perfil iónico de cada localidad, a través de los diagramas de Maucha (Broch & Yake, 1969) y el diamante de Piper (Silberbauer & King, 1991), los cuales a pesar de obtenerse con los mismos datos, los muestran de una manera distinta. El diagrama de Maucha reúne en un solo gráfico la concentración y proporción individual de los seis iones determinados y permite su comparación inmediata. El polígono está dividido en dos mitades: la mitad izquierda representa los aniones y la mitad derecha los cationes. En este diagrama, las concentraciones altas de sulfato o cloruros pueden significar

una falta en el tratamiento del agua, mientras que una concentración alta de calcio o magnesio representa una muestra de agua dulce.

A diferencia del diagrama de Maucha, el diamante de Piper indica puntos donde se conjuntan las proporciones de los aniones y los cationes; se compone de dos triángulos y un rombo que reúne la información de ambos triángulos. Uno de ellos representa la proporción de los tres cationes principales y el otro la proporción de los aniones principales. En cada triángulo, la suma de los iones debe representar el 100% de la composición de la muestra de agua (Fig. 3). En el rombo se proyectan las coordenadas de los puntos de ambos triángulos, y la intersección de las dos rectas representa la composición del agua con respecto a una determinada agrupación de aniones y cationes (Fagundo & González, 2005). El perfil iónico derivado de dicha composición de agua, permite comparar el perfil iónico de distintas localidades, por lo que se utilizó para comparar los tres lagos en este trabajo.

Se determinó la salinidad de los sitios en especial atención a los antecedentes de salinidad del lago de Chalco (Caballero & Ortega, 1998), a través de la suma de las concentraciones de todos los iones y el sistema de clasificación de Hammer (1987), en el cual, por ejemplo,  $>0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ Cl}^{-}$  corresponde con un cuerpo de agua *dulce*<sup>1</sup> y  $1 \text{ g L}^{-1} \text{ Cl}^{-}$  con un cuerpo de agua oligohalina.

### Recolección de material biológico y determinación taxonómica

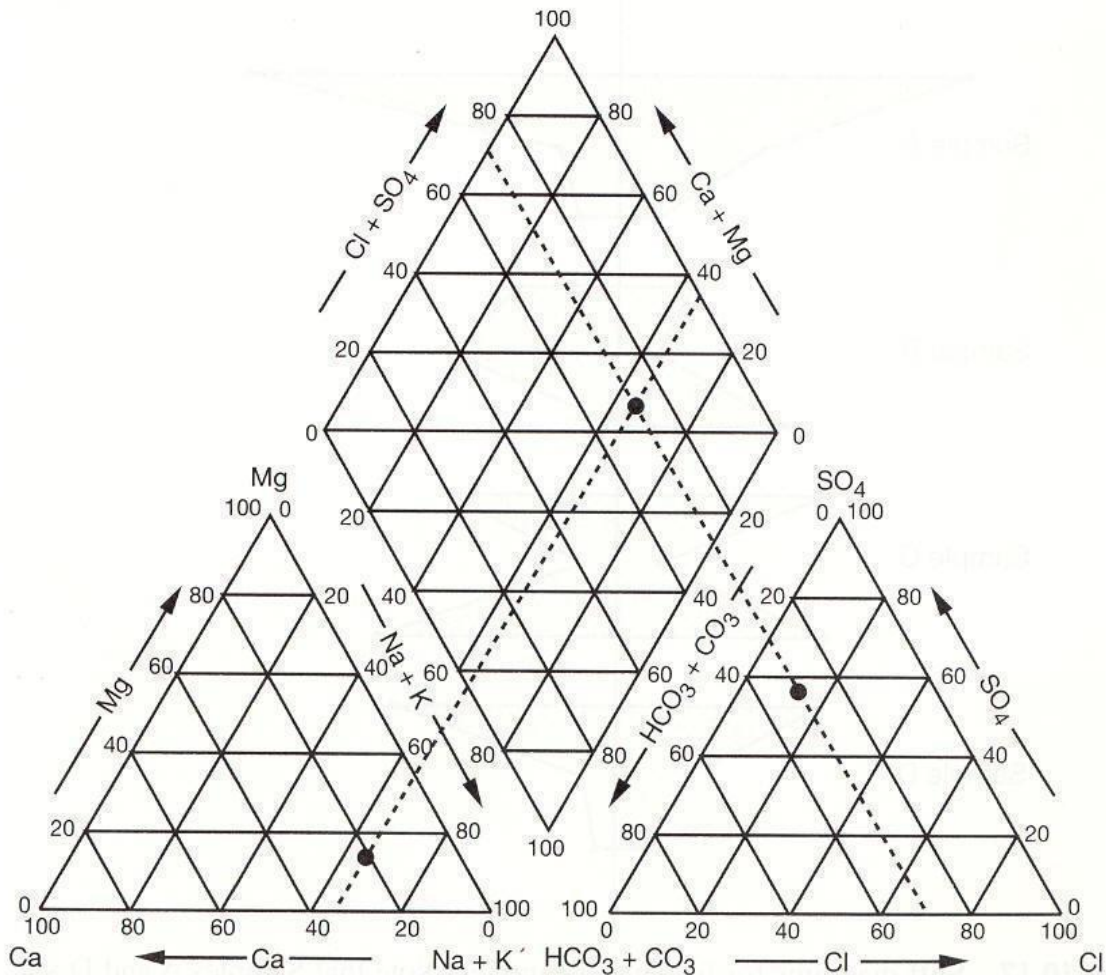
Se recolectó material biológico con dos objetivos: realizar cultivos unialgales y tener submuestras fijadas con formol para realizar observaciones al microscopio, y determinar las especies de *Microcystis* presentes.

Se realizaron aislamientos de distintas especies de *Microcystis* a partir de todas las recolecciones a excepción de la de noviembre de 2015 que correspondió al Lago de Chalco, pero únicamente fue posible obtener un cultivo unialgal de la especie *Microcystis ichthyoblabe* - morfotipo 3, proveniente del Lago Mayor de la Segunda Sección de Chapultepec, aislado en octubre de 2013 en medio BG11 modificado con el pH de la localidad, con valor 9.0.

Por otro lado, de los tres lagos se concentró y recolectó biomasa del fitoplancton, donde fuese notoria la presencia de florecimientos de algas o cianoprocariontes; se utilizaron redes de fitoplancton de  $75 \mu\text{m}$  para filtrar el agua repetidamente hasta concentrar la biomasa, ya que dicho diámetro permitió filtrar altos volúmenes de agua de manera rápida sin perder colonias en el proceso (Segura, 2012)). La biomasa se almacenó en frascos plásticos de 20 mL de volumen, en algunos casos mantenidos en refrigeración para extraer el DNA en un periodo menor a tres horas a partir de la recolección y en otros casos fijados con alcohol absoluto, para extraer el DNA de la comunidad posteriormente. El objetivo de la recolección de estas muestras fue realizar análisis moleculares a través de PCR acoplado a DGGE y posterior análisis de las bandas resultantes de este tipo de electroforesis, para conocer la diversidad de las secuencias de *Microcystis* en cada lago durante las dos fechas de recolección (cuadro 3).

---

<sup>1</sup> En la tesis, el término agua *dulce* se refiere a que la concentración de sales es baja y se encuentra por debajo de  $0.5 \text{ g L}^{-1} \text{ Cl}^{-}$  de acuerdo con el sistema de clasificación presentado por Hammer (1987).



**Figura 3.** Esquema del diagrama de Piper. El triángulo izquierdo representa la proporción de cada catión respecto a los demás cationes y el triángulo derecho la proporción de cada anión respecto a los demás aniones. El diamante es el resultado de la proyección de los dos puntos resultantes de cada triángulo.

De las muestras de agua y florecimiento de cada sitio (cuadro 3), se prepararon submuestras de 20 mL fijadas con formalina 3%, las cuales se incorporaron al Herbario de la Facultad de Ciencias, en la colección de Biodeterioro Algal, UNAM. A partir de las muestras fijadas, se realizaron preparaciones semipermanentes por triplicado, las cuales se añadieron también a la colección del herbario. Dichas preparaciones se utilizaron para la determinación taxonómica las especies de *Microcystis*. Se consultaron los trabajos de Komárek & Anagnostidis (1999), Sant' Anna *et al.* (2004) y Komárek & Komárková (2002) para confrontar nuestras observaciones.

Las poblaciones de *Microcystis* se observaron en un microscopio fotónico Nikon Eclipse 80i. De las siete recolecciones se documentaron las especies de *Microcystis* y las variedades morfológicas que presentaba cada una. A un objetivo de 100X, se tomaron medidas de tamaño de las colonias, diámetro celular,



distancia entre células y amplitud del mucílago. En orden de importancia, los caracteres con más peso que nos permitieron determinar las especies así como los morfotipos o variantes morfológicas dentro de las mismas especies, fueron el diámetro celular, la forma de la colonia en general, la presencia o ausencia de clatrado, la presencia o ausencia de subcolonias, el arreglo homogéneo o heterogéneo de las células, la consistencia difluente o refractante del mucílago alrededor de la colonia, el color de las colonias y la consistencia de las mismas, por ejemplo pulverulento en el caso de *M. ichthyoblabe*.

Para evaluar la posible asociación entre la presencia de especies y el ambiente en que se observaron, así como la época climática, se aplicó una prueba de asociación no paramétrica con el estadístico Chi-cuadrada, mediante la creación de una tabla de contingencia. A la presencia de cada especie y morfotipo en cada sitio y época se le asignó un valor determinado por el cálculo de la frecuencia relativa; los valores se organizaron en clases que fueron establecidas aplicando la fórmula estadística de Sturges (Scott, 2009).

## Métodos moleculares

### Extracción y cuantificación de DNA

Las muestras de biomasa (floreCIMIENTO) preservadas en alcohol se enjuagaron con agua estéril y centrifugaron previo a su extracción. Las muestras recién recolectadas y filtradas en campo (75 µm), se filtraron de nuevo en prefiltros de fibra de vidrio (Millipore) para eliminar el exceso de agua. La justificación del uso de los prefiltros es que no se saturan rápidamente, a diferencia de los de medida 0.22 µm, lo que permitió una filtración rápida. Posteriormente, el DNA del florecimiento se extrajo con el kit PowerBiofilm™ DNA Isolation (MO BIO, Laboratories, Inc.), el cual está diseñado para extraer DNA de muestras con altas cantidades de mucílago, por lo que se consideró útil para *Microcystis*. Las muestras de DNA extraído se almacenaron en congelación hasta su cuantificación o amplificación por PCR.

La cuantificación de DNA se realizó por el método de fluorometría con el equipo Qubit3.0 (Thermo Fisher Scientific), con 2 µL de muestra extraída. La integridad del DNA se confirmó por la presencia de bandas en geles de agarosa al 1% teñido con SYBR Green bajo las condiciones de corrida de electroforesis de 90 Volts por 40 minutos. Los geles se observaron en un fotodocumentador Vilber Lourmat®, a una longitud de onda de 312 nm. Se tomaron fotografías con los ajustes hechos manualmente, con un tiempo de exposición de 40 mili segundos.

### Amplificación por PCR y electroforesis en gel por gradiente desnaturizante (DGGE)

Se realizó la técnica de PCR - DGGE para estudiar la diversidad genética de las secuencias que codifican para la región intergénica ITS 16S-23S rRNA ribosomal del género *Microcystis* en comunidades fitoplanctónicas distintas, dada su alta resolución a nivel intraespecífico reportado en la literatura (Casamayor *et al.*, 2000; Janse *et al.*, 2003; Shabir *et al.*, 2005; Zwart *et al.*, 2005).

Para la obtención de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis* se recurrió a una amplificación PCR anidada, que es una modificación de la PCR estándar que permite amplificar uno o varios fragmentos que están dentro de otro más extenso. Consiste de dos

rondas de amplificación; en la primera, el producto de PCR sirve como template para la segunda amplificación,

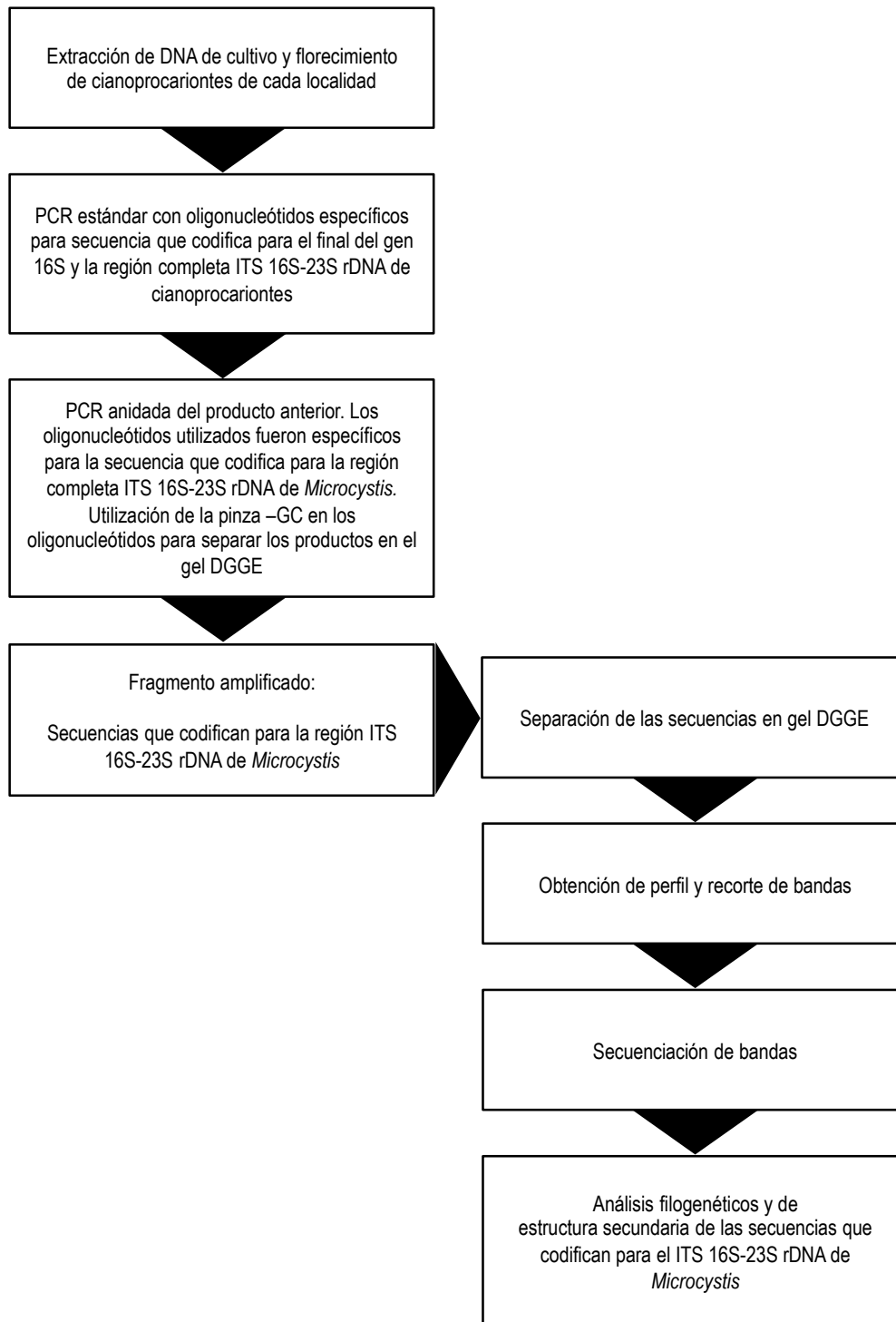


Figura 4. Diagrama de flujo que resume el trabajo molecular.

para la que se utilizan dos oligonucleótidos que son internos al producto de la primera PCR, que resulta en un producto de menor tamaño comparado con el producto original. Esta técnica suele ser altamente sensible en la detección del producto deseado (McPherson & Møller, 2006). En nuestro caso, el fragmento externo contiene el fragmento final de la secuencia que codifica para el gen 16S rDNA ribosomal, la secuencia completa que codifica para la región intergénica ITS 16S-23S rDNA ribosomal y parte del inicio de la secuencia que codifica para el gen 23S rDNA ribosomal, y el fragmento interno es la secuencia que codifica para la región intergénica ITS 16S-23S rDNA ribosomal.

Para la obtención de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis* se recurrió a una amplificación PCR anidada, que es una modificación de la PCR estándar que permite amplificar uno o varios fragmentos que están dentro de otro más extenso. Consiste de dos rondas de amplificación; en la primera, el producto de PCR sirve como template para la segunda amplificación, para la que se utilizan dos oligonucleótidos que son internos al producto de la primera PCR, que resulta en un producto de menor tamaño comparado con el producto original. Esta técnica suele ser altamente sensible en la detección del producto deseado (McPherson & Møller, 2006). En nuestro caso, el fragmento externo contiene el fragmento final de la secuencia que codifica para el gen 16S rDNA ribosomal, la secuencia completa que codifica para la región intergénica ITS 16S-23S rDNA ribosomal y parte del inicio de la secuencia que codifica para el gen 23S rDNA ribosomal, y el fragmento interno es la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal.

En la primera PCR, se obtuvo el fragmento más extenso con los oligonucleótidos 1 y 2, específicos para cianoprocariontes, y cuyo producto serían fragmentos pertenecientes a especies de distintos géneros presentes en los tres lagos analizados, incluyendo a *Microcystis*. El producto de PCR, de aproximadamente 1,600 pb, fue a su vez el template para la siguiente amplificación (de allí el nombre de PCR anidada), con los oligonucleótidos 1 y 3, específicos para la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis* (cuadro 4). El producto de la segunda PCR, que consistía en los fragmentos de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal, se sometió a separación en un gel DGGE (Janse *et al.*, 2003; Kaardinal *et al.*, 2007; Shabir *et al.*, 2005). Para la segunda PCR, se utilizó el oligonucleótido inicial con una pinza-GC, cuya función fue detener los fragmentos amplificados a lo largo del gradiente del gel DGGE en relación con la naturaleza de su secuencia.

Las amplificaciones se realizaron con el *kit* HotStar Taq Plus de QIAGEN en reacciones de 25  $\mu$ L que contenían 2.5  $\mu$ L de Buffer 10X PCR; 1.25  $\mu$ L dNTPs (10 mM); 1.25  $\mu$ L oligonucleótido inicial, 1.25  $\mu$ L oligonucleótido terminal (ambos en concentración 10  $\mu$ M); 0.125  $\mu$ L de polimerasa HotStar Taq Plus (Qiagen); 23.875  $\mu$ L de agua ultrapura libre de DNAsas y RNAasas. A cada tubo se añadió 1  $\mu$ L de template, que a su vez contenía entre 10 y 15 ng de DNA (Souza & Eguiarte, 2011). En algunas ocasiones, incluyendo la reamplificación del primer producto de PCR, resultado de la primera amplificación, el template fue de 2 e incluso 5  $\mu$ L debido a la baja brillantez de la banda observada en los geles de agarosa 1% posterior a la extracción de DNA. La amplificación de cada muestra se verificó a través de un gel de agarosa al 1%, con las mismas condiciones de corrida que para la verificación de la extracción de DNA.

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Axygen™ Maxygen™ II, bajo las siguientes condiciones: un ciclo de desnaturalización inicial a 94° C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94° C por 1 min, hibridización a 60° C por 2 min, extensión a 72° C por 1 minuto y un ciclo de extensión final a 72° C por 1 minuto. Los valores de cantidad de muestra de DNA, viabilidad de los oligonucleótidos y 60° C como temperatura de hibridización fueron resultado de cuatro pruebas de optimización que llevaron a la estandarización de la amplificación.

### Preparación de productos de PCR como muestras para los geles DGGE

Se utilizaron entre 900 y 1200 ng de producto de PCR purificado (*kit* VS Wizard PCR and Gel CleanUp System (Promega)) como muestras para los geles DGGE (Lyautey *et al.* 2005; Beatriz Díez, comentario personal).

**Cuadro 4.** Oligonucleótidos utilizados para la PCR anidada. La primera amplificación se realizó con los oligonucleótidos 1 y 2, y la segunda con los oligonucleótidos 2 y 3. A partir de esta segunda amplificación se obtuvieron los fragmentos correspondientes a la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de las poblaciones de *Microcystis* que se separaron en el gel DGGE. Las direcciones *forward* y *reverse* indican el inicio y el final de la secuencia de interés, respectivamente.

Número de oligonucleótido	Nombre del oligonucleótido	Dirección del oligonucleótido	Fragmento amplificado	Secuencia	Referencia
1	(GC-) CYA371F	<i>forward</i>	16S + ITS	CCTACGGGAGGCAGCAGTGGG GAATTTTCC	Nübel <i>et al.</i> (1997)
2	ULR	<i>reverse</i>	16S + ITS e ITS	CCTCTGTGTGCCTAGGTATC	Janse <i>et al.</i> (2003)
3	(GC-) CSIF	<i>forward</i>	ITS	GTCACGCCCGAAGTCATTAC	Janse <i>et al.</i> (2003)
<b>Pinza -GC para los geles DGGE</b>				CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC C	Muyzer <i>et al.</i> , (1993)

### Geles DGGE

Los geles DGGE o Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE por sus siglas en inglés) es un tipo de electroforesis que permite la separación de fragmentos de DNA del mismo tamaño pero con diferente secuencia de nucleótidos (Fernández & Le Borgne, 2014). Se ha utilizado comúnmente para analizar la diversidad genética de comunidades o poblaciones de microorganismos (Muyzer *et al.*, 1993; Tavera & Díez, 2009) en conjunto con la amplificación por PCR de genes ribosomales. La separación se lleva a cabo en un gel de acrilamida compuesto por dos agentes desnaturalizantes urea y formamida, cuya concentración se encuentran en un gradiente específico. Durante la electroforesis, los fragmentos de DNA migran a lo largo del gel hasta encontrar una determinada concentración de urea y formamida a la cual las cadenas de DNA se desnaturalizan (o desdoblan) y su movimiento se detiene. Este punto de detenimiento está determinado por la secuencia de nucleótidos y de esta manera, los fragmentos de DNA con secuencias nucleotídicas distintas tendrán posiciones diferentes en el gel DGGE. La técnica tiene la

capacidad de separar secuencias que difieran en una sola base nitrogenada (Fernández & Le Borgne, 2014). Las muestras pueden tener una mezcla de fragmentos de DNA, por ejemplo una muestra de florecimiento de *Microcystis*, o un fragmento individual, por ejemplo un cultivo unialgal de *Microcystis*. El resultado de la electroforesis la separación de las muestras complejas en un perfil de bandas formado en los carriles del gel.

En los geles DGGE, la posición de las bandas indica la naturaleza del fragmento separado, por lo que si dos bandas se encuentran en la misma posición de freno en el gradiente, corresponden con un mismo tipo de secuencia, pero si las bandas se sitúan en distinta posición a lo largo del gradiente, significa que cada una de ellas tiene una combinación de nucleótidos distinta, y cada banda corresponde con una secuencia para la región que se separa en el gel (Muyzer *et al.*, 1993), en nuestro caso la secuencia que codifica para el ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis*.

La electroforesis se realizó con el sistema DGGE-2001 (CBS Scientific). El gel se realizó con un porcentaje de acrilamida de 7.5%, recomendada para la separación de fragmentos de 1,000 pb de tamaño, y con un gradiente desnaturante de 30 a 70% (ambos valores resultado de pruebas de optimización). La electroforesis se realizó en un *buffer* de corrida TAE 0.5X ajustado a una temperatura de 60 °C bajo condiciones de corrida de 75 V por 18 horas.

Concluida la electroforesis, el gel se tiñó en una solución con SYBR Safe (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) 1:10,000 por 30 minutos. El gel se observó y fotografió con luz UV de longitud de onda de 312 nm, en un transiluminador Vilber Lourmat. Posteriormente, se recortaron 18 bandas en un transiluminador UV (312 nm, Fotodyne). De acuerdo con Wichels *et al.* (2004), las bandas de DGGE que se encuentran en la misma posición en el gel en distintos carriles corroboran el mismo marcador (filotipos), por lo que las bandas se recortaron sin importar su posición, con puntas para recortar geles (Axygen®). Después del recorte de las bandas, se fotografió el gel para confirmar visualmente su recorte. Enseguida, las bandas se eluyeron en 50 µL de agua ultrapura libre de DNAsas y RNAsas (Fernández & LeBorgne, 2014), para luego incubarlas por 2 horas a 37° C con agitación cada 30 minutos y conservarlas en refrigeración a 4° C por 24 horas. Las bandas se purificaron con el kit antes mencionado, para después reamplificarlas previo a su secuenciación, con el oligonucleótido CSIF inicial (sin pinza -GC ya que no se someterían de nuevo a separación por DGGE). Las muestras se secuenciaron en MacroGen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

La identidad de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal se determinó mediante BLAST (NCBI). Posteriormente, la corrección de las posiciones degeneradas y recorte de los extremos de las secuencias se realizaron con el *software* UGENE. Con las secuencias corregidas se realizaron los análisis de distancia, filogenéticos y de estructura secundaria detallados más adelante. Cada secuencia corregida se nombró de acuerdo con su número de secuencia, localidad y fecha de muestreo, de tal manera que una secuencia proveniente de Chapultepec muestreada en octubre de 2013, se nombró "10493\_Chap1013" (cuadro 10, columna 6).

### Análisis de secuencias y estructuras secundarias

Se analizó un total de 40 secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis*: diez provenientes de las bandas del gel DGGE y 30 de bases de datos (GenBank) procedentes de especies de *Microcystis* recolectadas y cultivadas de distintos lagos y regiones de latitud templada. Este número de secuencias de DNA fue resultado de la aplicación de dos criterios de selección que validaran por un lado la identidad taxonómica de las secuencias y por otro, la ausencia de secuencias de DNA duplicadas. El primer criterio fue buscar secuencias que codificaran para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis* publicadas en trabajos donde se identificaran las especies con base en su morfología y tuviesen un respaldo fotográfico o en esquemas (cuadro 11). El resultado fue de más de 200 secuencias de DNA. Se aplicó entonces el segundo criterio, que consistió en la comparación de tales secuencias y la eliminación de aquellas que fuesen duplicadas, con las herramientas del sitio “CD-HIT-ES. Representative sequences” (<http://weizhongli-lab.org/cd-hit/>, 16 de febrero de 2016) estableciendo como umbral de similitud un porcentaje de  $\geq 98\%$  aplicado a las secuencias de bases de datos y a las obtenidas en este estudio. El resultado final fueron 30 secuencias de DNA que se utilizaron para los análisis de secuencias. Se utilizó la secuencia de *Arthrospira maxima* FACHB438 (número de acceso GenBank FJ826622.1) como grupo externo.

Todas las secuencias se alinearon con el *software* en línea Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, 17 de marzo de 2016), con las condiciones sugeridas por el mismo, y después se corrigieron manualmente de acuerdo con la estructura secundaria de los sectores que componen la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal (Iteman *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2011). La importancia del uso de la estructura secundaria para esta región ribosomal es que la función del rRNA se encuentra en buena parte determinada por su estructura, y por lo tanto, es posible reconocer regiones conservadas y asignar identidad primaria para regiones difíciles de alinear con programas de alineamiento múltiple de secuencias, y resulta en la mejora de la estimación de la filogenia, ya que la exactitud de un análisis filogenético depende de la exactitud del alineamiento (Kje, 1995; Gillespie, 2004).

El análisis de distancia Neighbor Joining y el modelo de sustitución se obtuvieron con el *software* MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) y los análisis de parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana se obtuvieron con los programas PAUP 4.0, TOPALi v2 y Mr Bayes v3.2.1, respectivamente. Para el análisis de distancia, se utilizó el modelo de sustitución Tamura-Nei (cuadro 12), y para los análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana el modelo Hasegawa-Kishino-Yano, con una distribución Gamma con sitios invariables (G+I) (cuadro 12), de acuerdo con el valor BIC (Bayesian Information Criterio; MEGA7). En el cuadro 12 se especifican las condiciones utilizadas en los análisis de distancia y filogenéticos. De los cuatro análisis de secuencias, se seleccionaron los que fueron más informativos por lo que se eligió el análisis de distancia neighbor joining como exploratorio y el de máxima verosimilitud por el nivel de resolución de las secuencias<sup>2</sup>.

---

<sup>2</sup> En los árboles filogenéticos, es común observar que los linajes ancestrales se dividen en dos linajes descendientes. Las separaciones son dicotómicas, y un árbol con todas sus ramificaciones dicotómicas se denomina *totalmente*

El análisis de distancia neighbor joining indicó la similitud entre las secuencias analizadas, mientras que los análisis de parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana mostraron distintas hipótesis de relaciones filogenéticas entre los organismos (Baum & Smith, 2013). Es importante resaltar que los análisis filogenéticos representan los árboles de los genes, mas no de las relaciones entre las especies como tal (Baum & Smith, 2013).

Se identificaron los dos sectores de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal, la hélice D y caja B de las 40 secuencias de *Microcystis* analizadas y se obtuvo su estructura secundaria en la plataforma Mfold rDNA (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/rna-folding-form>, 25 de abril de 2017). Este método se ha realizado previamente para estudiar las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de otros cianoprocariontes (Iteman *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2011). Dentro de nuestro conocimiento, en la literatura no se ha publicado un estudio de la estructura secundaria de esta secuencias de *Microcystis*, por lo tanto este trabajo es el primero en presentar una comparación entre la diversidad de los sectores hélice D y caja B de poblaciones de sitios tropicales, subtropicales y templados y estimar si existe una relación entre las topologías de los dos sectores y la especie a la que pertenece, con el objetivo de indagar si estos elementos genéticos apoyan la circunscripción de las especies de *Microcystis*.

La diversidad de estructuras secundarias o topologías para cada sector se identificó y clasificó asignando una numeración consecutiva. El sector de la hélice D presentó ocho topologías diferentes y la caja B cinco. Las 40 secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis* analizadas presentaron una combinación particular de topologías de la hélice D y la caja B, misma que se incorporó en la hipótesis del análisis de máxima verosimilitud como números delante de cada secuencia (Fig. 14).

---

*resuelto*. También se presentan árboles donde el linaje ancestral se divide más o menos simultáneamente en descendientes múltiples, por ejemplo en el caso de especies con poblaciones aisladas como resultado de cambios en las condiciones climáticas. Si estas poblaciones persisten en establecer nuevos linajes, el resultado sería un nodo con más de un linaje descendiente, una *politomía*. Sin embargo, las politomías en los diagramas de árbol representan incertidumbre en el patrón correcto de ramificación. Dado que estos árboles representan hipótesis de relaciones filogenéticas reales, las ramificaciones múltiples pueden indicar que la información analizada es insuficiente para resolver todas las relaciones (Baum & Smith, 2013).

## Resultados

### Riqueza de especies de *Microcystis*

Nuestras observaciones al microscopio evidenciaron un alta riqueza de especies de *Microcystis* en los tres lagos, con un total de 7 especies, de las cuales, *M. aeruginosa* y *M. ichthyoblabe* presentaron a su vez una alta diversidad fenotípica mientras que *M. flos-aquae*, *M. panniformis*, *M. protocystis*, *M. wesenbergii* y *M. viridis* presentaron un solo morfotipo.

Las diferencias entre los morfotipos de *M. aeruginosa* fueron la forma de las colonias y la presencia y amplitud del clatrado (espacios de mucílago sin células que atraviesan la colonia): en el caso de Chapultepec, la mayor parte de los morfotipos presentaron clatrado evidente y en Valle de Bravo la forma globular de las colonias fue particular, con “brazos”, y no presentaron un clatrado evidente como en Chapultepec. En el caso de *M. ichthyoblabe*, los morfotipos se distinguieron por el diámetro celular, la forma de las colonias y la distribución homogénea o heterogénea de las células dentro de la colonia, por ejemplo, si se encontraban zonas con mayor número de células, o la presencia de conjuntos de células formando lobulaciones o subcolonias. Esta variabilidad produjo los morfotipos distintos de *M. ichthyoblabe* que se observaron en los tres lagos (cuadro 5).

### ***Microcystis* cfr. *ichthyoblabe* Kützing**

De esta especie se determinaron algunos morfotipos, que se distinguieron principalmente por el aspecto del borde de las colonias, la densidad y distribución de las células en las colonias. Algunos de los morfotipos presentaron regiones con mayor densidad de células, sin que llegasen a formar subcolonias; en otros casos, se presentaron conjuntos de células alejados unos de otros dentro de un mucílago difluente. En los morfotipos descritos, el margen de la colonia fue irregular, el mucílago indistinto y difuso y las células se sobrepusieron de manera irregular. Por lo general las colonias fueron densas, con distribución homogénea o heterogénea de las células, regularmente distribuidas y aglomeradas.

Notas: Komárek & Anagnostidis (1999) señalaron que esta especie es de sitios mesotróficos o poco eutróficos y que probablemente no se encuentre en latitudes tropicales, ya que su presencia no se ha comprobado en esta zona (Komárek *et al.*, 2002). A pesar de los registros de estos autores, fue evidente la similitud de las poblaciones mexicanas con la descripción original.

### ***M. ichthyoblabe* Morfotipo 1 (M1)**

### **Figura 5**

Las colonias tuvieron forma globular y tuvieron el margen delimitado. La consistencia del mucílago fue difluente, fina y hialina, y fue visible sólo en algunas regiones del borde de la colonia. El color de las colonias fue verde claro y pardo-dorado. En general las colonias fueron densas y la distribución de las células heterogénea, sin que se observase ningún patrón en particular, aunque se encontraron regiones con mayor número de células que otras. Algunas células presentaron una alta cantidad de aerotopos que les confirió un color dorado, y células con poca cantidad que fueron de color azul claro. Las células fueron



esféricas, sin vaina celular individual, con presencia de aerotopos. Dentro de la colonia se observó la presencia de filamentos de *Pseudanabaena voronichini* Anagnostidis.

Las dimensiones de las colonias se encontraron entre 250 µm de largo por 200 µm de ancho. El diámetro celular varió entre 3.4 y 3.9 µm, con un promedio de 3.6 µm. La distancia entre las células más cercanas fue de 1 a 5.8 µm. La amplitud del mucílago fue cercana a 2.9 µm.

Chapultepec

### ***M. ichthyoblabe* Morfotipo 2 (M2)**

**Figura 5**

Las colonias fueron globulares y esféricas, de forma irregular y de margen no delimitado, a diferencia del morfotipo 1. El margen mucilaginoso fue difluente, fino y hialino, y fue visible en algunas regiones del borde de la colonia. Las colonias tuvieron aspecto pulverulento, dada la distancia entre las células y su distribución diferencial en la colonia, lo que a su vez permitió distinguir secciones más densas que otras en una misma colonia. Las células fueron esféricas, sin vaina celular individual, con presencia de aerotopos, lo que les confirió a las células y colonias un color dorado a pardo oscuro.

Las dimensiones de las colonias se encontraron entre 136 – 165 µm de largo por 104 – 165 µm de ancho. El diámetro celular varió entre 3.9 y 4.1 µm, con un promedio de 4 µm. La distancia entre las células más cercanas fue de 1 a 8.7 µm, con los valores más comunes 1.9 y 2.9 µm. La amplitud del mucílago fue variable entre colonias y osciló entre 1.9 µm y 6.8 µm, aunque en la mayoría de las colonias, estos valores se encontraron entre 2.9 y 4.8 µm.

Chapultepec

### ***M. ichthyoblabe* Morfotipo 3 (M3)**

**Figura 5**

La forma de las colonias fue irregular y el margen mucilaginoso fue difluente, fino y hialino, visible en algunas regiones del borde de la colonia. Las colonias fueron de aspecto pulverulento, dada la combinación de un diámetro celular pequeño, la distancia entre las células y su distribución diferencial en la colonia, lo que a su vez permitió distinguir conjuntos de células consideradas subcolonias, que se sobrepusieron irregularmente en el interior de una misma colonia. La presencia de subcolonias bien delimitadas diferenció a este morfotipo de los dos anteriores. Las células fueron esféricas, sin vaina celular individual, con presencia de aerotopos, lo que les confirió a las células y colonias un color dorado a pardo oscuro. Algunas colonias presentaron en su interior filamentos de *Pseudoanabaena voronichini* Anagnostidis.

Las dimensiones de las colonias se encontraron entre 145 – 240 µm de largo por 140 – 214 µm de ancho. El diámetro celular varió entre 3.3 y 3.5 µm, con un promedio de 3.4 µm. En las colonias se observaron subconjuntos de células que formaron subcolonias distanciadas entre sí; dentro de las subcolonias, las células se separaron entre sí por una distancia de 1 a 7.8 µm, siendo los valores más comunes 1.9 y 2.9 µm. La amplitud del mucílago fue variable entre colonias y osciló entre 2.9 y 11.7 µm.

Notas: de este morfotipo se obtuvo el cultivo *M. ichthyoblabe* utilizado como marcador en los geles DGGE.

Chapultepec

#### ***M. ichthyoblabe* Morfotipo 4 (M4)**

#### **Figura 5**

La forma de las colonias fue irregular y globular y el margen fue regular, fino y hialino, visible en algunas regiones del borde de la colonia. Las colonias presentaron aspecto pulverulento por el diámetro celular pequeño, su distribución en la colonia y la distancia entre las células, la cual fue menor a los morfotipos M1, M2 y M3 y le dio un aspecto más consistente a la colonia. Se observaron zonas con mayor densidad de células y subcolonias tipo lobulaciones externas a la colonia. Las células fueron esféricas, sin vaina celular individual, con presencia de aerotopos que les dio color pardo oscuro a las células y colonias.

La dimensión de las colonias fue macroscópica, de aproximadamente 1 mm, mayor que los morfotipos M1, M2 y M3 en el Lago de Chapultepec. El diámetro celular varió entre 3.2 y 3.5  $\mu\text{m}$ . Las células se separaron entre sí por una distancia de 1 a 3  $\mu\text{m}$ .

Chapultepec

#### ***M. ichthyoblabe* morfotipo 5 (M5)**

#### **Figura 6**

Colonias irregulares, sin una forma determinada pero definida, con margen difluente, fino y hialino, difícilmente visible. Las colonias fueron de aspecto pulverulento, dado el diámetro pequeño de las células. Estas se encontraron distribuidas de manera heterogénea en la colonia; no se distinguieron subcolonias. En los bordes de las colonias se observaron lobulaciones, o conjuntos de células conectadas a la colonia principal, por lo que en este trabajo no se consideró como subcolonia. Las células fueron esféricas, sin vaina individual, con aerotopos que le dieron a la colonia un color dorado a pardo oscuro.

El tamaño de las colonias se encontró entre 346 - 440  $\mu\text{m}$  de largo por 420 - 450  $\mu\text{m}$  de ancho. El diámetro celular varió entre 2.92 y 4.88  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 3.99  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células se encontró en un intervalo de 1.95 a 4.88  $\mu\text{m}$ . La amplitud del mucílago fue muy pequeña y fue menor a 1  $\mu\text{m}$ .

Notas: Este morfotipo se observó en los tres lagos mexicanos; particularmente en Chalco, el número de lobulaciones fue mayor y más evidentes.

Chapultepec, Valle de Bravo y Chalco

#### ***M. ichthyoblabe* morfotipo 6 (M6)**

#### **Figura 6**

Colonias irregulares, sin una forma determinada pero sí definida, con una alta cantidad de células. El margen fue difluente, fino y hialino. Las colonias fueron de aspecto pulverulento, y las células se distribuyeron de manera heterogénea y en algunas zonas de la colonia se observó una mayor densidad de células, en forma de parches no muy bien definidos. La distribución diferencial de las células también se observó como subcolonias (y no lobulaciones), separadas de la colonia principal. Las colonias observadas en Chalco presentaron dos colores dentro de una misma colonia, verde claro y verde azul.

El tamaño de las colonias se encuentra entre 255 - 442  $\mu\text{m}$  de largo por 185 - 292  $\mu\text{m}$  de ancho. El diámetro celular varía entre 2.92 y 4.3  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 3.6  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células se encuentra en un intervalo de 0.976 a 1.95  $\mu\text{m}$ . La amplitud del mucílago no superó 1  $\mu\text{m}$ .

Valle de Bravo y Chalco

***M. ichthyoblabe* morfotipo 7 (M7)**

**Figura 6**

Colonias irregulares, más o menos esféricas y pequeñas respecto a los otros morfotipos. En este morfotipo no se encontraron colonias con lobulaciones o subcolonias, y la distribución de las células en las colonias fue homogéneo, por lo que no se encontraron regiones de la colonia que fuesen más densas. El grosor de las colonias fue pequeño, de no más de 10 células, a diferencia de los otros morfotipos con colonias macroscópicas.

El tamaño de las colonias se encontró entre 40 - 80  $\mu\text{m}$  de largo por 50 - 60  $\mu\text{m}$  de ancho. El diámetro celular varió entre 3.09 y 3.92  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 3.7  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células se encontró en un intervalo de 2 a 6  $\mu\text{m}$ . La amplitud del mucílago fue muy baja y osciló entre 1 y 4  $\mu\text{m}$ .

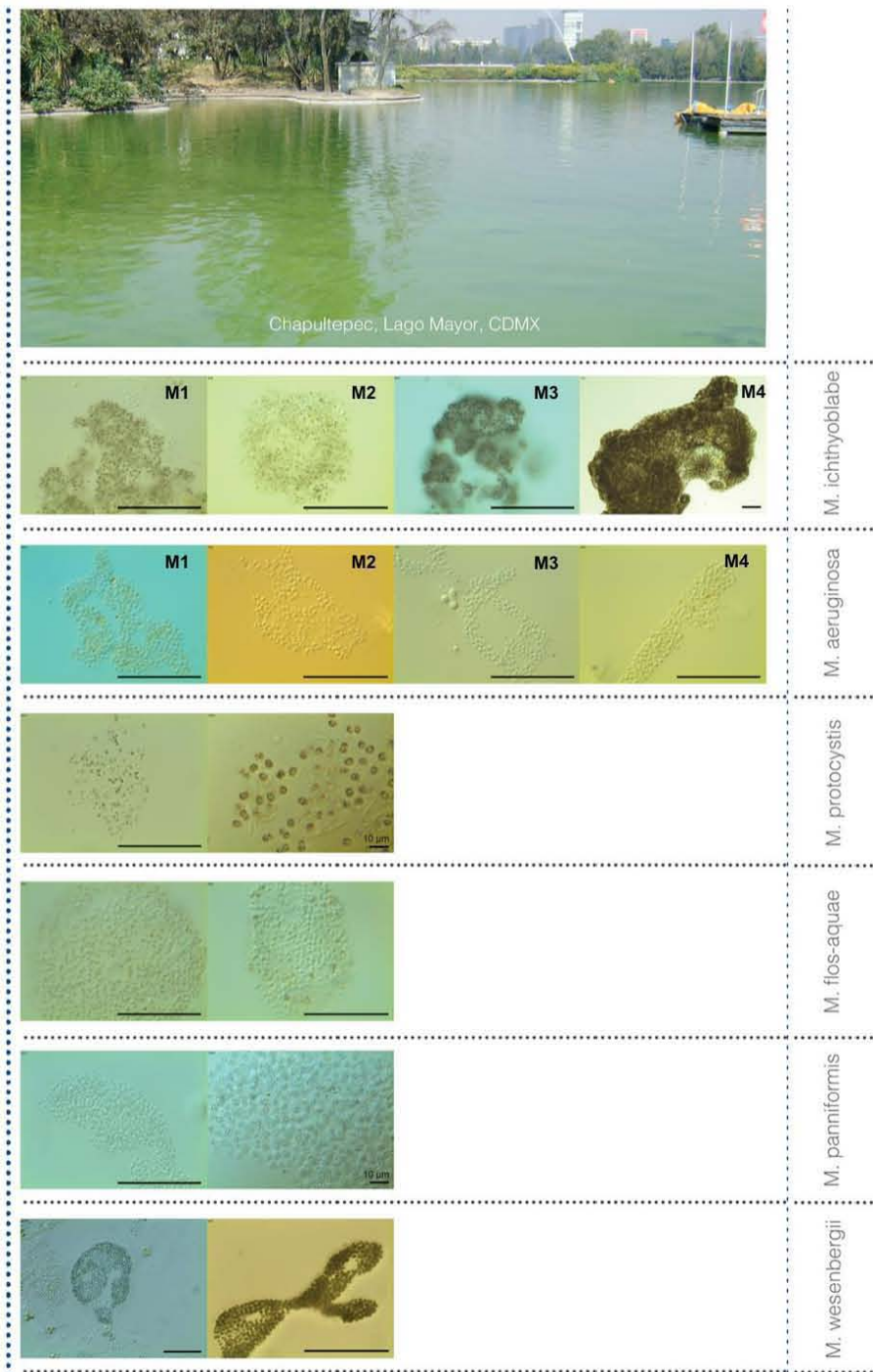
Valle de Bravo y Ch

***Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing**

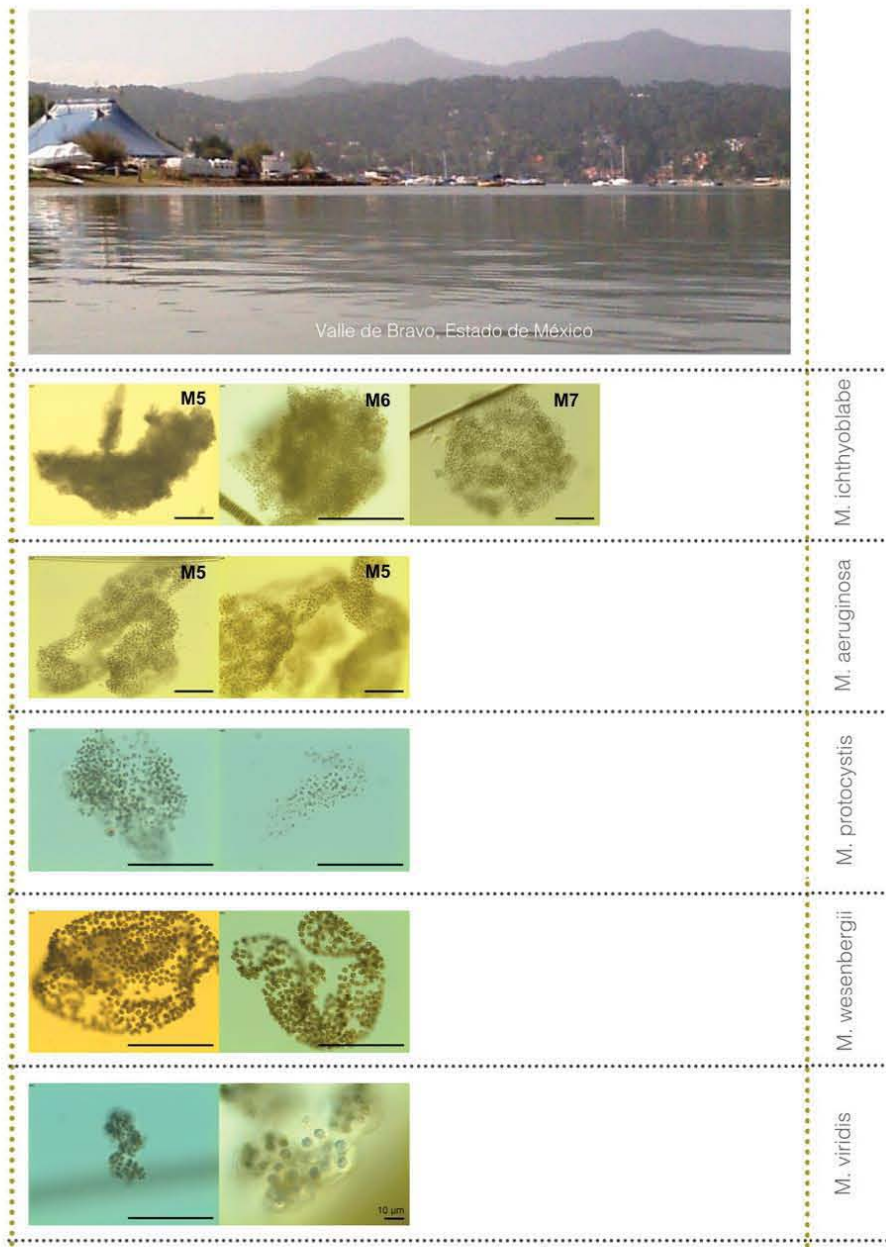
*Micraloa aeruginosa* Kützing 1833 since typo; *Dyplocystis aeruginosa* (Kützing) Trevisan 1848; *Clathrocystis aeruginosa* (Kützing) Henfrey 1856; *Microcystis ochracea* (Brand) Forti 1907 ?; *Anacystis cyanea* (Kützing) Drouet et Daily 1952 p.p. excl. typo; y muchos otros.

En este trabajo se encontraron distintos morfotipos de *M. aeruginosa*, cuyas diferencias principales fueron la forma y tamaño de la colonia y del clatrado, así como el color de las colonias. En general, en cada lago se observaron morfotipos particulares, cuya diferencia más notable era el tamaño, forma y densidad de la colonia, así como la presencia o ausencia de clatrado. Específicamente, en Chapultepec se encontraron las colonias más pequeñas y con clatrado evidente; en Valle de Bravo se encontraron las colonias de mayor tamaño y con un grado de clatrado menor, y en Chalco, se encontraron colonias de forma irregular, alargadas, lobuladas y sin clatrado.

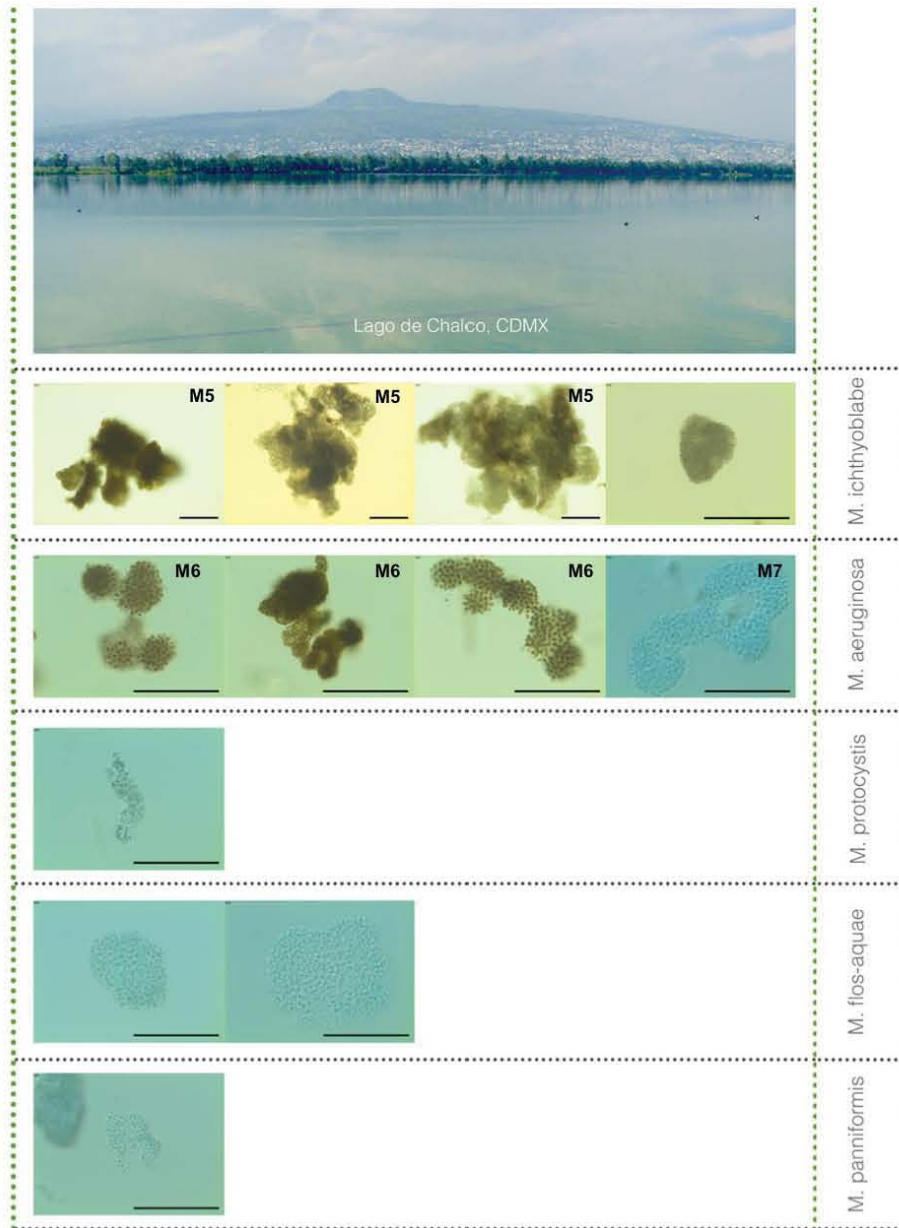
Notas: en general, esta especie habita cuerpos de agua dulce y salobre, y puede formar florecimientos densos. Su distribución es cosmopolita (Komárek & Anagnostidis, 1999), y la identidad genotípica de distintas formas que habitan diversas áreas no ha sido establecida.



**Figura 5.** Diversidad de especies y morfotipos de *Microcystis* en el Lago Mayor de Chapultepec. Al costado derecho se encuentran los nombres de las especies determinadas en cada lago. Los morfotipos de *M. ichthyoblabe* y *M. aeruginosa* se encuentran numerados de manera consecutiva a lo largo de las Figs. 5, 6 y 7. Las otras especies mostraron un único morfotipo. Barra = 100 µm excepto cuando se indique otra medida.



**Figura 6.** Diversidad de especies y morfotipos de *Microcystis* en el embalse Valle de Bravo. Al costado derecho se encuentran los nombres de las especies determinadas en cada lago. Los morfotipos de *M. ichthyoblabe* y *M. aeruginosa* se encuentran numerados de manera consecutiva a lo largo de las Figs. 5, 6 y 7. Las otras especies mostraron un único morfotipo. Barra = 100 µm excepto cuando se indique otra medida.



**Figura 7.** Diversidad de especies y morfotipos de *Microcystis* en el Lago de Chalco. Al costado derecho se encuentran los nombres de las especies determinadas en cada lago. Los morfotipos de *M. ichthyoblabe* y *M. aeruginosa* se encuentran numerados de manera consecutiva a lo largo de las Figs. 5, 6 y 7. Las otras especies mostraron un único morfotipo. Barra = 100  $\mu\text{m}$  excepto cuando se indique otra medida.

### ***M. aeruginosa* Morfotipo 1 (M1)**

**Figura 5**

Las colonias fueron de tamaño grande, de forma y borde irregulares, algunas presentaron lobulaciones en distintas zonas de la colonia. La consistencia del margen mucilaginoso fue difluente, fino y hialino, en algunas colonias indistinto, y su amplitud varió en una misma colonia. Las colonias fueron densas y clatradas; estos espacios libres de células estuvieron cubiertos por mucílago difluente e incoloro, donde se observó la acumulación de bacterias. En las colonias, el clatrado fue irregular y no del todo delimitado, breve o muy amplio, e incluso se presentaron ambos tipos de clatrado en una sola colonia. La distribución de las células en las colonias fue heterogénea, y derivado del clatrado amplio, se percibieron distintas secciones en las colonias. Las células fueron esféricas, sin vaina celular individual y se distribuyeron en pares después de la división celular; su color fue pardo o azul claro, con presencia de aerotopos. Este morfotipo presentó filamentos de otra cianoprocarionte, identificada como *Pseudoanabaena voronichini* Anagnostidis.

Las dimensiones de las colonias se encontraron entre 190 y 390  $\mu\text{m}$  de largo por 117 a 147  $\mu\text{m}$  de ancho. El diámetro celular varió entre 4.39  $\mu\text{m}$  y 4.88  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 4.61  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células más cercanas fue de 1 a 6.8  $\mu\text{m}$ , siendo las más comunes 1.9 y 2.9  $\mu\text{m}$ . La amplitud del mucílago fue variable en cada colonia y osciló entre 1 y 15  $\mu\text{m}$ , y en la mayoría de las colonias, estos valores se encontraron entre 3.9 y 11  $\mu\text{m}$ .

Notas: este morfotipo se observó en el Lago Mayor y no se observaron colonias tan bien delimitadas en Valle de Bravo y en Chalco.

Chapultepec

### ***M. aeruginosa* Morfotipo 2 (M2)**

**Figura 5**

Las colonias fueron de tamaño grande, de forma y margen irregulares. La consistencia del margen mucilaginoso fue difluente, fina y hialina, y fue de diferente amplitud incluso en una misma colonia. Las colonias fueron de color pardo o azul claro. Las colonias eran densas y clatradas; el clatrado se cubrió con mucílago difluente con bacterias acumuladas. En las colonias el clatrado fue múltiple y bien delimitado, a diferencia del morfotipo 1, donde el clatrado fue evidente pero un poco irregular en los bordes. La distribución de las células fue heterogénea alrededor del clatrado, y derivado del mismo, se percibieron distintas secciones en las colonias, como en el morfotipo 1. Las células fueron esféricas, sin vaina celular individual, de color pardo o azul oscuro y con aerotopos.

Las dimensiones de las colonias se encontraron entre 27 – 185  $\mu\text{m}$  de largo por 13 – 126  $\mu\text{m}$ . El diámetro celular varió entre 4.2 y 4.8  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 4.4  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células más cercanas fue de 1 a 4.88  $\mu\text{m}$ , siendo las más comunes 1.9 y 2.9  $\mu\text{m}$ . La amplitud del mucílago fue variable en cada colonia y en general, osciló entre 1.9 y 10.7  $\mu\text{m}$ .

Notas: este morfotipo se observó en el Lago Mayor y no se observaron colonias tan bien delimitadas en Valle de Bravo y en Chalco.

Chapultepec

#### ***M. aeruginosa* Morfotipo 3 (M4)**

**Figura 5**

Colonias grandes, de forma alargada e irregular. La consistencia del mucílago fue difluente, fina y hialina. Las colonias fueron de color pardo o azul claros. Las colonias fueron densas y en general no clatradas, pero en aquellas que lo presentaron, el clatrado era breve. En las colonias las células se encontraron dispuestas de manera compacta y heterogénea. Este morfotipo se observó en Chapultepec.

Chapultepec

#### ***M. aeruginosa* Morfotipo 4 (M4)**

**Figura 5**

Colonias alargadas, de forma irregular y con bordes delimitados. La consistencia del margen mucilaginoso fue difluente, fina y hialina, por lo que las células delimitaron el borde de la colonia. Las colonias fueron de color azul claro, densas y en general no clatradas, sin embargo algunas presentaron clatrado breve. En una misma colonia, hubo células dispuestas en hileras a lo largo de la colonia y células que se encontraron distribuidas de forma heterogénea. El acomodo de las células en hileras es un carácter que no se había descrito para *M. aeruginosa*, sino para *M. panniformis*, no obstante, es importante notar que dos diferencias importantes entre ambas e indicada por Komárek *et al.* (2002) en la descripción original de esta especie, es que *M. panniformis* presenta colonias con grosor de una célula, a diferencia de lo descrito para *M. aeruginosa*. Las colonias presentaron filamentos de la cianoprocarionte *Pseudoanabaena voronichini* Anagnostidis incrustados en el mucílago.

Las dimensiones de las colonias se encontraron entre 240 – 500  $\mu\text{m}$  de largo por 58 – 150  $\mu\text{m}$  de ancho. El diámetro celular varió entre 4.2 y 4.6  $\mu\text{m}$  y el valor promedio fue 4.4  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células más cercanas fue de 1  $\mu\text{m}$  a 8.8  $\mu\text{m}$ , siendo las más comunes 1.5  $\mu\text{m}$  y 3.9  $\mu\text{m}$ . La amplitud del mucílago fue variable en cada colonia y osciló entre 1.95  $\mu\text{m}$  y 20.4  $\mu\text{m}$ ; en la mayoría de las colonias, estos valores se encontraron entre 2.92 y 11  $\mu\text{m}$ . En Valle de Bravo se observaron colonias alargadas que podrían corresponder con el morfotipo 4, pero una diferencia entre ambos tipos de colonias fue que las de Valle de Bravo eran más anchas y con menor número de células.

Chapultepec y Valle de Bravo

#### ***M. aeruginosa* Morfotipo 5 (M5)**

**Figura 6**

Colonias globulares, de forma muy irregular y con bordes bien delimitados. La consistencia del margen mucilaginoso fue difluente, fina y hialina, donde las células delimitaron el borde de la colonia. Las colonias fueron de color dorado a pardo oscuro y en general no clatradas pero sí se notaron distintas regiones de la colonia, como “brazos”; fueron densas y un poco compactas con muchas células. Las colonias encontradas en Valle de Bravo fueron distintas en tamaño, forma y densidad celular que los morfotipos de *M. aeruginosa* observados en Chapultepec y Chalco.

Las dimensiones de las colonias se encontraron entre 350 - 800  $\mu\text{m}$  de largo por 290 - 682  $\mu\text{m}$  de ancho. El diámetro celular varió entre 3.90 y 4.05  $\mu\text{m}$  y el valor promedio fue 3.95  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células más cercanas varió de 1 a 7.80  $\mu\text{m}$ , siendo la más común 3  $\mu\text{m}$ . La amplitud del mucílago fue variable en cada colonia, de 2.92 a 14.64  $\mu\text{m}$ .

Valle de Bravo



### ***M. aeruginosa* Morfotipo 6 (M6)**

**Figura 7**

Las colonias presentaron forma irregular y bien definida, de talla grande que no alcanzó a ser macroscópica; algunas fueron alargadas y otras semiesféricas. La consistencia del mucílago fue difluente, fina y hialina, y fue visible en algunas zonas de la colonia. El número de células en las colonias fue alto, y se distribuyeron heterogéneamente a lo largo de toda la colonia, por lo que las colonias fueron compactas. En este morfotipo, las colonias eran lobuladas y no presentaron clatrado, aunque su forma irregular se ha descrito para *M. aeruginosa*.

Las dimensiones de las colonias se encontraron entre 250 - 300  $\mu\text{m}$  de largo por 140 - 200  $\mu\text{m}$  de ancho. El diámetro celular varió entre 4.3 y 4.8  $\mu\text{m}$  y el valor promedio fue 4.73  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células más cercanas varió de 4.88 a 5.85  $\mu\text{m}$ , siendo más comunes 1.95 y 2.92  $\mu\text{m}$ . La amplitud del mucílago fue variable en cada colonia y se encontró entre 4.88 y 5.85  $\mu\text{m}$ .

Notas: Esta especie se observó únicamente en el mes de noviembre de 2015 en la orilla del lago de Chalco, no se observó en las muestras de febrero del mismo año, cuando las muestras analizadas provenían al centro del lago.

Chalco

### ***Microcystis protocystis* Crow**

La forma de las colonias fue irregular, al igual que sus márgenes. La consistencia del mucílago era difluente, fina y hialina, y fue visible en algunas regiones del borde de la colonia. El número de células fue escaso comparado con las otras especies y se encontraron distribuidas heterogéneamente y distanciadas dentro de un mucílago amplio, indistinto y difuso. En algunas colonias se observaron células agrupadas en pares. Las células eran esféricas, sin vaina individual y presentaron un alto contenido de aerotopos, que le confirieron a las células un color dorado a pardo oscuro.

Las dimensiones de las colonias se encontraron entre 108 –160  $\mu\text{m}$  de largo por 58 – 112  $\mu\text{m}$  de ancho. El diámetro celular se encontró en un intervalo de 3.2 – 4  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 3.9  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células más cercanas en un mismo plano fue de 1 – 7.8  $\mu\text{m}$ , siendo los valores más comunes 1.9 y 2.9  $\mu\text{m}$ . La amplitud del mucílago fue mayor que en las especies anteriores, y fue de 2.9 a 31.2  $\mu\text{m}$ , y los valores más comunes se encontraron entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ .

Notas: En Chapultepec no se pudieron observar las vainas celulares individuales, pero la amplitud del mucílago y la disposición de las células en las colonias fueron elementos importantes para su determinación. Algunas colonias presentaron en su interior filamentos de *Pseudoanabaena voronichini* Anagnostidis. Esta especie se observó en los tres lagos mexicanos y su talla fue más grande en las poblaciones de Valle de Bravo.

Chapultepec, Valle de Bravo y Chalco

### ***Microcystis flos-aquae* (Wittrock) Kirchner**

= *Microcystis prasina* (Wittrock) Lemmermann 1904 ?; *Microcystis aeruginosa* f. *flos-aquae* (Wittrock) Elenkin 1938.

Colonias esféricas con un número alto de células aglomeradas y muy cercanas entre sí, que confirieron un aspecto denso a toda la colonia, incluso los márgenes, bien delimitados. El color de las colonias fue azul claro, a excepción de algunas células pardas a doradas. La distribución de las células en las colonias fue homogénea, por lo que no se observaron zonas más densas que otras, o células empaquetadas (como en el caso de *M. aeruginosa* y *M. ichthyoblabe* morfotipo 4, respectivamente), aunque se notaron zonas huecas sin células, pero no se determinó como clatrado ya que no atravesaron la colonia. A un aumento de 100X se observaron algunas células dispuestas en hileras, que se mantuvieron incluso en distintos planos de las colonias. Este carácter se ha descrito para *M. panniformis*, aunque una diferencia importante entre ambas especies es que las colonias de *M. panniformis* tienen un grosor de una célula, a diferencia de *M. flos-aquae*.

Las dimensiones de las colonias se encontraron entre 126 - 238  $\mu\text{m}$  de largo por 82 – 232  $\mu\text{m}$  de ancho. El diámetro celular se encontró en un intervalo de 3.31 – 4.90  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 4.39  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células más cercanas en un mismo plano fue de 1 – 7.8  $\mu\text{m}$ , siendo los valores más comunes 0.976 y 2.92  $\mu\text{m}$ . La amplitud del mucílago fue mayor que en las especies anteriores, y varió entre 1.95 y 14.64  $\mu\text{m}$ , y los valores más comunes fueron cercanos a 3  $\mu\text{m}$ .

Notas: en algunas colonias la presencia de una capa de mucílago fue evidente mientras que en otras colonias no se observó, pero la distribución laxa de las células en la colonia, así como su forma permitieron su determinación. Por otro lado, en algunas de las colonias se observaron hileras de células, y en otras se observaron zonas con agrupamientos de células y otras zonas sin células, sin que fuese clatrado. La presencia de hileras no había sido reportada para esta especie, como en el caso de *M. ichthyoblabe*.

Esta especie se observó en Chapultepec y en el Lago de Chalco, y en general las colonias fueron idénticas en cuanto a la distribución de las células en la colonia y el margen mucilaginoso.

[Chapultepec](#) y [Chalco](#)

### ***Microcystis panniformis* Komárek**

Colonias pequeñas, amorfas, alargadas, no clatradas, de forma aplanada hasta llegar a monocapas, con vaina difluente y hialina. El margen mucilaginoso fue indistinto y no se sobrepuso. Las células presentaron arreglos en hileras; su forma fue esférica y no tuvieron vaina individual; las células se distribuyeron cercana y regularmente, algunas veces en filas indistintas; su color fue azul brillante, con presencia de pocos aerotopos, lo que le confirió a la colonia un aspecto más liso que otras especies de *Microcystis*. Las colonias no presentaron clatrado, y fueron densas y compactas, con células muy cercanas entre sí. Las

colonias fueron de color azul verde claro, presentaron una baja cantidad de aerotopos que dieron a las células una textura lisa. El grosor de la colonia no sobrepasó las cinco células de grosor. Las células se encontraron cercanas entre sí con una distribución homogénea, en arreglos de hileras dentro de las colonias.

El tamaño de las colonias se encontró entre 200 y 100  $\mu\text{m}$  de largo por 100 - 50  $\mu\text{m}$  de ancho. El diámetro celular se encontró entre 3.0 y 3.4  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células fue de 2  $\mu\text{m}$  y la amplitud del mucílago fue de 1 - 3  $\mu\text{m}$ .

Notas: en Chapultepec y Valle de Bravo, esta especie coexistió con otras, como *M. aeruginosa*, lo cual ha sido reportado previamente en Brasil (Komárek *et al.*, 2002). La descripción original de esta especie fue consecuente con la latitud tropical y el tipo de agua eutrófico para esta especie, a diferencia, por ejemplo, del caso de *M. viridis*, cuya presencia en los lagos mexicanos y eutróficos contrastó con su registro en poblaciones templadas y de sitios oligotróficos.

Chapultepec y Chalco

### ***Microcystis wesenbergii* (Komárek) Komárek in Kondrateva**

*Coelosphaerium dubium* Grunow in Rabenhorst sensu auct. post. (Hollerbach *et al.*, 1953), excl. typo;  
*Microcystis aeruginosa* Kützing sensu Teiling 1941; *Diplocystis wesenbergii* Komárek 1958.

Colonias globulares, algunas alargadas y otras esféricas, algunas veces macroscópicas, con forma y margen bien definido. Las colonias estuvieron delimitadas por un mucílago denso, firme y refringente. Las colonias fueron de color pardo oscuro a negro, y presentaron una baja cantidad de células, cuya distribución fue heterogénea, laxa y hacia el margen exterior de la colonia, que sumado a la baja cantidad de células, dieron a las colonias la apariencia de estar semivacías. Las células eran esféricas, con una gran cantidad de aerotopos que le dieron a las células un color pardo oscuro. El número de células dentro de la colonia fue bajo respecto al tamaño de la colonia, y aunado a la distribución de las células hacia la periferia de la misma, dieron a las colonias un aspecto de estar semivacía.

El tamaño de las colonias se encontró entre 108 y 307  $\mu\text{m}$  de largo por 83 - 170  $\mu\text{m}$  de ancho. El diámetro celular varió entre 5.62 y 6.48  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 6.10  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células varió entre 0.488 y 8.784  $\mu\text{m}$ , y el valor más común fue 1  $\mu\text{m}$ . La amplitud del mucílago osciló entre 1.95 y 10.73  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 6  $\mu\text{m}$ .

Notas: Esta especie se observó en Chapultepec y Valle de Bravo; en el ambalse las colonias eran típicas de esta especie, con numerosas subcolonias con pocas células, y en ambos lagos se observaron colonias en estadios jóvenes, las cuales, de acuerdo con Komárek & Anagnostidis (1999), son esféricas y sin lobulaciones. De acuerdo con Komárek & Anagnostidis (1999), esta especie habita cuerpos de agua dulce y eutróficos, pueden formar florecimientos y presentar distribución cosmopolita, lo que fue consecuente con lo observado en este trabajo.

Chapultepec y Valle de Bravo

### ***Microcystis viridis* (A. Braun in Rabenhorst) Lemmermann**

*Polycystis viridis* A. Braun. In Rabenhorst 1862; *Microcystis aeruginosa* f. *viridis* (A. Braun) Elenkin 1938; *Anacystis cyanea* (Kützing) Drouet et Daily 1952 p.p. excl. tipo; *Diplocystis viridis* (A. Braun) Komárek 1958.

Las colonias fueron microscópicas, con morfología y márgenes bien definidos y delimitados por un margen mucilaginoso denso y refringente. El color de las colonias era pardo oscuro cercano a negro. Las células se encontraron empaquetadas dentro de subcolonias con un número par de células, que fue de 2 a 12 células aproximadamente. Los paquetes o subcolonias eran de forma y margen regular, casi cúbica, rodeadas de mucílago amplio y evidente, de estructura refringente. La amplitud del mucílago fue uniforme y no variable; en algunas subcolonias el mucílago formó capas y se sobrepuso el mucílago de las células más jóvenes. Las colonias se observaron compactas, tridimensionales y cúbicas, y se compusieron de 7 a 15 subcolonias, por lo que encontraron colonias muy pequeñas y otras grandes que no alcanzaron a ser macroscópicas como *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe* y *M. wesenbergii* observadas en este estudio; por otro lado, la abundancia de colonias de *M. viridis* no fue tan alta como las de las tres especies antes mencionadas.

El tamaño de las colonias se encontró entre 90 - 100  $\mu\text{m}$  de largo por 60 - 80  $\mu\text{m}$  de ancho. El diámetro celular se encontró en un intervalo de 4.84 – 6.13  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 5.34  $\mu\text{m}$ . La distancia entre las células presentó un intervalo de 0.97 - 7.8  $\mu\text{m}$ , siendo los valores más comunes cercanos a 2  $\mu\text{m}$ . La amplitud del mucílago dentro de un mismo paquete de células varió entre 2.92 a 4.88  $\mu\text{m}$ , y el valor más común fue 4.88  $\mu\text{m}$ .

Notas: en las colonias de esta especie, el acomodo de las células en los paquetes y la distancia tan pequeña entre las células, permitió inferir que la colonia se encontraba en un momento de división celular.

De acuerdo con Komárek & Anagnostidis (1999), esta especie tiene distribución cosmopolita, aunque se encuentra principalmente en sitios templados y esporádicamente eutróficos, lo cual contrastó con lo encontrado en este trabajo.

Valle de Bravo

**Cuadro 5.** Presencia de las especies y morfotipos de *Microcystis* en Chapultepec, Valle de Bravo y Chalco en las temporadas de lluvia (LL) y seca (S). La especie 1 *M. ichthyoblabe* incluyó 7 morfotipos, la especie y la especie 2 *M. aeruginosa* incluyó 6 morfotipos. Los cuadros negros indican presencia y los blancos la ausencia de especies o morfotipos.

Especies y morfotipos	Chapultepec		Valle de Bravo		Chalco
	Octubre 2013	Mayo 2015	Noviembre 2014	Junio 2015	Noviembre 2015
	LL	S	LL	S	LL
1 <i>M. ichthyoblabe</i> (Mi)					
M1	■	■	□	□	□
M2	■	■	□	□	□
M3	■	■	□	□	□
M4	■	□	□	□	□
M5	■	□	■	■	■
M6	□	□	■	■	■
M7	□	□	■	□	■
2 <i>M. aeruginosa</i> (Ma)					
M1	■	■	□	□	□
M2	■	■	□	□	□
M3	■	■	□	□	□
M4	■	■	■	□	□
M5	□	□	■	□	□
M6	□	□	□	□	■
3 <i>M. protocystis</i> (Mpr)	■	■	■	□	■
4 <i>M. flos-aquae</i> (Mfa)	■	■	□	□	■
5 <i>M. panniformis</i> (Mpa)	■	■	□	□	■
6 <i>M. wesenbergii</i> (Mw)	■	□	■	■	□
7 <i>M. viridis</i> (Mv)	□	□	■	■	□

Observamos que las poblaciones de *Microcystis* en los tres lagos fueron morfológicamente diferentes y la presencia heterogénea de especies con sus morfotipos le confirió un perfil particular a cada cuerpo de agua (Figs. 5-7, cuadro 5). Del total de especies, tres de ellas estuvieron presentes en los tres lagos: *M. ichthyoblabe*, *M. aeruginosa* y *M. protocystis*; en el caso de las dos primeras, su presencia varió con morfotipos específicos para cada lago. *M. panniformis* y *M. flos-aquae*, se observaron en Chapultepec y en Chalco; *M. wesenbergii* en Chapultepec y Valle de Bravo y *M. viridis* únicamente en Valle de Bravo (cuadro 5).

La relación entre la riqueza de especies y morfotipos de cada lago y las condiciones climáticas se analizó con la prueba de Chi cuadrada, considerando a los lagos y épocas como variables cualitativas y la frecuencia de especies o morfotipos presentes en cada época y en cada lago como valor de asociación.

Una tabla de contingencia de los datos (cuadro 6), mostró el grado de asociación entre las variables (Fig. 8). El resultado de la prueba de Chi cuadrada, con un  $p$ -valor menor al nivel de significación alfa, de 0.05, estableció diferencias evidentes en la riqueza de las especies y morfotipos de *Microcystis* en cada lago, dependiendo de la estación climática. Se aceptó por tanto la hipótesis alternativa de la prueba (cuadro 7), cuyo cumplimiento indicó que hay dependencia entre filas y columnas de la tabla de contingencia, es decir que la frecuencia de especies está asociada con el sitio y la época de lluvia o seca. Esto fue comprobado a través de las frecuencias teóricas y de proporciones y columnas (cuadro 8), que especificaron una magnitud de asociación de las especies con cada lago, dependiendo de la estación climática.

**Cuadro 6.** Tabla de contingencia para Chi cuadrada. La frecuencia relativa calculada para el número de especies y morfotipos sintetizó el valor que califica cada época y sitio.

	Chapultepec	Valle de Bravo	Chalco
Época de lluvias	184.6	65.6	57.4
Época seca	102	24.8	0

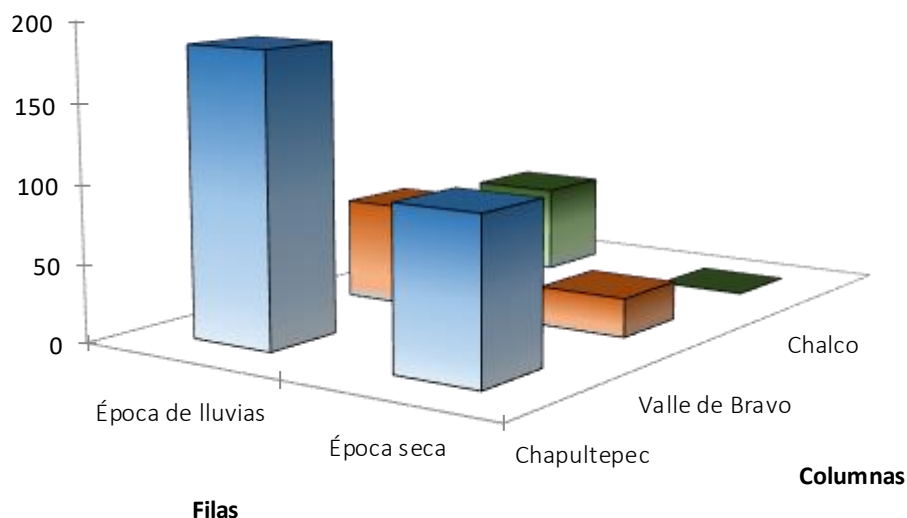
**Cuadro 7.** Prueba de independencia entre las filas y columnas (Chi-cuadrada). El valor de  $p$  calculado fue menor a la significación de alfa. El riesgo de rechazo de la Hipótesis nula ( $H_0$ ) en caso de ser verdadera, es mínimo (menor a 0.01 %).

Chi-cuadrado (Valor observado)	29.476
Chi-cuadrado (Valor crítico)	5.991
GL	2
valor-p	< 0.0001
alfa	0.05

### Diversidad genética de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA en las poblaciones de *Microcystis*

Las siete muestras utilizadas para el gel DGGE de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis* (cuadro 3) fueron resultado de amplificación por PCR anidada, con marcadores específicos para dicha región de *Microcystis* (Janse *et al.*, 2003; Fig. 1). A partir del gel obtenido, nosotros reconocimos y recortamos manualmente 13 bandas que conformaron el perfil del gel, utilizando el transiluminador Fotodyne (cuadro 9 y Fig. 9).

Sin embargo, existe la posibilidad de haber recuperado solo parte de la diversidad genética total de *Microcystis* debido a que al fotografiar el gel en el fotodocumentador Vilber Lourmat, fueron visibles otras bandas de baja intensidad que no logramos observar con el transiluminador Fotodyne al momento de recortar las bandas.



**Figura 8.** Datos gráficos de la tabla de contingencia. La frecuencia de especies en cada columna sugirió asociación entre las variables cualitativas seleccionadas de sitio (columnas) y época climática (filas).

**Cuadro 8.** Frecuencias teóricas y proporciones por columna de la prueba Chi cuadrada. Las frecuencias teóricas mostraron valores siempre superiores a 5.0 y al menos en época de lluvias, las proporciones entre filas y columnas mostraron diferencias significativas, lo que hizo robusto el resultado de Chi cuadrada por sobre análisis de exactitud de Fisher.

**Frecuencias teóricas:**

	Chapultepec	Valle de Bravo	Chalco	Total
Época de lluvias	202.942	64.013	40.645	307.600
Época seca	83.658	26.387	16.755	126.800
Total	286.6	90.4	57.4	434.4

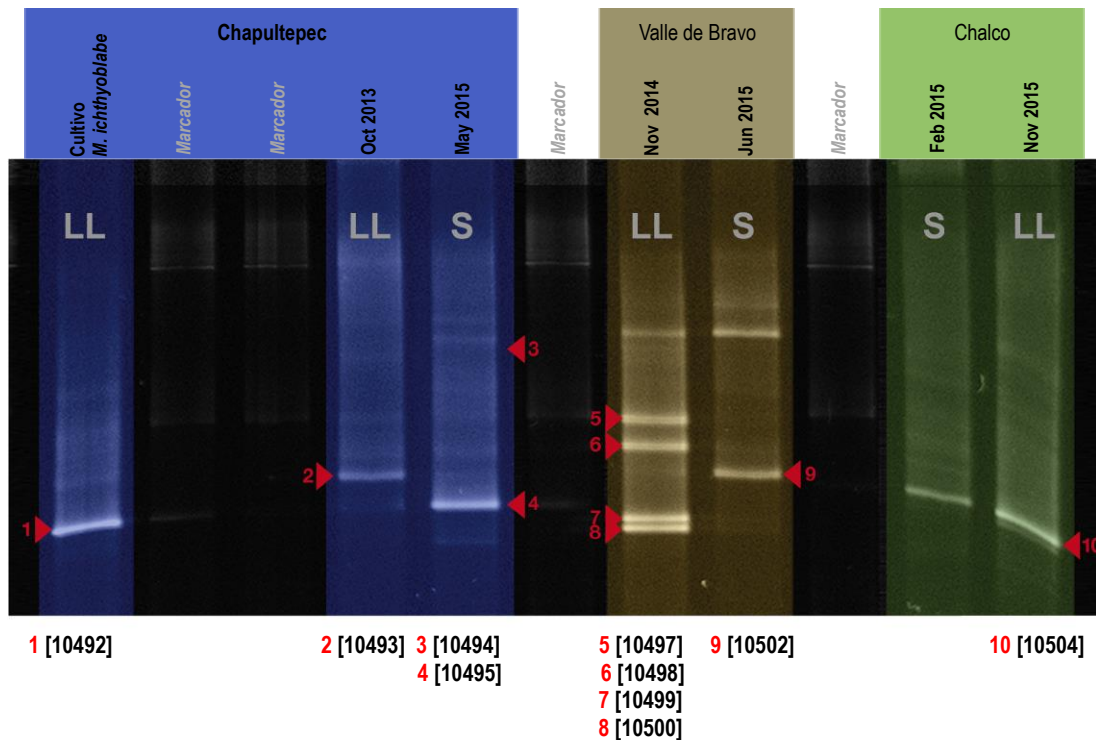
**Proporciones / Columna:**

	Chapultepec	Valle de Bravo	Chalco	Total
Época de lluvias	0.644	0.726	1.000	0.708
Época seca	0.356	0.274	0.000	0.292
Total	1	1	1	1

En la fotografía del gel obtenida (Fig. 9), las diez bandas cuyas secuencias analizadas mostraron una pertenencia con especies de *Microcystis* (BLAST, NCBI) se resaltaron con una flecha roja; las bandas superiores de los carriles de las muestras de Valle de Bravo (carriles 7 y 8) y la única banda de Chalco de temporada seca (carril 10), pertenecieron a distintos géneros de cianoprocariontes, por lo que la posición de las bandas no necesariamente indica la correspondencia con un único taxón, a diferencia de lo reportado por Muyzer *et al.* (1993).

La posición de las diez bandas que conformaron el perfil genético de *Microcystis* fue diferente y en consecuencia representaron secuencias distintas, de acuerdo con el fundamento de la técnica de los geles DGGE (apartado de métodos). La diferencia entre las secuencias de DNA fue corroborada para la región que codifica para el ITS 16S-23S rDNA (Fig. 10).

Para el cultivo de *Microcystis ichthyoblabe* se observó una sola banda, que correspondió en identidad con una secuencia de *Microcystis ichthyoblabe* de acuerdo con BLAST (GenBank, NCBI). En las muestras de comunidad del Lago de Chapultepec, se observaron dos bandas, una para la temporada seca (S) y otra para lluvias (LL), localizadas en una posición distinta, que indicaron secuencias diferentes. Considerando la posición de la banda del cultivo de *M. ichthyoblabe*, en el Lago de Chapultepec se identificaron en total tres secuencias distintas. En la muestra de Chapultepec de la temporada seca (S), la banda que correspondió con la muestra del cultivo estuvo ausente.



**Figura 9.** Perfil del gel DGGE de la diversidad genética de secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis* en los tres sitios estudiados. El carril 1 corresponde con el cultivo de *M. ichthyoblabe* y los carriles 4 y 5 a muestras de florecimiento en la temporada de lluvia (LL) y seca (S) del Lago Mayor de Chapultepec. Los carriles 7 y 8 corresponden con muestras de florecimiento de la temporada de lluvia (LL) y seca (S) de Valle de Bravo. Los carriles 10 y 11 corresponden con muestras de florecimiento de la temporada seca (S) y de lluvia (LL) del Lago de Chalco. Las bandas indicadas con flecha roja correspondieron con *Microcystis* de acuerdo con una búsqueda en BLAST, que posteriormente fueron secuenciadas y analizadas filogenéticamente. En la parte inferior del gel se indica el número de banda del gel y en corchetes la clave de la secuencia correspondiente). Cada lago se presenta con un color distintivo, utilizado en el apartado de la determinación de especies de *Microcystis*.



Para los carriles correspondientes a muestras de Valle de Bravo (carriles 7 y 8), se encontraron cinco bandas (Fig. 9): cuatro para la temporada de lluvia (LL) y una para la seca (S) (Fig. 9). Ninguna de estas bandas coincidió en posición con las bandas de muestras de Chapultepec, lo que indicó la presencia de secuencias distintas. Para la muestra de Chalco de la temporada de lluvia (LL), se observó una banda, cuya posición fue la misma a la del cultivo de *M. ichthyoblabe*.

El nivel de diversidad genética considerada como el número de secuencias distintas que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis* (número de bandas en cada muestra de cada lago) comparada con la riqueza morfológica detectada al microscopio, fue menor en todos los lagos (cuadro 6 y Fig. 9).

**Cuadro 9.** Número de secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de las poblaciones de *Microcystis* para los tres lagos y las especies de *Microcystis* observadas y compartidas (sombreado gris claro) en las temporadas de lluvia (LL) y seca (S).

	Chapultepec		Valle de Bravo		Chalco
Temporada de muestreo	LL	S	LL	S	LL
Número de secuencias ITS de <i>Microcystis</i> distintos	1	1	4	1	1
Total de secuencias ITS por lago	2		5		1
Especies presentes y compartidas en cada lago en ambas temporadas de muestreo	<i>M. ichthyoblabe</i>	<i>M. ichthyoblabe</i>	<i>M. ichthyoblabe</i>	<i>M. ichthyoblabe</i>	<i>M. ichthyoblabe</i>
	<i>M. aeruginosa</i>	<i>M. aeruginosa</i>	<i>M. aeruginosa</i>	<i>M. aeruginosa</i>	<i>M. aeruginosa</i>
	<i>M. protocystis</i>	<i>M. protocystis</i>	<i>M. protocystis</i>		<i>M. protocystis</i>
	<i>M. flos-aquae</i>	<i>M. flos-aquae</i>			<i>M. flos-aquae</i>
	<i>M. panniformis</i>	<i>M. panniformis</i>			<i>M. panniformis</i>
	<i>M. wesenbergii</i>		<i>M. wesenbergii</i>	<i>M. wesenbergii</i>	
			<i>M. viridis</i>	<i>M. viridis</i>	
Total de especies observadas	6	5	5	4	5

**Cuadro 10.** Bandas recortadas del gel DGGE y pertenecientes a la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis*. La identidad de cada secuencia (ID columna 3) se verificó a través de una búsqueda en BLAST (GenBank, NCBI). La clave de cada secuencia (columna 6) se compone del número de la secuencia, el sitio y la fecha de muestreo y es la que se utilizó en los análisis filogenéticos y de estructura secundaria.

Banda Gel DGGE	Origen de la muestra	ID de la secuencia	Fecha de recolección	Correspondencia de la secuencia con NCBI (BLAST)	Clave de la secuencia para análisis de secuencias posteriores
1	Cultivo <i>M. ichthyoblabe</i>	10492	Octubre 2013	<i>M. aeruginosa</i> (99-96%) <i>M. botrys</i> (96%) <i>M. flos-aquae</i> (95%)	10492_Mich_LMMx_1013
2	Chapultepec, S	10493	Octubre 2013	<i>M. aeruginosa</i> (99-96%)	10493_LMMx_1013
3	Chapultepec, LL	10494	Mayo 2015	<i>Microcystis</i> (88%)	10494_LMMx_0615
4	Chapultepec, LL	10495	Mayo 2015	<i>M. aeruginosa</i> (97-95%) <i>M. panniformis</i> (95%)	10495_LMMx_0615
6*	Valle de Bravo, S	10497	Noviembre 2014		10497_VBMx_1114
7*	Valle de Bravo, S	10498	Noviembre 2014	<i>M. aeruginosa</i> (97-95%) <i>M. panniformis</i> (97-95%)	10498_VBMx_1114
8*	Valle de Bravo, S	10499	Noviembre 2014	<i>M. flos-aquae</i> (97-95%)	10499_VBMx_1114
9*	Valle de Bravo, S	10500	Noviembre 2014		10500_VBMx_1114
11	Valle de Bravo, LL	10502	Junio 2015	<i>M. aeruginosa</i> (98-97%)	10502_VBMx_0615
13	Chalco, S2	10504	Noviembre 2015	<i>M. aeruginosa</i> (81-79%) <i>M. panniformis</i> (81-79%)	10504_ChMx_1115

Las secuencias obtenidas de las bandas recortadas se corrigieron (Unipro UGENE v1.14.2) y posteriormente se compararon con secuencias de bases de datos (GenBank, NCBI). Los resultados arrojaron que todas las secuencias correspondieron con un porcentaje de similitud  $\geq 95\%$  a secuencias de tres o más especies de *Microcystis*, que no fueron observadas en el microscopio para las localidades mexicanas (cuadro 10).

### **Análisis de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis***

Las secuencias obtenidas a partir de las bandas del gel DGGE presentaron completa la región que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal, de acuerdo con una comparación entre nuestras secuencias y el esquema de la estructura secundaria de la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis* propuesta por van Gremberghe *et al.* (2011) (Figs. 1 y 10 de este trabajo), donde el inicio (secuencia previa a la hélice D, color verde) y el final de las secuencias de DNA (secuencia del dominio D5) coinciden. El tamaño de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal obtenidas en este trabajo varió entre 353 y 366 pb, y representan secuencias de menor longitud que los 550 pb reportado por Janse *et al.* (2003). Esta diferencia en la longitud de las secuencias de DNA mostró que *Microcystis* presenta una

amplia variación de tamaño de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal como sucede en otros cianoprocariontes (Iteman *et al.*, 2000; Janse *et al.*, 2003).

Las diez secuencias de DNA de *Microcystis* se alinearon de manera automática (Clustal Omega) y manual (de acuerdo con la estructura secundaria) para identificar las diferencias en los sectores que componen la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal, ya que las bandas tuvieron una posición diferente en el gel DGGE. Tomando como base el método de alineamiento manual basado en las regiones conservadas y variables a partir de la estructura secundaria aplicado por distintos autores (Iteman *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2011), las secuencias de DNA mexicanas de *Microcystis* presentaron 79 posiciones con variación en bases y presencia de *gaps* (Fig. 10), específicamente en cinco sectores: hélice D (resaltado con color verde, con 8 posiciones con variación), gen del tRNA<sup>ile</sup> (6 posiciones con variación), caja B (resaltado con color magenta, con 8 posiciones con variación), caja A y caja D4.

Para la construcción de la filogenia molecular de la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis*, se utilizaron las diez de las secuencias obtenidas de los geles DGGE y otras 30 secuencias de siete especies de *Microcystis* (GenBank, NCBI), procedentes de cultivo o comunidad, que habitan lagos y reservorios de regiones de latitud tropical y templada de cinco países: Vietnam, Tailandia, Japón, China y Francia (cuadro 11). Ninguna de las secuencias analizadas presentó duplicados. Se utilizó la secuencia de *Arthrospira maxima* FACHB438 (número de acceso GenBank FJ826622.1) como grupo externo.

Los análisis de distancia y filogenéticos se realizaron bajo las condiciones establecidas en el cuadro 12. El análisis de inferencia bayesiana se realizó con el modelo HKY+G+I de acuerdo con el criterio BIC sugerido por el *software* MEGA7. En este apartado se mostraron y discutieron los resultados de los análisis de distancia y máxima verosimilitud, el primero por ser un análisis exploratorio y el segundo porque resolvió un mayor número de secuencias que los análisis de parsimonia e inferencia bayesiana; estos dos últimos se pueden consultar en el apéndice 3. Para fines comparativos, aquí se presentaron las condiciones de análisis de todas las reconstrucciones filogenéticas (cuadro 12).



**Figura 10.** Alineamiento de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de las diez secuencias de *Microcystis* obtenidas en el presente trabajo. Esta región se compuso de la hélice D, al inicio del ITS, la caja B, hacia el final del ITS, y otros cinco sectores más (D2, D3, tRNA<sup>ile</sup>, caja A y D4). Con asteriscos se indican las posiciones con diferencias en bases incluyendo los gaps (Johansen *et al.*, 2011; Itean *et al.*, 2000).



Se determinó la similitud entre las secuencias de DNA de *Microcystis* de los lagos mexicanos y sus taxones hermanos a través de una matriz de distancias *p* calculada con el *software* MEGA7. Los valores resultantes se discutieron como porcentaje de divergencia genética (%).

**Cuadro 11.** Referencias de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis* utilizadas en el trabajo presente con fines comparativos.

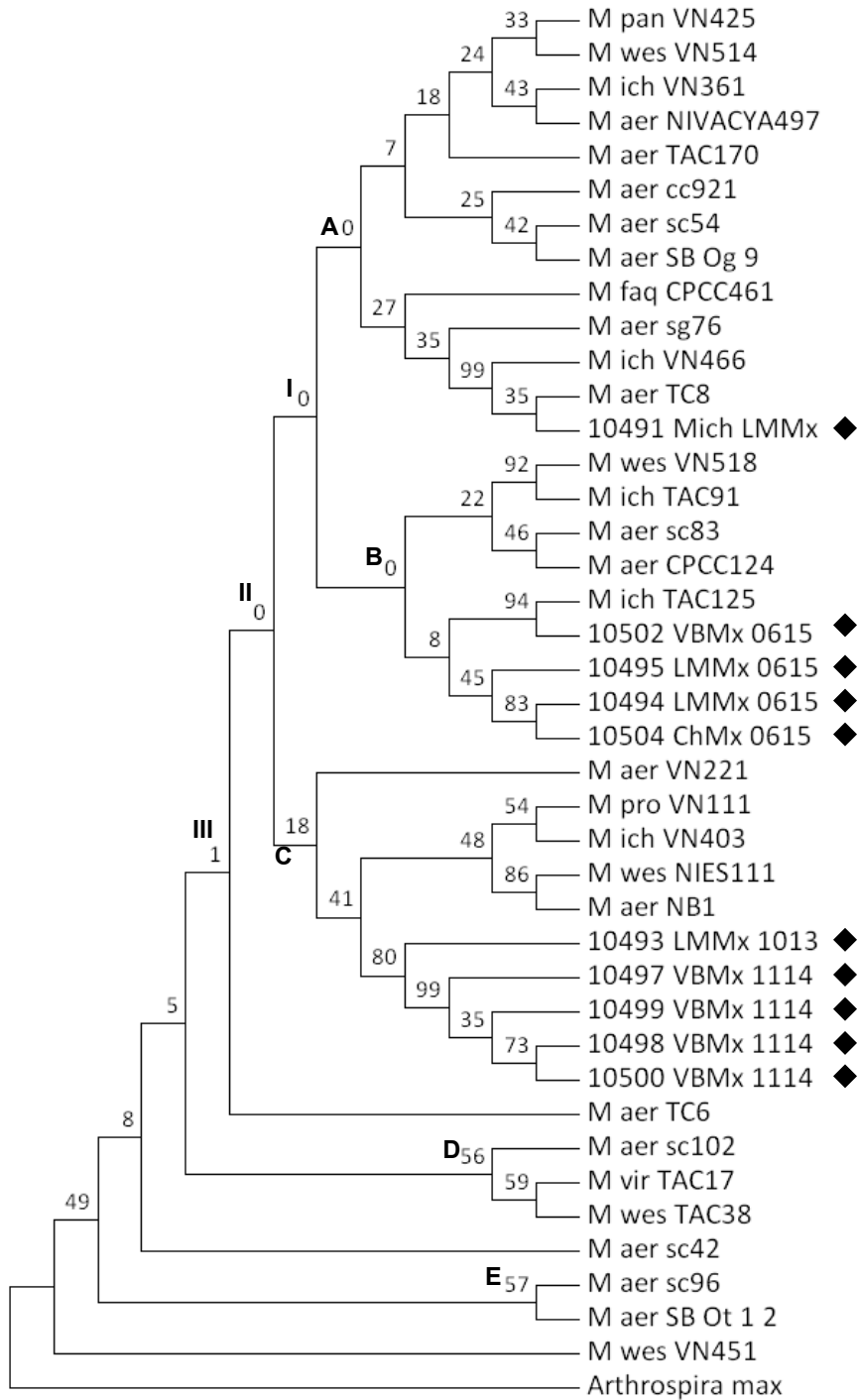
Referencia	País de origen de las secuencias publicadas	Número de secuencias sin duplicados
Otsuka <i>et al.</i> (1999)	Japón y China	26
Humbert <i>et al.</i> (2005)	Francia	12
Nishizawa <i>et al.</i> (2007)	Japón	14
Ngüyen <i>et al.</i> (2012)	Vietnam	23
Yoshida <i>et al.</i> (2008)	Japón	3
Otten & Paerl (2011)	China	4

La relación de algunas secuencias de DNA de los lagos mexicanos se conservó en todos los análisis. El árbol obtenido con máxima verosimilitud (Fig. 12) presentó mayor número de nodos soportados en comparación con los otros tres análisis, por tanto, la descripción y discusión de los análisis filogenéticos se basaron en él. Los análisis complementarios de estructura secundaria de los sectores hélice D y caja B y temperatura tuvieron como base el mismo árbol. Se formaron tres clados principales (I, II y III) y siete subgrupos (A-G); las secuencias de DNA de *Microcystis* de los lagos mexicanos se distribuyeron en los tres clados. En general, los valores de soporte de los nodos más incluyentes fueron menores que los nodos terminales, lo cual sugirió mayor consistencia para cada subgrupo que para las relaciones entre subgrupos.

La mayoría de las secuencias de DNA que integraron cada clado correspondió con la asignación a una especie en particular. Lo que indicó que para las poblaciones mexicanas, la diversidad genética es menor que lo reportado en la literatura (Janse *et al.*, 2003). Para cada secuencia obtenida en este estudio, se presenta su probable identidad taxonómica basada en el análisis de máxima verosimilitud en el cuadro 13. Los clados compuestos por las secuencias de DNA de *Microcystis* de los lagos mexicanos mostraron los valores de soporte (bootstrap y probabilidad posterior) más altos, por arriba de 80 a diferencia de los clados con secuencias de DNA de *Microcystis* obtenidas de la literatura, que no tuvieron soporte (bootstrap $\leq$ 50).

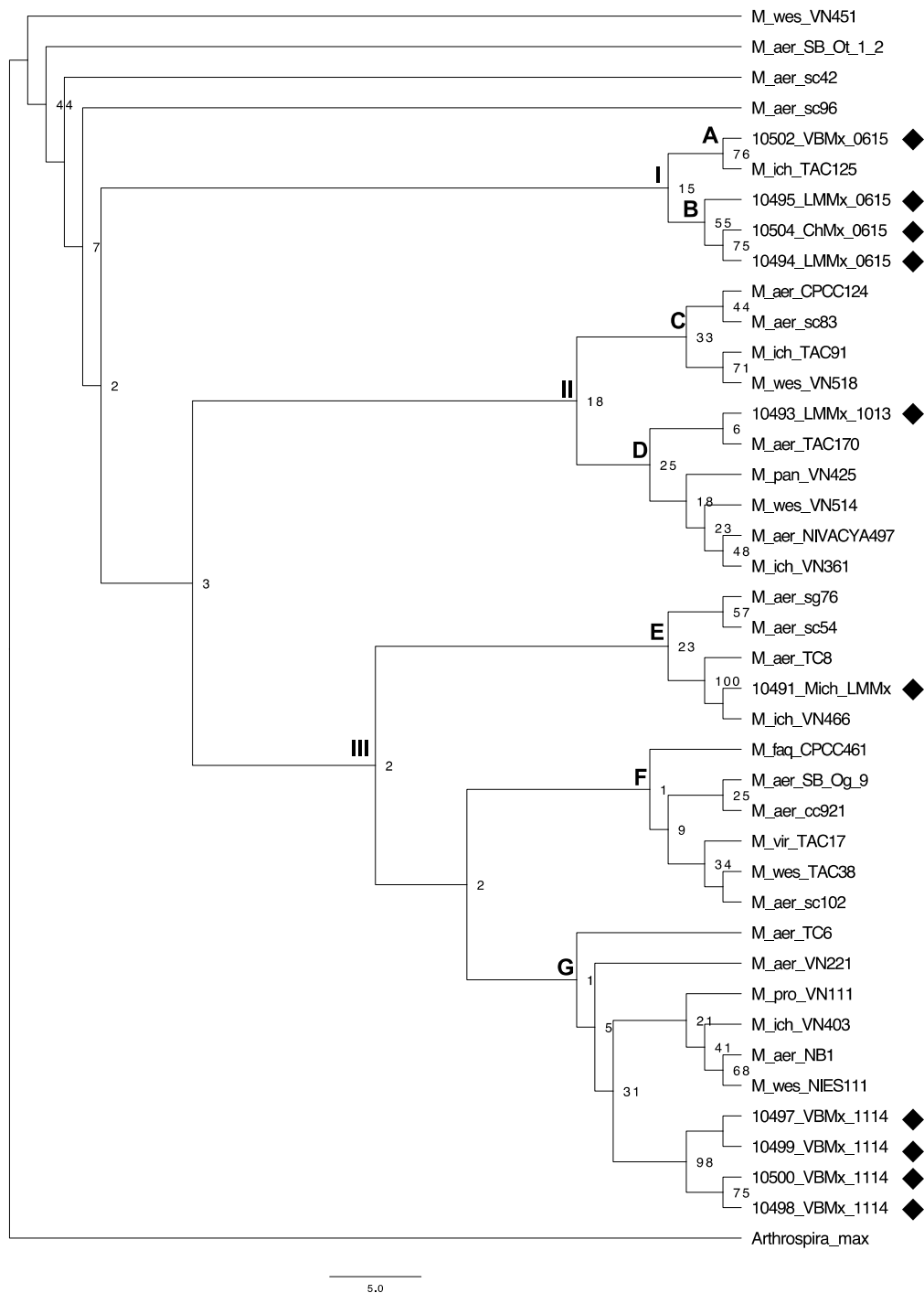
**Cuadro 12.** Condiciones de los análisis de distancia, parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana para las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis*.

Información del análisis	Neighbor Joining MEGA7	Parsimonia PAUP 4.0	Máxima Verosimilitud TOPALi v2	Análisis bayesiano Mr. Bayes v3.2.5
<b>General</b>				
Análisis				
<b>Análisis</b>	Reconstrucción de filogenia	Reconstrucción de filogenia	Reconstrucción de filogenia	Reconstrucción de filogenia
<b>Método estadístico</b>	Neighbor Joining	Parsimonia	Máxima verosimilitud	
Prueba de Filogenia				
<b>Prueba de filogenia</b>	Método bootstrap	Método bootstrap	Método bootstrap	Dos cadenas MCMC
<b>No. de réplicas</b>	1000 réplicas bootstrap	1000 réplicas bootstrap	100 réplicas bootstrap	10000000 generaciones
Modelo de Sustitución				
<b>Tipo de Sustitución</b>	Nucleotídica			
<b>Modelo/Método</b>	Modelo Tamura-Nei	No aplica	HKY+G+I	HKY+G+I
<b>Incluir las sustituciones [substituciones para incluir]</b>	d: Transiciones + Transversiones		Transiciones y transversiones	Transiciones y transversiones
Tasas y Patrones				
<b>Tasas entre sitios</b>	Distribución Gamma (G)		Distribución Gamma (G)	Invgamma
<b>Parámetro Gamma</b>	2			
<b>Patrón entre Linajes</b>	El mismo (Homogéneo)			
<b>Nombre completo del modelo de sustitución</b>	TN+G	No aplica	HKY+G	HKY+G+I
Subconjunto de datos a utilizar				
<b>Gaps/Tratamiento de datos faltantes</b>	Supresión completa	Tratados como datos faltantes		Supresión completa
<b>Número de sitios: 324</b>	314			
<b>Algoritmo de recambio de ramas</b>	TBR		TBR	TBR
<b>Orden de adición de secuencias</b>	Aleatorio			
<b>Número máximo de árboles</b>	No aplica	100	1	1
<b>Colapso de ramas</b>	Si la longitud máxima de la rama es cero			
<b>Árbol mostrado</b>	Árbol de mayoría, con bootstrap = 50%			
<b>Valor de distancia evolutiva presentada</b>	Sustituciones por sitio			
<b>Tipo</b>	<b>Valor</b>			
<b>Tipo</b>	No enraizado			
<b>SBL</b>	1.59437566			
<b>Valor de "burnin"</b>	No aplica	No aplica	No aplica	25%



**Figura 11.** Análisis de distancia Neighbor Joining (Saitou & Nei, 1987) inferido con secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis*. En la parte superior de las ramas se muestra el porcentaje de árboles replicados (1000 réplicas) en los que los filotipos asociados se agruparon juntos en la prueba de bootstrap (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Tamura Nei (Tamura & Nei, 1993) con una tasa de variación entre sitios con distribución gamma (shape parameter=2), a través del *software* MEGA7 (Kumar *et al.*, 2015). Todas las posiciones que contenían gaps o datos faltantes se eliminaron. En los árboles obtenidos, las abreviaciones de las especies corresponden con: M\_ich = *M. ichthyoblabe*; M\_aer = *M. aeruginosa*; M\_prot = *M. protocystis*; M\_pan = *M. panniformis*; M\_faq = *M. flos-aquae*; M\_wes = *M. wesenbergii*; M\_vir = *M. viridis*. Las iniciales seguidas de las especies corresponden con el país de origen: cc = Francia; CPCC = China; TC = Tailandia; VN = Vietnam; NIVACYA, TAC, NIES; NB1; SB = Japón.





**Figura 12.** Análisis de máxima verosimilitud obtenido con secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis*. Se implementó el modelo de sustitución HKY+I+G. Se utilizaron 100 réplicas de bootstrap y el algoritmo TBR. En los nodos se indica el valor de bootstrap. Los clados principales se muestran con números romanos (I - III) y los subgrupos derivados con letras (A - H). Las abreviaciones de las especies corresponden con: M\_ich = *M. ichthyoblabe*; M\_aer = *M. aeruginosa*; M\_prot = *M. protocystis*; M\_pan = *M. panniformis*; M\_faq = *M. flos-aquae*; M\_wes = *M. wesenbergii*; M\_vir = *M. viridis*. Las iniciales seguidas de las especies corresponden con el país de origen: cc = Francia; CPCC = China; TC = Tailandia; VN = Vietnam; NIVACYA, TAC, NIES; NB1; SB = Japón.

Siete de las secuencias de DNA de material mexicano (10494, 10495, 10504, 10497, 10498, 10499, 10500) formaron dos subgrupos resueltos dentro de los clados I y III que permanecieron constantes independientemente del método filogenético utilizado (ver Apéndice 3).

El clado I formó los dos subgrupos A y B, ambos con soporte mínimo de bootstrap (bootstrap=55). En este clado se encontraron cuatro secuencias de DNA de *Microcystis* provenientes de las tres localidades mexicanas durante la temporada seca de 2015: 10502\_VBMx\_0615, 10495\_LMMx\_0615, 10504\_ChMx\_0615 y 10494\_LMMx\_0615. La única otra secuencia agrupada en el clado I fue *M. ichthyoblabe* proveniente de Japón.

El clado II formó dos subgrupos, C y D sin soporte de bootstrap (bootstrap>50). El subgrupo C incluyó secuencias de *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe* y *M. wesenbergii* provenientes de las regiones de latitud tropical, subtropical y templada. El subgrupo D incluyó la secuencia 10493\_LMMx\_1013 de Chapultepec, cuya secuencia más cercana fue *M. aeruginosa* TAC170 proveniente de Japón y otras secuencias de especies con las que compartió un alto grado de similitud de acuerdo con BLAST (NCBI): *M. aeruginosa*, *M. panniformis*, *M. wesenbergii* y *M. ichthyoblabe* provenientes de Japón y Vietnam.

El clado III estuvo compuesto de tres subgrupos E, F y G, que no tuvieron soporte (bootstrap=31). En el subgrupo E la secuencia de nuestro cultivo de *M. ichthyoblabe* de Chapultepec tuvo una relación cercana con secuencias de *M. ichthyoblabe* y *M. aeruginosa* provenientes de Vietnam, Japón y Francia. Esta agrupación presentó un valor de soporte alto (bootstrap=100). El subgrupo G incluyó al complejo Valle de Bravo (10497\_VBMx\_1114, 10498\_VBMx\_1114, 10499\_VBMx\_1114 y 10500\_VBMx\_1114), quienes formaron un clado derivado particular, con soporte alto (bootstrap=98). Las secuencias más cercanas a ellas fueron de *M. aeruginosa*, *M. protocystis*, *M. ichthyoblabe* y *M. wesenbergii*, provenientes de Tailandia, Vietnam y Japón.

Respecto a los valores de divergencia genética (cuadro 16, apéndice 4), nuestras secuencias de DNA presentaron valores de 0 a 7.8% respecto a sus secuencias de DNA hermanas. En el clado I subgrupo A, la secuencia 10502 de Valle de Bravo tuvo un valor de divergencia de 0% respecto a *M. ichthyoblabe* TAC125 de Japón, y en el subgrupo B, las secuencias de Chapultepec y Chalco presentaron valores de 2, 6.1 y 7.8% entre ellas. En el clado II subgrupo C, los valores entre las secuencias de *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe* y *M. wesenbergii* fueron de 0.3 a 3.5% y en el subgrupo D la divergencia entre las secuencias 10493\_LMMx\_1013 de Chapultepec y *M. aeruginosa* TAC170 de Japón fue 3.2%. En el clado III subgrupo E, nuestro cultivo de *M. ichthyoblabe* presentó valores de divergencia entre 0 y 0.3% con secuencias de *M. aeruginosa* y *M. ichthyoblabe* provenientes de Tailandia y Vietnam. En el subgrupo G, las secuencias del complejo Valle de Bravo tuvieron valores de entre 0 y 0.3% entre ellas, mientras que respecto a sus secuencias hermanas, los valores fueron entre 1% y 3.2%.

**Cuadro 13.** Relación entre la posible identidad de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de las poblaciones de *Microcystis* de los lagos mexicanos. La columna 4 indica la atribución taxonómica de las secuencias de acuerdo con su relación filogenética con los análisis de distancia, parsimonia e inferencia bayesiana. La columna 5 indica la presencia de cada especie atribuida en las muestras recolectadas de cada lago en cada temporada de muestreo. También se indica las especies observadas al microscopio que no correspondieron con las especies atribuidas.

Origen de la muestra	Fecha de recolección	Clave de la secuencia para análisis de secuencias posteriores	Atribución taxonómica de acuerdo con las relaciones filogenéticas	Correspondencia de la atribución con las especies observadas en el microscopio fotónico
Cultivo <i>M. ichthyoblabe</i>	Octubre 2013	10492_Mich_LMMx_1013	<i>M. ichthyoblabe</i>	<i>M. ichthyoblabe</i>
Chapultepec, S	Octubre 2013	10493_LMMx_1013	<i>M. aeruginosa</i>	<i>M. aeruginosa</i> <i>M. panniformis</i> <i>M. wesenbergii</i> <i>M. ichthyoblabe</i>
Chapultepec, LL	Mayo 2015	10494_LMMx_0615	Sin asignación según el análisis de máxima verosimilitud.	Se esperaba encontrar: <i>M. aeruginosa</i> <i>M. ichthyoblabe</i> <i>M. protocystis</i> <i>M. panniformis</i>
Chapultepec, LL	Mayo 2015	10495_LMMx_0615	<i>M. ichthyoblabe</i>	<i>M. ichthyoblabe</i>
Valle de Bravo, S	Noviembre 2014	10497_VBMx_1114	Sin asignación	Se esperaba encontrar: <i>M. aeruginosa</i> <i>M. panniformis</i> <i>M. wesenbergii</i> <i>M. ichthyoblabe</i> <i>M. viridis</i>
Valle de Bravo, S	Noviembre 2014	10498_VBMx_1114		
Valle de Bravo, S	Noviembre 2014	10499_VBMx_1114		
Valle de Bravo, S	Noviembre 2014	10500_VBMx_1114		
Valle de Bravo, LL	Junio 2015	10502_VBMx_0615	<i>M. ichthyoblabe</i>	<i>M. ichthyoblabe</i> <i>M. viridis</i> <i>M. wesenbergii</i> <i>M. ichthyoblabe</i>
Chalco, S2	Noviembre 2015	10504_ChMx_1115	Ecotipo de las especies observadas al microscopio	<i>M. aeruginosa</i> <i>M. wesenbergii</i> <i>M. protocystis</i> <i>M. panniformis</i>

### Estructuras secundarias de la hélice D y caja B de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis*

Se identificaron ocho topologías diferentes de la hélice D, con variaciones en el tamaño de los *loops* y *stems* 2, 3 y 4 (cuadro 17). En la mayoría de las estructuras el tamaño del *loop* 1, *loop* 4 y *stem* 1 se conservó, a diferencia de los *loops* 2 y 3 y *stems* 2, 3 y 4. En el caso de las hélices 1 a 5, se encontraron pocas diferencias en las bases de las posiciones 11, 16, 18 y 39. De acuerdo con el tipo de hélice, cada una de estas posiciones correspondió con un *loop* o un *stem*. Las secuencias de DNA de los lagos mexicanos presentaron las topologías 1, 2, 4 y 5. Específicamente, las secuencias de DNA correspondientes a la temporada seca de 2015 en el clado I presentaron la topología 1 mientras que las secuencias del complejo Valle de Bravo y la secuencia 10493\_LMMx\_1013 de Chapultepec mostraron la topología 5. Nuestro cultivo de *M. ichthyoblabe* mostró la topología 2. En el cuadro 17 se muestra la información sobre las ocho hélices distintas y la secuencias a las que pertenecen.

Se encontraron cinco topologías diferentes de la caja B, con variaciones en el tamaño del *loop* 3 y la longitud del *stem* 3 (cuadro 18). Las secuencias de DNA de *Microcystis* de los lagos mexicanos presentaron las topologías 1, 2, 3 y 4. La topología 2 fue única y perteneció a la secuencia 10493\_LMMx\_1013 proveniente de Chapultepec de la temporada de lluvia de 2013. Las cajas B de las secuencias 10494\_LMMx\_0615 de Chapultepec y 10504\_ChMx\_0615 de Chalco no mostraron una topología confiable y no fueron analizadas.

Como análisis alternativos a los análisis filogenéticos de las secuencias de DNA de *Microcystis*, se incorporó al árbol de máxima verosimilitud por un lado las topologías de la hélice D y caja B (Fig. 14), y por otro, información latitudinal y de temperatura de las regiones geográficas de donde provinieron todas las secuencias (Fig. 15).

En el primer análisis alternativo las secuencias de DNA de *Microcystis* de los lagos mexicanos presentaron distintas topologías para los dos sectores y con cierta correspondencia respecto a la temporada de muestreo. Para la hélice D, las topologías 1 y 5 fueron específicas por clado y temporada de muestreo en dos casos: en el clado I, las secuencias de DNA de *Microcystis* de Chapultepec y Chalco de la temporada seca de 2015 presentaron la topología 1; en el clado III, las secuencias del complejo Valle de Bravo de la temporada seca de 2014 presentaron la topología 5 junto con sus secuencias hermanas del subgrupo G.

Por otro lado, la secuencia 10502\_VBMx\_0615 de Valle de Bravo de la temporada seca de 2015 y la secuencia de nuestro cultivo de *M. ichthyoblabe* 10491\_Mich\_LMMX presentaron las topologías 4 y 2 de la hélice D, respectivamente y las compartieron con sus secuencias de DNA de *Microcystis* más cercanas (clados I y III, respectivamente). Para la caja B, dos secuencias de DNA de *Microcystis* de Valle de Bravo y de Chapultepec de la temporada seca de 2015 (clado I) compartieron una misma topología, así como las cuatro secuencias de Valle de Bravo de la temporada de lluvia de 2014, que compartieron la topología 3 entre ellas y no con sus secuencias más cercanas (a diferencia de lo observado con la hélice D). Como sucedió con la hélice D, la secuencia de nuestro cultivo de *M. ichthyoblabe* compartió la topología 1 con sus secuencias más cercanas (clado III).

Para el segundo análisis alternativo se realizó una búsqueda de la temperatura de la región de procedencia de cada secuencia, basada en el artículo de su publicación (cuadro 11) y complementada con información sobre el clima de cada país y regiones geográficas. La Figura 15 mostró los países y las latitudes tropical (recuadros rojos), subtropical (recuadros verdes) y templada (recuadros azules). Se observó que la secuencia de DNA del cultivo de *M. ichthyoblabe* de Chapultepec se relacionó más cercanamente con secuencias de regiones de latitud tropical como Vietnam y Tailandia (subgrupo E, clado III). Las secuencias de Chapultepec, Chalco y Valle de Bravo del clado I se relacionaron más cercanamente con *M. ichthyoblabe* de Japón, considerado un país subtropical. Las secuencias de Chapultepec de la temporada de lluvia de 2013 (subgrupo D, clado III) y las cuatro secuencias de Valle de Bravo de la temporada de lluvia de 2014, se relacionaron cercanamente con secuencias de especies tropicales y subtropicales (subgrupo G, clado III).

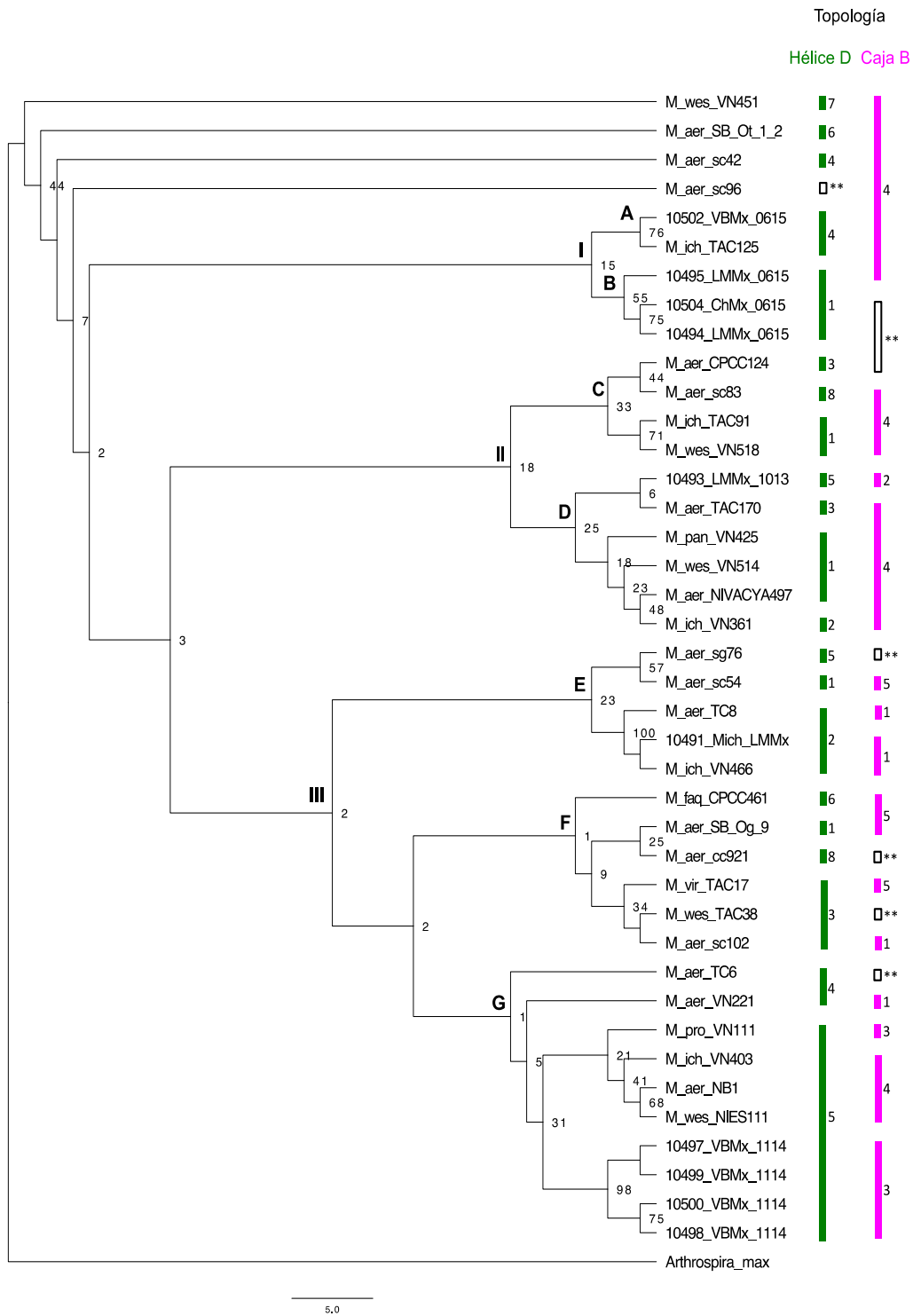
a)

<i>M. aeruginosa</i> NIES44	GACCTAATTGGGTATAAGACGAAAAATA-GTAGTC-GAAACCAAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. aeruginosa</i> TC6	GACCTAATTGGGTAGGAGACGAAAAATA-GTAGTC-GTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. aeruginosa</i> VN224	GACCTAATTGAGGTAGGAGACGAAAAATA-GTAGTC-GTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. aeruginosa</i> cc28	GACCTAATTGAGGTATAAGACGAAAAATA-GTAGTC-CCTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. pseudofilamentosa</i> VN511	GACCTAATTGGGTATAAGACGAAAAATA-GTAGTC-CCTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. ramosa</i> VN493	GACCTAATTGAGGTAGGAGACGAAAAATA-GTAGTC-CCTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. protocystis</i> VN111	GACCTAATTGGGTAGGAGACGAAAAATA-GTAGTC-GAAACCAAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. flos-aquae</i> CPCC 461	GACCTAATTGAGGTATGGGACGAAAAATA-GTAGTC-CCTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. aeruginosa</i> CPCC 124	GACCTAATTGGGTATGGGACGAAAAATA-GTAGTC-GTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. aeruginosa</i> NV211	GACCTAATTGAGGTATGGGACGAAAAATA-GTAGTC-GTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. aeruginosa</i> NIVACYA 431	GACCTAATTGCGGTAGGAGACGAAAAATA-GTAGTC-GTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. aeruginosa</i> NIVACYA 475	GACCTAATTGCGGTAGGAGACGAAAAATA-GTAGTC-CCTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. aeruginosa</i> NIVACYA 476	GACCTAATTGAGGTAGGAGACGAAAAATA-GTAGTC-CCTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. aeruginosa</i> AB2002 21	GACCTAATTGCGGTATGAGATGAAAAATA-GTAGTC-CCTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
<i>M. panniformis</i> VN355	GACCTAATTGAGGTAGGAGACGAAAAATA-GTAGTC-CCTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
10491_Mich_LMMx_1013	GACCTAATTCAGGTA TGGGATGAAAAATA-GTAGTC-CCAACCAAGAAATCAATCCCAAAGGTC
10492_Mich_LMMx_1013	GACCTAATTCAGGTA TGGGATGAAAAATA-GTAGTC-CCAACCAAGAAATCAATCCCAAAGGTC
10493_LMMx_1013	GACCTAATTCAGGTA TAAAGACGAAAAATA-GTAGTC-GAAACCAAGAAATCAATCCCAAAGGTC
10494_LMMx_0615	GACCTAATTCAGGTA TGGGATGAAAAATA-GTAGTC-CCTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
10495_LMMx_0615	GACCTAATTCAGGTA TGGGATGAAAAATA-GTAGTC-CCAACCAAGAAATCAATCCCAAAGGTC
10497_VBMx_1114	GACCTAATTCAGGTA TAAAGACGAAAAATA-GTAGTC-GAAACCAAGAAATCAATCCCAAAGGTC
10498_VBMx_1114	GACCTAATTCAGGTA TAAAGACGAAAAATA-GTAGTC-GAAACCAAGAAATCAATCCCAAAGGTC
10499_VBMx_1114	GACCTAATTCAGGTA TAAAGACGAAAAATA-GTAGTC-GAAACCAAGAAATCAATCCCAAAGGTC
10500_VBMx_1114	GACCTAATTCAGGTA TAAAGACGAAAAATA-GTAGTC-GAAACCAAGAAATCAATCCCAAAGGTC
10502_VBMx_0615	GACCTAATTCAGGTA TGGGATGAAAAATA-GTAGTC-GTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC
10504_ChMx_0615	GACCTAATTCAGGTA TGGGATGAAAAATA-GTAGTC-CCTACCAGAAATCAATCCCAAAGGTC

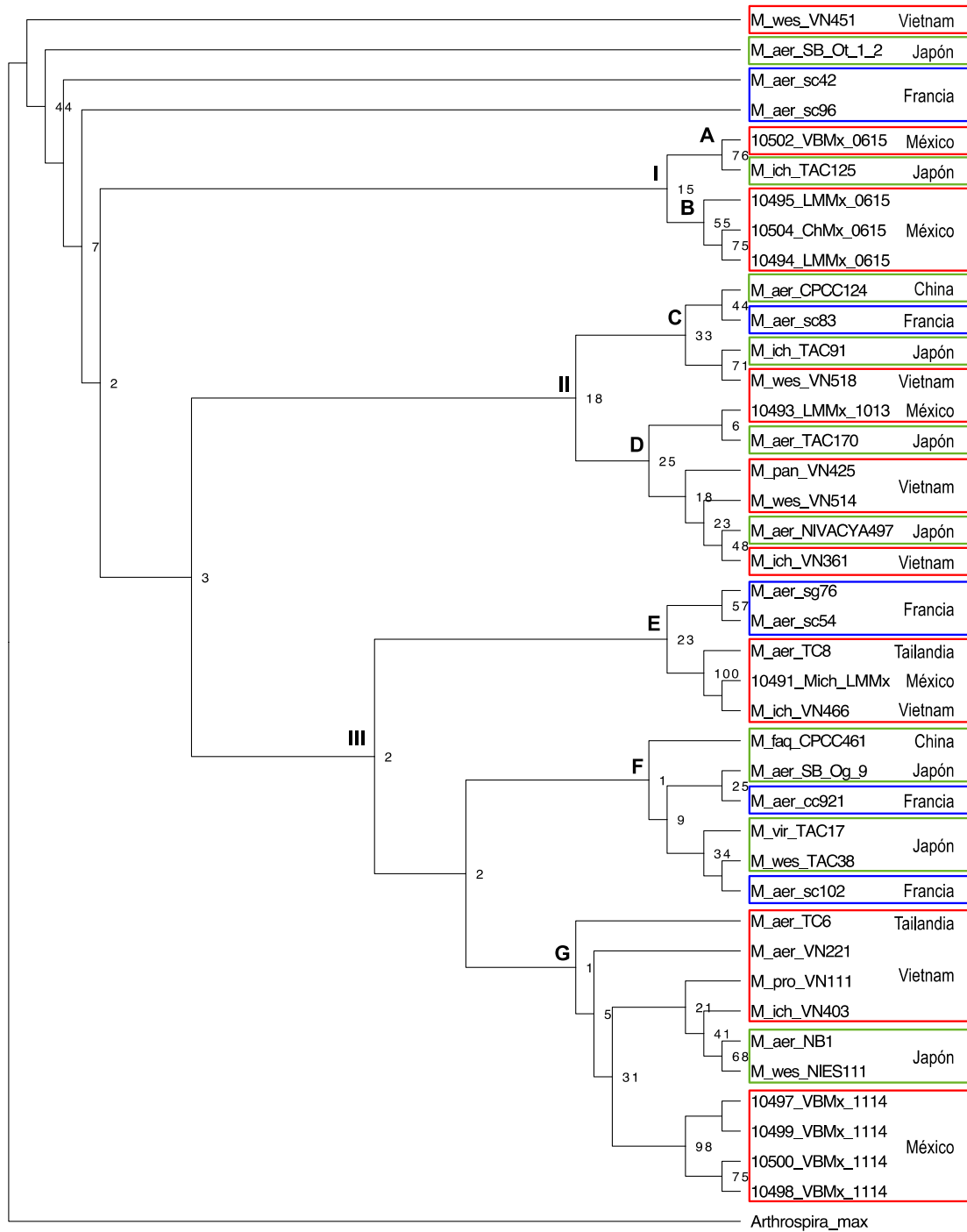
b)

<i>M. aeruginosa</i> NES44	AGCACCTTATCTTACT--TATAT-AGTAAGAGAGAA TGCT
<i>M. wesenbergii</i> NES44	AGCACCTTATCTTACT--TACAT-AGTAAGAGAGAA TGCT
<i>M. wesenbergii</i> VN11	AGCACCTTATCTTAT--TTATATT-GTAAGAGAGAA TGCT
<i>M. wesenbergii</i> VN43	AGCACCTTATCTTAT--TTATAT--GTAAGAGAGAA TGCT
<i>M. aeruginosa</i> TC6	AGCACCTTATCTTATCTATATATAAGTAAGAGAGAA TGCT
<i>M. aeruginosa</i> VN224	AGCACCTTATCTTAT--TTAT---ATAAGAGAGAA TGCT
<i>M. aeruginosa</i> cc28	AGCACCTTATCTTATAT--ACATATATAAGAGAGAA TGCT
<i>M. novacekii</i> T20-3	AGCACCTTATCTTAC--TTATACA-GTAAGAGAGAA TGCT
<i>M. aeruginosa</i> TAC170	AGCACCTTATCTTAT--TTATATA-GTAAGAGAGAA TGCT
<i>M. ichthyoblabe</i> VN512	AGCACCTTATCTTAC--TCATATA-GTAAGAGAGAA TGCT
<i>M. ichthyoblabe</i> TAC136	AGCACCTTATCTTAC--TGACATA-GTAAGAGAGAA TGCT
<i>M. aeruginosa</i> VN611	AGCACCTTATCTTAC--TTACATA-GTAAGAGAGAA TGCT
<i>M. novacekii</i> BC18	AGCACCTTATCTTAC--CTACATA-GTAAGAGAGAA TGCT
<i>M. novacekii</i> TAC20	AGCACCTTATCTTAT--ATACATATAAGAGAGAA TGCT
10491_Mich_LMMx_1013	AGCACCTTATCCTAT--TTATAT--ATAGGAGAGAA TGCT
10492_Mich_LMMx_1013	AGCACCTTATCCTAT--TTATAT--ATAGGAGAGAA TGCT
10493_LMMx_1013	AGCACCTTATCTTAC--TTATATATAAGTAAGAGAGAA TGCT
10494_LMMx_0615*	AACACCTTATCTTAC--TCATATA-ATAAAAAAATGGT
10495_LMMx_0615	AGCACCTTATCTTAC--TCATATA-GTAAGAGAGAA TGCT
10497_VBMx_1114	AGCACCTTATCTTAT--CTATAG--ATAAGAGAGAA TGCT
10498_VBMx_1114	AGCACCTTATCTTAT--CTATAG--ATAAGAGAGAA TGCT
10499_VBMx_1114	AGCACCTTATCTTAT--CTATAG--ATAAGAGAGAA TGCT
10500_VBMx_1114	AGCACCTTATCTTAT--CTATAG--ATAAGAGAGAA TGCT
10502_VBMx_0615	AGCACCTTATCTTAC--TTATATA-GTAAGAGAGAA TGCT
10504_ChMx_0615*	CCCCCTTATCTTAC--TTATATA-TAAAAAAGAAAGGT

**Figura 13.** Secuencias que codifican para los sectores hélice D (a) y caja B (b) de la región ITS 16S-23S rDNA de algunas secuencias de *Microcystis* provenientes de bases de datos y de las secuencias obtenidas en el gel DGGE. En ambos sectores, el color verde representa las zonas conservadas, que corresponden a los *stems* en la estructura secundaria, y en azul se muestran las zonas variables, que corresponden con los *loops*. Dos de las secuencias obtenidas en este trabajo no presentaron estructuras secundarias confiables de la caja B (\*), por lo que no se reportaron ni compararon con las estructuras de otras secuencias.



**Figura 14.** Árbol de máxima verosimilitud complementado con las topologías correspondientes de la hélice D (en verde) y caja B (en rosa) de cada secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis*. Las estructuras secundarias de la caja B de algunas secuencias (\*\*) presentaron inconsistencias por lo que no se consideraron confiables.



**Figura 15.** Árbol de máxima verosimilitud complementado con la temperatura ambiental de la región y país de origen de cada secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis*. Los recuadros rojos indican una temperatura aproximada de 20° C y corresponden con países de latitud tropical; los recuadros verdes indican una temperatura aproximada de 17° C y corresponden con países de latitud subtropical; los recuadros azules indican una temperatura menor a 17° C y corresponden con latitudes templadas.

### Determinación de las condiciones ambientales de los tres sitios estudiados

Las variables fisicoquímicas se registraron solamente para las recolecciones realizadas en la temporada seca de 2015. Los tres sitios presentaron valores muy similares de temperatura y pH alcalino. De acuerdo con los registros, el Lago Mayor presentó los valores más altos de conductividad y nutrientes (cuadro 14). No es posible conocer si esta diferencia es significativa ya que nuestro número de datos es limitado e impide aplicar una prueba estadística.

Los diagramas de Maucha permitieron visualizar de manera rápida cuál o cuáles elementos hidroquímicos marcaron diferencias entre los sitios. Los iones más importantes para cada sitio fueron, en Chapultepec:  $\text{Na}^+ > \text{CO}_3 > \text{Cl}^-$ ; en Chalco:  $\text{Na}^+ > \text{CO}_3 > \text{SO}_4$ ; en Valle de Bravo:  $\text{CO}_3 > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$ .

Respecto a las proporciones iónicas mostradas en los diagramas de Maucha, Chapultepec y Chalco tuvieron perfiles similares y a su vez diferentes del embalse Valle de Bravo. No obstante, respecto a las concentraciones de los iones, Chalco presentó valores elevados, seguido por Chapultepec y Valle de Bravo. Específicamente, Chalco superó por 60 y 32 veces los valores de sulfato y sodio de Chapultepec. Por otro lado, en Chalco la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  superó a la de  $\text{Ca}^{2+}$ , contrario a lo determinado en Chapultepec y Valle de Bravo. Considerando tanto la proporción de iones como la concentración de los mismos, podemos decir que los tres lagos presentaron un perfil hidroquímico distinto.

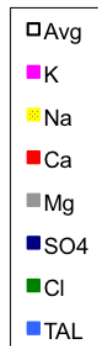
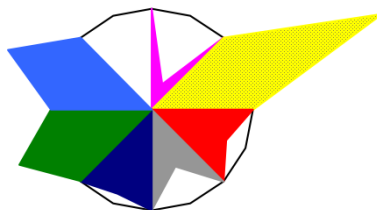
De acuerdo con el perfil hidroquímico expresado en  $\text{meq L}^{-1}$  y la clasificación de Shchoukarev (Fagundo & González, 2005), empleando como criterio los aniones que se encuentran en un porcentaje superior al 25% del total de miliequivalentes de aniones o de cationes, el agua del Lago de Chapultepec se clasificó como clorurada sódica, el agua de Valle de Bravo como carbonatada cálcica y el agua del lago de Chalco como sulfatada sódica. Los diagramas de Piper mostraron la misma clasificación antes mencionada para los tres sitios (Fig. 21, apéndice 6). La caracterización hidroquímica indicó que los tres sitios tienen agua tratada, y a pesar de sus diferencias, en los tres se desarrollaron poblaciones abundantes de *Microcystis*.



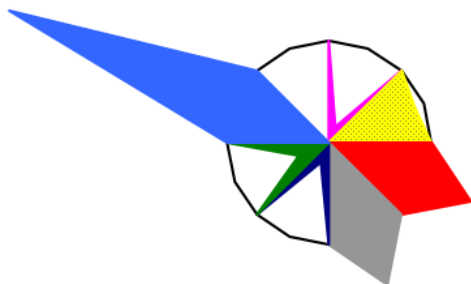
**Cuadro 14.** Datos de factores fisicoquímicos y concentración de iones de los tres sitios estudiados. En el apartado de la concentración los iones, se añaden dos columnas de cálculos empleados para realizar los diagramas de representación del perfil iónico de cada localidad. <sup>a</sup>La expresión de la alcalinidad total en las unidades meq L<sup>-1</sup> y % meq L<sup>-1</sup> se obtuvo a partir de la suma de las lecturas en mg L<sup>-1</sup> del bicarbonato y carbonato. <sup>b</sup>El nivel de salinidad se obtuvo a partir de las concentraciones (g L<sup>-1</sup>) de los iones y la clasificación del nivel de salinidad se basó en Hammer (1998).

	Chapultepec Mayo 2015			Valle de Bravo Junio 2015			Chalco Mayo 2015		
Temperatura (° C) ( <i>in situ</i> )	19.1			20			19.8		
pH (laboratorio)	8.9			8.62			9.35		
Conductividad (µS cm <sup>-1</sup> )	492.0			158.7			166.4		
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	20.16			1.4			2.1		
NO <sub>2</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	0.066			0.003			0.007		
NH <sub>4</sub> -N (mg L <sup>-1</sup> )	0.45			0.000			0.11		
Fósforo total (mg L <sup>-1</sup> )	1.32			0.08			0.59		
NID (mg L <sup>-1</sup> )	59.216			1.403			2.217		
N:P (NID:Ptot)	15.7			17.5			3.8		
<b>Concentraciones de aniones y cationes</b>									
	Lectura (mg L <sup>-1</sup> )	meq L <sup>-1</sup>	% meq L <sup>-1</sup>	Lectura (mg L <sup>-1</sup> )	meq L <sup>-1</sup>	% meq L <sup>-1</sup>	Lectura (mg L <sup>-1</sup> )	meq L <sup>-1</sup>	% meq L <sup>-1</sup>
<b>Aniones</b>									
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	56.73	0.92	22.01	21.26	0.82	46.57	244	3.99	19.47
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	23.43	0.78	18.48	50.07	0.70	40.21	147	4.89	25.15
Cl <sup>-</sup>	54.6	1.54	36.46	5.07	0.14	8.11	206	5.81	28.30
SO <sub>4</sub>	46.74	0.97	23.03	4.31	0.08	5.09	279.54	5.82	28.35
<b>Cationes</b>									
Na <sup>+</sup>	61.6	2.67	59.56	9.22	0.40	22.37	302	13.13	66.81
K <sup>+</sup>	11.45	0.29	6.50	2.78	0.07	3.96	36	0.92	4.68
Ca <sup>2+</sup>	17.4	0.86	19.30	13.23	0.66	36.83	33.88	1.69	8.59
Mg <sup>2+</sup>	8	0.65	14.63	8.02	0.65	36.81	47.55	3.91	19.89
<b>Alcalinidad total, balance y caracterización del tipo de agua</b>									
Alcalinidad total <sup>a</sup>	--	1.67	40.49	--	1.49	86	--	8.14	44.63
Nivel de salinidad (g L <sup>-1</sup> Cl <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	0.279 agua dulce			0.113 agua dulce			1.295 agua subsalina		
Balance de aniones/cationes	0.93			0.98			1.04		
Tipo de agua basada en el porcentaje de meq L <sup>-1</sup>	Agua clorurada sódica			Agua carbonatada cálcica			Agua sulfatada sódica		

a. Lago Mayor, Chapultepec



b. Valle de Bravo



c. Lago de Chalco

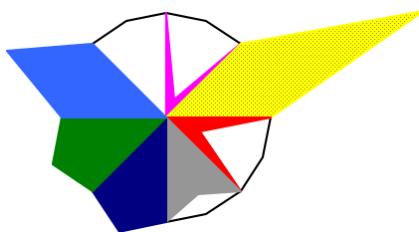


Figura 16. Diagramas de Maucha que muestran la proporción relativa de cada ión cuantificado en los tres sitios.

## Discusión

### Riqueza de especies de *Microcystis*, variantes morfológicas y su relación con el ambiente

Los tres lagos presentaron una riqueza alta y similar de entre cinco y siete especies (Figs. 5, 6 y 7), número que supera el determinado para otras poblaciones de *Microcystis* de México y el mundo, ya que el máximo ha sido de cuatro especies en un mismo sitio (por lo común son *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *M. viridis* y *M. ichthyoblabe*). De acuerdo con nuestro conocimiento, el trabajo presente tiene el primer registro de *M. viridis* para México, mientras que las demás especies han sido reportadas previamente en el centro y sureste de México, en lagos no salinos (Alcocer *et al.*, 1988; Komárek *et al.*, 1996; Oliva *et al.*, 2008; Vasconcelos *et al.*, 2010; Segura, 2012; Ortiz, 2013) subsalinos y salobres, con excepción de *M. ichthyoblabe* (Nava & Valadez, 2012).

*M. ichthyoblabe* presentó una diversidad fenotípica que en general cumple con las características del tipo, como el diámetro celular y el aspecto pulverulento de las colonias, mientras que la disposición de las células en forma de subcolonias definidas y los parches de células en el interior de las colonias observados en nuestras muestras no han sido descritos en la literatura (Ngüyen *et al.*, 2012; Sanchis *et al.*, 2014). Por otro lado, la presencia de esta especie en los lagos mexicanos de latitud tropical difiere con la zona de distribución sugerida por Komárek *et al.* (2002) en la descripción de la especie, pues indicaron que se asocia con cuerpos de agua de latitud templada y de condición oligotrófica, ya que no han comprobado su presencia en países de latitud tropical. La presencia de *M. ichthyoblabe* en sitios de latitud tropical, eutróficos e hipereutróficos con niveles de salinidad bajos y altas concentraciones iónicas (Chalco), es indicio de que podría tratarse de una entidad distinta.

*M. aeruginosa* es la especie más estudiada y al mismo tiempo controvertida en la literatura, debido en parte a la variabilidad de sus características morfológicas. En el trabajo presente, la circunscripción de *M. aeruginosa* se fundamenta en Komárek & Anagnostidis (1999), dando mayor importancia a caracteres como la forma de la colonia (principalmente irregular y alargada), la presencia constante de clatrado (desde breve hasta amplio), el diámetro celular y la distribución homogénea de las células en la colonia. Las variaciones de la forma de la colonia y la presencia de clatrado fueron dos de los caracteres más importantes que nos permitieron reconocer seis morfotipos de *M. aeruginosa* y a la vez descartar que se tratase de otra especie en el aspecto ambiental, esta especie es común en sitios de todos los niveles tróficos, sean de agua hiposalina o salina, de latitud templada o tropical (Nava & Valadez, 2012), por lo que nuestras observaciones son consistentes con la literatura.

Al igual que *M. aeruginosa*, *M. flos-aquae* es consistente en el aspecto morfológico y también en el latitudinal, ya que su presencia en latitudes tropicales (Oliva *et al.*, 2008; Segura, 2012; Guiry & Guiry, 2017) además de las templadas donde fue descrita, ha llevado recientemente a su propuesta como especie cosmopolita (McGregor *et al.*, 2007). *M. panniformis* también es consistente en los aspectos morfológico y latitudinal. Originalmente fue descrita en sitios no salinos, de latitud tropical y eutróficos

(Komárek *et al.*, 2002), sin embargo, Nava & Valadez (2012) la observaron en una laguna oligohalina poco profunda del estado de Quintana Roo.

El trabajo presente es, a nuestro conocimiento, el primer registro de *M. viridis* para México. En el aspecto morfológico, la población de Valle de Bravo difiere de las europeas en la forma cúbica de las colonias del embalse a diferencia de la forma alargada de las poblaciones de Europa donde fue descrita (Komárek & Anagnostidis, 1999). La presencia de esta especie en Valle de Bravo es consistente con su distribución cosmopolita (Komárek & Anagnostidis, 1999; Jiang *et al.*, 2014), sin embargo, la presencia de *M. viridis* en latitudes tropicales han llevado a Komárek & Anagnostidis (1999) a sugerir estudios genéticos para distinguir poblaciones tropicales de las templadas.

En los tres lagos, la riqueza de especies y morfotipos presentó cambios relacionados con cada lago y con la temporada de muestreo de acuerdo con la prueba Chi cuadrada (cuadro 6); en Valle de Bravo y Chapultepec el número de especies y morfotipos disminuyó entre la temporada de lluvia y seca, condición que es aparentemente frecuente en el embalse de acuerdo con estudios previos (Valeriano-Riveros *et al.*, 2014; Alillo, 2014) pero para Chapultepec no existen registros previos con qué compararlo.

Las condiciones ambientales han mostrado tener influencia en la presencia, dominancia y morfología de las especies de *Microcystis*. La temperatura y la concentración de nitrato se han relacionado con cambios en la riqueza de las especies del fitoplancton y *Microcystis* en lagos alrededor del mundo (Park *et al.*, 1998; Takamura & Watanabe, 1987; Watanabe *et al.*, 1986; Kasperoviciene *et al.*, 2005) y en lagos eutróficos del centro de México, incluido Valle de Bravo (Valeriano-Riveros *et al.*, 2014; Alillo, 2014; Tavera & Díez, 2009; Olivera *et al.*, 2008). En el embalse, Valeriano-Riveros (2014) y Alillo (2014) registraron la dominancia de *M. wesenbergii* respecto a *M. aeruginosa* en los meses con las temperaturas más cálidas y cercanas a 24° C. De acuerdo con estos autores, los cambios se debieron a que la temperatura para el crecimiento óptimo de algunas especies de *Microcystis* es particular (Alillo, 2014; Imai *et al.*, 2008; Watanabe & Oishi, 1985). En el lago Tezozómoc, un lago somero y eutrófico de la Ciudad de México, Oliva *et al.* (2008) determinaron altas densidades de *M. cf. botrys* y *M. flos-aquae* en los meses de septiembre a diciembre, correspondientes a la temporada fría y seca, que desaparecieron en febrero del siguiente año. Por su parte, Park *et al.* (1998) detectaron variaciones en la presencia y dominancia de *M. aeruginosa*, *M. viridis*, *M. ichthyoblabe* y *M. wesenbergii* en temporadas en las que la temperatura del agua varió en un lago hipertrófico de Japón.

Respecto a las concentraciones iónicas, Li *et al.* (2013) reportaron que la concentración de calcio y una alta temperatura causan la solubilización del mucílago y con ello el cambio en la morfología de las colonias, con transiciones que remiten a los fenotipos de *M. ichthyoblabe*, *M. wesenbergii* y *M. aeruginosa*. Esta sería una causa que dirige los cambios morfológicos en el ciclo de vida, como en el caso de la confusión para la identificación de *M. panniformis*, mencionada en la introducción (Komárek *et al.*, 2012).

En nuestro estudio, Chapultepec presentó los valores más altos de conductividad y concentraciones de fósforo, nitrógeno inorgánico disuelto, de los cuales destacó el nitrato que superó 15 y 10 veces los valores de Valle de Bravo y Chalco, respectivamente. Respecto a las concentraciones iónicas, los tres sitios presentaron un perfil iónico diferente, de los cuales destacó Chalco por los altos valores de sodio, sulfato y cloruro mayores a  $200 \text{ mg L}^{-1}$ , así como por la dominancia de la concentración de magnesio sobre la de calcio, que lo clasifica como un lago subsalino ( $<2.0 \text{ g L}^{-1} \text{ Cl}^{-1}$ ), lo que es consistente con estudios previos (Caballero & Ortega, 1998). La condición iónica de Chalco es un ambiente donde *M. ichthyoblabe* no ha sido registrada y desafortunadamente los trabajos que abordan poblaciones de *Microcystis* en sitios con características salinas (p. ej. Nava & Valadez, 2008), no proporcionan detalles sobre las variantes morfológicas particulares, con las que podamos comparar las poblaciones detectadas en los tres lagos estudiados.

De acuerdo con los párrafos anteriores, es posible que Chapultepec, Chalco y Valle de Bravo estén sujetos a condiciones climáticas semejantes al lago Tezozómoc y los canales de Xochimilco por estar dentro de una misma región geográfica y las poblaciones de *Microcystis* estén influenciadas por los factores fisicoquímicos en los cambios de riqueza de especies (por ejemplo la presencia de *M. viridis* en Valle de Bravo únicamente) y las concentraciones iónicas en la diversidad fenotípica de *M. ichthyoblabe* y *M. aeruginosa*. Dado que los datos fisicoquímicos e iónicos determinados en este estudio corresponden a una sola temporada de muestreo sería necesario obtener más datos para confirmar si las relaciones sugeridas realmente existen a nivel de especies y morfotipos y en qué grado. Adicionalmente, en este estudio mostramos la importancia de vincular el reconocimiento de las especies con los aspectos ambientales y con una caracterización genética para lograr un acercamiento polifacético.

### **Diversidad genética y análisis de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis***

La utilización de la técnica PCR-DGGE ha sido aplicada exitosamente en el análisis de comunidades del fitoplancton en cuerpos de agua de México (Tavera & Díez, 2009), donde la diversidad observada al microscopio corresponde con la genética. En nuestro caso, la aplicación de la técnica al estudio de la diversidad de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis* se basó en estudios previos por ejemplo Janse *et al.* (2003), quienes mostraron que poblaciones de *M. aeruginosa* de latitud templada tuvieron bandas con la misma posición y con posiciones distintas, es decir, que una misma especie presenta distintas secuencias para ese marcador.

La riqueza de especies de *Microcystis* en los tres lagos fue mayor que la diversidad genética determinada, ya que se encontraron seis especies en Chapultepec, cinco en Valle de Bravo y cinco en Chalco, en contraste con el número de secuencias de DNA: dos en Chapultepec, cinco en Valle de Bravo y una en Chalco (cuadro 9). Las bandas recortadas tienen posiciones diferentes en el perfil de DGGE en las dos temporadas de muestreo, que representan poblaciones genéticamente distintas a nivel de cada localidad y temporada, tal como se corroboró con las especies de *Microcystis* en la prueba de Chi cuadrada. Sin embargo, considerando que recuperamos las secuencias de DNA más abundantes o mejor representadas, no podemos descartar la posibilidad de que todas ellas (a excepción del cultivo de *M. ichthyoblabe*) hayan

estado presentes durante las dos temporadas de muestreo, pero en distintas abundancias, de manera que las secuencias de DNA más abundantes fueron detectadas en las bandas y las menos abundantes no. La literatura muestra que, independientemente del método molecular aplicado (en nuestro caso geles DGGE), las poblaciones genéticamente diversas de *Microcystis* presentan cambios temporales y espaciales que ocurren a gran velocidad en lagos templados, incluso en cuestión de semanas (Sabart *et al.*, 2009; Briand *et al.*, 2009; Pobel *et al.*, 2012).

Nosotros determinamos que las cinco a siete especies de *Microcystis* fueron representadas por una a cuatro secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA, a diferencia de los trabajos de Janse *et al.*, (2003) y Haande *et al.* (2007) quienes reportaron que la sola especie *M. aeruginosa* proveniente de latitudes templada y tropical puede tener un número alto de secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA.

La búsqueda de nuestras secuencias en BLAST (GenBank, NCBI) arrojó que por un alto grado de similitud corresponden con varias especies de *Microcystis* (*M. aeruginosa*, *M. botrys*, *M. flos.aquae* y *M. panniformis*; cuadro 10, columna 5) las cuales no representan el total de especies que determinamos en las localidades; lo anterior quiere decir que no existe una correspondencia única entre el número de secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA y las especies de *Microcystis*, lo cual fundamentó los objetivos de este trabajo y coincide con la literatura en que las especies de *Microcystis* que están basadas en una distinción morfológica no necesariamente tienen un respaldo genético (Otsuka *et al.*, 2000). Por esta razón, la confrontación representó únicamente la confirmación de que nuestras secuencias son de *Microcystis*, mientras que una asignación potencial de nombres de especies a nuestras secuencias de DNA, se realizó mediante el análisis de máxima verosimilitud.

En el árbol de máxima verosimilitud los valores de bootstrap dan soporte a los nodos terminales, con los que se podría confirmar las relaciones y asignación de nuestras poblaciones con especies de *Microcystis* particulares. La agrupación de las secuencias en los clados no sigue un fundamento tipológico o morfológico de acuerdo con el nombre de las especies de *Microcystis*, aunque destaca que la identidad de todas ellas se relaciona principalmente con tres especies (*M. ichthyoblabe*, *M. aeruginosa* y *M. wesenbergii*). La falta de correspondencia entre la diversidad morfológica y la genética podría ser explicada en términos de la plasticidad morfológica de *Microcystis* dada por las condiciones ambientales (Li *et al.*, 2013), como se discutió en la sección anterior.

Las secuencias de DNA de las poblaciones correspondientes a la temporada seca (S) de las tres localidades (10495 y 10494 de Chapultepec, 10502 de Valle de Bravo y 10504 de Chalco) se agruparon en un mismo clado, separado a su vez del subgrupo Valle de Bravo correspondiente a la temporada de lluvia (LL). Nuestro cultivo de *M. ichthyoblabe* y la secuencia 10493\_LMMx\_1013, ambos provenientes de Chapultepec en la temporada de lluvia (LL), no mostraron una tendencia de agrupación por temporada ya que se encontraron en clados diferentes. Independientemente de que la asignación de las secuencias a una entidad única no sea posible, la separación de unidades genéticas relacionada con la época climática

indica que existen cambios poblacionales asociados con las condiciones fisicoquímicas de los sitios, lo que hace imprescindible el enfoque ambiental en el estudio de especies de *Microcystis*.

### Importancia de la estructura secundaria de los sectores hélice D, caja B y temperatura

El uso de la estructura secundaria de los sectores hélice D y la caja B está reportado como carácter de tipo autapomórfico para distinguir diferencias entre algunas especies de cianoprocariontes (Johansen *et al.*, 2011; Osorio-Santos *et al.*, 2014) pero no para *Microcystis*. En nuestro trabajo las topologías de la hélice D y la caja B no presentaron una combinación única por clado ni por especie de *Microcystis* por lo que no resolvieron la identidad de las secuencias de DNA de las poblaciones mexicanas, bajo el criterio de que las estructuras secundarias son específicas para cada clado o especie. La incorporación de ambos sectores al árbol de máxima verosimilitud revela que la agrupación de las secuencias de DNA no sólo está relacionada con la temporada de muestreo (de lluvia o seca) sino también con la estructura secundaria de los dos sectores. Por esta razón, interpretamos nuestros resultados como que la situación ambiental y climática influyen en la diversidad genética de las poblaciones de *Microcystis*, como se discute a continuación.

En tres casos observamos que las topologías de la hélice D y la caja B agrupan o separan a las secuencias mexicanas de otras en el árbol de máxima verosimilitud. En el clado II, la secuencia de DNA 10491 de nuestro cultivo compartió las estructuras secundarias de los dos sectores con las secuencias hermanas *M. aeruginosa* y *M. ichthyoblabe*. En el clado I, las secuencias de DNA del Lago Mayor y Chalco 10494, 10495 y 10504 de la temporada seca (S) de 2015 comparten la topología 1 de la hélice D que no comparten con la secuencia 10502 de Valle de Bravo, la cual a su vez se agrupa con *M. ichthyoblabe* con la que comparte ambas estructuras secundarias. En el clado III, las cuatro secuencias de DNA de Valle de Bravo de la temporada de lluvia (LL) de 2014 tienen en común el tipo 3 de caja B y el tipo 5 de hélice D con las otras secuencias de *M. wesenbergii*, *M. aeruginosa*, *M. ichthyoblabe* y *M. protocystis*, del subgrupo G, lo cual interpretamos como que el embalse alberga subpoblaciones particulares de las especies antes mencionadas, ya que también fueron observadas al microscopio. El caso contrario ocurre con la secuencia 10493 de Chapultepec de la temporada de lluvia (LL) de 2013 en el clado II, pues presentó una combinación de estructuras secundarias únicas para los dos sectores, mientras que la mayoría de las estructuras del mismo clado tuvieron la misma topología para ambos sectores.

Lo anterior sugiere la necesidad de análisis detallados entre todos los sectores que componen la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA, por ejemplo considerar el balance entre el sector hélice D, caja B, sumado a la caja A y los dominios D1-D5, mismos que mostraron variación en nuestras secuencias (Figs. 1 y 10), sin embargo, consideramos que con los datos que obtuvimos en este estudio, este análisis no sería posible de realizar sin un algoritmo específico.

Como complemento a nuestros análisis filogenéticos, los datos de temperatura incluidos en el árbol de máxima verosimilitud dan indicios de que este factor explica parte de la agrupación de las secuencias (Fig. 15). Notamos un patrón de cercanía entre las secuencias de los lagos mexicanos y las secuencias tropicales vietnamitas, con temperatura aproximada de 20° C idéntica a los lagos mexicanos, y mayor distancia respecto a las secuencias subtropicales y templadas japonesas y francesas, con temperatura

aproximada de 17 y 15° C, respectivamente. Lo anterior es consistente con los trabajos de Yoshida *et al.* (2008) y Tanabe & Watanabe (2011), quienes propusieron la existencia de poblaciones de *Microcystis* adaptadas a distintos nichos que incluyen temperatura, luz o nutrimentos con base en experimentos previos. No obstante, otros autores (p. ej. van Gremberghe *et al.* (2011) niegan tal diferenciación de poblaciones basándose en comparaciones generales de las condiciones climáticas y no de las condiciones ambientales del sitio estudiado.

Los valores de divergencia genética indicarían que dentro de todos los clados y subgrupos hay especies crípticas<sup>3</sup> de acuerdo con Erwin & Thacker (2008) y Pietrasiak *et al.* (2014) pero nuestros resultados muestran otra situación: pocas especies genéticamente reconocibles con una amplia diversidad fenotípica, aún considerando que recuperamos una parte de la diversidad genética en el gel DGGE. Lo anterior es evidente en la población de *Microcystis* en Valle de Bravo en la temporada seca (S) de 2015, donde se determinaron cuatro especies (bajo el concepto tipológico de especie) y una sola banda en el gel DGGE (Fig. 9, banda 9).

Los análisis complementarios de los sectores internos de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal y la temperatura de cada localidad muestran que es importante tomar en cuenta distintas fuentes de información para comenzar a comprender y fortalecer el trabajo polifacético para circunscribir especies problemáticas como *Microcystis*. Nuestro cultivo de *M. ichthyoblabe* mostró una situación peculiar a nivel morfológico, genético y ambiental. En primer lugar, una de las características morfológicas de este morfotipo 3 no se ha registrado antes. En segundo lugar, el Lago Mayor de Chapultepec es de latitud tropical, eutrófico y tiene un perfil hidroquímico distinto de Valle de Bravo y Chalco. La latitud difiere con la templada que propuso Komárek *et al.* (2002) para la distribución de la especie. En tercer lugar, el cultivo tiene una combinación única de las estructuras secundarias de la hélice D y la caja B de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal que es distinta de las poblaciones de *Microcystis* de Valle de Bravo y Chalco, donde también se identificó la presencia de *M. ichthyoblabe* a partir de muestras naturales.

Si tomamos los tres elementos anteriores como caracteres decisivos en la identificación de nuevas especies como lo resaltan Johansen & Casamatta (2005) en su revisión sobre la importancia de los acercamientos polifacéticos en los estudios taxonómicos de cianoprocariontes, podríamos considerar que nuestro cultivo es un indicio de la presencia de especies diferentes en las localidades mexicanas y vale la pena profundizar nuestro trabajo con fundamento polifacético realizando cambios a nivel metodológico.

---

<sup>3</sup> Una especie críptica es una especie que es reconocida bajo el concepto tipológico y presenta un conjunto de caracteres morfológicos que la determinan como una sola entidad, pero al integrar más información de valor taxonómico, por ejemplo caracteres genéticos, la entidad es claramente separable en especies diferentes. Existen trabajos sobre la presencia de especies crípticas y su reconocimiento en cianoprocariontes (p. ej. Osorio-Santos *et al.*, 2014) pero no en *Microcystis*.



### Perspectivas hacia la circunscripción de especies de *Microcystis*

Idealmente, nuestra forma de resolver el problema en *Microcystis* sería trabajar con cultivos de las especies y sus variantes morfológicas provenientes de muestras naturales para documentar la morfología y obtener la información molecular de organismos cuya identidad se haya determinado desde el inicio. El árbol de máxima verosimilitud mostró que *M. ichthyoblabe* pertenece a un subgrupo diferente de *M. ichthyoblabe* de otros trabajos y que esa diferencia está muy probablemente asociada con “variedades genéticas” que *M. ichthyoblabe* podría tener, por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el apoyo de estudios de *Microcystis* con cultivos es fundamental, al grado de hacerlos indispensables para una revisión taxonómica del género.

Respecto a los marcadores moleculares, si bien la utilización de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ha logrado distinguir especies presumiblemente crípticas de cianoprocariontes de los géneros *Symplocastrum* y *Oculatella* (Pietrasiak *et al.*, 2014; Osorio-Santos *et al.*, 2014, respectivamente), la falta de resolución en *Microcystis* se debe a varios factores. Uno de ellos es que las secuencias de DNA de *Microcystis* (98%) son altamente similares y en consecuencia insuficientes para distinguir diferencias entre especies. Respecto a las secuencias de DNA de *Symplocastrum* y *Oculatella*, estas son más largas que las de *Microcystis* y tienen un número de sectores internos (variables) que *Microcystis* no tiene (Osorio-Santos *et al.*, 2014; Pietrasiak *et al.*, 2014). Es decir, que el nivel de resolución que proporciona la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis* es insuficiente por la misma naturaleza de la secuencia. Como consecuencia de lo anterior, el nivel de politomía del análisis de máxima verosimilitud de nuestro trabajo es un reflejo de la necesidad de ampliar el acercamiento polifacético al incluir más marcadores de distintos *loci*. Por ejemplo, Mazard *et al.* (2012) utilizaron siete marcadores que distinguieron linajes diferentes a nivel ecológico y geográfico del género de *Synechococcus*, un cianoprocarionte marino que tiene pocas características fenotípicas diagnosticables que son similares entre sí. Adicionalmente, hay evidencia de genes que podrían estar relacionados con el ambiente, el cual puede cambiar rápidamente e implicar una repartición del nicho entre parientes cercanos (Dvořák *et al.*, 2015; Rodríguez-Valera *et al.*, 2009).

Respecto a la información ambiental, la determinación de los factores fisicoquímicos y concentración de iones se haría de la misma manera que en este estudio con la diferencia de aumentar el número de datos.

## Conclusiones

- Las poblaciones de *Microcystis* en el Lago Mayor de Chapultepec, Valle de Bravo y Chalco son similares entre sí y altamente diversas en el número de especies.
- En *Microcystis* la diversidad genética no muestra una correspondencia con el número de especies reconocidas a través de características morfológicas.
- Las características ambientales particulares de cada sitio y la temporada climática influyen en la presencia y ausencia de las especies y se relacionan con la diversidad genética de las poblaciones de *Microcystis*.
- La situación latitudinal no influye en la diversidad genética presentada por *Microcystis*.
- El uso de la técnica DGGE para conocer la composición genética para las poblaciones fue eficiente en el caso de este estudio y fue consistente con la diversidad genética de *Microcystis* observada.
- El empleo de la estructura secundaria fue importante para visualizar la diversidad genética de *Microcystis* y para definir la necesidad de emplear más marcadores genéticos.
- El estudio presente indica que el enfoque polifacético en el estudio de las especies de *Microcystis* se encuentra en proceso y es correcto siempre y cuando se tenga información morfológica y ambiental detalladas sobre las especies y se cuente con un mayor número de marcadores moleculares.

## Literatura citada

Aguirre R. 2011. Análisis espacio-temporal del Lago de Chalco utilizando imágenes satelitales. Instituto de Geografía, UNAM. Disponible en:

[http://www.agua.unam.mx/assets/pdfs/academicos/recursos\\_naturales/raulaguirre\\_ig.pdf](http://www.agua.unam.mx/assets/pdfs/academicos/recursos_naturales/raulaguirre_ig.pdf)

Alcocer J., Kato E., Robles E. y Vilaclara G. 1988. Estudio preliminar del efecto del dragado sobre el estado trófico del Lago Viejo de Chapultepec. *Contaminación Ambiental* 4: 43-56.

Alillo J. 2014. Relación de la concentración de Microcistina-LR con el biovolumen de cianobacterias potencialmente tóxicas en el embalse Valle de Bravo, Estado de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 58 pp.

Aragão-Tavares N., Moura A. and Bittencourt-Oliveira M. 2013. Planktonic Cyanobacteria forming blooms in reservoirs of northeastern Brazil. *Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 8 (4): 662-668.

Baum D. y Smith S. 2013. Tree Thinking. An introduction to Phylogenetic Biology. *Roberts and Company Publishers*. Greenwood Village, Colorado, EU. 476 pp.

Bittencourt-Oliveira M., Oliveira M. y Bolch C. 2001. Genetic variability of brazilian strains of the *Microcystis aeruginosa* complex (Cyanobacteria/Cyanophyceae) using the phycocyanin intergenic spacer and flanking regions (*cpcBA*). *Journal of Phycology* 37: 810-818.

Bolch C. , Blackburn S., Jones G., Orr P. y Grewe P. 1997. Plasmid content and distribution in Australian isolates of *Microcystis* Kützing ex Lemmermann (Cyanobacteria: Chroococcales) *Phycologia* 36: 6-11.

Bohunicka M., Johansen J. y Fuciková K. 2011. *Tapinothrix clintonii* sp. nov. (Pseudoanabaenaceae, Cyanobacteria), a new species at the nexus of five genera. *Fottea* 11(1): 127-140.

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

Bouvier C., Didon E., Niedzielski H., y Huizar R. 1993. Hidrología e Hidrogeología en la cuenca de Chalco. Descripción y perspectivas. *ContactoS* 10: 19-29.

Briand E., Escoffier N., Straub C., Sabart M., Quiblier C. y Humbert JF. 2009. Spatiotemporal changes in the genetic diversity of a Bloom-forming *Microcystis aeruginosa* (cyanobacteria) population. *The ISME Journal* (3): 419-429.

- Broch E. and Yake W. 1969. A modification of Maucha's iconic diagram to include ionic concentrations. *Limnology and Oceanography* 14: 933-935.
- Caballero M. y Ortega B. 1998. Lake levels since about 40,000 years ago at Lake Chalco, near Mexico City. *Quaternary Research* 50: 69-79.
- Casamayor E., Pedrós-Alió C., Muyzer G. y Amann R. 2002. Microheterogeneity in 16S ribosomal DNA-Defined bacterial populations from a stratified planktonic environment is related to temporal changes and to ecological adaptations. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4): 1706-1714.
- Clustal Omega. Servidor de alineamiento múltiple de secuencias en línea. Consultado en agosto 2016. Disponible en:  
<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>
- CNA, Comisión Nacional del Agua, tomado del Sistema Meteorológico Nacional, SMN. Clima de las localidades en los siguientes enlaces. Consultado en agosto 2016.  
Lomas de Chapultepec. Disponible en:  
<http://smn.cna.gob.mx/tools/RESOURCES/Normales5110/NORMAL09050.TXT>  
Tláhuac, 1981 - 2010. Disponible en:  
<http://smn.cna.gob.mx/tools/RESOURCES/Normales8110/NORMAL09051.TXT>  
Presa Valle de Bravo, 1981 - 2010. Disponible en:  
<http://smn.cna.gob.mx/tools/RESOURCES/Normales8110/NORMAL15130.TXT>
- Costa I., Azevedo S., Senna P., Bernardo R., Costa S., y Chellappa N. 2006. Occurrence of toxin-producing cyanobacteria blooms in a Brazilian semiarid reservoir. *Brazilian Journal of Biology* 66(1B): 211-219.
- da Silva E., da Silva C., da Silva C. y Lopes S. 2013. Ocorrência de Cianobactérias no Reservatório de Mundaú, no Estado de Pernambuco no Período de Janeiro de 2010 a Novembro de 2011. *Capa* 1(3): 35-42.
- Dvořák P., Poulíčková A., Hašler P., Belli M., Casamatta D. y Papini A. 2015. Species concepts and speciation factors in cyanobacteria, with connection to the problems of diversity and classification. *Biodiversity and Conservation* 24: 739-757.
- Eguiarte L., Souza V. Y Aguirre X. (comps.). 2007. Ecología molecular. *Instituto Nacional de Ecología, Semarnat; Conabio*. México. 573 pp.
- Erwin P. y Thacker R. 2008. Cryptic diversity of the symbiont cyanobacterium *Synechococcus sporangium* among sponge hosts. *Molecular Ecology* 17: 2937-2947.

- Fagundo J. y González P. 2005. Hidrogeoquímica. Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional (CENAMENT). Ministerio de Salud Pública. La Habana, Cuba. 314 pp.
- Fernández M. y LeBorgne S. 2014. DGGE: electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante. En: Cornejo A., Serrato A., Rendón B. y Rocha M. (comps.). Herramientas moleculares aplicada en Ecología: aspectos teóricos y prácticos. SEMARNAT, INECC. México. 274 pp.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Gaytan M., Martínez V., Oliva M. Duran A. y Ramírez P. 2011. Temporal variation of phytoplankton from the tropical reservoir Valle de Bravo, Mexico. *Journal of Environmental Biology* 32(1): 117-126.
- GDF, Gobierno del Distrito Federal, Secretaría de Medio Ambiente (2006). Disponible en: <http://www.sma.df.gob.mx/sma/index.php?opcion=26&id=368>
- Genuário D., Gomes M., Scotta G., Sant'Anna C. y Fiore M. 2015. *Halotia* gen. nov., a phylogenetically and physiologically coherent cyanobacterial genus isolated from marine coastal environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65: 663-675.
- Gillespie J. 2004. Characterizing regions of ambiguous alignment caused by the expansion and contraction of hairpin-stem loops in ribosomal RNA molecules. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33: 936-943.
- Guiry M. y Guiry G. 2017. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponible en: <http://www.algaebase.org>; consultado en agosto 2017.
- Haande S., Ballot A., Rohrlack T., Fastner J., Wiedner C., y Edvarsen B. 2007. Diversity of *Microcystis aeruginosa* isolates (Chroococcales, Cyanobacteria) from East-African water bodies. *Archives of Microbiology* 188: 15-25.
- Hammer U. 1987. Saline lake ecosystems of the world. *Springer Science & Business Media*. 616 pp.
- Hasegawa M., Kishino H., y Yano T. 1985. Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.
- Humbert J., Duris-Latour D., Le Berre B., Giraudet H. y Salençon M. 2005. Genetic diversity in *Microcystis* populations of a French storage reservoir assessed by sequencing of the 16S-12S rRNA Intergenic Spacer. *Microbial Ecology* 49: 308-314.

Iteman I., Rippka R., Tandeau de Marsac N. y Herdman M. 2000. Comparison of conserved structural and regulatory domains within divergent 16S rRNA-23S rRNA spacer sequences of cyanobacteria. *Microbiology* 146: 1275-1286.

Janse I., Meima M. Kardinaal W. y Zwart G. 2003. High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69(11): 6634-6643.

Janse I., Kardinaal W., Meima M., Fastner J. Visser P. y Zwart G. 2004. Toxic and non toxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 70(7): 3979-3987.

Jiang Y., He W., Liu W-X., Qin N., Ouyang H., Kong X-Z., Wang Q-M., He Q-S, Yang B. y Xu F-L. 2014. The seasonal and spatial variations of phytoplankton community and their correlation with environmental factors in a large eutrophic Chinese lake (Lake Chaohu). *Ecological Indicators* 40:58-67.

Johansen J. and Casamatta D. 2005. Recognizing cyanobacterial diversity through adoption of a new species paradigm. *Algological Studies* 117: 71-93.

Johansen J., Kovacic L., Casamatta D., Fucikova K. and Kastovsky J. 2011 Utility of 16S-23S sequence and secondary structure for recognition of intragenic and intergenic limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya corticola* sp. nov. (Pseudoanabaenaceae, Cyanobacteria). *Nova Hedwigia* 92 (3-4): 238-302.

Johansen J., Bohunická M., Lukesová A., Hrcková K., Vaccarino M. y Chesario M. 2014. Morphological and molecular characterization within 26 strains of the genus *Cylindrospermum* (Nostocaceae, Cyanobacteria), with descriptions of three new species. *Journal of Phycology* 50: 187-202.

Kardinaal W., Janse I., Kamst-van Agterveld M., Meima M., Snoek J., Mur L., Huisman J., Zwart G. And Visser P. 2007. *Microcystis* genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes. *Aquatic Microbial Ecology* 48: 1-12.

Kasperoviciene J., Koreiviene J. y Paskauskas R. 2005. Cyanoprokaryotes and microcystins dynamics in shallow hypertrophic lake (South-Eastern Lithuania). *Oceanographic and Hydrobiological Studies Vol. XXXIV, Supplement 3*: 93-104.

Kato T., Watanabe MF., Watanabe M. 1991. Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference. *Algological Studies* 64: 129-140.

Kim S-G., Rhee S-K., Ahn C-Y., Ko S-R. Choi G-G., Bae J-W., Park Y-H. y Oh H-M. 2006. Determination of cyanobacterial diversity during algal blooms in Daechung reservoir, Korea, on the basis of *cpcBA* Intergenic Spacer región analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 72(5): 3252-3258.

- Kje K. 1995. Use of rRNA secondary structure in phylogenetic studies to identify homologous positions: an example of alignment and data presentation from the frogs. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 4(3): 314-330.
- Komárek J. 1991. A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie* 64: 115-127.
- Komárek J., Montejano G., Gold-Morgan M. y Tavera R. 1996. Taxonomic identity and distribution of tropical cyanoprokaryotes (Cyanophyta, Cyanobacteria): An example from central Mexico. *Nova Hedwigia, Beiheft* 112: 49-54.
- Komárek J. y Anagnostidis K. 1999. Cyanoprokaryota, 1. Teil: chroococcales. *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, v. 19/1 (Ettl H., Gärtner G., Heying H. y Mollenhauer D. eds.) pp. 1-548. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Komárek J., Komárková J., Sant' Anna C., Azevedo MT. y Senna P. 2002. Two common *Microcystis* species (Chroococcales, Cyanobacteria) from tropical America, including *M. panniformis* sp. nov. *Cryptogamie, Algologie* 23(2): 159-177.
- Komárek J. y Komárková J. 2002. Review of the European *Microcystis* morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. *Czech Phycology, Olomouc* 2: 1-24.
- Komárek J., Kastovsky J., Mares J. y Johansen J. 2014. Taxonomic classifications of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* 86: 295-335.
- Krstic S. y Aleksovski B. 2016 Dominance of *Microcystis* spp. In Lake Djoran - a consequence of 30 years of accelerated eutrophication. *Sbotanica Serbica* 40(2): 119-128.
- Kumar S., Stecher G., y Tamura K. 2015. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Lampert W. y Sommer U. 2007. Limnoecology. Second Edition. *Oxford. University Press*. 313 pp.
- Li M., Zhu M. y Sun Q. 2013. Solubilization of mucilage induces changes in *Microcystis* colonial morphology. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 48(1): 38-47.
- Lyautey E., Lacoste B., Ten-Hage L., Rols J. y Garabetian F. 2005. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation. *Water Research* 39 (1-2): 380-388.

- Mazard S., Ostrowski M., Partensky F. y Scanlan DJ. 2012. Multi-locus sequence analysis, taxonomic resolution and biogeography of marine *Synechococcus*. *Environmental Microbiology* 14(2): 372-386.
- McGregor G.B., Fabbro L. D. y Lobegeiger J. S. 2007 Freshwater planktic Chroococcales (Cyanoprokaryota) from North-Eastern Australia: a morphological evaluation. *Nova Hedwigia* 84 (3-4): 299-331.
- McPherson M. y Møller S. 2006. PCR. Second Edition. Taylor & Francis, Cornwall, UK. 305 pp.
- Merino M., Monroy E., Vilaclara G., Castillo F., Gallegos M. y Ramírez J. 2008. Physical and chemical limnology of a wind-swept reservoir in the tropical highlands of Mexico. *Aquatic Ecology* 42: 335-345.
- Merino-Ibarra M., Monroy-Ríos E., Vilaclara G., Castillo F., Gallegos M. y Ramírez Z. 2008. Physical and chemical limnology of a wind-swept tropical highland reservoir. *Aquatic Ecology* 42: 335-345.
- Mfold. Servidor de plegamiento de estructuras secundarias a partir de secuencias de DNA o RNA. Consultado en mayo 2015 y octubre 2016. Disponible en:  
<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/rna-folding-form>
- Muyzer G., de Waal E., y Uitterlinden A. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology* 59: 695-700.
- Muyzer G. y Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Ant Van Leeuw* 73: 127-141.
- Nava V. y Valadez F. 2012. Flora planctónica de laguna Lagartos, Quintana Roo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 561-582.
- Neilan B., Jacobs D., Del Dot T., Blackall L., Hawkins P. Cox P. y Goodman E. 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47(3): 693-697.
- Ngüyen V., Tanabe Y., Matsuura H., Kaya K. y Watanabe M. 2012. Morphological, biochemical and phylogenetic assessments of wáter-bloom-forming tropical morphospecies of *Microcystis* (Chroococcales, Cyanobacteria). *Phycological Research* 60: 208-222.
- Nikanorov A. M. y Brazhnikova L. V. 2009. Water chemical composition of rivers, lakes and wetlands. En: Types and properties of water. Vol II.
- Nishizawa T., Nishizawa A., Asayama M., Harada K-I. y Shirai M. 2007. Diversity within the microcystin biosynthetic gene clusters among the genus *Microcystis*. *Microbes Environment* 22(4): 380-390.



Nübel U., Garcia-Pichel F. y Muyzer G. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8): 3327-3332.

Oliva M., Rodríguez A., Lugo A. y Sánchez M. 2008. Composición y dinámica del fitoplancton en un lago urbano hipertrófico. *Hidrobiológica* 18 (1): 1-113.

Oliver R. & Ganf G. 2002. Freshwater blooms. En: Whitton B. & Potts M. The ecology of Cyanobacteria Their diversity in time and space. Kluwer Academic Publishers, USA. 735 pp.

Olvera V. 1992. Estudio de la eutroficación de la presa Valle de Bravo, México. *Ingeniería Hidráulica en México*. 148-160.

Ongun S. & Celik K., 2014. The effects of certain physical and chemical variables on the succession of the phytoplankton in the shallow Cagis Pond (Balikesir, Turkey). *Ekoloji* 23(93): 27-35.

Ortega B., Lozano S., Caballero M. y Herrera D. 2015. Historia de la evolución deposicional del lago de Chalco, México, desde el MIS3. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 67(2): 185-201.

Ortiz D. y Ortega M. 2007. Origen y evolución de un nuevo lago en la planicie de Chalco: implicaciones de peligro por subsidencia e inundación de áreas urbanas en Valle de Chalco (Estado de México) y Tláhuac (Distrito Federal). *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM* 64: 26-42.

Ortiz F. 2013. Análisis estacional de la composición de cianoprocariontes en el lago de Zumpango y su relación con la presencia de microcistina LR. Tesis de Licenciatura. UNAM. 84 pp.

Otten T. y Paerl H. 2011. Phylogenetic inference of colony isolates comprising seasonal *Microcystis* blooms in Lake Taihu, China. *Microbial Ecology* 62: 907-918.

Otsuka S., Suda S., Li R., Watanabe M., Oyaizu H., Matsumoto S. y Watanabe M. 1998. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiology Letters* 164: 119-124.

Otsuka S., Suda S., Li R., Watanabe M., Oyaizu H., Matsumoto S. y Watanabe M. 1999. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiology Letters* 172(1): 15-21.

Otsuka S., Suda S., Li R., Matsumoto S. y Watanabe M. 2000. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *Journal of General and Applied Microbiology* 46: 39-50.

Otsuka S., Suda S., Shibata S., Oyaizu H., Matsumoto S. y Watanabe M. 2001. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907 under

the Rules of Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 873-879.

Palinska KA., Liesack W., Rhiel E. y Krumbein WE. 1996. Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on *Merismopedia*-like isolates. *Archives of Microbiology* 166: 224-233.

Park H-D., Iwami C., Watanabe M., Harada K-I., Okino T. y Hayashi H. 1998. Temporal variabilities of the concentrations of intra- and extracellular microcystin and toxic *Microcystis* species in a hypertrophic lake, Lake Suwa, Japan (1991-1994). *Environmental Toxicology and Water Quality* 13(1): 61-72.

Pietrasiak N., Mühlsteinová R., Siegesmund M. y Johansen J. 2014. Phylogenetic placement of *Symplocastrum* (Phormidiaceae, Cyanophyceae) with a new combination *S. californium* and two new species: *S. flechtnerae* and *S. torsivum*. *Phycologia* 53(6): 529-541.

Pineda R. 2009. Determinación de cianobacterias toxigénicas productoras de microcistinas por métodos moleculares y bioensayos. *Instituto Politécnico Nacional*. México 112 pp.

Pobel D., Godon J., Humbert J. y Robin J. 2012. High-frequency monitoring of the genetic diversity and the potential toxicity of a *Microcystis aeruginosa* Bloom in a French shallow lake. *FEMS Microbiology Ecology* 79(1): 132-141.

Ptácnik R., Andersen T., y Tamminen T. 2010. Performance of the Redfield Ratio and a family of nutrient limitation indicators as thresholds for phytoplankton N vs. P limitation. *Ecosystems* 13 (8): 1201-1214.

Ramírez J., Merino M., Monroy E., Olson M., Castillo F., Gallegos M. y Vilaclara G. 2010. Changing water, phosphorus and nitrogen budgets for Valle de Bravo reservoir, water supply for Mexico City Metropolitan Area. *Lake and Reservoir Management* 26(1).

Rodríguez-Valera F., Martín-Cuadrado AB., Rodríguez-Brito B., Thingstad TF., Rohwer F., y Mira A. 2009. Explaining microbial population genomics through phage predation. *Nature Reviews Microbiology* 7(1): 828-836.

Sabart M., Pobel D., Latour D., Robin J., Salençon MJ. y Humbert JF. 2009. Spatiotemporal changes in the genetic diversity in French bloom-forming populations of the toxic cyanobacterium, *Microcystis aeruginosa*. *Environmental Microbiology Reports* (2009) 1(4): 263-272.

Sabour B., Loudiki M., Oudra B., Vasconcelos V., Martins R., Oubraim S. y Fawsi B. 2002. Toxicology of a *Microcystis ichthyoblabe* waterbloom from Lake Oued Mellah (Morocco). *Environmental Toxicology* 17(1): 24-31.

- Saitou N. y Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sanchis D., Carrasco D. y Quesada A. 2004. The genus *Microcystis* (Microcystaceae/Cyanobacteria) from a Spanish reservoir: a contribution to the definition of morphological variations. *Nova Hedwigia* 79(3-4): 479-495.
- Sant'Anna C., Azevedo M., Senna P., Komárek J. y Komárková J. 2004. Planktic cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. *Revista Brasileira de Botânica* 27(2): 213-227.
- Schirrmeister B., Dalquen D., Anisimova M. y Bagheri H. 2012. Gene copy number variation and its significance in cyanobacterial phylogeny. *BMC Microbiology* 12: 177-191.
- Scott D.W. 2009. Sturges' rule. *WIREs Computational Statistics* 1(3): 303-306.
- Šejnohová L. & Maršálek B. 2012. *Microcystis*. En: Whitton B. Ecology of Cyanobacteria II. Their diversity in space and time. Springer. 759 pp.
- SEMARNAT - PAOT. 2009. Estudio para la elaboración de recomendaciones de política para mejorar la administración de la zona de los humedales de Tláhuac. Cuerpo académico consolidado "Desarrollo Integral y Planificación Territorial", Instituto de Investigaciones en Ingeniería, Facultad de Ingeniería "Arturo Navarro Siller", Universidad Autónoma de Tamaulipas. EOT-06-2009. 59 pp.
- Segura M. 2012. Construcción de un modelo matemático para la predicción de la Microcistina-LR intracelular a partir de la biomasa y la clorofila *a*. Tesis de Licenciatura, UNAM. 87 pp.
- Shabir D., Kuenen G. y Muyzer G. 2005. Nested PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 71(5): 2325-2330.
- Silberbauer M.J. y King J.M., 1991. Geographical trends in the water chemistry of wetlands in the southwestern Cape Province, South Africa. *South African Journal of Aquatic Sciences*. 17(1/2): 82-88.
- Takamura N. y Watanabe M. 1987. Seasonal changes in the biomass of four species of *Microcystis* in Lake Kasumiragua. *Japanese Journal of Limnology* 48: S139-S144.
- Tamura K. y Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512-526.
- Tan X., Kong F., Zeng Q., Cao H. Qian S. y Zhang M. 2009. Seasonal variation of *Microcystis* in Lake Taihu and its relationships with environmental factors. *Journal of Environmental Sciences* 21: 892-899.

- Tanabe Y. y Watanabe M. 2011. Local expansion of a panmictic lineage of water bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Plos One* 6 (2): 1-7.
- Tavera R. y Díez B. 2009. Multifaceted approach for the analysis of the phototrophic microbial community in a freshwater recreational area of Xochimilco, México. *Hydrobiology* 636: 353-368.
- Valeriano-Riveros M.E., Vilaclara G., Castillo-Sandoval F.S. y Merino-Ibarra M. 2014. Phytoplankton composition changes during water levels fluctuations in a high-altitude, tropical reservoir. *Inland Waters* (4): 337-348.
- van Gremberghe I., Van der Gucht K., Vanormelingen P., Asmelash T., Dejenie T., D'hondt S., Declerck S., De Meester L., y Vyerman W. 2011. Genetic diversity of *Microcystis* blooms (Cyanobacteria) in recently constructed reservoirs in Tigray (Northern Ethiopia) assessed by rDNA ITS. *Aquatic Ecology* 45: 289-306.
- Vasconcelos V., Martins A., Vale M., Antunes A., Azevedo J., Welker M., Lopez O. y Montejano G. 2010. First report on the occurrence of microcystins in planktonic cyanobacteria from Central Mexico. *Toxicon* 56(3): 1-7.
- Watanabe M. 1996. Isolation cultivation and classification of bloom-forming *Microcystis* in Japan. En: Watanabe M., Harada K-I., Carmichael W. y Fujiki H. Toxic *Microcystis*. CRC Press, Inc. 265 pp.
- Watanabe M. y Oishi S. 1985. Effects of environmental factor son toxicity of cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 49(5): 1342-1344.
- Watabane Y., Watanabe M. y Watanabe M. 1986. The distribution and relative abundance of bloom forming *Microcystis* species in several eutrophic waters. *Japanese Journal of Limnology* 47(1): 87-93.
- Wichels A., Humbert C., Elbrächter M., Luckas B., Schütt C. y Gerdt G. 2004. Bacterial diversity in toxic *Alexandrium tamarense* blooms off the Orkney Isles and the Fifth of Forth. *Helgoland Marine Research* 58: 93-103.
- Yoshida M., Yoshida T., Satomi M., Takashima Y. Hosoda N. e Hiroishi S. 2008. *Journal of Applied Microbiology* 105: 407-415.
- Zwart G., Agterveld M., Werff-Staverman I., Hagen F., Hoogveld H. y Gons H. 2005. Molecular characterization of cyanoabcterial diversity in a shallow eutrophic lake. *Environmental Microbiology* 7: 365-377.

## Apéndice 1. Factores ambientales importantes para el crecimiento de *Microcystis*.

El ciclo de vida anual de *Microcystis* ocurre en dos fases, una planctónica o activa que es cuando se inician y se establecen los florecimientos y otra bentónica que funge como inóculo para la primera. El crecimiento celular y la ocurrencia de florecimientos de *Microcystis* están influenciados por la interacción de factores ambientales físicos y químicos, fisiológicos y ecológicos, que a su vez repercuten en la fases planctónica y bentónica. En lagos templados, los florecimientos ocurren en verano a diferencia de sitios tropicales, donde estos pueden persistir todo el año (Oliver & Ganf, 2002). Los factores ambientales incluyen la atenuación de la luz, la estabilidad de la columna de agua, la temperatura, la concentración de nutrimentos, la concentración de oxígeno disuelto, la turbidez y la velocidad del viento. De estos, la luz es una función de la profundidad, los compuestos disueltos, partículas y también en parte creado por los organismos fotosintéticos (Šejnohová & Maršálek, 2012).

En los florecimientos de *Microcystis* la disponibilidad de luz y su contraparte, la turbidez, tienen un papel esencial en la regulación de la flotabilidad de las colonias y en los ciclos diarios y anuales (Šejnohová & Maršálek, 2012). *M. aeruginosa* está adaptada a condiciones de poca intensidad de luz y una alta intensidad de luz provoca la inhibición de la fotosíntesis. A pesar de esta respuesta, *Microcystis* tiene la capacidad de adaptarse a la irradianza característica de los periodos de formación y establecimiento de florecimientos durante el verano en latitudes templadas (Oliver & Ganf, 2002).

La temperatura del agua es un factor crítico para el desarrollo de *Microcystis* en los ciclos anuales. La temperatura óptima para la fotosíntesis tiene un intervalo entre 17.5 y 26° C mientras que las bajas temperaturas causan la reducción de la flotabilidad. La sucesión de las especies de *Microcystis* está influenciada por los cambios de temperatura durante el verano, de manera que *M. aeruginosa* se ha reportado como más abundante en los meses con mayor temperatura a diferencia de *M. wesenbergii* en sitios de latitud templada (Park *et al.*, 1998; Šejnohová & Maršálek, 2012) aunque en el embalse Valle de Bravo, de latitud tropical, se ha reportado el caso contrario (Valeriano-Riveros, 2014).

*Microcystis* también tiene la capacidad de habitar ambientes con baja concentración de oxígeno disuelto o anóxicos, generados bajo la superficie de los lagos con florecimientos densos en la columna de agua o en los sedimentos. La tolerancia de *Microcystis* a estas condiciones puede ser importante para la dominancia de *M. aeruginosa* en lagos eutróficos (Šejnohová & Maršálek, 2012).

El fósforo es uno de los nutrimentos más importantes para el desarrollo de cianoprocariontes en los ambientes de agua no salinos. La tasa de crecimiento está correlacionada con la disponibilidad de este elemento. La formación de aerotopos está influenciada por el estado de P en las células: en condiciones con poco P se produce menor número de aerotopos en las células y la tasa fotosintética también disminuye, a diferencia de una población con alto P. *Microcystis* contrarresta la baja concentración de P con la capacidad de asimilar y acumular P, que sumado al control de su flotabilidad, le permiten tener acceso a P en aguas profundas cuando las concentraciones de P del epilimnion son bajas.

Combinados, el aumento de temperatura y la concentración P comúnmente resulta en altas tasas de crecimiento celular de *Microcystis*, lo que sugiere que la creciente eutrofización de los cuerpos de agua y el calentamiento climático pueden tener un efecto aditivo en promover en mayor medida el desarrollo de poblaciones tóxicas en lugar de poblaciones no tóxicas de *Microcystis*, y en consecuencia florecimientos con un mayor contenido de microcistinas.

El nitrógeno es esencial para la síntesis de aerotopos y su limitación impacta en la flotabilidad de las células. La asimilación de N está relacionada con la producción de proteínas y el contenido de carbohidratos (fijación de CO<sub>2</sub>). En condiciones de limitación de N, las células aumentan su contenido de carbohidratos y su flotabilidad disminuye; lo contrario ocurre en concentraciones no limitantes de N. Respecto a la proporción de N:P, los florecimientos de *Microcystis* parecen estar limitados por la disponibilidad del N y P en lugar de su proporción. Es decir, el límite es la baja concentración del nutrimento limitante.

La tasa de cambio de las poblaciones de *Microcystis* está influenciada por turbulencia, luz, CO<sub>2</sub> y nutrimentos. La regeneración de los últimos depende del efecto de los fagos, bacterias parásitas y herbívoros, pero también de la degradación de los florecimientos, por ejemplo. En las temporadas de sequía, se ha reportado que las poblaciones de *M. aeruginosa* aumentan de 1-2 órdenes de magnitud.

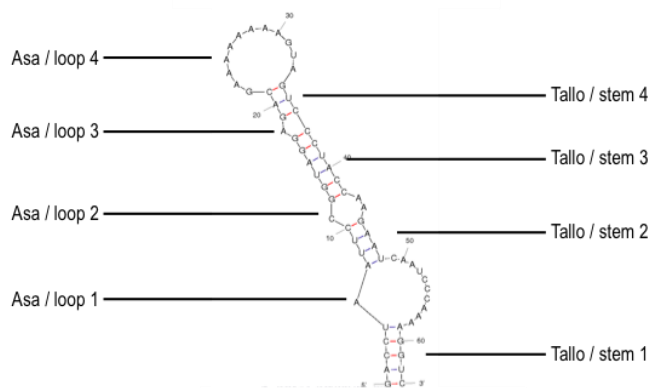
Se han registrado cambios en la composición genética de *Microcystis*, pues en los periodos donde las poblaciones alcanzan un máximo, se presentan dos genotipos dominantes. El inicio de los florecimientos de *Microcystis* comúnmente coincide con el aumento de la luz y la temperatura, condiciones anóxicas, una baja proporción N:P y limitación de CO<sub>2</sub> en el sedimento de los lagos. Los factores que regulan el reclutamiento de los estadios de reposo incluyen variaciones en la concentración de nutrientes, formas y proporciones y la temperatura. Como parte de los factores físicos, la resuspensión y mezcla por el viento también son factores importantes del reclutamiento de las colonias de *Microcystis*. En comparación entre lagos someros (1-2 m) y profundos (6-7 m), los someros presentan un reclutamiento mayor que los profundos, por lo que los primeros tienen un papel importante como sitios de inoculación para poblaciones planctónicas (Šejnohová & Maršálek, 2012).

## Apéndice 2. Estudio de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal en *Microcystis*

El análisis de la estructura secundaria de algunas regiones semiconservadas que componen la región ITS 16S-23S rDNA es una propuesta taxonómica reciente (Johansen & Casamatta, 2005) que ha mostrado ser útil en la distinción de especies de cianoprocariontes que tienen pocos caracteres morfológicos, al convertirse en otro tipo de carácter taxonómico (Johansen & Casamatta, 2005; Johansen *et al.*, 2011, 2014, Genuário *et al.*, 2015; Iteaman *et al.*, 2000). De esta manera, por ejemplo, Johansen *et al.* (2011) dieron elementos para la distinción de dos especies de *Leptolyngbya*. El número de sectores que son parte de la secuencia que codifica para el ITS 16S-23S rDNA y que se han analizado por su estructura secundaria para distinguir entre especies, varía entre los cianoprocariontes, ya que algunos géneros tienen tres sectores variables, hélice D, caja B y V3, y *Microcystis* tiene los dos primeros.

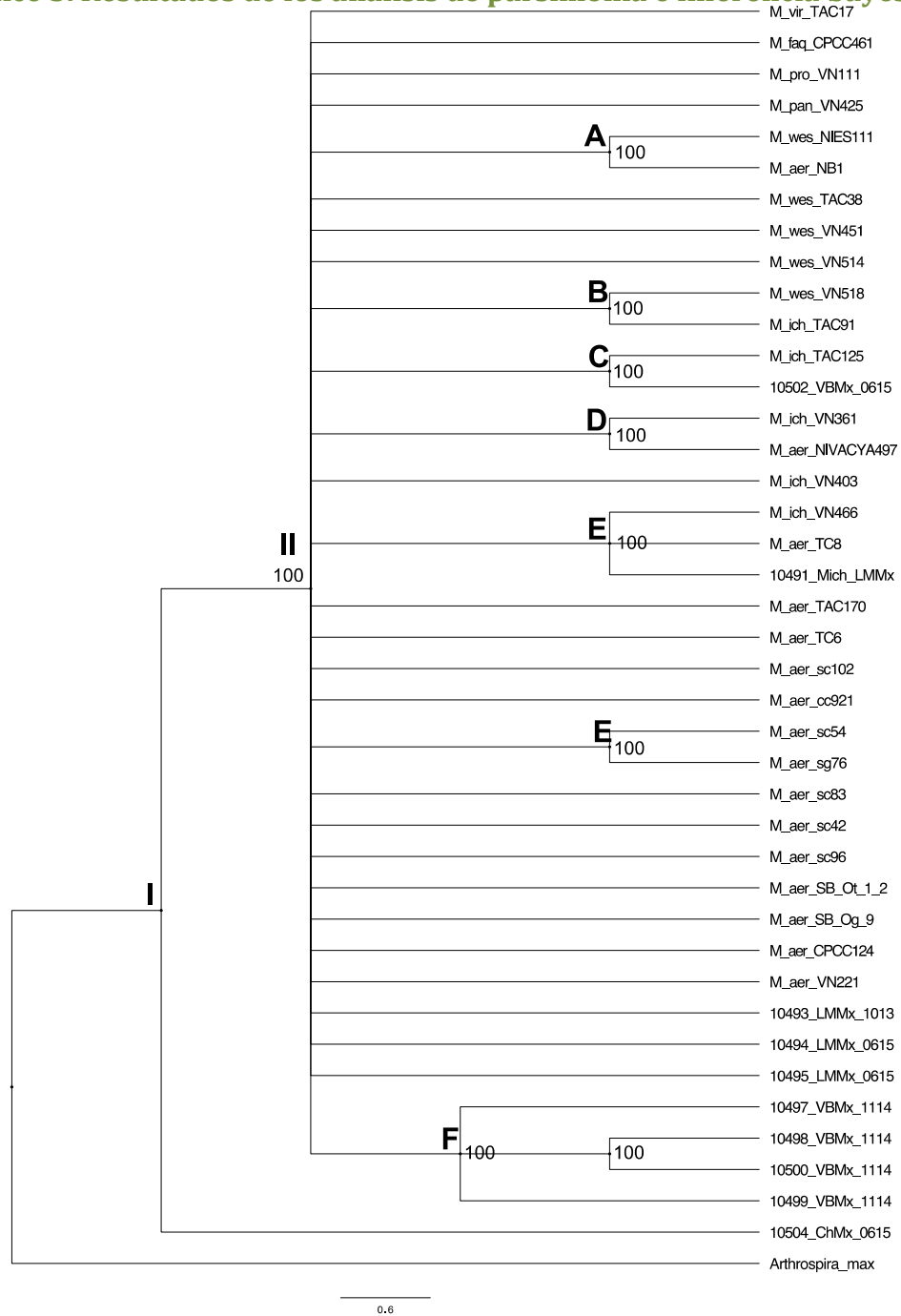
En el trabajo presente, se trabajó de manera individual los sectores hélice D y caja B de las 40 secuencias de DNA utilizadas para los análisis de secuencias. El primer paso fue identificar los sectores internos de la región ITS 16S-23S rDNA para asignarles un código de color, el cual fue desarrollado por varios autores que trabajan con cianoprocariontes (Iteaman *et al.*, 2000; Johansen *et al.*, 2011) e integran la estructura secundaria como un carácter genético dentro de análisis polifacéticos que incluyen información morfológica y ambiental.

Posteriormente, se obtuvo la estructura secundaria de las secuencias de ambos sectores en la plataforma <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/rna-folding-form> y se compararon entre sí, buscando diferencias a nivel de estructura y variación de bases nitrogenadas. Se consideró el tamaño de cada *loop* y *stem* por medio de la cuantificación de las bases que componen a cada subregión; en el caso de los *loops* el número de bases individuales y en el caso de los *stems*, el número de pares de bases. Se tomó la estructura secundaria de la secuencia M\_aer\_NIES44 HelixD como referencia para considerar el número y distribución de *stems* y *loops* (Fig. 17). A partir de la raíz de la hélice, y hacia el final, se enumeraron los *loops* y los *stems*. En la hélice de la secuencia antes mencionada se forman 4 *loops* y 4 *stems*, como se observa en la siguiente figura.



**Figura 17.** Estructura secundaria de la hélice D, a partir del reconocimiento de la secuencia que codifica para la región ITS 16S-23S rDNA.

### Apéndice 3. Resultados de los análisis de parsimonia e inferencia bayesiana

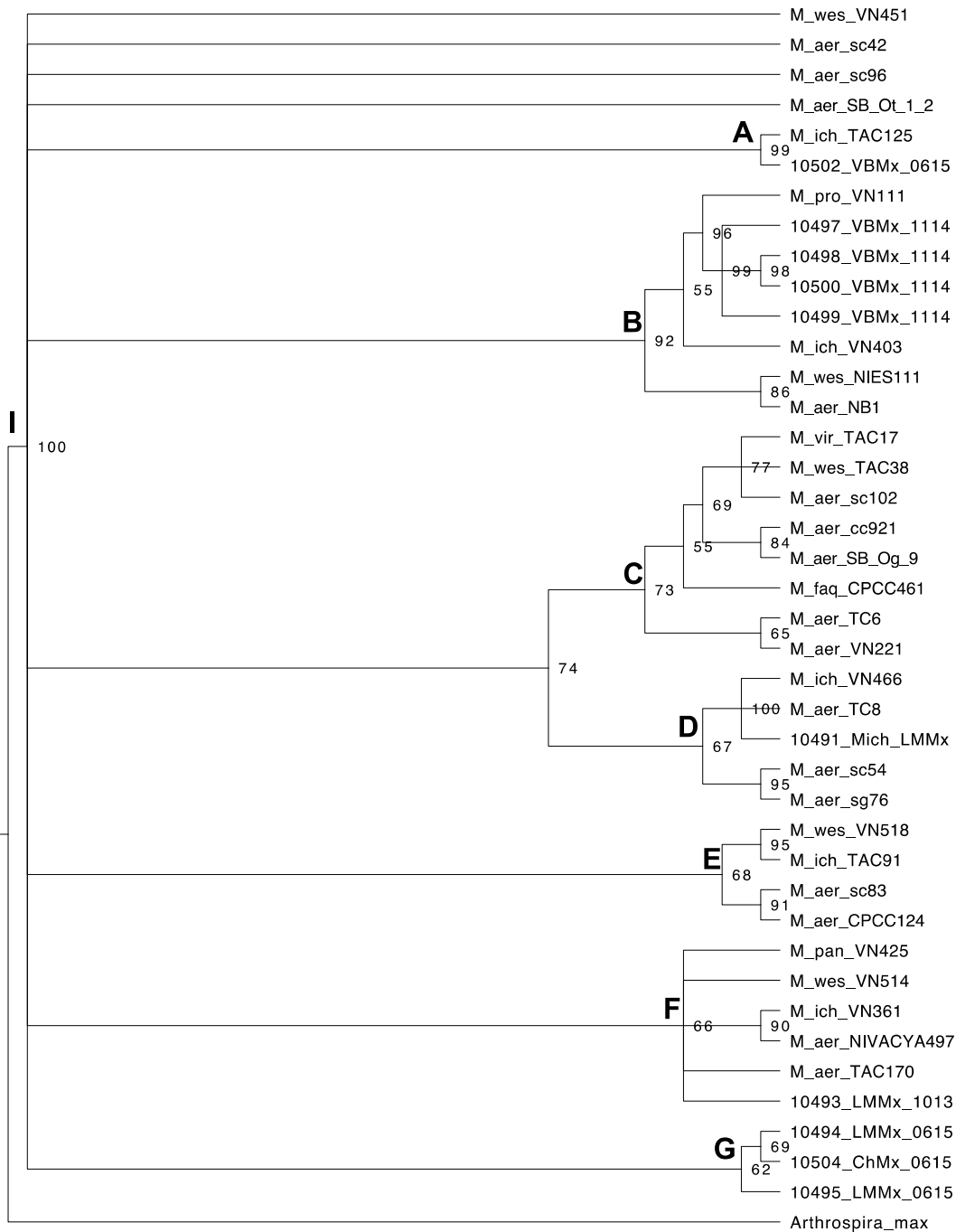


**Figura 18.** Análisis de parsimonia inferido con secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis*. Se muestra uno de los árboles más parsimoniosos, bajo el criterio de consenso de mayoría, que establece la resolución de un clado a partir de su presencia en un mínimo del 50% de las 1000 réplicas bootstrap. Los clados que no cumplen con el requisito se muestran colapsadas como politomías. Las posiciones que contenían gaps se trataron como datos faltantes. El análisis de parsimonia consideró que todas las posiciones tienen un mismo valor, y no se considera un modelo de sustitución nucleotídica. Las abreviaciones de las especies corresponden con: M\_ich = *M. ichthyoblabe*; M\_aer = *M. aeruginosa*; M\_prot = *M. protocystis*; M\_pan = *M. panniformis*; M\_faq = *M. flos-aquae*; M\_wes = *M. wesenbergii*; M\_vir = *M. viridis*. Las iniciales seguidas de las especies corresponden con el país de origen: cc = Francia; CPCC = China; TC = Tailandia; VN = Vietnam; NIVACYA, TAC, NIES; NB1; SB = Japón.



**Cuadro 15.** Condiciones del análisis de parsimonia realizado con el *software* PAUP4.0. Se muestra que todos los caracteres fueron considerados con el mismo peso o importancia, y que del total de los mismos, 74 fueron informativos. Los valores de los índices del análisis arrojados posteriormente, indican la presencia de un nivel bajo de homoplasia.

<b>Información acerca del análisis de parsimonia (PAUP4.0)</b>	
Peso de los caracteres	El mismo peso para todos
Caracteres constantes	172
Caracteres informativos	74
Caracteres no informativos	150
<b>Índice de análisis de máxima parsimonia</b>	<b>Valor del índice</b>
Longitud del árbol	629
Índice de Consistencia (CI)	0.4547
Índice de Homoplasia (HI)	0.5453
Índice de consistencia que excluye caracteres no informativos	0.2412
Caracteres no informativos que excluyen el índice de homoplasia	0.7588
Índice de Retención (RI)	0.2942
Índice de Consistencia Reescalado (RC)	0.1338



**Figura 19.** Análisis de inferencia bayesiana obtenido con secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis*. Se muestra el árbol de mayoría inferido con el método de probabilístico, con la implementación del modelo de sustitución HKY+I+G. Se utilizaron dos cadenas de Markov Monte Carlo. En la parte superior de cada rama se indica el valor de probabilidad posterior. Los valores de los diagnósticos de convergencia ESS (tamaño de la muestra estimada) con un valor mayor a 100 y PSRF (factor de reducción de estala potencial) con un valor cercano a 1.00 indicaron que el parámetro tuvo un muestreo exitoso. La porción burnin = 0.25 se ajustó al 25%. Las abreviaciones de las especies corresponden con: M\_ich = *M. ichthyoblabe*; M\_aer = *M. aeruginosa*; M\_prot = *M. protocystis*; M\_pan = *M. panniformis*; M\_faq = *M. flos-aquae*; M\_wes = *M. wesenbergii*; M\_vir = *M. viridis*. Las iniciales seguidas de las especies corresponden con el país de origen: cc = Francia; CPCC = China; TC = Tailandia; VN = Vietnam; NIVACYA, TAC, NIES; NB1; SB = Japón.

## Apéndice 4. Matriz de distancias $p$ entre las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis* utilizadas en los análisis filogenéticos.

**Cuadro 16.** Matriz de distancias  $p$  entre las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA ribosomal de *Microcystis* analizadas en este trabajo. Las secuencias 31- 40 corresponden a los lagos mexicanos. Los valores de distancia o divergencia se obtuvieron multiplicando los valores por 100 y se describen como porcentajes. La matriz se obtuvo con el *software* MEGA7.

Número de secuencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 M_vir_TAC17	-									
2 M_faq_CPCC461	0.016	-								
3 M_pro_VN111	0.029	0.039	-							
4 M_pan_VN425	0.045	0.032	0.056	-						
5 M_wes_NIES111	0.025	0.042	0.022	0.045	-					
6 M_wes_TAC38	0.003	0.019	0.032	0.042	0.022	-				
7 M_wes_VN451	0.077	0.066	0.088	0.077	0.073	0.074	-			
8 M_wes_VN514	0.045	0.035	0.056	0.013	0.045	0.042	0.073	-		
9 M_wes_VN518	0.035	0.029	0.052	0.025	0.042	0.032	0.073	0.025	-	
10 M_ich_TAC91	0.035	0.025	0.049	0.022	0.042	0.032	0.070	0.022	0.003	-
11 M_ich_TAC125	0.032	0.025	0.039	0.029	0.032	0.029	0.070	0.029	0.016	0.019
12 M_ich_VN361	0.049	0.032	0.066	0.019	0.049	0.045	0.077	0.029	0.042	0.039
13 M_ich_VN403	0.035	0.045	0.013	0.042	0.009	0.032	0.073	0.042	0.042	0.039
14 M_ich_VN466	0.039	0.022	0.052	0.036	0.052	0.042	0.081	0.046	0.035	0.032
15 M_aer_TAC170	0.032	0.022	0.056	0.019	0.045	0.029	0.077	0.019	0.025	0.022
16 M_aer_TC6	0.035	0.039	0.039	0.056	0.045	0.039	0.096	0.049	0.045	0.046
17 M_aer_TC8	0.042	0.025	0.056	0.039	0.056	0.045	0.085	0.049	0.039	0.035
18 M_aer_sc102	0.006	0.022	0.029	0.049	0.029	0.009	0.081	0.049	0.039	0.039
19 M_aer_cc921	0.039	0.025	0.052	0.035	0.055	0.042	0.092	0.039	0.045	0.049
20 M_aer_sc54	0.035	0.029	0.042	0.025	0.055	0.039	0.095	0.032	0.039	0.042
21 M_aer_sg76	0.025	0.022	0.035	0.042	0.042	0.029	0.088	0.049	0.042	0.039
22 M_aer_sc83	0.049	0.032	0.066	0.049	0.052	0.045	0.085	0.052	0.039	0.035
23 M_aer_sc42	0.025	0.029	0.045	0.039	0.032	0.022	0.066	0.038	0.025	0.029
24 M_aer_sc96	0.029	0.026	0.052	0.039	0.035	0.025	0.074	0.042	0.032	0.032
25 M_aer_NIVACYA497	0.045	0.035	0.056	0.019	0.045	0.042	0.073	0.013	0.032	0.029
26 M_aer_SB_Ot_1_2	0.022	0.025	0.045	0.039	0.029	0.019	0.063	0.042	0.032	0.032
27 M_aer_SB_Og_9	0.019	0.022	0.042	0.025	0.045	0.022	0.088	0.026	0.035	0.036
28 M_aer_NB1	0.025	0.042	0.022	0.045	0.000	0.022	0.073	0.045	0.042	0.042
29 M_aer_CPCC124	0.039	0.022	0.049	0.029	0.032	0.035	0.063	0.025	0.019	0.016
30 M_aer_VN221	0.022	0.019	0.025	0.035	0.029	0.025	0.070	0.035	0.029	0.025
31 10491_Mich_LMMx	0.039	0.022	0.052	0.036	0.052	0.042	0.081	0.046	0.035	0.032
32 10493_LMMx_1013	0.049	0.049	0.042	0.025	0.022	0.045	0.088	0.025	0.039	0.042
33 10494_LMMx_0615	0.093	0.085	0.104	0.089	0.097	0.089	0.124	0.085	0.074	0.078
34 10495_LMMx_0615	0.039	0.029	0.039	0.025	0.035	0.035	0.062	0.029	0.026	0.022
35 10497_VBMx_1114	0.045	0.049	0.035	0.039	0.032	0.045	0.095	0.039	0.059	0.056
36 10498_VBMx_1114	0.049	0.052	0.039	0.042	0.035	0.049	0.099	0.042	0.062	0.059
37 10499_VBMx_1114	0.045	0.049	0.035	0.039	0.032	0.045	0.095	0.039	0.059	0.056
38 10500_VBMx_1114	0.049	0.052	0.039	0.042	0.035	0.049	0.099	0.042	0.062	0.059
39 10502_VBMx_0615	0.032	0.025	0.039	0.029	0.032	0.029	0.070	0.029	0.016	0.019
40 10504_ChMx_0615	0.211	0.197	0.220	0.188	0.225	0.216	0.264	0.184	0.193	0.188
41 Arthrospira_max	1.012	1.041	1.014	1.026	0.998	1.012	0.996	1.011	1.057	1.058

Cuadro 16. Continuación.

Número de secuencia	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	M_vir_TAC17									
2	M_faq_CPCC461									
3	M_pro_VN111									
4	M_pan_VN425									
5	M_wes_NIES111									
6	M_wes_TAC38									
7	M_wes_VN451									
8	M_wes_VN514									
9	M_wes_VN518									
10	M_ich_TAC91									
11	M_ich_TAC125	-								
12	M_ich_VN361	0.039	-							
13	M_ich_VN403	0.025	0.052	-						
14	M_ich_VN466	0.042	0.035	0.056	-					
15	M_aer_TAC170	0.029	0.022	0.049	0.039	-				
16	M_aer_TC6	0.032	0.066	0.042	0.056	0.052	-			
17	M_aer_TC8	0.045	0.039	0.059	0.003	0.042	0.060	-		
18	M_aer_sc102	0.029	0.052	0.032	0.042	0.035	0.029	0.046	-	
19	M_aer_cc921	0.029	0.036	0.055	0.046	0.025	0.042	0.049	0.032	-
20	M_aer_sc54	0.029	0.035	0.049	0.045	0.025	0.045	0.042	0.035	0.022
21	M_aer_sg76	0.032	0.045	0.039	0.029	0.035	0.042	0.032	0.019	0.035
22	M_aer_sc83	0.035	0.042	0.055	0.053	0.039	0.059	0.056	0.049	0.046
23	M_aer_sc42	0.016	0.042	0.032	0.045	0.032	0.049	0.049	0.022	0.039
24	M_aer_sc96	0.022	0.039	0.039	0.043	0.035	0.042	0.046	0.026	0.039
25	M_aer_NIVACYA497	0.029	0.016	0.042	0.052	0.019	0.049	0.056	0.049	0.039
26	M_aer_SB_Ot_1_2	0.022	0.039	0.032	0.042	0.035	0.042	0.046	0.019	0.039
27	M_aer_SB_Og_9	0.032	0.035	0.049	0.046	0.019	0.035	0.049	0.025	0.025
28	M_aer_NB1	0.032	0.049	0.009	0.052	0.045	0.045	0.056	0.029	0.055
29	M_aer_CPCC124	0.022	0.035	0.035	0.032	0.025	0.042	0.036	0.042	0.039
30	M_aer_VN221	0.019	0.045	0.025	0.035	0.029	0.035	0.039	0.025	0.035
31	10491_Mich_LMMx	0.042	0.035	0.056	0.000	0.039	0.056	0.003	0.042	0.046
32	10493_LMMx_1013	0.035	0.035	0.029	0.052	0.032	0.059	0.056	0.052	0.039
33	10494_LMMx_0615	0.064	0.100	0.090	0.104	0.089	0.093	0.108	0.089	0.096
34	10495_LMMx_0615	0.016	0.035	0.025	0.039	0.032	0.042	0.042	0.036	0.045
35	10497_VBMx_1114	0.055	0.049	0.035	0.056	0.039	0.059	0.059	0.045	0.042
36	10498_VBMx_1114	0.059	0.052	0.039	0.059	0.042	0.062	0.063	0.049	0.045
37	10499_VBMx_1114	0.055	0.049	0.035	0.056	0.039	0.059	0.059	0.045	0.042
38	10500_VBMx_1114	0.059	0.052	0.039	0.059	0.042	0.062	0.063	0.049	0.045
39	10502_VBMx_0615	0.000	0.039	0.025	0.042	0.029	0.032	0.045	0.029	0.029
40	10504_ChMx_0615	0.197	0.197	0.220	0.215	0.184	0.220	0.211	0.216	0.206
41	Arthrospira_max	1.013	1.025	1.013	1.073	1.058	1.017	1.088	0.998	0.998

**Cuadro 16.** Continuación.

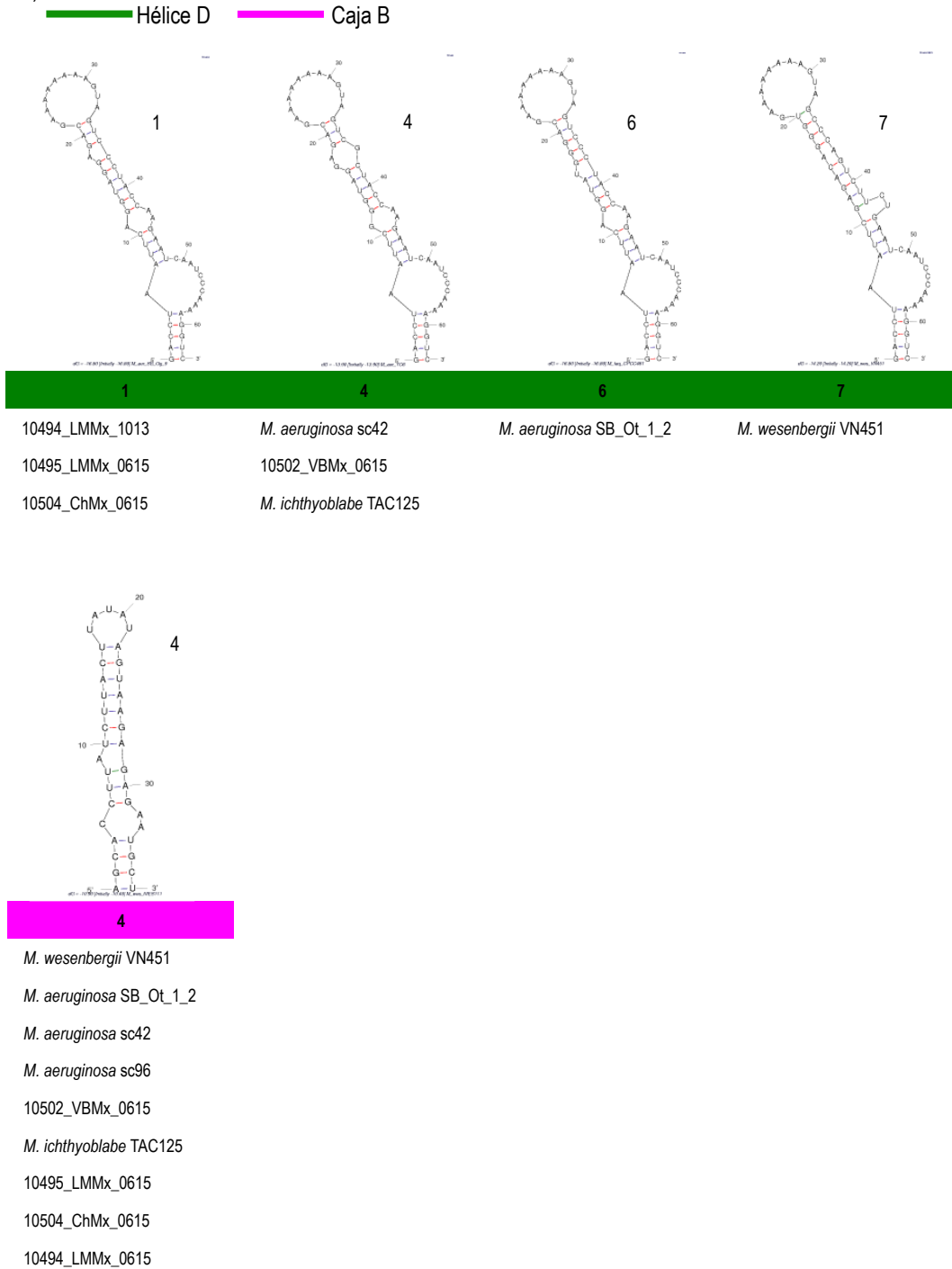
Número de secuencia	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
1	M_vir_TAC17										
2	M_faq_CPCC461										
3	M_pro_VN111										
4	M_pan_VN425										
5	M_wes_NIES111										
6	M_wes_TAC38										
7	M_wes_VN451										
8	M_wes_VN514										
9	M_wes_VN518										
10	M_ich_TAC91										
11	M_ich_TAC125										
12	M_ich_VN361										
13	M_ich_VN403										
14	M_ich_VN466										
15	M_aer_TAC170										
16	M_aer_TC6										
17	M_aer_TC8										
18	M_aer_sc102										
19	M_aer_cc921										
20	M_aer_sc54										
21	M_aer_sg76	-									
22	M_aer_sc83	0.049	-								
23	M_aer_sc42	0.032	0.045	-							
24	M_aer_sc96	0.039	0.042	0.025	-						
25	M_aer_NIVACYA497	0.049	0.045	0.039	0.042	-					
26	M_aer_SB_Ot_1_2	0.039	0.042	0.019	0.013	0.042	-				
27	M_aer_SB_Og_9	0.039	0.056	0.042	0.035	0.025	0.035	-			
28	M_aer_NB1	0.042	0.052	0.032	0.035	0.045	0.029	0.045	-		
29	M_aer_CPCC124	0.042	0.025	0.032	0.029	0.032	0.029	0.045	0.032	-	
30	M_aer_VN221	0.032	0.042	0.029	0.039	0.035	0.032	0.029	0.029	0.029	-
31	10491_Mich_LMMx	0.029	0.053	0.045	0.043	0.052	0.042	0.046	0.052	0.032	0.035
32	10493_LMMx_1013	0.049	0.059	0.042	0.052	0.032	0.052	0.042	0.022	0.032	0.042
33	10494_LMMx_0615	0.093	0.103	0.075	0.082	0.085	0.079	0.092	0.097	0.085	0.085
34	10495_LMMx_0615	0.029	0.046	0.025	0.029	0.029	0.025	0.039	0.035	0.029	0.029
35	10497_VBMx_1114	0.045	0.066	0.055	0.070	0.045	0.062	0.045	0.032	0.045	0.039
36	10498_VBMx_1114	0.049	0.069	0.059	0.073	0.049	0.066	0.049	0.035	0.049	0.042
37	10499_VBMx_1114	0.045	0.066	0.055	0.070	0.045	0.062	0.045	0.032	0.045	0.039
38	10500_VBMx_1114	0.049	0.069	0.059	0.073	0.049	0.066	0.049	0.035	0.049	0.042
39	10502_VBMx_0615	0.032	0.035	0.016	0.022	0.029	0.022	0.032	0.032	0.022	0.019
40	10504_ChMx_0615	0.216	0.225	0.211	0.215	0.180	0.216	0.188	0.225	0.202	0.197
41	Arthrospira_max	1.012	1.011	1.012	0.998	1.011	1.012	1.012	0.998	1.027	1.043

**Cuadro 16.** Continuación.

Número de secuencia	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
1	M_vir_TAC17										
2	M_faq_CPCC461										
3	M_pro_VN111										
4	M_pan_VN425										
5	M_wes_NIES111										
6	M_wes_TAC38										
7	M_wes_VN451										
8	M_wes_VN514										
9	M_wes_VN518										
10	M_ich_TAC91										
11	M_ich_TAC125										
12	M_ich_VN361										
13	M_ich_VN403										
14	M_ich_VN466										
15	M_aer_TAC170										
16	M_aer_TC6										
17	M_aer_TC8										
18	M_aer_sc102										
19	M_aer_cc921										
20	M_aer_sc54										
21	M_aer_sg76										
22	M_aer_sc83										
23	M_aer_sc42										
24	M_aer_sc96										
25	M_aer_NIVACYA497										
26	M_aer_SB_Ot_1_2										
27	M_aer_SB_Og_9										
28	M_aer_NB1										
29	M_aer_CPCC124										
30	M_aer_VN221										
31	10491_Mich_LMMx	-									
32	10493_LMMx_1013	0.052	-								
33	10494_LMMx_0615	0.104	0.100	-							
34	10495_LMMx_0615	0.039	0.042	0.061	-						
35	10497_VBMx_1114	0.056	0.019	0.123	0.056	-					
36	10498_VBMx_1114	0.059	0.022	0.128	0.059	0.003	-				
37	10499_VBMx_1114	0.056	0.019	0.123	0.056	0.000	0.003	-			
38	10500_VBMx_1114	0.059	0.022	0.128	0.059	0.003	?	0.003	-		
39	10502_VBMx_0615	0.042	0.035	0.064	0.016	0.055	0.059	0.055	0.059	-	
40	10504_ChMx_0615	0.215	0.211	0.197	0.193	0.215	0.220	0.215	0.220	0.197	-
41	Arthrospira_max	1.073	1.041	1.090	1.041	1.055	1.070	1.055	1.070	1.013	1.285

## Apéndice 5. Tipologías de las estructuras secundarias de la hélice D y caja B de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis*

a) Clado I



**Figura 20.** Diversidad de topologías de la hélice D y caja B presentadas en las secuencias de DNA que formaron cada clado del análisis de máxima verosimilitud. a) clado I; b) clado II; c) clado III subgrupo E; d) clado III subgrupo G. Las topologías de ambos sectores no varían de la misma manera.

b) Clado II

█ Hélice D    █ Caja B

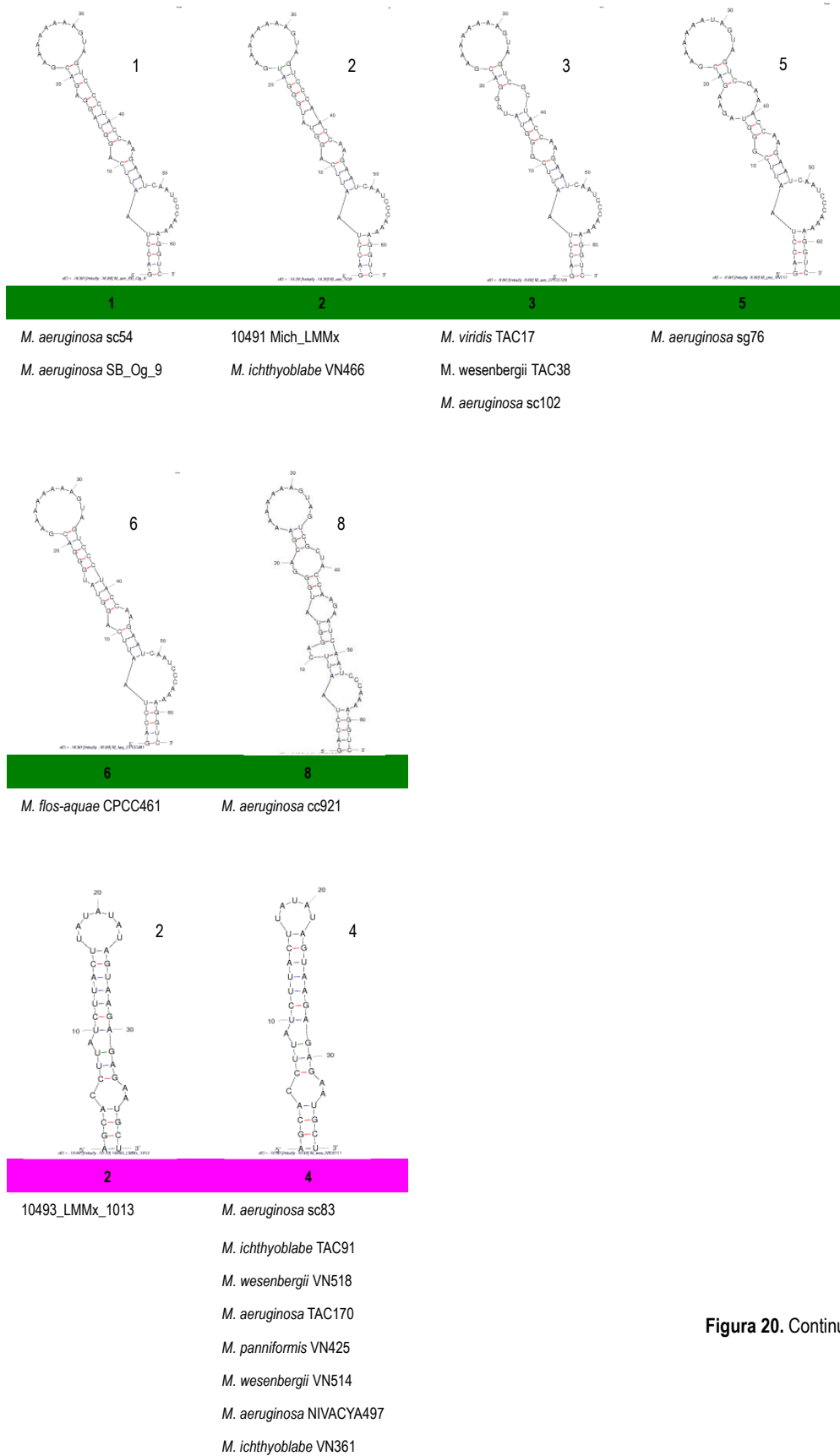
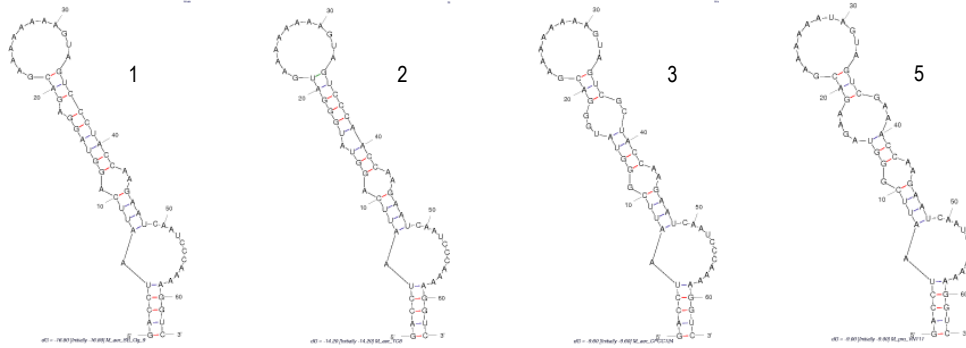


Figura 20. Continuación.



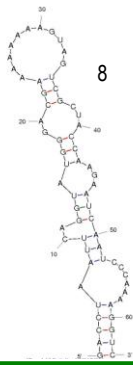
c) Clado III

█ Hélice D    █ Caja B



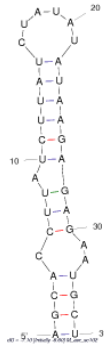
1
2
3
5

<p><i>M. ichthyoblabe</i> TAC91</p> <p><i>M. wesenbergii</i> VN518</p> <p><i>M. panniformis</i> VN425</p> <p><i>M. wesenbergii</i> VN514</p> <p><i>M. aeruginosa</i> NIVACYA497</p>	<p><i>M. ichthyoblabe</i> VN361</p>	<p><i>M. aeruginosa</i> CPCC124</p> <p><i>M. aeruginosa</i> TAC170</p>	<p>10493_LMMx_1013</p>
---	-------------------------------------	--	------------------------



8

*M. aeruginosa* sc83



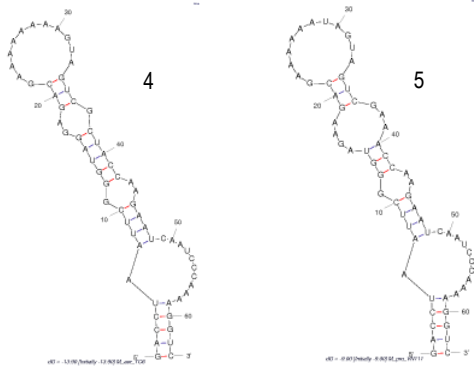
1
5

<p><i>M. aeruginosa</i> TC8</p> <p>10491_Mich_LMMx</p> <p><i>M. ichthyoblabe</i> VN466</p> <p><i>M. aeruginosa</i> sc102</p>	<p><i>M. flos-aquae</i> CPCC461</p> <p><i>M. aeruginosa</i> SB_Og_9</p> <p><i>M. viridis</i> TAC17</p>
--	--

Figura 20. Continuación.

d) Clado III

█ Hélice D     █ Caja B



*M. aeruginosa* TC6

*M. aeruginosa* VN221

*M. protocystis* VN111

*M. ichthyoblabe* VN403

*M. aeruginosa* NB1

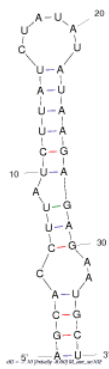
*M. wesenbergii* NIES111

10497\_VBMx\_1114

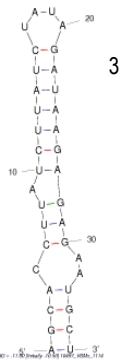
10499\_VBMx\_1114

10500\_VBMx\_1114

10498\_VBMx\_1114



*M. aeruginosa* VN221



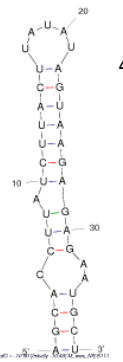
*M. protocystis* VN111

10497\_VBMx\_1114

10499\_VBMx\_1114

10500\_VBMx\_1114

10498\_VBMx\_1114



*M. ichthyoblabe* VN403

*M. aeruginosa* NB1

*M. wesenbergii* NIES111

Figura 20. Continuación.

**Cuadro 17.** Detalle de las topologías obtenidas del sector hélice D, a partir de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis* obtenidas en este trabajo y de GenBank. La descripción de cada topología se basa en el número de bases que componen los *loops* y *stems*.

<b>Topología 1</b> <b>Descripción</b>	<b>Topología 2</b> <b>Descripción</b>	<b>Topología 3</b> <b>Descripción</b>	<b>Topología 4</b> <b>Descripción</b>
Loop 1: 11 bases , 1 (A) en 5´ y 10 en 3´ Loop 2: 3 bases (5´A y 3´ AA) Loop 3: 1 base (5´ A) loop 4: 12 bases  Stem 1: 5 pares de bases Stem 2: 4 pares de bases Stem 3: 6 pares de bases Stem 4: 3 pares de bases	Loop 1: 11 bases , 1 (A) en 5´ y 10 en 3´ Loop 2: 3 bases (5´G y 3´ AA) Loop 3: 1 base (5´ A) loop 4: 12 bases  Stem 1: 5 pares de bases Stem 2: 4 pares de bases Stem 3: 3 pares de bases Stem 4: 6 pares de bases	Loop 1: 11 bases, 1 (A) en 5´ y 10 en 3´ Loop 2: 3 bases, 1 (A) en 3´ y 2 (AA) en 3´ Loop 3: 5 bases, 3 (UAA) en 5´ y 2 (CC) en 3´ Loop 4: 12 bases  Stem 1: 5 pares de bases Stem 2: 4 pares de bases Stem 3: 4 pares de bases Stem 4: 3 pares de bases	Loop 1: 11 bases, 1 (A) en 5´ y 10 en 3´ Loop 2: 3 bases, 1 (G) en 5´ y 2 (AA) en 3´ Loop 3: 3 bases, 2 (GA) en 5´ y 1 (G) en 3´ Loop 4: 12 bases  Stem 1: 5 pares de bases Stem 2: 4 pares de bases Stem 3: 5 pares de bases Stem 4: 3 pares de bases
<i>M. aeruginosa</i> NIVACYA476	<i>M. aeruginosa</i> AB2002 21	<i>M. aeruginosa</i> cc28	<i>M. aeruginosa</i> TC6
<b>Topología 5</b> <b>Descripción</b>	<b>Topología 6</b> <b>Descripción</b>	<b>Topología 7</b> <b>Descripción</b>	<b>Topología 8</b> <b>Descripción</b>
Loop 1: 11 bases, 1 (A) en 5´y 10 en 3´ Loop 2: 3 bases, 1 (G) en 5´ y 2 (AA) en 3´ Loop 3: 7 bases, 4 (AGAA) en 5´y 3 (GAA) en 3´ Loop 4: 12 bases  Stem 1: 5 pares de bases Stem 2: 4 pares de bases Stem 3: 3 pares de bases Stem 4: 3 pares de bases	Loop 1: 11 bases, 1 (A) en 5´ y 11 en 3´ Loop 2: 3 bases, 1 (A) en 5´ y 2 (AA) en 3´ Loop 3: 1 base (U) en 5´ y una línea en 3´, que no es gap (de acuerdo con la secuencia) Loop 4: 12 bases  Stem 1: 5 pares de bases Stem 2: 4 pares de bases Stem 3: 4 pares de bases Stem 4: 5 pares de bases	Loop 1: 11 bases, 1(A) en 5´ y 10 en 3´ Loop 2: 2 bases en 3´ (CU) Loop 3: loop final con 12 bases  Stem 1: 5 pares de bases Stem 2: 4 pares de bases Stem 3: 10 pares de bases	Loop 1: 12 bases, 10 en 5´ y 2 (AA) en 3´ Loop 2: 20 bases, en cada lado tiene 10 Loop 3: 3 bases (UCG)  Stem 1: 5 pares de bases Stem 2: 5 pares de bases Stem 3: 4 pares de bases
<i>M. aeruginosa</i> NIES44	<i>M. flos-aquae</i> CPCC461	<i>M. wesenbergii</i> VN451	<i>M. aeruginosa</i> VN211

**Cuadro 18.** Detalle de las topologías obtenidas del sector caja B, a partir de las secuencias que codifican para la región ITS 16S-23S rDNA de *Microcystis* obtenidas en este trabajo y otras en GenBank. La descripción de cada topología se basa en el número de bases que componen los *loops* y *stems*.

<b>Topología 1</b> <b>Descripción</b>	<b>Topología 2</b> <b>Descripción</b>	<b>Topología 3</b> <b>Descripción</b>	<b>Topología 4</b> <b>Descripción</b>
loop 1 - 3 bases loop 2 - 1 base loop 3 - 6 bases	loop 1 - 3 bases (C en 5' y AA en 3') loop 2 - 1 base (A en 5') loop 3 - 7 bases	loop 1 - 3 bases (C en 5' y AA en 3') loop 2 - 1 base (A en 5') loop 3 - 4 bases	loop 1 - 3 bases (C en 5' y AA en 3') loop 2 - 1 base (A en 5') loop 3 - 5 bases
stem 1 - 4 pares stem 2 - 3 pares stem 3 - 6 pares	stem 1 - 4 pares stem 2 - 3 pares stem 3 - 7 pares	stem 1 - 4 pares stem 2 - 3 pares stem 3 - 7 pares	stem 1 - 4 pares stem 2 - 3 pares stem 3 - 7 pares
10491_Mich_LMMx_1013	10493_LMMx_1013	10497_VBMx_1114, 10498_VBMx_1114, 10499_VBMx_1114 y 10500_VBMx_1114	Posiciones con bases distintas: posición 17 (loop 3) 10495 tiene C y 10502 tiene U  10495_LMMx_0615 y 10502_VBMx_0615
Caja B única, ausente en las secuencias de GenBank	Caja B única, ausente en las secuencias de GenBank	Caja B única, ausente en las secuencias de GenBank	

**Topología 5**  
**Descripción**

Loop 1: 3 bases, (C) en 5' y (AA) en 3'  
Loop 2: 1 base (A) en 5'  
Loop 3: 4 bases (ACAU)

Stem 1: 3 pares de bases  
Stem 2: 3 pares de bases  
Stem 3: 8 pares de bases

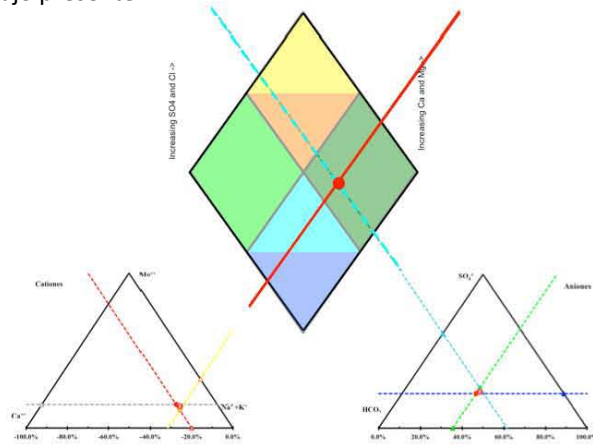
*M. aeruginosa* cc28 (Francia)

Otras secuencias que compartan esta estructura:  
*M. aeruginosa* TC6 (Japón)  
*M. aeruginosa* VN224 (Vietnam)  
*M. novacekii* TAC20 (Japón)

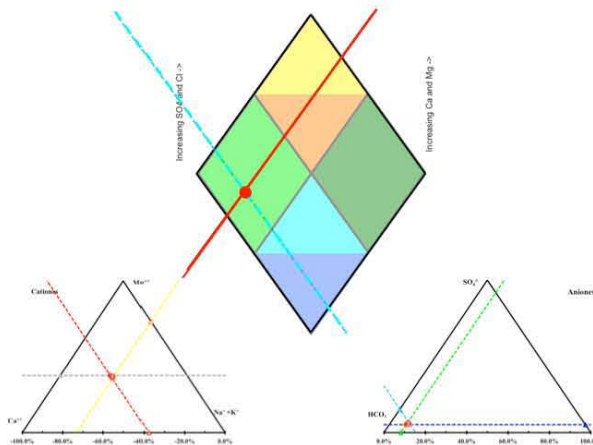
## Apéndice 6. Diagrama de Piper

La siguiente figura muestra el tipo de agua de cada localidad de acuerdo con la proporción de los seis iones principales determinados en el trabajo presente.

a. Lago Mayor de Chapultepec



b. Valle de Bravo



c. Lago de Chalco

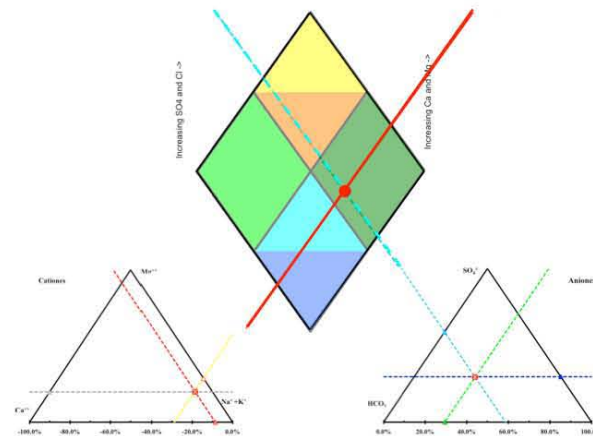


Figura 21. Diagrama de Piper que representa el perfil iónico de los tres sitios.