



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA  
FACULTAD DE CIENCIAS

Taxonomía integral de *Durinskia baltica* (Dinophyta: Peridiniales) en  
un florecimiento en aguas continentales no salinas en México

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

BEATRIZ IRENE LIRA HERNÁNDEZ

Directora de Tesis:  
Dra. Rosaluz Tavera Sierra  
Facultad de Ciencias

Comité tutor:  
Dra. Gloria Vilaclara Fatjó  
Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM  
Dra. Ma. Esther Meave del Castillo  
Departamento de Hidrobiología, UAM Iztapalapa  
Dra. Jhoana Díaz Larrea  
Departamento de Bioquímica, UAM Iztapalapa

Ciudad Universitaria, CD. MX.

junio 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.

## Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por brindarme todas las oportunidades para seguir avanzando en mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT por el apoyo con la beca de No. de registro y el apoyo de beca mixta para la estancia de investigación realizada durante el último semestre de Doctorado, en la Universidad de Lund en Suecia.

A mi directora de tesis la Dra. Rosaluz Tavera Sierra por su incondicional apoyo y confianza sin los cuales no hubiera podido resolver todos los retos que se me presentaron durante el desarrollo de este proyecto. Gracias por alentarme a dar lo mejor de mí y un poco más, en todos los proyectos que se presenten.

A los miembros de mi comité tutor y jurado, la Dra. Gloria Vilaclara Fatjó, la Dra. Ma. Esther Meave del Castillo, la Dra. Jhoana Díaz Larrea y la Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia por sus valiosos comentarios y acertadas observaciones que me ayudaron a mejorar consistentemente este manuscrito.

Quiero expresar mi especial y profundo agradecimiento al Laboratorio de Algas Continentales, Ecología y Taxonomía (Facultad de Ciencias, UNAM), el cual ha sido mi casa por 8 años y me ha brindado todas las facilidades de infraestructura y apoyo académico para la realización de este proyecto.

Al Dr. Eberto Novelo Maldonado por sus invaluable enseñanzas acerca del estudio de las algas las cuales han nutrido enormemente a mi amor por ellas.

A la M. en C. Guadalupe Vidal Gaona por su incondicional apoyo con el trabajo de laboratorio y por la grata convivencia y cariño.

A mis compañeras del laboratorio de algas continentales, ecología y taxonomía: Angélica, Eleonor, Alejandra, Martha, Itzel, Eva, Marisela muchas gracias por el apoyo, la convivencia y el cariño. A todos los miembros nuevos y a los chicos de taller un agradecimiento especial por siempre tener la mejor actitud y disposición de aprender.

A la Dra. Ma. Aurora Armienta, a la QFB Olivia Cruz Ronquillo, QFB Nora Elia Ceniceros y a la MI Alejandra Aguayo Ríos por su apoyo en la determinación de iones mayores en Laboratorio de Química Analítica del Instituto de Geofísica, UNAM.

A la Dra. Karin Rengefors por la invaluable asesoría, facilidades de infraestructura y materiales brindadas durante la estancia de investigación en su laboratorio del departamento de ecología acuática en la Universidad de Lund, Suecia.

## **Dedicatoria**

*Quiero dedicar esta tesis a toda mi familia por ser mi más grande soporte, especialmente a mis padres Carlos Enrique y Beatriz por su incondicional apoyo durante las diferentes etapas de mi formación, ustedes son el motor que me impulsa a seguir adelante para seguir su ejemplo de trabajo y esfuerzo, gracias.*

# Contenido

Agradecimientos .....	1
Introducción .....	14
Marco teórico .....	17
1. Variables biológicas y ciclo de vida de dinofitas .....	17
1.1 Generalidades y particularidades dentro del ciclo de vida de dinofitas .....	17
1.2 Diferencias entre los quistes peliculares (temporales) y los quistes de resistencia .....	19
1.3 Función ecológica y fisiológica de los quistes de resistencia .....	20
1.4 Características generales de los dinotomos .....	21
Antecedentes .....	24
Estudios previos en México y definición de la especie .....	24
Grado de conocimiento de las especies del género y otros dinotomos .....	27
Justificación .....	27
Preguntas de investigación .....	28
Hipótesis .....	29
Objetivo general .....	29
Objetivos particulares .....	30
Materiales y métodos .....	30
Área de estudio .....	30
Caracterización ambiental general del canal “El Japón” (Xochimilco) .....	31
Fase experimental 1. Relación entre la tasa de crecimiento en condiciones de cultivo estandarizadas y el ciclo de vida de <i>Durinskia baltica</i> .....	32
Tasa de crecimiento .....	32
Ciclo de vida .....	35
Fase experimental 2. Variaciones en la morfología y tasas de crecimiento de <i>Durinskia baltica</i> en diferentes condiciones de cultivo .....	36
Análisis estadísticos .....	38
Fase experimental 3. Evaluación de la similitud entre las secuencias parciales de los genes 18S y rbcL de la población de <i>Durinskia baltica</i> de Xochimilco con secuencias de otros ambientes .....	39
Extracción de DNA .....	39
Cuantificación de DNA .....	39
Reacción de PCR .....	40
Purificación de productos de PCR y secuenciación .....	41
Análisis de secuencias .....	42
Análisis de vecinos cercanos (Neighbor-Joining) .....	44
Análisis de Parsimonia .....	44

Análisis de máxima verosimilitud .....	45
Análisis de inferencia Bayesiana .....	45
Resultados.....	46
Características ambientales generales del canal del “El Japón” .....	46
Fase experimental 1. Relación entre la tasa de crecimiento en condiciones de cultivo estandarizadas y el ciclo de vida de <i>Durinskia baltica</i> .....	47
Variaciones morfológicas.....	48
Descripción completa del ciclo de vida de <i>Durinskia baltica</i> .....	50
Fase asexual .....	50
Fase sexual.....	53
Fase experimental 2. Variaciones en la morfología y tasas de crecimiento de <i>Durinskia baltica</i> en diferentes condiciones de cultivo .....	61
Categoría mesotrófica .....	61
Curvas de crecimiento.....	61
Tasas de crecimiento .....	62
Variaciones morfológicas.....	64
Categoría eutrófica.....	65
Curvas de crecimiento.....	65
Tasas de crecimiento .....	66
Variaciones morfológicas.....	68
Categoría hipertrófica .....	69
Curvas de crecimiento.....	69
Variaciones morfológicas.....	72
Análisis estadísticos .....	73
Fase experimental 3: Fase experimental 3. Evaluación de la similitud entre las secuencias parciales de los genes 18S y rbcL de la población de <i>Durinskia baltica</i> de Xochimilco con secuencias de otros ambientes .....	76
Resultados de la extracción de DNA y PCR.....	76
Análisis filogenéticos del hospedero y huésped de <i>Durinskia baltica</i> .....	78
Análisis de secuencias.....	78
Vecinos cercanos (Neighbor Joining) .....	79
Máxima Parsimonia .....	83
Máxima verosimilitud.....	86
Inferencia Bayesiana.....	90
Discusión.....	94
Características ambientales generales del canal de Japón con base en su hidroquímica.....	94
Tasa de crecimiento.....	94
División asexual.....	94

Reproducción sexual.....	95
Morfología de gametos .....	95
Fusión de gametos.....	95
Formación del planomeiocito y quistes peliculares sexuales .....	96
Quistes peliculares sexuales e hipnocigotos .....	98
Sexualidad y quistes de resistencia .....	98
Periodo de latencia.....	99
Efecto de la modificación de nutrimentos y pH sobre el crecimiento de <i>Durinskia baltica</i>	101
Relación entre los nutrimentos de las categorías mesotrófica y eutrófica con el pH .....	101
Efecto particular del pH sobre todos los tratamientos .....	102
Efectos fisiológicos del aumento del pH .....	103
Filogenia a partir de secuencias parciales del gen 18S del hospedero de <i>Durinskia baltica</i>	104
Filogenia a partir de secuencias parciales del gen de la rbcL del huésped de <i>Durinskia baltica</i>	106
Conclusiones.....	107
Referencias.....	109
Anexo1. Valores de iones mayores en meq. L <sup>-1</sup> y mg l <sup>-1</sup> , pH y coeficiente de variación registrados para el canal “El Japón” durante el periodo de octubre de 2013 a mayo de 2014 .....	122
Anexo 1a. Resultados (en mg L <sup>-1</sup> ) de iones mayores y alcalinidad obtenidos del canal Japón en el periodo de octubre de 2013 a mayo de 2014.....	122
Anexo2. Resultados de las pruebas de t de dos colas entre las diferentes categorías tróficas y sus tratamientos de pH.....	122
Anexo 2a. Resultados de la prueba de t de dos colas entre los tratamientos de pH de la categoría mesotrófica.....	122
Anexo 2b. Resultados de prueba de t de dos colas entre los tratamientos de la categoría eutrófica y el tratamiento de pH 8 de la categoría mesotrófica .....	123
Anexo 2c. Resultados de prueba de t de dos colas entre los tratamientos de la categoría eutrófica .....	123
Anexo 2d. Resultados de prueba de t de dos colas entre los tratamientos de la categoría hipertrófica y el tratamiento de pH 8 de la categoría mesotrófica.....	124
Anexo 2e. Resultados de prueba de t de dos colas entre los tratamientos de la categoría hipertrófica.....	124
Anexo 3. Matrices de divergencia nucleotídica de las secuencias analizadas con el huésped y hospedero de <i>Durinskia baltica</i> .....	125
Anexo 3a. Matriz de divergencia nucleotídica corregida para secuencias analizadas con el hospedero de <i>Durinskia baltica</i> .....	125
Anexo 3a continuación. Matriz de divergencia nucleotídica corregida para secuencias analizadas con el hospedero de <i>Durinskia baltica</i> .....	126
Anexo 3b. Matriz de divergencia nucleotídica corregida para secuencias analizadas con el	

## Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la organización celular de un dinotomo. Modificado de Stoebe y Maier (2002).....	23
Figura 2. Cambio en el número de células para definir el tiempo de aclimatación del cultivo. Datos obtenidos experimentalmente en los cultivos de <i>D. baltica</i> de Xochimilco del 5-15 de noviembre de 2012.....	33
Figura 3. Diagrama de diseño experimental de fase experimental 1 (21 de octubre- 13 de noviembre de 2013). .....	34
Figura 4. Valores de $r$ , $k$ y $T_2$ calculados a partir de los valores de número de células de <i>Cyclotella cryptica</i> usando las ecuaciones descritas en el texto. ....	35
Figura 5. Representación esquemática del método utilizado en la fase experimental 2 (enero-mayo; octubre-noviembre, 2014).....	38
Figura 6. Diagrama de Maucha del promedio de las recolecciones de octubre de 2013 a mayo de 2014 del canal de “El Japón” en Xochimilco. Dominancia iónica (% sobre $\text{meq.l}^{-1}$ ): $\text{HCO}_3^- (+\text{CO}_3^-) > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^- > \text{Na}^+ > \text{Mg}^{++} > \text{Ca}^{++}$ . Concentración iónica: $0.984 \text{ meq.l}^{-1}; \pm 0.03 \text{ d.s.}$ , $\text{K}_{25}: 906 \mu\text{Scm}^{-1} \pm 155 \text{ d.s.}$ .....	47
Figura 7. Representación gráfica del cambio en densidad celular de <i>D. baltica</i> en función del tiempo de cultivo (fase experimental 1) con barras de error de las réplicas de cada conteo. .	48
Figura 8. Variaciones morfológicas registradas en células vegetativas de los cultivos de la fase experimental 1.....	50
Figura 9. Descripción de las fases de la mitosis. A-B) Profase. C-D) Metafase, flecha superior: formación de canales citoplasmáticos; flecha derecha: endosimbionte. E-F) Anafase, flecha: migración de cromosomas. G-H) Telofase, flecha: ecdisis de la teca. I) Pared o quiste de división, comienzo de citocinesis. J) Núcleo endosimbionte, flecha superior: división amitótica; flecha inferior: conexión con dinocarion. A, C, E, G, I (microscopía fotónica); B, D, F (epifluorescencia DAPI); H-I (epifluorescencia Syber Green).Escala de la barra $10\mu\text{m}$ . .....	51

Figura 10. Secuencia de la citocinesis desde la ecdisis de la teca hasta la liberación de las células independientes. B) Orientación del ápice y antápice (flechas). C) Flagelo longitudinal (flecha). D) Rompimiento de la pared (flecha). Escala de la barra: 10µm. ....	52
Figura 11. Morfología de quistes peliculares. A) Ecdisis del quiste pelicular. B-C) Coloración parda del quiste pelicular, forma redonda. D) No se distinguen estructuras celulares. Escala de la barra 20µm. ....	53
Figura 12. Diferentes orientaciones registradas previas a la fusión de gametos de <i>Durinskia baltica</i> . A) Poro apical-intersección placa 5'''. B) Unión en poro flagelar. C) Ápice-zona flagelar. D) Orientación final observa durante la fusión de gametos de <i>Durinskia baltica</i> . Escala de la barra: 10µm. ....	54
Figura 13. Fusión de gametos después del acomodo con orientación perpendicular. A) Separación de placas (flecha). B-C) Cariogamia e integración de citoplasmas. D) Fusión de tecas y reacomodo de placas. E-G) Diferentes morfologías de la formación del planocigoto. H-I) Planocigoto. Escala de la barra: 10 µm. ....	55
Figura 14. Morfología del planocigoto móvil. A) Flagelos longitudinales (flechas) en vista lateral derecha. B) Vista ventral, flagelo transversal saliendo del cingulo (flecha superior), flagelos longitudinales (flechas inferiores). Escala de la barra: 10 µm. ....	56
Figura 15. Secuencia de la retracción de los flagelos longitudinales (flechas) en el planocigoto. Escala de la barra: 20 µm. ....	56
Figura 16. Células vegetativas con posible deficiencia de nutrimentos. A) Pérdida de pigmentación y presencia de sustancias de reserva (flecha). B) Diferencia de pigmentación y tamaño de células vegetativas con y sin deficiencia de nutrimentos. Escala de la barra 10 µm. ....	57
Figura 17. Planocigotos en fase de meiosis. A-B) Se indican cuatro células haploides generadas por meiosis. C-D) Se observan tres núcleos visibles en primer plano (tinción con Sybr green). Escala de la barra: 10 µm. ....	57
Figura 18. Quistes peliculares de origen sexual. A) Arqueópilo pentagonal abierto (a). B) Arqueópilo cerrado (a). C) Quiste en fase de meiosis, se indican cuatro células hijas (flechas). D) Quiste eclosionando un planomeiocito (de color pardo) con flagelos longitudinales (flecha). Escala de la barra: 10µm. ....	58

Figura 19. Hipnocigotos o quistes de resistencia. A) Perifragma (fecha superior); endofragma (flecha inferior). B) Cuerpos de acumulación (flechas). C) Arqueópilo con forma romboide (a). D, F) Eclósión de hipnocigotos. E) Hipnocigoto vacío, flecha: arqueópilo. Escala de la barra: 20  $\mu\text{m}$ ..... 59

Figura 20. Fase asexual (en círculo) y fase sexual del ciclo de vida de *Durinskia baltica*. Cuando hay reproducción asexual, las células se orientan de forma opuesta dentro del quiste de división, ya tienen flagelos y forman una nueva teca al liberarse de la pared materna. En la reproducción sexual, las células vegetativas actúan como isogametos (A); en un periodo de aproximadamente 35 minutos después de la singamia, se genera un planocigoto diploide (B). El planocigoto puede seguir una de 3 posibles rutas: (C) dividirse por meiosis después de 2-4 días produciendo 4 células hijas por desmoesquisis; (D-E) convertirse en un quiste pelicular (en el cual resalta un arqueópilo pentagonal) y después de 4-10 días se divide por meiosis liberando células haploides, (F) de forma alternativa, el quiste pelicular puede producir un planomeiocito diploide, el cual se distingue por la presencia de flagelos temporales; en 4-6 días el planomeiocito cambia a una forma más redondeada y produce por meiosis (5-7) días nuevas células hijas.(G) La ruta final ocurre cuando el planocigoto diploide se convierte en un hipnocigoto (2-4 días), mediante un cambio completo de forma así como el desarrollo de una pared doble muy gruesa; los hipnocigotos tienen un periodo de latencia de 15 a 45 días antes de generar células hijas haploides por meiosis. .... 61

Figura 21. Curvas de crecimiento obtenidas a partir de la densidad celular registrada en la categoría mesotrófica con pH de 7-10. .... 62

Figura 22. Comparación entre la densidad de células y quistes de resistencia (hipnocigotos) de *D. baltica* en los diferentes tratamientos de pH de la categoría mesotrófica en escala logarítmica. .... 64

Figura 23. Variaciones morfológicas registradas en los cultivos modificados de la condición mesotrófica. A-B: pH 7; C-D: pH 8; E-F: pH 9; G-H: pH 10. Escala de la barra 10 $\mu\text{m}$ ..... 65

Figura 24. Curvas de crecimiento obtenidas a partir de la densidad celular registrada en la categoría eutrófica con pH de 7-10. .... 66

Figura 25. Comparación entre la densidad de células y quistes resistencia (hipnocigotos) de *Durinskia baltica* en los diferentes tratamientos de pH de la categoría eutrófica en escala logarítmica. .... 68

Figura 26. Variaciones morfológicas registradas en los cultivos modificados de la condición eutrófica. A-B: pH 7; C-D: pH 8; E-F: pH 9; G-H: pH 10. Escala de la barra 10µm. ....	69
Figura 27. Curvas de crecimiento obtenidas a partir de la densidad celular registrada en la categoría hipertrófica con pH de 7-10. ....	70
Figura 28. Comparación entre la densidad de células y quistes de resistencia (hipnocigotos) de <i>Durinskia baltica</i> en los diferentes tratamientos de pH de la categoría hipertrófica en escala logarítmica. ....	72
Figura 29. Variaciones morfológicas registradas en los cultivos modificados de la condición hipertrófica. A-B: pH 7; C-D: pH 8; E-F: pH 9; G-H: pH 10. Escala de la barra: 10µm. ....	73
Figura 30. Gel de agarosa al 1%, en el primer carril se observan bandas correspondientes al marcador molecular de alto peso, en el segundo carril se observa una banda correspondiente a los 7 ng µl <sup>-1</sup> DNA extraído del cultivo de <i>Durinskia baltica</i> .....	76
Figura 31. Gel de agarosa al 1%, en el primer carril se observan las bandas del marcador molecular de alto peso, en el segundo se observa una banda de aproximadamente 500 pb correspondiente al producto de PCR con primers específicos.....	77
Figura 32. Gel de agarosa al 1%, en el primer carril se observa una banda de aproximadamente 1600 pb correspondiente al producto de PCR con primers generales, en el segundo carril se observan las bandas del marcador molecular de alto peso. ....	77
Figura 33. Gel de agarosa al 1%, en el primer carril se observan las bandas del marcador molecular de alto peso, en segundo y tercer carriles, se observan bandas de aproximadamente 500 pb correspondientes al producto de PCR con primers específicos para el gen <i>rbcL</i> .....	78
Figura 34. Árbol de distancia construido a partir de secuencias del gen 18S usando el método de vecinos cercanos (Neighbor-Joining). Se muestra la posición filogenética del hospedero de la población de <i>D. baltica</i> de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos corresponden con los valores de soporte de bootstrap. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especie de agua continental no salina. Dentro del recuadro verde se agrupan las secuencias de los dinotomos. ....	80
Figura 35. Árbol de distancia construido a partir de secuencias del gen <i>rbcL</i> usando el método de vecinos cercanos (Neighbor-Joining). Se muestra la posición filogenética del huésped de la población de <i>D. baltica</i> de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos indican los	

valores de soporte de bootstrap. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especies de agua continental no salina. Los recuadros verdes muestran a los dinotomos..... 82

Figura 36. Árbol de consenso de mayoría de máxima parsimonia construido a partir de secuencias del gen 18S. Se muestra la posición filogenética del hospedero de la población de *D. baltica* de Xochimilco. Los números ubicados a la izquierda de los nodos corresponden con el valor de soporte de bootstrap. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especie de agua continental dulce. Dentro del recuadro verde se agrupan las secuencias de dinotomos. .... 84

Figura 37. Árbol de consenso de mayoría de máxima parsimonia construido a partir de secuencias del gen *rbcL*. Se muestra la posición filogenética del huésped de la población de *D. baltica* de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos indican los valores de soporte de bootstrap. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especies de agua continental no salina. Los recuadros verdes muestran a los dinotomos..... 86

Figura 38. Árbol de máxima verosimilitud inferido a partir de las secuencias del gen 18S, se muestra la posición filogenética del hospedero de *Durinskia baltica* de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos indican los valores soporte de bootstrap. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especie de agua continental dulce. En el recuadro verde se muestran los dinotomos..... 88

Figura 39. Árbol de máxima verosimilitud inferido a partir de las secuencias del gen *rbcL*, se muestra la posición filogenética del huésped de *Durinskia baltica* de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos indican los valores de soporte de bootstrap. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especies de agua continental no salina. Los recuadros verdes muestran a los dinotomos. 90

Figura 40. Árbol de consenso generado por el análisis de inferencia Bayesiana a partir de la secuencia del gen 18S, se muestra la posición filogenética del hospedero de *Durinskia baltica* de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos indican los valores de probabilidad posterior. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especie de agua continental dulce. En el recuadro verde se muestra a los dinotomos..... 91

Figura 41. Árbol de consenso generado por el análisis de inferencia Bayesiana a partir de la secuencias del gen <i>rbcL</i> , se muestra la posición filogenética del huésped de <i>Durinskia baltica</i> de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos indican los valores de probabilidad posterior. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especie de agua continental dulce. En los recuadros verdes se muestran los dinotomos.....	93
Figura 42. Distribución esquemática de las membranas del anfiesma de acuerdo con Morrill y Loeblich (1983). ME: membrana externa; MVAE: membrana de la vesícula anfiesimal externa; PT: placa tecal; P: película; MVAI: membrana de la vesícula anfiesimal interna; VA: vesícula anfiesimal. Modificado de Pozdnyakov y Skarlato, 2012. ....	96
Figura 43. Representación esquemática de la relación entre el hipnocigoto y planomeiocito (esquema propio). ....	97

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Diferencias en la ecología y fórmula tecal de especies de dinotomos cercanos a <i>Durinskia baltica</i> .....	26
Cuadro 2. Intervalos que definen las categorías de trofismo reportadas en la literatura comparadas con las concentraciones que se proponen en el proyecto, incluyendo las que contiene el medio comercial L1 (nitrógeno inorgánico disuelto, fósforo total y medio L1 en $\text{mg l}^{-1}$ ).....	37
Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes 18S rDNA y <i>rbcL</i> de <i>D. baltica</i> .....	41
Cuadro 4. Componentes de la mezcla (master mix “Mmix”) utilizada para la reacción de PCR .....	41
Cuadro 5. Especies de dinofitas utilizadas para el análisis filogenético del marcador nuclear 18S .....	43
Cuadro 6. Especies de diatomeas y dinofitas utilizadas para el análisis filogenético del marcador nuclear <i>rbcL</i> .....	43
Cuadro 7. Valores máximos, mínimos y coeficiente de variación de iones mayores en $\text{mg l}^{-1}$ registrados para el canal “El Japón” durante el periodo de octubre de 2013 a mayo de 2014	46

Cuadro 8. Resultados en $\text{meq.l}^{-1}$ de iones mayores y alcalinidad obtenidos del canal Japón en el periodo de octubre de 2013 a mayo de 2014 .....	46
Cuadro 9. Tasa de crecimiento ( $r$ ), número de divisiones por día ( $k$ ) y tiempo de duplicación de la población (T2), obtenidos a partir de los valores de densidad registrados durante la fase experimental 1 .....	48
Cuadro 10. Valores máximos y mínimos de las dimensiones registradas (en $\mu\text{m}$ ) de <i>Durinskia baltica</i> en cultivo mesotrófico con pH 8 en comparación con las registradas en muestras ambientales. ....	49
Cuadro 11. Tasa de crecimiento ( $r$ ), número de divisiones por día ( $k$ ) y tiempo de duplicación de la población (T2), obtenidos para los tratamientos de pH 7-10 a partir de los valores de densidad registrados durante la fase experimental 2 en la categoría mesotrófica. ....	63
Cuadro 12. Tasa de crecimiento ( $r$ ), número de divisiones por día ( $k$ ) y tiempo de duplicación de la población (T2), obtenidos para los tratamientos de pH 7-10 a partir de los valores de densidad registrados durante la fase experimental 2 en la categoría eutrófica. ....	67
Cuadro 13. Tasa de crecimiento ( $r$ ), número de divisiones por día ( $k$ ) y tiempo de duplicación de la población (T2), obtenidos para los tratamientos de pH 7-10 a partir de los valores de densidad registrados durante la fase experimental 2 en la categoría hipertrófica.....	71
Cuadro 14. Resultados de análisis de ANOVA para la densidad de células vegetativas con el último conteo de las categorías mesotrófica, eutrófica e hipertrófica para los tratamientos de pH de 7-10.....	74
Cuadro 15. Resultados de análisis de ANOVA para la densidad de quistes de resistencia (hipnocigotos) de las categorías mesotrófica, eutrófica e hipertrófica para los tratamientos de pH de 7-10.....	74
Cuadro 16. Número de caracteres utilizados en los análisis de máxima parsimonia para los genes 18S y <i>rbcL</i> de la secuencia de <i>Durinskia baltica</i> de Xochimilco.....	83

# **Taxonomía integral de *Durinskia baltica* (Dinophyta: Peridinales) en un florecimiento en aguas continentales no salinas en México**

## **Introducción**

Cuando se estudian organismos biológicos como las algas, el tipo de herramientas que se utilizan para aproximarse a la descripción de diferentes aspectos de su biología dependerá de los objetivos del estudio. Es común que uno de los primeros objetivos que se busca resolver cuando no se conoce el organismo de estudio, es la identificación taxonómica, debido a que ésta, representa la oportunidad de entender a las entidades sistemáticas como especies (Mayr, 1942), y así poder relacionarlas con procesos evolutivos y ecológicos.

Resaltando ese aspecto, la taxonomía integral se enfoca en obtener la mayor cantidad de información acerca de las especies, combinando diferentes herramientas (microscópicas, fisiológicas, moleculares, entre otras), por lo que permite obtener una visión mucho más compleja de las especies al estudiar cómo la evolución de sus caracteres se refleja en la gran variedad de relaciones entre la fisiología y el ambiente (Manoylov, 2014). Una correcta caracterización taxonómica provee de consistencia, brindando la capacidad de transferir las inferencias ecológicas que se puedan obtener de las especies a través de áreas geográficas diferentes (Kahlert *et al.* 2008).

Sin embargo, es importante siempre tener en cuenta; que las algas y en particular las dinofitas, poseen respuestas especie-específicas sensibles hacia muchos cambios físicos, químicos y biológicos en los ambientes acuáticos; es por esto que la taxonomía integral provee de información relevante que permite hacer evaluaciones biológicas más robustas para describir estas respuestas, como son la abundancia relativa y las relaciones con condiciones ambientales óptimas, así como el tamaño de la células y cambios en la forma (Stevenson *et al.*, 2008).

Recientemente, ha ido incrementado la importancia de resaltar aspectos particulares en el contexto de la biología de las dinofitas que sobresalen en medios acuáticos no salinos, puesto que estos organismos pueden formar florecimientos en estos ambientes, como resultado de ciertas estrategias reproductivas que les permiten desarrollarse y sobrevivir en condiciones que pueden ser desfavorables para otras algas (Cardoso *et al.*, 2010).

A pesar de que hay varios reportes de eventos de florecimiento, no existe suficiente información acerca de la ecología, fisiología general y ciclo de vida, así como, su papel dentro de la dinámica de los florecimientos; tal es el caso de *Durinskia baltica*, que es una dinofita con un sólo antecedente de su estudio en aguas continentales de México (Lira, 2012).

Para comprender la dinámica y efecto de un florecimiento, es necesario conocer no sólo aquellos factores ambientales y fisiológicos determinantes para su generación y permanencia, sino también el efecto que tendría la modificación de alguno de estos factores sobre la población. En los últimos años, diversos autores (Smayda, 1990; Paerl, 1997; Anderson *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*; 2005; Masó y Garcés, 2006; Heisler *et al.*, 2008) han establecido una relación directa entre la formación de florecimientos de dinofitas y la eutrofización, proponiendo diversas hipótesis acerca de los efectos que provocan los cambios en las concentraciones y forma química en la que se encuentran los nutrientes, ya que el fitoplancton en general presenta una preferencia por el consumo de formas reducidas de nitrógeno como el amonio  $\text{NH}_4^+$ , el cual comúnmente es incorporado antropogénicamente a los sistemas acuáticos (Falkowski, 2000; Conley *et al.*, 2009).

Sin embargo, no es fácil encontrar un patrón que relacione uno o varios nutrientes por sí solos directamente con la formación de cualquier evento de florecimiento, debido a que estas dinámicas se modifican dependiendo de las variables fisicoquímicas particulares de cada ambiente y de si hay episodios crónicos o esporádicos de aporte de nutrientes alóctonos (Heisler *et al.*, 2008). Por lo tanto, es necesario tomar en cuenta la relación entre los nutrientes y las variables fisicoquímicas en conjunto. Es por esta razón que los estudios experimentales son indispensables para definir las posibles causas de los florecimientos, tomando en cuenta las particularidades tanto de las especies como del ambiente.

Una manera adecuada de abordar la relación de los nutrientes, variables fisicoquímicas y ciclo de vida cuando se estudian florecimientos de dinofitas, es a través del trabajo con la modificación de cultivos, ya que en el cultivo es posible manipular ciertas condiciones, como son las concentraciones de nutrientes vinculadas a variables como el pH, temperatura y disponibilidad de oxígeno (Coats, 2002; Ki y Han, 2005; Ki y Han, 2007), además de monitorear y describir los diversos cambios que presenta la población con diferentes condiciones.

Estos estudios constituyen herramientas muy importantes con especies formadoras de florecimientos, para resolver características ecofisiológicas particulares relacionadas con sus historias de vida, como afinidades específicas por algún nutrimento, respuestas a temperatura y tasas de crecimiento (Fan *et al.*, 2003; Fan y Gilbert, 2005; Gilbert *et al.*, 2006; Herndon y Cochlan, 2007; Lomas *et al.*, 2008; Lindehoff *et al.*, 2011).

Un aspecto muy importante que destacar con respecto a *Durinskia baltica*, es que pertenece a un grupo de dinofitas que albergan una diatomea endosimbionte, a los que recientemente se han denominado “dinotomos” (Piennar *et al.*, 2007; Imanian y Keeling, 2007; Imanian *et al.*, 2010; Imanian *et al.*, 2012). Un dinotomo se refiere a todo el sistema biológico que incluye a la dinofita hospedera y al endosimbionte que se corresponde con una diatomea.

Las características que definen a los endosimbiontes de estas especies son las pérdidas distintivas de: la pared celular, motilidad y la habilidad para dividirse mitóticamente (Dodge, 1971; Tomas y Cox, 1973). A pesar de estas pérdidas y de la integración dentro de su hospedero, el endosimbionte ha retenido algunos de sus caracteres originales, incluyendo un núcleo vestigial con DNA, rodeado de un citoplasma voluminoso separado del hospedero por una membrana; dentro de esta membrana también se incluyen cloroplastos con tilacoides estructurados (paquetes de lamelas bien definidos) y, sorprendentemente, también mitocondrias activas en algunas especies (Imanian *et al.*, 2012).

Con sólo diez especies conocidas, los dinotomos son un pequeño grupo de dinofitas muy diverso en morfología (pueden ser atecados o presentar diferentes configuraciones tecales dentro de las especies tecadas), en hábitat (de ambientes marinos o de aguas continentales no salinas) y en formas de vida (pueden ser planctónicos, bentónicos, epipsámicos, móviles o sésiles). Estos dinoflagelados se han clasificado en cinco géneros de los órdenes Dinotrichales y Peridiniales: *Durinskia*, *Galeidinium*, *Kryptoperidinium*, *Peridinium*, *Peridiniopsis* (Imanian *et al.*, 2010, 2012).

El hecho de ser dinotomos les ha conferido a las especies del género *Durinskia* varias características que las diferencian de otras especies con configuraciones tecales muy parecidas, con las cuales comúnmente se han confundido taxonómicamente. Sin embargo, la identificación de la presencia del endosimbionte dentro de las células no siempre es fácil mediante microscopía fotónica y es necesario confirmar la presencia del endosimbionte en cortes ultra finos mediante microscopía electrónica de transmisión (MET).

Con el presente estudio se busca entender, a través de cultivos de laboratorio, las posibles relaciones entre las variaciones ambientales (traducidas como concentraciones de nutrientes y pH) y las diferentes etapas del ciclo de vida de *Durinskia baltica*, que nos permitan avanzar en la comprensión de los cambios en la densidad poblacional reportados para esta especie en ambientes como el canal “El Japón” de la zona lacustre de Xochimilco.

Asimismo, se busca observar si existe alguna relación entre la identidad genética de la especie y su ecología, ya que en trabajos recientes ha habido confusión en relación con su presencia en aguas continentales no salinas. Algunos autores la han descrito indudablemente como dulceacuícola (Horiguchi, 2004; Cardoso *et al.*, 2010), mientras que otros aseguran que es una especie únicamente marina o salobre (Hansen y Flaim, 2007; Pienaar *et al.*, 2007; Hansen, 2011).

## **Marco teórico**

### *1. Variables biológicas y ciclo de vida de dinofitas*

#### *1.1 Generalidades y particularidades dentro del ciclo de vida de dinofitas*

Entre la gran variedad de especies de dinofitas descritas, se conocen muy poco los ciclos de vida de algunas y en general han mostrado que son heteromórficos, compuestos por fases planctónicas dominantes y bentónicas de latencia alternantes, que implican etapas tanto vegetativas como reproductoras. La fase planctónica está formada por células vegetativas que se dividen de forma asexual, aumentando la población hasta que cambian a la etapa con reproducción sexual, en la que actúan como gametos, conservando el número cromosómico haploide.

La fusión de dos gametos produce un planocigoto diploide que conserva la motilidad, el cual se desarrolla para convertirse en un hipnocigoto (quiste de resistencia) en un proceso denominado enquistamiento. Generalmente, los quistes de resistencia se depositan en el bentos (fase bentónica de latencia) y entran en un periodo de latencia obligatorio, hasta que las condiciones ambientales son favorables para que comiencen su maduración fisiológica (Anglés *et al.*, 2012). Una vez que esta maduración está completa, los hipnocigotos pasan por un proceso de germinación, proceso posterior a una meiosis que, en algunos casos antecede a una mitosis que restablecerá la fase vegetativa (haploide). Los hipnocigotos no eclosionados

entran en un estado de latencia, permaneciendo viables en el sedimento por un tiempo variable según la especie, hasta que las condiciones ambientales sean adecuadas para su germinación (Bravo y Figueroa, 2014).

En algunas especies se ha observado otras rutas dentro de los ciclos de vida, por ejemplo, cuando los planocigotos son capaces de dividirse durante su fase móvil o enquistarse formando un quiste pelicular de origen sexual (Uchida, 1991; Figueroa y Bravo, 2005; Kremp y Parrow, 2006). Las distintas fases dentro del ciclo de vida de las dinofitas, así como sus alteraciones, son reguladas por interacciones muy complejas entre diversos factores físicos, químicos y biológicos, con profundas implicaciones para la permanencia y persistencia de las especies en los ecosistemas. Los factores que desencadenan la transición entre los estados planctónicos y bentónicos dentro de las dinofitas son muy variados y, por lo general, especie-específicos (Kremp *et al.*, 2009). A pesar de que la formación de quistes ha estado típicamente ligada con condiciones adversas para el crecimiento, principalmente la limitación de nutrientes, ya que el estrés nutricional desencadena la formación de gametos y enquistamiento en muchas especies estudiadas, las respuestas particulares de cada etapa sexual a posibles condiciones adversas son comúnmente desconocidas (Figueroa y Bravo, 2005).

Por otra parte, hay muy pocos estudios acerca de los requerimientos nutricionales de las fases motiles de la reproducción sexual, por lo que se desconoce hasta qué punto influyen las concentraciones ambientales de nutrientes o la magnitud de las reservas intracelulares, como factores determinantes de la viabilidad de las células o desencadenantes de la transición a los quistes. Algunos estudios han reportado que muchos cigotos formados en cultivos finalmente fueron incapaces de enquistarse. La razón de este comportamiento es incierta, a pesar de que el enquistamiento puede ser prevenido por medio de reservas nutricionales altas en el medio (Anderson y Lindquist, 1985; Anderson, 1998). Aunque no se conocen completamente los procesos que desencadenan las variaciones en el comportamiento del enquistamiento y eclosión, recientemente se han relacionado variables como la temperatura, luz, carga bacteriana y densidad celular con estas variaciones (Adachi *et al.*, 1999; Uchida, 1999).

En este estudio es muy importante describir las diferentes etapas dentro del ciclo de vida que puede presentar *Durinskia batika* en cultivo, para así poder explicar la dinámica de la población natural.

## 1.2 Diferencias entre los quistes peliculares (temporales) y los quistes de resistencia

Se ha calculado que aproximadamente el 24% de las dinofitas de aguas continentales no salinas producen quistes, que es un porcentaje un poco más alto que en especies marinas (15–20% según Head, 1996). La proporción puede resultar significativamente más alta en estos ambientes, debido a que los diferentes tipos de quistes de especies de aguas continentales no salinas son menos conocidos y estudiados, en comparación con los marinos y en muchas ocasiones se sobrestiman al ser confundidos con diferentes etapas de los ciclos de vida. Asimismo, la escasez de especies formadoras de quistes en el océano abierto probablemente se debe a la dificultad que puede representar la resuspensión de los quistes de la zona bentónica hacia la columna de agua (Mertens *et al.*, 2012).

*Quistes peliculares o temporales.* En ambientes de aguas continentales dulces, no siempre es sencillo diferenciar entre los quistes temporales peliculares y los quistes de resistencia verdaderos (Tardio *et al.*, 2009; Moestrup *et al.*, 2009), por ello su estudio morfológico tiene que ser detallado. Típicamente los quistes peliculares se habían descrito como estructuras producidas en diferentes etapas dentro del ciclo de vida de las especies, siempre relacionados con respuestas a condiciones adversa temporales, precedidos de ecdisis de la teca o como una etapa en la reproducción vegetativa asexual (Figuroa *et al.*, 2005). Sin embargo, estudios recientes, han mostrado que tanto en las etapas vegetativa y reproductiva del ciclo de vida, se pueden formar quistes peliculares, los cuales generalmente son de pared delgada, de una sola capa, carecen de ornamentaciones y sustancias de reserva. Es por esto, que en muchas ocasiones sólo cuando el quiste de resistencia es observado es posible diferenciarlo del quiste pelicular (Bravo y Figuroa, 2014).

Al igual que los quistes de resistencia, los quistes temporales son muy importantes dentro del ciclo de vida y la ecología de las especies, pues para las dinofitas son lo que las semillas para las plantas terrestres (Bravo y Figuroa, 2014). Sus funciones adaptativas incluyen la supervivencia bajo condiciones adversas (ya sean esporádicas o de largo plazo), conservación de la diversidad genética, dispersión a través del tiempo y el espacio, por lo que tienen influencia sobre la dinámica de las poblaciones, la sucesión estacional y biogeografía (Mertens *et al.*, 2012).

*Quistes de resistencia (hipnocigotos).* Los quistes de resistencia o hipnocigotos, se han asociado tradicionalmente con la fase reproductora (sexual) y son morfológicamente diferentes

de la etapa vegetativa. Generalmente presentan ornamentaciones, sustancias de reserva y son capaces de permanecer viables en los sedimentos o fosilizarse (Mertens *et al.*, 2012). Los quistes de resistencia son de gran interés debido a sus marcadas diferencias morfológicas con la teca, lo cual tiene una gran importancia taxonómica porque un determinado quiste puede ser relacionado a una teca particular (de una especie), a partir de similitudes morfológicas y/o coocurrencias dentro de la misma población o de similitudes del tipo germinación. Además, al ser capaces de fosilizarse, estos quistes tienen una gran importancia paleoecológica, pero pueden sugerir información relevante para entender los florecimientos de dinoflagelados actuales y futuros (Dale, 2001).

Generalmente, un quiste de resistencia (hipnocigoto) se refiere a una estructura formada por una pared gruesa constituida por material celulósico y mucilaginoso, la cual, además puede contener dinosporina y estar conformada de varias capas (Taylor, 1990). Con base en esta característica, Fensome *et al.* (1993) describen que los quistes proximales son aquellos que desarrollan su pared inmediatamente dentro de la teca, los quistes proximales *chorates* (en inglés, sin traducción), comprenden un cuerpo más o menos redondo central con procesos o crestas. La pared de los quistes puede presentar diferentes capas, una pared de una sola capa, se denominada *autofragma*. Una pared de dos capas, consisten en el *perifragma* (externa) y el *autofragma* (interna). Una pared de tres capas consiste en un *ectofragma*, un *perifragma* y un *endofragma*. Los quistes con dos o más capas en la pared que definen una cavidad se denominan *cavados*. La endoespora consiste de una capa de celulosa gruesa dentro de la pared que es birefringente (Reid y Boalch, 1987). La eclosión usualmente resulta de la pérdida de una parte o de la abertura de la pared del quiste; esta abertura se denomina *arqueópilo*, su forma y posición puede indicar la forma y posición de una o más placas que tenía la teca de la célula vegetativa original (Mertens *et al.*, 2012).

### *1. 3 Función ecológica y fisiológica de los quistes de resistencia*

Los quistes que proceden de la fusión sexual son cigotos y darán lugar a múltiples individuos con diferentes genotipos. Hasta hace poco se creía que las especies formadoras de florecimientos estaban dominadas por sólo unos pocos linajes al final del florecimiento. Por el contrario, las huellas de DNA de cultivos clonales de *Peridinium cinctum*, *Peridiniopsis borgei* y *Peridinium acicuiferum* mostraron que todos los clones eran diferentes (Logares *et al.*, 2009). Estos estudios soportan la hipótesis de que los quistes son un reservorio de diversidad genética

y ecológicamente funcionan como un banco de semillas genéticamente diverso, el cual provee de una amortiguación adaptativa a los cambios ambientales (Lundholm *et al.*, 2011).

Un proceso muy importante dentro de la dinámica de los quistes de resistencia es la latencia, la cual, se define como el periodo dentro del ciclo de vida de un organismo en el cual el crecimiento, desarrollo y actividad física son temporalmente suspendidos por una inhibición endógena activa. Los quistes en periodo de latencia son incapaces de germinar aun cuando estén bajo condiciones ambientales óptimas (Anderson, 1980). Las características de la latencia de los quistes de dinofitas pueden variar dependiendo de las condiciones ambientales, como la temperatura y niveles de nutrimentos (Figueroa *et al.*, 2005).

En algunas especies, las condiciones en las que el planocigoto fue formado parecen afectar la latencia (Figueroa *et al.*, 2005). Durante este periodo, no es posible inducir la germinación, lo cual puede reflejar la existencia de un sistema designado a resistir condiciones ambientales con extremos cíclicos. Esta función es muy posible en especies con un periodo de latencia de varios meses, dado que en estos casos la formación del quiste ha estado relacionada con estrategias de hibernación estacional. Por otra parte, algunas especies de dinofitas, tienen periodos de latencia menores a un mes (Blackburn *et al.*, 2001; Figueroa *et al.*, 2005), indicando que, en estos casos, los quistes están más relacionados con un cambio rápido (en comparación con latencias de varios meses) entre la fase planctónica y bentónica, que con la dinámica estacional de los eventos de florecimiento (Hallegraeff *et al.*, 1998).

Al formar estos quistes las especies son capaces de escapar a periodos de baja sobrevivencia; sin embargo, algunas de las desventajas incluyen, dejar la zona pelágica, perder divisiones celulares durante la latencia, el costo energético de la formación de quistes y los riesgos de recolonización cuando las condiciones no son favorables (Mertens *et al.*, 2012). A pesar de que la formación de quistes podría parecer un rasgo muy costoso para las dinofitas, las ventajas que les brindan sobrepasan las desventajas, ya que les permite recuperar aquellas poblaciones vegetativas que llegan a desaparecer de la columna de agua.

#### *1.4 Características generales de los dinotomos*

Como se mencionó anteriormente, *Durinskia baltica* presenta un endosimbionte que, por tener su origen en una diatomea, le confiere a esta especie la cualidad de ser un dinotomo. Los

dinotomos se encuentran ampliamente distribuidos tanto en ambientes marinos como de agua continental no salina y algunos forman florecimiento con efectos nocivos ocasionales (Imanian *et al.*, 2010). Las dinofitas hospederas que componen este grupo se encuentran actualmente divididas en al menos cinco géneros diferentes, *Kryptoperidinium*, *Durinskia*, *Peridinium*, *Gymnodinium* y *Galeidinium* (Carty y Cox, 1986; Horiguchi y Pienaar, 1994; Tamura *et al.*, 2005), mientras que se ha demostrado que los endosimbiontes presentan un origen en tres diferentes linajes de diatomeas, uno de la clase Bacillariophyceae (Chesnick *et al.*, 1997; Medlin y Kaczmarska, 2004; Imanian y Keeling, 2007; Pienaar *et al.*, 2007) y dos de la clase Coscinodiscophyceae (Medlin y Kaczmarska, 2004; Takano *et al.*, 2008; Horiguchi y Takano, 2006).

Hay dinofitas que contienen endosimbiontes cuyo origen se finca en clorofitas, haptofitas y criptofitas; en estas dinofitas, el endosimbionte se ha reducido al punto en el que sólo el cloroplasto permanece, en contraste con las diatomeas endosimbiontes de los dinotomos, que han preservado más características de su identidad genética y celular que cualquier otro cloroplasto secundario o terciario (Imanian *et al.*, 2010), principalmente la presencia de un núcleo vestigial.

El endosimbionte ha perdido la pared celular y la capacidad de condensar sus cromosomas normalmente o de dividirse mitóticamente (Tomas y Cox, 1973; Tippit y Pickett-Heaps, 1976; Chesnick y Cox, 1989), pero presenta un grado inusual de retención de caracteres, pues comúnmente retiene su genoma nuclear dentro del núcleo vestigial, varias mitocondrias con su genoma mitocondrial (Imanian y Keeling, 2007; Imanian *et al.*, 2007), así como ribosomas citosólicos, retículo endoplásmico y dictiosoma todo dentro de un citoplasma que, sorprendentemente, está separado del huésped por una membrana simple (Tomas y Cox, 1973; Eschbach *et al.*, 1990); esta membrana probablemente representa la membrana de la vacuola alimenticia de la dinofita hospedera (Hoek *et al.*, 1995).

A pesar de este grado inusual de retención de caracteres, el endosimbionte se encuentra integrado permanentemente dentro del hospedero y se encuentra presente durante todas las etapas del ciclo de vida (Chesnick y Cox, 1989; Chesnick y Cox, 1987; Figueroa *et al.*, 2009). Este comportamiento sugiere una coordinación metabólica y transferencia genética del endosimbionte hacia el hospedero (Stoebe y Maier, 2002). La organización celular es muy

similar en todos los dinotomos, en donde dentro de la célula de la dinofita hospedera, una membrana simple rodea un compartimento citoplasmático subcelular que contiene el núcleo endosimbionte junto con los caracteres que haya retenido (Horiguchi y Pienaar, 1991; 1994; Tamura *et al.*, 2005), (figura 1).

Los cloroplastos se encuentran rodeados por múltiples membranas, contienen tilacoides en paquetes de tres y una lamela que corre alrededor de toda la periferia del cloroplasto, el cual también presenta un pirenoide interno. Los cloroplastos están distribuidos periféricamente y se encuentran encerrados por el retículo endoplásmico del hospedero, el cual presenta continuidad con la membrana nuclear (Stoebe y Maier, 2002; Imanian *et al.*, 2010).

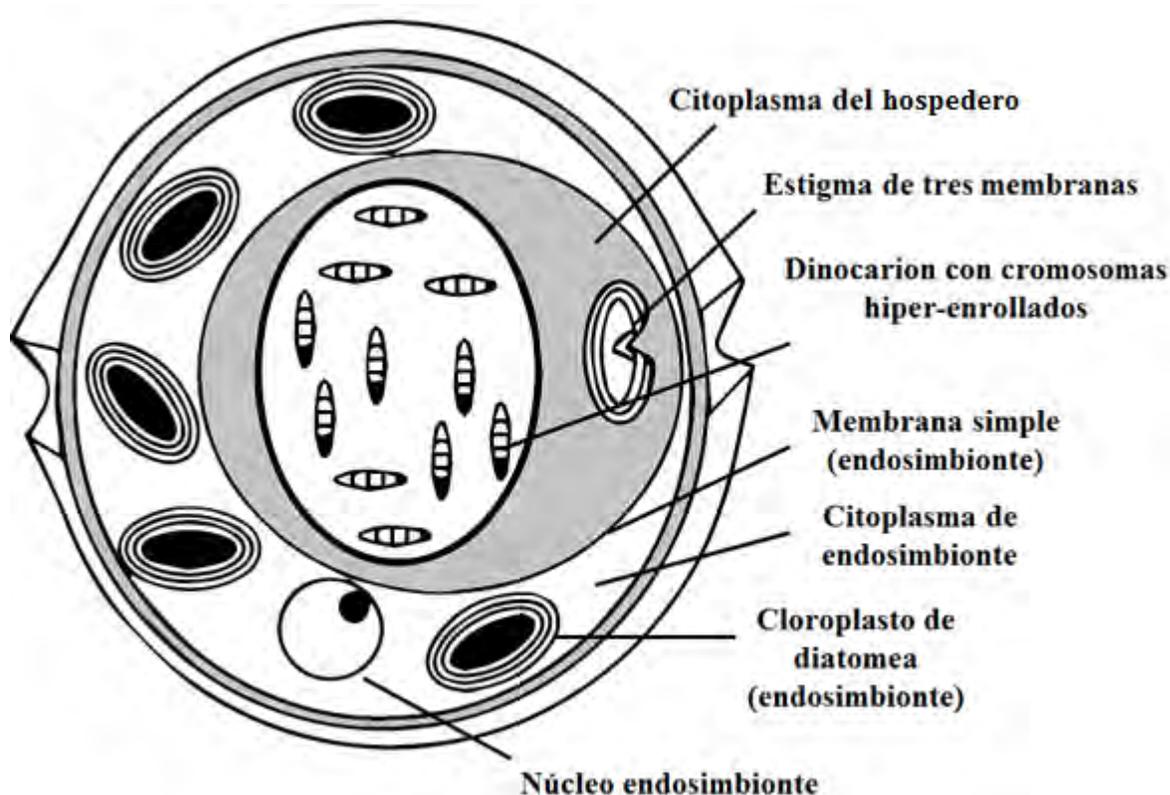


Figura 1. Esquema de la organización celular de un dinotomo. Modificado de Stoebe y Maier (2002)

La clorofila *a*, *c1* y *c2* se encuentran entre los pigmentos presentes en los dinotomos más estudiados, *Kryptoperidinium foliaceum* y *Durinskia baltica*. El principal carotenoide encontrado en los cloroplastos de estos dinotomos está identificado como fucoxantina (Stoebe y Maier, 2002; Imanian *et al.*, 2010), como se espera de un dinotomo y en oposición a las

demás dinofitas, cuyo principal carotenoide es la peridinina (Yoon *et al.*, 2005).

## Antecedentes

### *Estudios previos en México y definición de la especie*

En 2007, en el canal de “El Japón” en Xochimilco se detectó la presencia de un florecimiento de una dinofita (sin estudios previos), el cual ha sido permanente hasta ahora, aun en las condiciones hipertróficas que caracterizan a este canal, juzgando por el índice de estado trófico (“TSI” por sus siglas en inglés) mayor de 90 (Aizaki *et al.*, 1981; Lira *et al.*, 2017).

En 2009 se realizó un estudio del fitoplancton de Xochimilco (Tavera y Díez, 2009) y en el canal de Japón se identificó *Peridiniopsis oculatum*, como la especie dominante. En el periodo de 2010-2011 se realizó un segundo estudio abordando específicamente al florecimiento del canal de “El Japón” (Lira, 2012). En este estudio se observó la misma especie dominante y se rectificó su identificación como *Durinskia baltica*, la cual corresponde con la especie tipo del género *Durinskia* aislada de aguas no salinas en Texas (Carty y Cox, 1986). A diferencia del trabajo de 2009, esta última determinación se basó en la fórmula de la teca y en las observaciones realizadas en microscopía fotónica y microscopía electrónica (MET y MEB).

En el entorno de la sistemática de estas especies, Hansen y Flaim (2007) renombraron a *Peridiniopsis oculatum* como *Durinskia oculata* y destacaron que es propia de aguas continentales no salinas, en oposición a *Durinskia baltica*, considerada por ellos y otros autores como exclusiva de aguas estuarinas y costeras (Coute *et al.* 2012; Jaanus, 2011; Stoecker *et al.*, 2009). Hansen y Flaim (*op. cit.*) propusieron que la ecología era importante para resolver el claro traslape morfológico de ambas especies cuando se observan sólo con microscopía de luz. Tavera y Díez (2009), trabajaron detalladamente la ecología, aunque no resolvieron la morfología debido a que no trabajaron con microscopía electrónica de barrido y hay placas de importancia taxonómica que no se pueden ver con microscopía de luz.

Actualmente existen dos elementos morfológicos importantes y un elemento, desde el punto de vista genético, que apoyan la decisión de que la identidad correcta de la población de Xochimilco es *Durinskia baltica*:

a. Las especies del género *Durinskia* de ambientes marinos, salobres o de aguas continentales no salinas, albergan una diátomea endosimbionte (Figuroa *et al.* 2009; Imanian *et al.* 2010; Pienaar *et al.*, 2007; Saburova *et al.* 2012).

Aparentemente, todas las dinofitas que poseen alguna diátomea endosimbionte presentan un estigma rodeado de 3 membranas (Horiguchi, 2004); por ejemplo, *Gaelidium rugatum* Tamura, Shimada *et Horiguchi*, *Peridiniopsis penardii* (Lemmermann) Bourrelly, *P. kevei* Grigorszky y *Durinskia capensis* Pienaar, Sakai *et Horiguchi* (Pienaar *et al.*, 2007). El material del canal de “El Japón” presenta un estigma bipartito y rodeado de 3 membranas (Lira, 2012). Ninguna de estas características se presenta en *D. oculata* (Hansen y Flaim 2007).

b. En *D. oculata* la placa sulcal anterior parece estar ausente y la placa 1a es grande y de forma hexagonal (Hansen y Flaim 2007). Contrariamente, los organismos de Xochimilco sí presentan la placa sulcal anterior (Sa) y la placa 1a es pequeña y de forma pentagonal, como se describe para *D. baltica*.

c. Tavera y Díez (2009) realizaron, con base en DGGE (*Denaturing gradient gel electrophoresis*), un análisis filogenético de las algas de Xochimilco y, en dicho análisis, el organismo que forma el florecimiento (identificado como *Peridiniopsis oculatum*) mostró afinidad con el clado de *Peridiniopsis penardii* (Lemmermann) Bourrelly en las filogenias construidas, es decir, una de las especies comunes y formadoras de florecimientos de aguas continentales no salinas en China (Zhang *et al.*, 2011b).

Esto sugirió, que la población de Xochimilco podría corresponder con un dinotomo (*D. baltica*), puesto que la población del canal de “El Japón” también se situó cerca de *P. kevei*, que también es un dinotomo (Cuadro 1). Por lo tanto, en este proyecto nos referiremos a la población de estudio como *Durinskia baltica*.

Cuadro 1. Diferencias en la ecología y fórmula tecal de especies de dinotomos cercanos a *Durinskia baltica*

Especie	Fórmula tecal	Ambiente	Endosimbionte	Referencia
<i>Durinskia baltica</i> (Levander) Carty et Cox	Po, x, 4', 2a, 6'', 5c, 4s, 5''', 2''''.	Marino No salino	✓	Carty y Cox, 1986
<i>Durinskia occulata</i> (Stein) Gert Hansen et Flaim	Po, x, 4', 2a, 6'', 5c, ?s, 5''', 2''''o 1''''	No salino	?	Hansen y Flaim, 2007
<i>Durinskia capensis</i> Pienaar, Sakai et Horiguchi	Po, x, 4', 2a, 6'', 5c, 4s, 5''', 2''''	Marina	✓	Pienaar et al., 2007
<i>Durinskia agilis</i> (Kofoid et Swezy) Saburova, Chomérat et Hoppenrath	Po, x, 4', 2a, 70, 5c, 6s, 5''', 2''''.	Marina (arenícola)	✓	Saburova et al., 2012
<i>Galeidinium rugatum</i> Tamura et Horiguchi	Atecado	Marina	✓	Tamura et al., 2005
<i>Kryptoperidinium foliaceum</i> (F.Stein) Lindemann	3', 2a, 7'', 4c, ?s, 5''', 2''''	Marina	✓	Figuroa et al., 2009
<i>Peridiniopsis penardii</i> (Lemmermann) Bourelly	Po, x, 4', 0a, 6'', 5c (o t+4c), 5s, 5''', 2''''	No salino	✓	Zhang et al., 2011b
<i>Peridiniopsis kevei</i> Grigorszky et Vasas	Po, x, 3', 1a, 6'', 5c, ?s, 5''', 2''''	No salino	✓	Takano et al., 2008

En el contexto de la fisiología, esta especie comparte con el resto de las dinofitas una marcada escasez en estudios acerca de sus ciclos de vida, principalmente por la dificultad que representa establecer y mantener cultivos de laboratorio. Para algunos dinotomos el ciclo de vida se ha documentado (Figueroa et al., 2009; Tamura et al., 2005), pero los únicos estudios que describen de manera general sólo algunas etapas del ciclo de *Durinskia baltica* (considerada como *Peridinium balticum*) son los trabajos de Tippit y Pickett-Heaps (1976) en el cual se describió a la división mitótica de *P. balticum* mediante microscopía electrónica de transmisión y Chesnick y Cox (1987, 1989), quienes reportaron también para *P. balticum*, la reproducción sexual a partir de los gametos fusionados hasta la formación de un cigoto por medio de microscopía de luz y electrónica de transmisión.

### **Justificación**

De acuerdo con el estudio de Lira (2012), la determinación de la dinofita del canal de “El Japón” (*Durinskia baltica*) parece estar resuelta en un contexto morfológico, pero en un contexto ecológico hay varios aspectos que deben estudiarse más ampliamente:

1. En general, la ecología de *Durinskia baltica* está poco documentada en aguas continentales no salinas y no se reportan florecimientos en los sitios en que se ha registrado, como en charcos someros en Texas, USA, (Carty y Cox, 1986), reservorios eutróficos de Brasil (Cardoso et al., 2010) y reservorios de China (Zhang et al., 2011b); ahora se registra en estos humedales someros en México, en donde forma un florecimiento persistente (Tavera y Díez, 2009 (registrada como *Peridiniopsis oculatum*); Lira, 2012).

En el estudio de Lira (*op. cit.*), se reportó que factores ambientales particulares como el pH y nutrimentos, se correlacionan significativamente ( $p \leq 0.05$ ) tanto con las fluctuaciones en las densidades poblacionales, como con alguna de las fases reproductivas que se presentan en el florecimiento (estado vegetativo o como hipnocigoto) (Lira et al., 2017). Es por esto que lo relevante de estudiar el efecto que pueden tener los cambios extremos en los valores de pH (que, a su vez, representan los equilibrios en la reserva alcalina y la afectación por parte de procesos biológicos como la fotosíntesis y la respiración) y nutrimentos sobre la población de

*Durinskia baltica* en Xochimilco pues se ha observado que el pH ha sido uno de los factores que correlaciona positivamente con la abundancia de dinoflagelados (Yoo, 1991), por lo que consideramos que este factor contribuye a la regulación del florecimiento de *D. baltica* que estamos estudiando.

Los cambios en el pH pueden resultar en un gran número de efectos fisiológicos especie-específicos poco conocidos (Sunda *et al.*, 2005), por lo que los efectos que podamos documentar en este estudio serán aportaciones muy importantes a la biología no sólo de esta especie sino de las dinofitas de aguas continentales no salinas.

A partir de nuestros datos, aun cuando podemos intuir cómo y cuándo interactúa el pH, esta correlación no es suficiente para explicar los por qué, cómo y cuándo influye en el tránsito del organismo de una etapa a la otra, ni tampoco por qué se presenta como florecimiento sólo en el canal de “El Japón” y no en los canales que están conectados con dicho canal, por ejemplo “La Virgen” y “El Bordo”, así como la laguna de Tláhuac, en donde forma poblaciones de escasa densidad. Por esta razón, la documentación y análisis del ciclo de vida de esta especie en cultivo, nos ayudará a determinar si existe alguna relación entre las diferentes etapas de la población y las características ambientales del sitio.

2. En otro aspecto de su ecología, *D. baltica* tiene registros en ambientes salinos y de agua continental no salina, mesotróficos a hipertróficos. Es por esto de suma importancia complementar el estudio de la ecología de esta especie con la comparación de las secuencias genéticas entre poblaciones de diferentes ambientes (salobres y marinos), al igual que con otras especies del mismo género y de géneros cercanos, ya que este tipo de análisis permitirá definir si su identidad como especie, está vinculada al tipo de ambiente en donde se registre.

### **Preguntas de investigación**

1. ¿Las concentraciones de nitrógeno, fósforo, y pH (de las combinaciones propuestas), explicarían las variaciones en la densidad de las etapas vegetativa y de hipnocigoto de *Durinskia baltica* aislada del canal “El Japón” en Xochimilco?

2. ¿Por qué el crecimiento vegetativo máximo (primavera) no está precedido por una considerable germinación de hipnocigotos, como ocurre en otras especies que forman florecimientos?
3. Debido a las diferencias ecológicas descritas para las poblaciones de *Durinskia baltica* reportadas en diversos tipos de ambientes, ¿es posible que la población encontrada en Xochimilco pertenezca a alguna especie de *Durinskia* diferente a pesar de las semejanzas morfológicas?

## Hipótesis

1. *Durinskia baltica* se desarrollará más rápido y con mayor densidad con las concentraciones ambientales que predominan en el canal de “El Japón”, básicamente las que se reflejan en nutrientes y pH (es decir condiciones mesotróficas y condiciones de reserva alcalina asociada con pHs de 8.0), mostrando que podría formar florecimientos en otros sitios de Xochimilco aledaños, semejantes al canal “El Japón”.
2. El crecimiento vegetativo de *Durinskia baltica* está más relacionado con la variación de nutrientes que con la germinación de hipnocigotos; esta relación se confirmará mediante el establecimiento del ciclo de vida, en donde se espera observar el momento en que se producen los hipnocigotos y conocer su densidad, pudiendo correlacionar esta información con los datos obtenidos *in situ*.
3. Si en este estudio se confirma que la población de Xochimilco es *Durinskia baltica*, se espera que una comparación de secuencias parciales muestre afinidad genética con secuencias de *D. baltica* de otros sitios, independientemente de la procedencia ambiental de las otras poblaciones, confirmando su presencia en aguas continentales no salinas y la capacidad de esta especie para vivir dentro de una amplia gama de condiciones ambientales, además de su capacidad para formar florecimientos.

## Objetivo general

Analizar la variabilidad morfológica y genética de poblaciones clonales de *Durinskia baltica* en cultivo, así como las relaciones entre algunas variaciones ambientales (nitrógeno, fósforo y

pH) y las respuestas en las tasas de crecimiento y ciclo de vida, para definir si es efectivamente una población de esta especie y si las condiciones ambientales del canal de “El Japón” (Xochimilco) se relacionan con la producción del florecimiento observado.

### **Objetivos particulares**

- ❖ Caracterizar la composición hidroquímica del canal “El Japón” en Xochimilco y compararla entre diferentes muestreos.
- ❖ Describir y documentar el ciclo de vida de *Durinskia baltica* en condiciones de cultivo estandarizadas.
- ❖ Evaluar la relación entre los cambios en la tasa de crecimiento y la variabilidad morfológica de *Durinskia baltica* en condiciones de cultivos modificados.
- ❖ Evaluar la similitud entre las secuencias parciales del gen 18S rDNA para el hospedero y *rbcL* para el huésped, de la población de Xochimilco de *Durinskia baltica* y su endosimbionte, con las secuencias parciales de *D. baltica* y otras dinofitas-dinotomos, (obtenidas de las bases de datos) de otros sitios salobres, marinos y de aguas continentales no salinas.

### **Materiales y métodos**

#### **Área de estudio**

El área de estudio de la cual se aislaron las poblaciones de *Durinskia baltica* para los cultivos que se analizaron en este trabajo, es el canal conocido como “El Japón”, el cual se localiza en la región de Xochimilco, ubicada al sur de la Ciudad de México, con una altitud de 2240 m s.n.m. El clima es templado con la mayor precipitación y humedad durante el periodo de mayo a septiembre. Este sistema, se considera un ambiente de agua continental no salina, con base en el registro de salinidad promedio inferior al 2‰ (Leyva, 2010). El canal “El Japón” tiene una profundidad de 1.5 m y se encuentra en una zona de actividad agrícola y pecuaria intensiva; además, recibe agua municipal tratada para compensar la pérdida de volumen durante las sequías y descargas directas de aguas de desecho doméstico. Estas prácticas han resultado en

la prevalencia de un estado eutrófico a hipertrófico en el sistema (Lira *et al.*, 2017).

### **Caracterización ambiental general del canal “El Japón” (Xochimilco)**

Como apoyo complementario a las observaciones en cultivo, para resolver la pregunta acerca de las relaciones entre la presencia de *Durinskia baltica* y las variables ambientales, se caracterizó y comparó la composición hidroquímica del agua del sitio de estudio. Se realizaron 6 recolecciones mensuales en el canal “El Japón” en Xochimilco, durante el periodo de octubre de 2013 a mayo de 2014. Las muestras se recolectaron en botellas de plástico (de 1 L y 500 mL) previamente lavadas con HCL al 10 %, agua destilada y cubiertas con papel aluminio para evitar el paso de la luz.

Se recolectó 1 L de agua superficial sin filtrar para la determinación de la alcalinidad, conductividad, Cl<sup>-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Por otra parte, se recolectaron 500 mL de agua superficial a la cual se le agregó la cantidad suficiente de HNO<sub>3</sub> concentrado para disminuir el pH a valores entre 2 y 3, para los análisis de cationes. Ambas botellas fueron mantenidas en obscuridad y refrigeradas inmediatamente después del muestreo.

Los análisis químicos se realizaron en el Laboratorio de Química Acuática del Instituto de Geofísica, UNAM mediante métodos secos siguiendo los procedimientos descritos en APHA (2005) para aguas continentales superficiales. La alcalinidad total fue medida por titulación ácida a pH de 4.6, usando como indicador una mezcla de rojo de metilo y verde de bromocresol; la concentración de bicarbonatos se calculó a partir de la alcalinidad. Los sulfatos se determinaron por medio de turbidimetría.

Las concentraciones de calcio y magnesio se obtuvieron por medio de titulación complexiométrica con EDTA. El cloruro se determinó potenciométricamente con un electrodo selectivo de iones adicionando una solución 5M de NaNO<sub>3</sub>, utilizada como un ajustador de fuerza iónica. El sodio y potasio se midieron con espectroscopía de emisión atómica. La calidad analítica se revisó mediante el balance iónico (con un error de ±5 %), (Armienta *et al.*, 2008).

La información obtenida de los análisis de las 6 recolecciones se promedió para generar un diagrama iónico de Maucha (Maucha, 1932), mediante el cual se analizaron las

concentraciones relativas de los aniones y cationes mayores para determinar el carácter químico general del agua del canal de Japón (Güler *et al.*, 2002).

## **Fase experimental 1. Relación entre la tasa de crecimiento en condiciones de cultivo estandarizadas y el ciclo de vida de *Durinskia baltica***

### **Objetivos**

- a) Determinar la tasa de crecimiento de *Durinskia baltica*.
- b) Describir el ciclo de vida de *Durinskia baltica*.

### **Tasa de crecimiento**

Se calculó la tasa de crecimiento de *Durinskia baltica* a partir de poblaciones clonales de cultivo mantenidas en condiciones estándar de temperatura, irradiancia y fotoperiodo. Se utilizó el medio de cultivo comercial L1 ajustado a pH 8.0. Las concentraciones de nitrógeno, fósforo y pH que presenta el medio L1, correspondieron con las condiciones calificadas como mesotróficas del canal de Japón en Xochimilco.

Se inocularon 3 lotes (correspondientes con 3 réplicas) de 12 tubos cada uno con 20 m L del medio de cultivo estéril L1 (Guillard y Hargraves, 1993) con aproximadamente  $1 \times 10^3 \text{cél.m L}^{-1}$  obtenidas a partir de una población clonal de *Durinskia baltica*, aislada de muestras ambientales del canal “EL Japón”. Cada lote fue colocado dentro de una cámara Sanyo™ con control de temperatura e iluminación, ajustada a 20°C con un ciclo de luz-obscuridad de 12:12 y una iluminación de  $30 \mu\text{M m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , correspondiente con la máxima registrada en el sitio de aislamiento.

Después de una semana de aclimatación del cultivo, se inició la recolección de sub muestras para el análisis. El tiempo de aclimatación se determinó con base en conteos previos al establecimiento del diseño experimental, llevados a cabo sobre los primeros cultivos obtenidos, durante el periodo comprendido entre el 5 y el 15 de noviembre de 2012 (figura 2), tomando como criterio el tiempo en el que el cultivo duplicó el número de células.

Las poblaciones del cultivo se censaron por triplicado cada dos días durante 30 días, manteniendo a los cultivos en forma de lote (batch), (Spector, 1984; Morales y De Velotti, 1990; Rodríguez-Palacio, 2006), abarcando el periodo comprendido entre el 21 de octubre y

13 de noviembre de 2013 (figura 3). El censo se realizó por conteo directo de 1 m L de cultivo preservado con lugol mediante una cámara de conteo Sedgewick-Rafter.

Para el monitoreo del estado de la población y registro de la variación morfológica, se montaron preparaciones fijas (por triplicado) con gelatina glicerinada (González y Novelo, 1986) para realizar observaciones con microscopio fotónico (Nikon Eclipse 80i); asimismo, se registró el valor de pH (potenciómetro, Orion versastar®) para medir posibles cambios con respecto al ajuste inicial.

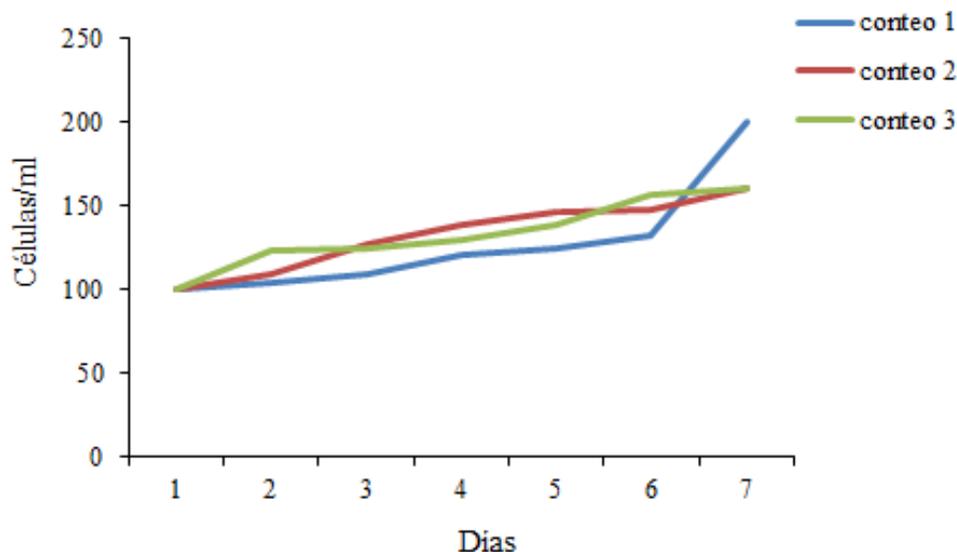


Figura 2. Cambio en el número de células para definir el tiempo de aclimatación del cultivo. Datos obtenidos experimentalmente en los cultivos de *D. baltica* de Xochimilco del 5-15 de noviembre de 2012.

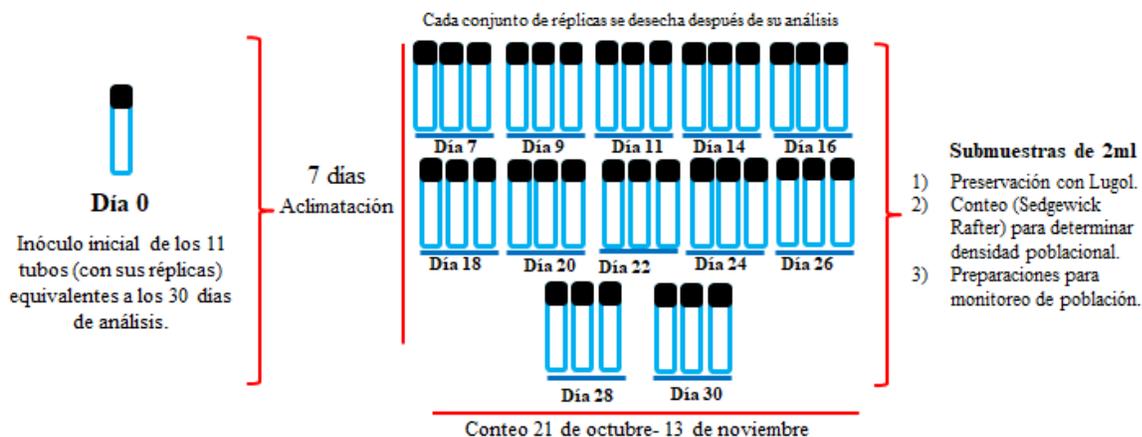


Figura 3. Diagrama de diseño experimental de fase experimental 1 (21 de octubre- 13 de noviembre de 2013).

Con los datos obtenidos del número de células a lo largo del tiempo, se determinó la velocidad o tasa de crecimiento ( $r$ ), según la siguiente ecuación diferencial modificada de Guillard, (1973) en Wood *et al.*, (2005):

$$dN/dt = Rn$$

Arreglando la ecuación tenemos:

$$* r = \frac{\ln (N_t/N_0)}{\Delta t}$$

\*\* $N_0$ = tamaño de la población al inicio del intervalo;  $N_t$  = tamaño de la población al final del intervalo evaluado ( $t_i$ );  $\mu$  ( $r$ ) = velocidad o tasa de crecimiento;  $\Delta t$  = tiempo transcurrido.

Para obtener el número de duplicaciones del cultivo por día ( $k$ ), se dividió el valor de la tasa de crecimiento ( $r$ ), entre el ln de 2, siguiendo la siguiente ecuación:

$$k = r / 0.6931*$$

\* El valor constante 0.6931 es el resultado del ln (2).

Para calcular el tiempo de duplicación de la población ( $T_2$ ), expresado en las mismas unidades que  $r$ , se utilizó la siguiente ecuación:

$$T_2 = 0.6931*/ r$$

\* El valor constante 0.6931 es el resultado del ln (2).

En la figura 4 se muestra un ejemplo tomado de Wood *et al* (2005), de cómo se organizaron y analizaron los datos registrados de número de células usando las ecuaciones mencionadas.

Curva de crecimiento de *Cyclotella cryptica* (modificado de Guillard, 1973).

Day	0	1	2	3	4	5	6	7
Cell number	1.25	2.14	4.62	11.8	20.5	33.8	35.7	35.3

Cell number =  $n \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ .

Tasa de crecimiento ( $r$ ), duplicaciones por día ( $k$ ) y tiempo de duplicación de la población ( $T_2$ ) usando los datos de número de células de *Cyclotella cryptica* con las ecuaciones mencionadas en el texto

Time interval (days)	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	1-7	1-4
$N_2/N_1$	2.14/1.25	4.62/2.14	11.8/4.62	20.5/11.8	33.8/20.5	35.7/33.8	35.3/35.7	35.3/2.14	20.5/2.14
$\ln(N_2/N_1)$	1.71	2.16	2.55	1.74	1.65	1.06	0.99	16.5	9.58
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	1	1	1	1	1	1	1	6	3
$r$	0.54	0.77	0.94	0.55	0.5	0.05	-0.01	0.47	0.75
$k$	0.78	1.11	1.35	0.8	0.72	0.08	-0.01	0.67	1.09
$T_2$	1.28	0.9	0.74	1.26	1.39	13.86	—	1.49	0.92

Figura 4. Valores de  $r$ ,  $k$  y  $T_2$  calculados a partir de los valores de número de células de *Cyclotella cryptica* usando las ecuaciones descritas en el texto.

## Ciclo de vida

Para realizar una descripción detallada y completa del ciclo de vida (división asexual y fusión sexual) de *Durinskia baltica*, se realizaron aislamientos a partir de los tubos del cultivo en condiciones estándar de células individuales ( $ca. 1 \times 10^2 \text{ cél.m L}^{-1}$ ). Las células fueron lavadas en gotas de medio L1 fresco, para después ser depositadas en portaobjetos equipados con separadores de silicón (Sigma-Aldrich®), para sellar la muestra, estas preparaciones semipermanentes se realizaron por triplicado y fueron mantenidas durante 30 días en una cámara Sanyo™ con control de temperatura e iluminación, ajustada a 20 °C con un ciclo de luz-obscuridad de 12:12 con una iluminación de  $30 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Cada preparación fue revisada diariamente dos veces al día durante los 30 días en los que se mantuvo el análisis. El seguimiento de las diferentes etapas del ciclo de vida presentes en las preparaciones se realizó por medio de secuencias fotográficas de los procesos observados con sus respectivas mediciones, utilizando un microscopio fotónico provisto de cámara digital (Coolpix S10 VR®) con los objetivos de 40x y 100x (Nikon Optiphot -2®).

Para observar los procesos ocurridos dentro del dinocarion y el núcleo endosimbionte, durante las diferentes etapas del ciclo de vida, se realizaron tinciones de submuestras de 1 mL del cultivo en condiciones estandarizadas de *Durinskia baltica* con los fluorocromos DAPI (500 ng mL<sup>-1</sup>) y Syber green (1:100). Cada fluorocromo fue aplicado por separado de manera directa, las submuestras teñidas se colocaron en condiciones de oscuridad y refrigeración durante 12 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, se realizaron preparaciones frescas para ser observadas con un microscopio de epifluorescencia (Nikon Optiphot -2™) equipado con filtros de 350 nm<sub>ex</sub> y 480 nm<sub>em</sub> para el DAPI (Litaker *et al.*, 2002) y 380 nm<sub>ex</sub> y 497 nm<sub>em</sub> para el Syber green (Figueroa *et al.*, 2006b).

## **Fase experimental 2. Variaciones en la morfología y tasas de crecimiento de *Durinskia baltica* en diferentes condiciones de cultivo**

### **Objetivos**

- a) Obtener la relación entre el crecimiento de *Durinskia baltica* y las variables nitrógeno, fósforo y pH en tres condiciones tróficas diferentes.
- b) Describir la variación morfológica de las poblaciones en los diferentes tratamientos.

Los antecedentes en los que se sustentó este diseño experimental son:

- a) Los registros *in situ* (canal de “El Japón” en Xochimilco de Lira, 2012) de valores de pH y nutrimentos (nitrógeno y fósforo) durante 18 muestreos en un año.
- b) La correlación estadística de estos parámetros con la variación poblacional de la especie (análisis de componentes principales categórico) reportado en Lira (2012).

Se probó el efecto de un gradiente de pH de 7-10 para observar de qué manera intervine esta variable sobre la densidad de células vegetativas en cultivo. La modificación del pH se realizó mediante la administración de alícuotas de NaOH 1 M o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.

Los diferentes tratamientos de pH se probaron por triplicado sobre 3 categorías tróficas correspondientes con mesotrófica, eutrófica e hipertrófica, las cuales se registraron en el canal de “El Japón” en Xochimilco de forma variable a lo largo del año (Lira *et al.*, 2017). Las

concentraciones de nitrógeno y fósforo del medio de cultivo L1, fueron modificadas dependiendo de la condición trófica que se probó (Cuadro 2).

Cada tratamiento de pH, en cada categoría trófica, fue inoculado con *ca.*  $1 \times 10^3$  cél m L<sup>-1</sup> en 20 ml de medio de cultivo L1 modificado. Así mismo, todos los tratamientos fueron mantenidos bajo condiciones constantes de temperatura a 20 °C, irradianza de 30  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un ciclo de luz-obscuridad de 12:12.

Cada categoría trófica, se analizó de manera individual durante 30 días. En la categoría mesotrófica el periodo de aclimatación de cultivo comprendió del 13-19 de enero y el periodo de conteo fue del 20 de enero al 12 de febrero de 2014. El periodo de aclimatación de la categoría eutrófica fue del 13-19 de octubre y su conteo del 20 de octubre al 12 de noviembre. La categoría hipertrófica tuvo un periodo de aclimatación del 21-27 de abril y un periodo de conteo del 28 de abril al 2 de mayo del 2014.

Cuadro 2. Intervalos que definen las categorías de trofismo reportadas en la literatura comparadas con las concentraciones que se proponen en el proyecto, incluyendo las que contiene el medio comercial

L1 (NID, P<sub>tot</sub> y medio L1 en mg L<sup>-1</sup>)

Categoría	NID intervalo registrado en Xochimilco 2010-2011 (mg L <sup>-1</sup> )	P <sub>tot</sub> intervalo registrado en Xochimilco 2010-2011 (mg L <sup>-1</sup> )	Nitrato y fosfato ajustados a medio de cultivo (mg L <sup>-1</sup> )		OECD P <sub>tot</sub> *	OECD NID*
			NaNO <sub>3</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·4 H <sub>2</sub> O		
Mesotrófica	0.40-0.71	0.06-0.37	0.75	0.05	0.01-0.10	0.36-1.39
Eutrófica	0.88-1.66	0.46-0.87	1.50	0.10	0.20-0.39	0.39-6.10
Hipertrófica	1.95-6.09	1.05-5.29	2.25	1.50	0.75-1.20	>6.10

\*Intervalos propuestos por la Organización para la cooperación y el desarrollo económico (OECD siglas en inglés) reportado en  $\text{mg l}^{-1}$  por Geider *et al.*, 1998.

Después del periodo de aclimatación (7 días), se realizó el censo de la población por triplicado mediante el conteo directo de 1 ml de una sub muestra de 2 m L (equivalente a 10 % del volumen total del cultivo), con una cámara Sedgewick-Rafter cada dos o tres días durante 30 días, restaurando el volumen retirado con el mismo volumen de medio fresco estéril, lo que permitió mantener constante el pH y restaurar los nutrimentos.

Este procedimiento distingue a los cultivos de esta fase experimental como cultivos semi-continuos. A la par se realizaron preparaciones permanentes y frescas mediante las cuales se realizó la documentación fotográfica de las diferentes etapas del ciclo de vida, así como de la variabilidad morfológica presente en la población de cada tratamiento (figura 5).

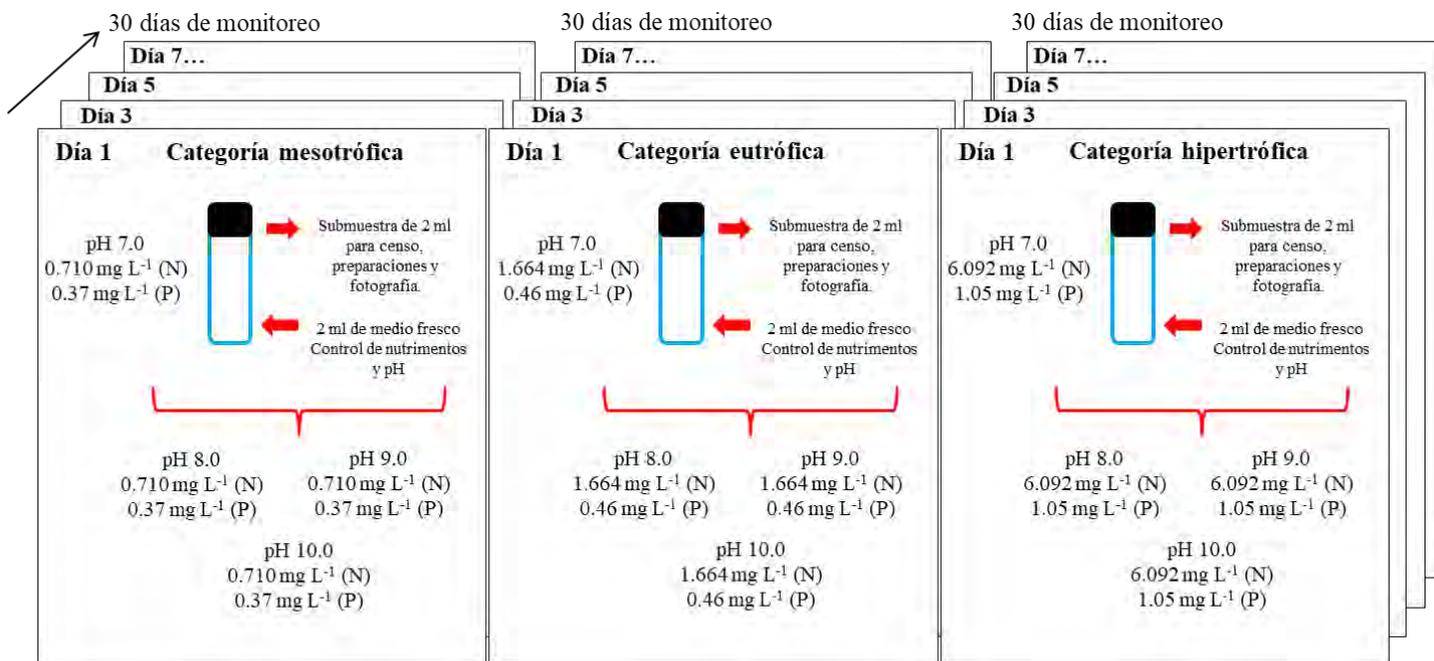


Figura 5. Representación esquemática del método utilizado en la fase experimental 2 (enero-mayo; octubre-noviembre, 2014).

### Análisis estadísticos

Los valores de densidad celular obtenidos de las curvas de crecimiento fueron sometidos a un análisis paramétrico de varianza (ANOVA) de un factor (pH), con la finalidad de saber si existieron diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de crecimiento de los diferentes tratamientos. Así mismo, se realizó un análisis de t-student, para comparar individualmente las diferencias entre conteos de la curva de crecimiento estándar (del cultivo sin modificar) y la de cada tratamiento.

### **Fase experimental 3. Evaluación de la similitud entre las secuencias parciales de los genes 18S y *rbcL* de la población de *Durinskia baltica* de Xochimilco con secuencias de otros ambientes**

#### **Objetivos**

- a) Realizar la extracción de DNA a partir de muestras del cultivo en condiciones estandarizadas.
- b) Realizar la amplificación, purificación y secuenciación del DNA extraído.
- c) Realizar análisis filogenéticos del hospedero (gen 18S) y huésped (gen *rbcL*) de *D. baltica* comparándolos con especies cercanas.

#### **Extracción de DNA**

La extracción del DNA de *Durinskia baltica*, se realizó a partir de una muestra de cultivo clonal en condiciones estandarizadas experimentales, mediante el kit de extracción “Power Biofilm DNA isolation kit” (MoBio Laboratories ®). La preparación de la muestra para extracción consistió en concentrar una muestra de cultivo de 2 ml mediante su centrifugación (HSiangtai®) a 13,000 r.p.m. durante 5 minutos hasta obtener un botón celular (pellet) de 213 mg.

Posteriormente, se realizó un pretratamiento de choque térmico mediante una secuencia de congelación con nitrógeno líquido, seguida de descongelación en baño seco a 65 °C (Accublock®); este proceso se realizó 5 veces. Después del pretratamiento, el botón celular se procesó siguiendo los protocolos indicados por el fabricante del kit de extracción.

#### **Cuantificación de DNA**

Para la cuantificación del DNA extraído, se leyó una alícuota de 2 µ L del DNA extraído en el fluorómetro Qubit® calibrado para comprobar la fluorescencia del DNA. Paralelamente, se realizó un gel de agarosa al 1%, disolviendo 0.50 g de agarosa (AMRESCO®) en 50 m L de

buffer TBE 1x; cuando la disolución alcanzó 50 °C, se agregaron 5 µ L del fluorocromo Sybr Safe DNA stain (10 µg µ L<sup>-1</sup>) para teñir el gel.

En el gel de agarosa se cargaron 3 µ L de muestra de DNA extraído y 1 µ L de marcador molecular de alto peso (Trackit 100bp DNA Ladder INVITROGEN®), combinados con 1 µL de buffer de carga (Blue juice loading buffer INVITROGEN®) para tener una referencia del tamaño del fragmento de DNA extraído. La muestra se corrió a 60 volts durante 45 minutos y la corrida de las bandas se fotografió con el transluminador (BIORAD Molecular Imager Chemidoc® XRS) equipado con una cámara fotográfica.

## **Reacción de PCR**

Para la amplificación del DNA extraído, se realizaron los cálculos de los componentes de la reacción para un volumen final de 25 µ L. Las reacciones se llevaron a cabo por duplicado con un control negativo (agua ultra pura), siguiendo las instrucciones y reactivos del protocolo proporcionado con la enzima HotStar Taq Plus (QIAGEN®). Se utilizó un template de DNA con una concentración de 20 ng µ L<sup>-1</sup> y los oligonucleótidos específicos Dba1F y Dba1R (10 µM), así como los oligonucleótidos generales EUKA y EUKB (10 µM), para la amplificación del marcador nuclear 18S del hospedero de *Durinskia baltica*. Estos oligonucleótidos se diseñaron con el programa Primer3® a partir de las secuencias reportadas en Tavera y Díez (2009) y en Díez *et al.* (2001), (Tabla 6).

Para la amplificación del DNA el huésped se utilizaron los oligonucleótidos específicos DiatrbcL2F y DiatrbcL5R de acuerdo con lo sugerido por Tamura *et al.*, 2005, (Cuadro 3). Para ambas amplificaciones, se trabajó con una mezcla guía o master mix (Mmix) para la cual se tomó en cuenta el volumen de 3 reacciones (la reacción por duplicado más un blanco) (Cuadro 4).

Cuadro 3. Oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes 18S rDNA y *rbcL* de *D. baltica*

Gen	Oligonucleótido	Tamaño esperado	Secuencia
18S	DbalF	600 pb	5'-AACCTGGTTGATCCYGCCAG-3'
18S	DbalR	600 pb	5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'
18S	EUKA	1800 pb	5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'
18S	EUKB	1800 pb	5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'
<i>rbcL</i>	DiatrbcL2F	1200 pb	5'-ACAGTAAAACCWAAATTAGG-3'
<i>rbcL</i>	DiatrbcL5R	1200 pb	5'-ATTTGACCACAGTGGATACC-3'

Cuadro 4. Componentes de la mezcla (master mix "Mmix") utilizada para la reacción de PCR

Componentes	Mmix
Buffer 10X	5 µL
dNTPs	1 µL
MgCl <sub>2</sub>	1.5 µL
Primer Fwd	0.5 µL
Primer Rvs	0.5 µL

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en el termociclador (Maxygene Therm-100®), utilizando las siguientes condiciones de temperatura: para el gen 18S, temperatura inicial de 94 °C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto; 60 °C, 1 minuto; 72 °C, 1 minuto y 72 °C, 5 minutos para terminar con 4 °C ∞. Para el gen *rbcL*, temperatura inicial de 94 °C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de 94 °C por 1 minuto; 50 °C, 1 minuto; 72 °C, 1 minuto, 72 °C, 5 minutos y 4 °C ∞.

### Purificación de productos de PCR y secuenciación

Para la purificación de los productos de PCR de las reacciones con los genes 18S y *rbcL*, se utilizó el volumen total del producto de dos reacciones de PCR (50 µ L), siguiendo el protocolo proporcionado en el kit de purificación GenElute™ PCR Clean- up Kit (Sigma-Aldrich®). De la purificación se recuperó un volumen final de 50 µ L de los cuales se utilizaron 2 µ L para su cuantificación por fluorometría (mismo procedimiento descrito anteriormente). La secuenciación del hospedero y huésped se llevó a cabo a partir de un volumen de 30 µ L de

producto de PCR y una concentración de los primers DiatrbcL5R y EUKA de 4 pM los cuales fueron enviados al servicio de secuenciación de la empresa Macrogen®, Seúl, Korea.

### **Análisis de secuencias**

Las secuencias obtenidas del hospedero y del huésped se limpiaron y corrigieron en las dos direcciones generadas; así mismo, se cortaron en los extremos terminales en donde las curvas del cromatograma perdieron definición. La edición se llevó a cabo con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). La secuencia editada del hospedero que se utilizó para el alineamiento tuvo un tamaño final de 588 pb; la secuencia editada del huésped tuvo un tamaño final de 658 pb. Con estas secuencias se realizó una prueba de similitud por medio del algoritmo de Blast (NCBI).

Las secuencias del hospedero se alinearon empleando el algoritmo de CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1997) y se compararon con 31 secuencias nucleares ya existentes en la base de datos GenBank de especies de dinotomos, dinofitas de agua continental no salina y marina del mismo tamaño, además de secuencias de *Durinskia baltica* y *Perdinium balticum* (agua continental no salina y marina), (Cuadro 5). Las secuencias del huésped se alinearon con el mismo método antes descrito y se compararon con 21 secuencias nucleares parciales del gen *rbcL* de diatomeas y dinotomos disponibles en la base de datos del GenBank (Cuadro 6).

Para ambas secuencias, del hospedero y del huésped, se calcularon los intervalos de los valores de divergencia nucleotídica por medio de los valores de distancia corregida (comparación de secuencias a partir de un modelo de evolución), a nivel interespecífico e intergenérico con el programa MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Para calcular esta distancia, se calcularon los modelos evolutivos que mejor se ajustaran a las secuencias de hospedero y huésped mediante el programa Topali v2.5 (Milne *et al.*, 2004). Para el hospedero se utilizó el modelo Kimura de dos parámetros (Kimura, 1980) y para el huésped el modelo general de tiempo reversible (GTR+G). Estos modelos se utilizaron para el resto de los análisis filogenéticos. Los resultados de distancia se expresaron como porcentaje de divergencia.

Cuadro 5. Especies de dinofitas utilizadas para el análisis filogenético del marcador nuclear 18S

Dinotomos	Dinofitas de agua dulce	Dinofitas marinas
<i>Durinskia agilis</i> _JF514516	<i>Peridiniopsis borgei</i> _EF058241	<i>Akashiwo sanguinea</i> _KP976596
<i>Durinskia baltica</i> China_GU999528	<i>Peridinium polonicum</i> _AY443017	<i>Amphidinium herdmannii</i> _AF274253
<i>Durinskia baltica</i> Mex	<i>Peridinium gatunense</i> _DQ166208	<i>Gymnodinium catenatum</i> _GU362426
<i>Durinskia capensis</i> _AB271107	<i>Peridinium inconspicuum</i> _EF05827	<i>Heterocapsa niei</i> _KU900227
<i>Durinskia cf. baltica</i> _LC054926	<i>Peridinium umbonatum</i> _GU001637	<i>Heterocapsa rotundata</i> _AF274267
<i>Galeidinium rugatum</i> _AB195668	<i>Peridinium volzii</i> _EF058248	<i>Karenia brevis</i> _FJ587219
<i>Kryptoperidinium foliaceum</i> _EF492508	<i>Peridinium willei</i> _EF058250	<i>Karenia mikimotoi</i> _FJ587220
<i>Peridiniopsis cf. kevei</i> _AB353770		<i>Karlodinium micrum</i> _JF791096
<i>Peridiniopsis penardii</i> _HM596543		<i>Prorocentrum micans</i> _EF492511
<i>Peridinium balticum</i> _AF231803		<i>Perkinsus marinus</i> _AF324218
<i>Peridinium quinquecorne</i> _AB246744		<i>Prorocentrum triestinum</i> _AB183673
		<i>Scrippsiella sweeneyae</i> _AF274276
		<i>Scrippsiella trochoidea</i> _KR535602

Cuadro 6. Especies de diatomeas y dinofitas utilizadas para el análisis filogenético del marcador nuclear *rbcL*

Secuencia de <i>rbcL</i> de diatomeas	Secuencia de <i>rbcL</i> de dinotomos
<i>Rhizosolenia setigera</i> _AF015568	<i>Peridiniopsis penardii</i> _AB353775
<i>Chaetoceros gracilis</i> _AY604697	<i>Peridiniopsis cf. kevei</i> _AB353774
<i>Chaetoceros muellerii</i> _HQ912422	<i>Peridinium balticum</i> _AB195670
<i>Odontella sinensis</i> _KC309577	<i>Galeidinium rugatum</i> _AB195669
<i>Skeletonema costatum</i> _JN159931	<i>Peridinium quinquecorne</i> _AB246745
<i>Thalassiosira eccentrica</i> _DQ514789	<i>Kryptoperidinium foliaceum</i> _GU591328
<i>Pseudonitzschia multiseriis</i> _KC801040	Endosimbionte de <i>Durinskia baltica</i>
<i>Bacillaria paxillifer</i> _HQ912491	
<i>Nitzschia longissima</i> _AY881967	
<i>Cylindrotheca closterium</i> _DQ143047	
<i>Bolidomonas pacifica</i> _KR998416	
<i>Nitzschia palea</i> _KC736611	
<i>Cyclotella sp</i> _HQ912489	
<i>Discostella sp</i> _DQ514830	
<i>Nitzschia capitellata</i> _FN557031	

## **Análisis de vecinos cercanos (Neighbor-Joining)**

Se realizó un análisis con el método de vecinos cercanos (Neighbor-Joining) para los genes 18S y *rbcL*. Con este análisis fue posible inferir el grado de similitud entre las diferentes secuencias de ambos genes, mediante la unión de las dos secuencias vecinas que tuvieron la menor distancia genética. Posteriormente, este par inicial se consideró como una sola entidad, y se buscó al siguiente terminal con el cual tuviera la menor distancia genética. El procedimiento continuó hasta unir todos los terminales al “árbol filogenético” (Peña, 2011).

La filogenia molecular de *Durinskia baltica* para los genes 18S y *rbcL*, fue inferida mediante el método de vecinos cercanos con ayuda del programa Topali v2.5 (Milne *et al.*, 2004). Las distancias evolutivas (inferidas a partir de los filotipos) están en las unidades del número de sustituciones por sitio. La tasa de variación entre sitios fue modelada con una distribución gamma. Todas las posiciones que presentaron espacios (gaps) e información faltante, fueron eliminadas conservando 437 posiciones en la base de datos final para el 18S y 494 posiciones para el *rbcL*. Se evaluó la estabilidad de las ramas internas en los cladogramas mediante el análisis de bootstrap (Felsenstein, 1985).

## **Análisis de Parsimonia**

Para elegir el árbol filogenético que explique mejor la filogenia de un grupo con el menor número de cambios evolutivos, se realizó un análisis de parsimonia para el hospedero y huésped, a partir de una búsqueda heurística, con ayuda del programa WinClada v.1.00.08 (Nixon, 1999-2002). Se utilizó el algoritmo de búsqueda heurística de tree-bisection-reconnection múltiple (TBR + TBR “MultiMax”), los modelos evolutivos antes descritos para hospedero y huésped, así como, un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones; los valores obtenidos en este análisis correspondieron con una medida conservativa de la probabilidad de que los grupos recuperados representan clados verdaderos (Zharkikh y Li, 1992). Los árboles se enraizaron por comparación con los grupos externos *Perkinsus marinus* en el caso del hospedero (gen 18S) y *Bolidomonas pacifcia* para el caso del huésped (*rbcL*). Los grupos externos fueron seleccionados teniendo en cuenta la distancia filogenética con la secuencia de *D. baltica* de Xochimilco y lo reportado en la literatura (Zhang *et al.*, Tamura *et al.*, 2005).

Por otra parte, se calcularon los índices de consistencia (IC) y de retención (IR) como resultado

del análisis de máxima parsimonia (MP) con ayuda del programa PAUP v.4.0 (Swofford, 2016).

### **Análisis de máxima verosimilitud**

Para estimar la probabilidad de que tan bien la matriz de caracteres (secuencias) es explicada por medio de los árboles filogenéticos (Felsenstein, 2004), se realizó un análisis de máxima verosimilitud para las secuencias del hospedero y huésped. Los modelos de sustitución utilizados para las secuencias de ambos genes se eligieron con base en los valores de los estimadores BIC (criterio de información Bayesiana) y del AIC (criterio de información de Akaike) a partir de las 32 secuencias del gen 18S y 22 del gen *rbcL* y correspondieron con los modelos descritos anteriormente. Los análisis de ambos genes se realizaron con el programa Topali v2.5 (Milne *et al.*, 2004) utilizando el algoritmo de búsqueda heurística de tree-bisection-reconnection (TBR) y 100 repeticiones del método de bootstrap.

### **Análisis de inferencia Bayesiana**

Para estimar la probabilidad de que tan bien los árboles filogenéticos son explicados por la matriz de caracteres (secuencias) (Brooks *et al.*, 2007), se estimó la filogenia del hospedero y del huésped de *Durinskia baltica* mediante un análisis de inferencia Bayesiana. Ambos análisis se realizaron con ayuda del programa Topali v2.5 (Milne *et al.*, 2004) con los modelos evolutivos antes descritos.

Ambos análisis se corrieron con 4 cadenas de Monte Carlo-Markov (MCMC), (tres cadenas calientes y una fría) para 30, 000,000 de generaciones y los árboles fueron muestreados cada 100 generaciones. Los primeros 7.5 millones de árboles fueron descartados como “burn-in” (25 %) y los árboles restantes fueron usados para construir el árbol de consenso e inferir las probabilidades posteriores bayesianas.

## Resultados

### Características ambientales generales del canal del “El Japón”

En el cuadro 7 se muestran los valores máximos, mínimos, promedio (Media), desviación estándar (ds) y coeficiente de variación (CV%) de los análisis de iones mayores obtenidos de los muestreos realizados en el canal Japón durante el periodo de octubre de 2013 a mayo de 2014. En el cuadro 8 se muestran los resultados, en meq. L<sup>-1</sup>, de iones mayores y alcalinidad obtenidos del canal Japón en el periodo de octubre de 2013 a mayo de 2014.

Cuadro 7. Valores máximos, mínimos y coeficiente de variación de iones mayores en mg l<sup>-1</sup> registrados para el canal “El Japón” durante el periodo de octubre de 2013 a mayo de 2014

Ion	Máximo (mg l <sup>-1</sup> )	Mínimo (mg l <sup>-1</sup> )	Media	± ds	CV%
CO <sub>3</sub> <sup>=</sup>	14	0	7	10	82%
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	411	245	328	118	20%
Cl <sup>-</sup>	103	72	87	22	13%
SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	172	68	120	74	39%
Ca <sup>2+</sup>	49	29	39	14	23%
Mg <sup>2+</sup>	60	24	42	26	40%
Na <sup>+</sup>	139	90	115	35	17%
K <sup>+</sup>	21	12	17	7	18%

Cuadro 8. Resultados en meq. l<sup>-1</sup> de iones mayores y alcalinidad obtenidos del canal Japón en el periodo de octubre de 2013 a mayo de 2014

Mes de colecta	pH <i>in situ</i>	ALKT (CaCO <sub>3</sub> )	CO <sub>3</sub> <sup>=</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
oct-13	7.1	7	0	7	3	4	3	5	6	0
dic-13	7.1	6	0	6	3	3	2	4	5	0
ene-14	7.5	4	1	4	2	2	2	2	4	0
feb-14	7.0	5	0	5	2	2	2	2	4	0
mar-14	7.3	4	0	5	2	2	2	2	4	0
abr-14	6.9	5	0	5	2	1	2	2	4	0

Con los valores de aniones y cationes obtenidos, se realizó un promedio mediante el cual se generó un diagrama de Maucha (figura 6). En el diagrama de Maucha se observó que, en los muestreos de octubre de 2013 a mayo de 2014, el agua del canal de Japón en Xochimilco presenta la siguiente proporción HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>(+CO<sub>3</sub><sup>=</sup>) > Cl<sup>-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>=</sup>, Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup> > Mg<sup>++</sup> > Ca<sup>++</sup>, lo cual corresponde con aguas continentales no salinas de mineralización intermedia de naturaleza

alcalino-sódica. En el anexo 1 se muestran los resultados de los análisis de iones mayores y alcalinidad en  $\text{mg. l}^{-1}$ , así como los valores máximos, mínimos y el coeficiente de variación.

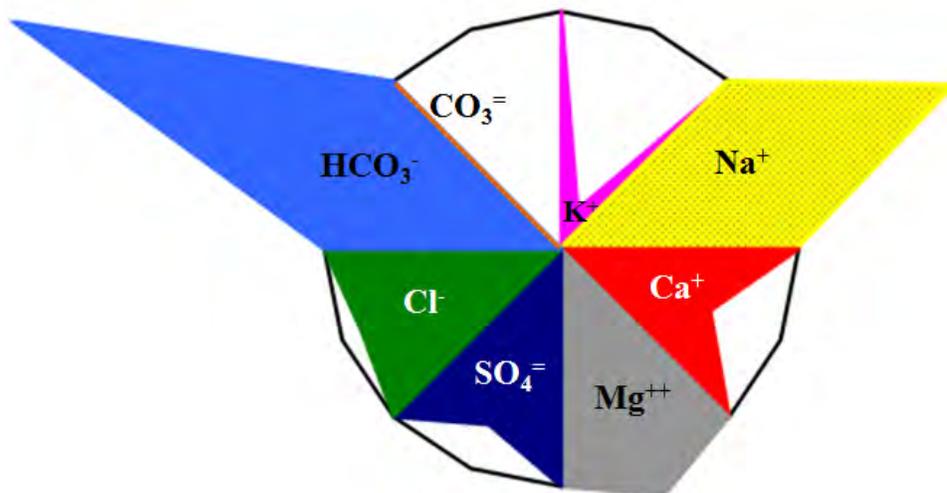


Figura 6. Diagrama de Maucha del promedio de las recolecciones de octubre de 2013 a mayo de 2014 del canal de “El Japón” en Xochimilco. Dominancia iónica (% sobre  $\text{meq. l}^{-1}$ ):  $\text{HCO}_3^- (+\text{CO}_3^{=}) > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{=} > \text{Na}^+ > \text{Mg}^{++} > \text{Ca}^{++}$ . Concentración iónica total:  $0.984 \text{ meq. l}^{-1}$ ;  $\pm 0.03 \text{ d.s.}$ , K25:  $906 \mu\text{Scm}^{-1}$   $\pm 155 \text{ d.s.}$

### Fase experimental 1. Relación entre la tasa de crecimiento en condiciones de cultivo estandarizadas y el ciclo de vida de *Durinskia baltica*

Los resultados de los conteos de células cada dos o tres días durante 30 días, mostraron que la población de *Durinskia baltica* en cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento a los 25 días, con valores de  $r = 0.616$ ;  $k = 0.89$  y  $T2 = 1$ ; así mismo, se observó que la población alcanzó la fase estacionaria entre los 26-28 días, y posteriormente comenzó a decaer el número de células (Cuadro 9, figura 7).

Cuadro 9. Tasa de crecimiento ( $r$ ), número de divisiones por día ( $k$ ) y tiempo de duplicación de la población ( $T_2$ ), obtenidos a partir de los valores de densidad registrados durante la fase experimental I

Tiempo (días)	0-7	7-9	9-11	11-14	14-16	16-18	18-21	21-23	23-25	25-28	28-30
N2/N0	49/40	60/49	179/60	333/179	621/333	748/621	1136/748	1271/1136	4353/1271	4493/4353	4314/4493
	1.23	1.22	2.98	1.87	1.86	1.21	1.52	1.12	3.43	1.03	0.96
LN(N2/N0)	0.20	0.20	1.09	0.62	0.62	0.19	0.42	0.11	1.23	0.03	-0.04
$\Delta t$ (t2-t1)	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$r$	0.03	0.10	0.55	0.21	0.31	0.09	0.14	0.06	0.62	0.01	-0.02
$k$	0.04	0.15	0.79	0.30	0.45	0.13	0.20	0.08	0.89	0.02	-0.03
$T_2$	23.91	6.84	1.27	3.33	2.23	7.43	4.97	12.41	1.13	65.53	-34.10

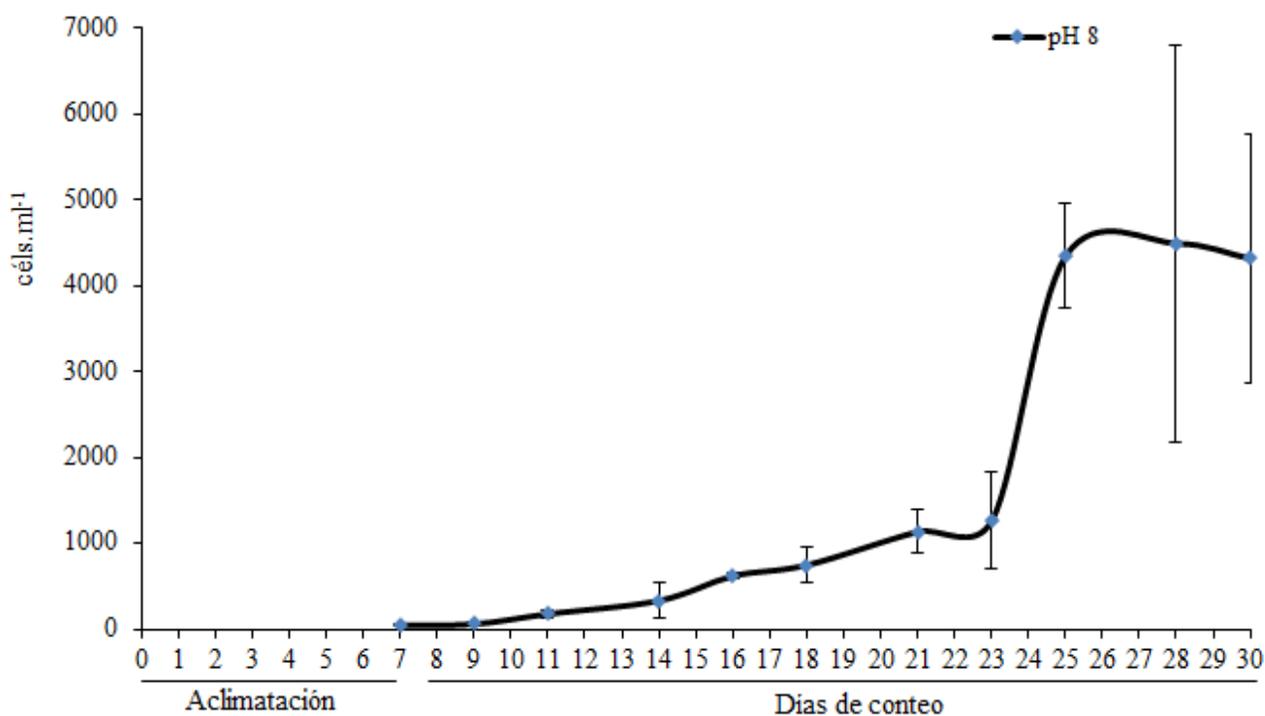


Figura 7. Representación gráfica del cambio en densidad celular de *D. baltica* en función del tiempo de cultivo (fase experimental I) con barras de error de las réplicas de cada conteo.

### Variaciones morfológicas

Se obtuvieron las dimensiones máximas y mínimas de las poblaciones del cultivo mesotrófico (estándar) de la fase experimental I. Estos valores se compararon con los datos promedio registrados *in situ* en el canal Japón (Lira, 2012), mostrando que *D. baltica* en cultivo presentó

un intervalo ligeramente más amplio en las dimensiones de células vegetativas y quistes, en comparación con los registros *in situ* (Cuadro 10).

Cuadro 10. Valores máximos y mínimos de las dimensiones registradas (en  $\mu\text{m}$ ) de *Durinskia baltica* en cultivo mesotrófico con pH 8 en comparación con las registradas en muestras ambientales.

<b>Células</b>	<b>Cultivo</b>	<b><i>in situ</i></b>	<b>Quistes</b>	<b>Cultivo</b>	<b><i>in situ</i></b>
<b>L<sub>máx</sub></b>	47	34	<b>L<sub>máx</sub></b>	49	50
<b>A<sub>max</sub></b>	38	22	<b>A<sub>máx</sub></b>	44	30
<b>L<sub>mín</sub></b>	17	24	<b>L<sub>mín</sub></b>	42	30
<b>A<sub>mín</sub></b>	17	18	<b>A<sub>mín</sub></b>	30	20

A partir de 132 preparaciones permanentes y 132 muestras frescas generadas durante los conteos, se realizó el registro de la variabilidad morfológica presente durante la fase experimental 1, encontrando, que *D. baltica* presenta una amplia variedad en la forma de sus células vegetativas. Estas variaciones se traducen en células vegetativas con la epiteca redondeada, ligeramente más grande que la hipoteca y presentando una ligera depresión en el antápice, particularmente en la zona de unión entre las placas 1'''' y 2'''' (figura 8A); así como células con la epiteca e hipoteca del mismo tamaño, presentando una depresión en el antápice y un ligero abultamiento en la zona apical de la epiteca (figura 8B); células con deformaciones en la zona apical (figura 8C), células alargadas con la epiteca ovalada y más grande que la hipoteca (figura 8D), células con la teca totalmente redondeada sin depresiones (figura 8E) y células muy grandes con deformaciones en las regiones apicales y antapicales (figura 8F).

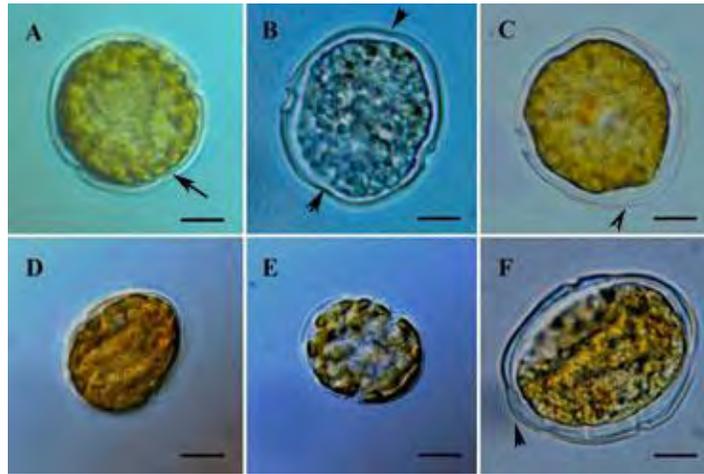


Figura 8. Variaciones morfológicas registradas en células vegetativas de los cultivos de la fase experimental 1.

## Descripción completa del ciclo de vida de *Durinskia baltica*

### Fase asexual

La fase asexual se observó en las células vegetativas móviles durante este proceso la célula vegetativa se dividió por mitosis y produjo por eleuteroesquisis (liberación de la teca y formación de un quiste de división), dos células hijas haploides desnudas (sin teca), las cuales generaron posteriormente su propia teca.

El proceso comenzó con la profase, como se muestra en la figura 9 A, durante esta fase la célula presentó ligeros movimientos espasmódicos manteniéndose casi inmóvil a pesar de conservar los flagelos. En el dinocarion se observó con fluorescencia de DAPI, una separación progresiva de los cromosomas híper-condensados (figura 9 B).

Durante la metafase (figura 9 C), se observaron secciones transversales de los arreglos del núcleo con cromátidas arregladas alrededor de los canales citoplasmáticos (figura 9 D). En la anafase (figura 9 E), la teca se siguió conservando y la célula aumentó en longitud *ca* de un 10 %; así mismo, se observó un alargamiento de los canales citoplasmáticos en el dinocarion y, posteriormente, comenzó la migración de los cromosomas hacia los extremos opuestos de la células formando dos discos separados (figura 9 F).

En la telofase temprana la teca se liberó por medio de un proceso de ecdisis (figura 9 G); durante esta fase se formaron los núcleos hijos y comenzó la citocinesis (figura 9 H). El resto

de esta fase se llevó a cabo dentro de un quiste de división, formado de una pared simple mucilaginosa y hialina (figura 9 I).

A la par del proceso de división, se observó una división amitótica del núcleo endosimbionte, la cual se caracterizó por la ausencia de condensación de los cromosomas en la cromatina, además de la ausencia de huso o microtúbulos, este núcleo se dividió mediante una escisión simple concurrente con una escisión citoplasmática, se observó una pequeña área conectando a los dos núcleos (figura 9 J).

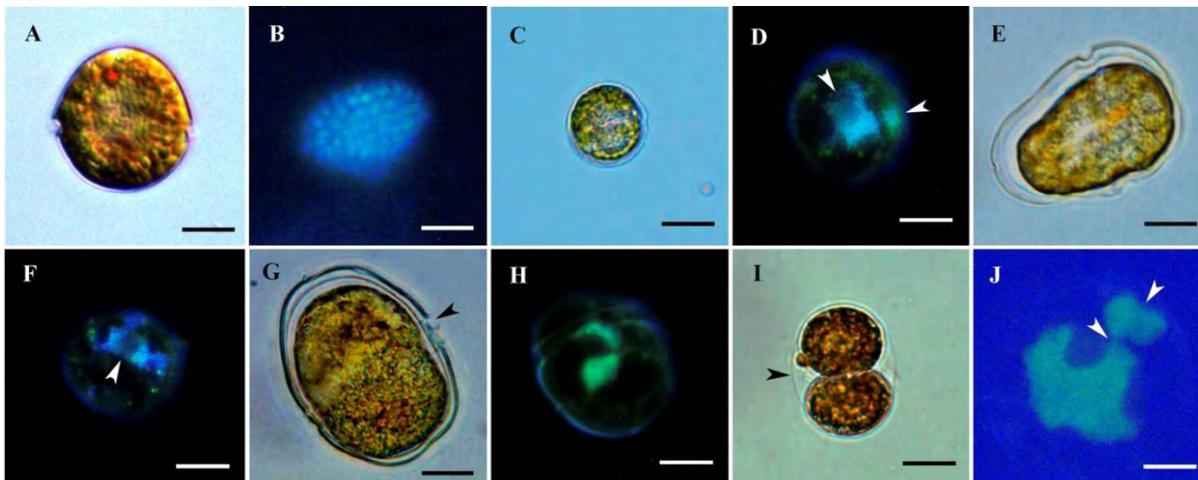


Figura 9. Descripción de las fases de la mitosis. A-B) Profase. C-D) Metafase, flecha superior: formación de canales citoplasmáticos; flecha derecha: endosimbionte. E-F) Anafase, flecha: migración de cromosomas. G-H) Telofase, flecha: ecdisis de la teca. I) Pared o quiste de división, comienzo de citocinesis. J) Núcleo endosimbionte, flecha superior: división amitótica; flecha inferior: conexión con dinocarion. A, C, E, G, I (microscopía fotónica); B, D, F (epifluorescencia DAPI); H-I (epifluorescencia Syber Green). Escala de la barra 10 $\mu$ m.

Durante el desarrollo de la citocinesis (figura 10 A), se observó que las células hijas se orientaron de ápice a antápice, dentro de la pared de división (10 B); cada una de estas células ya presentaban flagelos longitudinales móviles (figura 10 C). Durante el proceso de liberación de la pared, ambas células presentaron movimientos persistentes en diferentes direcciones hasta finalizar con el rompimiento de dicha pared; esto sugiere que la presión ejercida desde dentro, por las células, provoca el rompimiento de la pared (figura 10 D). Las células hijas liberadas no heredaron la teca materna, al contrario, formaron una teca nueva posteriormente (eleuteroesquisis). El proceso completo de división celular se llevó a cabo en un periodo aproximado de 40  $\pm$  20 minutos.

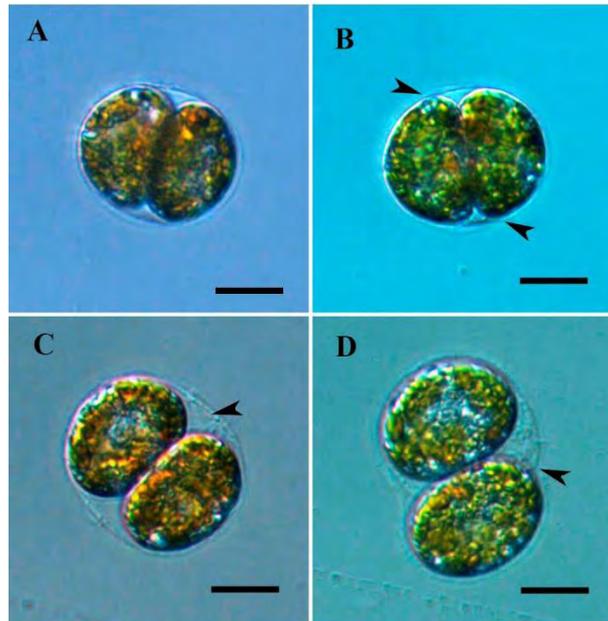


Figura 10. Secuencia de la citocinesis desde la ecdisis de la teca hasta la liberación de las células independientes. B) Orientación del ápice y antápice (flechas). C) Flagelo longitudinal (flecha). D) Rompimiento de la pared (flecha). Escala de la barra: 10 $\mu$ m.

Por otra parte, se observó que al manipular las células para su observación en microscopio fotónico (que las somete a cambios de iluminación directa, aumento de temperatura y deshidratación), se produjo un cambio en la morfología asociado con la generación de quistes temporales, también llamados *quistes peliculares asexuales*; esta estructura de resistencia se denominó temporal, ya que fue capaz de regenerar a la célula vegetativa móvil en un periodo aproximado de 48 horas.

Es muy importante resaltar que este tipo de quistes, por su condición de fase vegetativa, sólo regeneró células haploides. Los quistes peliculares asexuales, a diferencia de los quistes sexuales de resistencia tienen una pared de una sola capa de celulosa, son menos gruesos, carecen de ornamentaciones (espinas, cuernos) y de sustancias de almacenamiento.

Cuando se generaron estos quistes, las células vegetativas perdieron el flagelo longitudinal, liberaron la teca por ecdisis y se recluyeron en la pared engrosándola (figura 11 A), lo cual cambió la coloración de dorado a pardo tenue (figura 11 B-C), resultando en una forma redonda en donde no se distinguieron el cingulo ni el sulco (figura 11 D).

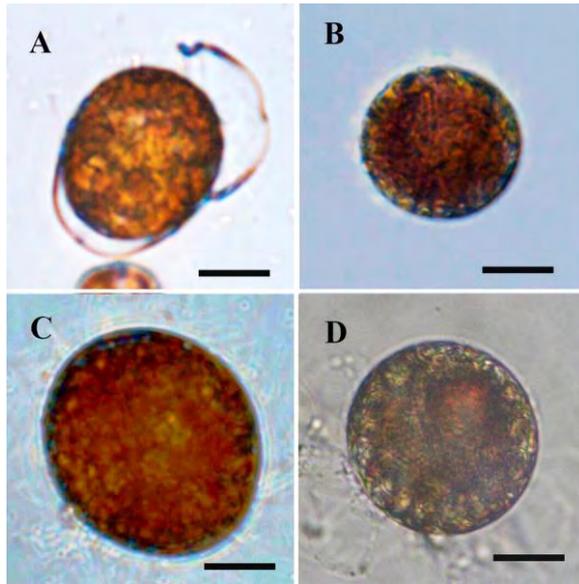


Figura 11. Morfología de quistes peliculares. A) Ecdisis del quiste pelicular. B-C) Coloración parda del quiste pelicular, forma redonda. D) No se distinguen estructuras celulares. Escala de la barra 20 $\mu$ m.

### Fase sexual

Durante la fase sexual del ciclo de vida, las células vegetativas actuaron como gametos isogámicos, los cuales no presentaron ninguna diferencia morfológica evidente. El proceso comenzó con el reconocimiento de las células como gametos (figura 12 A); durante este reconocimiento, uno de los gametos se mantuvo nadando en círculos frente al otro en posición ventral durante aproximadamente cinco minutos (figura 12 B). Consecutivamente, los gametos cambiaron de posición (figura 12 C) hasta alcanzar una orientación final previa a la fusión; en esta orientación los gametos se unieron en la porción ventral de la hipoteca y nadaron juntos hasta que uno de los gametos orientó la porción antapical, hacia la parte cingular del otro gameto, tocándolo en una posición perpendicular; este evento marcó, para cada uno de los pares cingulares, el inicio de la fusión o singamia (figura 12 D).

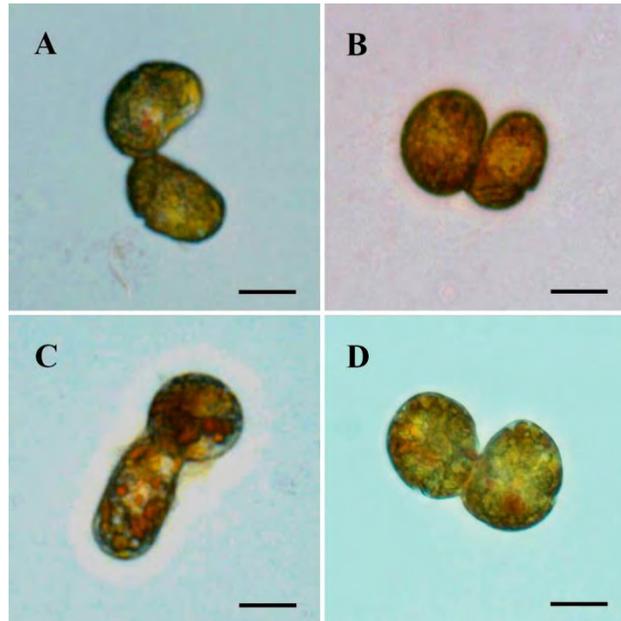


Figura 12. Diferentes orientaciones registradas previas a la fusión de gametos de *Durinskia baltica*.

A) Poro apical-intersección placa 5<sup>va</sup>. B) Unión en poro flagelar. C) Ápice-zona flagelar. D) Orientación final observa durante la fusión de gametos de *Durinskia baltica*. Escala de la barra: 10μm.

La fusión comenzó con la separación de las placas que conforman el complejo formado por el poro apical y la placa x, así como las placas 4' y 2' de uno de los gametos y respectivamente, las placas sulcales del otro gameto; la abertura dejada por la separación de las placas posibilitó la fusión de las membranas (figura 13 A), posteriormente comenzó la cariogamia y los contenidos celulares de ambos gametos se integraron en una sola estructura (figuras 13 B-C). Las tecas de ambos gametos también se fusionaron en una sola presentando un reacomodo de placas (figura 13 D).

Los gametos fusionados conservaron la movilidad durante este proceso y dentro de un patrón bastante similar, presentaron diversas formas, resultantes de formas peculiares de integración de ambos, en una sola estructura (figuras 13 E-G). El planocigoto producto de la fusión de gametos fue diploide, conservó la movilidad y aumentó al doble del tamaño de los gametos aproximadamente 40 (L) x 28 μm (A) (figura 13H; confrontar con figura 17A-D), además presentó recurrentemente ligeras deformaciones como consecuencia de la fusión (figura 13 I). El proceso de fusión se llevó a cabo en aproximadamente 35 minutos.

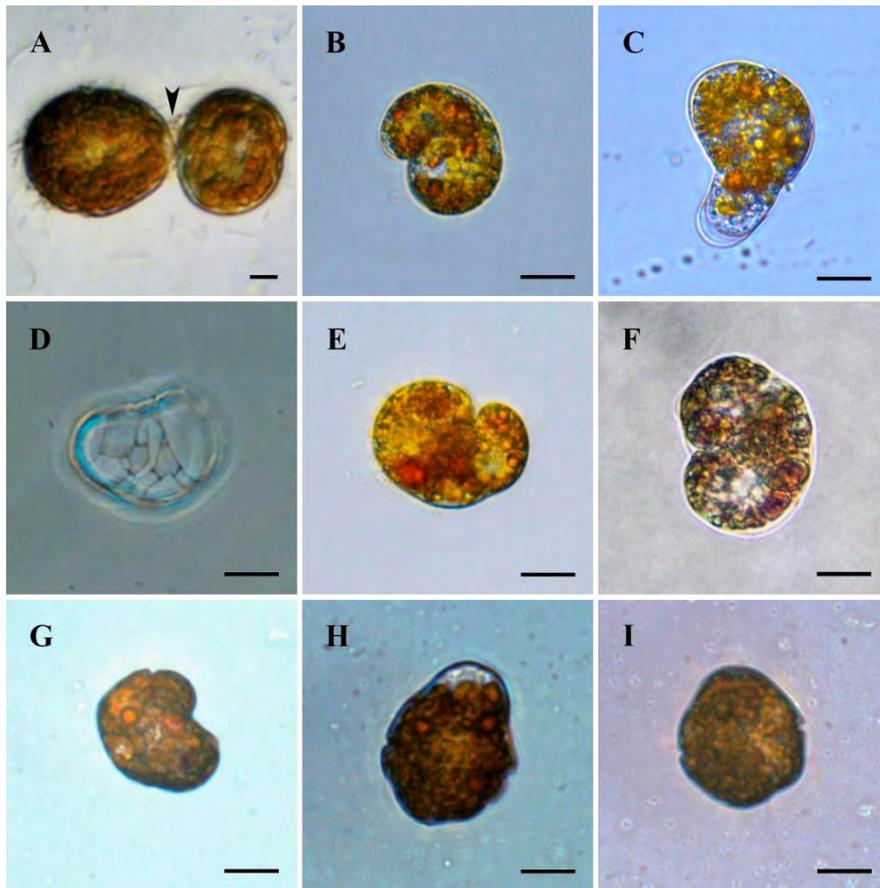


Figura 13. Fusión de gametos después del acomodo con orientación perpendicular. A) Separación de placas (flecha). B-C) Cariogamia e integración de citoplasmas. D) Fusión de tecas y reacomodo de placas. E-G) Diferentes morfologías de la formación del planocigoto. H-I) Planocigoto. Escala de la barra: 10  $\mu\text{m}$ .

Una característica muy importante del planocigoto fue la presencia de 2 flagelos longitudinales y 2 transversales (figura 14 A). Se observó que uno de los flagelos transversales salió del área del cíngulo al no lograr integrarse dentro de la membrana junto con el flagelo original (figura 14 B).

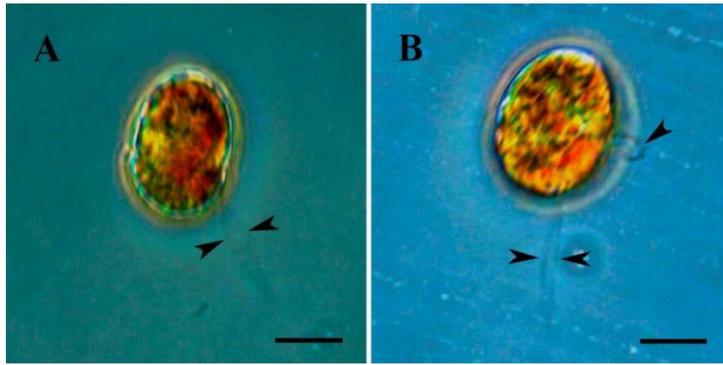


Figura 14. Morfología del planocigoto móvil. A) Flagelos longitudinales (flechas) en vista lateral derecha. B) Vista ventral, flagelo transversal saliendo del cíngulo (flecha superior), flagelos longitudinales (flechas inferiores). Escala de la barra: 10  $\mu\text{m}$ .

El planocigoto conservó movilidad por un periodo aproximado de 2-6 días; posteriormente y en algunos casos, desprendió los flagelos longitudinales al nivel de la base (antápice) y en otros los retrajo, perdiendo la movilidad en ambas situaciones (figura 15).

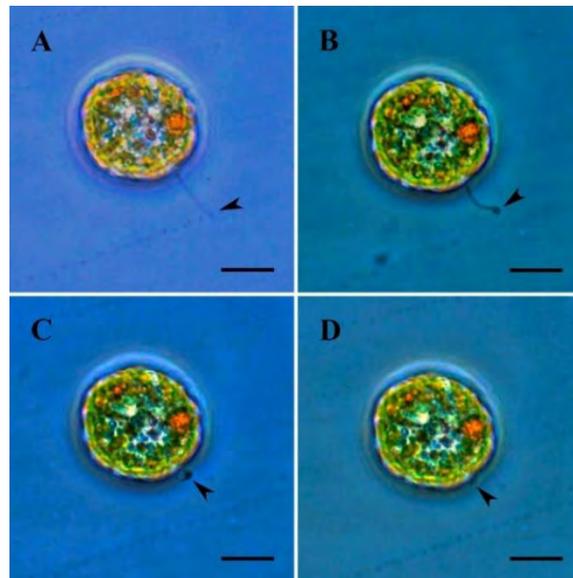


Figura 15. Secuencia de la retracción de los flagelos longitudinales (flechas) en el planocigoto. Escala de la barra: 20  $\mu\text{m}$ .

La presencia de planocigotos en el cultivo aumentó a partir de los 28 días y, al mismo tiempo, comenzó a disminuir la presencia de células vegetativas móviles; en ese momento, estas células presentaron una disminución en el número de cloroplastos (pigmentación) y tamaño ( $\pm 10 \mu\text{m}$ ), así como un aumento de las estructuras de reserva (figura 16 A-B).

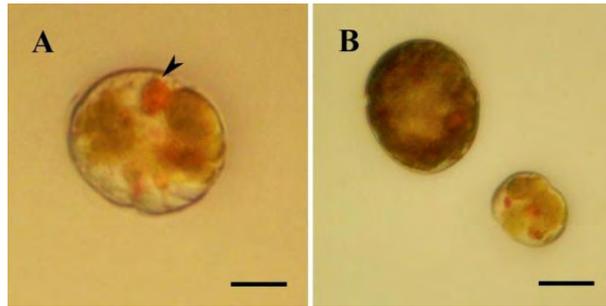


Figura 16. Células vegetativas con posible deficiencia de nutrientes. A) Pérdida de pigmentación y presencia de sustancias de reserva (flecha). B) Diferencia de pigmentación y tamaño de células vegetativas con y sin deficiencia de nutrientes. Escala de la barra 10 µm.

Una vez que el planocigoto perdió la movilidad, se observó que podía seguir cuatro rutas diferentes que comprenden:

1) *Primera ruta*: La división directa por meiosis, en donde se observaron 4 células hijas (figura 17) que fueron liberadas por eleuteroesquisis para restablecer a la población vegetativa haploide; esta ruta se generó comúnmente en cultivos con alta densidad ( $10^3$  cels  $m^{-1}$ ) y una edad de cultivo entre 7 y 20 días.

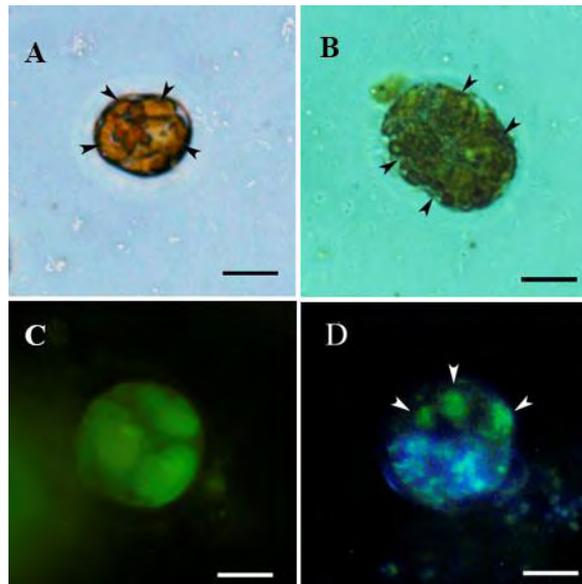


Figura 17. Planocigotos en fase de meiosis. A-B) Se indican cuatro células haploides generadas por meiosis. C-D) Se observan tres núcleos visibles en primer plano (tinción con Sybr green). Escala de la barra: 10 µm.

2) *Segunda ruta*: El enquistamiento temporal o pelicular sexual, se produjo cuando el planocigoto no siguió la serie de transformaciones que dan lugar a un hipnocigoto; en su lugar

se formó un quiste proximal de pared simple (autofragma), redondo, refringente, con un arqueópilo (abertura) pentagonal bien definido (figura 18 A-B). Este quiste se dividió por meiosis y eclosionó cuatro células vegetativas haploides en un periodo de entre 4 y 10 días (figura 18 C).

3) *Tercera ruta*: El quiste temporal o pelicular, produjo de forma alternativa, una estructura diploide denominada planomeiocito en un periodo de entre 4 y 6 días; el planomeiocito presentó dos flagelos transversales móviles que desprendió durante la división meiótica, la cual dio lugar 4 células vegetativas haploides al cabo de entre 5-7 días (figura 18 D).

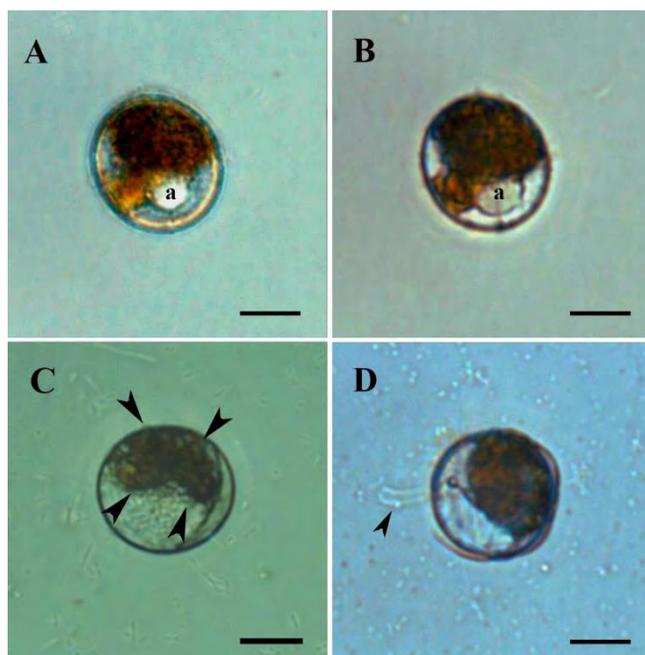


Figura 18. Quistes peliculares de origen sexual. A) Arqueópilo pentagonal abierto (a). B) Arqueópilo cerrado (a). C) Quiste en fase de meiosis, se indican cuatro células hijas (flechas). D) Quiste eclosionando un planomeiocito (de color pardo) con flagelos longitudinales (flecha). Escala de la barra: 10µm.

4) *Cuarta ruta*: De manera alternativa, el planocigoto generó un hipnocigoto o *quiste de resistencia proximal* que, como indica su nombre, es proximal (desarrolló la pared inmediatamente dentro de la teca), de color pardo, de forma alargada e irregular, de doble pared, con un perifragma grueso sin ornamentaciones y un endofragma más delgado (figura 19 A), así como un arqueópilo de forma rómbica (figura 19 C). El hipnocigoto fue más grande que el quiste temporal o pelicular, con un promedio de 40-45 µm de largo y de 28-30 µm de

ancho y presentó cuerpos de acumulación (figura 19 B). El tiempo de eclosión de estos quistes fue muy variable, ya que se observaron quistes vacíos (figura 19 E) y quistes en eclosión (figura 19 D, F) en cultivos de entre 15 a 45 días. El esquema del ciclo de vida completo de *Durinskia baltica* se muestra en la figura 20.

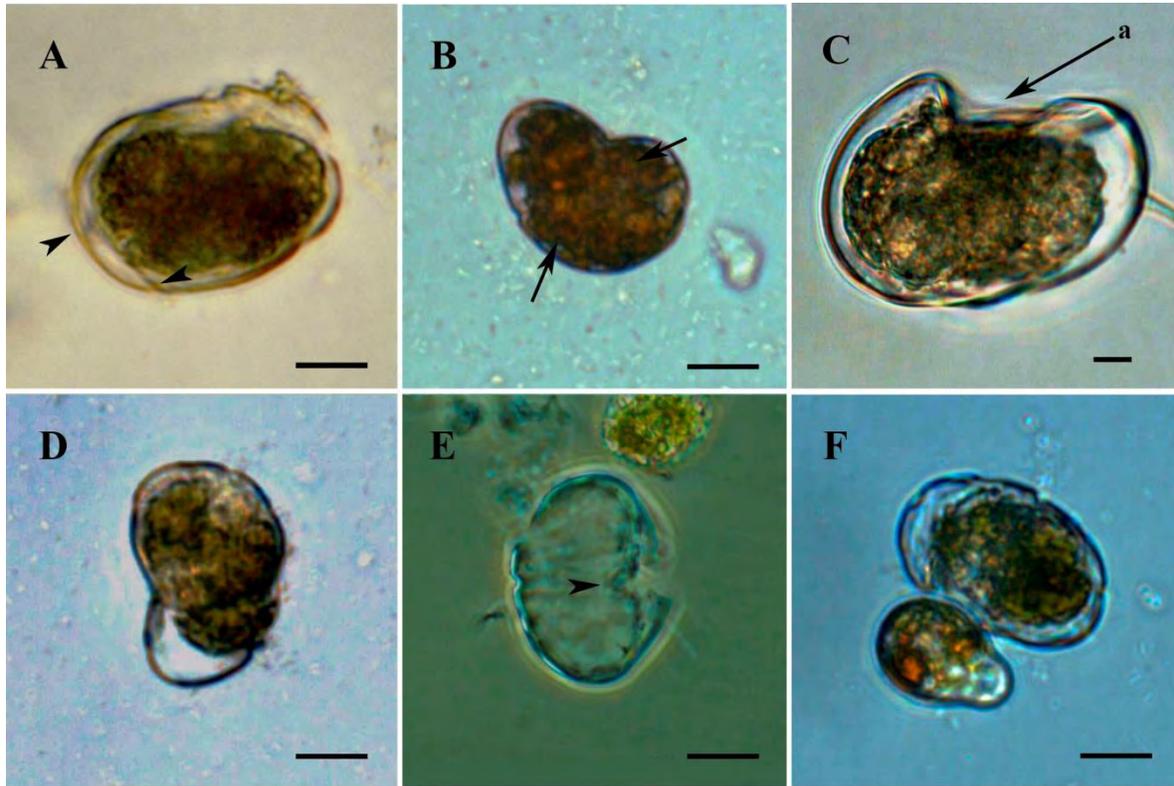


Figura 19. Hipnocigotos o quistes de resistencia. A) Perifragma (flecha superior); endofragma (flecha inferior). B) Cuerpos de acumulación (flechas). C) Archeópilo con forma romboide (a). D, F) Eclosión de hipnocigotos. E) Hipnocigoto vacío, flecha: archeópilo. Escala de la barra: 20  $\mu\text{m}$ .

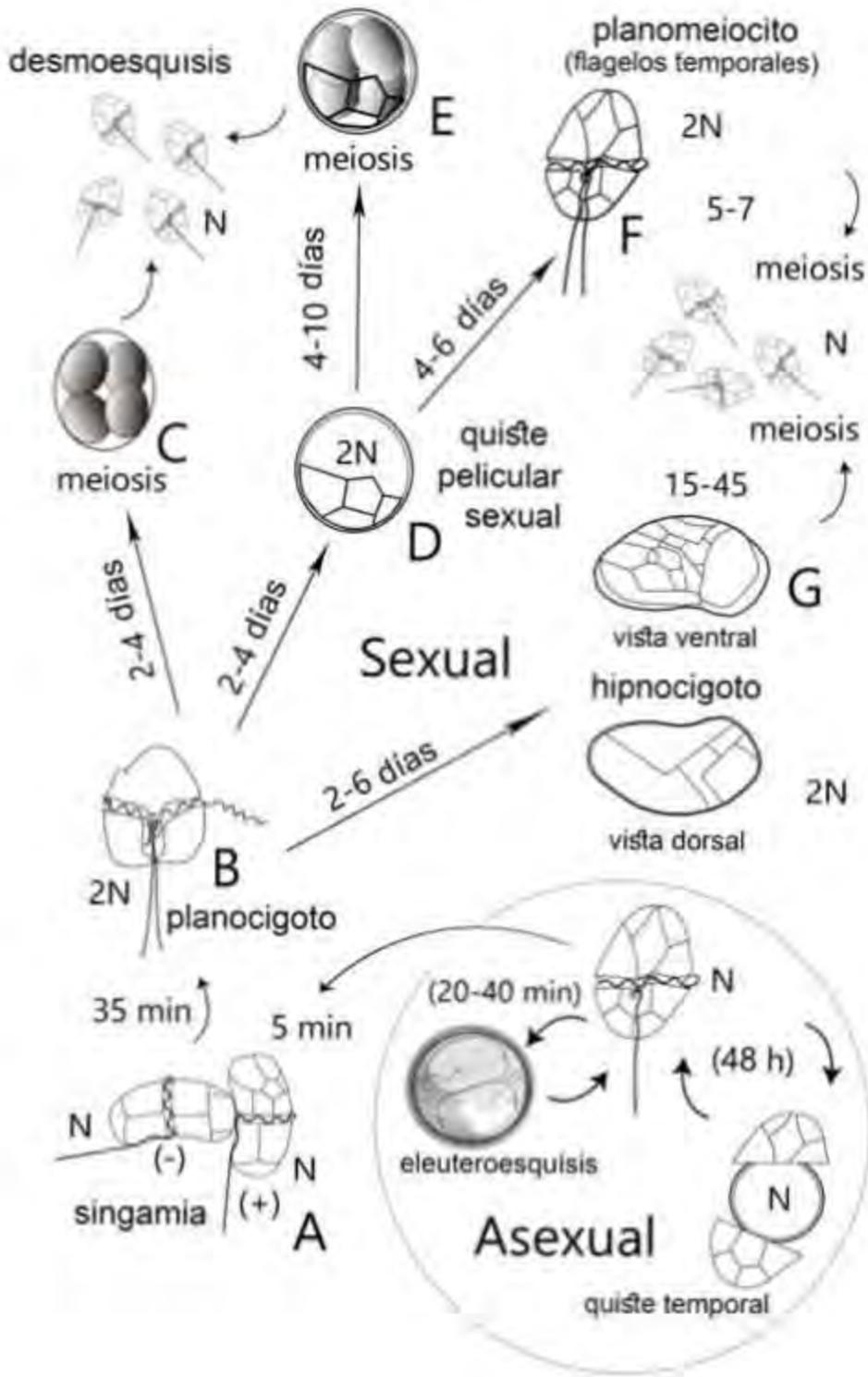


Figura 20. Fase asexual (en círculo) y fase sexual del ciclo de vida de *Durinskia baltica*. Cuando hay reproducción asexual, las células se orientan de forma opuesta dentro del quiste de división, ya tienen flagelos y forman una nueva teca al liberarse de la pared materna. En la reproducción sexual, las células vegetativas actúan como isogametos (A); en un periodo de aproximadamente 35 minutos después de la singamia, se genera un planocigoto diploide (B). El planocigoto puede seguir una de 3 posibles rutas: (C) dividirse por meiosis después de 2-4 días produciendo 4 células hijas por desmoesquisis; (D-E) convertirse en un quiste pelicular (en el cual resalta un arqueópilo pentagonal) y después de 4-10 días se divide por meiosis liberando células haploides, (F) de forma alternativa, el quiste pelicular puede producir un planomeiocito diploide, el cual se distingue por la presencia de flagelos temporales; en 4-6 días el planomeiocito cambia a una forma más redondeada y produce por meiosis (5-7) días nuevas células hijas. (G) La ruta final ocurre cuando el planocigoto diploide se convierte en un hipnocigoto (2-4 días), mediante un cambio completo de forma así como el desarrollo de una pared doble muy gruesa; los hipnocigotos tienen un periodo de latencia de 15 a 45 días antes de generar células hijas haploides por meiosis.

## **Fase experimental 2. Variaciones en la morfología y tasas de crecimiento de *Durinskia baltica* en diferentes condiciones de cultivo**

### **Categoría mesotrófica**

#### **Curvas de crecimiento**

En la figura 21, se presentan las curvas de crecimiento de la categoría mesotrófica para cada tratamiento de pH probado. En la curva de crecimiento de pH 7, el mayor número de células se registró en el día 14, seguido de una fase estacionaria en los días 16-21; a partir del día 23, la población decreció.

En la curva de crecimiento de pH 8, la mayor densidad se alcanzó a los 28 días; a partir del día 29, la población comenzó a decrecer. En pH 9, el máximo número de células registrado se observó en el día 14, mostrando una fase estacionaria entre los días 16 y 23, y una disminución a partir del día 25.

En pH 10, se observó que hay una disminución en la densidad del día 7 al 9 para después presentar un aumento en el día 11, cuando se registró la mayor densidad; a partir de este registro la población disminuyó hasta el último conteo.

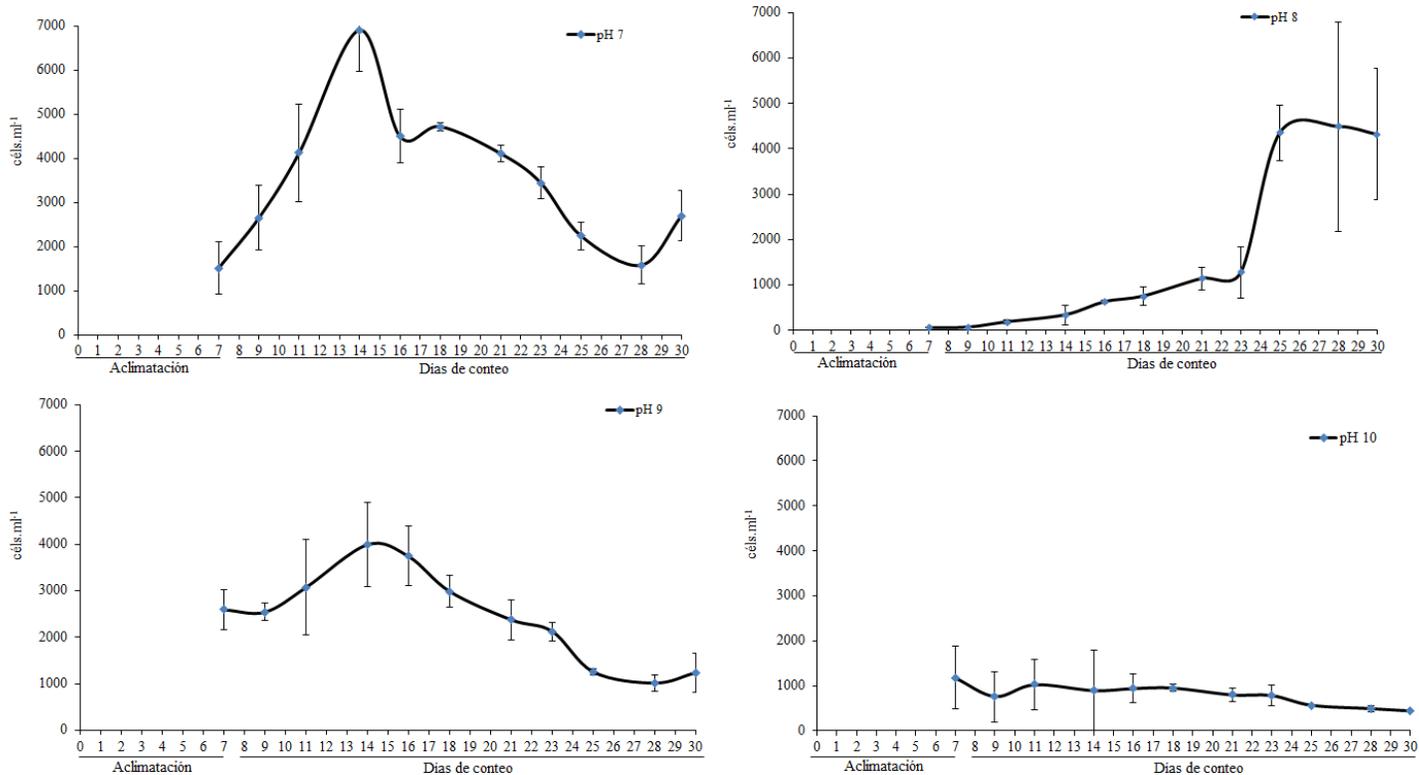


Figura 21. Curvas de crecimiento obtenidas a partir de la densidad celular registrada en la categoría mesotrófica con pH de 7-10.

### Tasas de crecimiento

En el cuadro 11 se presentan los valores de la tasa de crecimiento ( $r$ ), número de duplicaciones por día ( $k$ ) y tiempo de duplicación de la población ( $T_2$ ), obtenidos para cada tratamiento de pH probado de esta categoría. Se registraron valores negativos de  $r$  a partir de los días en donde la densidad comienza a disminuir.

El valor que indica el comienzo de la fase de crecimiento exponencial (el valor más cercano a 1), se observó en todos los casos, en el conteo previo a donde se registró la máxima densidad, siendo que, para pH 7 el crecimiento exponencial comenzó entre los primeros 7-9 días, con un valor de 0.280.

Para pH 8 la fase de crecimiento exponencial comenzó a los 25 días, con un valor de 0.616; en pHs 9 y 10, esta fase se presentó a los 11 días con valores de 0.095 y 0.151, respectivamente.

Cuadro 11. Tasa de crecimiento ( $r$ ), número de divisiones por día ( $k$ ) y tiempo de duplicación de la población ( $T_2$ ), obtenidos para los tratamientos de pH 7-10 a partir de los valores de densidad registrados durante la fase experimental 2 en la categoría mesotrófica.

Fecha de conteo	20/01/2015	22/01/2015	24/01/2015	27/01/2015	29/01/2015	31/01/2015	04/02/2015	05/02/2015	07/02/2015	10/02/2015	12/02/2015
<b>pH7/Tiempo (días)</b>	<b>0-7</b>	<b>7-9</b>	<b>9-11</b>	<b>11-14</b>	<b>14-16</b>	<b>16-18</b>	<b>18-21</b>	<b>21-23</b>	<b>23-25</b>	<b>25-28</b>	<b>28-30</b>
N2/N1	1516/800	2654/1516	4131/2656	6917/4131	4504/6917	4726/4504	4114/4726	3448/4114	2239/3448	1577/2239	2699/1577
$\ln(N2/N1)$	1.895	1.751	1.556	1.674	0.651	1.049	0.870	0.838	0.649	0.704	1.712
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$r$	0.091	0.280	0.221	0.172	-0.214	0.024	-0.046	-0.088	-0.216	-0.117	0.269
$k$	0.132	0.404	0.319	0.248	-0.309	0.035	-0.067	-0.127	-0.312	-0.169	0.388
$T_2$	7.593	2.474	3.134	4.034	-3.232	28.856	-14.984	-7.857	-3.210	-5.932	2.579
<b>pH8/Tiempo (días)</b>	<b>0-7</b>	<b>7-9</b>	<b>9-11</b>	<b>11-14</b>	<b>14-16</b>	<b>16-18</b>	<b>18-21</b>	<b>21-23</b>	<b>23-25</b>	<b>25-28</b>	<b>28-30</b>
N2/N1	40/800	49/40	60/49	179/60	333/179	621/333	748/621	1136/748	1271/1136	4353/4493	4314/4493
$\ln(N2/N1)$	0.061	1.218	2.994	1.866	1.862	1.205	1.519	1.118	3.425	1.032	0.960
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	-2.793	0.197	1.097	0.624	0.622	0.187	0.418	0.112	1.231	0.032	-0.041
$r$	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$k$	-0.399	0.098	0.548	0.208	0.311	0.093	0.139	0.056	0.616	0.011	-0.020
$T_2$	-0.576	0.142	0.791	0.300	0.448	0.135	0.201	0.081	0.888	0.015	-0.029
$T_2$	-1.737	7.038	1.264	3.334	2.230	7.428	4.973	12.406	1.126	65.527	-34.097
<b>pH9/Tiempo (días)</b>	<b>0-7</b>	<b>7-9</b>	<b>9-11</b>	<b>11-14</b>	<b>14-16</b>	<b>16-18</b>	<b>18-21</b>	<b>21-23</b>	<b>23-25</b>	<b>25-28</b>	<b>28-30</b>
N2/N1	2595/800	2545/2595	3076/2545	4001/3076	3744/4001	2991/3744	2379/2991	2128/2379	2128/2379	1255/2128	1014/1255
$\ln(N2/N1)$	3.244	0.980	1.209	1.300	0.936	0.799	0.795	0.895	0.590	0.808	1.228
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	1.177	-0.020	0.190	0.263	-0.066	-0.225	-0.229	-0.111	-0.528	-0.213	0.205
$r$	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$k$	0.168	-0.010	0.095	0.088	-0.033	-0.112	-0.076	-0.056	-0.264	-0.071	0.103
$T_2$	0.243	-0.014	0.137	0.126	-0.048	-0.162	-0.110	-0.080	-0.381	-0.103	0.148
$T_2$	4.123	-70.311	7.306	7.914	-20.934	-6.168	-9.082	-12.466	-2.626	-9.739	6.754
<b>pH10/Tiempo (días)</b>	<b>0-7</b>	<b>7-9</b>	<b>9-11</b>	<b>11-14</b>	<b>14-16</b>	<b>16-18</b>	<b>18-21</b>	<b>21-23</b>	<b>23-25</b>	<b>25-28</b>	<b>28-30</b>
N2/N1	1184/800	762/1184	1031/762	897/1031	943/897	954/943	799/954	786/799	565/786	487/565	435/487
$\ln(N2/N1)$	1.480	0.643	1.353	0.870	1.052	1.011	0.838	0.983	0.719	0.862	0.893
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	0.392	-0.441	0.302	-0.139	0.051	0.011	-0.177	-0.017	-0.330	-0.148	-0.114
$r$	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$k$	0.056	-0.220	0.151	-0.046	0.025	0.005	-0.059	-0.009	-0.165	-0.049	-0.057
$T_2$	0.081	-0.318	0.218	-0.067	0.037	0.008	-0.085	-0.012	-0.238	-0.071	-0.082
$T_2$	12.384	-3.144	4.583	-14.929	27.322	127.238	-11.778	-80.381	-4.197	-14.052	-12.193

Paralelamente, se realizó el registro de la densidad de hipnocigotos (quistes de resistencia) presentes en cada cultivo modificado, encontrando en general una producción muy baja de quistes en todos los pH probados. En pH 7, se registró el mayor número de quistes de todos los tratamientos, con un valor máximo de 18 quistes  $m L^{-1}$  en el día 11; en pH 8, el mayor registro fue de 9 quistes  $m L^{-1}$  en el día 25; en pH 9, el valor máximo fue de 12 quistes  $m L^{-1}$  en el día 11, y el menor número de quistes registrado se presentó en pH 10, con 7 quistes  $m L^{-1}$  en el día 18.

Estos valores se relacionaron con los valores de densidad de células. Ambas densidades se expresaron en escala logarítmica con la finalidad de homogeneizar los datos; en cada gráfico se observa la densidad de quistes (rojo) en proporción a la densidad de células (negro) en la misma barra. En estos gráficos no se distingue ninguna tendencia que relacione las densidades (figura 22).

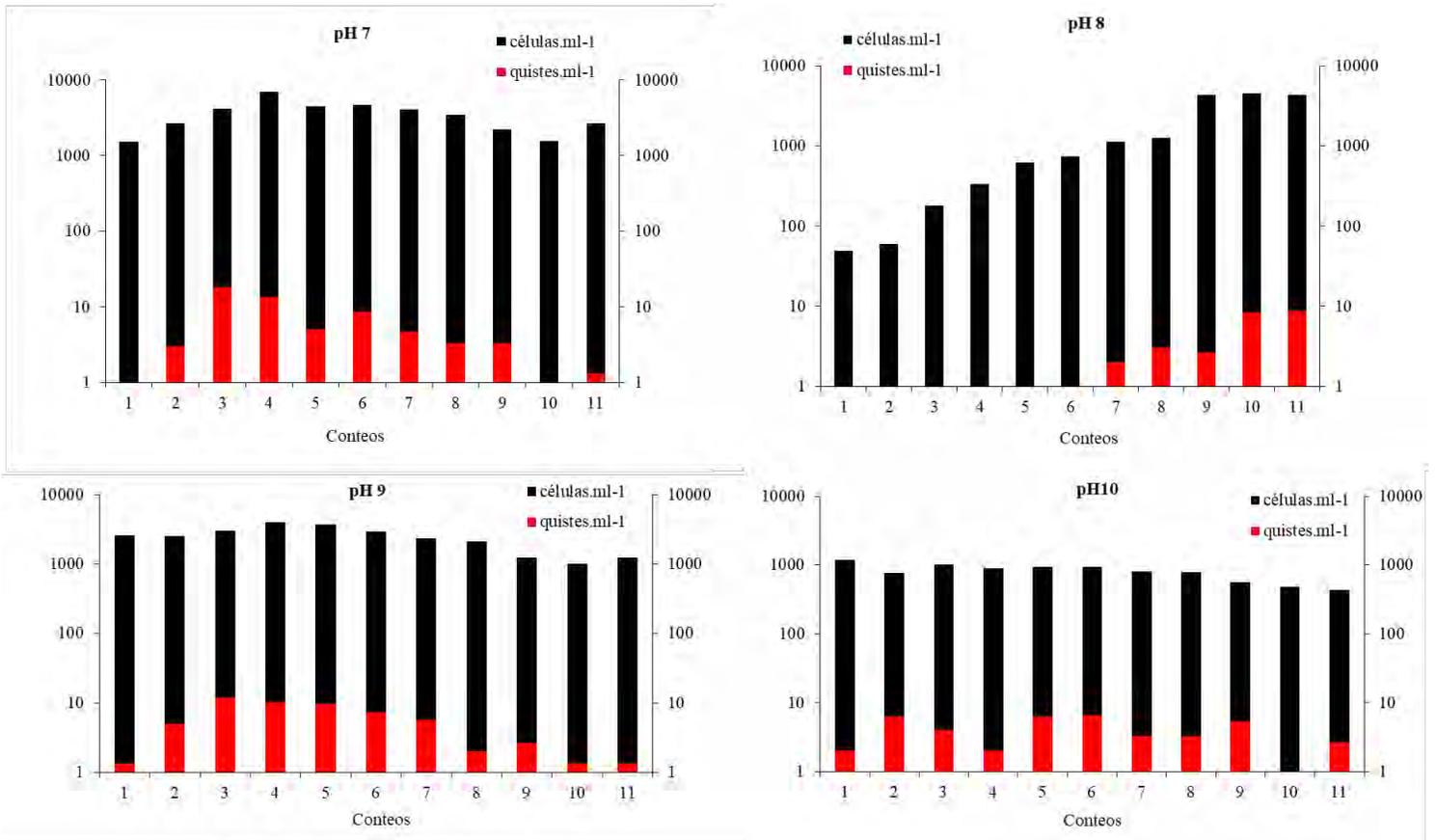


Figura 22. Comparación entre la densidad de células y quistes de resistencia (hipnocigotos) de *D. baltica* en los diferentes tratamientos de pH de la categoría mesotrófica en escala logarítmica.

### Variaciones morfológicas

Se revisaron un total de 396 preparaciones permanentes obtenidas de los 11 conteos del análisis, correspondiéndose con 99 preparaciones por cada tratamiento de esta categoría. En el tratamiento de pH 7 se registraron células vegetativas anchas y con deformaciones en el antápice, con dimensiones que variaron entre 15–37  $\mu\text{m}$  de longitud y 15–30  $\mu\text{m}$  de anchura (figura 23 A-B).

En el tratamiento de pH 8 se observaron células con la teca totalmente redondeada y células con depresiones en el ápice y antápice de la teca con dimensiones que variaron entre 17–47  $\mu\text{m}$  de longitud y 17–38  $\mu\text{m}$  de anchura (figura 23 C-D).

En el tratamiento de pH 9 se registraron células con deformaciones en la hipoteca y la epiteca ligeramente más grande que la hipoteca; sus dimensiones variaron entre 22–37  $\mu\text{m}$  de longitud y 20–32  $\mu\text{m}$  de anchura (figura 23 E-F).

En el tratamiento de pH 10 se registraron células con la hipoteca ligeramente cónica y más pequeña que la epiteca, o con la epiteca muy grande y con un abultamiento en la zona apical; sus dimensiones variaron entre 25–40  $\mu\text{m}$  de longitud y 22–30  $\mu\text{m}$  de anchura (figura 23 G-H).

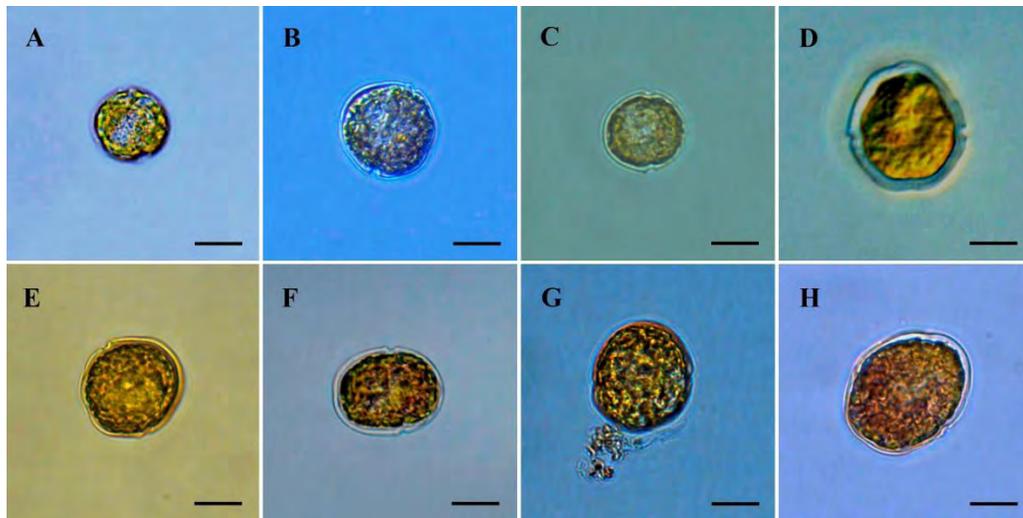


Figura 23. Variaciones morfológicas registradas en los cultivos modificados de la condición mesotrófica. A-B: pH 7; C-D: pH 8; E-F: pH 9; G-H: pH 10. Escala de la barra 10 $\mu\text{m}$ .

### **Categoría eutrófica**

#### **Curvas de crecimiento**

En la figura 24 se presentan las curvas de crecimiento de la categoría eutrófica para cada pH probado, donde se observa que el mayor número de células, en pH 7, se registró en el día 21; entre los días 23-28 se registró una fase estacionaria, y la población decreció a partir del día 28.

En la curva de crecimiento de pH 8, se observó que la máxima densidad, se presentó en el día 14, seguida de una fase estacionaria del día 15-23 y en el día 25 la población decreció. En pH

9 se registró el mayor número de células en el día 18; posteriormente se presentó una fase estacionaria entre los días 21-23 y a partir del día 25, la población decreció.

En la curva de crecimiento de pH 10, el mayor número de células se presentó en el día 11; posteriormente se presentó una fase estacionaria entre los días 14 a 18 y, finalmente la población decreció en el día 21 con el menor número de células de todos los tratamientos de esta categoría.

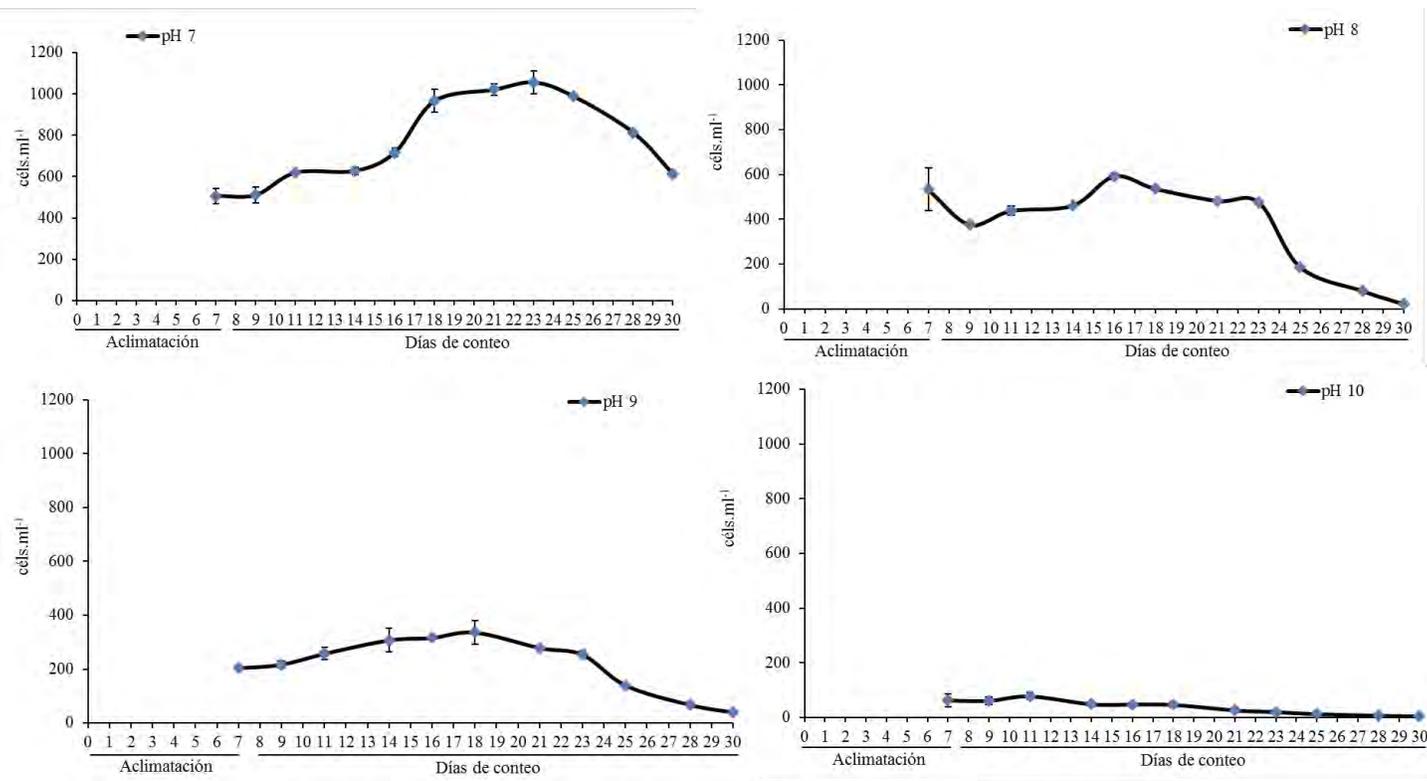


Figura 24. Curvas de crecimiento obtenidas a partir de la densidad celular registrada en la categoría eutrófica con pH de 7-10.

### Tasas de crecimiento

Los valores obtenidos de la tasa de crecimiento ( $r$ ), número de divisiones por día ( $k$ ) y tiempo de duplicación de la población ( $T_2$ ), a partir de la densidad registrada en los tratamientos de pH de 7-10 de la categoría eutrófica, se muestran en el cuadro 12.

En esta categoría, se observó que a pH 7 comenzó la etapa crecimiento exponencial de los 16-18 días, con un valor de  $r$  de 0.149, mientras que a pH 8 comenzó esta etapa entre los días 14-

16 días, con un valor de 0.124. Los pH 9 y 10 registraron la fase de crecimiento exponencial entre los días 9-11 con un valor de 0.086 y 0.117, respectivamente.

Cuadro 12. Tasa de crecimiento ( $r$ ), número de divisiones por día ( $k$ ) y tiempo de duplicación de la población ( $T_2$ ), obtenidos para los tratamientos de pH 7-10 a partir de los valores de densidad registrados durante la fase experimental 2 en la categoría eutrófica.

Fecha de conteo	20/10/2015	22/10/2015	24/10/2015	27/10/2015	29/10/2015	31/10/2015	03/11/2015	05/11/2015	07/11/2015	10/11/2015	12/10/2015
<b>pH7/Tiempo (días)</b>	<b>0-7</b>	<b>7-9</b>	<b>9-11</b>	<b>11-14</b>	<b>14-16</b>	<b>16-18</b>	<b>18-21</b>	<b>21-23</b>	<b>23-25</b>	<b>25-28</b>	<b>28-30</b>
N2/N1	506/800	511/506	619/511	628/619	718/628	967/718	1022/967	1057/1022	989/1057	813/989	613/813
	0.633	1.010	1.212	1.014	1.143	1.347	1.057	1.034	0.936	0.823	0.753
ln(N2/N1)	-0.458	0.010	0.192	0.014	0.134	0.298	0.055	0.034	-0.067	-0.195	-0.283
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$r$	-0.065	0.005	0.096	0.005	0.067	0.149	0.018	0.017	-0.033	-0.065	-0.142
$k$	-0.094	0.007	0.139	0.007	0.097	0.215	0.026	0.024	-0.048	-0.094	-0.204
$T_2$	-10.591	140.975	7.210	149.627	10.350	4.656	37.811	41.153	-20.840	-10.651	-4.893
<b>pH8/Tiempo (días)</b>	<b>0-7</b>	<b>7-9</b>	<b>9-11</b>	<b>11-14</b>	<b>14-16</b>	<b>16-18</b>	<b>18-21</b>	<b>21-23</b>	<b>23-25</b>	<b>25-28</b>	<b>28-30</b>
N2/N1	533/800	377/533	438/377	462/438	593/462	537/593	483/537	476/483	187/476	81/187	22/81
	0.666	0.707	1.162	1.056	1.283	0.906	0.899	0.986	0.393	0.433	0.272
ln(N2/N1)	-0.406	-0.346	0.150	0.054	0.249	-0.099	-0.106	-0.015	-0.934	-0.837	-1.303
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$r$	-0.058	-0.173	0.075	0.018	0.124	-0.050	-0.035	-0.007	-0.467	-0.279	-0.652
$k$	-0.084	-0.250	0.108	0.026	0.180	-0.072	-0.051	-0.011	-0.674	-0.402	-0.940
$T_2$	-11.947	-4.003	9.243	38.458	5.569	-13.974	-19.619	-94.953	-1.484	-2.485	-1.064
<b>pH9/Tiempo (días)</b>	<b>0-7</b>	<b>7-9</b>	<b>9-11</b>	<b>11-14</b>	<b>14-16</b>	<b>16-18</b>	<b>18-21</b>	<b>21-23</b>	<b>23-25</b>	<b>25-28</b>	<b>28-30</b>
N2/N1	204/800	217/204	258/217	308/258	317/308	337/317	279/337	254/279	139/254	68/139	39/68
	0.255	1.062	1.187	1.194	1.029	1.063	0.830	0.909	0.549	0.486	0.581
ln(N2/N1)	-1.365	0.060	0.172	0.177	0.029	0.061	-0.187	-0.095	-0.600	-0.722	-0.543
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$r$	-0.195	0.030	0.086	0.059	0.014	0.031	-0.062	-0.048	-0.300	-0.241	-0.271
$k$	-0.281	0.043	0.124	0.085	0.021	0.044	-0.090	-0.069	-0.433	-0.347	-0.391
$T_2$	-3.555	23.048	8.070	11.724	48.077	22.634	-11.138	-14.581	-2.309	-2.879	-2.555
<b>pH10/Tiempo (días)</b>	<b>0-7</b>	<b>7-9</b>	<b>9-11</b>	<b>11-14</b>	<b>14-16</b>	<b>16-18</b>	<b>18-21</b>	<b>21-23</b>	<b>23-25</b>	<b>25-28</b>	<b>28-30</b>
N2/N1	63/800	62/63	78/62	49/78	48/49	47/48	27/47	20/27	13/20	7/13	5/7
	0.078	0.984	1.265	0.628	0.980	0.972	0.571	0.763	0.639	0.538	0.667
ln(N2/N1)	-2.547	-0.016	0.235	-0.465	-0.021	-0.028	-0.560	-0.271	-0.447	-0.619	-0.405
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$r$	-0.364	-0.008	0.117	-0.155	-0.010	-0.014	-0.187	-0.136	-0.224	-0.206	-0.203
$k$	-0.525	-0.012	0.170	-0.224	-0.015	-0.020	-0.269	-0.196	-0.323	-0.298	-0.293
$T_2$	-1.905	-86.174	5.900	-4.473	-67.228	-49.207	-3.716	-5.112	-3.099	-3.359	-3.419

En el registro de la densidad de hipnocigotos para esta categoría se observó que, en general, la cantidad de quistes es mucho menor que en la categoría mesotrófica. En pH 7 la densidad máxima de quistes se registró en el día 7, y a pH 8 el mayor número de quistes se presentó en el día 14.

El mayor número de quistes presentes en el pH 9 se observó en el día 11 y finalmente en pH 10, el mayor número de quistes se presentó en el día 11. Estos valores se relacionaron con los valores de densidad de células (figura 25).

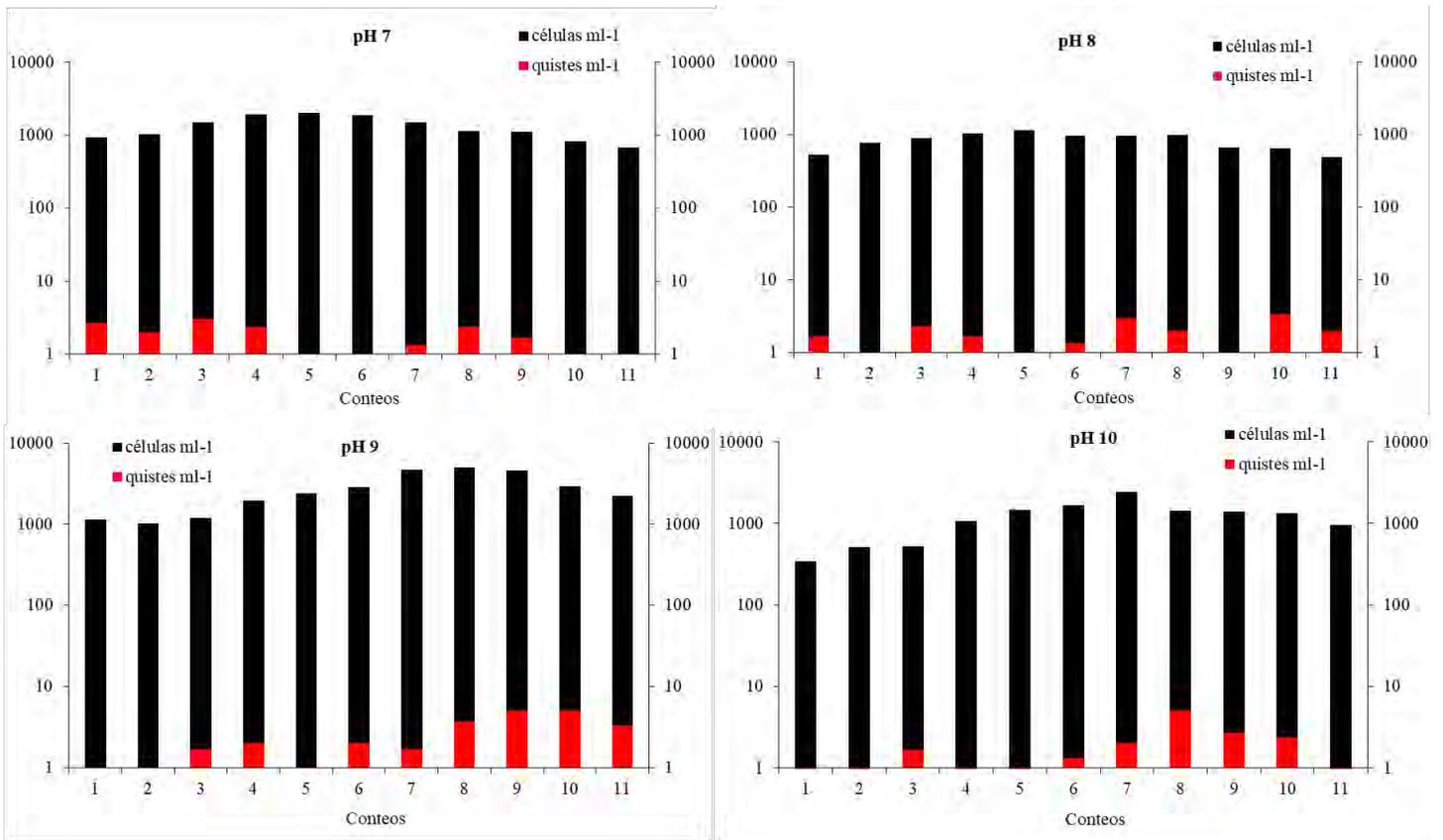


Figura 25. Comparación entre la densidad de células y quistes resistencia (hipnocigotos) de *Durinskia baltica* en los diferentes tratamientos de pH de la categoría eutrónica en escala logarítmica.

### Variaciones morfológicas

Se revisaron un total de 396 preparaciones permanentes obtenidas de los 11 conteos del análisis correspondiendo con 99 preparaciones por cada tratamiento de esta categoría. En el tratamiento de pH 7 se registraron células vegetativas con la teca totalmente redondeada algunas con un adelgazamiento en la zona del cíngulo y una ligera depresión en la zona antapical de la teca; sus dimensiones variaron entre 25–37  $\mu\text{m}$  de longitud y 22–32  $\mu\text{m}$  de anchura (figura 26 A-B). En el tratamiento de pH 8 se observaron células con una ligera depresión en el antápice y una epiteca más grande que la hipoteca con forma ligeramente cónica sus dimensiones que variaron entre 22–37  $\mu\text{m}$  de longitud y 20–32  $\mu\text{m}$  de anchura (figura 26 C-D).

En el tratamiento de pH 9 se registraron células con una depresión en la zona apical de la teca, así como células con la teca totalmente redondeada sus dimensiones variaron entre 16–32  $\mu\text{m}$  de longitud y 16–30  $\mu\text{m}$  de anchura (figura 26 E-F). En el tratamiento de pH 10 se registraron

células con la epiteca ligeramente cónica con dimensiones que variaron entre 25–37  $\mu\text{m}$  de longitud y 22–32  $\mu\text{m}$  de anchura (figura 26 G-H).

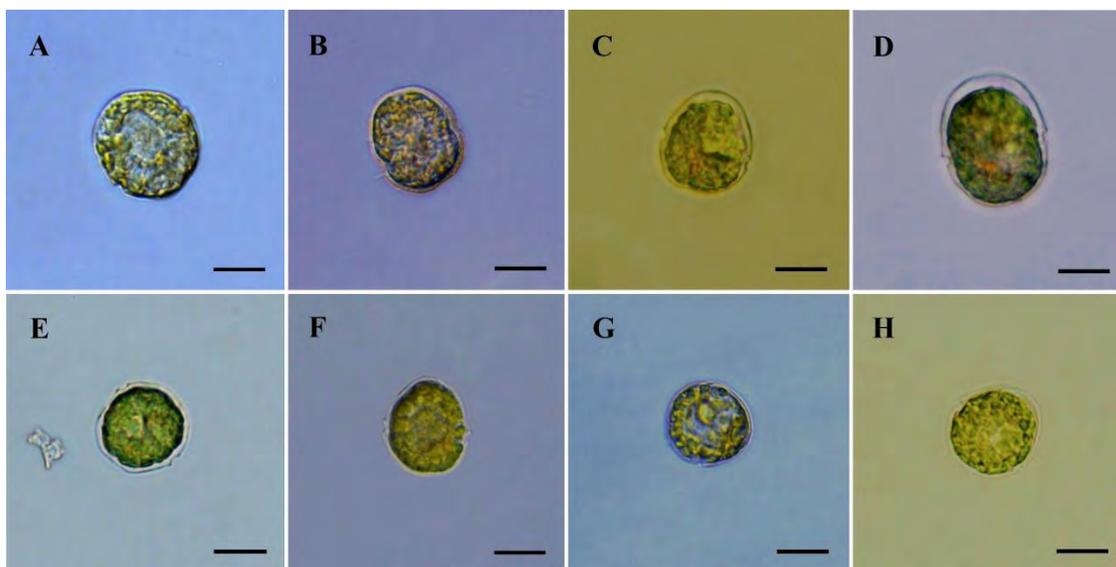


Figura 26. Variaciones morfológicas registradas en los cultivos modificados de la condición eutrófica. A-B: pH 7; C-D: pH 8; E-F: pH 9; G-H: pH 10. Escala de la barra 10 $\mu\text{m}$ .

### **Categoría hipertrófica**

#### **Curvas de crecimiento**

En la figura 27 se presentan las curvas de crecimiento de la categoría hipertrófica para cada tratamiento de pH. Se observó que en la curva de crecimiento de pH 7, el mayor número de células se registró en el día 11, seguido de una fase estacionaria de los días 11-14; a partir del día 16, la población decreció. En la curva de crecimiento de pH 8, la mayor densidad se alcanzó en el día 11; a partir del día 12, la población se mantuvo hasta el día 16, cuando la población comenzó a decrecer. En pH 9, el máximo número de células se registró en el día 11, seguido de un decremento de la población a partir del día 14. En pH 10, se observó la mayor densidad en el día 14, a partir de este registro la población comenzó a decrecer para el día 16.

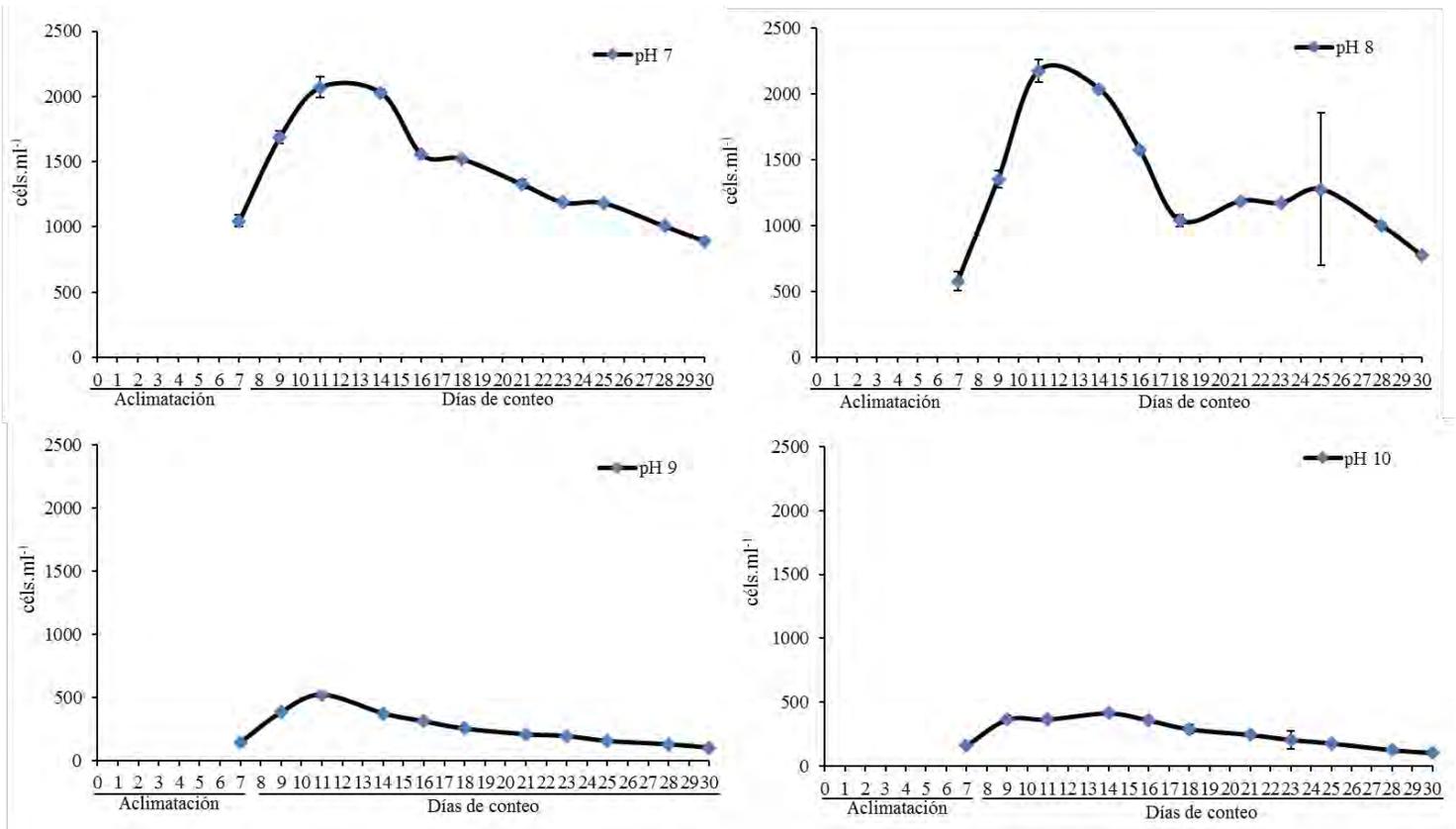


Figura 27. Curvas de crecimiento obtenidas a partir de la densidad celular registrada en la categoría hipertrófica con pH de 7-10.

Los valores obtenidos de la tasa de crecimiento ( $r$ ), número de divisiones por día ( $k$ ) y tiempo de duplicación de la población ( $T_2$ ), a partir de la densidad registrada en los tratamientos de pH de 7-10 de la categoría hipertrófica, se muestran en el cuadro 13.

En esta categoría, se observó que todos los tratamientos de pH comenzaron la etapa de crecimiento exponencial durante los días 7-9, con valores de  $r$  de: 0.238, 0.424, 0.499 y 0.405 respectivamente.

Cuadro 13. Tasa de crecimiento ( $r$ ), número de divisiones por día ( $k$ ) y tiempo de duplicación de la población ( $T_2$ ), obtenidos para los tratamientos de pH 7-10 a partir de los valores de densidad registrados durante la fase experimental 2 en la categoría hipertrófica.

Fecha de conteo	28/04/2015	30/04/2015	2/05/015	05/05/2015	07/05/2015	09/05/2015	12/05/2015	14/05/2015	16/05/2015	19/05/2015	21/05/2015
pH7/Tiempo (días)	0-7	7-9	9-11	11-14	14-16	16-18	18-21	21-23	23-25	25-28	28-30
N2/N1	1048/800	1687/1048	2071/1687	2029/2071	1558/2029	1522/1558	1326/1522	1190/1326	1185/1190	1008/1185	893/1008
$\ln(N_2/N_1)$	1.310	1.610	1.228	0.980	0.768	0.977	0.871	0.897	0.996	0.851	0.886
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	0.270	0.476	0.205	-0.020	-0.264	-0.023	-0.138	-0.108	-0.004	-0.162	-0.122
$r$	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$k$	0.039	0.238	0.103	-0.007	-0.132	-0.012	-0.046	-0.054	-0.002	-0.054	-0.061
$T_2$	0.056	0.344	0.148	-0.010	-0.191	-0.017	-0.066	-0.078	-0.003	-0.078	-0.088
	17.989	2.910	6.754	-101.503	-5.245	-59.857	-15.086	-12.780	-329.222	-12.853	-11.408
pH8/Tiempo (días)	0-7	7-9	9-11	11-14	14-16	16-18	18-21	21-23	23-25	25-28	28-30
N2/N1	580/800	1353/580	2174/1353	2037/2174	1579/1037	1039/1579	1188/1039	1173/1188	1277/1173	999/1277	772/999
$\ln(N_2/N_1)$	0.725	2.335	1.607	0.937	0.775	0.658	1.143	0.988	1.089	0.782	0.773
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	-0.322	0.848	0.474	-0.065	-0.255	-0.418	0.133	-0.012	0.085	-0.246	-0.258
$r$	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$k$	-0.046	0.424	0.237	-0.022	-0.127	-0.209	0.044	-0.006	0.042	-0.082	-0.129
$T_2$	-0.066	0.612	0.342	-0.031	-0.184	-0.302	0.064	-0.009	0.061	-0.118	-0.186
	-15.060	1.635	2.924	-31.870	-5.443	-3.315	15.586	-111.556	16.318	-8.469	-5.378
pH9/Tiempo (días)	0-7	7-9	9-11	11-14	14-16	16-18	18-21	21-23	23-25	25-28	28-30
N2/N1	141/800	382/141	521/382	373/521	310/373	252/310	207/252	193/207	154/193	127/154	101/127
$\ln(N_2/N_1)$	0.176	2.713	1.365	0.715	0.832	0.813	0.823	0.929	0.799	0.827	0.791
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	-1.738	0.998	0.311	-0.335	-0.184	-0.207	-0.195	-0.073	-0.224	-0.190	-0.235
$r$	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$k$	-0.248	0.499	0.156	-0.112	-0.092	-0.104	-0.065	-0.037	-0.112	-0.063	-0.117
$T_2$	-0.358	0.720	0.225	-0.161	-0.133	-0.149	-0.094	-0.053	-0.162	-0.091	-0.170
	-2.791	1.389	4.454	-6.206	-7.529	-6.692	-10.658	-18.894	-6.188	-10.935	-5.899
pH 10/Tiempo (días)	0-7	7-9	9-11	11-14	14-16	16-18	18-21	21-23	23-25	25-28	28-30
N2/N1	163/800	366/163	367/366	415/367	359/415	291/359	247/291	208/247	180/208	128/180	106/128
$\ln(N_2/N_1)$	0.203	2.248	1.005	1.129	0.867	0.809	0.850	0.842	0.867	0.710	0.826
$\Delta t = (t_2 - t_1)$	-1.593	0.810	0.005	0.121	-0.143	-0.212	-0.163	-0.172	-0.143	-0.343	-0.192
$r$	7	2	2	3	2	2	3	2	2	3	2
$k$	-0.228	0.405	0.002	0.040	-0.072	-0.106	-0.054	-0.086	-0.071	-0.114	-0.096
$T_2$	-0.328	0.584	0.003	0.058	-0.103	-0.153	-0.078	-0.124	-0.103	-0.165	-0.138
	-3.046	1.711	304.825	17.155	-9.679	-6.536	-12.773	-8.066	-9.712	-6.066	-7.230

En el registro de la densidad de hipnocigotos para esta categoría, se observó que en pH 7 la mayor densidad de quistes se registró en los días 21. En pH 8 el mayor número de quistes se presentó en el día 16 y el mayor número de quistes presentes en pH 9 fue en el día 21. En pH 10, el mayor número de quistes se presentó en el día 18. Estos valores se relacionaron con los valores de densidad de células (figura 28).

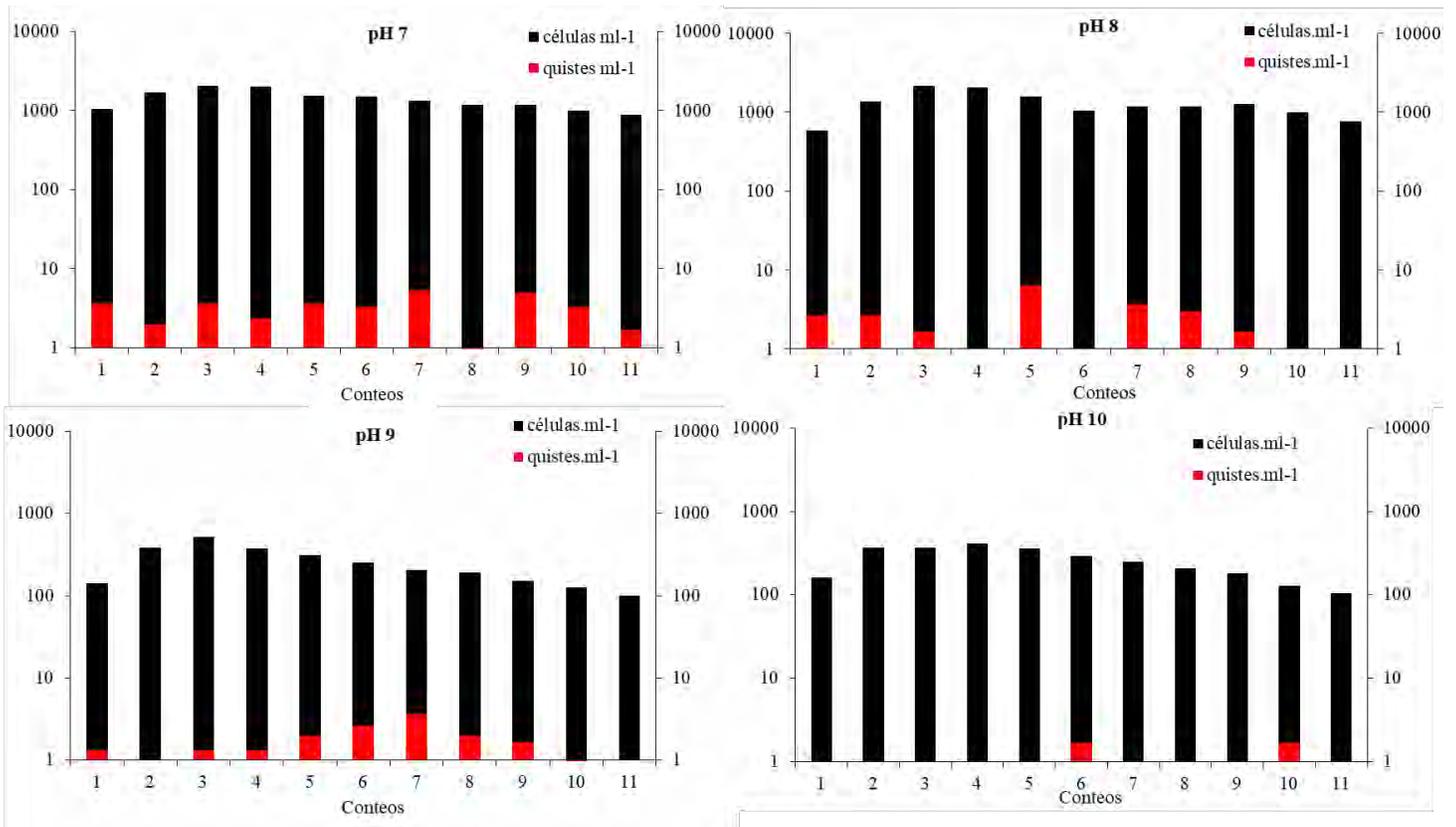


Figura 28. Comparación entre la densidad de células y quistes de resistencia (hipnocigotos) de *Durinskia baltica* en los diferentes tratamientos de pH de la categoría hipertrófica en escala logarítmica.

### Variaciones morfológicas

Se revisaron un total de 396 preparaciones permanentes obtenidas de los 11 conteos del análisis, correspondiendo con 99 preparaciones por cada tratamiento de esta categoría. En el tratamiento de pH 7 se registraron células vegetativas redondeadas con epiteca e hipoteca casi del mismo tamaño o con la epiteca alargada más grande que la hipoteca, sus dimensiones variaron entre 22–35  $\mu\text{m}$  de longitud y 20–30  $\mu\text{m}$  de anchura (figura 29 A-B).

En el tratamiento de pH 8 se observaron células con la hipoteca más pequeña que la epiteca y con terminación cónica, también se observaron células con hundimientos en la zona apical, sus variaron entre 25–37  $\mu\text{m}$  de longitud y 22–30  $\mu\text{m}$  de anchura (figura 29 C-D). En el tratamiento de pH 9 se registraron células con una epiteca visiblemente más grande que la hipoteca la cual también presentó un antápice ligeramente cónico, sus dimensiones variaron entre 22–32  $\mu\text{m}$  de longitud y 17–27  $\mu\text{m}$  de anchura (figura 29 E-F). En el tratamiento con el

pH 10 se registraron células con la epiteca más grande que la hipoteca así como células con el ápice ligeramente cónico, sus dimensiones variaron entre 25–30  $\mu\text{m}$  de largo y 20–27  $\mu\text{m}$  de ancho (figura 29 G-H).

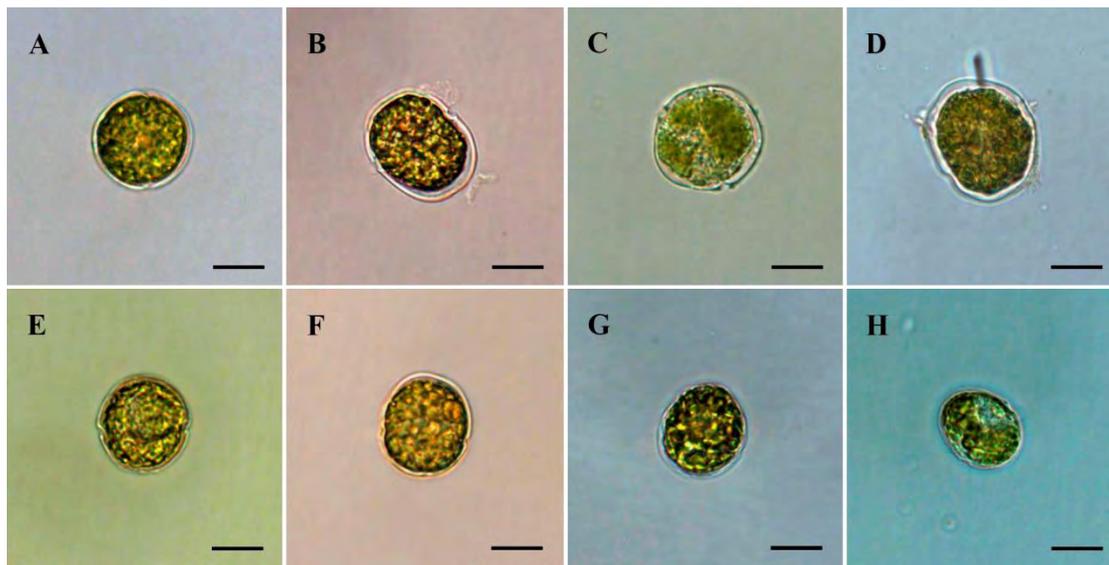


Figura 29. Variaciones morfológicas registradas en los cultivos modificados de la condición hipertrófica. A-B: pH 7; C-D: pH 8; E-F: pH 9; G-H: pH 10. Escala de la barra: 10 $\mu\text{m}$ .

### **Análisis estadísticos**

En las pruebas de ANOVA, se observó que el pH presentó diferencias estadísticamente significativas sobre la densidad celular de las tres categorías tróficas (ANOVA < 0.001) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Resultados de análisis de ANOVA para la densidad de células vegetativas con el último conteo de las categorías mesotrófica, eutrófica e hipertrófica para los tratamientos de pH de 7-10.

MESO/Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Valor-P	Valor crítico de F
Entre los grupos	44265551.74	3	14755183.91	8.473	1.77E-04	2.839
Dentro de los grupos	69653357.19	40	1741333.93			
<b>Total</b>	113918908.9	43				
EU/Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	P	Valor crítico de F
Entre los grupos	3184567.987	3	1061522.662	45.914	5.06E-13	2.839
Dentro de los grupos	924801.253	40	23120.031			
<b>Total</b>	4109369.24	43				
HIPER/Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Valor-P	Valor crítico de F
Entre los grupos	13282472.15	3	4427490.716	41.560	2.30E-12	2.839
Dentro de los grupos	4261337.616	40	106533.440			
<b>Total</b>	17543809.77	43				

Por otra parte, los resultados de las pruebas de ANOVA realizadas con la densidad registrada de quistes entre los diferentes tratamientos arrojaron que en la categoría mesotrófica, no se observaron diferencias significativas. Las densidades de las categorías eutrófica e hipertrófica sí produjeron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 15).

Cuadro 15. Resultados de análisis de ANOVA para la densidad de quistes de resistencia (hipnocigotos) de las categorías mesotrófica, eutrófica e hipertrófica para los tratamientos de pH de 7-10.

MESO/Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	P	Valor crítico de F
Entre los grupos	77.63636364	3	25.87878788	1.639103	0.1955782	2.838745398
Dentro de los grupos	631.5353535	40	15.78838384			
<b>Total</b>	709.1717172	43				
EU/Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	P	Valor crítico de F
Entre los grupos	12.98989899	3	4.32996633	3.16826805	0.03461797	2.838745398
Dentro de los grupos	54.66666667	40	1.366666667			
<b>Total</b>	67.65656566	43				
HIPER/Origen de la variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de cuadrados	F	Valor-P	Valor crítico de F
Entre los grupos	31.33333333	3	10.44444444	6.0186263	0.0017498	2.838745398
Dentro de los grupos	69.41414141	40	1.735353535			
<b>Total</b>	100.7474747	43				

Los resultados de la prueba de t de dos colas de la categoría mesotrófica, produjeron diferencias estadísticamente significativas entre la densidad celular del tratamiento de pH 7 y los tratamientos de pH 8, pH 9 y pH 10, al igual que entre los tratamientos de pH 9 y pH 10 (Anexo 2a).

Los resultados del análisis en donde se comparó la densidad celular de todos los tratamientos de pH de la categoría eutrófica, con la densidad del tratamiento de la categoría mesotrófica de pH 8 (condición óptima), produjeron diferencias estadísticamente significativas en cada caso, a excepción del tratamiento de pH 7 de la categoría eutrófica (Anexo 2b). Los resultados del análisis sólo de la categoría eutrófica produjeron diferencias estadísticamente significativas entre todos sus tratamientos de pH (Anexo 2c).

Los resultados del análisis entre los tratamientos de pH de la categoría hipertrófica con el tratamiento de pH 8 de la categoría mesotrófica, produjo diferencias estadísticamente significativas únicamente el pH 9 (Anexo 2d). Todos los tratamientos de la categoría hipertrófica muestran diferencias significativas entre sí, a excepción de los tratamientos con pH 7 y pH 10 (Anexo 2e).

### Fase experimental 3: Fase experimental 3. Evaluación de la similitud entre las secuencias parciales de los genes 18S y *rbcL* de la población de *Durinskia baltica* de Xochimilco con secuencias de otros ambientes

#### Resultados de la extracción de DNA y PCR

Se extrajeron  $7 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  de DNA nuclear del hospedero de *Durinskia baltica* (Figura 30), a partir de este DNA se realizaron reacciones de PCR utilizando  $3 \mu\text{l}$  de DNA extraído como templete y los oligonucleótidos DbalF (específico), DbalR (específico), EUKA (general) y EUKB (general) para la amplificación del hospedero y los oligonucleótidos DiatrbcL2F (específico) y DiatrbcL5R (específico) para el huésped.

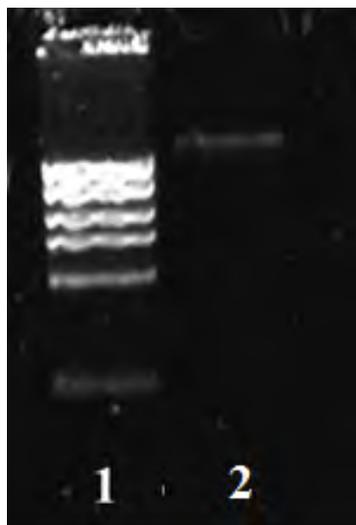


Figura 30. Gel de agarosa al 1%, en el primer carril se observan bandas correspondientes al marcador molecular de alto peso, en el segundo carril se observa una banda correspondiente a los  $7 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  DNA extraído del cultivo de *Durinskia baltica*.

Los productos de las reacciones se purificaron y se obtuvo un banda de aproximadamente 500 pb (Figura 31) con los oligonucleótidos específicos y 1800 pb (Figura 32) con los oligonucleótidos generales para el hospedero.

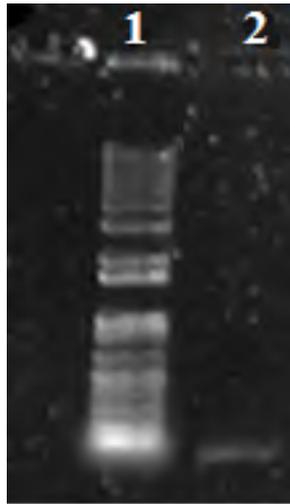


Figura 31. Gel de agarosa al 1%, en el primer carril se observan las bandas del marcador molecular de alto peso, en el segundo se observa una banda de aproximadamente 500 pb correspondiente al producto de PCR con primers específicos.

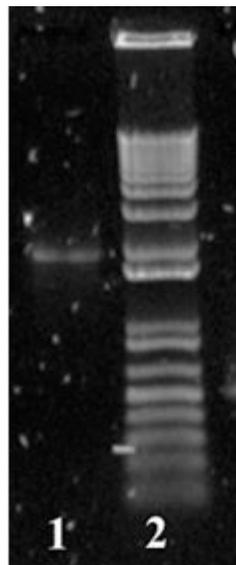


Figura 32. Gel de agarosa al 1%, en el primer carril se observa una banda de aproximadamente 1600 pb correspondiente al producto de PCR con primers generales, en el segundo carril se observan las bandas del marcador molecular de alto peso.

Para el huésped, los productos de las reacciones se purificaron y se obtuvo un banda de aproximadamente 500 pb (Figura 33).

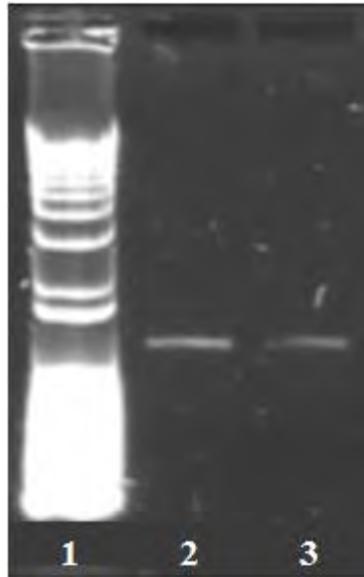


Figura 33. Gel de agarosa al 1%, en el primer carril se observan las bandas del marcador molecular de alto peso, en segundo y tercer carriles, se observan bandas de aproximadamente 500 pb correspondientes al producto de PCR con primers específicos para el gen *rbcL*.

### **Análisis filogenéticos del hospedero y huésped de *Durinskia baltica***

#### **Análisis de secuencias**

Se secuenciaron un total de 588 pb, para el gen 18S de *Durinskia baltica* de Xochimilco, lo cual fue equivalente al 33% del gen 18S completo, el cual, de acuerdo con la literatura está conformado por 1800 pb. Para el gen *rbcL* del endosimbionte de *D. baltica* se secuenciaron un total de 658 pb, equivalente al 47% del tamaño completo de gen que de acuerdo con la literatura es de 1400 pb.

Se analizaron un total de 32 secuencias nucleares del marcador molecular 18S incluyendo al grupo externo *Perkinsus marinus*. Los valores de divergencia inter genérica corregida de las secuencias del marcador 18S fueron de 6.8% para *Kryptoperidinium foliaceum*, 7.1% para *Gaelidium rugatum*, 6% para *Peridinium quinquecorne*, 4.4% para *Peridiniopsis penardii*, 4.9% para *Peridiniopsis cf. kevei* y 4.1 para *Peridinium balticum*. Los valores de divergencia intra genérica fueron de 9.4% para *Durinskia agilis*, 5.7% para *Durinskia capensis*, 7.1% para *Durinskia cf. baltica* y 1.4% para *Durinskia baltica* de China. La matriz original de divergencia corregida se muestra en el anexo 3a.

Se analizaron un total de 22 secuencias nucleares del marcador molecular *rbcL* incluyendo al grupo externo *Bolidomonas pacifica* para el huésped de *Durinskia baltica*. Los valores de divergencia inter genérica corregida fueron de 117.6% para *Nitzschia palea*, 124% para *Nitzschia capitellata*, 155.7% para *Peridinium balticum*, 131.6% para *Galeidinium rugatum*, 113.9% para *Kryptoperidinium foliaceum* y 136.1% para *Cylindrotheca closterium*. La matriz completa de divergencia corregida, se muestra en el anexo 3b.

### **Vecinos cercanos (Neighbor Joining)**

En la figura 34, se presenta el árbol resultante del análisis de vecinos cercanos (Neighbor Joining) a partir de la secuencia del hospedero de *Durinskia baltica* y 31 secuencias nucleares del marcador molecular 18S. El valor de bootstrap se muestra en los nodos.

En este árbol se generaron 2 grandes clados, un clado basal, que agrupó a especies del género *Peridinium* y su clado hermano, que agrupó con bajos valores de soporte de bootstrap secuencias de los géneros *Karenia*, *Amphidinium*, *Karlodinium*, *Akashiwo*, *Peridinium*, *Scropsiella*, *Prorocentrum*, *Heterocapsa*, *Peridiniopsis* y *Gymnodinium*. Los diferentes grupos se formaron con géneros de ambientes marinos y de aguas continentales no salinas indistintamente. Dentro de este gran clado, se distinguió un grupo monofilético con bajo valor de soporte (27) que incluye secuencias de dinotomos de los géneros *Galeidinium*, *Kryptoperidinium*, *Peridinium*, *Peridiniopsis* y *Durinskia*.

En este mismo clado, también se observó que el género *Durinskia* es monofilético, agrupándose con un soporte bajo de bootstrap (27). Dentro de este grupo se observó que la secuencia de *Durinskia capensis* se separó del resto con un valor de soporte de bootstrap bajo (28) mientras que la secuencia de *Durinskia agilis* se separa de las secuencias de *Durinskia baltica* con un valor de soporte alto (98).

Es interesante como las secuencia de *Durinskia cf. baltica* y *Peridinium balticum*, ambas de origen marino, se separan con un valor de soporte alto y medio respectivamente (99/79), de las secuencias de *Durinskia baltica* de China y *Durinskia baltica* de Xochimilco México con un valor medio alto de soporte de bootstrap (82).

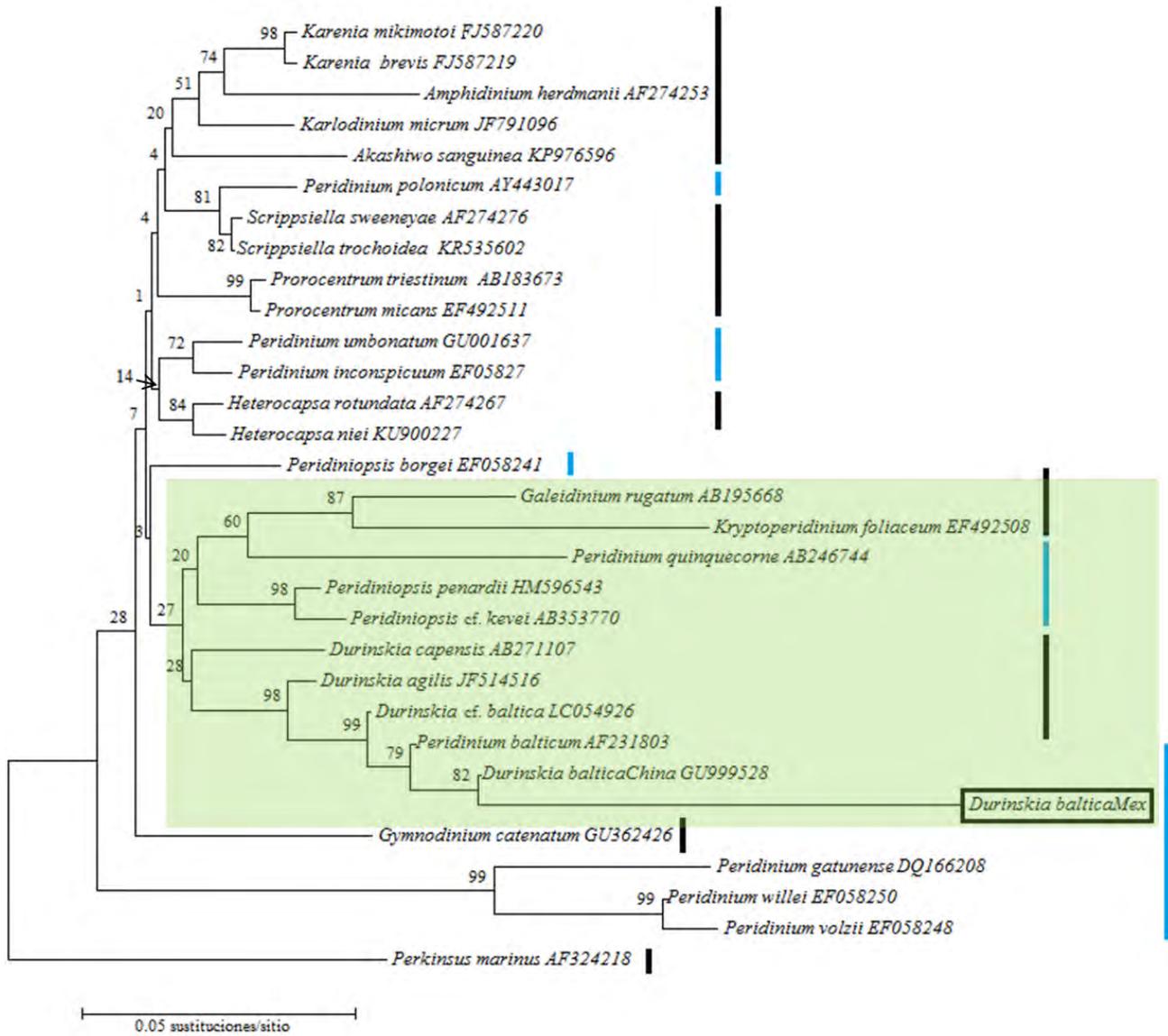


Figura 34. Árbol de distancia construido a partir de secuencias del gen 18S usando el método de vecinos cercanos (Neighbor-Joining). Se muestra la posición filogenética del hospedero de la población de *D. baltica* de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos corresponden con los valores de soporte de bootstrap. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especie de agua continental no salina. Dentro del recuadro verde se agrupan las secuencias de los dinotomos.

En la figura 35, se presenta el árbol resultante del análisis de vecinos cercanos (Neighbor Joining) a partir de la secuencia del huésped de *Durinskia baltica* y 21 secuencias nucleares del marcador molecular *rbcL*. Los valores de soporte de bootstrap, se muestran junto a los nodos. En esta filogenia se formaron 2 clados hermanos, uno de los clados agrupó con un valor bajo de bootstrap (57), a la secuencia del endosimbionte del dinotomo de agua continental no

salina *Peridinium quinquecorne* junto con secuencias de diatomeas marinas del género *Chaetoceros* con un valor de soporte alto (100).

En el clado hermano se agruparon indistintamente con valores bajos de soporte, secuencias de diatomeas de los géneros *Nitzschia*, *Cylindrotheca*, *Pseudonitzschia*, *Odontella*, *Bacillaria*, *Rhizosolenia*, *Skeletonoma*, *Thalassiosira*, *Cyclotella* y *Discostella* con endosimbiontes de origen marino y de aguas continentales no salinas de los géneros *Peridinium*, *Durinskia*, *Kryptoperidinium*, *Galeidinium* y *Peridiniopsis*.

Dentro de este clado, se observó que los endosimbiontes de las dinofitas dinotomos *Peridinium balticum* y *Durinskia baltica* de Xochimilco se agruparon con un valor bajo de soporte de bootstrap (42), la secuencia del endosimbionte de *Kryptoperidinium foliaceum* se separó de las últimas, con un valor bajo de soporte (32) y las tres se agruparon con secuencias de diatomeas de aguas continentales no salinas del género *Nitzschia* con un valor de soporte medio (50).

Otra agrupación interesante dentro de este clado, se observó con la secuencia del endosimbionte de la dinofita *Peridiniopsis penardii*, la cual se ubicó con un valor alto de soporte de bootstrap (94), como hermana de la secuencia del endosimbionte de *Peridiniopsis* cf. *kevei*; esta secuencia, a su vez se agrupó con las secuencias de diatomeas de origen continental no salino de los géneros *Cyclotella* y *Discostella* con un valor de soporte alto.

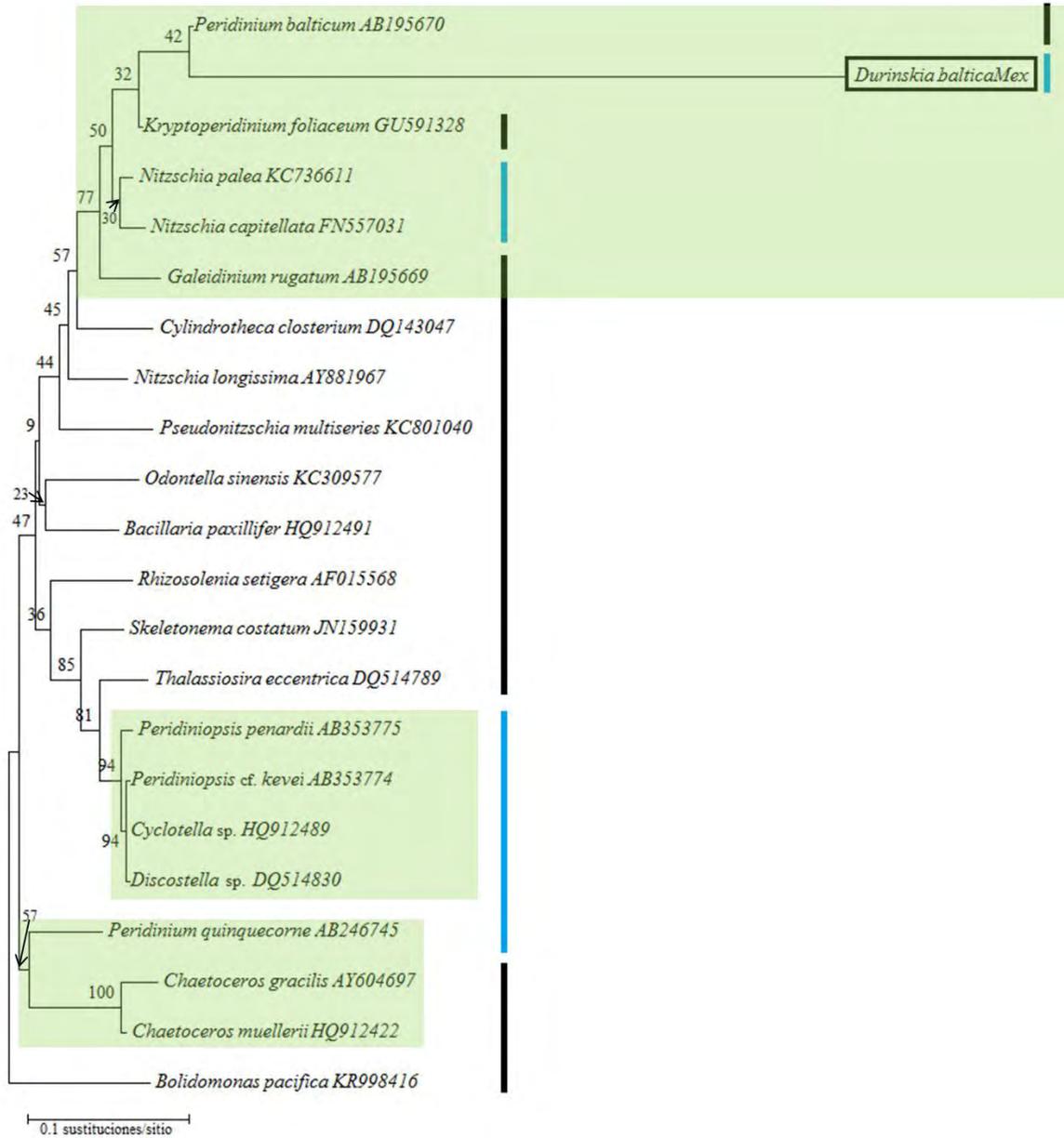


Figura 35. Árbol de distancia construido a partir de secuencias del gen *rbcL* usando el método de vecinos cercanos (Neighbor-Joining). Se muestra la posición filogenética del huésped de la población de *D. baltica* de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos indican los valores de soporte de bootstrap. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especies de agua continental no salina. Los recuadros verdes muestran a los dinotomos.

## Máxima Parsimonia

En el cuadro 16, se muestra el número total, así como, la proporción de caracteres variables informativos para la parsimonia. En la figura 36, se muestra el árbol de consenso de mayoría elegido de un total de 7 árboles generados del análisis de máxima parsimonia para la secuencia del gen 18S de *Durinskia baltica* de Xochimilco.

Cuadro 16. Número de caracteres utilizados en los análisis de máxima parsimonia para los genes 18S y *rbcL* de la secuencia de *Durinskia baltica* de Xochimilco

Gen	Número de caracteres	Caracteres constantes	Caracteres variables no informativos	Caracteres variables informativos
18S	603	319	150	134
<i>rbcL</i>	678	281	245	152

Para este análisis, el valor del índice de consistencia fue de 0.64 y el valor del índice de retención fue de 0.61. En el árbol, se observó que, al igual que en el árbol de distancia se generaron dos clados, uno basal con valores de soporte de bootstrap altos (100/100) que también agrupó secuencias del género *Peridinium* y otro en donde se agruparon los géneros restantes con un valor de soporte medio (63).

En este clado se observó una marcada diferencia con la topología de distancia ya que se puede observar una politomía con un valor de soporte de 53, entre los géneros *Heterocapsa*, *Peridiniopsis*, *Akashiwo*, *Peridinium*, *Prorocentrum* y *Scrippsiella*. Al igual que en el árbol de distancia se pudo observar una agrupación de las secuencias de los dinotomos con un valor de soporte de 66, sin embargo, dentro de este grupo se generó otra politomía con las secuencias de los dinotomos *Durinskia capensis*, *Galeidinium rugatum*, *Kryptoperidinium foliaceum* con un valor de soporte de 98; *Peridinium quinquecorne* se agrupó con *Peridiniopsis penardii* y *Peridiniopsis* cf. *kevei* con valores de soporte de 66/100. En esta topología también se agruparon las secuencias del género *Durinskia* en un clado monofilético con un valor alto de soporte de bootstrap (99) la posición de las secuencias de este género coincide con las descritas en el árbol de distancia, pero con valores de soporte más bajos.

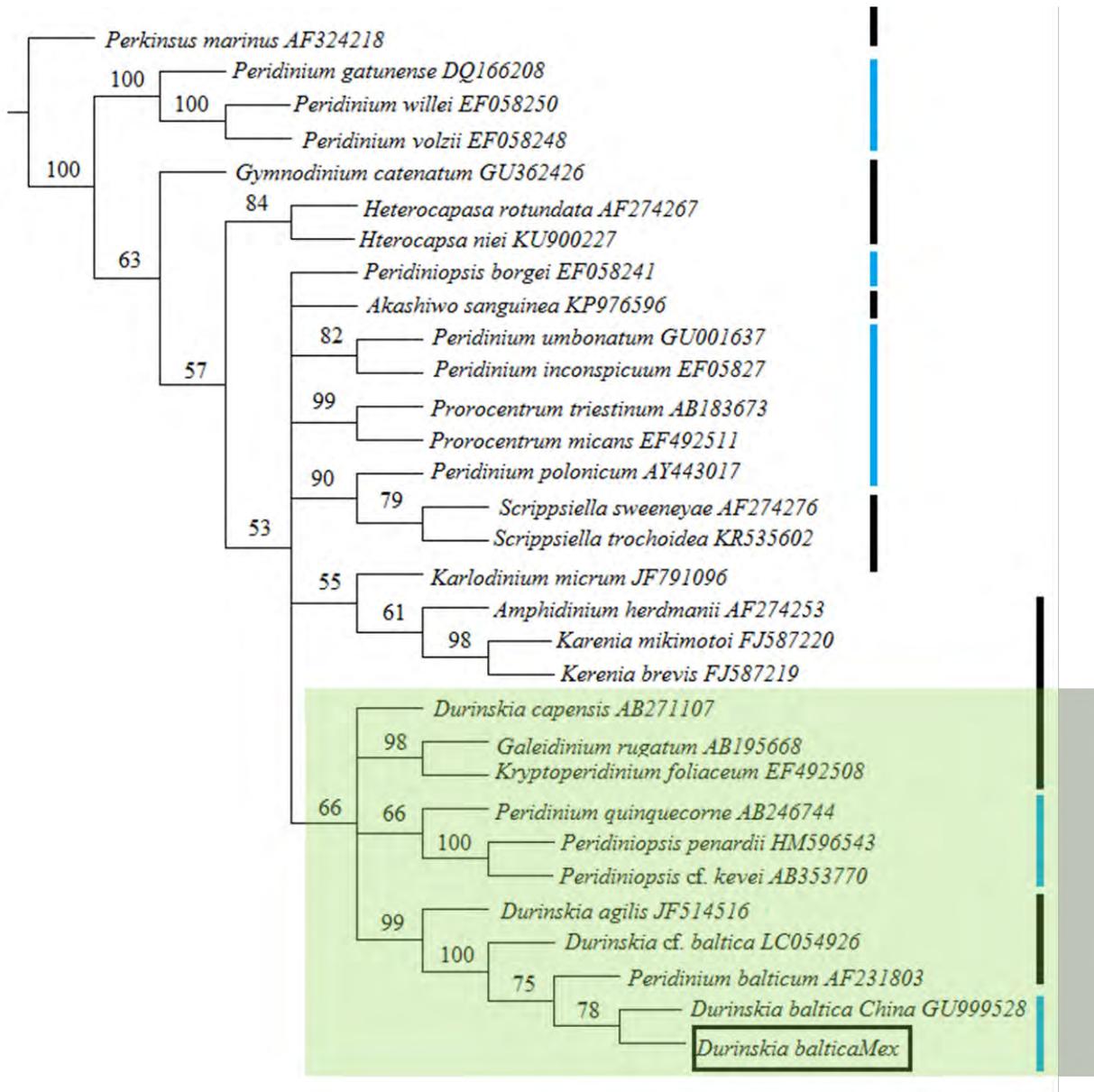


Figura 36. Árbol de consenso de mayoría de máxima parsimonia construido a partir de secuencias del gen 18S. Se muestra la posición filogenética del hospedero de la población de *D. baltica* de Xochimilco. Los números ubicados a la izquierda de los nodos corresponden con el valor de soporte de bootstrap. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especie de agua continental dulce. Dentro del recuadro verde se agrupan las secuencias de dinotomos.

En la figura 37, se muestra el árbol de consenso de mayoría elegido de un total de cuatro árboles, generados a partir del análisis de máxima parsimonia con el gen *rbcL* para la secuencia del endosimbionte de *Durinskia baltica* de Xochimilco. En el cuadro 15, se muestra el número total, así como, la proporción de caracteres variables informativos para la parsimonia.

En este análisis el valor del índice de consistencia fue de 0.6 y el índice de retención fue de 0.53. Al igual que se observó en el árbol de distancia, en este árbol se generaron 2 clados, el primero comparte la topología que se describió para el árbol de distancia agrupando secuencias del género *Chaetoceros* con las secuencias del endosimbionte de *Peridinium quinquecorne* con un valor alto de soporte de bootstrap (100).

El segundo clado también agrupó el resto de las secuencias y al igual que en árbol de distancia se formaron dos grupos diferentes con secuencias de endosimbiontes. En el primero de estos grupos, se observó una coincidencia con el árbol de distancia en cuanto a las secuencias que lo conformaron, sin embargo, la posición fue diferente, siendo que la secuencia del endosimbionte de *Peridiniopsis penardii* se ubicó como hermana de la secuencia de la diatomea del género *Cyclotella* con un valor de soporte de 96, esta secuencia a su vez resultó hermana del grupo conformado por la secuencia del endosimbionte de *Peridiniopsis cf. kevei* y la diatomea del género *Discostella* con un valor de soporte de 96.

El siguiente grupo de este clado, también difirió del árbol de distancia con respecto a la posición de las secuencias ya que en este caso las secuencias de las diatomeas del género *Nitzschia* se agruparon juntas con un valor de soporte de 50 como grupo hermano del endosimbionte de *Peridinium balticum* (soporte de 100) como hermana de *Galeidinium rugatum* y esta a su vez hermana de *Kryptoperidinium foliaceum* y *Durinskia baltica* de México con un valor de soporte de 100.

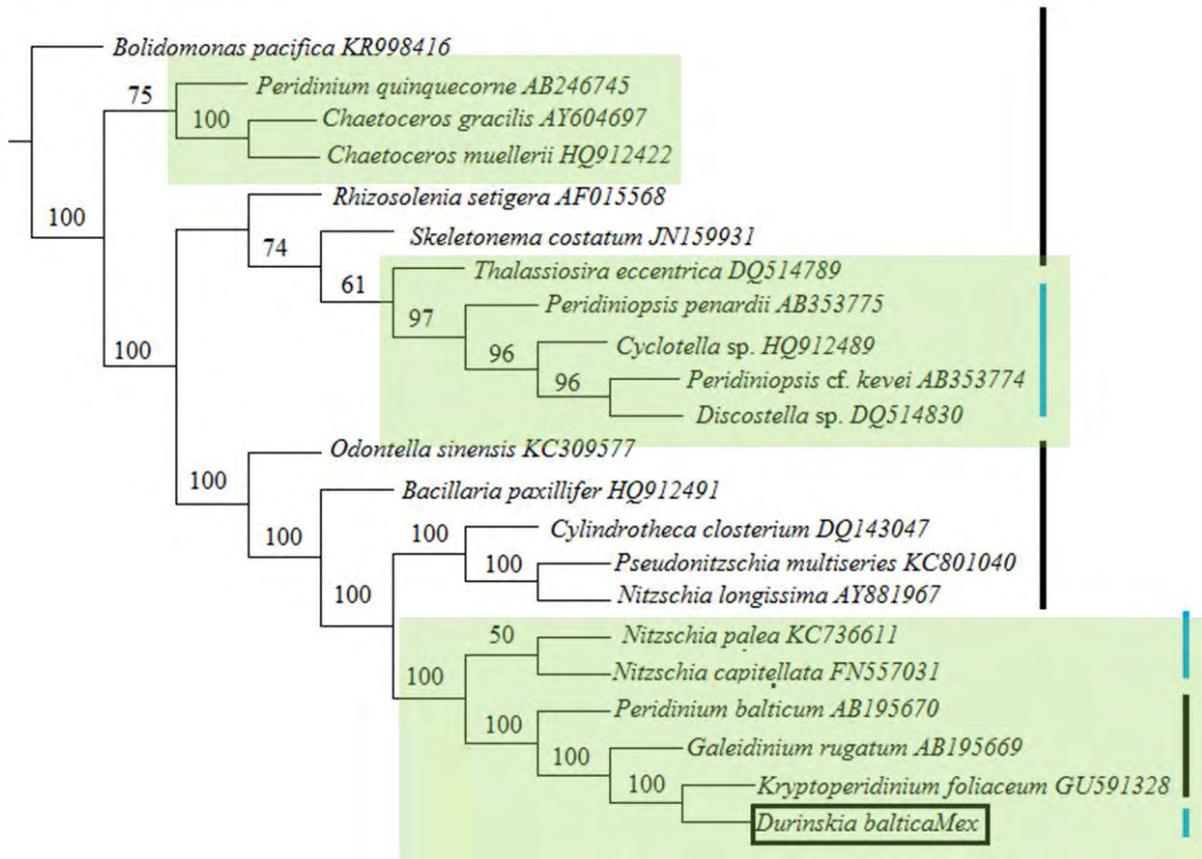


Figura 37. Árbol de consenso de mayoría de máxima parsimonia construido a partir de secuencias del gen *rbcL*. Se muestra la posición filogenética del huésped de la población de *D. baltica* de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos indican los valores de soporte de bootstrap. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especies de agua continental no salina. Los recuadros verdes muestran a los dinotomos.

### Máxima verosimilitud

En la figura 38, se presenta el árbol resultante del análisis de máxima verosimilitud para el gen 18S de la secuencia de *Durinskia baltica* de Xochimilco. En esta filogenia se observó que se generaron 2 clados, a diferencia de los árboles de distancia y máxima parsimonia, uno de los clados estuvo conformado por la secuencia de *Gymnodinium catenatum* y el otro clado estuvo conformado por el resto de las secuencias con un valor de soporte de bootstrap bajo (32).

En el segundo gran clado, al igual que en árbol de distancia y parsimonia se agruparon con valores de soporte altos (100) las secuencias del género *Peridinium*, por otra parte, se observó una politomía en las secuencias del género *Heterocapsa* con un valor de soporte medio de 76.

Al igual que en los árboles de los análisis anteriores las secuencias de dinofitas dinotomos se agruparon juntas con un valor de soporte de 28.

En este grupo se observó a las secuencias de los géneros *Kryptoperidinium* y *Galeidinium* juntas, con un valor de soporte de 99, como grupo hermano a estas secuencias se encontró a *Peridinium quinquecorne* con un valor de soporte de 34, que a su vez se separó de las secuencias del género *Peridiniopsis* con un valor de soporte de 90.

En este mismo grupo, se volvió a observar que el género *Durinskia* es monofilético a pesar de presentar un valor de soporte de bootstrap de 38. En este grupo también se vuelve a observar a la secuencia de *Durinskia baltica* de China agrupada con la secuencia de *Durinskia baltica* de México con un valor de soporte de 76, ambas secuencias son de aguas continentales no salinas.

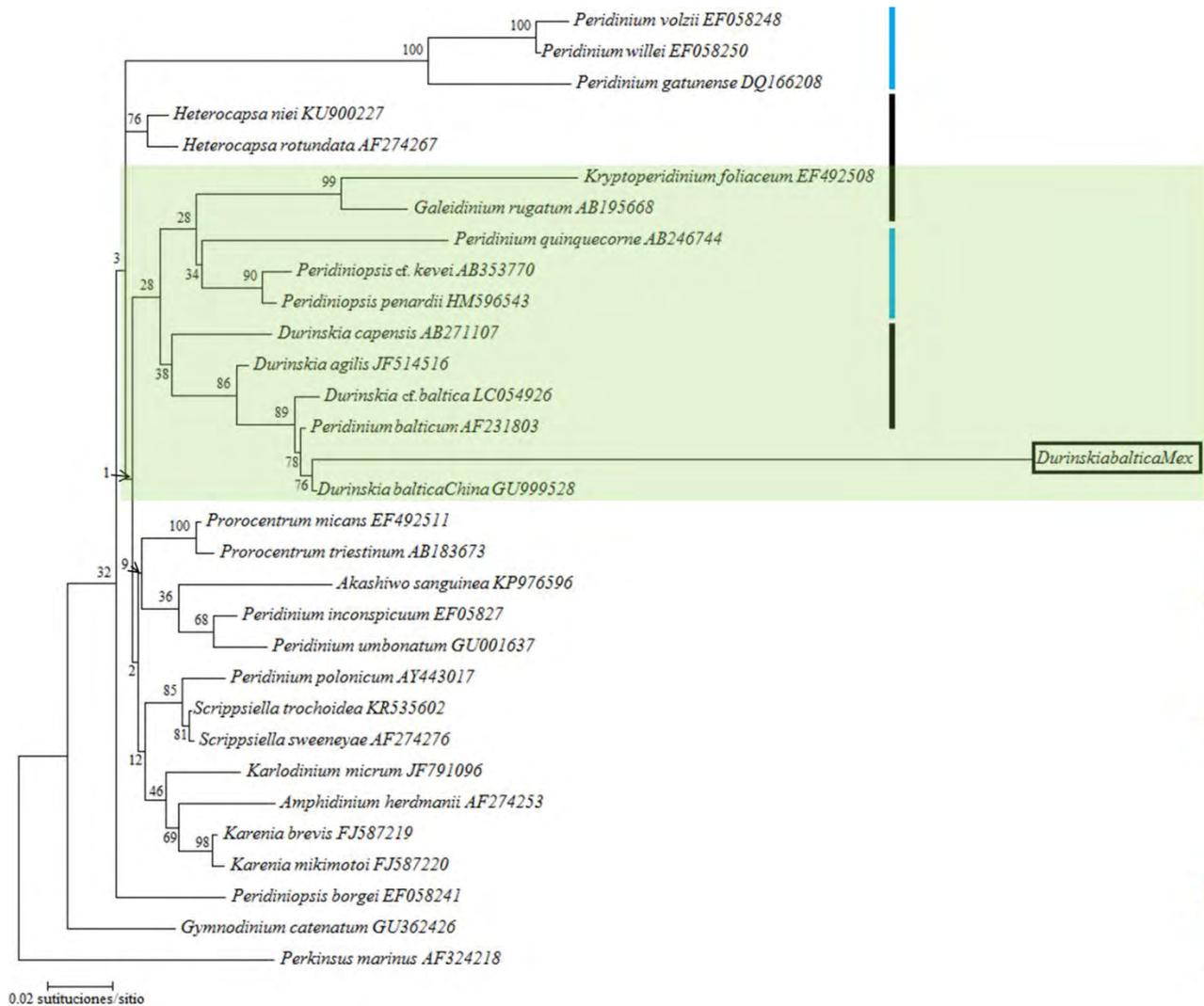


Figura 38. Árbol de máxima verosimilitud inferido a partir de las secuencias del gen 18S, se muestra la posición filogenética del hospedero de *Durinskia baltica* de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos indican los valores soporte de bootstrap. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especie de agua continental dulce. En el recuadro verde se muestran los dinotomos.

En la figura 39 se muestra el árbol resultante del análisis de máxima verosimilitud para el gen *rbcL* de la secuencia de *Durinskia baltica* de Xochimilco. En este árbol se observaron los mismos dos clados formados en los análisis de distancia y parsimonia. El primer clado, coincidió con los análisis anteriores en la posición de las secuencias y los valores de soporte altos.

En el segundo clado se formaron los mismos dos grupos con secuencias de endosimbiontes que en los análisis anteriores, pero con ligeros cambios en la posición de algunas secuencias. La secuencia del endosimbionte de *Peridiniopsis penardii* se ubicó como hermana con un valor

alto de soporte (100) del grupo de la diatomea del género *Discosella*, esta a su vez, se separa del grupo conformado por la diatomea del género *Cyclotella* y la secuencia del endosimbionte de *Peridiniopsis* cf. *kevei* con un valor de soporte de 100.

Las secuencias agrupadas dentro del segundo grupo con endosimbiontes de este clado, presentaron posiciones diferentes en comparación con los análisis de distancia y parsimonia. La secuencia de la diatomea *Pseudonitzschia multiseriis* se agrupó con un valor de soporte muy bajo (3) como hermana del grupo formado por la secuencia del endosimbionte de *Durinskia baltica* de México y la diatomea continental no salina *Nitzschia longissima* con un valor de soporte bajo (42).

La secuencia de la diatomea *Cylondrotheca closterium* se separó con un soporte bajo (42) de la secuencia del endosimbionte de *Peridinium balticum*, la cual, a su vez, se separó con un valor de soporte de 13 de las secuencias de los endosimbiontes de las dinofitas marinas *Kryptoperidinium foliaceum* y *Galeidinium rugatum*, estas secuencias, se agruparon juntas con un valor de soporte de 28 como grupo hermano de las diatomeas continentales no salinas del género *Nitzschia* con un valor de soporte bajo (54).

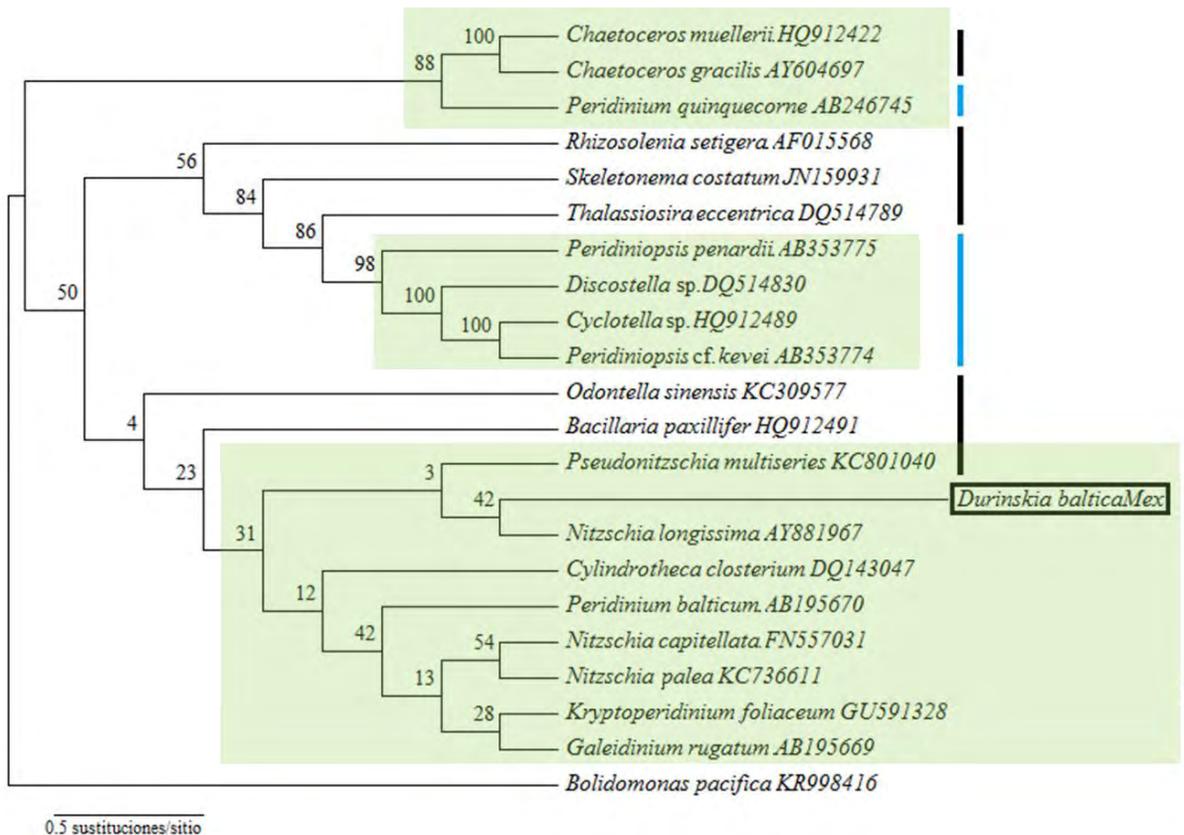


Figura 39. Árbol de máxima verosimilitud inferido a partir de las secuencias del gen *rbcL*, se muestra la posición filogenética del huésped de *Durinskia baltica* de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos indican los valores de soporte de bootstrap. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especies de agua continental no salina. Los recuadros verdes muestran a los dinotomos.

## Inferencia Bayesiana

En la figura 40 se muestra el árbol de consenso resultado del análisis de inferencia Bayesiana generado a partir de la secuencia del gen 18S de *Durinskia baltica* de Xochimilco. En este árbol se observó la misma topología que la descrita para el árbol de máxima verosimilitud. Se generaron dos clados, el primero fue conformado por la secuencia de *Gymnodinium catenatum*, en el segundo clado se agruparon el resto de las secuencias y al igual que en los análisis anteriores se formó un grupo en donde se congregaron las secuencias de las dinofitas dinotomos.

En éste grupo se agruparon las secuencias de los géneros *Kryptoperidinium* y *Galeidinium* con valor de probabilidad posterior (pp) alto (1) y como grupo hermano de los géneros *Peridinium* y *Peridionopsis* con un valor medio de pp (0.67). Las secuencias del género *Durinskia* se congregaron en un grupo monofilético, al igual que en los análisis anteriores.

Las secuencias de *Durinskia baltica* de China y la secuencia de *Durinskia baltica* de México se agruparon con un valor medio de pp (0.67), ambas secuencias son de ambientes continentales no salinos. Fuera del grupo de los dinotomos, se formaron politomías con las secuencias de los géneros *Peridinium* (0.99/1 pp), *Peridiniopsis*, *Prorocentrum* y *Heterocapsa* (1/1 pp).

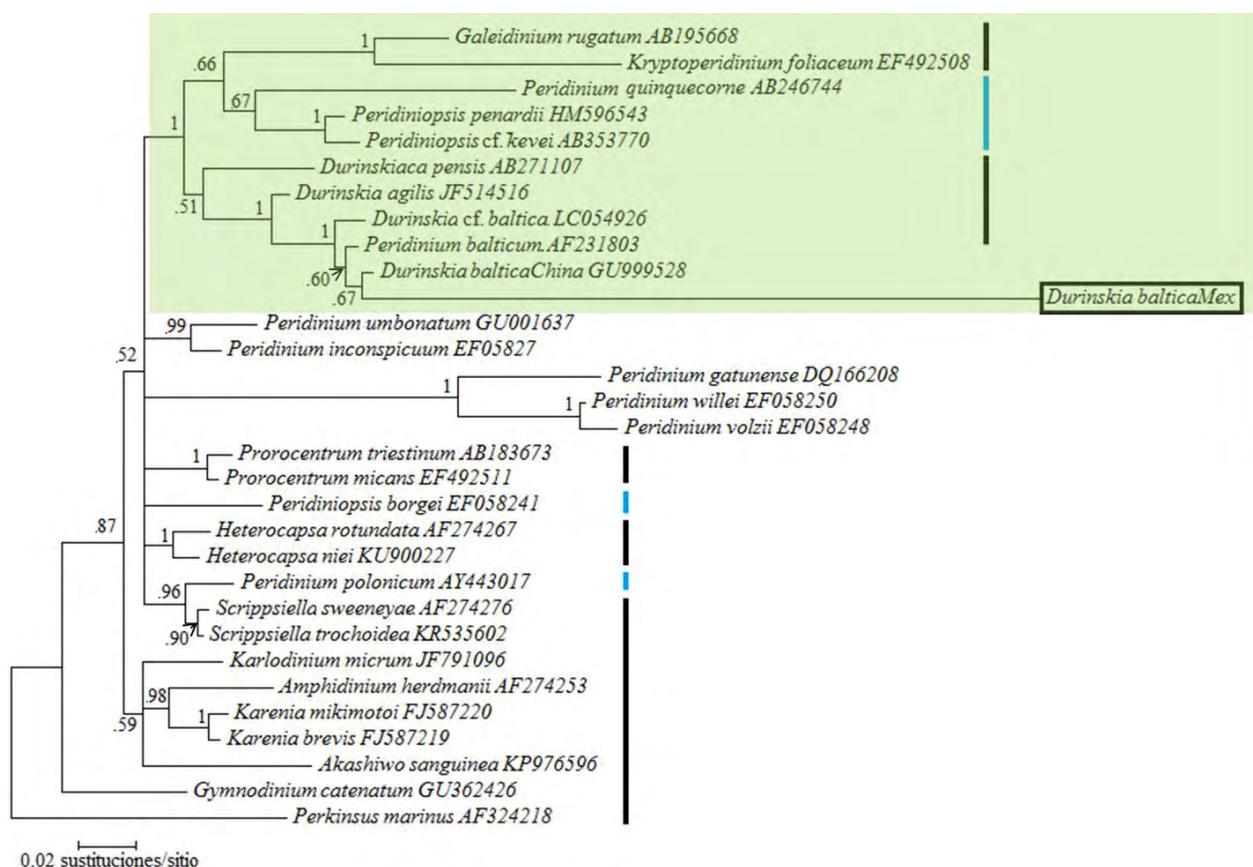


Figura 40. Árbol de consenso generado por el análisis de inferencia Bayesiana a partir de la secuencia del gen 18S, se muestra la posición filogenética del hospedero de *Durinskia baltica* de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos indican los valores de probabilidad posterior. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especie de agua continental dulce. En el recuadro verde se muestra a los dinotomos.

En la figura 41 se muestra el árbol de consenso resultado del análisis de inferencia Bayesiana generado a partir de la secuencia del gen *rbcL* de *Durinskia baltica* de Xochimilco. La topología de este árbol coincide con las de los árboles de parsimonia y verosimilitud, en donde también se generaron 2 clados; en uno de los clados se agrupó la secuencia del endosimbionte de *Peridinium quinquecorne* con secuencias de diatomeas marinas del género *Chaetoceros*, con un valor alto de pp (1).

En el segundo clado resaltaron dos grupos que coincidieron con los grupos formados en los análisis anteriores. En el primero de estos grupos, la secuencia de la diatomea marina *Thalassiosira eccentrica* se separó con un valor de pp alto (1) de la secuencia del endosimbionte de *Peridiopsis penardii* que a su vez se separó de la agrupación de la secuencia del endosimbionte de *Peridiniopsis* cf. *kevei* con las diatomeas continentales no salinas *Cyclotella* sp. y *Discostella* sp. con un valor de pp alto (1).

El segundo grupo que resaltó en este clado fue el conformado por las secuencias de los endosimbiontes de las dinofitas dinotomos con un valor de pp alto (0.86). La secuencia del endosimbionte de *Peridinium balticum* se separó de las secuencias de los endosimbiontes de *Galeidinium rugatum* y *Kryptoperidinium foliaceum* con un valor de pp medio (0.70); dentro de esta misma agrupación se ubicó la secuencia de *Durinskia baltica* de México, con una politomía, y las secuencias de las diatomeas continentales no salinas del género *Nitzschia*, a su vez, se separaron con un valor de pp alto (0.85).



Figura 41. Árbol de consenso generado por el análisis de inferencia Bayesiana a partir de la secuencia del gen *rbcL*, se muestra la posición filogenética del huésped de *Durinskia baltica* de Xochimilco. Los números a la izquierda de los nodos indican los valores de probabilidad posterior. Las barras en color negro indican a los conjuntos de especies marinas y las barras en color azul indican conjuntos de especie de agua continental dulce. En los recuadros verdes se muestran los dinotomos.

## Discusión

### Características ambientales generales del canal de Japón con base en su hidroquímica

Este tipo de agua se define como aguas continentales no salinas correspondientes con la Zona I (Xochimilco) de la subcuenca hidrológica de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) (Lafragua-Contreras *et al.*, 2003). La tendencia de los cationes dominantes a conservar la misma proporción a lo largo de todas las recolecciones, de acuerdo con Guevara-Olivar (2014), se puede relacionar con material parental poco intemperizado, así como que las altas concentraciones de cloruros y bicarbonatos pueden indicar procesos de hidromorfismo e intemperismo autóctono, así como influencia de aguas de desecho doméstico en el caso de los cloruros.

El porcentaje del coeficiente de variación de cada uno de los iones mayores sobrepasa el 10%, sugiriendo que los valores de los iones mayores representados en el diagrama de Maucha, tienen un intervalo de variación más amplio que lo esperado en condiciones no afectadas por fenómenos de concentración/dilución y, por lo tanto, no representan valores estables. Lo anterior sugiere que el sistema es más vulnerable al efecto de factores externos, como puede ser la mezcla de agua alóctona proveniente de la descarga de aguas de desecho, las cuales pueden afectar la dinámica físicoquímica y biológica del canal.

### Tasa de crecimiento

Los resultados de los valores de la tasa de crecimiento de *Durinskia baltica* con las diferentes condiciones de cultivo se encuentran en el intervalo entre  $r = 0.11$  y  $0.616$ , este comportamiento coincide con las tasas de crecimiento reportadas para otras especies de dinofitas en diferentes investigaciones (Ichimi *et al.*, 2001; Litaker *et al.*, 2002; Garcés *et al.*, 2005; Veldhuis *et al.*, 2005; Solte y Garcés, 2006).

### División asexual

Las observaciones en cultivo de la mitosis de *Durinskia baltica* coinciden con las principales características descritas por Spector (1984) respecto a este proceso, las cuales resume en tres

procesos principales: 1) la cubierta nuclear persiste a través de la mitosis, 2) los cromosomas, que permanecen condensados y con una morfología compacta durante todo el ciclo celular, se adhieren a los microtúbulos que atraviesan el núcleo antes de segregarse y 3) los canales citoplasmáticos que conteniendo al “huso mitótico” (haz de microtúbulos) intra nuclear atraviesan al núcleo durante la mitosis (Hoek et al., 1995).

Las características de la división de *Durinskia baltica* son similares a las de otras dinofitas del mismo orden, como reportan Kretschmann *et al.* (2015) para *Peridinium acuminatum*, en la cual la división celular es normalmente por eleuteroquiasis. Las células tecadas se abren desde la arruga superior del cíngulo para liberar a las células en división o ecdisis. También se observó una célula elongada e inmóvil al fondo de la placa de cultivo con una teca vacía a su lado, como se describió para *Durinskia baltica*.

## **Reproducción sexual**

### *Morfología de gametos*

El único antecedente de la reproducción de *Durinskia baltica* se encuentra en el trabajo de Chesnick y Cox (1989), dentro del cual la descripción de los gametos no es clara debido a confusiones con la forma de las células vegetativas en estado de inanición. Nuestras observaciones detalladas del proceso de fusión de *Durinskia baltica* en cultivo, nos permitieron establecer que las células vegetativas actúan como gametos, sin variación de la forma, resolviendo la confusión previa en la literatura.

### *Fusión de gametos*

Para que ocurra la fusión, los gametos tienen que pasar a través de las tres membranas que componen la cubierta celular o anfiesma las cuales se corresponden con: la membrana externa, la membrana vesicular anfiesimal externa y la membrana vesicular anfiesimal interna (Figura 42); las vesículas anfiesimales contienen las placas tecales, además de presentar una capa pelicular subyacente a las placas tecales (Morill y Loeblich, 1983; Chesnick y Cox, 1989). Para que esto ocurra, se han descrito principalmente dos mecanismos que consisten en la separación o disolución enzimática de placas y membrana (Pfiester, 1984; Pfiester *et al.*, 1984; Chesnick y Cox, 1989).

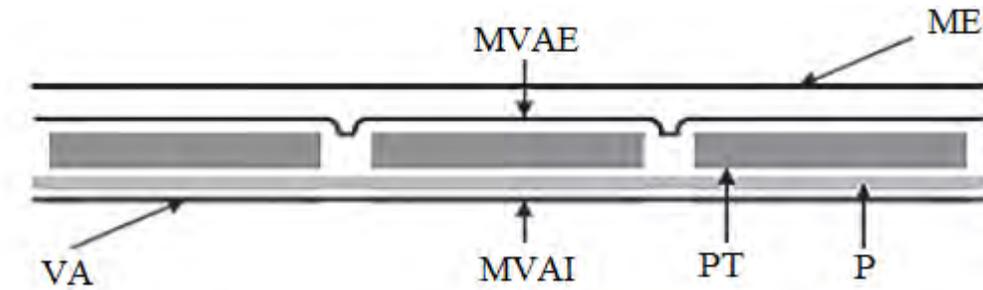


Figura 42. Distribución esquemática de las membranas del anfiesma de acuerdo con Morrill y Loeblich (1983). ME: membrana externa; MVAE: membrana de la vesícula anfiesimal externa; PT: placa tecal; P: película; MVAI: membrana de la vesícula anfiesimal interna; VA: vesícula anfiesimal. Modificado de Pozdnyakov y Skarlato, 2012.

Aun cuando no fue nuestro objetivo comprobar si ocurrió algún tipo de proceso enzimático previo a la unión de gametos en cultivo, pudimos observar que, una vez que la membrana externa de ambos gametos se fusiona, ocurre un desprendimiento de ciertas placas previo a la cariogamia; estas observaciones concuerdan con las descripciones de Chesnick y Cox (1989) en donde indican que la fusión en esta especie ocurre por un contacto directo entre gametos generado por desprendimiento de placas.

Existen descripciones de especies de dinofitas del orden de las Perdiniales que comparten características similares de la fusión de gametos con *Durinskia baltica*, a pesar de que no se detalla el desprendimiento de placas. Kretschmann *et al.* (2015) describen la orientación perpendicular de los gametos con respecto a sus pares cingulares para *P. acuminatum* en donde uno de ellos se adhiere de la zona del ápice al cingulo del otro, coincidiendo con lo que describimos para *D. baltica*.

#### *Formación del planomeiocito y quistes peliculares sexuales*

En este trabajo se describió que cuando ocurre la fusión y se forma el planocigoto, el destino de este puede ser la formación de un quiste pelicular sexual, que puede generar un planomeiocito o la formación de un hipnocigoto.

Sin embargo, existen trabajos en los que la producción del planomeiocito se relaciona directamente con la división meiótica retardada del hipnocigoto (Pfiester, 1976; 1977; von Stosch; 1972; 1973; Blackburn y Parker, 2005) ya que este planomeiocito generalmente ha sido descrito como una estructura diploide que se produce de la germinación del hipnocigoto

y, por lo tanto, la meiosis ocurrirá dentro de este (Blackburn et al., 1989; Blackburn y Parker, 2005), posicionando al planomeiocito como una estructura intermedia entre la germinación del hipnocigoto y la división meiótica para el restablecimiento de la población haploide (Figura 43).

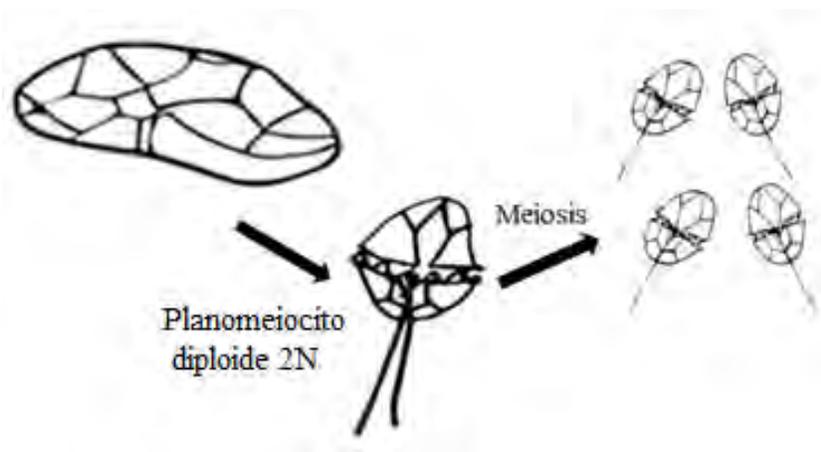


Figura 43. Representación esquemática de la relación entre el hipnocigoto y planomeiocito (esquema propio).

Existen muy pocas descripciones de especies en las que se presenten quistes peliculares sexuales relacionados con la generación del planomeiocito sin embargo, especies como *Lingulodinium polyedrum* (Figuroa y Bravo, 2005) y *Alexandrium taylori* (Figuroa et al., 2006a) presentan el mismo comportamiento que describimos para *Durinskia baltica*, en donde el planomeiocito se puede originar de la germinación del quiste pelicular sexual y es dentro de esta estructura en donde ocurre la meiosis que dará lugar a nuevas células haploides. No obstante, estas especies pertenecen al orden de los Gonyaulacales, mientras que especies del mismo orden que *Durinskia baltica* no presentan el comportamiento mencionado después de la fusión de gametos. Tal es el caso de *Scrippsiella lachrymosa*, en la cual y según Persson et al. (2016), después de la fusión se forman quistes de resistencia que pueden producir planomeiocitos diploides. Posteriormente, al inicio de la nueva temporada de crecimiento, los quistes de resistencia germinan desde el sedimento y los planomeiocitos diploides emergen. Cada una de estas células se divide en dos células vegetativas haploides que a su vez se dividen por fisión binaria.

### *Quistes peliculares sexuales e hipnocigotos*

En relación a los diferentes quistes que se describieron en los cultivos de *D. baltica*, se ha observado que, en los estudios de ciclo de vida, comúnmente se han producido confusiones e interpretaciones equivocadas referentes a los quistes peliculares de origen sexual y los hipnocigotos. Como refieren Figueroa *et al.* (2006a), en muchas especies es muy fácil confundir la morfología de estos quistes, ya que tanto en las etapas del ciclo de vida asexual como en el sexual se pueden formar quistes peliculares. Estos quistes son, generalmente de pared delgada, de una sola capa, carecen de ornamentaciones y sustancias de reserva; es por esto que en muchas ocasiones sólo cuando el quiste de resistencia es identificado es cuando el quiste pelicular puede ser diferenciado.

A comparación de los hipnocigotos, algunos autores han descrito los quistes peliculares como estructuras temporales de resistencia con periodos de latencia cortos, pero lo más importante es que han sido reportados como estructuras que pueden o no ser de origen sexual (Figueroa *et al.*, 2006a; Kremp y Parrow, 2006) y esto es debido a que algunas especies como *Kryptoperidinum foliaceum* producen quistes peliculares sexuales y asexuales con morfologías externas idénticas (Figueroa *et al.*, 2009).

Sin embargo, nuestras observaciones muestran que los quistes peliculares de origen sexual y los de origen asexual en *Durinskia baltica*, son estructuras que, aun con cierta similitud, son morfológicamente diferentes y es posible diferenciarlos en cultivo con observaciones detalladas de la pared y el contenido interno. Aunque en algunas especies del mismo orden que *Durinskia baltica* se ha descrito la formación de quistes peliculares asexuales o temporales, como es el caso de *Scrippsiella lachrymosa* (Persson *et al.*, 2016), esta morfología no se ha relacionado con quistes originados por fusión de gametos.

### *Sexualidad y quistes de resistencia*

En nuestros cultivos observamos que el ciclo sexual de *D. baltica* puede seguir cuatro rutas después de la fusión, ya descritos en la sección de resultados, como: 1) formación de planocigoto con meiosis directa, 2) formación de hipnocigoto, 3) formación de quiste pelicular con meiosis directa y 4) formación de quiste pelicular con formación de planomeiocito.

Es interesante que la característica de seguir rutas diferentes, sólo se ha observado en algunas dinofitas del orden Gonyaulacales, diferente al orden de *D. baltica* (Peridinales). Por ejemplo, las especies de *Alexandrium catenella* y *Alexandrium minutum*, las cuales presentan 4 rutas diferentes con las mismas etapas que las descritas para *D. baltica* (Figueroa y Bravo, 2005a, b; Figueroa et al., 2006; Bravo et al., 2010); además, estas especies también presentan una multidirección posterior a la fusión de gametos, que no siempre resulta en la formación de un hipnocigoto.

Presentar diferentes rutas tiene implicaciones ecológicas y evolutivas importantes, ya que se ha sugerido que este tipo de comportamiento permite mantener ambas fases haploides y diploides durante el ciclo de vida, lo que puede representar una ventaja cuando el ambiente ofrece más de un nicho ecológico que puede ser ocupado por alguna de las dos fases (Stebbins y Hill, 1980; Steidinger y Garcés, 2006).

Si relacionamos estas características observadas en cultivo con el comportamiento de *Durinskia baltica* reportada en Xochimilco, la alternativa que presenta esta especie de formar dos tipos diferentes de quistes sexuales cuyo desarrollo depende de las variaciones ambientales, podría ser una causa que explique la dominancia de *D. baltica* sobre otras especies del grupo de las dinofitas que son raras en el sitio, así como sobre el resto de la comunidad fitoplanctónica (Lira, 2012).

#### *Periodo de latencia*

Otra particularidad que encontramos en relación a los quistes de resistencia de *D. baltica* y su dominancia en Xochimilco, es que el periodo de latencia es corto en comparación con otras especies de dinofitas que forman este tipo de quistes, y que puede variar entre 1-12 meses (Dale et al., 1978; Walker y Steidinger, 1979; Anderson, 1980; Montresor y Marino, 1996; Pérez et al., 1998; Figueroa et al., 2006a; Figueroa et al., 2009) en el caso de *D. baltica* encontramos que los hipnocigotos presentaron un periodo de latencia que varió entre 15-45 días.

Este es un intervalo corto que no representa una condición real de latencia (Figueroa et al., 2009). Si consideramos que la duración del periodo de latencia es un factor que determina fuertemente los patrones de formación de florecimientos de estas especies, los periodos de

latencia largos están relacionados con sucesiones de sobrevivencia estacionales de larga duración ya que los organismos son capaces de permanecer latentes en los sedimentos durante cambios ambientales extremos y eclosionar de manera estacional proporcionando un inóculo de células vegetativas a la columna de agua cuando las condiciones ambientales sean adecuadas para el crecimiento, esta dinámica representa un patrón común en los eventos de florecimientos de dinofitas (Anderson, 1997).

Un periodo de latencia corto, como en el caso de *Durinskia baltica* en Xochimilco, indica que puede existir una transición rápida entre la fase bentónica y planctónica (Hallegraeff *et al.*, 1998; Lundholm *et al.*, 2011), lo cual puede ser crucial para la sobrevivencia cuando los cambios ambientales de corta duración tienen mucho más impacto que las transiciones estacionales.

Por otra parte, es notable que la presencia de diferentes quistes sexuales con periodos de latencia cortos ha sido reportado para especies cercanas filogenéticamente a *D. baltica* (Tamura *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2011 a,b), como *Kryptoperidinium foliaceum* (Figueroa *et al.*, 2009). Tanto es así, que la estrategia que proponemos para *D. baltica*, posiblemente aplicaría a otros dinotomos; sin embargo, para probarlo sería necesario tener conocimiento de las condiciones ambientales en las que esos otros dinotomos habitan.

Con base en las observaciones de las diferentes etapas del ciclo de vida, podemos señalar que nuestros resultados respaldan la relación entre el crecimiento de *Durinskia baltica* con la variación de nutrientes. Sin embargo, esta relación ocurre a un nivel mucho más complejo, porque esta especie es capaz de tener respuestas fisiológicas diferentes que se acoplan a y contrarrestan las variaciones de nutrientes que puedan presentarse en el ambiente. Estas respuestas fisiológicas son las que probablemente le han permitido a *D. baltica* mantenerse como la especie dominante y con abundancias muy grandes, sólo en el canal de “El Japón”, ya que debido a las características físicas del canal (muy angosto y somero), las variaciones ambientales extremas podrían acentuarse, confiriendo a esta especie una ventaja sobre otras que no son capaces de sobrellevar la magnificación de estos efectos.

## **Efecto de la modificación de nutrientes y pH sobre el crecimiento de *Durinskia baltica***

### *Relación entre los nutrientes de las categorías mesotrófica y eutrófica con el pH*

Nuestros resultados mostraron que el crecimiento más rápido y con mayor densidad se presentó en la categoría mesotrófica a pH 7.0, refutando nuestra hipótesis de que este comportamiento se presentaría a pH 8.0, que es el que predomina en el sitio; pero a pesar de que en el tratamiento de pH 7.0 se presentó el crecimiento exponencial más rápido, la población decayó inmediatamente después de alcanzar la fase exponencial sin presentar una fase estacionaria, mientras que en pH 8.0 la población se mantuvo en fase estacionaria por más tiempo, por lo que podemos plantear que cuando en el sitio se presentan estas condiciones, las poblaciones de *Durinskia baltica* son capaces de permanecer más tiempo con altas densidades, debido a que la forma y concentración de nutrientes es la más adecuada para no sólo el crecimiento, sino para el mantenimiento de la población (Lira et al., 2017).

Este resultado coincide con el trabajo antecedente del sitio de Lira (2012), en el cual se registró la mayor densidad de esta especie justo cuando en el sitio se presentó una condición mesotrófica con pH 7.0. Otro de nuestros resultados más interesantes es la marcada diferencia en los valores de densidad, respaldada por la significancia estadística, pues esta diferencia afecta únicamente las categorías mesotrófica y eutrófica con los valores de pH de 8.0 a 10.0.

Un punto muy importante, con respecto a estos resultados, es la razón por la cual la mayor diferencia se presenta entre categorías consecutivas y no entre las categorías extremas como se esperaría. Glibert *et al.* (2005) mencionan que el éxito de una especie (*v.gr.* el crecimiento expresado como densidad depende de su habilidad para explotar cantidad y calidad de los nutrientes disponibles, la sincronización e intensidad con la que se suministran dichos nutrientes y las interacciones con otros factores ambientales, en este caso el pH, por lo que el cambio en la concentración de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo de una categoría a otra parece tener un efecto evidente en la capacidad de las poblaciones para asimilar los cambios. También es muy importante resaltar que las respuestas más pronunciadas del fitoplancton ocurren cuando se da un enriquecimiento de nitrógeno y fósforo juntos (Esler *et al.*, 1990), por lo que las diferencias que se presentaron en cada categoría dependen de la dinámica de asimilación de ambos nutrientes.

El comportamiento en gradientes ambientales (se equipará con gradientes en concentración de nutrientes y gradientes de pH de los cultivos de este estudio), ha sido muy observado en plantas y denota que los organismos no se relacionan con el ambiente de forma lineal. De hecho, es uno de los conceptos fundamentales de la ecología vegetal sobre la distribución de especies y ha generado la clasificación de comunidades, dividiéndolas en tipos cerrado o abierto, dependiendo de las amplitudes de respuesta a factores ambientales de cada especie (Fontana *et al.*, 2017). Una “comunidad abierta” se correspondería con el caso del fitoplancton del canal “El Japón”, en el que *D. baltica* es quizá la especie con el gradiente ambiental más amplio. Una muestra de cómo se cumple este tipo de respuesta para *D. baltica* en Xochimilco, fue el resultado del manejo estadístico de los datos que realizaron Lira *et al.* (2017) y que se basó en una categorización previa de las variables ambientales para aplicar un Análisis de Componentes Principales (CATPCA o categórico). Desde luego, en la interpretación de respuestas hay que considerar también que el comportamiento del fitoplancton, como comunidad, es diferente de una comunidad vegetal que permanece inmóvil (fija a un sustrato), porque el movimiento de organismos de vida libre posibilita relaciones casi individuales microorganismo-ambiente.

De acuerdo con Glibert *et al.* (2001), un aporte de nutrientes particular puede ser asimilado por las células de la misma especie con diferentes tasas, dependiendo de las cepas presentes en cada cultivo, de su historia nutricional y de sus tasas de crecimiento. Las complicaciones que traen las diferencias de sincronización, los mecanismos fisiológicos de nutrición y las diferencias intrínsecas en la fisiología y comportamiento entre las diferentes cepas en los diversos tratamientos en cultivo, frecuentemente hace muy difícil diferenciar el papel de los niveles de eutrofización en el desarrollo de los florecimientos, de otros mecanismos que estructuran a las poblaciones (Springer *et al.*, 2005). Si este comportamiento observado en cultivo lo relacionamos con lo que puede ocurrir en el ambiente, la sincronización e intensidad del aporte de nutrientes también pueden ser importantes para el mantenimiento de la dominancia de esta especie en contra de especies competidoras o consumidoras.

#### *Efecto particular del pH sobre todos los tratamientos*

Por otra parte, nuestros resultados también mostraron que, si se analiza independientemente el pH, las diferencias entre todos los tratamientos son estadísticamente significativas, mostrando

que se trata de una variable que influye directamente sobre la densidad de esta especie coincidiendo con lo reportado por Lira (2012) en donde esta variable mostró una correlación significativa ( $P= 0.05$ ) con la densidad de *Durinskia baltica*.

De acuerdo con Moss (1972), existen muchas formas en las que el incremento en el pH puede afectar al crecimiento de las algas en los lagos eutróficos y van desde efectos directos en las enzimas de la pared celular o la membrana, la limitación de la capacidad de las especies para absorber metales traza, precipitación del fosfato con el calcio, magnesio y carbonato, un efecto tóxico directo del carbonato o de los iones hidróxido y un cambio en la disponibilidad de los diferentes compuestos de carbón para la fotosíntesis.

#### *Efectos fisiológicos del aumento del pH*

En nuestros cultivos observamos que en los tratamientos con el pH más elevado se presentó una disminución en las tasas crecimiento y aumentó en las deformaciones de la morfología externa de las células, en comparación con las variaciones morfológicas descritas para las poblaciones del canal “El Japón”. Raven (1980) menciona que el efecto del pH no se relaciona únicamente con las interacciones bioquímicas que afectan los procesos de incorporación de nutrimentos, sino que también puede intervenir de manera negativa sobre procesos metabólicos celulares, al afectar los procesos de transporte de membrana y funciones metabólicas involucradas en la regulación celular del pH.

En el caso de nuestros cultivos, podemos asociar directamente la disminución en las tasas de crecimiento con la exposición continua de las células durante 30 días a pH elevados, lo cual intervino directamente sobre su metabolismo, como demostraron Pedersen y Hansen (2003), cuando reportan que 3 de 6 especies de dinoflagelados heterótrofos y dinofitas fotótrofas experimentaron una reducción en su tasa de crecimiento con un pH de 8.9 y tasas negativas por encima de pH 9.0; según estos autores, el hecho de que el crecimiento de ambos tipos de organismos fuera limitado dentro de los mismos intervalos de pH, indica que presentan el mismo tipo de efecto celular que se traduce en un cambio metabólico.

En nuestros cultivos, las deformaciones presentes en las células expuestas a pH elevados pueden ser resultado de cambios y alteraciones en la conformación de membrana, como sugieren Taraldsvik y Myklestad (2000). Es muy importante resaltar que las condiciones de pH a las que estuvieron sometidas nuestras poblaciones en los cultivos experimentales, fueron

condiciones extremas manipuladas para observar los efectos “magnificados” sobre el metabolismo de la especie; sin embargo, aunque en el ambiente natural efectivamente puedan registrarse elevaciones anormales en el pH por efecto de los aportes alóctonos de agua al sistema o bien por efectos de la eutroficación (tasas elevadas de fotosíntesis que pueden basificar un medio de relativamente baja reserva alcalina), es muy poco probable que estas condiciones se mantengan por mucho tiempo, lo que demuestra que esta especie es capaz de persistir y sobrellevar los cambios temporales que puedan surgir en el ambiente, debidos probablemente a los equilibrios puntuales en las dinámicas del sistema acuático, fuertemente influidas por efectos antropogénicos.

Si analizamos el caso particular del pH, el hecho de que esta especie sea capaz de sobrellevar los efectos metabólicos de los cambios de pH, debido a su forma de crecimiento y ciclo de vida, le permite formar florecimientos que no necesariamente son dependientes de la estacionalidad, además de permanecer el resto del año con altas densidades. Este comportamiento, según Hansen (2002) y Pedersen y Hansen (2003), se puede deber a que el aumento del pH provoca una disminución del crecimiento o muerte de otras especies más sensibles, tanto de autótrofos como de heterótrofos, y esta disminución de la herbivoría provoca un aumento en la tasa neta de crecimiento de aquellas especies de fotótrofos tolerantes al pH, lo que eventualmente generará florecimientos mono específicos (Macedo *et al.*, 2001; Olesen, 2001; Hansen, 2002). Nuestra hipótesis es que esto concuerda con el florecimiento de *Durinskia baltica* en el canal de Japón.

En resumen, todo el comportamiento de *Durinskia baltica* observado en los cultivos y que incluye la forma como se reproduce y la forma como crece en las distintas concentraciones de nutrientes y pH probadas, coincide con las características ambientales del canal de El Japón en Xochimilco; por ello proponemos que las particularidades del ciclo de vida que se han descrito en este trabajo y las respuestas de crecimiento poblacional, son estrategias que le permiten a esta especie persistir en densidades elevadas en un ambiente tan desafiante como lo es esta localidad.

### **Filogenia a partir de secuencias parciales del gen 18S del hospedero de *Durinskia baltica***

En las filogenias resultantes de los diferentes análisis filogenéticos, se observaron coincidencias en agrupaciones particulares de secuencias en todos los análisis. Una de estas

coincidencias es la posición de las secuencias del género *Durinskia* dentro de un clado monofilético. Estos resultados nos permiten comprobar la solidez de la hipótesis de que la secuencia de *D. baltica* de Xochimilco se encuentra descrita de forma correcta dentro de este género. Los resultados del trabajo de Zhang *et al.* (2011) coinciden con los nuestros, para las 3 secuencias del género *Durinskia* estudiadas y que se agruparon dentro del mismo clado.

En el trabajo de Zhang (*op. cit.*) se compararon secuencias de *D. baltica* de agua continental no salina con una secuencia marina, y a pesar de que entre ellas se presentó un alto grado de similitud (95.9 %) y que se agruparon en el mismo clado, fueron diferentes debido a la longitud de la rama y el valor del porcentaje de divergencia nucleotídica.

En nuestros análisis, la secuencia de *D. baltica* de Xochimilco se agrupó en la misma rama que *D. baltica* de China, y a pesar de que la longitud de la rama podría indicar un número alto de cambios evolutivos entre ellas, el valor del porcentaje de divergencia nucleotídica entre ellas fue del 1.4%; este valor se encuentra dentro del intervalo de 1- 4% que, de acuerdo con los trabajos de Edvarsen *et al.* (2003) y Miranda *et al.* (2012), se corresponde con secuencias de la misma especie, por lo que de acuerdo con los valores de divergencia la secuencia de *D. baltica* de Xochimilco se corresponde genéticamente con la secuencias de *D. baltica* de China (ambas de aguas continentales no salinas), pero no corresponde a las secuencias de *Peridinium balticum* y *Durinskia cf. baltica* de ambientes marinos.

Cada secuencia presente en la base de datos asociada con el nombre de *D. baltica*, independientemente del ambiente del que provenga, se separó de la otra, mostrando que aún existe un conflicto taxonómico importante asociado con el nombre *Durinskia baltica*. Para resolver este conflicto, se tendrán que seguir estudiando los miembros de este género utilizando herramientas moleculares más especializadas, con diferentes marcadores moleculares.

Por otra parte, otra coincidencia que se observó en todas las filogenias fue la formación de una agrupación de las secuencias correspondientes a las especies de dinotomos *Galeidinium rugatum*, *Kryptoperidinium foliaceum*, *Peridinium quinquecorne*, *Peridiniopsis penardii* y *Peridiniopsis cf. kevei*. Este comportamiento coincide con las filogenias moleculares presentadas en el trabajo de Tamura *et al.* (2005), en donde las secuencias de los dinotomos

*Kryptoperidinium foliaceum* y *Galeidinium rugatum* se agruparon cerca de las secuencias del género *Durinskia*. Este mismo resultado se observó en el trabajo de Zhang *et al.* (2011), pues la secuencia de *Durinskia baltica* de China se agrupó con las secuencias de *Perdidiopsis penardii* y *Perdiniopsis cf. kevei*, las cuales también pertenecen al grupo de los dinotomos.

La genética molecular expuesta en estas filogenias del gen 18S de la SSU DNA, nos ha permitido sugerir que los hospederos de las especies de dinotomos son de origen monofilético y reúnen una gran diversidad morfológica y ecológica: ambientes continentales no salinos y salobres, así como marinos.

Estos resultados también coinciden con los trabajos de Inagaki *et al.* 2000; Tamura *et al.* (2005) y Zhang *et al.* (2011); sin embargo, representan sólo un pequeño fragmento dentro la historia evolutiva de estas especies, de manera que para entender y poder llegar a describir los posibles procesos evolutivos, será importante llevar a cabo más estudios genéticos y ecológicos de estas dinofitas y sus simbiontes.

### **Filogenia a partir de secuencias parciales del gen de la *rbcL* del huésped de *Durinskia baltica***

En las filogenias obtenidas a partir de las secuencias del endosimbionte o huésped de *Durinskia* de Xochimilco, pudimos observar que las secuencias de los endosimbiontes de dinotomos formaron tres grupos monofiléticos en todos los análisis. En el primer grupo; se encuentra la secuencia del endosimbionte de *Durinskia baltica* de Xochimilco, junto con *Kryptoperidinium foliaceum*, *Galeidinium rugatum* con las diatomeas *Nitzschia palea* y *Nitzschia capitellata*. A pesar de que en los diferentes análisis estas secuencias se ubican en diferentes posiciones y valores de soporte, el hecho de que las secuencias se agrupen juntas en todas las filogenias sugiere que a pesar de las diferencias morfológicas y de hábitat, estas tres dinofitas comparten el mismo ancestro endosimbionte, como indican Tamura *et al.* (2005).

El segundo grupo que observamos en todas las filogenias es parte de un clado bien definido en donde se ubicó la secuencia del dinotomo *Peridinium quinquecorne* agrupado junto con diatomeas del género *Chaetoceros* este grupo es monofilético y coincide con los resultados del trabajo de Horiguchi y Takano (2006), en el cual el dinotomo también se agrupó con el género *Chaetoceros*.

El tercer grupo pertenece a las secuencias de los endosimbiontes de *Peridiniopsis pernardii* y *Peridiniopsis* cf. *kevei*; los dinotomos mencionados se agruparon con diatomeas de los géneros *Thalassiosira*, *Cyclotella* y *Discostella*. Este tercer grupo no se había reportado en estudios previos, ya que no se había trabajado con las especies de dinotomos, en trabajos como el de Inagaki *et al.* (2000), Tamura *et al.* (2005) y Takano *et al.* (2008), sólo se habían reportado dos grupos de dinotomos.

El hecho de que en nuestras filogenias se hayan observado 3 grupos monofiléticos de endosimbiontes, fortalece la hipótesis de Takano *et al.* (2008) acerca de la existencia de un reemplazamiento seriado de endosimbiontes desde una diatomea original del tipo *Nitzschia* hacia una diatomea central como *Thalassiosira* o viceversa. Una de las evidencias de dicho reemplazamiento seriado, según algunos autores (Horiguchi y Takano, 2006; Takano *et al.*, 2008), es la discrepancia entre las filogenias del hospedero y las del huésped, ya que en las filogenias de las dinofitas (hospederos), los dinotomos forman un sólo grupo filogenético, mientras que en las filogenias de sus endosimbiontes (huéspedes) se observan tres grupos. Sin embargo, aún no se han publicado evidencia suficiente para comprobar o desestimar esta hipótesis del reemplazamiento seriado en dinotomos.

Asimismo, en este trabajo se plantea que los resultados de las filogenias moleculares del gen *rbcL* para el hospedero, sugieren que los dinotomos adquirieron sus huéspedes a partir de eventos de endosimbiosis cercanos, posiblemente en un mismo tipo de ambiente, y que posteriormente diversificaron por líneas diferentes que les permitió incursionar en los diversos ambientes en que hoy se encuentran.

## **Conclusiones**

- La cantidad y calidad de nutrimentos, al igual que el pH, en conjunto influyen de manera directa en el crecimiento de *Durinskia baltica* en cultivo, provocando con su aumento la disminución del crecimiento poblacional.
- El efecto individual que produce el aumento de pH en el cultivo es la deformación de la teca y una interrupción del crecimiento celular.

- El crecimiento vegetativo de *Durinskia baltica* en Xochimilco, así como su florecimiento, está relacionado con las estrategias de su ciclo de vida (4 diferentes rutas, 2 tipos de quistes sexuales y tiempo corto de eclosión) y cambios temporales de las condiciones ambientales.
- Las poblaciones presentes en Xochimilco pertenecen al género *Durinskia* y se corresponden morfológicamente con el nombre de *Durinskia baltica*, y genéticamente con secuencias generadas a partir del gen 18S del mismo nombre confirmando la presencia de esta especie en ambiente continentales no salinos.
- La secuencia del cloroplasto (endosimbionte), generada a partir del gen *rbcL* de *Durinskia baltica* de Xochimilco, mostró una relación con una diatomea de tipo *Nitzschia*, lo que no permitió identificar el ambiente original de la especie debido a que la información genética contenida en el endosimbionte es solo una porción desconocida de la información del cloroplasto original.

## Referencias

1. Adachi, M., Kanno, T., Matsubara, T., Nishijim, T., Itakura, S., Yamaguchi, M. (1999). Promotion of cyst formation in the toxic dinoflagellate *Alexandrium* (Dinophyceae) by natural bacterial assemblages from Hiroshima Bay, Japan. *Marine Ecology Progress Series*. 191:175-185.
2. Aizaki, M., Otsuki, O., Fukushima, M., Hosomi, M., Muraoka. (1981). Application of Carlson's trophic state index to Japanese lakes and relationships between the index and other parameters. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*. 21:675-681.
3. Anderson, D.M. (1980). Effects of temperature conditioning on development and germination of *Gonyaulax tamarensis* (Dinophyceae) hypnozygotes. *Journal of Phycology*. 16: 166-172.
4. Anderson, D.M. (1997). Bloom dynamics of toxic *Alexandrium* species in the north eastern US. *Limnology and Oceanography*. 42: 1009-1022.
5. Anderson, D.M. (1998). Physiology and bloom dynamics of toxic *Alexandrium* species, with emphasis on life cycle transitions. *En: Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hallegraeff, G.M. [Eds.], Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. NATO ASI Series, Vol. G41, Springer-Verlag, Berlin, pp: 29-48.
6. Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition and consequences. *Estuaries*. 25:562-584.
7. Anderson, D.M., Lindquist, N.L. (1985). Time-course measurements of phosphorus depletion and cyst formation in the dinoflagellate *Gonyaulax tamarensis* Lebour. *Journal of experimental Marine Biology and Ecology*. 86:1-13.
8. Anglés, S., Garcés, E., Reñé, A. (2012). Life-cycle alternations in *Alexandrium minutum* natural populations from the NW Mediterranean Sea. *Harmful Algae*. 16: 1-11.
9. APHA (American Public Health Association) AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Pollution Control Federation). (2005). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, Maryland.
10. Armienta, M.A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Ceniceros, N., Cruz, O., Aguayo, A., Arcega-Cabrera, F. (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanos. *Journal of Volcanology and Research*. 178:249-258.
11. Blackburn, S. I., Bolch, C. J. S., Haskard, K. A., Hallegraeff, G. M. (2001). Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*. 40:78-87.

12. Blackburn, S. I., Hallegraeff, G. M., Bolch, C. J. (1989). Vegetative reproduction and sexual life cycle of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Journal of Phycology*. 25:577-90.
13. Blackburn, S., Parker, N. (2005). Microalgal life cycles: encystment and excystment. *En: Andersen, R. A. [Ed.]: Algal Culturing Techniques*. Academic Press, London, pp. 399-417.
14. Bravo, I., Figueroa, R.I., Garcés, E., Fraga, S., Massanet, A. (2010). The intricacies of dinoflagellate pellicle cysts: The example of *Alexandrium minutum* cysts from a bloom- recurrent area (Bay of Baiona, NW Spain). *Deep-Sea Res PT II*. 57:166-174.
15. Bravo, I., Figueroa, R.I. (2014). Towards an ecological understanding of dinoflagellate cyst functions. *Microorganisms*. 2:11-32.
16. Brooks, D.R., Bilewitch, J., Condy, C. (2007). Quantitative Phylogenetic Analysis in the 21st Century. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 78: 225-252.
17. Cardoso, L., Braga-Fagundes, P., Becker, V. (2010). Spatial and temporal variations of Dinophyceae in subtropical reservoirs in southern Brazil. *Hydrobiologia*. 654: 205-214.
18. Carty, S., Cox, E.R. (1986). *Kansodinium* gen nov. and *Durinskia* gen nov.: two genera of freshwater dinoflagellates (Pyrrhophyta). *Phycologia*. 25(2): 197-204.
19. Chesnick, J.M., Cox, E.R. (1987). Synchronized sexuality of an algal symbiont and its dinoflagellate host, *Peridinium balticum* (Levander) Lemmermann. *BioSystems*. 21: 69-78.
20. Chesnick, J.M., Cox, E.R. (1989). Fertilization and zygote development in the Binucleate dinoflagellate *Peridinium balticum* (Pyrrhophyta). *American Journal of Botany*. 76(7): 1060-1072.
21. Chesnick, J.M., Kooistra, W.H.C.F., Wellbrock, U., Medlin, L.K. (1997). Ribosomal RNA analysis indicates a benthic pennate diatom ancestry for the endosymbionts of the dinoflagellates *Peridinium foliaceum* and *Peridinium balticum* (Pyrrhophyta). *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 44(4): 314-320.
22. Coats, D.W. (2002). Dinoflagellate life-cycle complexities. *Journal of Phycology*. 38:417-419.
23. Conley, D.J., Paerl, H.W., Howarth, R.W., Boesch, D.F., Seitzinger, S.P., Havens, K.E., Lancelot, C., Likens, G.E. (2009). Controlling eutrophication by reducing both nitrogen and phosphorus. *Science*. 323:1014-1015.
24. Dale, B., Yentsch, C.M., Hurst, J.W. (1978). Toxicity in resting cysts of the red tide dinoflagellate *Gonyaulax excavata* from deeper water coastal sediments. *Science* 201: 1223-1225.

25. Dale, B. (2001). The sedimentary record of dinoflagellate cyst: looking back into the future of phytoplankton blooms. *Scientia Marina*. 65(2):257-272.
26. Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T.L., Massana, R. (2001). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied Environmental Microbiology*. 67:2942-2951.
27. Dodge, J.D. (1971). A dinoflagellate with both a mesokaryotic and a eukaryotic nucleus. *Protoplasma*. 73:145-157.
28. Edvarsen, B., Shalchian-Tabrizi, K., Jakobsen, K.S., Medlin, L.K., Dahl, E., Brubak, S., Paasche, E. (2003). Genetic variability and molecular phylogeny of *Dinophysis* species (Dinophyceae) from Norwegian waters inferred from single cell analyses of rDNA. *Journal of Phycology*. 39:395-408.
29. Eschbach, S., Speth, V., Hansmann, P., Sitte, P. (1990). Freeze-fracture study of the single membrane between host cell and endocytobiont in the dinoflagellates *Glenodinium foliaceum* and *Peridinium balticum*. *Journal of Phycology*. 26: 324-328.
30. Esler, J.J., Marzolf, E.R., Goldman, C.R. (1990). Phosphorus and nitrogen limitation of phytoplankton growth in freshwaters of North America: A review and critique of experimental enrichments. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 47: 1468-1477.
31. Falkowski, P.G. (2000). Rationalizing elemental ratios in unicellular algae. *Journal of Phycology*. 36:3-6.
32. Fan, C., Glibert, P.M. (2005). Effects of light on nitrogen and carbon uptake during a *Prorocentrum minimum* bloom. *Harmful Algae*. 4:629-641.
33. Fan, C., Glibert, P.M., Alexander, J., Lomas, M.W. (2003). Characterization of urease activity in three marine phytoplankton species, *Aureococcus anophagefferens*, *Prorocentrum minimum* and *Thalassiosira weissflogii*. *Marine biology*. 142:949-958.
34. Felsenstein, J. (2004). *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. 580 p.
35. Fensome, R.A., Saldarriaga, J.F., Taylor, F.J.R. (1993). Dinoflagellate phylogeny revisited: reconciling morphological and molecular based phylogenies. *Grana*. 38:66-80.
36. Figueroa, R.I., Bravo, I. (2005). Sexual reproduction and two different encystment strategies of *Lingulodinium polyedrum* (dinophyceae) in culture. *Journal of Phycology*. 41:370-379.

37. Figueroa, R.I., Bravo, I., Garcés, E. (2005). Effects of nutritional and different parental crosses on the encystment and excystment of *Alexandrium ctenella* (Dinophyceae) in culture. *Phycologia*. 44(6): 658-670.
38. Figueroa, R.I., Bravo, I., Fragab, S., Garcés, E., Llaveria, G. (2009). The life history and cell cycle of *Kryptoperidinium foliaceum*, Dinoflagellate with two eukaryotic nuclei. *Protist*. 160: 285-300.
39. Figueroa, R.I., Bravo, I., Garcés, E. (2006a). Multiple routes of sexuality in *Alexandrium taylori* (Dinophyceae) in culture. *Journal of Phycology*. 42:1028-1039.
40. Figueroa, R.I., Bravo, I., Ramilo, I. (2006b). Nuclear features and effect of nutrients on *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae) sexual stages. *Journal of Phycology*. 42:67-77.
41. Fontana, V. Kohler, M., Niedrist, G., Bahn, M., Tappeiner, U., Frenck, G. (2017). Decomposing the land-use specific response of plant functional traits along environmental gradients. *Science of The Total Environment*. 8:599-600:750-759.
42. Garcés, E., Vila, M., Masó, M., Sampedro, N., Grazia- Giacobbe, M., Penna, A. (2005). Taxon-specific analysis of growth and mortality rates of harmful dinoflagellates during bloom conditions. *Marine Ecology Progress Series*. 301:67-79.
43. Geider, R.J., MacIntyre, H.L., Kana, T.M. (1998). A dynamic regulatory model of phytoplankton acclimation to light, nutrients, and temperature. *Limnology and Oceanography*. 43(4):679-694.
44. Gisselson, L.Å., Carlsson, P., Granéli, E., Pallon, J. (2002). Dinophysis blooms in the deep euphotic zone of the Baltic Sea: do they grow in the dark? *Harmful Algae*. 1:401-418.
45. Glibert, P.M., Anderson, D.A., Gentien, P., Granéli, E., Sellner, K.G. (2005). The global, complex phenomena of harmful algal blooms. *Oceanography*. 18(2):136-147.
46. Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Parrow, M.W., Lewitus, A.J., Gustafson, D.E. (2001). Direct uptake of nitrogen by *Pfiesteria piscicida* and *Pfiesteria shumwayae*, and nitrogen nutritional preferences. *Harmful Algae*. 5:380-394.
47. González, G. J., Novelo M. E. (1986). *Técnicas especiales de recolección y preparación de ejemplares de grupos selectos de plantas: algas*. Separata de Manual de herbario. Consejo nacional de la flora de México. A.C. México.
48. Guevara-Olivar, O.M. (2014). *Caracterización fisicoquímica de suelos inundados sujetos a desalinización*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo, México, 181 p.

49. Guillard, R. R. L. (1973). Division rates. *En: Stein, J. R. [Ed.]: Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements.* Cambridge University Press, Cambridge, pp: 289-311.
50. Guillard, R. R. L., Hargraves, P. E. (1993). *Stichochrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia*. 32:234-6.
51. Güler, C., Thyne, G.D., McCray, J.E., Turner, A.K. (2002). Evaluation of graphical and multivariate statistical methods for classification of water chemistry data. *Hydrogeology Journal*. 10: 455-474.
52. Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41:95-98.
53. Hallegraeff, G.M., Marshall, J.A., Valentine, J., Hardiman, S. (1998). Shortcyst-dormancy period of an Australian isolate of the toxic dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Marine and Freshwater Research*. 49: 415-420.
54. Hansen, G., Flaim, G. (2007). Dinoflagellates of the Trentino Province, Italy. *Journal of Limnology*. 66(2):107-141.
55. Hansen, P.J. (2002). Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: implications for species succession. *Aquatic Microbial Ecology*. 28: 279-288.
56. Hansen, P.J. (2011). The role of photosynthesis and food uptake for the growth of marine mixotrophic dinoflagellates. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 58: 203-214.
57. Head, M.J. (1996). Modern dinoflagellate cysts and their biological affinities. *En: Jansonius, J., McGregor, D.C. [Eds.] Palynology: Principles and applications,* American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation, Dallas, Texas. pp. 1197-1248.
58. Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H.G., Sellner, K., Stockwell, D.A., Stoecker, D.K., Suddleson, M. (2008). Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae*. 8:3-13.
59. Herndon, J., Cochlan, W.P. (2007). Nitrogen utilization by the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*: Growth and uptake kinetics in laboratory cultures. *Harmful Algae*. 6:260-270.
60. Hoek, C., Mann, D.G., Jahns, H.M. (1995). *Algae. An introduction to phycology.* Cambridge University Pres. Cambridge, UK. 623 p.
61. Horiguchi, T. (2004). Origin and evolution of dinoflagellates with a diatom endosymbiont. *En: Mawatari, S.F. y Okada, H. [Eds.]. Proceedings of International*

*Symposium on “Dawn of a New Natural History-Integration of Geoscience and Biodiversity Studies”*. Hokkaido University, Sapporo.

62. Horiguchi, T., Pienaar, R.N. (1991). Ultrastructure of a marine dinoflagellate, *Peridinium quinquecorne* Ab6 (Peridiniales) from South Africa with particular reference to its chrysophyte endosymbiont. *Botanica Marina*. 34: 123-131.
63. Horiguchi, T., Pienaar, R.N. (1994). Ultrastructure of a new marine sand-dwelling dinoflagellate, *Gymnodinium quadrilobatum* sp. nov. (Dinophyceae) with special reference to its endosymbiotic alga. *European Journal of Phycology*. 29:237-245.
64. Horiguchi, T., Takano, Y. (2006). Serial replacement of a diatom endosymbiont in the marine dinoflagellate *Peridinium quinquecorne* (Peridiniales, Dinophyceae). *Phycological Research*. 54: 193-200
65. Huelsenbeck, J., Ronquist, E. (2001). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19: 1572-74.
66. Ichimi, K., Yamasaki, M., Okumura, Y., Suzuki, T. (2001). The growth and cyst formation of a toxic dinoflagellate, *Alexandrium tamarense*, at low water temperatures in northeastern Japan. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 261:17-29.
67. Imanian, B., Keeling, P.J. (2007). The dinoflagellates *Durinskia baltica* and *Kryptoperidinium foliaceum* retain functionally overlapping mitochondria from two evolutionarily distinct lineages. *Evolutionary Biology*. 7:172.
68. Imanian, B., Carpenter, K.J., Keeling, P.J. (2007). The mitochondrial genome of a tertiary endosymbiont retains genes for electron transport proteins. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 54:146-153
69. Imanian, B., Pombert J.F., Keeling, P.J. (2010). The complete plastid genomes of the two ‘Dinotoms’ *Durinskia baltica* and *Kryptoperidinium foliaceum*. *Plos one*. 5(5): e10711.
70. Imanian, B., Pombert, J.F., Dorrell, R.G., Burki, F., Keeling, P.J. (2012). Tertiary endosymbiosis in two dinotoms has generated little change in the mitochondrial genomes of their dinoflagellate hosts and diatom endosymbionts. *Plos one*. 7(8): e43763.
71. Jaanus, A. (2011). *Phytoplankton in Estonian coastal waters – variability, trends in response to environmental pressures*. Thesis Ph.D. Biologicae Universitatis Tartuensis. Tartu Univ. Press. 72 p.
72. Kahlert, M., Albert, R. L., Anttila, E. L., Bengtsson, R., Bigler, C., Eskola, T., Gälman, V. (2008). Harmonization is more important than experience—results of the first

- Nordic-Baltic diatom intercalibration exercise 2007 (stream monitoring). *Journal of Applied Phycology*. 20:227-35.
73. Ki, J.S., Han, M.S. (2005). Sequence-based diagnostics and phylogenetic approach of uncultured freshwater dinoflagellate *Peridinium* (Dinophyceae) species, based on single-cell sequencing of rDNA. *Journal of Applied Phycology*. 17:147-153.
  74. Ki, J.S., Han, M.S. (2007). Rapid molecular identification of the harmful freshwater dinoflagellate *Peridinium* in various life stages using genus-specific single-cell PCR. *Journal of Applied Phycology*. 19:467-470.
  75. Kremp, A., Parrow, M.W. (2006). Evidence for asexual resting cysts in the life cycle of the marine Peridinoid dinoflagellate, *Scrippsiella hangoei*. *Journal of Phycology*. 42:400-409.
  76. Kremp, A., Rengefors, K., Montresor, M. (2009). Species-specific encystment patterns in three Baltic cold-water dinoflagellates: The role of multiple cues in resting cyst formation. *Limnology and Oceanography*. 54(4): 1125-1138.
  77. Kretschmann, J., Elbrächter, M., Zinssmeister, C., Soehner, S., Kirsch, M., Kusber, W.H., Gottschling, M. (2015). *Phytotaxa*. 220(3): 239-256.
  78. Lafragua-Contreras, J., Gutiérrez-López, A., Aguilar-Garduño, E., Aparicio-Mijares, J., Mejía-Zermeño, R., Sánchez-Díaz, L.F. (2003). Balance hídrico de la cuenca de México. Instituto Mexicano de la Tecnología del agua. Centro de consulta del agua. México. 203 p.
  79. Lampert, W., Sommer, U. (2007). *Limnoecology: The Ecology of Lakes and Streams*. Oxford University Press, Oxford.
  80. Lindehoff, E., Granéli, E., Glibert, P.M. (2011). Nitrogen uptake kinetics of *Prymnesium parvum* (Haptophyte). *Harmful Algae*. 12:70-76.
  81. Lira, B.I. (2012). *Caracterización biológica de Durinskia baltica (Dinophyceae, Peridiniales) en la zona lacustre de Xochimilco-Tláhuac y factores ambientales relacionados con su presencia*. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México., México. 111 p.
  82. Lira, B., Tavera, R., Parrow, M.W. (2017). Morphology and ecology of *Durinskia baltica* (Dinophyceae: Peridiniales) freshwater blooms in Xochimilco, Mexico. *British Microbiology Research Journal*. 18(1): 1-15.
  83. Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Kibler, S.R., Madden, V.J., Noga, E.J., Tester, P. A. (2002). Life cycle of the heterotrophic dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae). *Journal of Phycology*. 38:442-463.

84. Leyva, E. (2010). Acuíferos semi confinados y su modelación: Aplicaciones al acuífero de la zona metropolitana de la Ciudad de México. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
85. Logares, R., Boltovskoy, A., Bensch, S., Laybourn-Parry, J., Rengefors, R. (2009). Genetic diversity patterns in five protist species occurring in lakes. *Protist*, 160: 301-317.
86. Lomas, M.W., Glibert, P.M., Berg, G.M., Burford, M. (2008). Characterization of nitrogen uptake by natural populations of *Aureococcus anophagefferens* (chrysophyceae) as a function of incubation duration, substrate concentration, light, and temperature. *Journal of Phycology*. 32(6):907-916.
87. Lundholm, N., Ribeiro, S., Andersen, T.J., Koch, T., Godhe, A., Ekelund, F., Ellegaard, M. (2011). Buried alive, germination of up to a century old marine protist resting stages. *Phycologia*. 50: 629-640.
88. Macedo, M.F., Duarte, P., Mendes, P., Ferreira, J.G. (2001). Annual variation of environmental variables, phytoplankton species composition and photosynthetic parameters in a coastal lagoon. *Journal of Plankton Research*. 23:719-732.
89. Manoylovn, K. (2014). Taxonomic identification of algae (morphological and molecular): species concepts, methodologies, and their implications for ecological bioassessment. *Journal of Phycology*. 50: 409-424
90. Masó, M., Garcés, E. (2006). Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Marine Pollution Bulletin*. 53:620-630.
91. Maucha, R. (1932). Hydrochemische Methoden in der Limnologie. *Binnengewasser*. 12:173.
92. Medlin, L.K., Kaczmarek, I. (2004). Evolution of diatoms: V. Morphological and cytological support for the major clades and a taxonomic revision. *Phycologia*. 43(3):245-270.
93. Mertens, K.N., Rengefors, K., Moestrup, O., Ellegaard, M. (2012). A review of recent freshwater dinoflagellate cysts: taxonomy, phylogeny, ecology and palaeocology. *Phycologia*. 51(6):612-619.
94. Miranda, L.N., Zhuang, Y., Zhang, H., Lin, S. (2012). Phylogenetic analysis guided by intragenomic SSU rDNA polymorphism refines classification of “*Alexandrium tamrense*” species complex. *Harmful algae*. 16:35-48.
95. Milne, I., Wright, F., Rowe, G., Marshal, D.F., Husmeier, D., McGuire, G. (2004). TOPALi: Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments. *Bioinformatics*. 20(11): 1806-1807.

96. Moestrup, Ø., Lindberg, K., Daugbjerg, N. (2009). Studies on woloszynskioid dinoflagellates IV: The genus *Biecheleria* gen. nov. *Phycological Research*. 57: 203-220.
97. Montresor, M., Marino, D. (1996). Modulating effect of cold-dark storage on excystment in *Alexandrium pseudogonyaulax* (Dinophyceae). *Marine Biology*. 127: 55-60.
98. Morales, V. V., De Velotti, A. (1990). *Temas de Acuicultura*. Fitoplancton. Programa regional de apoyo al desarrollo de la pesca en el Istmo Centroamericano, Pradepesca. Unión Europea, Oldepesca. Convenio ALA 90/9. Cartilla 2. 25 p.
99. Morrill, L.C., Loeblich, A.R. (1983). Ultrastructure of the dinoflagellate amphiesma. *International Review of Cytology*. 82:151-180.
100. Moss, B. (1972). The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae: an experimental study. I. Introduction and the influence of calcium level. *Journal of Ecology*. 60: 917-32.
101. Olesen, M. (2001). Sedimentation in Mariager Fjord, Denmark: the impact of sinking velocity on system productivity. *Ophelia*. 55:11-26.
102. Paerl, H. W. (1997). Coastal eutrophication and harmful algal blooms: Importance of atmospheric deposition and groundwater as "new" nitrogen and other nutrient sources. *Limnology and Oceanography*. 42:1154-1165.
103. Pedersen, M.F., Hansen, P.J. (2003). Effects of high pH on the growth and survival of six marine heterotrophic protists. *Marine Ecology Progress Series*. 260:33-41.
104. Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista Peruana de Biología*. 18(2):265-267.
105. Pérez, C.C., Roy, S, Anderson, D.M. (1998). Control of germination of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) cysts from the lower St. Lawrence estuary (Canada). *Journal of Phycology*. 34: 242-249.
106. Persson, A. Smith, B.C., Cyronak, T., Cooper, E., DiTullio, G.R. (2016). Differences in pigmentation between life cycle stages in *Scrippsiella lachrymosa* (Dinophyceae). *Journal of Phycology*. 52:64-74.
107. Pfiester, L.A. (1976). Sexual reproduction of *Peridinium willei* (Dinophyceae). *Journal of Phycology*. 12: 234-238.
108. Pfiester, L.A. (1977). Sexual reproduction of *Peridinium gatunense* (Dinophyceae). *Journal of Phycology*. 13: 92-95.
109. Pfiester, L.A. (1984). Sexual reproduction. En: Spector, D. L. [Ed.]: *Dinoflagellates*, Academic Press, New York, pp: 181-199.

110. Pfiester, L.A., Timpano, P., Skvarla, J. J., Holt, J. R. (1984). Sexual reproduction and meiosis in *Peridinium inconspicuum* Lemmermann (Dinophyceae). *American Journal of Botany*. 71: 1121-1127.
111. Pienaar, R.N., Sakai, H., Horiguchi, T. (2007). Description of a new dinoflagellate with a diatom endosymbiont, *Durinskia capensis* sp. nov. (Peridinales, Dinophyceae) from South Africa. *Journal of Plant Research*. 120:247-258.
112. Pozdnyakov, I., Skarlato, S. (2012). Dinoflagellate amphiesma at different stages of the life cycle. *Protistology*. 7(2): 108-115.
113. Raven, J. A. (1980). Nutrient transport in microalgae. *Advances in Microbial Physiology*. 21:47-226.
114. Reid, P.C., Boalch, G.T. (1987). A new method for the identification of dinoflagellate cysts. *Journal of Plankton Research*. 9: 249-253.
115. Rengefors, K., Anderson, D. (1998). Environmental and endogenous regulation of cyst germination in two freshwater dinoflagellates. *Journal of Phycology*. 34:568-577.
116. Rodríguez-Palacio, M.C. (2006). Establecimiento de cultivos de dinoflagelados del Pacífico Mexicano. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 113 p.
117. Saburova, M., Chomérat, N., Hoppenrath, M. (2012). Morphology and SSU rDNA phylogeny of *Durinskia agilis* (Kofoid & Swezy) comb. nov. (Peridinales, Dinophyceae), a thecate, marine, sand-dwelling dinoflagellate formerly classified within *Gymnodonium*. *Phycologia*. 51(3):287-302.
118. Smayda, T.J., (1990). *Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic*. En: Granéli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M. [Eds.] *Toxic Marine Phytoplankton*. Elsevier, New York, pp: 29-40.
119. Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*. 100:179-196.
120. Spector, D. J. (1984). *Dinoflagellates*. Academic Press. Orlando. 545 p.
121. Springer, J.J., Burkholder, J.M., Glibert, P.M., Reed, R.E. (2005). Use of a real-time remote monitoring network (RTRM) and shipborne sampling to characterize a dinoflagellate bloom in the Neuse Estuary, North Carolina, USA. *Harmful algae*. 4:533-551.
122. Stebbins, G.L., Hill, G.J.C. (1980). Did multi cellular plants invade the land? *American Naturalist*. 115: 342-353.

123. Steidinger, K., Garcés, E. (2006). Life cycles of harmful algae: an overview. *En: Graneli, E., Turner, J.T. [Eds.], Ecology of Harmful Algae*. Springer, Heidelberg. pp: 37- 49.
124. Stevenson, R. J., Pan, Y., Manoylov, K. M., Parker, C. A., Larsen, D. P., Herlihy, A. T. (2008). Development of diatom indicators of ecological conditions for streams of the western US. *Journal of the North American Benthological Society*. 27:1000-16.
125. Stoebe, B., Maier, U.G. (2002). One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma*. 219: 123-130.
126. Stoecker, D.K., Johnson, M.D., de Vargas, C., Not, F. (2009). Acquired phototrophy in aquatic protists. *Aquatic Microbial Ecology*. 57:279-310.
127. Sunda, W.G., Price, N.M., Morel, F.M.N. (2005). Trace Metal Ion Buffers and Their Use in Culture Studies. *En: Andersen, R. A. [Ed.] Algal Culturing Techniques*. Elsevier, San Diego, pp: 35-74.
128. Takano, Y., Hansen, G., Fujita, D., Horiguchi, T. (2008). Serial replacement of diatom endosymbionts in two freshwater dinoflagellates, *Peridiniopsis spp.* (Peridinales, Dinophyceae). *Phycologia*. 47(1):41-53.
129. Tamura, M., Shimada, S., Horiguchi, T. (2005). *Galeidinium rugatum* gen. et sp. nov. (dinophyceae), a new coccoid dinoflagellate with a diatom endosymbiont. *Journal of Phycology*. 41:658-671.
130. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 30: 2725-2729.
131. Taraldsvik, M., Myklestad, S.M. (2000). The effect of pH on growth rate, biochemical composition and extracellular carbohydrate production of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *European Journal of Phycology*. 35: 189-194.
132. Tardio, M., Ellegaard, M., Lundholm, N., Sangiorgi, F., Di Giuseppe, D. (2009). A hypocystal archeopyle in a freshwater dinoflagellate from the *Peridinium umbonatum* group (Dinophyceae) from Lake Nero di Cornisello, South-East Alps, Italy. *European Journal of Phycology*. 44: 1-10.
133. Tavera, R., Díez, B. (2009). Multifaceted approach for the analysis of the phototrophic microbial community in a freshwater recreational area of Xochimilco, México. *Hydrobiologia*. 636:353-368.
134. Taylor, F.J.R. (1990). 24. Phylum Dinoflagellata. *En: Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M., Chapman, D.J., McKhann, H.I. [Eds.], Handbook of protoctista* Jones and Bartlett, Boston. pp: 419-437.

135. Thompson, J., Gibson, D., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25:4876-82.
136. Tippit, D. H., Pickett-Heaps, J. D. (1976). Apparent amitosis in the binucleate dinoflagellate *Peridinium balticum*. *Journal of Cell Science*. 31: 273-289.
137. Tomas, R.W., Cox, E.R., Steidinger, K.A. (1973). *Peridinium balticum* (Levander) Lemmermann, an unusual dinoflagellate with a mesokaryotic and an eukaryotic nucleus. *Journal of Phycology*. 9:91-98.
138. Uchida, T. (1991). Sexual reproduction of *Scrippsiella trochoidea* isolated from Muroran Harbor, Hokkaido. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 57:1215.
139. Uchida, T., Toda, S., Matsuyama, Y., Yamaguchi, M., Kotani, Y., Honjo, T. (1999). Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 241:285-299.
140. Veldhuis MJW, Brussaard CPD, Noordeloos AAM (2005) Living in a Phaeocystis colony: a way to be a successful algal species. *Harmful Algae* 4:841–858.
141. von Stosch, H.A. (1972). La signification cytologique de la "cyclose nucleaire" dans le cycle de vie Dinoflagelles. Mémoires de la Société Botanique de France (1949-1973), 201-212.
142. von Stosch, H.A. (1973). Observations on vegetative reproduction and sexual life cycles of two freshwater dinoflagellates, *Gymnodinium pseudopalustre* Schiller and *Wolozynskia apiculata* sp. nov. *British Phycology Journal*. 8: 105-134.
143. Walker, L.M., Steidinger, K.A. (1979). Sexual reproduction in the toxic dinoflagellate *Gonyaulax monilata*. *Journal of Phycology*. 15: 312-315.
144. Wood, M., Everroad, R. C., Wingard, L. M. (2005). *Measuring growth rates in microalgal cultures*. En: Andersen, R.A. [Ed.] *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. San Diego California, USA. pp: 282-300.
145. Yoo, K. I. (1991). Population dynamics of dinoflagellate community in Masan Bay with a note on the impact of environmental parameters. *Marine Pollution Bulletin*. 23:185-188.
146. Yoon, H.S, Hackett, J.D., Dolah, F.M., Nosenko, T., Lidie, K.L., Bhattacharya, D. (2005). Tertiary endosymbiosis driven genome evolution in dinoflagellate algae. *Molecular Biology and Evolution*. 22(5):1299-1308.
147. Zhang, Q., Liu, G., Hu, Z. (2011a). Morphological differences and molecular phylogeny of freshwater blooming species, *Peridiniopsis* spp. (Dinophyceae) from China. *European Journal of Protistology*. 47(3):149-160.

148. Zhang, Q., Liu, G., Hu, Z. (2011b). *Durinskia baltica* (Dinophyceae), a newly recorded species and genus from China, and its systematic. *Journal of Systematics and Evolution*. 49(5):476-485.
149. Zharkikh, A., Li, W.H. (1992). Phylogenetic performance of mitochondrial protein coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Molecular Biology Evolution*. 13: 933-942.

**Anexo1. Valores de iones mayores en meq. L<sup>-1</sup> y mgL<sup>-1</sup>, pH y coeficiente de variación registrados para el canal “El Japón” durante el periodo de octubre de 2013 a mayo de 2014**

Anexo 1a. Resultados (en mg L<sup>-1</sup>) de iones mayores y alcalinidad obtenidos del canal Japón en el periodo de octubre de 2013 a mayo de 2014.

Mes de colecta	pH <i>in situ</i>	ALKT (CaCO <sub>3</sub> )	CO <sub>3</sub> <sup>=</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>
oct-13	7.1	372	0	411	103	172	49	60	139	21
dic-13	7.1	309	0	377	90	119	42	45	121	19
ene-14	7.5	198	14	253	81	82	30	30	101	19
feb-14	7.0	241	0	294	80	84	32	29	102	20
mar-14	7.3	176	0	275	80	77	31	24	96	19
abr-14	6.9	225	0	245	72	68	29	26	90	12

**Anexo2. Resultados de las pruebas de t de dos colas entre las diferentes categorías tróficas y sus tratamientos de pH**

Anexo 2a. Resultados de la prueba de t de dos colas entre los tratamientos de pH de la categoría mesotrófica

Análisis	meso 7	meso 8	meso 9	meso 8	meso 10	meso 8
Media	3502.273	1596.030	2452.121	1596.030	803.727	1596.030
Varianza	2554416.04	3372252.43	984442.1172	3372252.432	54225.129	3372252.432
Observaciones	11	11	11	11	11	11
Varianza agrupada	2963334.236		2178347.275		1713238.781	
Diferencia hipotética de medias	0		0		0	
df	20		20		20	
t Stat	2.597		1.360		1.420	
P(T<=t) una cola	0.009		0.094		0.086	
t Crítico una cola	1.725		1.725		1.725	
P(T<=t) dos colas	0.017		0.189		0.171	
t Crítico dos colas	2.086		2.086		2.086	
Análisis	meso 7	meso 9	meso 7	meso 10	meso 9	meso 10
Media	3502.273	2452.121	3502.273	803.727	2452.121	803.727
Varianza	2554416.040	984442.117	2554416.040	54225.129	984442.117	54225.129
Observaciones	11	11	11	11	11	11
Varianza agrupada	1769429.079		1304320.585		519333.623	
Diferencia hipotética de medias	0		0		0	
df	20		20		20	
t Stat	1.851		5.541		5.364	
P(T<=t) una cola	0.039		0.00001		0.00001	
t Crítico una cola	1.725		1.725		1.725	
P(T<=t) dos colas	0.079		0.00002		0.00003	
t Crítico dos colas	2.086		2.086		2.086	

Anexo 2b. Resultados de prueba de t de dos colas entre los tratamientos de la categoría eutrófica y el tratamiento de pH 8 de la categoría mesotrófica

Análisis	meso 8	eu 7	meso 8	eu 8	meso 8	eu 9	meso 8	eu 10
Media	1596.030	767.485	1596.030	380.848	1596.030	219.970	1596.030	37.970
Varianza	3372252.432	44104.541	3372252.432	37820.986	3372252.432	9934.366	3372252.432	620.232
Observaciones	11	11	11	11	11	11	11	11
Varianza agrupada	1708178.487		1705036.709		1691093.399		1686436.332	
Diferencia hipotética de medias	0		0		0		0	
df	20		20		20		20	
t Stat	1.487		2.183		2.482		2.814	
P(T<=t) una cola	0.076		0.021		0.011		0.005	
t Crítico una cola	1.725		1.725		1.725		1.725	
P(T<=t) dos colas	0.153		0.041		0.022		0.011	
t Crítico dos colas	2.086		2.086		2.086		2.086	

Anexo 2c. Resultados de prueba de t de dos colas entre los tratamientos de la categoría eutrófica

Análisis	eu 7	eu 8	eu 7	eu 9	eu 7	eu 10
Media	767.485	380.848	767.485	219.970	767.485	37.970
Varianza	44104.541	37820.986	44104.541	9934.366	44104.541	620.232
Observaciones	11	11	11	11	11	11
Varianza agrupada	40962.764		27019.454		22362.387	
Diferencia hipotética de medias	0		0		0	
df	20		20		20	
t Stat	4.480		7.812		11.441	
P(T<=t) una cola	0.0001		0.00000008		0.0000000002	
t Crítico una cola	1.725		1.725		1.725	
P(T<=t) dos colas	0.0002		0.00000002		0.0000000003	
t Crítico dos colas	2.086		2.086		2.086	
Análisis	eu 8	eu 9	eu 8	eu 10	eu 9	eu 10
Media	380.848	219.970	380.848	37.970	219.970	37.970
Varianza	37820.986	9934.366	37820.986	620.232	9934.366	620.232
Observaciones	11	11	11	11	11	11
Varianza agrupada	23877.676		19220.609		5277.299	
Diferencia hipotética de medias	0		0		0	
df	20		20		20	
t Stat	2.442		5.800		5.876	
P(T<=t) una cola	0.012		0.000006		0.000005	
t Crítico una cola	1.725		1.725		1.725	
P(T<=t) dos colas	0.024		0.00001		0.00001	
t Crítico dos colas	2.086		2.086		2.086	

Anexo 2d. Resultados de prueba de t de dos colas entre los tratamientos de la categoría hipertrófica y el tratamiento de pH 8 de la categoría mesotrófica

Análisis	meso 8	hiper 7	meso 8	hiper 8	meso 8	hiper 9	meso 8	hiper 10
Media	1596.030	1410.697	1596.030	1288.303	1596.030	250.909	1596.030	257.212
Varianza	3372252.432	159873.032	3372252.432	237229.721	3372252.432	17304.402	3372252.432	11726.606
Observaciones	11	11	11	11	11	11	11	11
Varianza agrupada	1766062.73		1804741.077		1694778.417		1691989.52	
Diferencia hipotética de medias	0		0		0		0	
df	20		20		20		20	
t Stat	0.327		0.537		2.423		2.414	
P(T<=t) una cola	0.374		0.299		0.012		0.013	
t Crítico una cola	1.725		1.725		1.725		1.725	
P(T<=t) dos colas	0.747		0.597		0.025		0.025	
t Crítico dos colas	2.086		2.086		2.086		2.086	

Anexo 2e. Resultados de prueba de t de dos colas entre los tratamientos de la categoría hipertrófica

Análisis	hiper 7	hiper 8	hiper 7	hiper 9	hiper 7	hiper 10
Media	1410.697	1288.303	1410.697	250.909	1410.697	257.212
Varianza	159873.032	237229.721	159873.032	17304.402	159873.032	11726.606
Observaciones	11	11	11	11	11	11
Varianza agrupada	198551.377		88588.71717		85799.81919	
Diferencia hipotética de medias	0		0		0	
df	20		20		20	
t Stat	0.644		9.138		9.235	
P(T<=t) una cola	0.263		0.000000007		0.000000006	
t Crítico una cola	1.725		1.725		1.725	
P(T<=t) dos colas	0.527		0.00000001		0.00000001	
t Crítico dos colas	2.086		2.086		2.086	
Análisis	hiper 8	hiper 9	hiper 8	hiper 10	hiper 9	hiper 10
Media	1288.303	250.909	1288.303	257.212	250.909	257.212
Varianza	237229.721	17304.402	237229.721	11726.606	17304.402	11726.606
Observaciones	11	11	11	11	11	11
Varianza agrupada	127267.062		124478.164		14515.504	
Diferencia hipotética de medias	0		0		0	
df	20		20		20	
t Stat	6.820		6.854		-0.123	
P(T<=t) una cola	0.0000006		0.0000006		0.452	
t Crítico una cola	1.725		1.725		1.725	
P(T<=t) dos colas	0.000001		0.000001		0.904	
t Crítico dos colas	2.086		2.086		2.086	

**Anexo 3. Matrices de divergencia nucleotídica de las secuencias analizadas con el huésped y hospedero de *Durinskia baltica***

Anexo 3a. Matriz de divergencia nucleotídica corregida para secuencias analizadas con el hospedero de *Durinskia baltica*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 <i>Akashiwo_sanguinea_KP976596</i>																
2 <i>Amphidinium_herdmanii_AF274253</i>	0.094															
3 <i>Durinskia_agilis_JF514516</i>	0.115	0.139														
4 <i>Durinskia_balticaChina_GU999528</i>	0.079	0.122	0.085													
5 <i>Durinskia_balticaMex</i>	0.088	0.131	0.094	0.014												
6 <i>Durinskia_capensis_AB271107</i>	0.080	0.115	0.107	0.049	0.057											
7 <i>Durinskia_cf_baltica_LC054926</i>	0.089	0.122	0.114	0.066	0.071	0.024										
8 <i>Galeidinium_rugatum_AB195668</i>	0.089	0.122	0.114	0.066	0.071	0.024	0.005									
9 <i>Gymnodinium_catenatum_GU362426</i>	0.089	0.115	0.119	0.063	0.068	0.024	0.012	0.012								
10 <i>Heterocapsa_niei_KU900227</i>	0.091	0.115	0.091	0.049	0.054	0.050	0.061	0.061	0.055							
11 <i>Heterocapsa_rotundata_AF274267</i>	0.181	0.183	0.189	0.134	0.128	0.154	0.173	0.173	0.160	0.142						
12 <i>Karenia_brevis_FJ587219</i>	0.193	0.195	0.202	0.145	0.134	0.165	0.185	0.185	0.171	0.153	0.009					
13 <i>Karenia_mikimotoi_FJ587220</i>	0.202	0.205	0.202	0.145	0.142	0.165	0.177	0.177	0.172	0.136	0.069	0.080				
14 <i>Karlodinium_micrum_JF791096</i>	0.089	0.119	0.103	0.055	0.054	0.044	0.047	0.047	0.047	0.055	0.133	0.143	0.140			
15 <i>Karlodinium_micrum_JF791096</i>	0.083	0.126	0.107	0.052	0.052	0.047	0.050	0.050	0.049	0.047	0.126	0.136	0.133	0.017		
16 <i>Kryptoperidinium_foliaceum_EF492508</i>	0.092	0.119	0.097	0.066	0.068	0.057	0.065	0.071	0.065	0.052	0.128	0.138	0.146	0.044	0.041	
17 <i>Peridiniopsis_borgei_EF058241</i>	0.094	0.119	0.100	0.052	0.057	0.046	0.055	0.055	0.054	0.047	0.126	0.136	0.143	0.024	0.026	0.036
18 <i>Peridiniopsis_cf_kevei_AB353770</i>	0.085	0.119	0.095	0.049	0.049	0.052	0.060	0.060	0.060	0.049	0.129	0.139	0.136	0.029	0.026	0.036
19 <i>Peridiniopsis_penardii_HM596543</i>	0.080	0.115	0.100	0.044	0.044	0.044	0.057	0.057	0.054	0.052	0.122	0.132	0.129	0.031	0.029	0.047
20 <i>Peridinium_balticum_AF231803</i>	0.077	0.118	0.097	0.041	0.041	0.041	0.055	0.055	0.052	0.049	0.125	0.136	0.133	0.029	0.026	0.044
21 <i>Peridinium_gatunense_DQ166208</i>	0.080	0.132	0.100	0.055	0.057	0.049	0.063	0.058	0.060	0.063	0.136	0.147	0.144	0.042	0.039	0.052
22 <i>Peridinium_inconspicuum_EF05827</i>	0.094	0.131	0.106	0.049	0.054	0.052	0.072	0.072	0.071	0.055	0.123	0.133	0.130	0.050	0.042	0.057
23 <i>Peridinium_polonicum_AY443017</i>	0.097	0.131	0.088	0.057	0.065	0.062	0.071	0.071	0.071	0.054	0.138	0.149	0.139	0.049	0.046	0.051
24 <i>Peridinium_quinquecorne_AB246744</i>	0.097	0.134	0.103	0.054	0.060	0.052	0.060	0.060	0.060	0.052	0.131	0.142	0.146	0.034	0.036	0.049
25 <i>Peridinium_umbonatum_GU001637</i>	0.091	0.134	0.097	0.052	0.060	0.046	0.060	0.060	0.060	0.052	0.135	0.145	0.149	0.039	0.036	0.044
26 <i>Peridinium_volzii_EF058248</i>	0.094	0.131	0.106	0.049	0.054	0.052	0.072	0.072	0.071	0.055	0.123	0.133	0.130	0.050	0.042	0.057
27 <i>Peridinium_willei_EF058250</i>	0.139	0.187	0.145	0.101	0.107	0.102	0.108	0.111	0.117	0.096	0.178	0.189	0.189	0.081	0.073	0.090
28 <i>Perkinsus_marinus_AF324218</i>	0.097	0.131	0.094	0.057	0.065	0.057	0.071	0.071	0.071	0.054	0.138	0.149	0.146	0.049	0.046	0.051
29 <i>Prorocentrum_micans_EF492511</i>	0.089	0.153	0.115	0.068	0.076	0.065	0.065	0.065	0.071	0.071	0.150	0.161	0.154	0.052	0.047	0.063
30 <i>Prorocentrum_triestinum_AB183673</i>	0.116	0.149	0.114	0.077	0.086	0.077	0.086	0.086	0.089	0.086	0.157	0.169	0.169	0.058	0.060	0.072
31 <i>Scrippsiella_sweeneyae_AF274276</i>	0.149	0.166	0.185	0.107	0.119	0.123	0.140	0.140	0.143	0.129	0.184	0.196	0.197	0.107	0.117	0.117
32 <i>Scrippsiella_trochoidea_KR535602</i>	0.334	0.378	0.377	0.299	0.310	0.236	0.197	0.205	0.209	0.271	0.470	0.494	0.480	0.275	0.280	0.291

Anexo 3a continuación. Matriz de divergencia nucleotídica corregida para secuencias analizadas con el hospedero de *Durinskia baltica*

	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1 <i>Akashiwo sanguinea</i> KP976596																
2 <i>Amphidinium herdmanii</i> AF274253																
3 <i>Durinskia agilis</i> JF514516																
4 <i>Durinskia baltica</i> China GU999528																
5 <i>Durinskia baltica</i> Mex																
6 <i>Durinskia capensis</i> AB271107																
7 <i>Durinskia cf. baltica</i> LC054926																
8 <i>Galeidinium rugatum</i> AB195668																
9 <i>Gymnodinium catenatum</i> GU362426																
10 <i>Heterocapsa niei</i> KU900227																
11 <i>Heterocapsa rotundata</i> AF274267																
12 <i>Karenia brevis</i> FJ587219																
13 <i>Karenia mikimotoi</i> FJ587220																
14 <i>Karlodinium micrum</i> JF791096																
15 <i>Karlodinium micrum</i> JF791096																
16 <i>Kryptoperidinium foliaceum</i> EF492508																
17 <i>Peridiniopsis borgei</i> EF058241																
18 <i>Peridiniopsis cf. kevei</i> AB353770	0.012															
19 <i>Peridiniopsis penardii</i> HM596543	0.031	0.031														
20 <i>Peridinium balticum</i> AF231803	0.029	0.029	0.002													
21 <i>Peridinium gatunense</i> DQ166208	0.042	0.042	0.019	0.016												
22 <i>Peridinium inconspicuum</i> EF05827	0.044	0.044	0.036	0.034	0.050											
23 <i>Peridinium polonicum</i> AY443017	0.039	0.039	0.041	0.039	0.052	0.039										
24 <i>Peridinium quinquecorne</i> AB246744	0.034	0.034	0.036	0.034	0.047	0.044	0.044									
25 <i>Peridinium umbonatum</i> GU001637	0.034	0.034	0.036	0.034	0.041	0.044	0.044	0.005								
26 <i>Peridinium volzii</i> EF058248	0.044	0.044	0.036	0.034	0.050	0.000	0.039	0.044	0.044							
27 <i>Peridinium willei</i> EF058250	0.076	0.076	0.078	0.076	0.090	0.073	0.065	0.081	0.081	0.073						
28 <i>Perkinsus marinus</i> AF324218	0.039	0.039	0.041	0.039	0.052	0.034	0.005	0.044	0.044	0.034	0.065					
29 <i>Prorocentrum micans</i> EF492511	0.046	0.052	0.052	0.049	0.049	0.052	0.057	0.057	0.052	0.052	0.096	0.057				
30 <i>Prorocentrum triestinum</i> AB183673	0.057	0.055	0.060	0.057	0.072	0.078	0.068	0.068	0.068	0.078	0.111	0.068	0.087			
31 <i>Scrippsiella sweeneyae</i> AF274276	0.107	0.110	0.119	0.123	0.141	0.120	0.119	0.110	0.106	0.120	0.164	0.119	0.126	0.127		
32 <i>Scrippsiella trochoidea</i> KR535602	0.287	0.298	0.288	0.283	0.299	0.308	0.299	0.286	0.286	0.308	0.355	0.299	0.296	0.328	0.413	

Anexo 3b. Matriz de divergencia nucleotídica corregida para secuencias analizadas con el huésped (endosimbionte) de *Durinskia baltica*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
<i>Rhizosolenia setigera</i> AF015568																							
<i>Chaetoceros gracilis</i> AY604697	0.155																						
<i>Chaetoceros muellerii</i> HQ912422	0.132	0.027																					
<i>Odontella sinensis</i> KC309577	0.123	0.173	0.154																				
<i>Skeletonema costatum</i> JN159931	0.094	0.161	0.135	0.117																			
<i>Thalassiosira eccentrica</i> DQ514789	0.112	0.183	0.156	0.146	0.067																		
<i>Pseudonitzschia multiseriata</i> KC801040	0.146	0.176	0.149	0.137	0.118	0.115																	
<i>Bacillaria paxillifer</i> HQ912491	0.102	0.126	0.121	0.107	0.120	0.138	0.129																
<i>Nitzschia longissima</i> AY881967	0.137	0.161	0.140	0.126	0.107	0.123	0.094	0.105															
<i>Cylindrotheca closterium</i> DQ143047	0.149	0.167	0.146	0.152	0.134	0.123	0.120	0.112	0.087														
<i>Bolidomonas pacifica</i> KR998416	0.166	0.187	0.156	0.166	0.157	0.170	0.173	0.170	0.160	0.188													
<i>Nitzschia palea</i> KC736611	0.151	0.161	0.143	0.134	0.123	0.131	0.099	0.089	0.094	0.079	0.169												
<i>Peridinium balticum</i> AB195670	0.149	0.174	0.156	0.129	0.143	0.143	0.137	0.105	0.107	0.089	0.166	0.048											
<i>Galeidinium rugatum</i> AB195669	0.149	0.158	0.134	0.147	0.134	0.155	0.134	0.127	0.099	0.097	0.176	0.059	0.057										
<i>Kryptoperidinium foliaceum</i> GU591328	0.131	0.177	0.161	0.115	0.104	0.143	0.109	0.089	0.089	0.094	0.166	0.036	0.064	0.057									
<i>Peridiniopsis penardii</i> AB353775	0.107	0.187	0.159	0.120	0.062	0.056	0.099	0.123	0.101	0.146	0.151	0.112	0.140	0.137	0.104								
<i>Peridiniopsis cf. kevei</i> AB353774	0.109	0.180	0.152	0.117	0.057	0.044	0.094	0.120	0.091	0.134	0.151	0.115	0.137	0.143	0.104	0.010							
<i>Peridinium quinquecorne</i> AB246745	0.126	0.129	0.105	0.118	0.104	0.152	0.151	0.115	0.123	0.123	0.149	0.109	0.123	0.112	0.104	0.134	0.131						
<i>Durinskia baltica</i> Mex	1.368	1.516	1.547	1.417	1.383	1.277	1.469	1.288	1.260	1.361	1.375	1.176	1.157	1.316	1.139	1.296	1.249	1.406					
<i>Cyclotella</i> sp. HQ912489	0.109	0.180	0.152	0.117	0.057	0.044	0.094	0.120	0.091	0.134	0.151	0.115	0.137	0.143	0.104	0.010	0.000	0.131	1.249				
<i>Discostella</i> sp. DQ514830	0.109	0.180	0.152	0.117	0.057	0.044	0.094	0.120	0.091	0.134	0.151	0.115	0.137	0.143	0.104	0.010	0.000	0.131	1.249	0.000			
<i>Nitzschia capitellata</i> FN557031	0.148	0.140	0.132	0.140	0.137	0.134	0.107	0.097	0.104	0.081	0.166	0.025	0.052	0.062	0.055	0.131	0.128	0.123	1.240	0.128	0.128		