



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Caracterización molecular de *Cyclotella alchichicana*
(Diatomea: Thalassiosirales): delimitación específica y
relaciones filogenéticas**

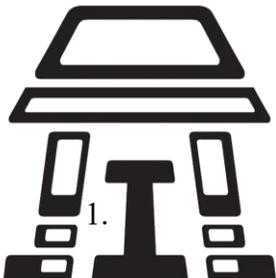
T E S I S

Que para obtener el título de:

Biólogo

Presenta:

Essicka Andrea García Saldaña



Directora de tesis:
Dra. Elizabeth Ortega Mayagoitia

LOS REYES IZTACALA, ESTADO
DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Datos de la alumna

García Saldaña Essicka Andrea

Carrera de Biología

Grupo de Investigación en Limnología Tropical, UIICSE. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, Estado de México, México.
essickaa@gmail.com

2. Datos del tutor

Dra. Ortega Mayagoitia Elizabeth

Grupo de Investigación en Limnología Tropical, UIICSE, División de Investigación y Posgrado. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, Estado de México, México.

Datos del sinodal 1

Dr.

Ciros Pérez Jorge

3. Datos del sinodal 2

Dr.

Campos Contreras Jorge Eduardo

4. Datos del sinodal 3

Dra.

Vilaclara Fatjó Gloria

5. Datos del sinodal 4

Dr.

Salazar Rojas Víctor Manuel

6. Datos del trabajo escrito

Caracterización molecular de *Cyclotella alchichicana* (Diatomea: Thalassiosirales): delimitación específica y relaciones filogenéticas.

México

63 p.

2018

AGRADECIMIENTOS

A mi mami

No me queda más que agradecerte por soportar mis errores, mis 5 añitos de carrera, por consentirme todos los días con lo más caro de París, aguantar mi detención en la delegación, tolerar mi suspensión inofensiva, , por darme una hermana increíble que tanto amo y por todo lo que haces para sacarnos delante de la mejor manera. Eres un ejemplo a seguir a tu corta edad XD.

A mi novio de toda la vida

Te he agradecido trillones de veces por el amor empalagoso después de tantos años, por los cariños ilimitados que me das día a día, por la paciencia que me tienes cuando pierdo el juicio, por la constancia obsesiva que tienes de quererme, por compartirme de tu familia bonita e incluirme siempre en su hogar; pero esta vez te lo digo protegido con derechos de autor! Eres mi más todo, te amo.

A mis amigas las más preciosas del universo y las únicas que tengo (Nicolás y Melón).

Les agradezco el apoyo incondicional que me dieron en los días frustrantes, las risas al salir en secreto para distraernos, las horas interminables de escuchar mis historias interesantísimas, los consejos malísimos que siempre me dan, los metros de papel que me dieron cuando solo quería llorar y las millones de diatomeas que separaron para ayudarme. La felicidad de conseguir esta meta en mi vida, no se compara con el placer tan grande que me da tenerlas a mi lado por el resto de mis días.

Grax

Los amo mil

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis, Dra. Elizabeth Mayagoitia, muchas gracias por todo el apoyo que me brindó a lo largo de este trabajo y los anteriores; valoro muchísimo que nunca dejó que mi ánimo decayera con los fracasos que tuve y toda la paciencia que tuvo para que aprendiera lo necesario para este proyecto.

Al Dr. Jorge Campos, por apoyarme con todos los experimentos de extracción de ADN, enseñarme las técnicas necesarias para llevar a cabo el trabajo y aclararme pacientemente los sustentos teóricos.

Al Dr. Jorge Ciros Perez que me ayudó desde los primeros proyectos de LICYT hasta la elaboración de este escrito. A la Dra. Gloria Vilaclara Fatjo y al Dr. Victor Manuel Salazar Rojas, que me prestaron el tiempo para ayudarme con este proyecto.

Este trabajo fue posible gracias al apoyo de los proyectos PAPIIT IN222916 (DGAPA-UNAM) y CONACYT-CB 255788, que proveyeron los recursos financieros para salidas de campo, reactivos y servicios de secuenciación. El proyecto PAPIIT IN222916 me proporcionó una beca para la conclusión de mis estudios de Licenciatura.

DEDICATORIAS

A mi familia:
mi mami, Xhail, Marce,
Toño ♡, Nico y Mel.

“Systems of classification are not hat racks, objectively presented to us by nature. They are dynamic theories developed to express particular views about the history of organisms. Evolution has produced a set of unique species ordered by differing degrees of genealogical relationship. Taxonomy, the search for this natural order, is the fundamental science of history.”

S. J. Gould (1987)

“Final thoughts? There are a lot of diatom species (God must like them almost as much as beetles); humans find it difficult to tell them apart, other diatoms don't; but perhaps a compleat diatomist can get to know their ways.”

D.G. Mann. (1999)

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	
1.1 Generalidades de las diatomeas	3
1.2 Conceptos de especie	4
1.3 Marcadores moleculares	6
1.4 Características morfológicas y ecológicas del género <i>Cyclotella</i>	7
1.5 Ubicación taxonómica del género <i>Cyclotella</i>	9
1.6 Problemas taxonómicos variación y plasticidad fenotípica en el género <i>Cyclotella</i> ..	9
1.7 <i>C. alchichicana</i> y su similitud morfológica con <i>C. quillensis</i>	11
2. Objetivos	14
3. Descripción del área de estudio	14
4. Materiales y métodos	
4.1 Colecta de organismos	15
4.2 Extracción de ADN, PCR y secuenciación	15
4.3 Análisis de datos moleculares	18
4.4 Reconstrucción filogenética	18
4.5 Delimitación específica de <i>C. alchichicana</i>	20
4.6 Datos morfológicos	20
5. Resultados	
5.1 Secuencia nucleotídica de la región D1/D2 del gen nuclear 28S del ADNr y el gen <i>psaA</i> del ADN cloroplástico	21
5.2 Posiciones variables en las secuencias	22
5.3 Filogenias	24
5.4 Matriz de distancias en pares de nucleótidos	28
5.5 Delimitación específica	29
5.6 Micromorfología	33
6. Discusión	

6.1 Filogenia de <i>C. alchichicana</i> y especies cercanas	35
6.2 Delimitación específica de <i>C. alchichicana</i>	36
6.3 ¿Qué concepto debería utilizarse al hablar de <i>C. alchichicana</i> ?	37
7. Conclusiones	38
8. Perspectivas de investigación	39
9. Literatura citada	39

Anexos

Anexo 1. Listado de las cepas utilizadas en el análisis de 28S	50
Anexo 2. Listado de las cepas utilizadas en el análisis de psaA	53
Anexo 3. Árbol filogenético de las regiones D1/D2 del gen nuclear 28S del ADNr, con 60 secuencias	56
Anexo 4. Árbol filogenético del gen psaA del ADN cloroplástico, con 59 secuencias	57
Anexo 5. Secuencia nucleotídica de las regiones D1/D2 del gen nuclear 28S del ADNr.....	58
Anexo 6. Secuencia nucleotídica del gen psaA del ADN cloroplástico.....	59
Anexo 7. Micromorfología	60
Anexo 8. Fotografías de los taxones analizados	61
Anexo 9. Fotografías de <i>C. alchichicana</i>	62

RESUMEN

Las diatomeas de simetría radial, en particular el género *Cyclotella*, conforman un grupo de diatomeas donde se presenta amplia plasticidad fenotípica, especies crípticas y alta variación intraespecífica en la morfología de las frústulas. Estas características obstaculizan los avances en la taxonomía del grupo, que se basa principalmente en evidencias morfológicas, por lo que se ha intentado resolver su estatus taxonómico a través de marcadores moleculares. *C. alchichicana* es una especie microendémica del lago Alchichica, Puebla; fue descrita como una especie nueva ya que se encontraron suficientes diferencias morfológicas con otras especies del mismo género, especialmente con *C. quillensis*, con la que además comparte características ecológicas. En el presente estudio se secuenciaron las regiones D1/D2 del gen nuclear 28S del ADNr y psaA del ADNcp para establecer las relaciones evolutivas de *C. alchichicana* con otras especies del mismo género y definir el estatus específico de *C. alchichicana* con un enfoque molecular. Se encontró que *C. alchichicana* es más cercana filogenéticamente al complejo de especies crípticas *C. meneghiniana* que a la morfoespecie *C. quillensis*. Además, se encontraron tan solo tres mutaciones autapomórficas en el gen 28S y una en el gen psaA, las cuales separan a *C. alchichicana* del resto con una divergencia intraespecífica previa (P) relativamente baja de ≤ 0.0028 . Dado que, en general, los marcadores utilizados tienen baja divergencia intraespecífica dentro del género *Cyclotella*, la delimitación específica a nivel molecular no pudo establecerse con claridad, por lo cual se propone utilizar otras regiones del genoma y obtener otro tipo de evidencias interespecíficas como aislamiento reproductivo, plasticidad fenotípica y tolerancia a la salinidad.

ABSTRACT

The diatoms of radial symmetry, particularly the *Cyclotella* genus, constitute a group of diatoms with wide phenotypic plasticity, cryptic species and high intraspecific variation in the morphology of the frustule. These characteristics impede advances in the taxonomy of the group, which is based mainly on morphological traits. Molecular markers have been proposed as tools to resolve the taxonomic status and phylogenetic relationships of its species. *C. alchichicana* is a microendemic species of Lake Alchichica, Puebla. It was described as a new species due to morphological differences with other species of the same genus, especially with *C. quillensis*, with which it also shares ecological characteristics. In the present study, the D1 / D2 regions of the 28S nuclear gene of the rDNA and psaA of the cDNA were sequenced to establish the evolutionary relationships of *C. alchichicana* with other species of the same genus and to define the specific status of *C. alchichicana* with a molecular approach. It was found that *C. alchichicana* is phylogenetically closer to the *C. meneghiniana* complex of cryptic species than to the morphospecies *C. quillensis*. In addition, only three autapomorphic mutations were found in the 28S gene and one in the psaA gene, which separates *C. alchichicana* from the rest with a relatively low intraspecific (P) divergence of ≤ 0.0028 . Given that, in general, the markers used have low intraspecific divergence within the genus *Cyclotella*, the specific delimitation at the molecular level could not be established clearly, for which reason it is proposed to use other regions of the genome and obtain another type of interspecific evidence such as reproductive isolation, phenotypic plasticity and tolerance to salinity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de las diatomeas

Las diatomeas (Diatomea, Dumortier 1821) son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos, los cuales poseen una pared celular formada de óxido de sílice (SiO_2) compuesta de dos partes llamadas valvas o frústulas (epivalva e hipovalva) que las caracteriza (Simms et al., 2006). Las diatomeas se distinguen por alternar la reproducción asexual, en la que por división celular cada célula madre reconstruye la frústula de menor tamaño, originando una diatomea del mismo tamaño y otra más pequeña, y la reproducción sexual, en la que después de un determinado número de generaciones asexuales se producen gametos que se fusionan formando auxosporas que recuperan el tamaño original de la diatomea. Las diatomeas son el grupo más diverso de microalgas eucarióticas (Mann, 1999) y constituyen gran parte del fitoplancton; además, contribuyen globalmente en los ciclos de carbono y silicio y se utilizan cada vez más en el monitoreo ecológico y la correlación estratigráfica (Nagy, 2011). A pesar de su gran importancia, la taxonomía de las diatomeas es desordenada y carece de una base conceptual firme (Spamer y Theriot, 1997; Mann, 1999) que obstaculiza el avance en el conocimiento de la biología de este grupo.

Fundamentalmente, la clasificación de las diatomeas se ha basado en su simetría y en las características micromorfológicas de las frústulas, como son las estructuras internas del manto, la interrupción en el patrón de la estriación, el espesamiento del margen valvar (pseudoseptos), el patrón de organización de las estrías, el campo poroso apical y las estructuras externas como espinas, entre otros (Mann, 1999; Alverson, 2008). Estas estructuras son reconocibles a través de microscopía de luz y electrónica de barrido (MEB) (Mann, 1999). Otros autores utilizan estructuras citoplasmáticas como plastidios, vacuolas, procesos de reproducción, entre otros (Cox, 1996). No obstante, continuamente se pone en duda el valor taxonómico que se le atribuye a la morfología en la descripción de nuevos taxones, pues algunas diatomeas presentan variación fenotípica, llegando a ser similares con otras especies, aunque son linajes distintos (genéticamente diferentes) y formando complejos de especies crípticas (Duleba et al., 2015).

Las herramientas moleculares han tomado gran auge e importancia en el establecimiento efectivo del estatus taxonómico de las especies que tienen caracteres estructurales difíciles de

observar y al aclarar la identidad de linajes crípticos (Alverson, 2008; Rimet y Bouchez, 2012; Zou et al., 2016). Otras de las aplicaciones que proveen el uso de estas herramientas es el aproximar las relaciones biológicas evolutivas o describir la diversidad genética que existe dentro y entre las poblaciones.

Un género particularmente difícil de analizar son las diatomeas pelágicas de ambientes continentales del género *Cyclotella*, pues parece existir un continuo de morfotipos entre las especies individuales y gradientes morfológicos interespecíficos (Flower et al., 1990). Aunque se ha tratado de resolver el estatus de varias especies morfológicas pertenecientes a este género utilizando marcadores moleculares, aún quedan muchas incógnitas por resolver dentro de la taxonomía de este género como es el caso de la especie *Cyclotella alchichicana* (Oliva, Lugo, Alcocer y Cantoral). Esta especie fue descrita únicamente con base en su morfología y es considerada microendémica del Lago Alchichica en Puebla; sin embargo, se desconocen sus relaciones evolutivas respecto a especies cercanas filogenéticamente y su caracterización molecular para comprobar o no su delimitación como una especie distinta a otras.

1.2 Conceptos de especie

Uno de los primeros pasos para resolver los problemas taxonómicos dentro de las diatomeas, es establecer criterios claros para definir qué es una especie. Según Mann (1999) el concepto de especie en diatomeas debe tomar los rasgos morfológicos (concepto de especie morfológica, CEM) como valvas, protoplastos, tipo de reproducción, etc., como fuente primaria de datos para la delimitación de las especies, pues proporciona continuidad con las clasificaciones pasadas, es relativamente fácil, económica, rápida de describir y está siempre disponible (p.e, los datos fisiológicos sólo se pueden obtener si el organismo se puede cultivar). Con base a este enfoque, se han descrito más de 25,000 especies hasta el año 2008 (Alverson, 2008).

El concepto biológico de especie (CEB) utiliza al entrecruzamiento como un criterio para delimitar entre especies (Lee, 2003), según Dobzhansky (1937), Coyne y Orr (2004) y Mayr (1942, 2000), las especies se definen por su capacidad de dejar descendencia viable y fértil, además de establecer el límite entre especies a través del aislamiento reproductivo de las poblaciones con las de otras especies. Esto implica algunas limitantes para algunos organismos como las diatomeas, pues la mayor parte de su vida se reproducen asexualmente, además de que

se ha comprobado la existencia de autofertilización (automixis) en algunas especies de diatomeas penadas y centrales (Kociolek, 2005). Adicionalmente, estos resultados siempre carecerán de importancia biológica porque la forma de extrapolarlo a lo que ocurre en la naturaleza no es clara (Alverson, 2008).

Existen varias definiciones de especie que reconocen el criterio de cohesión (Lee, 2003), donde las especies están constituidas por los individuos o poblaciones que permanecen cohesionadas a través del tiempo y responden a las mismas fuerzas evolutivas, como es el concepto de especie ecológica (Van Valen, 1976), que habla de un linaje que ocupa y está adaptado a un área biogeográfica específica, distinta a la de otros linajes. De igual manera, el concepto de especie evolutiva (Wiley, 1978), que resalta a un linaje como una secuencia ancestro-descendiente con tendencias históricas y evolutivas propias. Sin embargo, algunas veces es difícil distinguir o probar la cohesión entre poblaciones.

Igualmente, se tienen conceptos basados en el criterio de monofilía, como el concepto de especie filogenética (CEF, Cracraft, 1983), basado en la idea de similitud que explica que cualquier grupo de organismos que compartan un único carácter apomórfico (no presente en sus ancestros) será establecido como una especie; no obstante, un mismo grupo puede tener variantes de diversos caracteres en sus individuos.

Con el afán de conciliar los diversos conceptos que se han propuesto alrededor de la delimitación de especies, de Queiroz (2005a, b, 2007) ha propuesto el concepto de especie basado en linaje (CEBL). Este concepto integra múltiples líneas de evidencia en la delimitación de especies, es decir que ninguna evidencia sea indispensable para hablar de especiación y tratarlas con el mismo valor. De esta manera, reconocer la identidad de los organismos resulta del conjunto reforzado de análisis comparados morfológicos, ecológicos, grado de aislamiento reproductivo, fisiología, secuencias de ADN, etc., que consoliden y enriquezcan la identidad de una especie, permitan conseguir una taxonomía integrativa y finalmente conduzcan a una clasificación natural (Schlick-Steiner et al., 2010; Alverson, 2008). Esta forma de delimitar especies exige extrema atención al momento de diseñar los métodos de estudio, como número de individuos que serán muestreados o el número y la elección de loci genéticos a estudiar, etc. (Alverson, 2008).

Concretamente, este último enfoque fue el que se utilizó para caracterizar a la especie en cuestión, *C. alchichicana*, en el que se considerando los caracteres genéticos obtenidos en este estudio y los morfológicos descritos con anterioridad en las especies cercanas.

1.3 Marcadores moleculares

El código de barras de ADN es un método taxonómico aplicado para identificar especies con base en marcadores genéticos, los cuales se analizan para encontrar similitudes y diferencias en sus secuencias usando bases de datos existentes (Hebert et al., 2003). Para la identificación y el cálculo de la distancia genética entre especies, el código de barras del ADN tradicional construye árboles filogenéticos, utilizando los criterios de la parsimonia, la inferencia bayesiana o la máxima verosimilitud (Hebert et al., 2003, Zou et al. 2016).

Los genes del complejo ribosómico y sus espaciadores (18S, 28S, ITS1, ITS2) son unos de los marcadores moleculares más usados, ya que existen oligos universales para la amplificación de sus fragmentos. La base de datos de esta región es cada vez más amplia, además, están repetidos en tándem cientos de miles de veces a lo largo del genoma y distribuidos en múltiples cromosomas, poseen regiones altamente conservadas y regiones hipervariables y algunas porciones de este cistrón permiten identificar entidades a nivel de especie (como es el caso de la subunidad grande del ADNr). Si bien los genes del complejo ribosómico proveen ventajas, también se han demostrado desventajas pues la mayoría de las diatomeas albergan una cantidad sustancial de polimorfismo intragenómico en prácticamente todo el cistrón de ADNr (Evans et al., 2008; Kooistra et al. 2008; Trobajo et al., 2010; Souffreau et al., 2011; Kaczmarska et al., 2014; Lefebvre y Hamilton, 2015).

El ADN cloroplástico también ha sido utilizado para discriminar complejos de especies de diatomeas o para estimar su evolución (Jung et al., 2010), gracias a que tiene múltiples copias en los cloroplastos de las células vegetales, sus genes se heredan aleatoriamente a las células hijas durante la mitosis y meiosis (segregación aleatoria) y la herencia es de forma uniparental (marcador haploide; Birky, 2001). Estas características le confieren ventajas sobre los estudios filogenéticos basados en genes de ADNr; aunque se debe trabajar más para determinar mejor su

heredabilidad en una muestra más amplia de diatomeas, pues se ha reportado herencia biparental en *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Ghiron et al. 2008).

Otros marcadores muy empleados en la sistemática molecular de las diatomeas en todos los niveles taxonómicos son los que utilizan el ADN repetitivo, como los microsatélites (Alverson, 2008). A pesar de esto, no se ha identificado un código de barras de ADN universal para los estudios filogenéticos de las diatomeas que sea satisfactorio en todos los casos (Guo, et al, 2015), por lo que parece más eficaz emplear múltiples genes para estos estudios (Saunders y Kucera, 2010).

Algunos autores (Mann et al., 2004, 2010; Alverson y Theriot, 2005) han delimitado especies de diatomeas por medio de herramientas moleculares; aunque a veces estos rasgos proporcionan datos inexactos, pues algunas especies han mostrado alta variación intraespecífica, lo que podría llevar a percibir a sus individuos como especies distintas. En algunos casos estos límites de especies son sensibles al muestreo intraespecífico, a la elección del marcador genético y a la calidad de la evidencia que corrobora su separación inicial (como con datos morfológicos; Alverson, 2008).

1.4 Características morfológicas y ecológicas del género *Cyclotella*

Las especies del género *Cyclotella* (Kützing) se caracterizan por tener simetría radial y forma de cilindro con 2 zonas distinguibles exteriormente sobre la cara de cada valva (véase, Fig. 1): el área central (“A”) y el marginal (“B”). La zona que rodea y junta una valva con otra se denomina manto (“E”). El área central puede ser ondulada, plana o tangencial, lisa o coliculada (con pequeñas elevaciones redondeadas); con depresiones (que no penetran en la pared silíceas), verrugas (papilas) o con varias o ninguna apertura (fultopórtulas). El área marginal tiene estrías (“C”) e interestrías (como surcos y crestas) radiales que rodean el área central, con un patrón estrellado. En la unión entre la valva y el manto se pueden insertar espinas de unión (“D”), que son extensiones sólidas de la valva. Las rimopórtulas (“Ri”) son procesos tubulares que atraviesan la valva con una abertura redonda o en forma de hendidura o de 2 labios, se ubican en el anillo de espinas o en el manto y secreta polisacáridos y otros compuestos de carbono (Round et al., 1990).

Por otra parte, en la cara interna hay costillas más o menos gruesas, de igual o diferente longitud, donde se encuentra el manto fultoportulado. Las fultoportulas también son procesos tubulares que atraviesan la valva como un tubo o un poro, pueden ser centrales (“Fc”) o marginales (“Fu”), están rodeadas por diferente cantidad y posición de poros satelitales (“s.p.”) y secretan β -quitina que ayuda a la flotabilidad de las algas. A veces una capa silíceo delgada cubre parcialmente el centro o el margen (membrana) (Round et al., 1990).

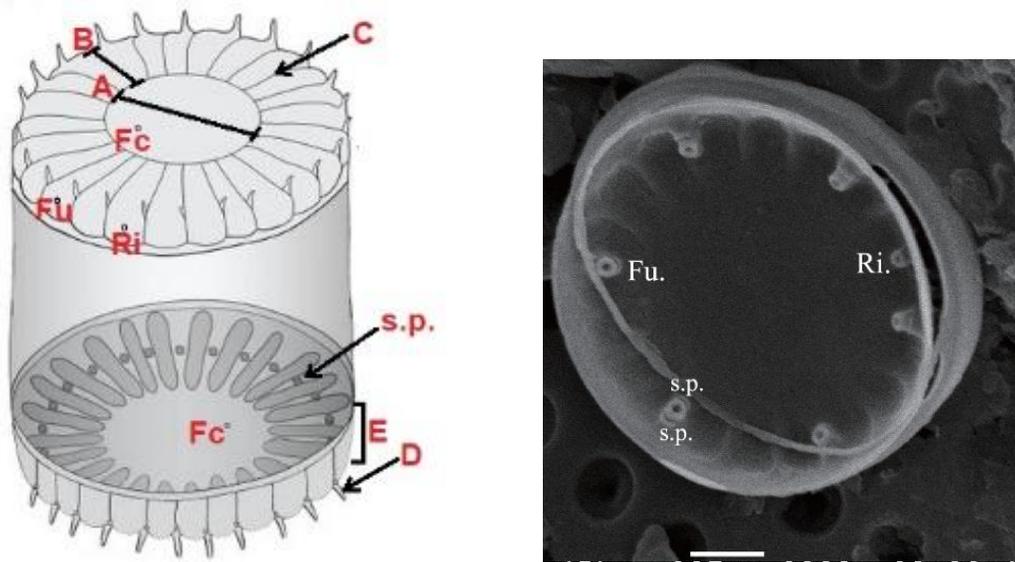


Figura 1. Izquierda: Diagrama basado en la morfología de *C. meneghiniana*, editado de Shirokawa y Shimada (2016). Derecha: Fotografía de *Cyclotella atomus* var. *marina*, la barra corresponde a 667 nm (Chung et al., 2010). Se indican las diferentes zonas y caracteres estructurales de la valva que distinguen al género *Cyclotella* como: el área central “A”, el área marginal “B”, las estrías “C”, espinas “D”, la zona del manto “E”, rimopórtulas “Ri”, fultopórtulas centrales “Fc”, fultopórtulas marginales “Fu” y poros satelitales “s.p.”

Ecológicamente, las especies pertenecientes al género *Cyclotella* se encuentran en una amplia gama de ambientes dulces y salinos y se han documentado hasta tres colonizaciones de especies dulceacuícolas hacia ambientes marinos, dos de las cuales condujeron a eventos de especiación (Alverson et al., 2007).

1.5 Ubicación taxonómica del género *Cyclotella*

En la revisión de la estructura general de la clasificación de eucariotas realizada por Adl et al. (2012), se incorporan los últimos avances realizados de análisis filogenéticos a escala filogenómica, así como las filogenias basadas en ARNr, tratando de llegar a un equilibrio conservador entre actualizar la clasificación y evitar el reconocimiento formal de agrupaciones inciertas. Con base a la clasificación de Adl et al. (2012) el género *Cyclotella* se ubica de la siguiente forma:

Supergrupo: Stramenopiles, Alveolata, y Rhizaria (SAR)

Subgrupo: Stramenopiles Patterson 1989, corregido por Adl et al. 2005

Diatomea Dumortier 1821 [= Bacillariophyta Haeckel, 1878]

Coscinodiscophytina Medlin y Kaczmarska, 2004

1.6 Problemas taxonómicos, variación y plasticidad fenotípica en el género *Cyclotella*

Como se mencionó anteriormente, las descripciones tradicionales de diatomeas basadas en la morfología de la frústula son insuficientes para delimitar especies, la razón de esto es que en las diatomeas de simetría radial existe una gran similitud morfológica entre linajes distintos (i.e., especies crípticas: morfológicamente indistinguibles usando enfoques clásicos), a que hay una alta variación intraespecífica (Meyer y Hakansson, 1996), a que las frústulas exhiben plasticidad fenotípica (Shirokawa et al., 2012), y a que las evidencias están sometidas a la subjetividad de los taxónomos (o sistemáticos) quienes deciden cuál y cuánta evidencia es suficiente para concluir que dos linajes divergieron (Silva, 2008).

En particular, dentro del género *Cyclotella* existe una variación morfológica intraespecífica considerable y también gradientes interespecíficos en la morfología (Flower et al., 1990). La plasticidad fenotípica plantea otros retos sistemáticos relevantes. Por ejemplo, Shirokawa et al. (2012) investigaron cómo la salinidad afecta el desarrollo morfológico de *Cyclotella meneghiniana* (Kützinger) y la relación genotipo-ambiente mediante el análisis del gen 28S ADNr. Detectaron que en un medio salino (17 psu) las diatomeas exhibían mayor número de fultopórtulas centrales y de estrías, aumentaron el diámetro del área central y el diámetro de la valva, en comparación con las diatomeas desarrolladas en un medio con salinidad 0 psu.

Adicionalmente, demostraron una interacción genotipo-ambiente significativa para estos rasgos (i.e., plasticidad adaptativa).

Para resolver estos problemas se ha optado por utilizar marcadores moleculares como complemento a los caracteres morfológicos, como en los trabajos realizados por Medlin et al. (1991), Sarno et al. (2005) y Beszteri et al. (2007). En este último estudio se analizan las regiones hipervariables D1/D2 (de 28S ADNr) y un segmento del gen *psaA* codificado en el cloroplasto de 3 morfoespecies: *C. meneghiniana*, *Cyclotella quillensis* (Bailey) y *Cyclotella cryptica* (Reimann). Se reconoció un linaje bien definido correspondiente a *C. quillensis*, tres de *C. cryptica* y ocho linajes crípticos genéticamente distintos dentro del complejo *C. meneghiniana* (i.e., es un complejo de varias especies reproductivamente aisladas; Fig. 2) (Beszteri et al., 2007). El motivo de analizar estas 3 morfoespecies se debió a la inestabilidad de sus estatus taxonómicos que estaban basados únicamente en su morfología, y a que las diferencias morfológicas son sutiles entre *C. quillensis* y *C. meneghiniana* (una de las diatomeas de ambientes continentales más comunes y estudiadas; Hakansson y Kling, 1994). *C. cryptica* ha expresado una amplia plasticidad fenotípica exhibiendo formas de la frústula representativas de *C. meneghiniana* al variar la salinidad en la que se desarrollan o después de la producción de auxosporas (Hoops y Floyd, 1979; Finlay et al., 2002). Por otro lado, *C. meneghiniana*, además de tener una amplia plasticidad fenotípica, se tiene ubicada como un complejo de especies genéticamente heterogéneo (Beszteri et al., 2005). Las cuales pueden corresponder a especies sexuales alógamas crípticas (con fecundación cruzada) en lugar de un complejo estrictamente autógeno (fusión de gametos femeninos y masculinos generados por el mismo individuo); o bien, la variación de este complejo se puede interpretar por la presencia de gran diferenciación genética intraespecífica (analizada con datos de AFLP; Beszteri et al., 2007; Alverson, 2008;).

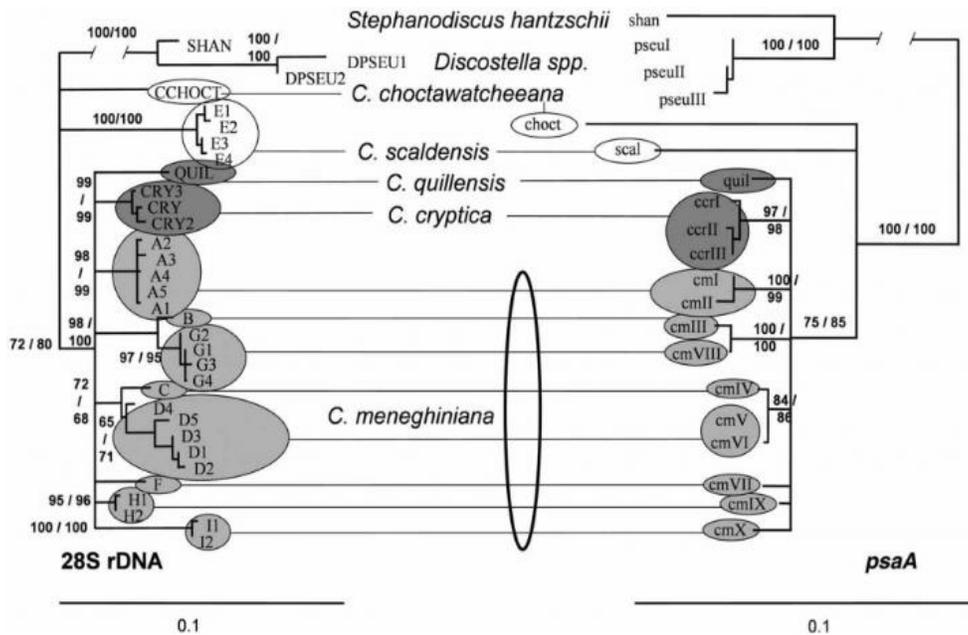


Figura 2. Filogenias de las variantes encontradas en el gen nuclear 28S de ADNr (izquierda) y el gen cloroplastídico *psaA* (derecha), reportado por Beszteri et al. (2007). El árbol se calculó con una secuencia de arranque (*bootstrap*) de 1,000 réplicas y se construyó con el modelo de vecino más cercano (*neighbour-joining*; NJ). En los nodos se muestran los valores de soporte *bootstrap* de NJ y de máxima verosimilitud. Las líneas que conectan a las variantes de 28S y *psaA* indican que estas corresponden al mismo grupo de razas. Se indican los nombres de las especies morfológicas a las que corresponden las variantes genéticas. Las barras de la parte inferior indican la escala para aproximar la longitud de las ramas. Los árboles se enraizaron utilizando secuencias de las cepas de *Stephanodiscus hantzschii* (SHAN) y *Discostella* (DPSEU, dpseu).

1.7 *C. alchichicana* y su similitud morfológica con *C. quillensis*

En el lago cráter Alchichica, Puebla, México habita la especie microendémica *C. alchichicana* (Oliva et al., 2006), la cual fue descrita usando solamente su morfología. Inicialmente fue identificada como *C. quillensis* (Oliva et al., 2001), pero estudios con microscopía electrónica de barrido permitieron distinguirla como una especie nueva.

Ambas especies comparten morfologías similares como son el diámetro de la valva (35 - 63 μm en *C. alchichicana* y 10.9-70 μm en *C. quillensis*), la densidad de estrías marginales, la morfología del área central de la cara de la valva, la estructura y número de fultopórtulas centrales en el interior de la valva, la presencia de tres poros satelitales en las fultopórtulas marginales y la morfología de la rimopórtula interna (Oliva et al., 2006; Fig. 3). Asimismo, las dos especies comparten rasgos ecológicos como habitar en lagos (*C. alchichicana* en el Lago Alchichica, México y *C. quillensis* en los lagos Medicine en E.U.A., Little Quill, Big Quill y Manitoba en Canadá) y la condición de salinidad en las que se desarrollan (salinidad baja de $\approx 8.5 \text{ gL}^{-1}$ para *C. alchichicana* y salinidad baja a alta de 4.76 - 88.74 g L^{-1} para *C. quillensis*, esta última con un óptimo en salinidad de 20.56 g L^{-1}) (Oliva, et al., 2006; Saros y Fritz, 2000; Hakansson, 2002).

A pesar de las similitudes entre estas diatomeas, poseen ciertas variaciones morfológicas que las diferencian. *C. alchichicana* muestra fultopórtulas marginales cada segunda o tercer costilla en el interior de la valva, mientras que *C. quillensis* tiene una fultopórtula en cada costilla; la abertura externa de la rimopórtula en la especie *C. alchichicana* es una abertura alargada en forma de hendidura en el manto y la posición de sus espinas varía en cada segunda a tercer estría o interestría en la unión de la cara/manto de la valva; mientras que *C. quillensis* presenta espinas al final de la estría o de la interestría (Oliva et al., 2006). La descripción de *C. quillensis sensu stricto* no especifica la forma de la abertura ni la posición de sus rimopórtulas. Estos caracteres llevaron a describir a *C. alchichicana* como una especie nueva en 2006 (Fig. 3). Sin embargo, aunque la morfología y la posición de la rimopórtula han recibido un gran valor taxonómico dentro de los géneros "cyclostephanoides" (Theriot et al., 1987; Hakansson, 2002, en Oliva et al., 2006), estas características fenotípicas podrían ser inadecuadas para asegurar que corresponde a una especie distinta de *C. quillensis*, ya que el número de rimopórtulas es un carácter variable dentro de las especies (Lynn y Furey, 2011) por lo que se necesita otro tipo de evidencias para confirmarla.

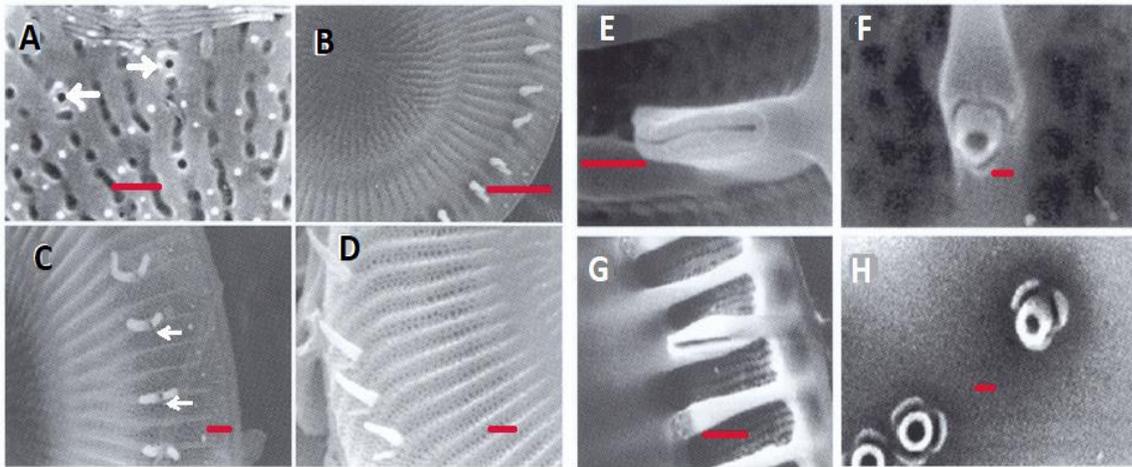


Figura 3. Detalles de *C. alchichicana* por microscopía electrónica de barrido. (A) Área central que muestra las aperturas externas de las fultopórtulas de la cara de la valva (flechas) y gránulos de sílice. (B y C) Área marginal externa que muestra las espinas ubicadas en las interestrías y las aberturas de las fultopórtulas (flechas). (D) Área marginal externa mostrando las espinas en las estrías. (E) Vista interna del área marginal mostrando los detalles de la rimopórtula. (F) Vista interna del área marginal que muestra el detalle de una fultopórtula con 3 pares de satélites. (G) Vista interna del área marginal que muestra la oclusión alveolar. (H) Detalle del área central con fultopórtulas mostrando tres poros satelitales. Escala = 5 μm en B; 1 μm en A, C, D, G; 0.5 μm en E y 0.1 μm en F, H (Figs. tomadas de Oliva et al., 2006).

Sabiendo que algunas especies de diatomeas del género *Cyclotella* llegan a presentar plasticidad o variación fenotípica intraespecífica y que la utilización de estos caracteres implica obstáculos para la taxonomía, en el presente trabajo se busca complementar la información acerca de *C. alchichicana* para delimitarla como una especie desde un enfoque molecular. Asimismo, este estudio constituye la primera aproximación a la filogenia de *C. alchichicana*, con base a los marcadores 28S del ADNr y psaA del ADNcp.

2. OBJETIVOS

General:

Caracterizar a la especie morfológica *Cyclotella alchichicana* desde una perspectiva filogenética utilizando herramientas moleculares.

Particulares:

1. Describir las regiones D1/D2 del gen nuclear 28S del ADNr y psA del ADNcp de *C. alchichicana*.
2. Establecer las relaciones evolutivas de *C. alchichicana* con otras especies del mismo género, incluyendo a *C. quillensis*.
3. Definir el estatus específico de *C. alchichicana* utilizando la información molecular

3. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El Lago Alchichica es un lago cráter semi-circular, con 1.8 km de diámetro máximo, superficie de 2.3 km², profundidad máxima de 62 m y profundidad media de 40.9 m; ubicado en la región semidesértica del centro de México (19° 82' 40'' N, 97° 82' 40'' W; a 2,300 m s.n.m.). Este lago presenta parámetros físicos y químicos peculiares, pues es de tipo oligotrófico, básico con pH \approx 9, es hiposalino con agua alcalino-sódica con dominancia de los iones sodio y cloruro; también la componen bicarbonatos, carbonatos, sulfatos y el magnesio (Vilaclara et al., 1993; Adame et al., 2008; Armienta et al., 2008).

El Lago Alchichica es de tipo monomítico cálido (las aguas se mezclan una vez al año a causa de las variaciones de la temperatura), lo cual proporciona dos condiciones hidrológicas opuestas que afectan a la comunidad fitoplanctónica, la temporada de estratificación y la de mezcla. La temporada de estratificación sucede en verano cuando se forma la termoclina y se crea un máximo profundo de clorofila, formado casi en su totalidad por *C. alchichicana*. La temporada de mezcla se produce en invierno, cuando la temperatura y los nutrientes se homogenizan en la columna de agua, la biomasa fitoplanctónica se incrementa y la luz que penetra es relativamente escasa (Oliva et al., 2001; Ortega-Mayagoitia et al., 2011). En esta etapa

la especie dominante en la columna de agua también es *C. alchichicana*. Esta diatomea es, al parecer, microendémica de este lago, pues no se tienen registros de otra población que habite otros lagos. Más información sobre la biota del lago Alchichica puede encontrarse en Ciro-Pérez et al. (2015).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Colecta de organismos

Los muestreos se realizaron en la temporada de estratificación en el mes de agosto y en la temporada de mezcla en enero. A distintas profundidades del lago, se midió oxígeno disuelto, temperatura, pH y conductividad específica con una sonda multiparamétrica marca Hydrolab DataSonde3/Surveyor®. Se realizaron varios arrastres verticales incluyendo el metalimnion (desde una profundidad de 30 a 35 m) en el mes de agosto de 2018 con una red cónica de 20 μm de apertura de poro. El material biológico obtenido se mantuvo en contenedores en un sitio oscuro y fresco. Una vez en el laboratorio las muestras se mantuvieron en una cámara ambiental a 18°C, con iluminación artificial y aireación para generar turbulencia en el agua y evitar que las algas se sedimentaran y crearan mucílago.

4.2 Extracción de ADN, PCR y secuenciación

Con el fin de poder comparar molecularmente a *C. alchichicana* con *C. quillensis*, que es la especie morfológica más cercana, se utilizaron los marcadores 28S (del ADNr) y psaA (del ADNcp), ya que son los únicos que se han publicado de *C. quillensis* (Beszteri et al., 2007; ver Tabla 1). Adicionalmente, se intentó secuenciar el marcador rbcL (del ADN cloroplástico), pero no se consiguió la amplificación de los fragmentos (Tabla 1).

Se diseñó el par de cebadores para obtener el fragmento del gen psaA a partir de secuencias de varias cepas del género *Cyclotella* (utilizadas por Beszteri et al., 2007), con el fin de crear cebadores más específicos del género y evitar la amplificación de este gen de cualquier otro organismo presente en la muestra. Para esto, se alinearon las secuencias pertenecientes al

género *Cyclotella* en el programa Geneious 9.1.6 basic© (Geneious 2005-2017), posteriormente se extrajo la secuencia consenso y de cada extremo se localizó la zona que cumpliera con: un valor $<70^\circ$ de T_m (temperatura de fusión), 50% aproximadamente de GC (Guanina y Citosina) y se evitaron las zonas con probabilidad de obtener dimerizaciones. Se obtuvieron dos cebadores: 1) Directo de 22 pb con una T_m de 69.4° C y 55% de GC y 2) Reverso 23 pb con una 67° C y 47.8% de GC. Los cebadores diseñados en este experimento se mandaron sintetizar con la compañía Sigma-Aldrich Química, S. de R.L. de C.V.

Se intentaron establecer cultivos clonales para conocer la variabilidad intrapoblacional y poder compararla con otras especies, para lo cual se aislaron células con una pipeta Pasteur y un microscopio estereoscópico marca Leica, modelo DM LS2, con iluminación LED y una magnificación máxima de $400\times$. Se aislaron alrededor de 560 células, las cuales se colocaron individualmente en pocillos de 350 μ L (placas Multipocillo Evergreen) con agua filtrada del lago Alchichica, con y sin nutrientes. Las placas se mantuvieron en agitadores orbitales a 40 rpm en una cámara de cultivo a 18° C y 443 lx (Kawai et al., 2005). Sin embargo, no se logró el establecimiento de los cultivos ya que las células morían ≤ 8 días después de algunas divisiones. Después de intentar establecer los cultivos en 5 ocasiones (10 meses), se decidió utilizar una población natural de *C. alchichicana* que permitiera obtener la cantidad suficiente de ADN para la secuenciación de los dos marcadores, aunque este procedimiento diera como resultado una sola secuencia por marcador. Para ello se filtraron varios litros de agua proveniente del lago (del mes de agosto) a través de filtros de Nylal de 45μ m de apertura de poro y se limpiaron manualmente eliminando otros organismos con ayuda de una pipeta Pasteur y un microscopio estereoscópico marca Leica, modelo DM LS2, con iluminación LED y una magnificación máxima de $400\times$. A continuación, para producir un shock térmico y promover la ruptura de las células las muestras se congelaron 24 h a -70° C, tras lo cual se calentaron a 35° C y después se trituraron con un pistilo homogenizador estéril de plástico. Se centrifugaron a 11,000 rpm por 3 min y se desechó el sobrenadante (agua del lago) para mantener las diatomeas con la menor cantidad de líquido posible. Para la extracción del ADN total se utilizó PowerPlant® Pro DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, IncTM); siguiendo el protocolo sin cambios descrito por el fabricante, que consiste en una serie de lavados y filtrados para conseguir el ADN.

Para la amplificación de las regiones 28S y *psaA*, se mezclaron los componentes para la reacción de PCR: 10 μ L de “Taq DNA Polymerase Master Mix RED” (Ampliqon PCR enzymes

& Reagents©), 2 µL de ADN en solución de *C. alchichicana*, 0.5 µL del primer forward y 0.5 µL del primer reverse (Tabla 1).

Tabla 1. Lista de oligos utilizados en este estudio, incluyendo su secuencia y temperatura de alineamiento.

<i>Nombre</i>	<i>Marcador</i>	<i>Secuencia (5' a 3')</i>	<i>Temperatura de alineamiento</i>	<i>Referencia</i>
LR0R LR3	28S	ACCCGCTGAACTTAAGC CCGTGTTTCAAGACGGG	45° C (en el primer ciclo) y 50° C (en el segundo ciclo)	Vilgalys y Hester (1990)
psaAFW psaARV	psaA	GGTATGCATTTCCATGGCGC GAATATTCACCCATTGACCACC	59.1° C	Diseñados en este estudio
psbA5 4RA	rbcL	TTAGGTATGGAAGTAATGCA AAAATGGGTTACTGGGATGC	55° C	Andersen y Bailey (2002)

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (Applied Biosystems), con el siguiente programa: (1) 95° por 1 min; (2) 10 ciclos de 95° por 15 seg, 45° 15 seg, 72° 10 seg; (3) 25 ciclos de 95° 15 seg, 50° 15 seg, 72° 10 seg; (4) 72° 7 min; (5) 12° continuo (basado en Dahlman et al., 2000). Posteriormente se comprobó la amplificación de los fragmentos por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.2%, tomando 0.5 µL de los productos de PCR. Después los geles se expusieron a luz UV en un transiluminador Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories, Inc.), únicamente se observó amplificación del gen 28S (banda de tamaño aproximado a 613 pb), el cual se envió a secuenciar. Al resto de las muestras se les aplicó una segunda reacción de PCR con el programa descrito anteriormente, consiguiendo su correcta amplificación (banda de 700 pb aproximadamente para psaA) y se enviaron a secuenciar.

Para el proceso de secuenciación, los productos de PCR amplificados se marcaron utilizando el kit para secuenciación BigDye® Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc.) y se secuenciaron bidireccionalmente utilizando un secuenciador de 16 capilares ABI 3130 en el Laboratorio de Análisis y Química de ADN, FES Iztacala, UNAM.

4.3 Análisis de datos moleculares

Los dos electroferogramas del gen 28S y el gen *psaA* generados en la secuenciación se analizaron y editaron con el software Geneious 9.1.6 basic© (Geneious 2005-2017) para conseguir la secuencia nucleotídica consenso de cada región amplificada. Estos productos se analizaron con el programa BLAST (herramienta de búsqueda básica de alineación local), en la base de datos NCBI (por sus siglas en inglés, Centro Nacional de Información Biotecnológica) para encontrar las secuencias más parecidas a las descritas en este estudio.

4.4 Reconstrucción filogenética

Para el análisis filogenéticos, las secuencias consenso de *C. alchichicana* se compararon con las secuencias depositadas en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) de las siguientes especies: *Cyclotella choctawhatcheeana* (Prasad), *C. cryptica* (Reimann, Lewin y Guillard), *C. meneghiniana*, *C. quillensis* y *C. cf. Scaldensis* (Muylaert y Sabbe), y como grupo externo se usaron *Discostella pseudostelligera* (Hustedt), *D. woltereckii* (Hustedt) y *Stephanodiscus hantzschii* (Grunow), bajo los números de acceso reportados por Beszteri et al. (2007), dando un total de 61 secuencias para el gen 28S y 59 para *psaA*. El alineamiento de todas las secuencias se obtuvo en el software Geneious 9.1.6 basic©, editando visualmente (procurando hacer el menor número de cambios posibles) y eliminando gaps y algunos nucleótidos de los extremos (las colas). Las secuencias finales de *C. alchichicana* tuvieron una longitud de 563 pb de la región D1/D2 del gen nuclear 28S (ADNr) y 505 pb del gen *psaA* (ADNcp), las dos secuencias nucleotídicas se presentan en el Anexo 5 y 6 respectivamente.

Con el alineamiento generado se construyeron dos árboles filogenéticos (Figs. 4, 5, 6 y Anexo 3, 4), uno con las secuencias del gen 28S y otro con el gen *psaA*. Los alineamientos fueron analizados con FindModel (<http://www.hiv.lanl.gov>) para determinar el modelo filogenético que mejor se ajustara a los datos de acuerdo con el Criterio de Información de Aike (AIC) (Beszteri, et al., 2007). Este criterio es una medida de calidad para la selección del modelo estadístico que mejor responda al conjunto de datos dados (Akaike, 1974). Se resolvió que para el gen 28S el mejor modelo fue el de Tamura-Nei + Gamma (Tamura y Nei, 1993), este se utilizó para analizar con máxima verosimilitud (NJ; AIC= 3136.98), mientras que para Inferencia

bayesiana se utilizó el modelo GTR + Gamma (AIC= 3139.35). Para los datos del gen *psaA* el mejor modelo fue GTR + gamma (General Time Reversible; Tavaré, 1986) (AIC= 2960.04). Para cada gen se usaron 2 distintos métodos de inferencia filogenética: 1) Inferencia bayesiana (IB) con el software Mr Bayes en Geneious 9.1.6 basic©, 2) Máxima verosimilitud (MV) con el software PhyML en Geneious 9.1.6 basic©. En los dos casos se determinó un valor de arranque de 10,000 réplicas, para evaluar el soporte de los nodos en los árboles (Andersen y Bailey, 2002), se incluyeron las transiciones + transversiones a una tasa uniforme entre sitios, delección parcial de los datos faltantes/gaps. En el anexo 3 y 4 se presentan los árboles filogenéticos que incluyen las 61 y 59 secuencias de 28S y *psaA* respectivamente, del análisis de IB, donde se anexaron los porcentajes de probabilidad de los nodos de MV. Estos análisis demostraron que algunas de las secuencias de cada variante eran idénticas entre sí, por lo que se optó por elegir al azar a un representante de cada linaje y elaborar un árbol filogenético simplificado (Fig. 4). Se reconocieron 8 linajes bien diferenciados en el conjunto de secuencias de *C. meneghiniana*, de los cuales se usó únicamente un representante de cada linaje (dos representantes de los grupos A y D porque se agrupaban de manera distinta con cada gen) y uno de las otras especies, dando un total de 18 secuencias de cada gen, marcadas en negritas en los Anexos 1 y 2. Las 18 variantes se nombraron con las iniciales de la especie; excepto la especie *C. woltereckii*, la cual se nombró “D. pseu” pues su secuencia se agrupó con unas de las dos variantes de *D. pseudostelligera* (*D. pseu* y *D. pseu2*). Se utilizaron los análisis de inferencia filogenética y de agrupación correspondientes, y para la representación gráfica se colapsaron las ramas con una probabilidad menor al 60%.

Con el fin de describir la cantidad de cambios genéticos que ha habido entre los taxones y delimitar a un grupo de variantes o a una morfoespecie de sus grupos hermanos, se examinaron los valores de distancias patrísticas del análisis de IB. Las distancias patrísticas resultan de la sumatoria de las longitudes de las ramas que se encuentran entre dos secuencias en un árbol. Se extrajeron las matrices de distancias patrísticas con el software Geneious 9.1.6 basic©, que involucró las 61 secuencias del gen 28S y 59 del gen *psaA* (Anexo 3 y 4 respectivamente). También se generó una matriz simplificada de distancias patrísticas de los dos genes con las 18 secuencias de cada morfoespecie, en el caso de *C. meneghiniana* se utilizó un representante de los linajes C y D pues son los linajes más cercanos filogenéticamente a *C. alchichicana* (Fig. 4).

4.5 Delimitación específica de *C. alchichicana*

Utilizando los alineamientos generados con el software Geneious 9.1.6 basic© de 60 y 59 secuencias de los dos genes por separado, se analizó si *C. alchichicana* se delimitaba como especie en función de las distancias genéticas con la interfaz web del algoritmo ABGD (*automated barcode gap discovery*; Puillandre et al., 2012), disponible en <http://www.wabi.snv.jussieu.fr/public/abgd/>. Esta interfaz se diseñó para analizar conjuntos de datos con un solo marcador secuenciado en varios individuos (conjuntos de datos de locus únicos) e intenta determinar el umbral óptimo con base a la divergencia de los mismos datos, en lugar de utilizar umbrales de distancia predefinidos para delimitar especies, y no necesita monofilia, es decir, se puede aplicar a filogenias con politomías, a diferencia de otros algoritmos de delimitación de especies (Puillandre et al., 2012; Fontaneto et al., 2015). Se procesaron los alineamientos con los siguientes valores: Pmin: 0.001 y Pmax: 0.1 (rango de divergencia intraespecífica), Steps: 10 (pasos recursivos dentro de las particiones primarias), Nb bins: 20, X: 1 (ancho del gap) y el modelo de sustitución de nucleótidos: Kimura (K2P) TS/TV 2.0. Se presentan los gráficos de las distancias genéticas intra- e interespecíficas y de los grupos generados a partir del algoritmo de ABGD. Los agrupamientos de posibles especies se graficaron como filograma con el programa Mega 6.06©.

4.6 Datos morfológicos

Con el fin de relacionar las diferencias genéticas con las morfológicas, se realizó una búsqueda de las características micromorfológicas consideradas en la descripción de cada taxón *sensu stricto* incluido en el análisis filogenético. Se compararon los rasgos morfológicos de *C. alchichicana* con *C. quillensis* (la más parecida morfológicamente a *C. alchichicana*) y con *C. meneghiniana* (la más cercana filogenéticamente a *C. alchichicana*) (Fig. 4). Las características fenotípicas del resto de los taxones analizados se encuentran en el Anexo 3. Se registraron las siguientes características: diámetro de la valva (μm), densidad de estrías cada 10 μm , ubicación y patrón de las fultopórtulas, forma de la abertura exterior de las fultopórtulas, cantidad de poros satelitales, forma de la abertura exterior de las rimopórtulas, presencia o ausencia y ubicación de las espinas, registro de variación fenotípica y salinidad del lago donde habitan las cepas

estudiadas, en conjunto con una recopilación de fotografías por microscopía electrónica de barrido obtenidas de la descripción de los taxones.

5. RESULTADOS

5.1 Secuencia nucleotídica de la región D1/D2 del gen nuclear 28S del ADNr y el gen *psaA* del ADN cloroplástico.

El tamaño de la única secuencia generada del gen 28S fue de aproximadamente 610 pb, la cual representa el consenso de diversas variantes genéticas de los individuos procesados de la especie morfológica *C. alchichicana*. Al alinearla con las otras secuencias para compararlas, el fragmento resultante tuvo una longitud de 563 pb (ver Anexo 5). En el caso del gen *psaA*, la única secuencia consenso fue de 700 pb aproximadamente y al alinear esta secuencia con las otras utilizadas en el análisis filogenético, el fragmento resultante midió 505 pb (ver Anexo 6). Cabe destacar que los electroferogramas se mostraron prácticamente limpios, con pocos sitios ambiguos.

Utilizando el programa BLAST, las secuencias de 28S y *psaA* de *C. alchichicana* mostraron coincidencia de identidad de 99% con registros identificados como *C. meneghiniana* con números de acceso JN854149 y AJ878484 (grupo C, Anexo 1; de 28S) y AJ878553, KJ958480, AJ878574, AJ878569, KJ958481, AJ878576, AJ878537 y AJ878583 (de *psaA*) disponibles en la base de datos NCBI. Con *C. quillensis* tuvo un 96% y 98% de coincidencia de identidad con los números de acceso AJ878498 (28S) y AJ878584 (*psaA*) respectivamente.

5.2 Posiciones variables en las secuencias

En el fragmento de la región D1/D2 del gen 28S de 563 pb, tomando en cuenta el conjunto de secuencias de todos los taxones analizados, se distinguieron 425 sitios conservados y 140 sitios variables; mientras que en el fragmento del gen *psaA* de 505 pb, se distinguieron 407 sitios y 98 sitios variables.

Con respecto del resto de las secuencias alineadas en el gen 28S de la especie *C. alchichicana* se localizaron 7 mutaciones, de las cuales 3 son autapomorfías, pues ninguna de las otras cepas estudiadas las comparte (en el sitio 75: G, sitio 83: T, sitio 181: T) y 3 mutaciones en el gen *psaA*, de las cuales solamente 1 es única, en la posición 19: C.

En cuanto al gen nuclear 28S se apreciaron ligeras variaciones dentro de las morfoespecies *C. cryptica*, *C. quillensis*, *C. choctawhatcheeana* y *C. cf. scaldensis*, comparado con *C. meneghiniana* que mostró más variantes entre sus cepas, similar a lo documentado por Bezsteri et al. (2007). Por ejemplo, de las 3 cepas analizadas de *C. quillensis* se observó una única variante en la secuencia de nucleótidos (*C. quill*, es decir que las 3 son idénticas genéticamente), lo mismo sucedió con las 2 cepas analizadas de *C. choctawhatcheeana* (*C. choct*). En cuanto a *C. cryptica* se distinguieron 3 variantes (*C. cry*, *C. cry2*, *C. cry3*) diferenciadas por hasta 4 pares de nucleótidos en las 4 secuencias analizadas. También *C. cf. scaldensis* resultó tener 2 variantes (*C. scal*, *C. scal2*) con hasta 5 pares de nucleótidos distintos en las 4 secuencias analizadas. En la morfoespecie *C. meneghiniana* la variación en sus secuencias fue mucho mayor, pues se encontraron 21 variantes diferentes con 72 sitios polimórficos en las 41 cepas analizadas (Tabla 2, Anexo 1 y 2).

En el gen *psaA* los patrones de variación dentro de las morfoespecies investigadas fueron distintos a 28S, pues no se hallaron variantes dentro de las cepas de *C. choctawhatcheeana* y *C. cf. scaldensis*; es decir, las cepas analizadas de cada morfoespecie son idénticas entre sí (Tabla 2 y 3). Las 4 cepas de *C. cryptica* tuvieron 2 variantes distintas (*CCR* y *CCR2*).

También se encontró menor variación entre las secuencias del gen cloroplastídico *psaA* de las cepas del grupo *C. meneghiniana*, en comparación con el gen nuclear, pues únicamente se encontraron 2 variantes dentro del grupo D (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Cantidad de linajes encontrados dentro de cada morfoespecie analizada con la información del gen 28S y psaA, con el nombre de las variantes que se muestran en los árboles filogenéticos (Figs. 4, 5 y 6). El listado de los números de acceso correspondientes a cada variante se encuentra en el Anexo 1 y 2. Las variantes de *Discostella pseudostelligera* y *D. woltereckii* se nombraron de la misma forma porque comparten secuencias idénticas, es por esto que en todas las filogenias generadas, se agrupan en el mismo clado.

Especie	28S		psaA	
	Número de variantes	Nombre de los linajes	Número de variantes	Nombre de los linajes
<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	1	S.hantz	1	SHAN
<i>Discostella woltereckii</i>	1	D.pseu	1	DPSE
<i>Discostella pseudostelligera</i>	2	D.pseu2	2	DPSE2
<i>Cyclotella choctawhatcheeana</i>	1	C.choct	1	CCHO
<i>Cyclotella cf. scaldensis</i>	2	C.scal	1	CSCA
<i>Cyclotella cryptica</i>	3	C.cry	2	CCR
<i>Cyclotella quillensis</i>	1	C.quill	1	CQUI
<i>Cyclotella alchichicana</i>	1	C.alchi	1	CALC
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	21	C.mene A C.mene B C.mene C C.mene D C.mene E C.mene F C.mene G C.mene H	10	CME A CME B CME C CME D CME E CME F CME G CME H

5.3 Filogenias

Cada filogenia creada con 60 (28S) o 59 (psaA) secuencias (Anexo 1 y 2) derivó en la misma topología al simplificarlas en 18 secuencias, solo varió ligeramente al comparar entre métodos de inferencia (IB y MV).

Los análisis de Inferencia Bayesiana (IB) y Máxima Verosimilitud (MV) de los dos genes presentaron como un clado fuertemente sustentado a todas las variantes identificadas como parte del género *Cyclotella* (probabilidad posterior: 100%; bien separadas de las cepas de los géneros *Stephanodiscus* y *Discostella*; Figs. 4, 5 y 6).

El gen psaA define mejor las relaciones evolutivas entorno a *C. alchichicana* en comparación con el gen 28S, pues asocia a *C. alchichicana* con las variantes C y D de *C. meneghiniana* (probabilidad: 60 de MV y 94 de IB). Mientras que el gen 28S proporcionó menos información y no logra aclarar los vínculos entre estas morfoespecies, incluyendo en una politomía a *C. alchichicana*, los ocho linajes reconocidos de *C. meneghiniana* (A, B, C, D, E, F, G, H), *C. quillensis* y *C. cryptica* (probabilidad posterior: 89 de MV y 99 de IB).

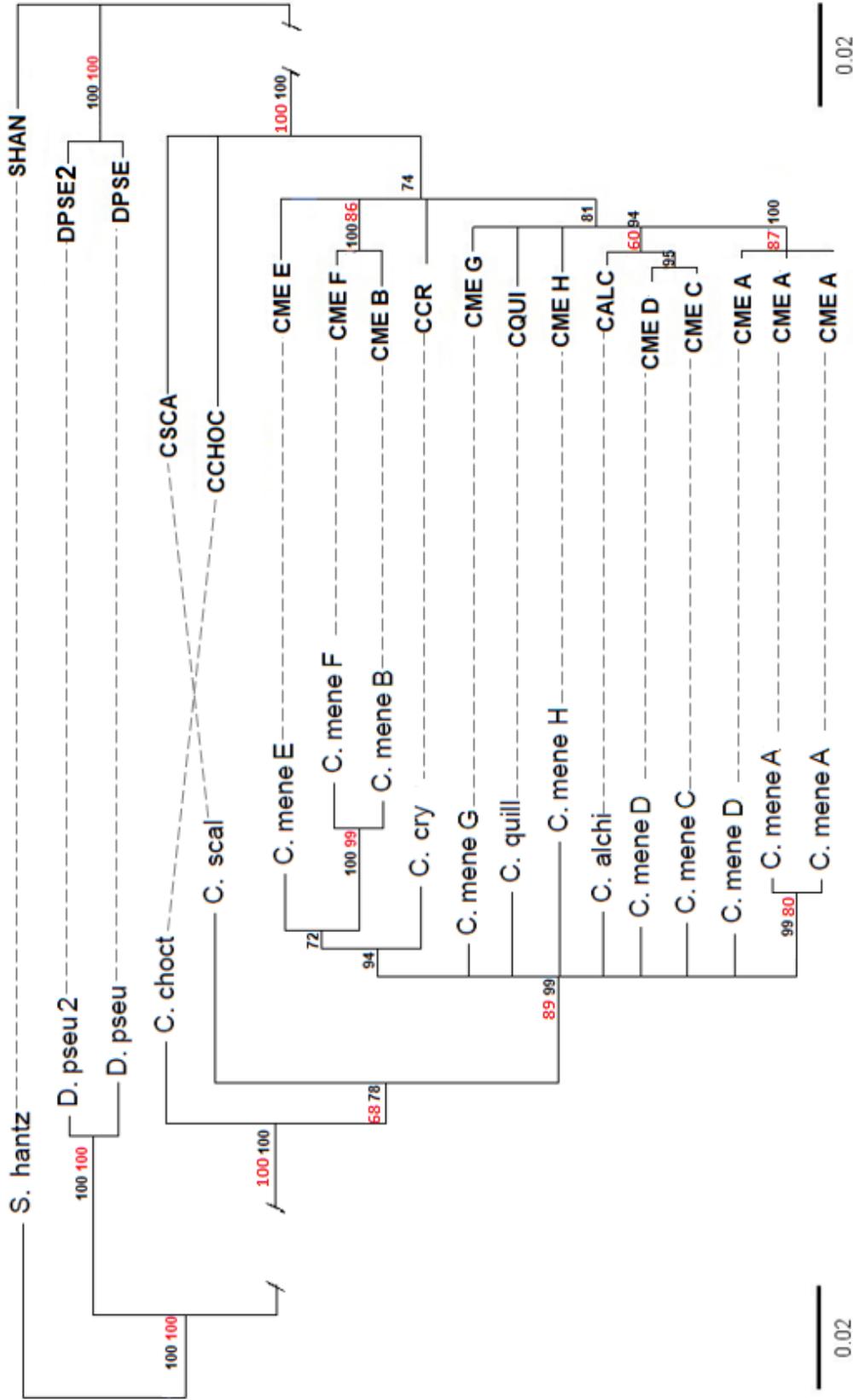


Figura 4. Filogenia de las 18 variantes de 28S ADNr nuclear (izquierda) y de psaA ADNcp (derecha), calculada con un arranque de alineaciones/generaciones de 10,000. El modelo de mejor ajuste utilizado para estos análisis fue General-time-reversible elegido por el Criterio de Información de Akaike. Las longitudes de las ramas representan un valor aproximado y corresponden a los árboles creados con IB y se presentan los porcentajes de probabilidad/boostrap de MV (rojo) y IB (negro) en cada nodo. Los árboles se enraizaron usando una secuencia de *Stephanodiscus hantzschii* (S.hantz en 28S y SHAN en psaA) como grupo externo (Tabla 2 y 3). Las ramas se colapsaron en politomías si tenían un soporte menor al 60%.

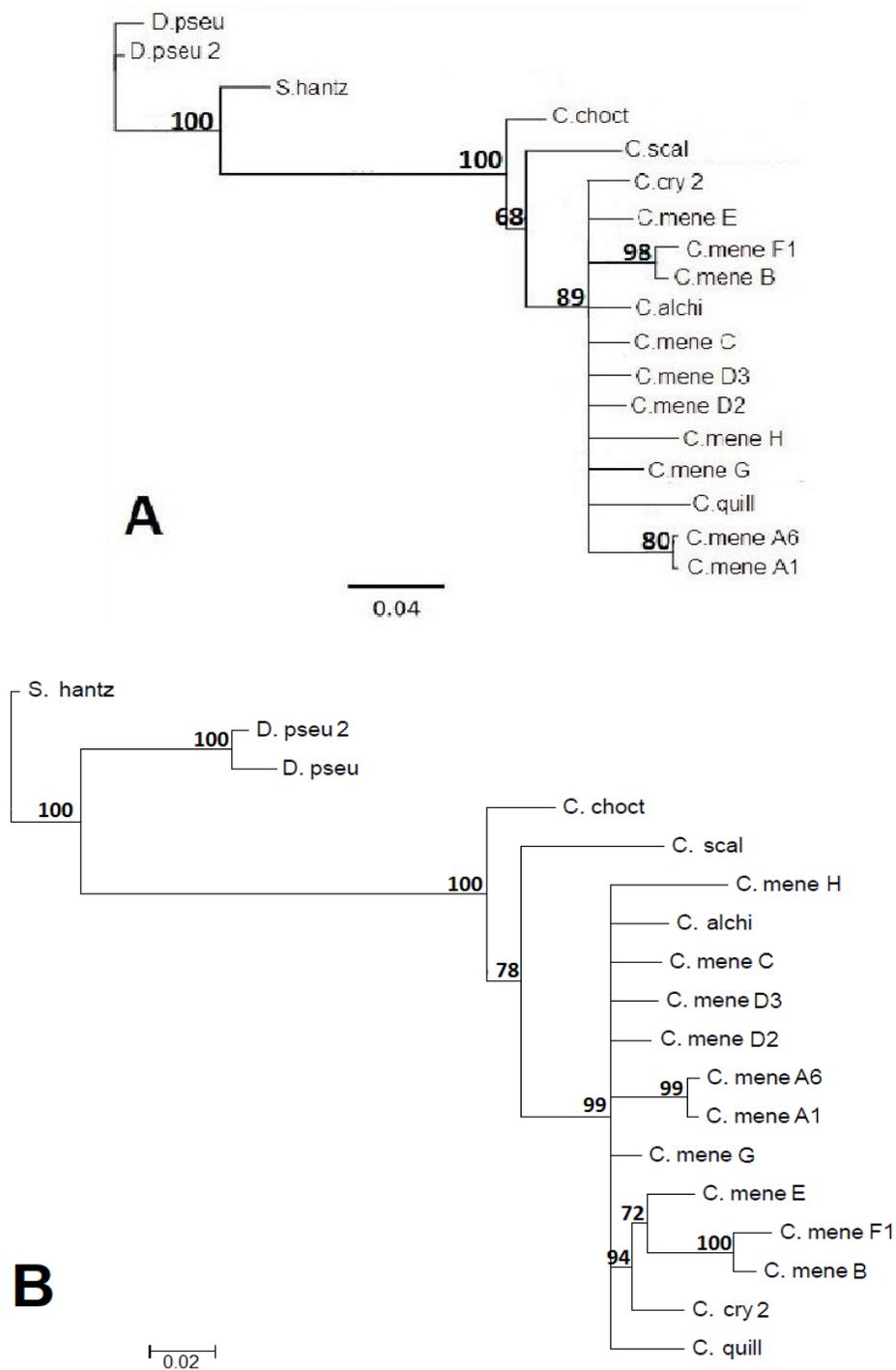


Figura 5. Filogenia de las 18 variantes de 28S ADNr nuclear con un arranque de alineaciones de 10,000 réplicas. Los valores junto a los nodos representan los porcentajes de probabilidad de cada clado. **A:** filogenia elaborada con el método MV. **B:** IB. Las ramas se colapsaron en politomías si tenían un soporte menor al 60%.

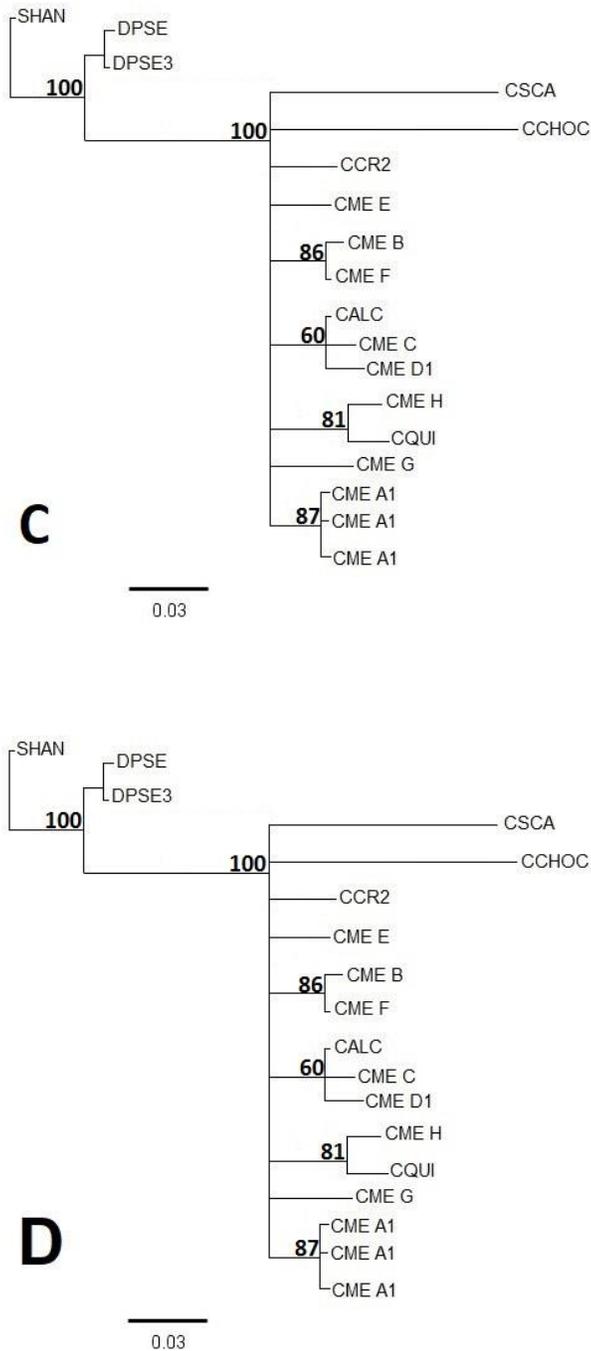


Figura 6. Filogenia de las 18 variantes del gen cloroplastídico *psaA* con un arranque de alineaciones de 10,000 réplicas. Los valores junto a los nodos representan los porcentajes de probabilidad de cada método filogenético. **C**: filogenia elaborada con el método MV. **D**: IB. Las ramas se colapsaron en politomías si tenían un soporte menor al 60%.

5.4 Matriz de distancias en pares de nucleótidos

La información de los dos genes demuestra que la morfoespecie *C. alchichicana* tiene mayor divergencia respecto de *C. quillensis* (0.034 en el gen 28S y 0.019 en *psaA*) en comparación con los linajes C (0.017 y 0.007) y D (0.016 y 0.009 respectivamente) del complejo *C. meneghiniana* (*C. alchichicana* es más cercana a los linajes C y D).

Cabe destacar que la divergencia entre C y D es menor (0.014 en el gen 28S y 0.004 en *psaA*) que la divergencia que tiene *C. alchichicana* con cada uno de estos linajes.

Tabla 4. Estimaciones de la divergencia evolutiva (distancia patrística entre secuencias) que existe entre cada morfoespecie del gen nuclear 28S del ADNr (superior) y el gen cloroplastídico *psaA* (inferior), con base al análisis de IB. En negritas se resaltan las divergencias entre *C. alchichicana* con *C. quillensis* (la más parecida morfológicamente) y con los linajes C y D del complejo *C. meneghiniana*. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo con el software Geneious 9.1.6 basic©.

28S	<i>S. hantzschii</i>	<i>C. scaldensis</i>	<i>C. alchichicana</i>	C. mene C	C. mene D	<i>C. cryptica</i>	<i>C. quillensis</i>	<i>C. chocta.</i>	<i>D. pseudo.</i>
<i>S. hantzschii</i>									
<i>C. scaldensis</i>	0.168								
<i>C. alchichicana</i>	0.170	0.074							
C. mene C	0.168	0.072	0.017						
C. mene D	0.167	0.071	0.016	0.014					
<i>C. cryptica</i>	0.173	0.078	0.034	0.032	0.031				
<i>C. quillensis</i>	0.173	0.078	0.034	0.032	0.031	0.038			
<i>C. chocta.</i>	0.141	0.062	0.064	0.062	0.061	0.068	0.068		
<i>D. pseudo.</i>	0.062	0.191	0.192	0.190	0.190	0.196	0.196	0.163	
<i>D. woltereckii</i>	0.07	0.199	0.2	0.198	0.197	0.204	0.204	0.171	0.016

psaA	<i>S. hantzschii</i>	<i>C. scaldensis</i>	<i>C. alchichicana</i>	CME C	CME D	<i>C. cryptica</i>	<i>C. quillensis</i>	<i>C. chocta.</i>	<i>D. pseudo.</i>
<i>S. hantzschii</i>									
<i>C. scaldensis</i>	0.143								
<i>C. alchichicana</i>	0.118	0.075							
CME C	0.119	0.076	0.007						
CME D	0.121	0.078	0.009	0.004					

<i>C. cryptica</i>	0.117	0.074	0.025	0.027	0.028				
<i>C. quillensis</i>	0.122	0.079	0.019	0.020	0.022	0.029			
<i>C. chocta.</i>	0.145	0.102	0.077	0.079	0.080	0.077	0.081		
<i>D. pseudo.</i>	0.065	0.139	0.114	0.115	0.117	0.113	0.118	0.141	
<i>D. woltereckii</i>	0.064	0.137	0.112	0.114	0.115	0.112	0.116	0.139	0.008

5.5 Delimitación específica

La interfaz-web ABGD y el software Geneious coincidieron en crear agrupamientos similares de las variantes (Figs. 4, 9 y 10).

Los análisis de ABGD probaron la existencia de una separación en la distancia genética de 28S entre 0.09-0.11 y de 0.04-0.06 en el *psaA* (Fig. 7). Estas separaciones fueron utilizadas por el algoritmo de ABGD como umbral para delimitar las hipótesis de especies o UTOs (unidades taxonómicas operacionales), considerándolas únicamente con un enfoque cuantitativo.

En comparación con el gen *psaA*, el gen 28S tuvo mayor divergencia intraespecífica (dentro de cada grupo), la cual generó 15 grupos diferentes como especies candidatas (en las particiones iniciales; Fig. 8) con un valor de divergencia intraespecífica previa (P) de ≤ 0.0028 . La mayoría de estos grupos coinciden con los de las filogenias descritas en la sección 5.3 (véase arriba; Fig. 4 y Anexo 3) excepto en el caso de *C. alchichicana*, que la distingue como una UTO significativamente diferente al resto (Fig. 9).

Con el gen *psaA* se identificaron 11 grupos con un valor de P de ≤ 0.0046 (en las particiones iniciales) y no aísla a *C. alchichicana* en un grupo distinto, sino que la agrupa junto con las variantes de *C. meneghiniana* C y D, los demás grupos también son consistentes con los observados en la Figura 4 y Anexo 4 (Fig. 10). Únicamente cuando se disminuye el valor de divergencia intraespecífica previa a ≤ 0.0017 , *C. alchichicana* se separa como una UTO diferente al resto. Sin embargo, este valor de divergencia ya resulta muy excluyente para todo el conjunto, creándose hasta 16 grupos distintos (véase la zona resaltada con una línea punteada, Fig. 8).

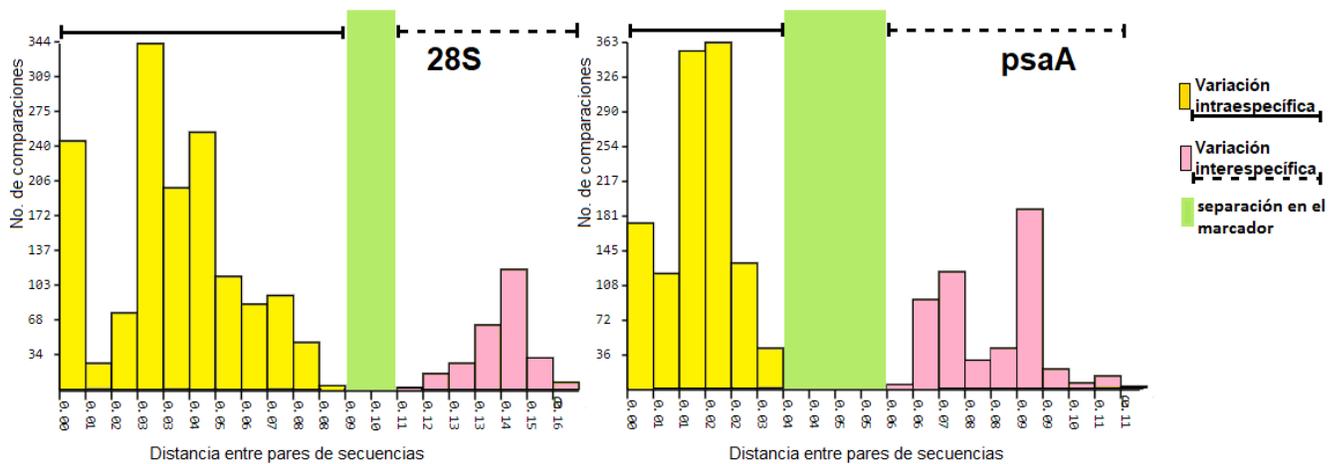


Figura 7. Histogramas de las distancias genéticas intra- (amarillo) e interespecíficas (rosa) entre las 60 secuencias del gen 28S y 59 secuencias del gen *psaA*. En color verde se muestra la zona de separación en la distancia genética de las secuencias del gen 28S y *psaA*.

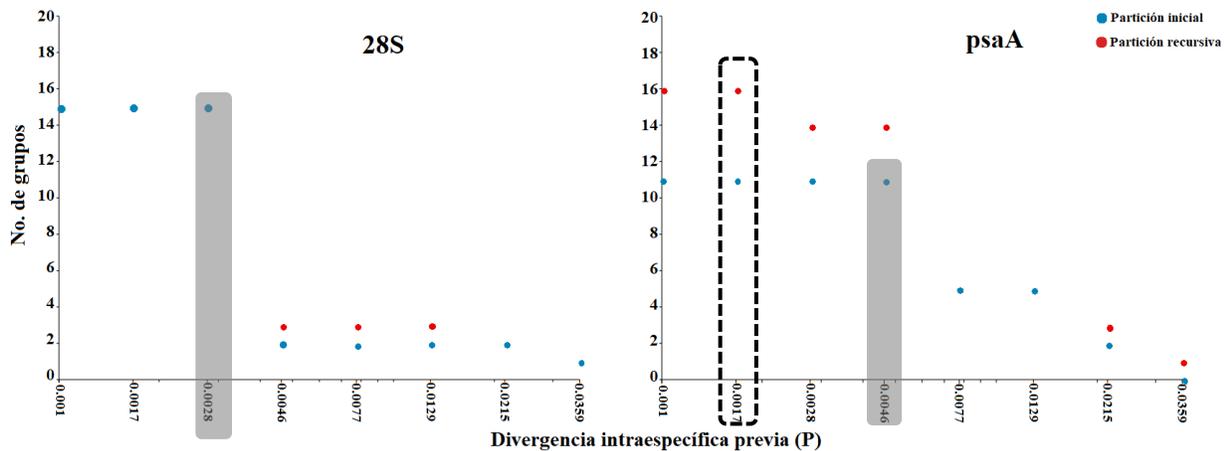


Figura 8. Cantidad de grupos generados en el análisis ABGD entre las 60 cepas del gen 28S (izquierda) y 59 secuencias del gen *psaA* (derecha), en relación con la divergencia genética intraespecífica previa (P). De color gris se muestra el número de agrupamientos utilizado para delimitar entre especies (28S: 15 taxones, $P \leq 0.0028$; *psaA*: 11 taxones; $P \leq 0.0046$). Se resalta con línea punteada el valor de $P \leq 0.0017$, que indica 16 taxones utilizando *psaA*.



Figura 9. Filograma simplificado de los grupos representativos de cada UTO con base a la información del gen 28S, generadas a partir del algoritmo de ABGD y graficadas con Mega 6.06©. Los valores de las ramas indican el valor de distancia de Kimura (K2P). Resaltado en color amarillo se muestra la separación de la especie *C. alchichicana* del resto de las cepas.

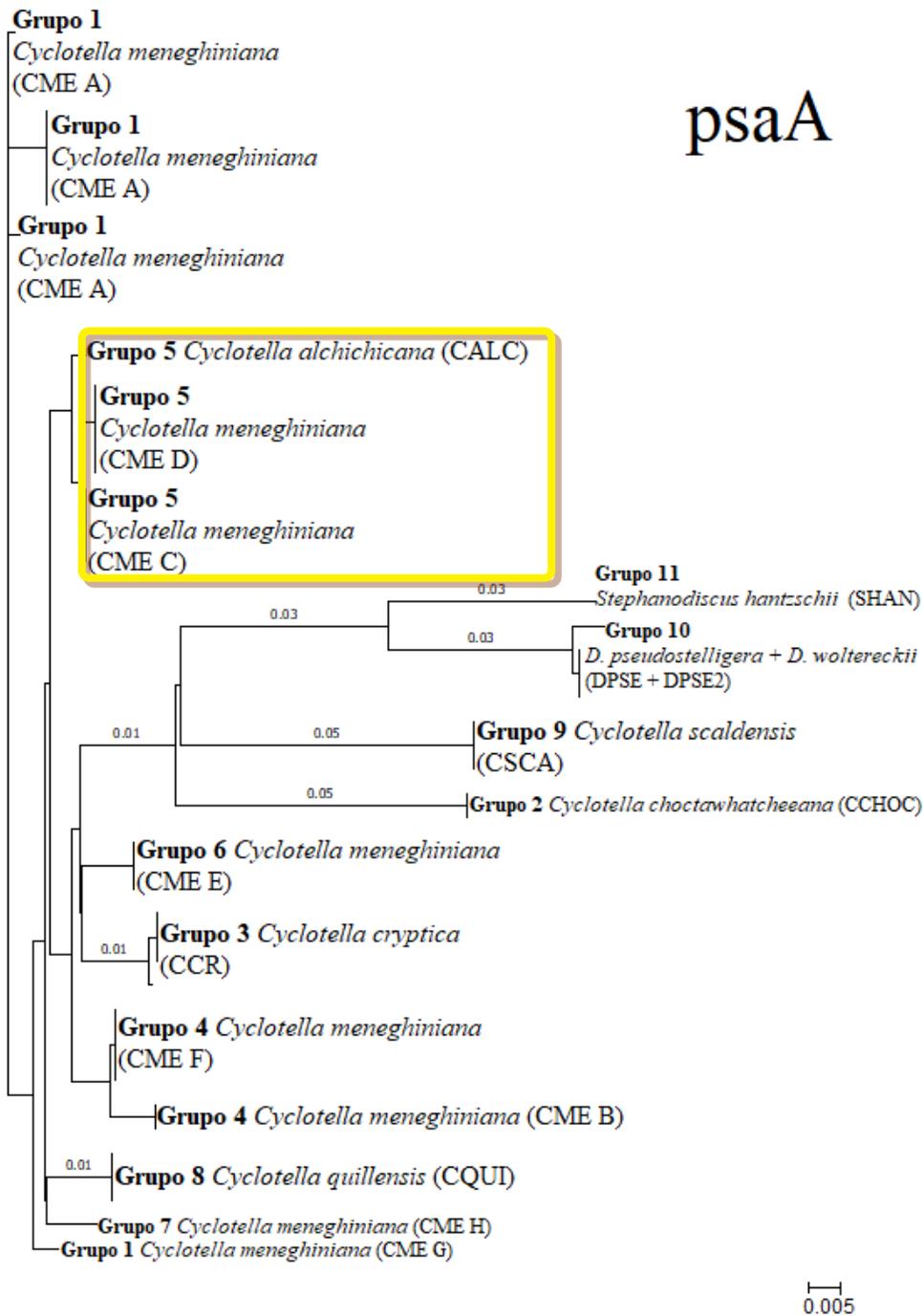


Figura 10. Filograma simplificado de los grupos representativos de cada UTO con base a la información del gen *psaA*, generadas a partir del algoritmo de ABGD y graficadas con Mega 6.06©. Los valores de las ramas indican el valor de distancia de Kimura (K2P). Resaltado en color amarillo se muestra a *C. alchichicana* formando un grupo con *C. meneghiniana* C y D.

5.6 Micromorfología.

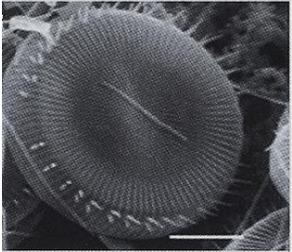
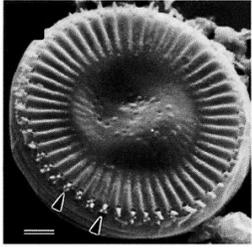
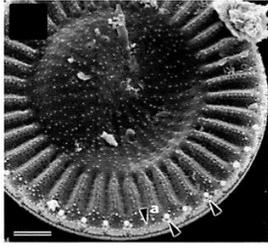
Algunas de las características fenotípicas de *C. alchichicana* se encuentran dentro del rango de variación de *C. quillensis* como el diámetro de la valva, la ubicación de las fultopórtulas, la cantidad de poros satelitales y el largo de las espinas. Sin embargo, otros rasgos de *C. alchichicana* también pueden entrar dentro del amplio rango de variación de *C. meneghiniana*, como el diámetro de la valva, la densidad de estrías o la presencia de espinas (Tabla 4 y 5).

Tabla 4. Características micromorfológicas y salinidad de los lagos donde habitan algunas de las morfoespecies estudiadas. Los guiones representan la información que no es proporcionada por los autores en las descripciones de los taxones. Se presentan dos descripciones distintas de la morfoespecie *C. meneghiniana*.

Morfoespecie	<i>C. alchichicana</i> (Oliva, Lugo, Alcocer y Cantoral)	<i>C. quillensis</i> (L. W. Bailey)	<i>C. meneghiniana</i> (Kützing)	
Autor(es) de la descripción	Oliva, et al. (2006)	Hakansson (2002)	Hakansson (2002)	Hevia-Orube et al., (2016)
Diámetro (µm)	35-63	10.9-70	5-45	6.1-19.6
Estrías/ 10µm	08-10	Gránulos en hileras	Estriación punteada aparente	Estriación conspicua 6.3-13
Ubicación de las fultopórtulas (fp.)	fp. marginales	fp. marginales	En la unión cara/manto, debajo de las espinas	Debajo de la espina más larga, si es que tiene. Algunos individuos no tienen espinas y presentan un poro simple ornamentado por fp. en el borde del manto
Patrón de las fp.	1 fp. cada 2° o 3° costilla	1 fp. en cada costilla	1-3 fp. cada estría	fp. Casi en todas las costillas
Abertura exterior de la fp.	No tiene	Engrosada, a veces rodeada por espínulas	Ligeramente engrosadas como tubos cortos	-
# Poros satelitales	3	3	3	3
Forma de la abertura externa de la rimopórtula (rp.)	1 rp. Con abertura elongada como rendija	1 rp. Con abertura en forma de manga	1 rp. con abertura externa en forma de hendidura	Grande, con labio alargado, orientado radialmente o ligeramente oblicuo.

Posición de la rp.	En el margen de la valva	En el manto	En el manto	Ocupa el lugar de 1 fp. en 1 de las costillas
Espinas	Sí, 2 cada 2° o 3° interstría o estría, en la unión cara/manto. Espinas de 2-4 μm de largo	Sí, al final de las estrías o interstrías. Espinas de 1-2 μm de largo	Sí, debajo de la unión de la cara/ manto	Algunos tienen espinas asociadas a las interestrías entre la cara y el manto.
Registro de var. fenotípica	No	Sí, la salinidad induce la auxosporulación (Meyer et al., 2001)	Sí, la salinidad afecta el # de estrías, fp., diámetro o la inducción de auxosporulación (Yuka et al., 2012)	-
Salinidad del lago	hiposalinidad \approx 8.5 g L^{-1} (Oliva et al., 2006)	4.76 a 88.74 g L^{-1} (Saros y Fritz, 2000)	Habita en agua dulce (Roubeix and Lancelot 2008)	

Tabla 5. Recopilación de fotografías publicadas de la cara externa de la valva, obtenidas por microscopía electrónica de barrido, obtenidas de las descripciones de los taxones. Barras de escala: A) 10 μm ; B) 5 μm y C) 2 μm .

Morfoespecie	<i>C. alchichicana</i> Oliva, et al. (2006)	<i>C. quillensis</i> Hakansson (2002)	<i>C. meneghiniana</i> Hakansson (2002)
Fotografía			

6. DISCUSIÓN

6.1 Filogenia de C. alchichicana y especies cercanas

En el año 2001, Oliva et al. identificaron a la diatomea que domina el fitoplancton del lago Alchichica como *C. quillensis* por su gran parecido morfológico con esta especie; pero después de estudiarla detalladamente, en el año 2006 se publicó como una especie nueva y microendémica a *C. alchichicana*, bien delimitada morfológicamente por el número y posición de las fultopórtulas, la abertura externa de la rimopórtula y la posición de sus espinas (Oliva et al., 2006). Sin embargo, a partir de los resultados descritos anteriormente, se descubrió que *C. alchichicana* no es tan cercana genéticamente a *C. quillensis*, sino que se encuentra más próxima al complejo de especies crípticas *C. meneghiniana* (específicamente de los linajes C y D, Fig. 4). Esto con la información proporcionada por el marcador cloroplastídico *psaA*, que resuelve con mayor detalle las relaciones evolutivas entre estos linajes, aunque no en su totalidad, probablemente porque el marcador no proporcionó suficiente información para determinar con mayor precisión el orden de ramificación o tal vez porque estas especies surgieron por múltiples episodios de especiación al mismo tiempo (Funk y Omland, 2003).

Las relaciones evolutivas de *C. quillensis* y *C. cryptica* (que en todas las hipótesis construidas también se ubican dentro del complejo filogenético *C. meneghiniana*) también quedan sin resolver.

La divergencia evolutiva (matriz de distancias patrísticas, Tabla 3) indica que la morfoespecie *C. alchichicana* es más distante de los linajes C y D en comparación con la baja divergencia que existe entre estos dos linajes en sí. Para Beszteri et al. (2005) esta baja divergencia entre C, D, el resto de linajes de *C. meneghiniana* (A, B, F, G, H, I), *C. quillensis* y *C. cryptica* resultó suficiente para identificarlos como 10 especies distintas, únicamente porque las filogenias del gen 28S y *psaA* coincidieron en distinguir claramente a los mismos agrupamientos. Tomando en cuenta el criterio para identificar especies de Beszteri et al. (2005), *C. alchichicana* correspondería a una especie separada de los linajes C y D. Sin embargo, considero que las diferencias genéticas bajas encontradas entre estas secuencias no son suficientes para apoyar la separación taxonómica pues en la literatura no se ha reportado un valor de corte fijo que permita delimitar genéticamente entre especies de diatomeas, quedando esta decisión a juicio de los investigadores (Silva, 2008; Alverson, 2008), lo cual lo hace ambiguo.

6.2 Delimitación específica de *C. alchichicana*

El análisis ABGD del gen 28S sí logró identificar a *C. alchichicana* como una especie distinta al resto, aunque con un valor bajo de P (a partir de ≤ 0.0028) y aún más bajo con la información del gen *psaA* (a partir de $P \leq 0.0017$) (Fig. 8, 9 y 10). Considero que cualquiera de estos valores resulta muy restrictivo para confiar en que existe una delimitación de *C. alchichicana* como especie, pues, como ya se mencionó, la divergencia interespecífica se basa solamente en 3 mutaciones únicas en el gen 28S (de un total de 563 pb) y 1 en el gen *psaA* (de un total de 505 pb). El tener una sola secuencia/repetición de cada marcador genético disminuye la posibilidad de establecer la divergencia de *C. alchichicana* con respecto a otras especies, ya que no se tiene un valor de la variabilidad intrapoblacional y/o intraespecífica de *C. alchichicana* y, por lo tanto, aunque con muchas restricciones, se podría asumir que las secuencias obtenidas son una representación básica de la identidad genética de la población.

Asimismo, como sucede en las filogenias, el criterio para escoger el valor de divergencia intraespecífica para la delimitación de especies es subjetivo y depende del investigador. No hay investigaciones previas acerca de este tema en especies del género *Cyclotella* o de diatomeas centrales. Únicamente se encontraron algunos valores de referencia de divergencia inter- e intraespecífica en otros géneros. Evans et al. (2007) utiliza un valor de divergencia interespecífica de al menos 18 pb o 2.9% (de un total de 624 pb) y un rango de divergencia intraespecífica de 0 a 5 pb ($\sim 0.8\%$) con el gen *Cox1*, para delimitar cepas estrechamente relacionadas del género *Sellaphora* como taxones separados. Lundholm et al. (2006) trabaja con secuencias de ITS1, 5.8S y ITS2 del ADNr y separa en 3 grupos cepas pertenecientes al complejo *Pseudo-nitzschia delicatissima*, con un valor de distancia mínimo de 0.075-0.090 y una divergencia intraespecífica mínima de 0.000-0.002.

Al combinar la información anterior, podemos acentuar que los datos generados en este estudio no soportan claramente la separación taxonómica de *C. alchichicana* del resto de linajes cercanos, pues además de contar con únicamente una repetición de cada marcador, no se encontró suficiente variación para delimitar entre especies. Si bien, las variaciones de la subunidad grande del ADN ribosomal y del gen *psaA* del ADNcp proporcionaron pistas valiosas de la historia evolutiva de las algas, no resultaron ideales para la delimitación de las entidades contenidas en el complejo críptico.

El gran número de copias del cistrón de ADNr distribuidas a lo largo del genoma de las diatomeas combinado con el nivel de polimorfismo intragenómico documentado en otras especies, conlleva a un establecimiento confuso o ambiguo de los límites entre especies y posteriormente a estimaciones erróneas de la biodiversidad de diatomeas (Alvarez y Wendel 2003; Thornhill et al., 2007). Los marcadores de herencia uniparental (como las mitocondrias o el cloroplasto) tienen el potencial de cambiar en poco tiempo, pero también pueden generar una clasificación incompleta cuando la especiación ha ocurrido demasiado rápido o recientemente (Funk y Omland, 2003), como pudo pasar con la morfoespecie *C. alchichicana* y con el complejo *C. meneghiniana* (Beszteri et al., 2007).

Por otra parte, la descripción de *C. alchichicana* como una especie nueva está basada únicamente en la comparación morfológica con *C. quillensis* (Oliva et al., 2006), lo que representa un sesgo en la caracterización de esta morfoespecie, pues algunos rasgos de *C. alchichicana* se encuentran dentro del amplio rango de variación fenotípica que exhibe *C. meneghiniana* (Häkansson y Chepurnov, 1999). Aunque estas evidencias no son suficientes para invalidar la descripción de *C. alchichicana* como una especie real, pues las descripciones de otras especies (*sensu stricto*) con las que se comparó en este trabajo también son inexactas o están incompletas. Por ejemplo, algunos autores no contemplan algunos caracteres morfológicos como las rimopórtulas o fultopórtulas en las descripciones de las diatomeas, o no detallan de igual forma las estructuras y la terminología que utilizan no es homogénea.

6.3 ¿Qué concepto debería utilizarse al hablar de *C. alchichicana*?

Los principales conceptos de especie como el concepto de especie biológica, ecológica o morfológica toman en cuenta una sola fuente de evidencia, en comparación con el concepto de especie basado en linaje (CEBL; de Queiroz, 2005a, b, 2007), que adopta varios tipos de evidencia como la morfología y los datos moleculares, para definir una especie. Por lo que considero que este concepto es el que debe aplicarse para tratar a la diatomea *C. alchichicana* y es el que mejor se ajusta a los datos que actualmente existen en torno a esta especie (los caracteres genéticos obtenidos en este estudio y los morfológicos reportados con anterioridad). Además, este concepto proveerá de una taxonomía integrativa más natural e informativa a nivel

de especie que proporcionará continuidad a las taxonomías pasadas (con el concepto de especie morfológica) (Queiroz, 2005a, b, 2007; Alverson, 2008).

Otras fuentes de evidencia que servirían para reforzar la identificación de *C. alchichicana* como una especie distinta, es la ecológica y biogeográfica, sin embargo esta diatomea se ha encontrado únicamente en el lago Alchichica, el cual es profundo y tiene una salinidad estable a lo largo del año (la cual se traslapa con la tolerada por otras especies del mismo género), por lo cual no hay información respecto a la amplitud de su nicho ecológico más allá de los cambios observados en este lago a lo largo del año. Por otra parte, el único aspecto del que se conoce variabilidad fenotípica de esta especie, es en el tamaño de sus frústulas (Oliva et al., 2006), el cual es producto de sus divisiones vegetativas, como en el resto de las diatomeas, por lo cual no es útil como carácter taxonómico. Dado que se tienen numerosos registros de especies del género *Cyclotella* con alta variación fenotípica dependiente del ambiente (Flower et al., 1990; Shirokawa et al., 2012), se ha intentado establecer cultivos para someter a *C. alchichicana* a distintas condiciones de salinidad para valorar si puede sobrevivir en otras salinidades y si tiene plasticidad fenotípica, pero como ya se ha comentado en este trabajo, hasta el momento no ha sido posible cultivarla en laboratorio.

Los resultados de los marcadores moleculares utilizados no fueron concluyentes para determinar las relaciones evolutivas de *C. alchichicana* con otras especies del mismo género, ni para delimitarla como una especie distinta a las demás, el cual es un problema común dentro del complejo *C. meneghiniana*, posiblemente porque se trata de casos de especiación reciente (Funk y Omland, 2003).

7. CONCLUSIONES

La poca variación interespecífica de las regiones D1/D2 del gen nuclear 28S del ADNr y psA del ADNcp no logra resolver la historia evolutiva del linaje o las relaciones filogenéticas precisas que existen entre *C. alchichicana* y otras especies del género *Cyclotella*, en específico de las variantes C y D del complejo *C. meneghiniana*. Además, estas regiones tampoco presentaron suficientes mutaciones autapomórficas en su secuencia nucleotídica para diferenciar claramente a

C. alchichicana como una especie distinta a cualquier otra incluida en el análisis. De manera que las evidencias morfológicas que identifican como una especie a *C. alchichicana* son la prueba más robusta por el momento, hasta conseguir más evidencia molecular que fortalezca la hipótesis de diferenciar a *C. alchichicana* como una especie distinta a cualquier otra.

8. PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN

Se sugieren las siguientes perspectivas de investigación para resolver la identificación de *C. alchichicana* como una especie distinta y microendémica. Primeramente, se debe conseguir un cultivo en condiciones de laboratorio de *C. alchichicana* fisiológicamente estable, con una tasa de reproducción constante para posteriormente llevar a cabo cualquier tipo de experimentos. Por una parte se necesita probar si existe entrecruzamiento entre *C. alchichicana* y las cepas de *C. meneghiniana* que resultaron más cercanas filogenéticamente (los grupos C y D) y así aproximar la caracterización de *C. alchichicana* con base al CEB.

También se debe evaluar si esta cepa tiene plasticidad fenotípica a distintas salinidades o disponibilidad de recursos como en las condiciones de las localidades donde habitan las especies hermanas (río Moselle en Luxemburgo y Köttinger See en Alemania, ver Anexo 1), para determinar a *C. alchichicana* con base al CEE.

Finalmente, se requiere información molecular más fina de *C. alchichicana* y de los linajes crípticos que engloba el complejo *C. meneghiniana* como la combinación de datos de otros marcadores moleculares (como el gen *rbcL* del ANDcp, el gen 18S o la región ITS del ADNr), para distinguir y organizar con mayor detalle las relaciones evolutivas que existen entre estas especies (Evans et al., 2007; Rynearson y Armbrust, 2004; Vanormelingen, et al., 2013) y así identificarlas con el CEF y en conjunto, con el CEBL.

9. LITERATURA CITADA

Alvarez, I. y J. F. Wendel JF. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 417-434.

- Adame, M. F., Alcocer, J. y Escobar, E. (2008). Size-fractionated phytoplankton biomass and its implication for the dynamics of an oligotrophic tropical lake. *Freshwater Biology*, 53: 22-31.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukesš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. y Spiegel, F. W. (2012). The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal. of Eukaryotic Microbiology*, 59: 429-493.
- Alvarez, I. y Wendel, J. F. (2003). Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29: 417-434.
- Alverson AJ y Theriot, E. C. (2005). Comments on recent progress toward reconstructing the diatom phylogeny. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5: 57-62.
- Alverson, A. J. (2008). Molecular systematics and the diatom species. *Protist*, 159: 339-353.
- Alverson, A. J., Jansen, R. K. y Theriot, E. C. (2007). Bridging the Rubicon: phylogenetic analysis reveals repeated colonizations of marine and fresh waters by thalassiosiroid diatoms. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45: 193-210.
- Andersen, R. A. y Bailey, J. C. (2002). Phylogenetic analysis of 32 strains of *Vaucheria* (Xanthophyceae) using the *rbcL* gene and its two flanking spacer regions. *Journal of Phycology*, 38: 583-592.
- Armbrust, E. V., Berges, J. A., Bowler, C., Green, B. R., Martinez, D., Putnam, N. H., Zhou, S., Allen, A. E., Apt, K. E., Bechner, M., Brzezinski, M. A., Chaal, B. K., Chiovitti, A., Davis, A. K., Demarest, M. S., Detter, J. C., Glavina, T., Goodstein, D., Hadi, M. Z., Hellsten, U., Hildebrand, M., Jenkins, B. D., Jurka, J., Kapitonov, V. V., Kroger, N., Lau, W. W. Y., Lane, T. W., Larimer, F. W., Lippmeier, J. C., Lucas, S., Medina, M., Montsant, A., Obornik, M., Parker, M. S., Palenik, B., Pazour, G. J., Richardson, P. M., Rynearson, T. A., Saito, M. A., Schwartz, D. C., Thamtrakoln, K., Valentin, K., Vardi, A., Wilkerson, F. P. y Rokhsar, D. S. (2004). The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science*, 306: 79-86.

- Armienta, M. A., Vilaclara, G., De la Cruz-Reyna, S., Ramos, S., Cenicerros, N., Cruz, O., Aguayo, A. y Arcega-Cabrera, F. (2008). Water chemistry of lakes related to active and inactive Mexican volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 178: 249-258.
- Beszteri, B., Ács, É. y Medlin, L. (2005). Conventional and geometric morphometric studies of valve ultrastructural variation in two closely related *Cyclotella* species (Bacillariophyta), *European Journal of Phycology*, 40: 89-103.
- Beszteri, B., John, W. y Medlin, L. K. (2007). An assessment of cryptic genetic diversity within the *Cyclotella meneghiniana* species complex (Bacillariophyta) based on nuclear and plastid genes, and amplified fragment length polymorphisms. *European Journal of Phycology*, 42: 47-60.
- Birky, C. W. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, mechanisms, and models. *Annual Review of Genetics*, 35: 125-148.
- Chung, M. H., Yoon, W. D. y Lee, J. B. (2010). Morphological description of *Cyclotella atomus* var. *marina* (Bacillariophyceae): newly reported in Korean waters. *Algae*, 25: 57-64.
- Ciros-Pérez, J., Ortega-Mayagoitia, E. y Alcocer, J. (2015). The role of ecophysiological and behavioral traits in structuring the zooplankton assemblage in a deep, oligotrophic, tropical lake. *Limnology and Oceanography*, 60: 2158-2172.
- Cox, E. J. (1996). Identification of Freshwater Diatoms from Live Material. *Chapman y Hall. London*, 158 p.
- Coyne, J. A. y Orr, H. A. (2004). Speciation. *Sinauer Associates*, Sunderland, MA. 545 p.
- Cracraft, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*, 1: 159-187.
- Fontaneto, D., Flot, J. F. y Tang, C. Q. (2015). Guidelines for DNA taxonomy, with a focus on the meiofauna. *Marine Biodiversity*, 45: 433-451.
- Dahlman, M., Danell, E. y Spatafora, J. W. (2000). Molecular systematics of Craterellus: cladistics analysis of nuclear LSU rDNA sequence data. *Mycological Research*, 104: 388-394.

- de Queiroz K. (2005a). Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 6600-6607.
- de Queiroz K. (2005b). A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 56: 196-215.
- de Queiroz K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56: 879-886.
- Mann, D. G. (1999). Phycological reviews 18. The species concept in diatoms. *Phycologia*, 38: 437-495.
- Dobzhansky, Theodosius (1970). *Genetics of the evolutionary process* (4th ed.). New York: Columbia university press.
- Duleba, M., Kiss, K. T., Földi, A., Kovács, J., KraljBorojević, K., Molnár, L. F., Plenković-Moraj, A., Pohner, Z., Solak, C. N., Tóth, B. y Ács, E. (2015). Morphological and genetic variability of assemblages of *Cyclotella ocellata* Pantocsek/ *C. comensis* Grunow complex (Bacillariophyta, Thalassiosirales). *Diatom Research*, 30: 283-306.
- Evans, K. M., Wortley, A. H., y Mann. D. G., (2007). An assessment of potential diatom “barcode” genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist*, 158: 349-364.
- Evans, K. M., Wortley, A. H., Simpson, G. E., Chepurnov, V. A., y Mann, D. G. (2008). A molecular systematic approach to explore diversity within the *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 44: 215-231.
- Finlay, B. J., Monaghan, E. B. y Maberly, S. C. (2002). Hypothesis: the rate and scale of dispersal of freshwater diatom species is a function of their global abundance. *Protist*, 153: 261-273.
- Flower, R. J., Gasse, F. y Hakansson, H. (1990). A new species of *Cyclotella*, *C. azigzensis* sp. nov., described from modern material collected from upland lakes in morocco. *Diatom Research*, 5: 253-260.

- Funk, D.J. y Omland, K. E. (2003). Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34: 397-423.
- Ghiron J. H. L., Amato, A., Montresor, M. y Kooistra, W. (2008). Plastid inheritance in the planktonic raphid pennate diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae). *Protist*, 159: 91-98.
- Gould, S. J. 1987. *Natural history*.
- Guerrero, J. M. y Echenique, R. O. (2006). *Discostella* taxa (Bacillariophyta) from the Río Limay basin (northwestern Patagonia, Argentina). *European Journal of Phycology*, 41: 83-96.
- Guo, L., Sui, Z., Zhang, S., Ren, Y. y Liu, Y. (2015). Comparison of potential diatom ‘barcode’ genes (the 18S rRNA gene and ITS, COI, rbcL) and their effectiveness in discriminating and determining species taxonomy in the *Bacillariophyta*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65: 1369-1380.
- Hakansson H. y Chepurnov, V. (1999). A study of variation in valve morphology of the diatom *Cyclotella meneghiniana* in monoclonal cultures: effect of auxospore formation and different salinity conditions, *Diatom Research*, 14: 251-272.
- Hakansson, H. (2002). A compilation and evaluation of species in the general *Stephanodiscus*, *Cyclostephanos* and *Cyclotella* with a new genus in the family Stephanodiscaceae. *Diatom Research*, 17: 1-139.
- Hakansson, H., S. y Kling, H. (1994). *Cyclotella agassizensis* nov. sp. and its relationship to *C. quillensis* Bailey and other prairie *Cyclotella* species. *Diatom Research*, 9: 289-301.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L. y deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 270: 313-321..
- Hevia-Orube, J., Orive, E., David, H., Laza-Martinez, A. y Seone, S. (2016). *Skeletonema* species in a temperate estuary: a morphological, molecular and physiological approach. *Diatom Research*, 31: 185-197.

- Hoops, H. J. y Floyd, G. L. (1979). Ultrastructure of the centric diatom *Cyclotella meneghiniana*: vegetative cell and auxospore development. *Phycologia*, 18: 424-435.
- Jung, S. W., Han, M. S. y Ki, J. S. (2010). Molecular genetic divergence of the centric diatom *Cyclotella* and *Discostella* (Bacillariophyceae) revealed by nuclear ribosomal DNA comparisons. *Journal of Applied Phycology*, 22: 319-329.
- Kaczmarek, I., Mather, L., Luddington, I. A., Muise, F. y Ehrman, J. M. (2014). Cryptic diversity in a cosmopolitan diatom known as *Asterionellopsis glacialis* (Fragilariaceae): Implications for ecology, biogeography, and taxonomy. *American Journal of Botany*, 101: 267-286.
- Kawai, H., Motomura, T. and Okuda, K. (2005). Isolation and Purification Techniques for Macroalgae. En: R. Andersen, (Ed.) *Algal Culturing Techniques*, San Diego, California: Frank Cynar, 133-144 pp.
- Kociolek, J. P. (2005). Taxonomy and ecology: further considerations. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 56: 99-106.
- Kooistra, W. H. C. F., Sarno, D., Balzano, S., Gu, H., Andersen, R. A. y Zingone, A. (2008). Global diversity and biogeography of *Skeletonema* species (Bacillariophyta). *Protist*, 159: 177-193.
- Kumar S., Stecher G. y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33: 1870-1874.
- Lee, M. S. Y. (2003) Species concepts and species reality: salvaging a Linnaean Rank. *Journal of Evolutionary Biology*, 13: 179-188.
- Lefebvre, K. E. y Hamilton, P. B. (2015). Morphology and molecular studies on large *Neidium* species (Bacillariophyta) of North America, including an examination of Ehrenberg's types. *Phytotaxa*. 220: 201-223.
- Lundholm N, Moestrup, O., Kotaki, Y., Hoef-Emden, K., Scholin, C., Miller, P. (2006). Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae)

illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. *Journal of Phycology*, 42: 464–481.

Lynn A. B. y Furey, P. C. (2011). Morphological variation in *Eunotia serra*, with a focus on the rimoportula, *Diatom Research*, 26: 221-226.

Mann, D. G., McDonald, S. M., Bayer, M. M., Droop, S. J. M., Chepurnov, V. A., Loke, R. E., A., Ciobanu, A. y Du Buf, J. M. H. (2004). The *Sellaphora pupula* species complex (Bacillariophyceae): morphometric analysis, ultrastructure and mating data provide evidence for five new species. *Phycologia*, 43: 459-482.

Mann, D. G., Sato, S., Trobajo, R., Vanormelingen, P. y Souffreau, C. (2010): DNA barcoding for species identification and discovery in diatoms. *Cryptogamie Algologie*, 31: 557-577.

Mann, D. G. (1999). Phycological reviews 18, The species concept in diatoms. *Phycologia*, 38: 437-495.

Mayr E. (2000). The Biological Species Concept. En: Wheeler Q. D., Meier R, eds. *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate*. New York: Columbia University Press. 17-29 pp.

Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist*. Columbia University Press. New York. 60: 289-291.

Medlin, L. K., Elwood, H. J., Stickel, S. y Sogin, M. L. (1991). Morphological and genetic variation within the diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae): Evidence for a new species, *Skeletonema pseudocostatum*. *Journal of Phycology*, 27: 514-524.

Meyer, B. y Hakansson, H. (1996). Morphological variation of *Cyclotella polymorpha* sp. nov. (Bacillariophyceae). *Phycologia*, 35: 64-69.

Muylaert, K. y Sabbe, K. (1996). *Cyclotella scaldensis* spec. nov. (Bacillariophyceae), a new estuarine diatom. *Nova Hedwigia*. 63(3-4):335-345.

Nagy, S. S. (2011) Collecting, cleaning, mounting, and photographing diatoms. Seckbach, J., Kociolek, J. P. (Ed.) *The diatom world*. London New York. Springer. 1-18 pp.

- Oliva, M. G., Lugo, A., Alcocer, J. y Cantoral-Uriza, E. A. (2006). *Cyclotella alchichicana* sp. nov. from a saline mexican lake. *Diatom Research*, 21: 81-89.
- Oliva, M. G., Lugo, A., Alcocer, J., Peralta, L. y Sánchez, M. R. (2001). Phytoplankton dynamics in a deep, tropical, hyposaline lake. *Hydrobiologia*, 466: 299-306.
- Ortega-Mayagoitia, E., Ciro-Pérez, J. y Sánchez-Martínez, M. (2011). A story of famine in the pelagic realm: temporal and spatial patterns of food limitation in rotifers from an oligotrophic tropical lake. *Journal of Plankton Research*, 33: 1574-1585.
- Prasad, A. K. S. K. y Nienow, J. A. (2006). The centric diatom genus *Cyclotella*, (Stephanodiscaceae: Bacillariophyta) from Florida Bay, USA, with special reference to *Cyclotella choctawhatcheeana* and *Cyclotella desikacharyi*, a new marine species related to the *Cyclotella striata* complex. *Phycologia*, 45: 127-140.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. y Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21: 1864-1877.
- Rimet, F. y Bouchez, A. (2012). Biomonitoring river diatoms: Implications of taxonomic resolution. *Ecological Indicators*, 15: 92-99.
- Roubeix V, Lancelot C (2008) Effect of salinity on growth, cell size and silicification of an euryhaline freshwater diatom: *Cyclotella meneghiniana* Kütz. *Transitional waters bulletin* 2: 31-38.
- Round, F. E., Crawford, R. M. y Mann, D. G. (1990). *The diatoms, biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge. 747 p.
- Rynearson, T. A., Armbrust, E. V. (2004). Genetic differentiation among populations of the planktonic marine diatom *Ditylum brightwellii* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 40: 34-43.
- Sarno, D., Kooistra, W. H. C. F., Medlin, L. K., Percopo, I. y Zingone, A. (2005). Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy of *S. costatum*-like species with the description of four new species. *Journal of Phycology*, 41: 151-176.

- Saros, J. E. y Fritz, S. C. (2000). Changes in the growth rates of saline-lake diatoms in response to variation in salinity, brine type and nitrogen form. *Journal of Plankton Research*, 22: 1071-1083.
- Saunders, G. W. y Kucera, H. (2010). An evaluation of *rbcL*, *tufA*, *UPA*, *LSU* and *ITS* as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogamie Algologie*, 31: 487-528.
- Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E., Crozier, R. H. (2010). Integrative Taxonomy: A Multisource Approach to Exploring Biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55: 421-438.
- Schultz, M. E. (1971). Salinity-related polymorphism in the brackish-water diatom *Cyclotella cryptica*. *Canadian Journal of Botany*, 49: 1285-1289.
- Shirokawa, Y. y Shimada, M. (2016). Cytoplasmic inheritance of parent –offspring cell structure in the clonal diatom *Cyclotella meneghiniana*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 16; 283: 20161632.
- Shirokawa, Y., Karino, K. y Mayama, S. (2012). Developmental plasticity and genotype-environment interactions influence valve morphology in the *Cyclotella meneghiniana* species complex (Bacillariophyceae). *European Journal of Phycology*, 47: 245-253.
- Shirokawa, Y., Karino, K. y Mayama, S. (2012). Developmental plasticity and genotype–environment interactions influence valve morphology in the *Cyclotella meneghiniana* species complex (Bacillariophyceae), *European Journal of Phycology*, 47: 245-253.
- Silva, P. C. (2008). Historical review of attempts to decrease subjectivity in species identification, with particular regard to algae. *Protist*, 159: 153-161.
- Simms, P. A., Mann D. G. y Medlin L. M. (2006). Evolution of the diatoms: insights from fossil, biological and molecular data. *Phycologia*, 45: 361-402.
- Souffreau, C., H., Verbruggen, A. P., Wolfe, P., Vanormelingen, P. A., Siver, E. J., Cox, D.G., Mann, B., Van de Vijver, K., Sabbe, W., Vyverman. (2011). A time-calibrated multi-gene phylogeny of the diatom genus *Pinnularia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61: 866-79.

- Spamer, E. E. y Theriot, E. C. (1997). "*Stephanodiscus minutulus*," "*S. minutus*," and similar epithets in taxonomic, ecological, and evo-lutionary studies of modern and fossil diatoms (Bacillariophyceae: Thalassiosiraceae) a century and a half of uncertain taxonomy and nomenclatural hearsay. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, 148: 231-272.
- Tamura, K. y Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10: 512-526.
- Tavaré S y Giddings, B. W. (1988). Some statistical aspects of the primary structure of nucleotide sequences. En: *Mathematical Methods for DNA Sequences*. (Ed.) Waterman MS. 117–132.
- Theriot, E., Stoermer, E. F. y Hakansson, H. (1987). Taxonomic interpretation of the rimoportula of freshwater genera in the centric diatom family Thalassiosiraceae. *Diatom Research*, 2: 251-265.
- Thornhill, D. J., Lajeunesse, T. C. y Santos, S. R. (2007). Measuring rDNA diversity in eukaryotic microbial systems: how intragenomic variation, pseudogenes, and PCR artifacts confound biodiversity estimates. *Molecular Ecology*, 16: 5326-5340.
- Trobajo, R., Mann, D. G., Clavero, E., Evans, K. M., y Mcgregor, R. C. (2010). The use of partial *cox1*, *rbcL* and LSU rDNA sequences for phylogenetics and species identification within the *Nitzschia palea* species complex (Bacillariophyceae) The use of partial *cox1*, *rbcL*, and LSU rDNA sequences for phylogenetics and species identification. *European Journal of Phycology*, 45: 413-425.
- Van Valen, L. (1976). Ecological species, multispecies and oaks. *Taxon*, 25: 233-239.
- Vanormelingen, P., Evans, K. M., Chepurinov, V. A., Vyverman, W. y Mann, D. G. (2013). Molecular species discovery in the diatom *Sellaphora* and its congruence with mating trials. *Fottea*, 13: 133-148.

- Vilaclara, G., Chávez, M., Lugo, A., González, H. y Gaytán, M. (1993). Comparative description of crater-lakes basic chemistry in Puebla state, Mexico. *Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 25: 435-440.
- Vilgalys, R. y Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172: 4239-4246.
- Wiley, E. O. (1978). The Evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology*, 27: 17-26.
- Zou, S., Fei, C., Wang, C., Gao, Z., Bao, Y., He, M. y Wang, C. (2016). How DNA barcoding can be more effective in microalgae identification: a case of cryptic diversity revelation in *Scenedesmus* (Chlorophyceae). *Scientific Reports*, 6: 36822.

ANEXOS

Anexo 1. Listado de las cepas utilizadas en el análisis del gen 28S. Se muestran los agrupamientos que forman, sus orígenes y los números de acceso con los que se construyeron los árboles filogenéticos con 60 secuencias (Anexo 3). En negritas se muestran las cepas utilizadas para los análisis filogenéticos simplificados, presentados en el apartado 5.3. La lista se encuentra separada por morfoespecies, las cuales resultaron tener distintos genotipos dentro de cada conjunto. Modificado de Beszteri et al. (2007).

Especie	Nombre de los linajes	Número de variantes	Códigos de acceso	Procedencia de la cepa
<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	S.hantz	1	AJ878502	Río Weser, Nienburg, Alemania
<i>Discostella woltereckii</i>	D.pseu	1	AY496186	Montezuma Well Natl. Mon., AZ, EE. UU.
<i>Discostella pseudostelligera</i>	D.pseu2	2	AJ878501, AY496185	Río Weser, Hasenbüren, Alemania; Montezuma Well Natl. Mon., AZ, EE. UU.
			AY496187	Borrow Pit, IA, EE. UU.
<i>Cyclotella choctawhatcheeana</i>	C.choct	1	AJ878463 , AJ878464	Salton Sea, California, EE. UU.
<i>Cyclotella cf. scaldensis</i>	C.scal	2	AY496198	Estuario de Geeste, Bremerhaven, Alemania
			AY496199	
			AY496200, AY496201	
<i>Cyclotella cryptica</i>	C.cry	3	AJ878465, AJ878466	Martha's Vineyard, MA, EE. UU.; Myakka River, Florida, EE. UU.
			AJ878467	
			AJ878483	
<i>Cyclotella quillensis</i>	C.quill	1	AJ878498 , AJ878499, AJ878500	Devils Lake, Dakota del Norte, EE. UU.
<i>Cyclotella alchichicana</i>	C.alchi	1	Anexo 5	Lago Alchichica, Puebla, México

Continuación del listado de las cepas utilizadas en la construcción de los árboles filogenéticos del gen 28S.

Espece	Cantidad total de variantes	Nombre de cada linaje	Número de variantes	Códigos de acceso	Procedencia de la cepa
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	21	C.mene A	8	AJ878468, AY496202 , AY496203, AY496204	Estuario de Geeste, Bremerhaven, Alemania
				AY496205	Estuario de Geeste, Bremerhaven, Alemania
				AJ878477, AJ878479, AJ878480, AJ878481	Río Weser, Nienburg, Alemania
				AJ878478, AY496190	Río Weser, Nienburg, Alemania
				AJ878462	
				AJ878470	
				AY496189	
				AJ878471, AJ878472, AJ878473, AJ878475, AJ878476	
		AJ878476			
		C.mene B	1	AY496195 , AY496196	Estuario de Geeste, Bremerhaven, Alemania
		C.mene C	1	AJ878484 , AY496191, AY496192, AY496193	Estuario de Geeste, Bremerhaven, Alemania Río Moselle, Luxemburgo
		C.mene D	5	AJ878485, AJ878486, AY496194	Río Ems, Papenburg, Alemania.
				AJ878469	Estuario de Geeste, Bremerhaven, Alemania
				AJ878488	Köttinger See, Alemania
				AJ878487	Loch Leven, Escocia,
AJ878489	Reino Unido				

		C.mene E	1	AJ878490 , AJ878491, AJ878492	Río Weser, Hasenbüren, Alemania. Lago Ohrid, Macedonia
		C.mene F	3	AJ878493	Río Weser, Hasenbüren, Alemania
				AJ878494, AJ878495	
				AJ878496	
		C.mene G	1	AJ878497	Hanoi, Vietnam
		C.mene H	1	AJ878482	Bayou Petite Prairie, LA, EE. UU.

Anexo 2. Listado de las cepas utilizadas en el análisis del gen *psaA*. Se muestran los agrupamientos que forman, sus orígenes y los números de acceso con los que se construyeron los árboles filogenéticos del gen *psaA* con 59 secuencias (Anexo 2). En negritas se muestran las secuencias utilizadas para los análisis filogenéticos simplificados, presentados en el apartado 5.3. La lista se encuentra separada por morfoespecies, las cuales resultaron tener distintos genotipos dentro de cada conjunto. Modificado de Beszteri et al. (2007).

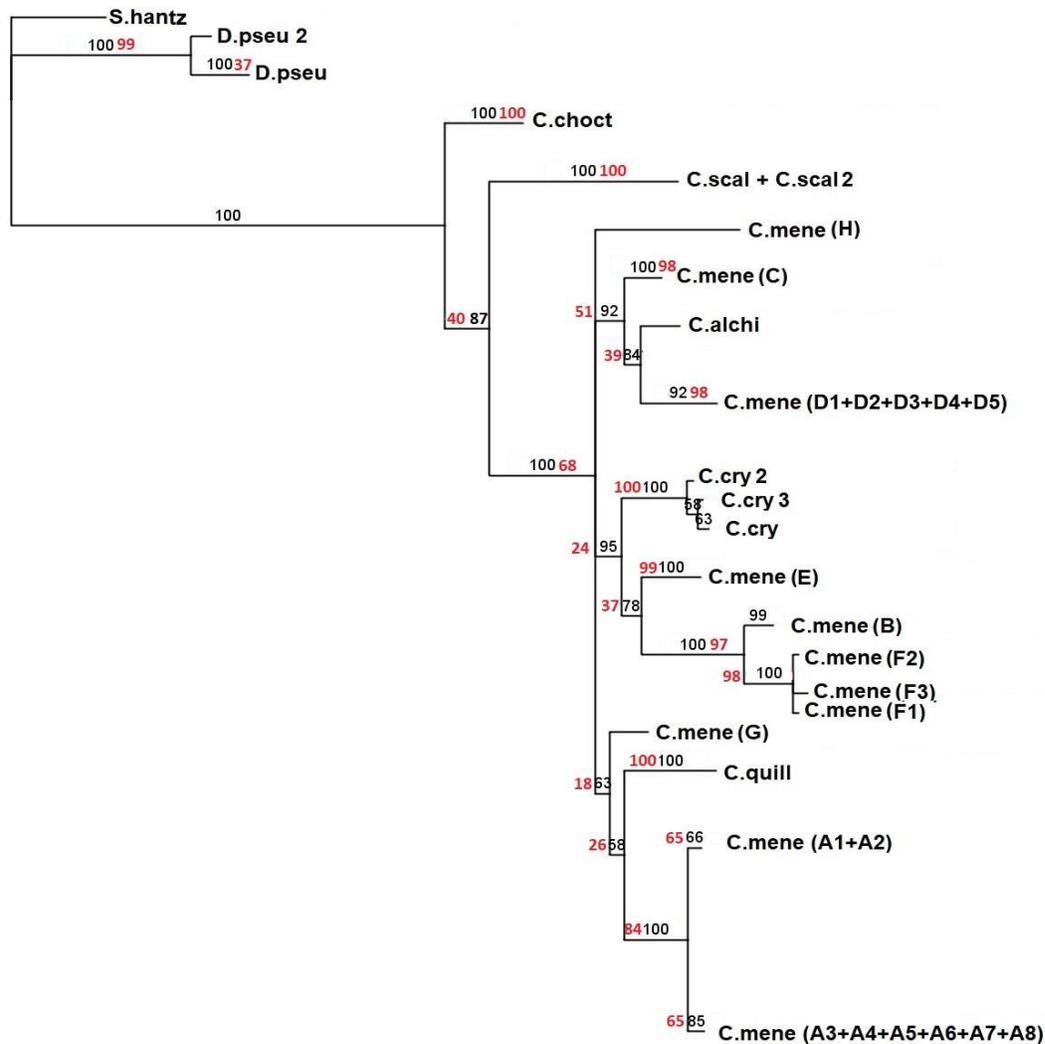
Espece	Número de variantes	Nombre de los linajes	Códigos de acceso	Procedencia de la cepa
<i>Stephanodiscus hantzschii</i>	1	SHAN	AJ878594	Río Weser, Nienburg, Alemania
<i>Discostella woltereckii</i>	1	DPSE	AJ878591	Montezuma Well Natl. Mon., AZ, EE. UU.
<i>Discostella pseudostelligera</i>	2	DPSE2	AJ878590	Río Weser, Hasenbüren, Alemania; Montezuma Well Natl. Mon., AZ, EE. UU.
			AJ878592	
			AJ878593	Borrow Pit, IA, EE. UU.
<i>Cyclotella choctawhatcheeana</i>	1	CCHOC	AJ878538 , AJ878539	Salton Sea, California, EE. UU.
<i>Cyclotella cf. scaldensis</i>	1	CSCA	AJ878588 AJ878589 AJ878587	Estuario de Geeste, Bremerhaven, Alemania
<i>Cyclotella cryptica</i>	2	CCR	AJ878541, AJ878542, AJ878543	Martha's Vineyard, MA, EE. UU.; Myakka River, Florida, EE. UU.
			AJ878540	
<i>Cyclotella quillensis</i>	1	CQUI	AJ878584 , AJ878585, AJ878586	Devils Lake, Dakota del Norte, EE. UU.
<i>Cyclotella alchichicana</i>	1	CALC	Anexo 6	Lago Alchichica, Puebla, México

Continuación del listado de las cepas utilizadas en la construcción de los árboles filogenéticos del gen *psaA*.

Espece	Cantidad total de variantes	Nombre de cada linaje	Número de variantes	Códigos de acceso	Procedencia de la cepa
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	10	CME A	2	AJ878537 , AJ878544, AJ878545, AJ878546, AJ878547, AJ878550 , AJ878562, AJ878563 , AJ878564, AJ878565, AJ878566, AJ878567, AJ878568	Estuario de Geeste, Bremerhaven, Alemania, Río Weser, Nienburg, Alemania
				AJ878548, AJ878549, AJ878557, AJ878558, AJ878559, AJ878560, AJ878561	Estuario de Geeste, Bremerhaven, Alemania Río Weser, Nienburg, Alemania
		CME B	1	AJ878552 , AJ878551	Estuario de Geeste, Bremerhaven, Alemania
		CME C	1	AJ878553, AJ878554, AJ878555, AJ878556	Estuario de Geeste, Bremerhaven, Alemania Río Moselle, Luxemburgo
		CME D	2	AJ878569, AJ878570, AJ878571, AJ878572, AJ878573	Río Ems, Papenburg, Alemania. Estuario de Geeste, Bremerhaven, Alemania
				AJ878574	Köttinger See, Alemania

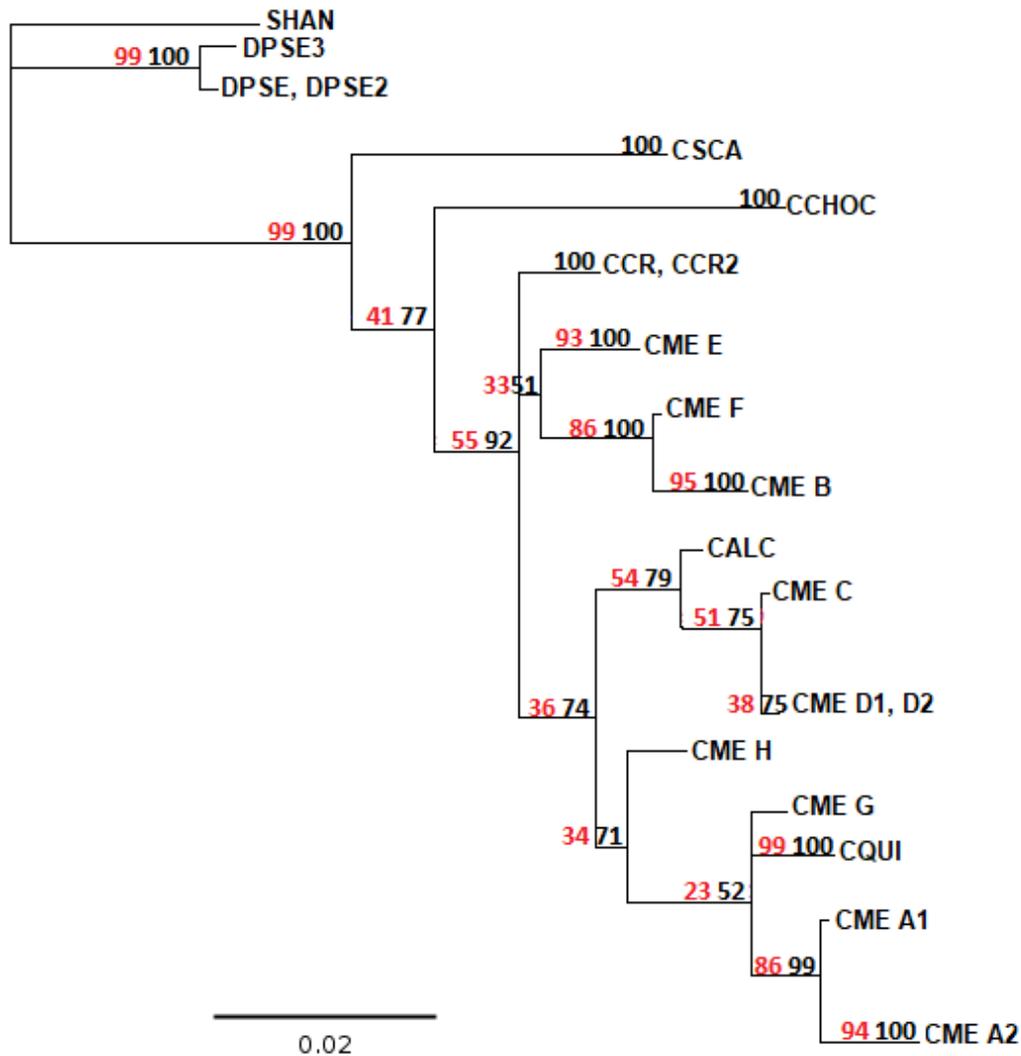
		CME E	1	AJ878577 , AJ878575, AJ878578	Río Weser, Hasenbüren, Alemania. Lago Ohrid, Macedonia
		CME F	1	AJ878579 , AJ878580, AJ878581, AJ878582	Río Weser, Hasenbüren, Alemania
		CME G	1	AJ878576	Hanoi, Vietnam
		CME H	1	AJ878583	Bayou Petite Prairie, LA, EE. UU.

Anexo 3. Árbol filogenético donde se analizan las regiones D1/D2 del gen nuclear 28S del ADNr, con 60 secuencias (ver Anexo 1).



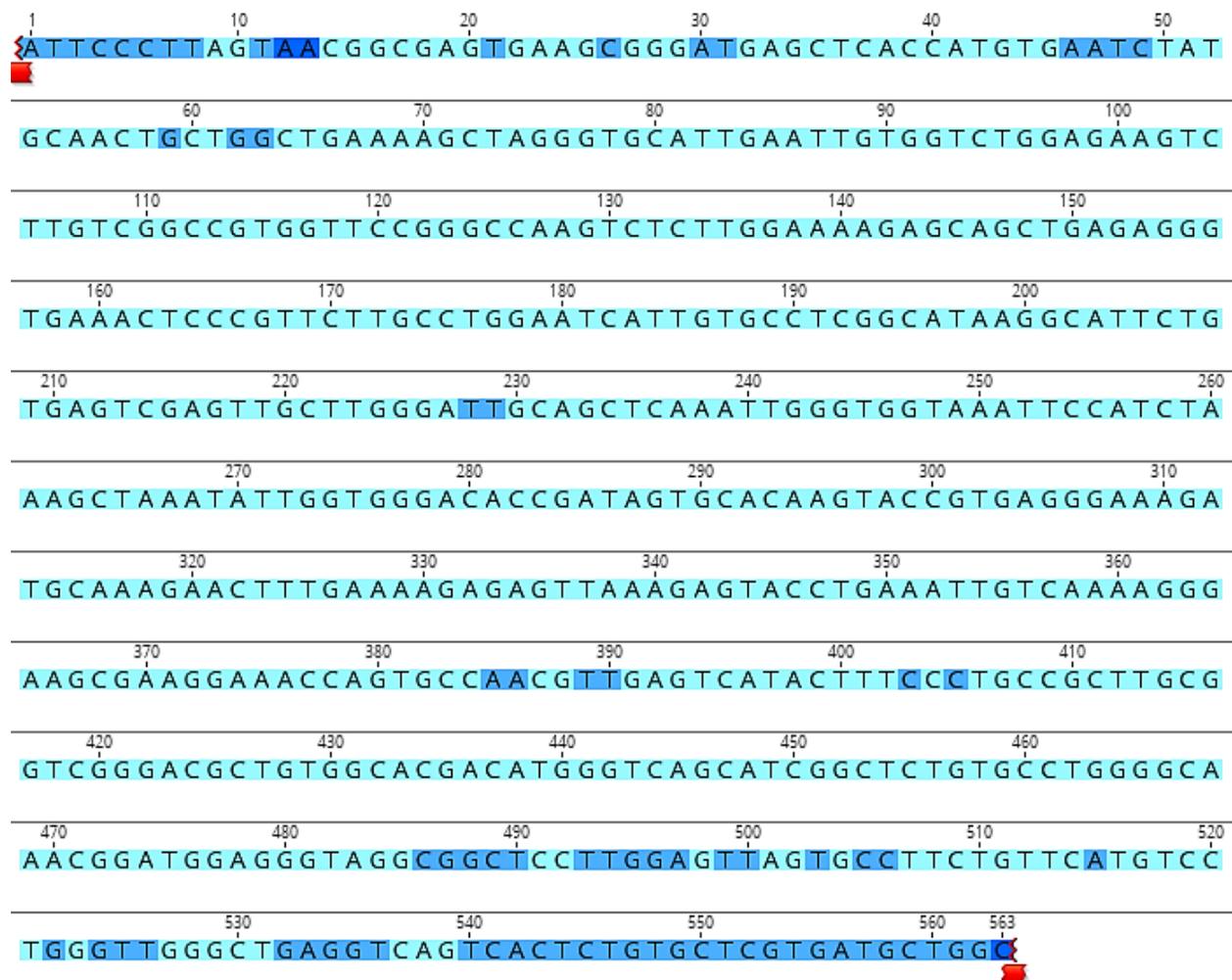
Anexo 3. Filogenia de las 60 variantes de 28S ADNr nuclear, calculada con un arranque de alineaciones de 10,000 réplicas. El modelo de mejor ajuste utilizado para estos análisis fue Tamura-Nei, elegido por el Criterio de información de Akaike. Las longitudes de las ramas corresponden al árbol creado con IB y se presentan los porcentajes de probabilidad de MV (rojo) y IB (negro) en cada nodo. Las variantes (descritas en la Tabla 2) se agruparon con la misma topología en los distintos métodos de inferencia filogenética. Los árboles se enraizaron usando una secuencia de *Stephanodiscus hantzschii* (S.hantz) como grupo externo (Tabla 2). Las ramas no se presentan colapsadas.

Anexo 4. Árbol filogenético donde se analizan las secuencias del gen *psaA* del ADN cloroplastídico, con 59 secuencias (ver Anexo 2).



Anexo 4. Filogenia de las 59 variantes del gen cloroplastídico *psaA*, calculada con un arranque de alineaciones de 10,000 réplicas. El modelo de mejor ajuste utilizado para estos análisis fue General-Time-Reversible, elegido por el Criterio de información de Akaike. Las longitudes de las ramas corresponden al árbol creado con IB y se presentan los porcentajes de probabilidad de MV (rojo) y IB (negro) en cada nodo. Las variantes (descritas en la Tabla 3) se agruparon con la misma topología en los distintos métodos de inferencia filogenética. Los árboles se enraizaron usando una secuencia de *Stephanodiscus hantzschii* (SHAN) como grupo externo (Tabla 3). Las ramas no se presentan colapsadas.

Anexo 5. Secuencia nucleotídica de la región D1/D2 del gen nuclear 28S (ADNr) de *Cyclotella alchichicana*. Fragmento de 563 pb de longitud, con dirección 5'-3'. Se muestran las iniciales de las bases nitrogenadas A: Adenina, C: Citosina, G: Guanina, T: Timina. Se eliminaron las zonas ambiguas del inicio y del final de la secuencia nucleotídica obtenida del electroferograma y se presenta la secuencia consenso obtenida del empalme de las secuencias hacia adelante (5'-3') y hacia atrás (3'-5'). Se distingue un gradiente de tonos azules para identificar la calidad de la lectura en el electroferograma, con azul claro los nucleótidos con buena calidad y con azul oscuro con mala calidad.



Anexo 6. Secuencia nucleotídica del gen *psaA* del ADN cloroplástico de *Cyclotella alchichicana*. Fragmento de 505 pb de longitud con dirección 5'-3'. Se muestran las iniciales de las bases nitrogenadas A: Adenina, C: Citosina, G: Guanina, T: Timina. Se eliminaron las zonas ambiguas del inicio y del final de la secuencia nucleotídica obtenida del electroferograma y se presenta la secuencia consenso obtenida del empalme de las secuencias hacia adelante (5'-3') y hacia atrás (3'-5'). Se distingue un gradiente de tonos azules para identificar la calidad de la lectura en el electroferograma, con azul claro los nucleótidos con buena calidad y con azul oscuro con mala calidad.

```

1      10      20      30      40
TGGTATGCAATTCCATGGCGCATATTTTTCCTAACTATTTCAGCT

50      60      70      80
TGGTTAACTGATCCAAATTAGTATTAAACAAAGTTCACAAGTTG

90      100     110     120
TTTGGCCAATAGTTGGTCAAGAAATTCTAAATGCTGATGTTGG

130     140     150     160     170
TGGTAATTTCCAAGGTGTTCAAACAACATCAGGTTGGTTCCAA

180     190     200     210
ATGTGGAGAGCAGAAGGAATTACAAGTGAAGTAGAACCTATACT

220     230     240     250
GGACAGCAATTGGTGGTTTAGCAATGTCAGCAATTATGTTATT

260     270     280     290     300
TGCTGGTTGGTTCCTACTATCATAAAGCTGCACCAAATTAGAA

310     320     330     340
TGGTTCCAAAATGCAGAAATCAATGATGAACCATCACTTAGCAG

350     360     370     380
GTTTATTAGGATTAGGATGTTTATCATGGTCTGGTCATCAGAT

390     400     410     420     430
TCATGTTGCATTACCAATCAATAAATTATTAGACGCAGGTGTT

440     450     460     470
TCACCACAAGAAATTCCTTTACCCCATGAATTCTTAATTAATC

480     490     500     505
GAGATTTTAATGGCACAATTATATCCAAGTTTT

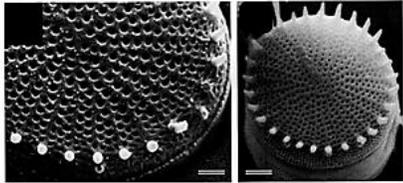
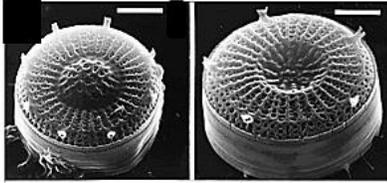
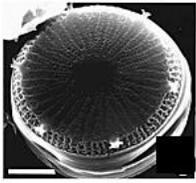
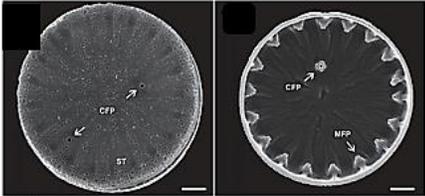
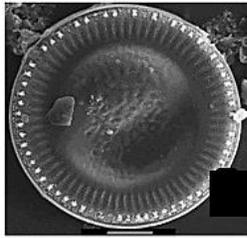
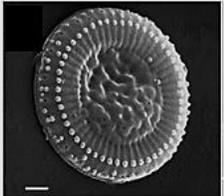
```

Anexo 7. Micromorfología

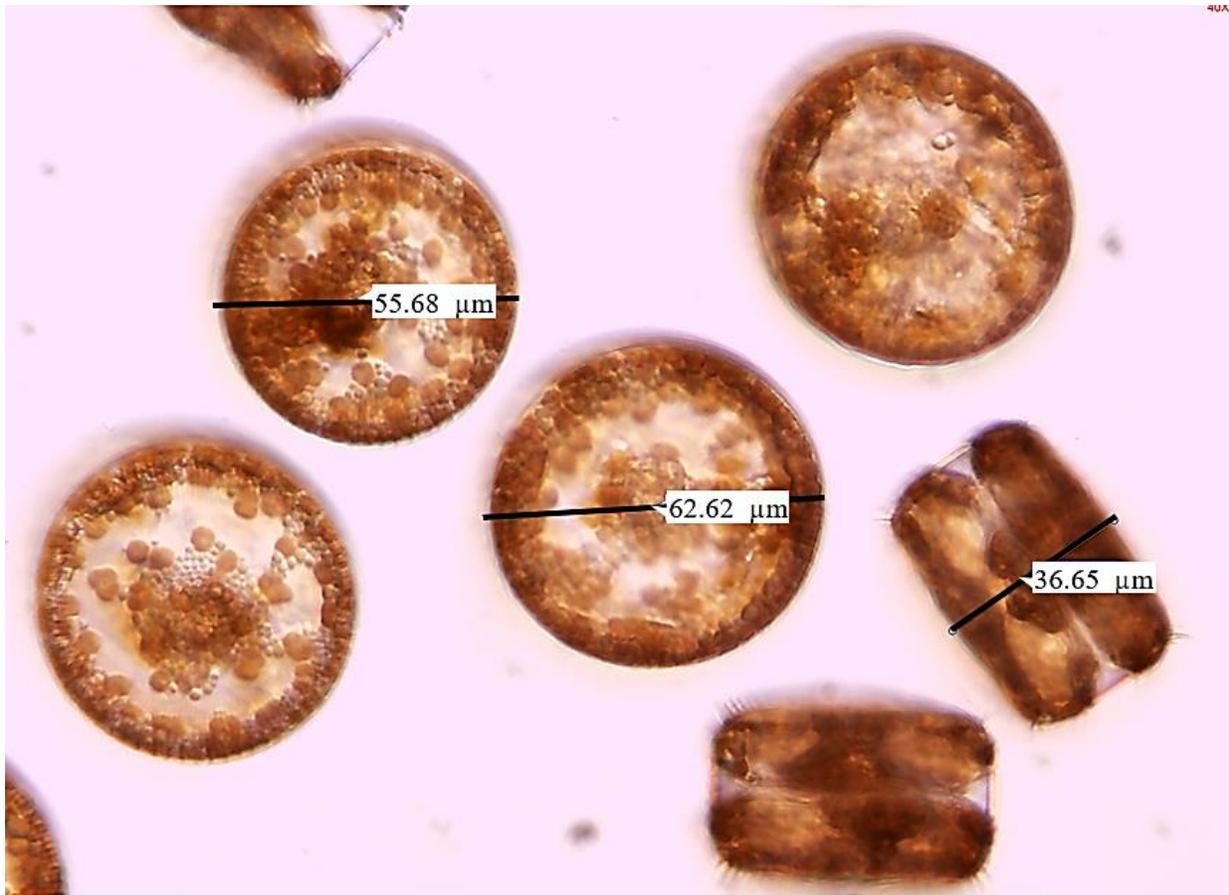
Características micromorfológicas y salinidad de los lagos donde habitan algunas de las morfoespecies estudiadas. Los guiones representan la información que no es proporcionada por los autores en las descripciones de los taxones.

Morfoespecie	<i>S. hantzschii</i> (Grunow)	<i>D. pseudostelligera</i> (Hustedt)	<i>D. woltereckii</i> (Hustedt)	<i>C. choctawhatcheeana</i> (Prasad)	<i>C. scaldensis</i> (Muylaert y Sabbe)	<i>C. cryptica</i> (Reimann, Lewin y Guillard)
Autor de la descripción	Hakansson (2002)	Guerrero y Echenique (2006)	Guerrero y Echenique (2006)	Prasad y Nienow. (2006)	Muylaert y Sabbe (1996)	Schultz (1971)
Diámetro (µm)	5-30	05-8	6.5-7.5	03-10	16-34	5.2-9.4
Estrías/ 10µm	Hileras de areolas	20-24 completa disposición estrellada de estrías	20-22 zona central de la valva no ornamentada	24-30	07-nov	7-9 marginales
Ubicación de las fp.	Manto	En la unión de la cara/manto	En la unión de la cara/manto	En el manto	Cerca del margen valvar	Anillo de fp. marginales, entre la cara y el manto
Patrón de las fp.	1 fp. Debajo de cada 3-5 espinas	5 a 8 fp. cada 4 a 7 estrías	5 a 6 fp. cada 6 a 7 estrías	1 fp. cada segunda o tercer interstria	1 fp. cada segunda, tercer o cuarta interstria.	1 fp. cada interstria
Abertura exterior de la fp.	aberturas engrosadas	Abertura larga tubular bifurcada	Abertura larga tubular bifurcada	Circular con un borde grueso	-	Como pequeños tubos
# Poros satelitales	3	2	-	2	3	3
Forma de la abertura externa de la rp.	1 rp. con una extensión tubular externa	La abertura no es distinta	-	-	1 rp. Con abertura noduliforme	como un tallo corto, orientado radialmente o ligeramente oblicuo
Posición de la rp.	Entre las espinas	En el manto	En el manto	En el manto	Debajo del anillo de fp. marginales	Ocupa el lugar de alguna fp.
Espinas	Sí, en la unión cara/manto	No	No	No	Sí, debajo de las aberturas de algunas fp.	No
Registro de var. fenotípica	No	Sí, la ornamentación de la valva depende de la disponibilidad de nutrientes. (Houk et al., 2010).	Sí pocos nutrientes promueven la semejanza con <i>D. pseudo</i> . (Houk et al., 2010).	No	No	Sí, con 1.4% de salinidad despliega morfología de <i>C. meneg.</i> (Hevia-Orube, et al., 2016)
Salinidad del lago	-	-	-	-	-	-

Anexo 8. Recopilación de fotografías por microscopía electrónica de barrido, de la cara externa de la valva, obtenidas de las descripciones de los taxones. Barras de escala: A) 1µm (izquierda) y 2µm (derecha); B) 2µm; C) 2µm; D) 1µm; E) 5 µm; F) 1µm.

Morfoespecie	<i>S. hantzschii</i> Hakansson (2002)	<i>C. pseudostelligera</i> Guerrero y Echenique (2006)	<i>D. woltereckii</i> Guerrero y Echenique (2006)
Fotografía	 <p>A</p>	 <p>B</p>	 <p>C</p>
Morfoespecie	<i>C. cryptica</i> Schultz (1971)	<i>C. scaldensis</i> Muylaert y Sabbe (1996)	<i>C. choctawhatcheeana</i> Prasad y Nienow. (2006)
Fotografía	 <p>D</p>	 <p>E</p>	 <p>F</p>

Anexo 9. Fotografía de *C. alchichicana*, tomada con microscopio óptico a un aumento de 40×. Las fotografías se tomaron con microscopio Leica® DMLB2 y una cámara digital Motic Imagic plus 2.0®, con una resolución de 2088 x 1550 pixeles en un formato de mapa de bits (*.bmp).



Anexo 9. Fotografía de *C. alchichicana*, tomada con microscopio óptico a un aumento de 20×. Las fotografías se tomaron con microscopio Leica® DMLB2 y una cámara digital Motic Imagic plus 2.0®, con una resolución de 2088 x 1550 píxeles en un formato de mapa de bits (*.bmp).

