



# UNIVERSIDAD DEL MAR

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

VALIDACIÓN DE ESPECIES FORMADORAS DE RODOLITOS (RHODOPHYTA:  
CORALLINOPHYCIDAE) EN LAS PLAYAS TIJERA, LA ENTREGA E ISLA CACALUTA,  
HUATULCO, OAXACA

### TESIS

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

### MAESTRÍA EN CIENCIAS: ECOLOGÍA MARINA

#### PRESENTA

Biol. Mar. Jesús Marino Antonio Sánchez

#### DIRECTOR

Dra. Valentina Isla Villanueva

#### CO-DIRECTOR

Dr. Edgar Francisco Rosas Alquicira

Puerto Ángel, Oaxaca, México

Octubre de 2019

## Índice

<b>Resumen</b>	iv
<b>Abstract</b>	v
<b>Dedicatorias</b>	vi
<b>Agradecimientos</b>	vii
<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Marco teórico</b>	2
2.1. Importancia ecológica	2
2.2. Aspectos biológicos	3
2.3. Sistemática de algas rojas coralinas formadoras de rodolitos	5
2.4. Problemas taxonómicos	10
2.5. Marcadores moleculares	11
<b>3. Antecedentes</b>	13
<b>4. Justificación</b>	15
<b>5. Hipótesis</b>	16
<b>6. Objetivos</b>	16
6.1. General	16
6.2. Específicos	16
<b>7. Material y métodos</b>	16
7.1. Área de estudio	16
7.2. Trabajo de campo	19
7.3. Trabajo de laboratorio	19
7.3.1. Determinación de las formas de crecimiento	19
7.3.2. Determinación taxonómica mediante análisis anatómico	19
7.3.3. Determinación taxonómica mediante análisis molecular	21
7.3.3.1. Extracción de ADN	21
7.3.3.2. Técnica de PCR	24
7.3.3.3. Selección de primers	24
7.3.3.4. Estandarización y amplificación por PCR	25
7.3.3.5. Control de calidad	27
7.3.3.6. Reconstrucción filogenética	28

<b>8. Resultados</b>	29
8.1. Determinación de las formas de crecimiento	29
8.2. Determinación taxonómica mediante análisis anatómico	29
8.3. Determinación taxonómica mediante análisis molecular	34
8.3.1. Extracción de ADN	34
8.3.2. Estandarización y amplificación por PCR	35
8.3.3. Análisis de secuencias	36
8.3.3.1. Reconstrucción filogenética con el marcador molecular <i>COI</i>	38
8.3.3.2. Reconstrucción filogenética con el marcador molecular <i>psbA</i>	42
<b>9.- Discusión</b>	47
9.1. Determinación taxonómica mediante análisis anatómico	47
9.2. Determinación taxonómica mediante análisis molecular	52
9.2.1. Extracción de ADN	52
9.2.2. Análisis de secuencias	53
9.2.2.1. Reconstrucción filogenética con el marcador molecular <i>COI</i>	53
9.2.2.2. Reconstrucción filogenética con el marcador molecular <i>psbA</i>	54
9.3. Distribución de la especie nominal <i>Lithothamnion muelleri</i>	55
<b>10.- Conclusión</b>	57
<b>11. Referencias</b>	58
<b>12. Anexos</b>	73

## Resumen

Los rodolitos juegan un rol ecológico importante en el medio marino, además de tener una importancia económica para los seres humanos. La clasificación de las especies conformadoras de rodolitos tiene grandes retos debido a la plasticidad fenotípica de los mismos y a la falta de caracteres anatómicos útiles en la segregación de taxones. Hoy en día a fin de resolver este problema, los investigadores han optado por conjuntar métodos morfológicos, histológicos y genéticos. El presente trabajo pretende conjuntar los tres métodos antes mencionados para poder validar la presencia de especies conformadoras de rodolitos en la región del Pacífico Sur de México. En total se recolectaron 69 muestras de las playas Tijera, La Entrega e Isla Cacaluta, Oaxaca. El análisis morfológico mostró que la forma de crecimiento fruticosa es la más abundante, seguida de la forma incrustante y grumosa, por otro lado, el análisis anatómico determinó que la especie conformadora de rodolitos es *Lithothamnion* cf. *muelleri*. La reconstrucción filogenética usando el marcador molecular *psbA*, determinó que la especie descrita en este estudio, es muy diferente a la secuencia no publicada denominada "*Lithothamnion muelleri*", por Hernández-Kantún. De igual forma, no podemos asumir que *L. cf. muelleri*, pertenezca a la especie nominal, debido a que no se comparó con alguna secuencia del lectotipo o material topotipo. Por otra parte, la distribución de *L. cf. muelleri* es amplia a lo largo de las costas del Pacífico Oriental Tropical, ya que genéticamente se asemeja a *Lithothamnion* sp. descrita para las costas de Panamá por Richards *et al.* (2016).

### Palabras clave

Coralinas no geniculadas, *COI*, *Lithothamnion muelleri*, *Lithothamnion* sp., *psbA*, sistemática.

## Abstract

Rhodoliths play important ecological role in the marine environments, and also have economic importance for human beings. The classification of rhodolith-forming species has great challenges due to their phenotypic plasticity and the lack of anatomical characters that could be useful in the segregation of taxa. Nowadays, in order to solve this problem, researchers have chosen to combine morphological, histological and genetic methods. The present work aims to combine these three methods to validate the presence of rhodolith forming- species in the Southern Mexican Pacific. Sixty nine samples were collected from Tijera and La Entrega beaches along with Cacaluta Island, in the central coast of Oaxaca. Regarding the morphological results, the fruticose growth form was the most abundant, followed by the lumpy and incrusting growth forms. Regarding the anatomical analysis, it was determined that *Lithothamnion* cf. *muelleri* is the rhodolith-forming species, while in the phylogenetic reconstruction with the *psbA* gene, the species described in this study did not match the unpublished sequence "*Lithothamnion muelleri*", by Hernández-Kantún. We cannot assume that *L. cf. muelleri*, belongs to the nominal species, because it was not been compared to any lectotype or topotype sequence. On the other hand, the distribution of *L. cf. muelleri* seems to be widespread along the coasts of the Eastern Tropical Pacific, since it genetically resembles *Lithothamnion* sp. described for the coasts of Panama for Richards *et al.* (2016).

## Keywords

Coralline non geniculate, *COI*, *Lithothamnion muelleri*, *Lithothamnion* sp., *psbA*, systematic.

## Dedicatoria

A mi madre

a mis hermanos José, Mariano y Pedro

a mis sobrinos Yorel, Kevin, Ángel y Pedrito

a mis perrunos Haru y Horus

En especial a Susi, por apoyarme cuando más lo necesito, por extender su mano en momentos difíciles y por el respaldo brindado cada día, de verdad mil gracias.

## Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico otorgado como becario (No. 791486) y al proyecto de “Biodiversidad nomenclatural y taxonómica del género *Amphiroa* Lamouroux (Corallinales, Rhodophyta) en el sur del Pacífico Tropical Mexicano”, financiado por SEP-CONACYT (2010), por la compra de reactivos y material de laboratorio.

Agradezco a los miembros del comité tutorial por dirigir el presente estudio con sus comentarios y sugerencias.

A la Dra. Valentina Islas Villanueva por su participación durante todo el desarrollo de este trabajo, por haberme transmitido parte de sus conocimientos sobre genética, por su paciencia, tiempo, entrega y regañones, que, sin ellos, este trabajo no hubiera sido posible. Y sobre todo por el haberse aventurado en el mundo de los rodolitos.

Al Dr. Edgar F. Rosas Alquicira por introducirme en el maravilloso mundo de los rodolitos, por sus consejos, enseñanzas, pero sobre todo mil gracias por su cariño y amistad.

A la Dra. Cindy Fernández García (CIMAR-Costa Rica) por los comentarios y correcciones, que hicieron de este proyecto, un mejor trabajo de tesis.

A la Dra. Elizabeth Labastida Estrada por haber aceptado ser revisor de este proyecto, por las correcciones y comentarios que hicieron de este, un mejor trabajo.

Al Dr. Luis David Maldonado Bonilla por los comentarios, correcciones y por el tiempo dedicado para mejorar este trabajo.

A los Laboratorios de Histología y Genética de la Universidad del Mar campus Puerto Ángel, por haber permitido la realización de este proyecto. A los técnicos Pau y Edgar por facilitarme el préstamo de material solicitado.

A la M. en C. Karlita, técnica del laboratorio de Bioquímica, Inmunología y Biología Molecular de la unidad Sisal, UNAM, por recibirme y permitirme realizar las extracciones de ADN, por sus consejos, sugerencias y tips, para lograr los objetivos de este trabajo.

A buceo Huatulco y en especial a Virgilio, por haberme apoyado en la recolecta y preservación de los ejemplares.

A las chicas del equipo de genética de la UMAR, Aurora, Gio y Dulce por el apoyo en el aprendizaje de extracción de ADN y PCR.

A tod@s y cada una de las personas que formaron parte de este proceso.

A mis amigos incondicionales Mafer, Maguito, Jessi y Raúl.

A mi familia, que siempre me apoya en las decisiones de mi vida. A mi madre que siempre me dio grandes consejos, para poder superarme en la vida. En donde quiera que estés muchas gracias mamá.

## 1. Introducción

Los rodolitos son algas rojas coralinas pertenecientes al filo Rhodophyta. Estas algas se caracterizan porque incorporan carbonato de calcio en sus paredes celulares y por ser epilíticas, epizoicas o epifíticas (Foster *et al.* 2007). Se distribuyen en todos los océanos del mundo, pero son mayormente estudiadas en aguas del Atlántico, específicamente en el Mediterráneo y en las costas de Brasil. En las costas del Pacífico oriental se distribuyen principalmente en el Golfo de California, en donde pueden formar mantos o agregaciones, aunque también se distribuyen desde Nayarit hasta Panamá (Robinson 2013).

Los rodolitos presentan un rol ecológico muy importante en el ambiente, por lo que actualmente son objetos de estudios, en varias regiones del planeta (Foster *et al.* 2007, Hinojosa-Arango & Riosmena-Rodríguez 2004, Harvey *et al.* 2007, Littler & Littler 2008, Steller *et al.* 2003). El nombramiento o clasificación de las especies formadoras de rodolitos es uno de los mayores retos que tienen los investigadores, ya que estos organismos presentan un alto grado de plasticidad fenotípica (Broom *et al.* 2008, Hernández-Kantún *et al.* 2015, Richards *et al.* 2014, 2016). Esta problemática se ha observado desde los tiempos de Linneo, en donde las algas rojas coralinas se clasificaban por la forma y coloración, llegando así a confundirlas con corales. Una solución a esto fue incluir caracteres anatómicos; sin embargo, para muchos de los casos, se requiere encontrar estructuras reproductivas fértiles, lo cual no siempre es posible. Por los problemas antes mencionados, los taxónomos en las últimas décadas han incluido a la genética como una herramienta de apoyo para la identificación y clasificación de las especies de algas rojas coralinas.

El poder dilucidar la riqueza de especies en un lugar determinado, permitirá sentar bases sólidas para futuras investigaciones paleoambientales, filogeográficas, ecológicas entre otras. Por lo tanto, en el presente trabajo, se pretende aplicar el análisis de caracteres morfológicos, anatómicos y genéticos, para determinar la composición de las especies formadoras de rodolitos en el área de estudio.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Importancia ecológica

Los rodolitos actúan como especies bioconformadoras de ecosistemas marinos debido a que son un sustrato disponible para anidación, reproducción y alimentación de invertebrados o vertebrados (Hall-Spencer *et al.* 2006, Foster *et al.* 2007). Asimismo, los rodolitos conforman un sustrato al que se sujeta una gran diversidad de flora (Foster *et al.* 2007, Amado-Filho *et al.* 2010).

Por otro lado, los rodolitos presentan un rol importante en el océano debido al considerable aporte de materia orgánica e inorgánica. Sobre materia inorgánica, los rodolitos aportan principalmente carbonato de calcio, un compuesto que podrá pasar a formar parte del ciclo de la biomineralización o al sedimento marino (Johansen 1981, Littler *et al.* 1991, Riosmena-Rodríguez *et al.* 2007). De igual forma, los rodolitos son excelentes asimiladores de dióxido de carbono, mismo que utilizan para el proceso de calcificación (Littler *et al.* 1991). Por su lento crecimiento y un periodo de vida mayor a 100 años, son considerados como indicadores paleoambientales (Foster 2001).

Por los servicios ecológicos antes mencionados, los rodolitos son considerados como especies fundamentales y forman parte de las grandes comunidades bentónicas como los bosques de quelpos y praderas de pastos marinos (Foster *et al.* 2007).

El principal uso que se le da a los rodolitos es la extracción de carbonato de calcio (Johansen 1981, Riosmena-Rodríguez *et al.* 2007), el cual es utilizado para el encalado de las tierras agrícolas, como aditivo alimenticio de animales, en la síntesis de filtros de depuradoras, en la aplicación de productos cosméticos y como suplemento alimenticio (López-Benito 1963). Por otra parte, los rodolitos y comunidades asociadas son consideradas como sensibles a disturbios antropogénicos (Kamenos *et al.* 2004, Hall-Spencer *et al.* 2006, 2010, Peña & Bárbara 2008, Peña *et al.* 2014a), tales como la pesca de arrastre, los amarres con cadenas, los fondeos no regulados (Hall-Spencer & Moore 2000, Bordehore *et al.* 2003, Steller *et al.* 2003), la eutrofización, la contaminación de metales pesados, la acuicultura y la presencia de especies invasoras (Peña & Bárbara 2007).

## 2.2. Aspectos biológicos

Los rodolitos son algas rojas coralinas completamente calcificadas que presentan en su interior un núcleo sólido compuesto de roca, coral u otras algas coralinas (Irvine & Chamberlain 1994, Foster 2001, Harvey & Woelkerling 2007). Para nombrar a un organismo como rodolito, la superficie del núcleo debe estar cubierta con al menos 50% de algas rojas coralinas no geniculadas (algas que no presentan zonas de articulación o están completamente calcificadas) (Foster 2001). Morfológicamente los rodolitos pueden ser esféricos a elípticos y/o tener una forma de crecimiento incrustante, fruticosa, foliosa, grumosa y/o verrugosa, o la combinación de algunas de las previamente enlistadas (Fig. 1) (Harvey *et al.* 2005).

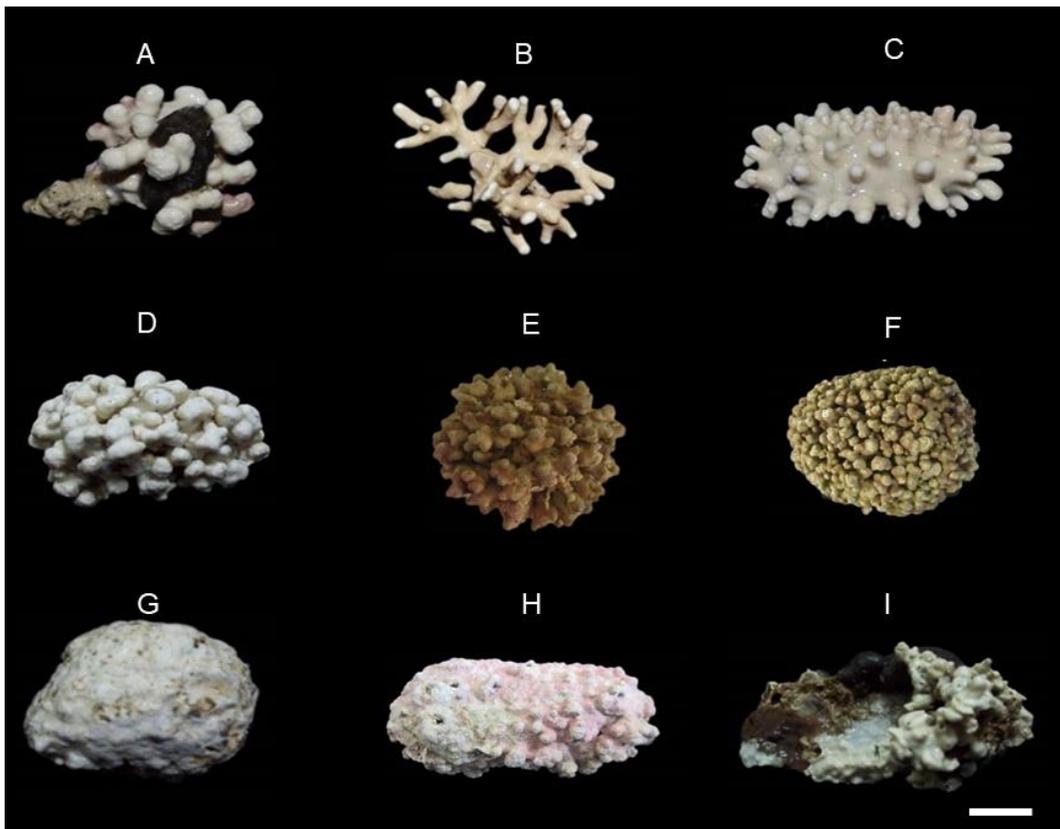


Figura 1.- Formas de crecimiento encontradas en rodolitos del Pacífico Sur de México. A-F. fruticosa; G. incrustante; H. incrustante a fruticosa; G. verrugosa. La barra de escala representa 10 mm.

Los rodolitos al no presentar estructuras de fijación se les considera como organismos de vida libre, característica que les permite ser movidos por las corrientes,

el oleaje y/o por otros organismos (bioturbación) (Foster 2001). Se distribuyen en todos los océanos del mundo pues son capaces de resistir diferentes condiciones ambientales (Aguirre *et al.* 2002). La gran capacidad de dispersión y resistencia que presentan las esporas del grupo es otro factor que favorece a su amplia distribución (Bittner *et al.* 2010). Latitudinalmente habitan desde los trópicos hasta las regiones polares (Foster 2001). De igual forma, se encuentran en costas arenosas, praderas de pastos marinos, en arrecifes tropicales y en los lechos marinos (Harvey *et al.* 2005). Por otra parte, el rango de distribución vertical abarca desde la zona intermareal hasta profundidades superiores a los 200 m (Foster 2001).

La reproducción de las especies formadoras de rodolitos, al igual que en otras especies de algas rojas de la clase Florideophyceae, presentan un ciclo de vida trifásico. En la fase I, diploide esporangial (fase asexual), se producen tetra o biesporas vía meiosis o mitosis, respectivamente; durante la fase II, haploide gametangial (fase sexual), se forman los espermatangios en el conceptáculo masculino y carpogonios en el conceptáculo femenino. Durante la fase III, diploide carposporangial (fase sexual) parásita del gametofito femenino, se originan carposporas vía mitosis (Fig. 2). En algunos casos se observa la reproducción asexual vía fragmentación (Woelkerling 1988).

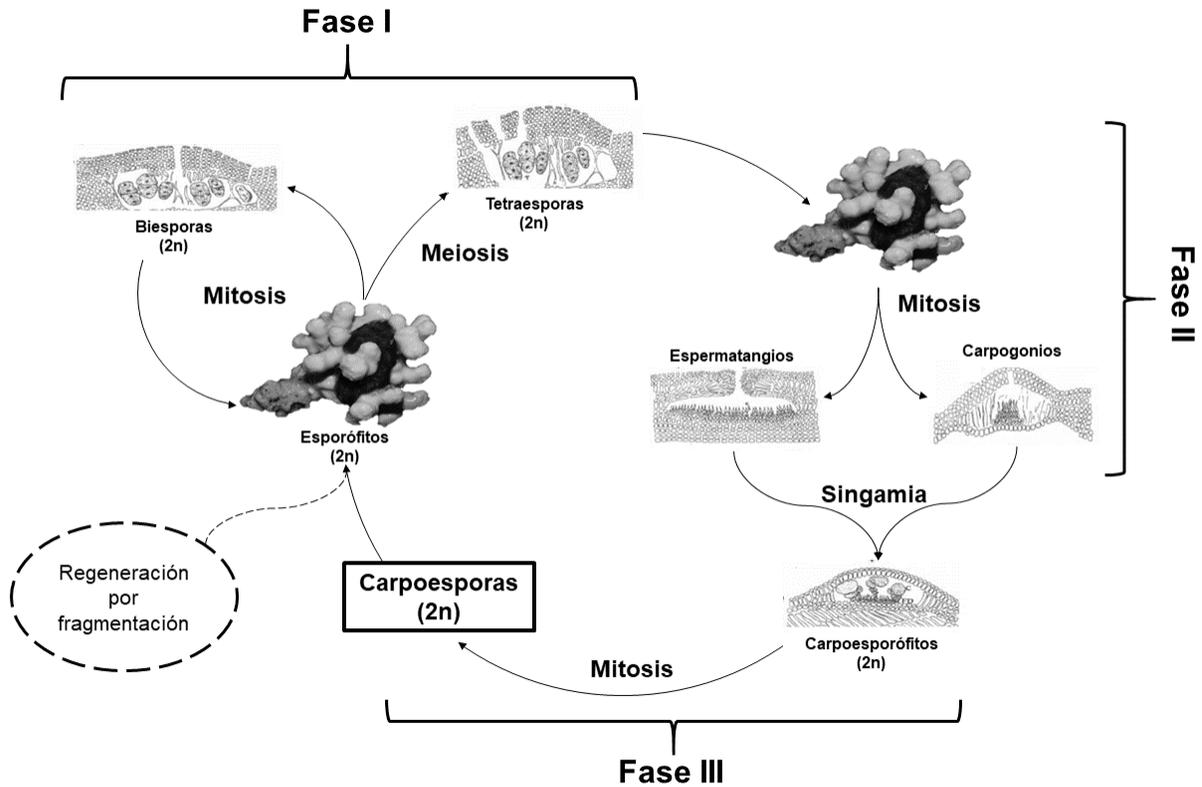


Figura 2.- Ciclo de vida trifásico representativo de especies de algas rojas coralinas formadoras de rodolitos. En el ciclo se considera tanto la vía sexual (gametofítica/carpoesporofítica) como la vía asexual (esporofítica y fragmentación) para la generación de talos algales. Esquemas modificados de Rosas-Alquicira (2002). Las fotografías pertenecen al rodolito 6T del herbario de la Universidad del Mar.

### 2.3. Sistemática de algas rojas coralinas formadoras de rodolitos

Los rodolitos pertenecen a la subclase Corallinophycideae Le Gall & G. W. Saunders, 2007, y esta se caracteriza por presentar conexiones celulares pits secundarias (conexiones entre células de dos filamentos adyacentes) o fusiones celulares (fusión de una célula con otra adyacente), conceptáculos en forma de cúpula y esporangios zonados o cruzados (Le Gall & Saunders 2007). Dentro de la subclase Corallinophycideae se encuentran los órdenes Corallinales P.C. Silva & H.W. Johansen 1986, Hapalidiales Nelson *et al.* 2015 y Sporolithales Le Gall & G. W. Saunders en Le Gall *et al.* 2010.

El orden Corallinales engloba a la familia Corallinaceae J. V. Lamouroux 1812; mientras que el orden Hapalidiales a la familia Lithothamniaceae H. J. Haas, 1886, y a la

familia Mesophyllaceae Athanasiadis, 2016, finalmente el orden Sporolithales a la familia Sporolithaceae Verheij, 1993. Los caracteres distintivos para las familias se presentan en la tabla I.

Tabla I.- Caracteres segregativos asociados a los conceptáculos tetra o biesporangiales de las familias formadoras de rodolitos pertenecientes a la subclase Corallinophycideae. Modificado de Harvey *et al.* (2005).

<b>Familia</b>	<b>Tipo de conceptáculo/ compartimento</b>	<b>Tipo de esporangio</b>	<b>Presencia o ausencia de tapón en el canal del poro del conceptáculo esporangial</b>
Corallinaceae	Uniporado	Zonado	Ausente
Lithothamniaceae	Multiporado	Zonado	Presente
Mesophyllaceae	Multiporado	Zonado	Presente
Sporolithaceae	Compartimentos calcificados	Cruzado	Presente

En el mundo se han registrado ocho géneros formadores de rodolitos (Tabla II). La clasificación de los géneros se basa en caracteres anatómicos vegetativos y reproductivos. Entre los caracteres vegetativos, se tienen: a) Presencia de conexiones intercelulares, tales como conexiones pit secundarias y/o fusiones celulares; b) forma de la pared distal de las células epiteliales (redondas, aplanadas o en forma de tazón) y c) tamaño de las células subepiteliales con respecto a las células consecutivas (iguales, más cortas o más largas) (Fig. 3) (Womersley 1994, Harvey & Woelkerling 2007).

Tabla II.- Clasificación general de los géneros de algas rojas coralinas no geniculadas formadoras de rodolitos (Guiry & Guiry 2019).

---

Filo Rhodophyta Wettstein, 1901

Subfilo Eurhodophytina G.W.Saunders & Hommersand, 2004

Clase Florideophyceae Cronquist, 1960

Subclase Corallinophycidae Le Gall & G. W. Saunders, 2007

Orden Corallinales P. C. Silva & H. W. Johansen, 1986

Familia Corallinaceae J. V. Lamouroux, 1812

Subfamilia Hydrolithoideae A. Kato & M. Baba in A. Kato *et al.*, 2011

Género *Hydrolithon* (Foslie) Foslie, 1909

Subfamilia Lithophylloideae Setchell, 1943

Género *Lithophyllum* Philippi, 1837

Subfamilia Porolithoideae A. Kato & Baba in Kato *et al.*, 2011

Género *Spongites* Kützing, 1841

Subfamilia Neogonolithoideae A. Kato & M. Baba in Kato *et al.*, 2011

Género *Neogonolithon* Setchell & L. R. Mason, 1943

Orden Hapalidiales Nelson *et al.*, 2015

Familia Lithothamniaceae H. J. Haas, 1886

Género *Lithothamnion* Heydrich, 1897

Género *Phymatolithon* Foslie, 1898

Familia Mesophyllaceae Athanasiadis, 2016

Género *Mesophyllum* Me. Lemoine, 1928

Orden Sporolithales Le Gall *et al.*, 2010

Familia Sporolithaceae Verheij, 1993

Género *Sporolithon* Heydrich, 1897

---

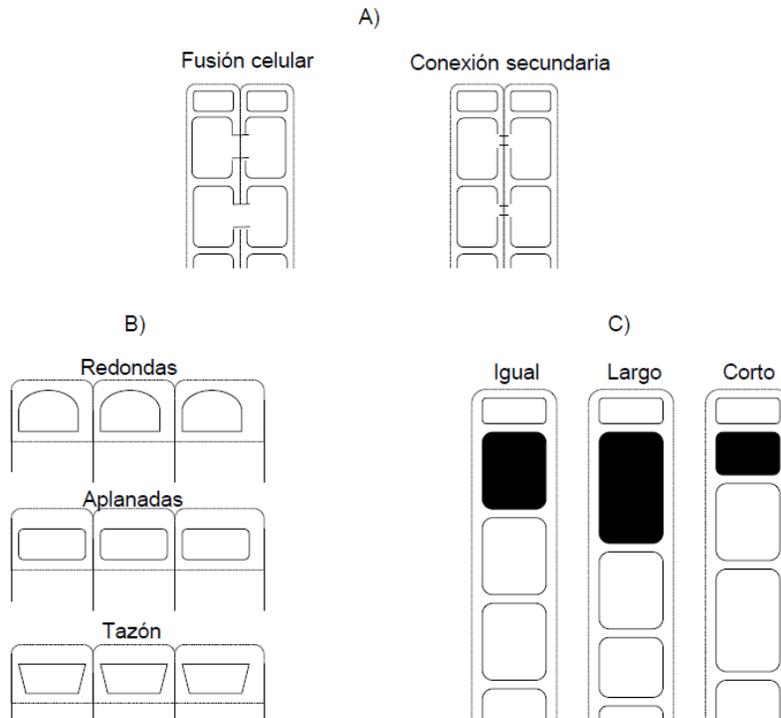


Figura 3.- Caracteres vegetativos utilizados en la determinación de géneros de algas rojas coralinas no geniculadas formadoras de rodolitos. A) Tipos de conexiones intercelulares. B) Morfología de las paredes distales de las células epiteliales. C) Tamaño de células subepiteliales iniciales con respecto a las células subsecuentes. Modificado de Harvey & Woelkerling (2007).

Los caracteres reproductivos para la determinación genérica de los rodolitos son: a) tipo de conceptáculo esporangial (uniporado, multiporado o compartimentos calcificados) y b) tipo de división en los tetraesporangios (cruzados o zonados). En los conceptáculos uniporados esporangiales, se deberá observar el tipo de arreglo de las células que rodean el poro (Womersley 1994, Harvey & Woelkerling 2007). En conceptáculos masculinos se tiene que confirmar, si los filamentos espermatangiales son ramificados o no (Fig. 4) (Harvey & Woelkerling 2007).

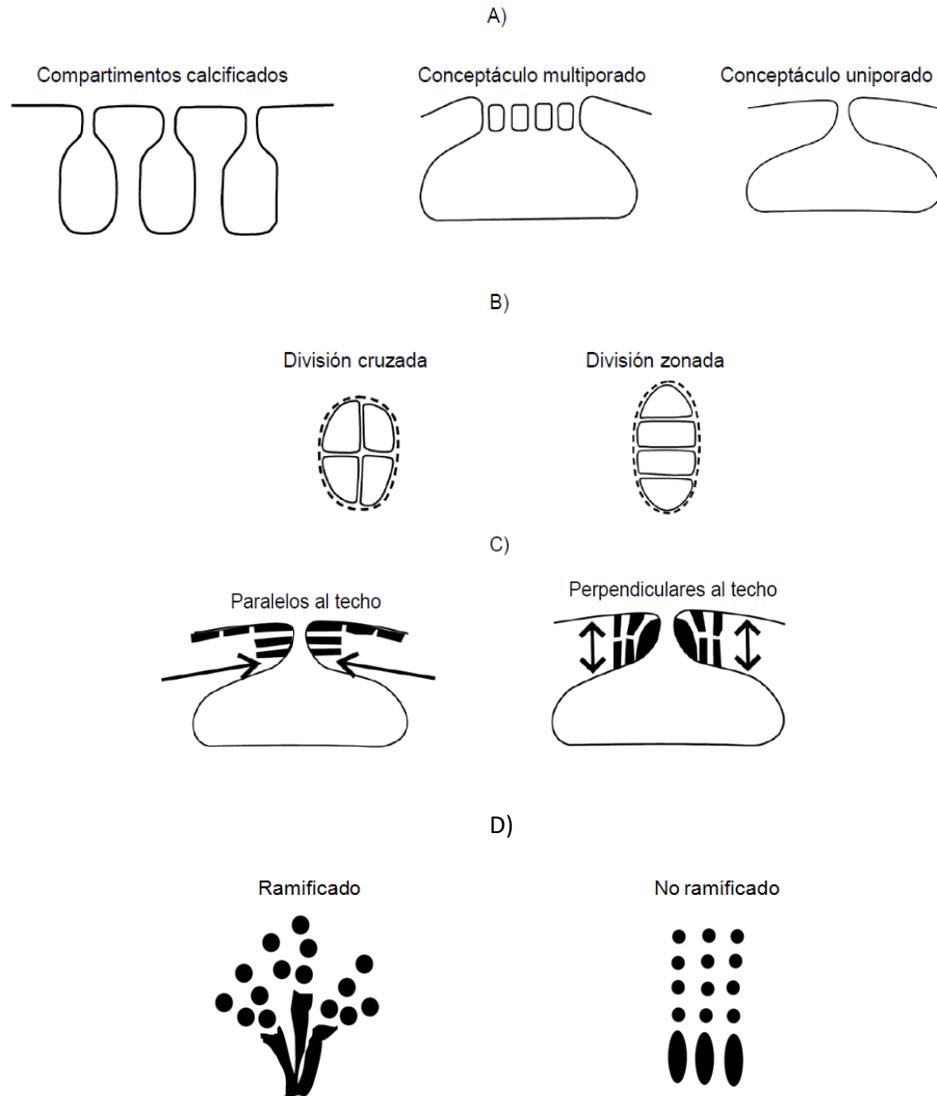


Figura 4.- Caracteres reproductivos para la determinación de los géneros de algas rojas coralinas no geniculadas formadoras de rodolitos. A) Cámaras reproductivas. B) Tipos de tetrasporangios. C) Dirección de las células que revisten el canal del poro del conceptáculo tetrasporangial uniporado. D) Filamentos gametangiales masculinos. Modificado de Harvey & Woelkerling (2007).

A nivel de especie también se tiene un conjunto único de caracteres anatómicos vegetativos y reproductivos que permiten diferenciar taxones (Harvey *et al.* 2005). Es importante mencionar que un rodolito puede estar conformado por una o varias especies de algas rojas coralinas no geniculadas (Richards *et al.* 2014).

#### 2.4. Problemas taxonómicos

Las especies de algas rojas coralinas son de difícil identificación debido a un alto grado de plasticidad fenotípica como respuesta a factores ambientales (Hernández-Kantún *et al.* 2015), una convergencia acelerada y a historias de vida entendidas incompletamente con alternancia de generaciones heteromórficas (Saunders 2005).

La descripción y clasificación de las especies de algas rojas coralinas ha tenido grandes problemas a lo largo del tiempo. Al principio se les consideraba como plantas, posteriormente Linneo las describió como animales, lo que inició un gran debate entre ficólogos y zoólogos. Este problema fue resuelto cuando se estudiaron a detalle sus estructuras reproductivas. El siguiente reto fue la clasificación de las algas rojas coralinas en niveles superiores. Primero se les consideró como una familia, la Corallinaceae, posteriormente se les colocó en un orden distintivo, las Corallinales, lo cual ha sido respaldado por estudios integrales que utilizaron técnicas morfológicas/anatómicas y moleculares (Harvey *et al.* 2005).

Las Corallinales en 1988, solo incluían a la familia Corallinaceae, pero en 1993 se incluyó a la familia Sporolithaceae y en 2003 se reconoció a la familia Hapalidiaceae. La separación de una familia en tres, estuvo respaldada por estudios morfológicos/anatómicos y moleculares (Harvey *et al.* 2003).

La clasificación de las algas rojas coralinas seguirá cambiando, con base en la adición de nuevos caracteres; sin embargo, aunque hoy en día se utilicen caracteres anatómicos reproductivos y vegetativos para la distinción de las especies de algas rojas coralinas, en algunas ocasiones los taxones determinados se consideran cuestionables. Un ejemplo de lo anterior, es el registro de especies en regiones biogeográficas muy distintas. Asimismo, algunos caracteres son complicados de encontrar ya que la identificación está limitada a especímenes fértiles (Broom *et al.* 2008). En este contexto, las herramientas moleculares proporcionan una alternativa para resolver las problemáticas antes planteadas (Broom *et al.* 2008). Por otra parte, no todos los materiales tipo han sido estudiados con herramientas histológicas y genéticas, lo que conlleva a una determinación imprecisa de las especies (Harvey *et al.* 2005). Por lo anterior, a fin de tener una mejor resolución de las especies los investigadores han

optado por revisar material tipo e histórico, así como de recolectas actuales utilizando herramientas moleculares (Gabrielson *et al.* 2011, Hind & Saunders 2013).

Entre los trabajos más recientes sobre la aplicación de marcadores moleculares en algas rojas coralinas se tienen el de Adey *et al.* (2015) y Hernández-Kantú *et al.* (2015, 2016), quienes utilizaron el marcador molecular que codifica para la subunidad D1 del centro de reacción del fotosistema II en el cloroplasto (*chloroplast-encoded photosystem II reaction center protein D1 gene, psbA* por sus siglas en inglés), al marcador molecular de la subunidad grande de la ribulosa-1, 5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (*ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene, rbcL* por sus siglas en inglés). Finalmente, en el trabajo de Richards *et al.* (2016) usaron los marcadores moleculares Citocromo C Oxidasa (*cytochrome oxidase subunit I, COI* por sus siglas en inglés) y *psbA*. En los estudios antes mencionados se determinó un alto grado de diversidad críptica en varios taxones y a su vez demostraron que al realizar solo estudios con análisis de caracteres anatómicos existía una subestimación de especies formadoras de rodolitos. Por lo que, a fin de tener una mejor resolución de la diversidad de especies presentes en una región, es recomendable un trabajo que contemple técnicas morfológicas, histológicas y genéticas.

En el Pacífico Sur de México (PSM), las especies reportadas que conforman a los rodolitos son *Lithophyllum frondosum* (Dufour) Furnari *et al.* 1996, *Lithothamnion muelleri* Lenormand ex Rosanoff 1866, *Phymatolithon* sp., *Phymatolithon lenormandii* (Areschoug) W.H. Adey 1966 y *Spongites fruticosus* Kützing 1841 (Dawson 1960, Fragoso & Rodríguez 2002, Peralta-García & Rosas-Alquicira 2014, Antonio-Sánchez 2015). No obstante, de acuerdo a Antonio-Sánchez (2015) las especies antes mencionadas, se consideran como cuestionables, debido a que la distribución de las especies tipo se encuentran muy alejadas del Pacífico Tropical Mexicano y no pertenecen a la región biogeográfica tropical.

## 2.5. Marcadores moleculares

Actualmente existen marcadores moleculares útiles para determinar la divergencia filogenética en especies de algas rojas coralinas. Algunos de los marcadores más usados son: el gen de la subunidad pequeña ribosomal 18S ó *SSU* (*small subunit of ribosomal*

*RNA*) y *COI* (Richards *et al.* 2014, 2016, Hernández-Kantún *et al.* 2014, Vieira-Pinto *et al.* 2014, Adey *et al.* 2015, Basso *et al.* 2015).

También se encuentran los códigos de barras de algas rojas coralinas. Entre los primeros trabajos para delimitar especies con estudios genéticos, se encuentra el de Broom *et al.* (2008) quienes proponen el uso del marcador *psbA*, para solucionar problemas filogenéticos en el orden Corallinales. Gabrielson *et al.* (2011) sugieren el uso de los marcadores moleculares *rbcl*, así como el gen *COI*, para delimitar especies y patrones filogeográficos en las algas coralinas geniculadas (Hernández-Kantún *et al.* 2014, 2015, 2016, Mateo-cid *et al.* 2014, Pardo *et al.* 2014, Peña *et al.* 2014b, 2015, Richards *et al.* 2014, 2016, Vieira-Pinto *et al.* 2014).

El marcador *COI* provee una mejor resolución filogenética comparada con cualquier otro gen mitocondrial (Knowlton & Weigt 1998). La evolución de este gen permite discriminar no sólo entre especies estrechamente relacionadas, sino también entre grupos filogeográficos dentro de una sola especie (Cox & Hebert 2001, Wares & Cunningham 2001). A pesar de que *COI* puede ser emparejado con otros genes mitocondriales en la resolución de casos de divergencia recientes, es más probable que este gen proporcione señales filogenéticas más profundas que otros genes (Simmons & Weller 2001). Lo anterior debido a que los cambios en los codones de *COI* son más lentos que cualquier otro gen mitocondrial (Lynch & Jarrell 1993).

El marcador molecular *psbA*, presenta poca variación genética, por lo que se ha utilizado para resolver relaciones filogenéticas en algas rojas a nivel de especie y de género (Seo *et al.* 2003, Yang & Boo 2004). Así mismo es un marcador molecular que se hereda uniparentalmente (Broom *et al.* 2008).

Finalmente, el marcador molecular *rbcl*, es un gen de la subunidad grande de la ribulosa-1, 5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, al igual que el *psbA* se hereda uniparentalmente y es usado mayormente para resolver relaciones genéricas (Soltis & Soltis 1998).

### 3. Antecedentes

El uso de herramientas moleculares en conjunto con la revisión de caracteres morfológicos y anatómicos, ha tenido gran auge en el estudio de la taxonomía y filogenia de algas rojas coralinas no geniculadas (Hernández-Kantún *et al.* 2014, 2015, 2016, Mateo-cid *et al.* 2014, Pardo *et al.* 2014, Peña *et al.* 2014b, 2014c, 2015, Richards *et al.* 2014, 2016, Vieira-Pinto *et al.* 2014). A continuación, se presentan los trabajos sobre taxonomía morfológica, anatómica y molecular realizados en algas rojas coralinas no geniculadas y ordenadas por provincias de acuerdo a Spalding *et al.* (2007).

En la provincia de Mares Europeos del Norte (MEN), en el archipiélago de Svalbard, Noruega, Islandia, Reino Unido, Francia, Irlanda, España, Portugal y el archipiélago Macaronésico, Pardo *et al.* (2014) utilizaron a los marcadores moleculares *psbA* y *COI* en conjunto con la revisión de caracteres morfológicos y anatómicos para concluir que, de las 16 especies reportadas, solo 13 eran válidas. Cabe mencionar que algunas afiliaciones genéricas fueron en función de los caracteres morfológicos y no hacen mención de los caracteres anatómicos utilizados para la segregación de especies.

Así mismo, en la provincia de MEN, Peña *et al.* (2014b, 2015) utilizaron el marcador *COI* para determinar qué, gametofitos no identificados de manera morfológica en las costas de Gran Bretaña corresponden a *Phymatolithon calcareum* (Pallas) W. H. Adey *et al.* 1986. Mientras que, en las costas de la península Ibérica, describieron a *Phymatolithon lusitanucum* como una nueva especie.

Por otra parte, en la provincia del Atlántico Cálido Templado del Noreste (ACTN), específicamente en las costas de Luisiana, Richards *et al.* (2014, 2016) utilizaron los marcadores *psbA*, *rbcL*, *COI* y *SSU*, así como caracteres morfológicos y anatómicos, para determinar a las especies de *Lithophyllum* y *Lithothamnion*. Los autores determinaron que *Titanoderma bermudense* (Foslie & M. Howe) Woelkerling *et al.* 1985 es una especie válida. Cabe mencionar que para ambos géneros solo se mencionan a los caracteres vegetativos para discriminar a las especies.

En la provincia del Atlántico Tropical Noroccidental (ATN), en el Golfo de México, Mateo-Cid *et al.* (2014) realizaron una reevaluación taxonómica del género *Neogoniolithon* Setchell & L. R. Mason 1943 con base en herramientas moleculares,

morfológicas e histológicas. Los autores determinaron 14 especies, de las cuales nueve habían sido registradas previamente mediante estudios anatómicos, así mismo confirmaron la presencia de *N. siankanensis* Mateo-Cid *et al.* 2014 y finalmente, las especies restantes fueron nuevas identificaciones. Los caracteres que usaron para segregar especies de *Neogoniolithon* son anatómicos vegetativos y reproductivos.

Para el Caribe, en la provincia de ATN, Hernández-Kantún *et al.* (2016) emplearon los marcadores *rbcl* y *psbA*, así como el análisis de caracteres morfológicos y anatómicos, confirmando así la presencia de *Lithophyllum kaiseri* (Heydrich) Heydrich 1897, *Lithophyllum kotschyanum* Foslie 1909, *Lithophyllum platyphyllum* (Foslie) Foslie 1900, *Lithophyllum pseudoplatyphyllum* y *Lithophyllum neocongestum*. Cabe mencionar que las especies *L. pseudoplatyphyllum* y *L. neocongestum* fueron determinadas como nuevas especies.

En la provincia del Océano Índico Occidental (OIO), Basso *et al.* (2014, 2015) analizaron caracteres anatómicos y en conjunto con el uso de los marcadores *LSU*, *COI* y *psbA* determinaron que de las tres especies previamente registradas para *Lithophyllum*: *L. kotschyanum*, *L. orbiculatum* (Foslie) Foslie 1900 y *L. okamurae* Foslie 1900; hay al menos seis especies más: *L. affine* (Foslie) Foslie 1898, *L. kaiseri*, *L. socotraense* Basso *et al.* 2015, *L. subplicatum* (Foslie) Basso *et al.* 2015, *L. subreduncum* (Foslie 1901) Caragnano *et al.* 2015 y *L. yemenense* Basso *et al.* 2015.

Robinson (2013) al realizar un análisis morfo-anatómico, reporta para la provincia del Pacífico Cálido Templado del Noreste (PCTN), a 10 especies formadoras de rodolitos incluyendo a *L. muelleri*. Por otra parte, para la provincia del Pacífico Tropical Oriental (PTO), reporta la presencia de *Lithophyllum stictaeforme* (Areschoug) Hauck 1877, para las costas del salvador; a *Lithophyllum okamurae* Foslie 1904 en Panamá; a *L. muelleri* para Nicaragua y Costa Rica; a *Lithoporella pacifica* (Heydrich) Foslie 1909 y a *Porolithon castellum* E.Y. Dawson 1960 para Costa Rica. Así mismo al utilizar el marcador *psbA*, corrobora la existencia de un patrón biogeográfico; mientras que al utilizar el marcador *LSU*, no logra determinar algún patrón. Por último, menciona que *L. muelleri* se distribuye desde Washington, Estados Unidos, hasta las costas del Pacífico de Costa Rica; sin embargo, para este último solo lo sustenta con análisis morfo-anatómico.

En particular, para las costas de Guerrero y Oaxaca en la provincia del PTO, hasta la fecha solo se han realizado estudios de identificación de especies formadoras de rodolitos con base en caracteres morfológicos y anatómicos. El número de especies formadoras de rodolitos citadas hasta el momento son cuatro. El primer registro fue realizado por Dawson (1960), quien menciona la presencia de *L. fruticosum* actual sinónimo homotipo de *S. fruticosus*, como una especie de vida libre, en la bahía de Petatlán, Guerrero y en Huatulco, Oaxaca.

Fragoso & Rodríguez (2002) registraron la presencia de *L. frondosum* en las playas de La Entrega y Puerto Escondido, Oaxaca y de *S. fruticosus* en las playas de Zihuatanejo, Guerrero y Bahías de Huatulco, Oaxaca. Peralta-García & Rosas-Alquicira (2014) registraron la presencia de *L. muelleri* y de *P. lenormandii* en la isla Cacaluta, Oaxaca y de las playas Manzanillo y Carey, Guerrero.

Finalmente, Antonio-Sánchez (2015), registró para las costas de Oaxaca a las especies *Phymatolithon* sp. y a *Lithothamnion* cf. *muelleri*, y mencionó que las especies *S. fruticosus*, *L. frondosum*, *L. muelleri* y *P. lenormandii* son consideradas cuestionables debido a que la distribución del material tipo de referencia son de regiones templadas distantes

#### **4. Justificación**

En las costas del PTO se reportan presencias de algas rojas coralinas no geniculadas formadoras de rodolitos, sin embargo, hasta la fecha se consideran cuestionables, debido a que las especies tipo se encuentran en otras regiones biogeográficas (i.e. *L. muelleri*). Por otra parte, la identificación de las especies mediante el análisis de caracteres morfológicos y anatómicos, presenta grandes retos, debido a la plasticidad fenotípica y a la dificultad de encontrar en los especímenes los caracteres segregativos citados en la literatura.

Por otra parte, las herramientas moleculares en conjunto con la taxonomía clásica han logrado discriminar especies y han proporcionado una mejor resolución de la biodiversidad. El presente estudio pretende tener una mejor resolución de la riqueza de especies de algas rojas formadoras de rodolitos, empleando análisis genéticos

mediante los marcadores *psbA* y *COI* junto con el análisis morfo-antibiótico. Este estudio enriquecerá el conocimiento respecto a las algas que se encuentran formando rodolitos en el área de estudio. La información aquí obtenida permitirá desarrollar futuros estudios taxonómicos y filogenéticos, tener mayor conocimiento, propuestas de conservación y uso sustentable de las especies.

## 5. Hipótesis

- Con base en los antecedentes para el Pacífico sur de México, se determinará que los rodolitos de playa Tijera, La Entrega e Isla Cacaluta, Oaxaca están compuestos principalmente por las especies *Lithothamnion muelleri*, *Phymatolihon lenormandii* y *Spongites fructiculosus*.

## 6. Objetivos

### 6.1. General

- Validar la identidad de las especies formadoras de rodolitos en las playas Tijera, La Entrega e isla Cacaluta, Oaxaca.

### 6.2. Específicos

- Determinar las especies formadoras de rodolitos con base en el análisis de caracteres morfológicos y anatómicos.
- Validar las especies determinadas por caracteres morfológicos y anatómicos mediante el análisis de código de barras genético.

## 7. Material y métodos

### 7.1. Área de estudio

El área de estudio incluye la playa La Entrega (15°44'34"N, 96°07'35"O), playa Tijera (15°40'50"N, 96°39'10"O) y la Isla Cacaluta (15°43'08.55"N, 96°09'44.74"O), Oaxaca (Fig. 5).

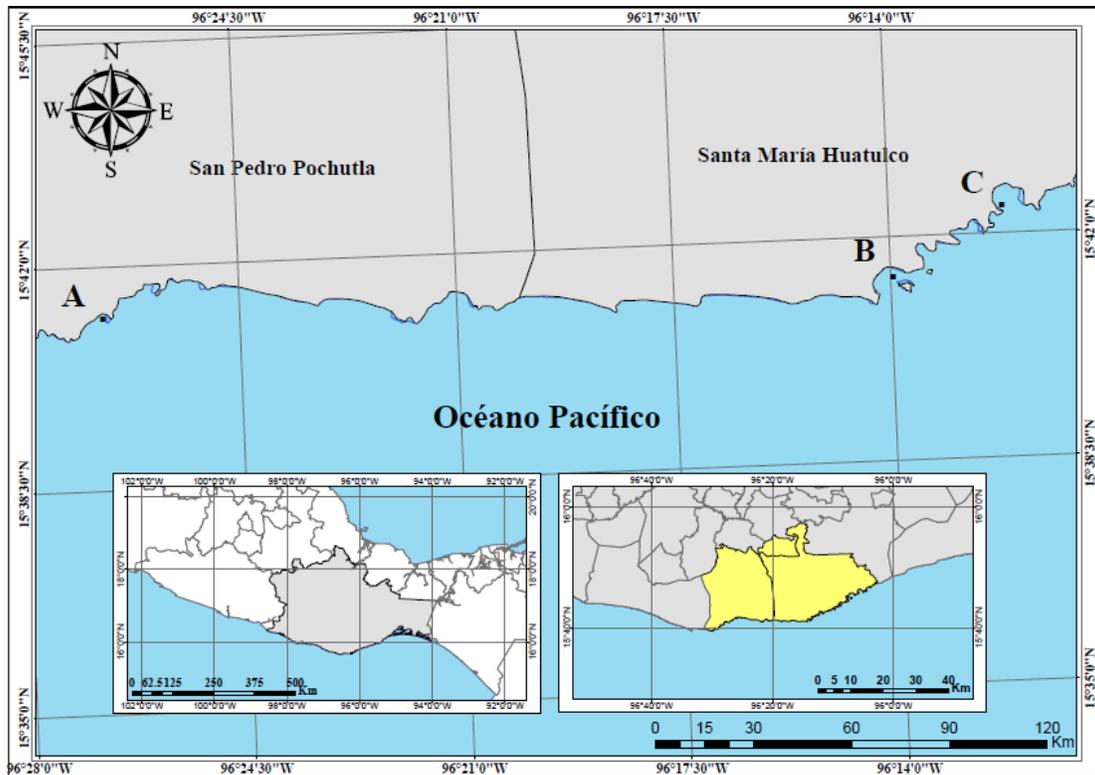


Figura 5.- Área de estudio. A) Playa Tijera, San Pedro Pochutla. B) Isla Cacaluta, Santa María Huatulco. C) La Entrega, Santa María Huatulco, Oaxaca.

Las localidades de muestreo se encuentran dentro del PTO, donde se presentan aguas cálidas del océano Pacífico (García 1989), la temperatura y salinidad del agua superficial varían dependiendo de las corrientes y de la velocidad de los vientos predominantes. La temperatura superficial promedio es de 28 °C con oscilaciones de 20.05 °C a 34 °C y una salinidad de 34.5 con oscilaciones de 33.5 a 43.5 (Kessler 2006, Pennington *et al.* 2006). En la zona litoral se observan mareas mixtas predominantemente semidiurnas y con amplitudes de 40 a 60 cm (Pacheco & Ayala 1991); sin embargo, el oleaje alcanza alturas medias de 2.4 m con una frecuencia de 10 a 20% durante el año (Carranza *et al.* 1988). La circulación costera en el área de estudio se encuentra poco estudiada. En eventos de tehuanos o vientos del norte, a partir de giros ciclónicos, se genera una corriente costera que transporta agua hacia el oeste (Chapa-Balcorta *et al.* 2015). Mientras que en invierno se genera una corriente con flujo hacia el este es decir hacia Salina Cruz (Barton *et al.* 2009). Las corrientes antes mencionadas, le dan una característica particular de salinidad y temperatura a la región

del Golfo de Tehuantepec (Fiedler 1992, Trasviña *et al.* 1999). Así mismo, los denominados tehuanos o vientos del norte (Kessler 2006) influyen en la cantidad de nutrientes en el área (Lavine *et al.* 1997).

La conformación del fondo marino en las tres localidades de estudio es de extensiones uniformes de arrecifes coralinos paralelos a la línea de costa y fondos arenosos con trozos de coral muerto (Edgar F. Rosas-Alquicira com. pers, Wicader & Monroe 2000).

De acuerdo a la clasificación climática de Köppen y modificada por García (SEDESOL 2013), el área de estudio se localiza en la región climática Pacífico sur de México, caracterizada por estar ubicada en la Zona Intertropical de Convergencia, con influencia del monzón de verano, ciclones tropicales, un régimen de lluvias de verano y muy escasa lluvia invernal (Gómez-Rojo *et al.* 2006). El clima predominante es tropical subhúmedo Aw0, es decir, cálido a muy cálido con temperaturas medias anuales mayores a 18°C, y que dentro de los climas subhúmedos se consideran el más seco.

Para el caso de las localidades de estudio, playa Tijera se caracteriza por la presencia de un sustrato arenoso grueso, de acantilados, de una pendiente moderada y una profundidad aproximada de 12 metros (Antonio-Sánchez com. pers.). Mientras que playa La Entrega, posee una playa arenosa fina (1.46 mm en la duna, 1.10 mm en el estrán y 0.53 mm a un metro de profundidad) (Mitchell-Arana 1994, SEMARNAT 2002). Asimismo, la localidad presenta una pendiente moderada y protegida por acantilados, las dimensiones que presenta son de 200 m de longitud y 35 m de ancho aproximadamente, el área resguarda uno de los arrecifes más extensos de la región (Leyte-Morales 2001). Finalmente, la Isla Cacaluta se caracteriza por tener una plataforma continental muy angosta con una fuerte pendiente (Wicader & Monroe 2000) y de un sustrato arenoso grueso, así como de una profundidad de 3 a 8 metros (Glynn & Leyte-Morales 1997). La isla está bajo la influencia de un río intermitente llamado Cacaluta, de cauce sinuoso que drena un área de 49 km<sup>2</sup> en temporada de lluvia (Gómez-Rojo *et al.* 2006). La bahía e Isla Cacaluta poseen uno de los sistemas arrecifales más importantes y mejor conservados de Oaxaca (Wicader & Moroe 2000).

## **7.2. Trabajo de campo**

La recolecta de los ejemplares se realizó en los meses de febrero, abril y octubre del 2017, en las localidades de Tijera, La Entrega e Isla Cacaluta y a profundidades que van de 6 a 30 m. En los muestreos se utilizaron equipos de buceo autónomo. Para la recolecta de los rodolitos se utilizaron bolsas de plástico, y a cada ejemplar recolectado se le colocó una etiqueta con los datos correspondientes: recolector, profundidad, localidad y fecha. Para su determinación, los rodolitos fueron llevados a los laboratorios de Histología y Genética de la Universidad del Mar, así como al de Bioquímica, Inmunología y Biología Molecular, en la Unidad Multidisciplinaria Sisal, Yucatán, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México.

## **7.3. Trabajo de laboratorio**

### **7.3.1. Determinación de las formas de crecimiento**

Los ejemplares fueron observados en un estereoscopio marca Zeiss modelo Discovery versión 8 y fotografiados con una cámara digital Carl Zeiss. Por último, las imágenes fueron procesadas en el programa Adobe Photoshop CS6 versión 13.0. Con el programa Axiovision versión 4.8, se tomaron las medidas de lo ancho y alto de las ramas, así como de la separación entre ellas. Para poder asignar el tipo de crecimiento se utilizó la nomenclatura propuesta por Harvey *et al.* (2005) y Woelkerling *et al.* (1993).

### **7.3.2. Determinación taxonómica mediante análisis anatómico**

En un estereoscopio Zeiss modelo Discovery V.8, se seleccionaron ramas que contaban con un mayor número de conceptáculos (protuberancias). Seguidamente se procedió a realizar la técnica histológica definida por Riosmena-Rodríguez *et al.* (1999) y modificado en Antonio-Sánchez *et al.* (2015).

Como primer paso se realizó la descalcificación. Las ramas reproductivas se colocaron en viales con ácido nítrico al 1.6 M durante un día con recambios cada hora. Posteriormente, el tejido descalcificado se tiñó con permanganato de potasio al 0.1%, durante un día y con recambios cada hora. Seguidamente se llevó acabo la deshidratación de los tejidos a diferentes concentraciones de alcoholes: 30%, 50%, 70%, 100% y alcohol butílico (diluido al 50% con alcohol etílico y al 100%) cada cambio

de concentración constó de 30 minutos, lo anterior mediante el uso de un Histoquinet (procesador automático de tejidos) marca Leica. Consecutivamente los tejidos se colocaron en un medio de inclusión tisular de parafina marca Paraplast Plus durante 12 horas a una temperatura de 60 °C, con dos cambios de parafina cada seis horas (Riosmena- Rodríguez *et al.* 1999).

Después se realizó la inclusión de los tejidos en un dispensador de parafina marca Leica. Los cubos resultantes fueron cortados a un grosor de 6 µm, en un micrótopo de rotación (marca Leica). Los tejidos se colocaron en un baño María a 40 °C durante un minuto y seguidamente sobre portaobjetos. Para eliminar el exceso de parafina en los tejidos, las laminillas se colocaron a 60 °C durante 12 horas en un horno. Los residuos de parafina fueron eliminados al colocar las laminillas en una caja de tinción que contenía Hemo-De. Finalmente, los tejidos fueron montados con resina sintética líquida marca Cytoseal™ 60.

Con una cámara digital Carl Zeiss se tomaron fotografías de las estructuras taxonómicas representativas. Las imágenes fueron procesadas en el programa Adobe Photoshop CS6 versión 13.0, y las placas de imágenes fueron armadas en una diapositiva de Powerpoint. Se realizaron conteos, medidas de células y de estructuras reproductivas mediante el uso del programa Axionvision versión 4.8. Las medidas fueron tomadas a 10 células y/o estructuras reproductivas por rodolito/especie. Para cada estructura, se registró el intervalo mínimo versus el máximo.

La determinación del género y especie se realizó con las claves taxonómicas de Womersley (1994), Wilks & Woelkerling (1995), Riosmena-Rodríguez *et al.* (2007) y Harvey & Woelkerling (2007), así mismo se contrastó la información de las especies tipo y las descritas en otras regiones con las del presente estudio utilizando literatura y fotografías del material tipo. Para cada especie determinada se integró el autor, año de descripción, número de página de la referencia original, localidad tipo, así como los sinónimos homotipos y heterotipos. Asimismo, se integró la distribución regional, hábitat, y observaciones taxonómicas.

Finalmente, a los ejemplares se les asignó una clave de herbario, la cual consta de un número e iniciales de la localidad en la que fue recolectada, ejemplo: 1IC (corresponde al ejemplar número 1, recolectado en Isla Cacaluta), 5E (corresponde al

ejemplar 5, recolectado en La Entrega) y 10T (corresponde al ejemplar 10, recolectado en playa Tijera). Posteriormente fueron depositados en el Herbario de la Universidad del Mar, campus Puerto Ángel.

### 7.3.3. Determinación taxonómica mediante análisis molecular

#### 7.3.3.1. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, los ejemplares se preservaron en frascos que contenían silica gel. Utilizando un estereoscopio Carl Zeiss, se seleccionaron tejidos de aproximadamente 3 mm<sup>3</sup> de cada ejemplar. Posteriormente de cada fragmento obtenido se eliminó todo organismo epífito, así como arena u otros sustratos. En un mortero y con un pistilo esterilizado se pulverizaron los tejidos. La extracción del ADN se logró después de probar diversos protocolos utilizados en distintos trabajos de algas rojas coralinas y sedimento. A continuación, se presenta en la tabla III, los protocolos y reactivos usados para cada una de las técnicas de extracción de ADN probadas.

Tabla III.- Protocolos probados en la extracción de ADN de rodolitos del PSM. \*Tampón de lisis: Tris pH7-8, quelante, EDTA, NaCl. Buffer de extracción: NaCl, EDTA, Tris. Solución amortiguadora de sales B: Tris-HCl, NaCl, EDTA. Solución amortiguadora de almacenamiento: Tris-HCl, EDTA. Buffer TE: Tris-HCl, EDTA. Buffer TEN: Tris-HCl, EDTA, NaCl.

Protocolo	Separación de proteínas y lípidos	Precipitación del ADN	Resuspensión de ADN
<b>Hughey <i>et al.</i> (2002)</b>	Beta-Mercaptoetanol Buffer de extracción Proteinasa K liofilizada Cloroformo	Acetato de potasio Isopropanol Lavado con etanol al 70%	Agua para PCR
<b>Vidal <i>et al.</i> (2002)</b>	Tampón de lisis SDS Beta-Mercaptoetanol Proteinasa K	Acetato de potasio Isopropanol Fenol-cloroformo Acetato de amonio Lavado con etanol al 70%	Buffer TE
<b>Rojas-Herrera <i>et al.</i> (2008)</b>	Buffer TEN Proteinasa K Solución de lisozima SDS al 20%	Acetato de potasio suspensión de SiO <sub>2</sub> al 4% Lavado con etanol al 70%	Agua destilada estéril

<b>Gabrielson <i>et al.</i> (2011)</b>	Beta-Mercaptoetanol	Acetato de potasio	
	Buffer de extracción Proteinasa K liofilizada	Isopropanol Cloroformo	Agua para PCR
		Lavado con etanol al 70%	
<b>Sales</b>	Solución amortiguadora de sales B	NaCl	Solución amortiguadora de almacenamiento
	SDS al 20% Proteinasa K liofilizada RNAsa	Isopropanol Lavado con etanol al 70%	
<b>DNeasy Plant Mini Kit®</b>	Buffer AP1		Agua para PCR
	Buffer P3		
	Buffer AW1		Buffer AE
	Buffer AW2		
<b>DNeasy Blood &amp; Tissue Kit®</b>	Buffer ATL		
	Buffer AL		
	Buffer AW1		Buffer AE
	Buffer AW2		
	Proteinasa K		

De la aplicación de los distintos protocolos de extracción de ADN, se pudo obtener ADN a partir del propuesto por Rojas-Herrera *et al.* (2008), mismo que fue modificado y que se presenta a continuación.

Del tejido pulverizado se tomó de 0.5 a 1 g de muestra y se colocó en un tubo eppendorf de 1.5 ml, se añadió 1 ml de buffer TEN y 20 µl de la solución de lisozima (10mg/ml en buffer TE), se dejó incubar a 37°C por una hora en una incubadora marca PolyScience y se agito por inversión cada 10 minutos. Transcurrido el tiempo los tubos se colocaron por 10 minutos en un baño de hielo/alcohol, posteriormente durante cinco minutos en un baño a 65°C. Este paso se repitió tres veces.

Seguidamente se añadieron 100 µl de SDS al 20% (p/v) y se agitó en vortex por un minuto. Después se incubó a 30°C por 30 minutos. Una vez que terminó la incubación, los tubos se centrifugaron a 10 000 xg por 10 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga refrigerada marca Centrifuge 5415R. El sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo y se añadieron 500 µl de acetato de potasio al 5M. Se incubó a 65°C durante 5 minutos y 20 minutos en un baño de hielo/alcohol. Posteriormente se centrifugó a 12 000 xg durante 30 minutos a 4°C.

El sobrenadante se pasó a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml y se añadieron 200  $\mu$ l de la suspensión de SiO<sub>2</sub> al 4% (p/v). Se agitó por inversión durante tres minutos y se centrifugó a 11 000 xg por dos minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y la pastilla resultante se lavó dos veces con 1 ml de etanol al 70% (v/v), se centrifugó cada dos minutos a 11 000 xg a temperatura ambiente. Una vez que se desechó el etanol, los tubos se dejaron abiertos y se colocaron en una mesa, para dejar evaporar el resto de alcohol. Finalmente, la pastilla fue resuspendida, añadiendo 60  $\mu$ l de agua destilada estéril. Se incubó a 55°C durante cinco minutos con agitación ocasional y se centrifugó a 10 000 xg durante cinco minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo, cuidando de no tomar la sílice.

Tabla IV.-Reactivos y volúmenes utilizados para cada muestra de acuerdo al protocolo de extracción de Rojas-Herrera *et al.* (2008).

Reactivos	Volumen por muestra
Acetato de potasio 5M	500 $\mu$ l
Agua destilada estéril	60 $\mu$ l
Buffer TEN	1 ml
Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 20% (p/v)	100 $\mu$ l
Etanol al 70% (v/v)	2 ml
Lisozima (se prepara al momento a 10mg/ml)	20 $\mu$ l
Oxido de silicio (SiO <sub>2</sub> ) al 4% (p/v)	200 $\mu$ l

Con la finalidad de obtener ADN que pudiera amplificarse mediante el método de PCR, se utilizaron los pasos 6 a 12 del Dnaesy Plant Mini Kit®, que a continuación se describen:

Se agregaron 1.5 volúmenes (300  $\mu$ l) de buffer AW1 y se mezcló con una pipeta, posteriormente se transfirieron 500  $\mu$ l a la columna Dnaesy minispín y se centrifugó durante una hora a 8000 rpm. Seguidamente la columna se colocó en un nuevo tubo de 1.5 ml y se añadió 500  $\mu$ l de buffer AW2 y se centrifugó por un minuto a  $\geq$  6000 xg, y se

desechó el sobrenadante. Posteriormente, se añadieron 500 µl de buffer AW2 y se centrifugó durante dos minutos a 2000 xg. Para la elusión se transfirió la columna a un nuevo tubo de 1.5 ml, se añadió 50 µl de buffer AE, se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente (15-25 °C) y se centrifugó a 6000 xg durante un minuto. Este paso se repitió de nueva cuenta, pero con un volumen de 20 µl de buffer AE. Finalmente, para la visualización del ADN se corrieron 5 µl del extracto en electroforesis a 80 V durante 30 min en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio en buffer TAE 1X.

### 7.3.3.2. Técnica de PCR

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es la síntesis enzimática *in vitro* y la amplificación de secuencias de ADN específicas (Erich 1989). El principio de la PCR, es producir millones de copias, utilizando una polimerasa que soporte temperaturas elevadas (Saiki *et al.* 1988). En la reacción se utiliza el segmento de ADN a amplificar, primers u oligonucleótidos (fragmentos de ADN complementarios que se unen a cada uno de los extremos 3' del fragmento de ADN molde y se inicie la transcripción), la enzima Taq polimerasa, los deoxinucleótidos-trifosfato (dNTPs), sales, y un buffer (Bolivar *et al.* 2014). La PCR se realiza a partir de tres pasos:

- a) Desnaturalización: consiste en la separación de las dobles cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno a una temperatura de 94°C (Bolivar *et al.* 2014).
- b) Alineamiento: consiste en la unión de los primers con el ADN a una temperatura que oscila entre 40 y 70°C. Los enlaces resultantes son estables solo si los oligonucleótidos y el fragmento de ADN son complementarios. Así mismo, para fortalecer la unión entre el ADN y los oligonucleótidos, la polimerasa comienza a unir nucleótidos complementarios adicionales en estos sitios y comienza a copiar en sentido 5' a 3' (Mullis & Faloona 1987).
- c) Extensión: este paso se lleva a cabo a 72°C, debido a que es la temperatura en donde la polimerasa alcanza su máxima actividad y continúa la síntesis de los fragmentos de ADN a partir de los oligonucleótidos que ya se habían alineado (Bolivar *et al.* 2014).

### 7.3.3.3. Selección de primers

Una vez obtenido el ADN de las muestras, para fines comparativos se seleccionaron los marcadores moleculares *psbA* y *COI* para su amplificación por PCR. Se emplearon iniciadores o primers previamente reportados que han sido exitosos para su amplificación en algas rojas coralinas y con el fin de aumentar las probabilidades de amplificación del fragmento específico, se diseñaron iniciadores específicos para *L. muelleri* (*LithpsbA*) a partir de la secuencia reportada en el GenBank (número de acceso JQ896241.1) y con el software Primer3 v0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) (Tabla V).

Tabla V.- Secuencias utilizadas en el presente estudio.

Autor	Marcador	Primers
Saunders (2005)	<i>COI</i>	GazF1 (5' TCAACAAATCATAAAGATATTGG 3')
		GazR1 (5' ACTTCTGGATGTCCAAAAAYCA 3')
Yoon <i>et al.</i> (2002).	<i>psbA</i>	psbA-F (5' ATGACTGCTACTTTAGAAAGACG 3')
		psbA-R2 (5' TCATGCATWACTTCCATACCTA 3')
Presente estudio	<i>LithpsbA</i>	LithpsbA-F (5' TCATCATTGCATTGTTGCT 3')
		LithpsbA-R (5' GCGCTGTCGACTACAGACTGA 3')

### 7.3.3.4. Estandarización y amplificación por PCR

Se realizaron curvas de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y de temperatura de alineamiento para establecer las condiciones ideales de amplificación para los marcadores *COI*, *psbA* y *LithpsbA*. Para cada par de primers se realizó una mezcla de reacción como se indica en la Tabla VI.

Tabla VI.- Mezcla de reacción de la PCR.

Reactivos	Cantidad por individuo (μL) / Concentración de MgCl <sub>2</sub>		
	2 mM	2.5 mM	3 mM

H <sub>2</sub> O	9.56 µL	9.41 µL	9.26 µL
Buffer	1.5 µL	1.5 µL	1.5 µL
MgCl <sub>2</sub>	0.6 µL	0.75 µL	0.9 µL
dNTPs (10mM)	0.3 µL	0.3 µL	0.3 µL
Primer Forward (10 mM)	0.45 µL	0.45 µL	0.45 µL
Primer Reverse (10 mM)	0.45 µL	0.45 µL	0.45 µL
Taq polimerasa (5 U µL <sup>-1</sup> )	0.14 µL	0.14 µL	0.14 µL

Posteriormente, en tubos para PCR que contenían de 30-50 ng/µl de ADN extraído, se adicionaron 13 µL de la mezcla de reacción de la PCR, teniendo un volumen final de 15 µL para cada concentración de MgCl<sub>2</sub>.

Para cada marcador, la amplificación consistió en 35 ciclos y se realizó en un termociclador Thermal Cycler Bio-Rad de acuerdo a las condiciones propuestas por Hernández-Kantún *et al.* (2015) y que se describe en la Tabla VII. En cada PCR fue incluida una muestra que hubiera amplificado anteriormente que sirvió de control positivo.

Tabla VII.- Perfil de temperatura de la reacción de PCR para los marcadores moleculares *COI*, *psbA* y *LithpsbA*. En la curva de temperatura se probaron las siguientes temperaturas.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	1 min	
Desnaturalización	94 °C	1 min	
Alineamiento	50 °C	30 min	35
	47.9 °C		
	43.9 °C		
Extensión	40.0 °C	1 min	
	72°C		
Extensión final	72°C	5 min	

Debido a la falta de amplificación del ADN con todas las temperaturas probadas en la curva a diferentes concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y ADN genómico total, se empleó el Kit TypeIT de QIAGEN®, que emplea HotStart Taq Plus, esta enzima comienza a trabajar hasta que llega a una temperatura específica y por esa razón es mucho más

eficiente en la reacción de PCR. Para la mezcla de reacción, se utilizaron 5  $\mu$ L de master mix y 3  $\mu$ L de primer mix (10 mM). Posteriormente a cada tubo con los 8  $\mu$ L de la mezcla de reacción, se le agregaron 30-50 ng/ $\mu$ L de ADN genómico total, teniendo un volumen final de 10  $\mu$ L.

Para cada par de primers, la amplificación consistió en 28 ciclos y se realizó en un termociclador Thermal Cycler Bio-Rad, las condiciones se describen en la Tabla VIII y en cada PCR se incluyó un control positivo.

Tabla VIII.- Condiciones de la amplificación por PCR.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	5 min	
Desnaturalización	95 °C	30 s	28
Alineamiento	50 °C	90 s	
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	60°C	30 min	

Para la visualización de los productos PCR, se observaron mediante electroforesis a 80 V durante 30 min en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio en buffer TAE 1X. Como referencias de los tamaños de las bandas observadas en los geles, se utilizó el marcador 1Kb plus, que contiene fragmentos de 100 a 1000 pb. Las imágenes de las bandas fueron fotografiadas con una cámara digital marca Canon, posteriormente en el programa Photoshop CS6 v13.0, se ajustó el brillo y el contraste luminoso para optimizar la identificación de las bandas.

Una vez que se observaron productos de PCR para *COI*, *psbA* y *LithpsbA* de concentración suficiente (30-50 ng/ $\mu$ l) se enviaron a secuenciar en ambas direcciones (*Forwardy Reverse*) al servicio de secuenciación Sanger de la Universidad de Illinois.

#### 7.3.3.5. Control de calidad

Los electroferogramas con las secuencias se visualizaron en el programa BioEdit 7.2.5 (Hall 1999) para hacer un control de calidad de cada uno de los nucleótidos de cada secuencia. Para comprobar la integridad de las secuencias, se emplearon las secuencias

complementarias *forward* y *reverse* y únicamente se usó la extensión donde ambas secuencias coincidieran en su totalidad y se obtuvo una secuencia consenso.

Para cada marcador molecular se obtuvo una secuencia consenso, estas se analizaron en el GenBank utilizando la herramienta BLASTN y se confirmó la semejanza con algún ejemplar del género *Lithothamnion*. Posteriormente se descargaron para cada gen todas las secuencias correspondientes al género y una secuencia correspondiente al género *Lithophyllum* (para emplear como grupo externo). En el programa BioEdit 7.2.5 las secuencias únicas obtenidas en el GenBank se alinearon junto con las obtenidas en este trabajo (Anexo 3) y posteriormente fueron traducidas a secuencias proteicas, para corroborar la identidad de estos (Anexo 4). Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron tanto con las secuencias nucleotídicas como proteicas.

#### **7.3.3.6. Reconstrucción filogenética**

Con el fin de representar las relaciones filogenéticas de las especies formadoras de rodolitos se construyeron dos alineamientos ClustalW: el primero fue para el marcador molecular *psbA* y el segundo alineamiento corresponde al marcador molecular *COI*.

Para encontrar el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustara a los datos se utilizó el programa PhyML 3.0 (Guindon *et al.* 2010) con el criterio de información Akaike (AIC) y de soporte fast likelihood. Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron por el método de reconstrucción de máxima verosimilitud. Para saber la confiabilidad de los análisis filogenéticos, para ambas reconstrucciones se utilizaron 500 réplicas de soporte *bootstrap*.

Finalmente, la distancia genética entre especies se calculó en el programa MEGA X (Kumar *et al.* 2018), mediante el modelo de distancias pareadas y el parámetro de distancia Kimura 2-parámetros, con un *bootstrap* de 500 réplicas. De igual forma para comparar entre grupos se utilizó el modelo de distancia media entre grupos con el parámetro de distancia Kimura 2-parametros, con un *bootstrap* de 500 réplicas (Kimura 1980, Kumar *et al.* 2018).

## 8. Resultados

### 8.1. Determinación de las formas de crecimiento

De los 69 rodolitos recolectados, estos presentaron una forma de crecimiento fruticosa, grumosa, incrustante-fruticosa y verrugosa, sin embargo, la forma de crecimiento fruticosa fue la más representativa para cada localidad de estudio (Fig. 6).

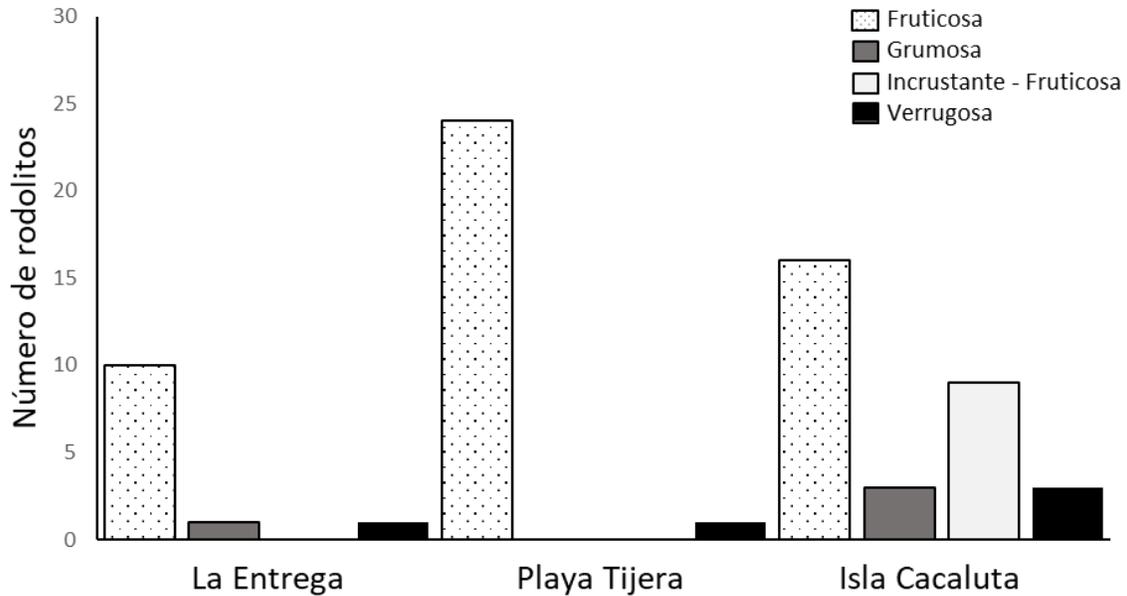


Figura 6.- Formas de crecimiento de los rodolitos recolectados en las tres localidades de estudio.

### 8.2. Determinación taxonómica mediante análisis anatómico

De la determinación taxonómica mediante el análisis de caracteres, se obtuvo que el 100% de los organismos formadores de rodolitos son monoespecíficos, y la especie conformadora es *L. cf. muelleri*. A continuación, se presenta la diagnosis de la especie.

**Reino Plantae** Haeckel, 1866

**Filo Rhodophyta** Wettstein, 1901

**Clase Florideophyceae** Cronquist, 1960

**Orden Corallinales** P.C. Silva & H.W. Johansen, 1986:

**Familia Hapalidiaceae** J.E. Gray, 1864

**Subfamilia Melobesioideae** Bizzozero, 1885

**Género *Lithothamnion*** Heydrich, 1897

***Lithothamnion cf. muelleri***

(Figs. 7A-G y 8A-D)

**Material tipo de la especie nominal:** Lectotipo en CN (Herbario Lenormand, no numerado); designado por Woelkerling (1983, p. 190); descrito en Woelkerling (1983, Fig. 29) y en Wilks & Woelkerling (1995, Fig. 1A). Isolectotipos: MEL 588439; L 941. 149-249 (Comunicado por Lenormand) (Womersley 1994).

**Sinónimos heterotípos:** *Archaeolithothamnion mirabile* Foslie 1899, *Lithothamnion muelleri* f. *cingens* Foslie 1900, *Lithothamnion gabrieli* Foslie 1905, *Lithothamnion mirabile* (Foslie) Foslie 1909, *Mesophyllum gabrieli* (Foslie) W.H. Adey 1970.

**Localidad tipo de la especie nominal:** Western Port, Victoria, sur de Australia (Wilks & Woelkerling 1995: 555).

**Descripción**

*Estructuras vegetativas:* Algas calcificadas de vida libre, los talos crecen de forma incrustante-fruticosa, grumosa, fruticosa y verrugosa (Fig. 7A-C). Las algas presentan un núcleo de roca o coral. Las ramas son simples y miden entre 6 a 8 mm de diámetro y de 4 a 6 mm de alto. Los conceptáculos en la superficie de las ramas se encuentran de forma uniporada, multiporada senescente, volcán y/o en hendidura (Fig. 7D-G).

La elongación celular se produce principalmente en la región subepitelial, sitio en donde por lo general las células son más cortas o iguales (6-10  $\mu\text{m}$  de diámetro y 6-9  $\mu\text{m}$  de alto) que sus derivados internos inmediatos (7-10  $\mu\text{m}$  de diámetro y 6-8  $\mu\text{m}$  de alto (Fig. 8A). Los filamentos adyacentes se encuentran unidos por fusiones celulares (Fig. 8A). No se observa presencia de tricocistos (Fig. 8A). Las células epiteliales presentan una pared distal de forma aplanada (Fig. 8B).

*Estructuras reproductivas:* Los conceptáculos esporangiales se encuentran en la superficie e inmersos en el talo vegetativo. El techo de los conceptáculos se encuentra formado de seis a 10 capas de células, y no presenta depresiones (Fig. 8C). Las cámaras de los conceptáculos presentan un diámetro de 300-450  $\mu\text{m}$  y una altura de 118-250  $\mu\text{m}$  (Fig. 8C)

Los canales de los poros están rodeados por células que son similares en tamaño y forma con respecto a otras células en el techo del conceptáculo (Fig. 8D). Los

esporangios maduros presentan un arreglo zonado, tienen un diámetro de 35-52  $\mu\text{m}$  y una altura de 33-70  $\mu\text{m}$  (Fig. 8C). No se observaron conceptáculos gamentagiales.

**Material examinado:** La Entrega: 1E, 2E, 3E, 4E, 5E, 6E, 7E, 8E, 9E, 10E, 11E, 12E. Playa Tijera: 1T, 2T, 3T, 4T, 5T, 6T, 7T, 8T, 9T, 10T, 11T, 12T, 13T, 14T, 15T, 16T, 17T, 18T, 19T, 20T, 21T, 22T, 23T, 24T, 25T. Isla Cacaluta: 1IC, 2IC, 3IC, 4IC, 5IC, 6IC, 7IC, 8IC, 9IC, 10IC, 11IC, 12IC, 13IC, 14IC, 15IC, 16IC, 17IC, 18IC, 19IC, 20IC, 21IC, 22IC, 23IC, 24IC, 25IC, 26IC, 27IC, 28IC, 29IC, 30IC, 31IC, 32IC.

**Observaciones ecológicas:** La especie se distribuye desde la zona intermareal hasta los 30 m de profundidad, en zonas arenosas y al pie de los arrecifes coralinos, los ejemplares del PSM, solo se encontraron formando agregaciones.

**Distribución geográfica:** Atlántico Oriental Tropical y subtropical. Atlántico Occidental: Argentina y Brasil. En el sureste de Asia: Golfo de Arabia. En Asia: Corea. En la Antártida y las islas sub-antárticas (Guiry & Guiry 2019). Al sur de Australia en el Puerto Occidental, Victoria. En el Pacífico Oriental: En Washington, Baja California Sur, Nicaragua y Costa Rica (Robinson *et al.* 2013). En el PSM: playas Manzanillo y Carey (Peralta-García & Rosas-Alquicira 2014), en Punta Maldonado, Guerrero; en La Entrega, Tijera e Isla Cacaluta, Oaxaca.

**Notas taxonómicas:** Los caracteres que diferencian a la especie de otras especies del género son: 1) la forma y el tamaño de las células que bordean los canales de los poros del conceptáculo son semejantes y 2) la ausencia de depresiones en el techo de los conceptáculos (Womersley 1994, Wilks & Woelkerling 1995,). Mismos caracteres que se lograron encontrar en el presente estudio. Por otra parte, se observa que la división celular en las células subepiteliales es muy constante en todos los ejemplares, por lo que es difícil distinguir el tamaño de los mismos con respecto a las células subsecuentes.

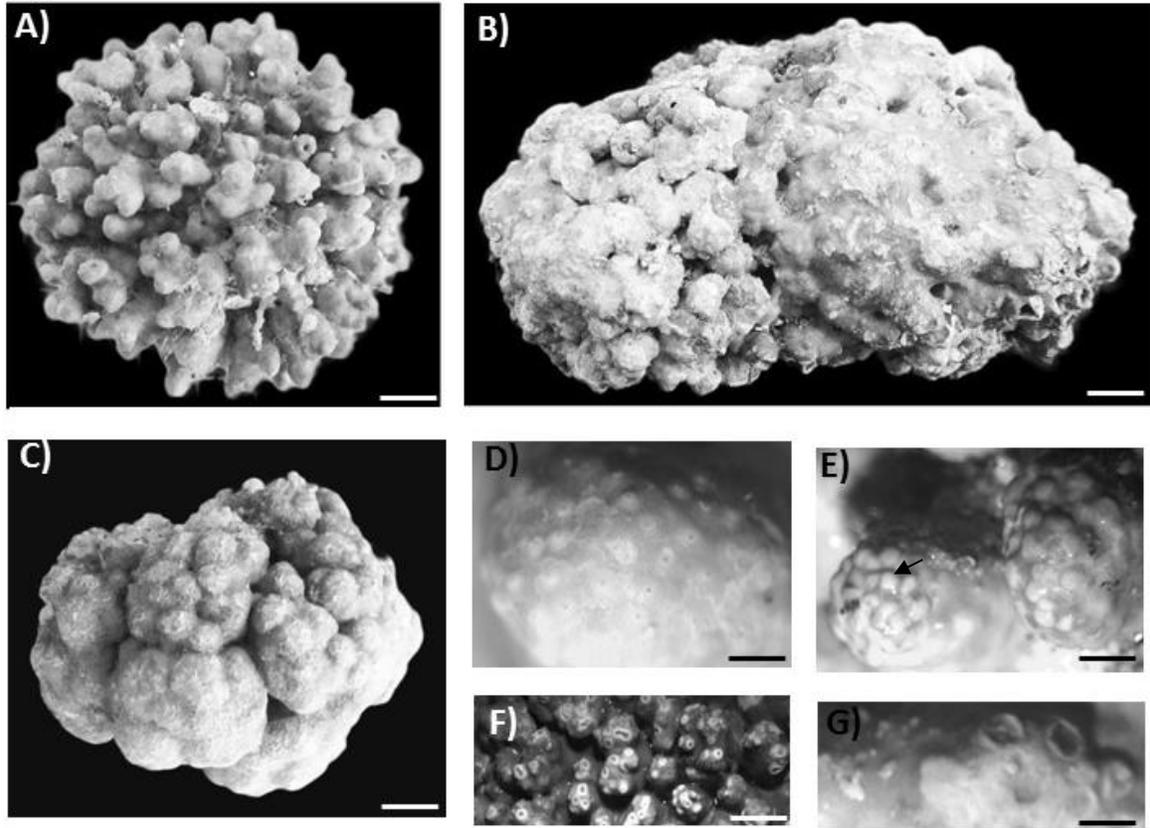


Figura 7.- Formas de crecimiento y vista superficial de los conceptáculos de *Lithothamnion cf. muelleri* (A, 1T; B, 1IC; C, 9E; D, 6IC; E, 5IC; F, 10E G, 9IC). A) Forma de crecimiento fruticosa. B) Forma de crecimiento incrustante-grumosa. C) Forma de crecimiento grumosa. D) Conceptáculos uniporados. E) Conceptáculo multiporado senescente (flecha). F) Conceptáculo multiporado en forma de volcán. G) Conceptáculo multiporado en hendidura. Las barras de escala representan: A-C 10 mm; D-G 2 mm.

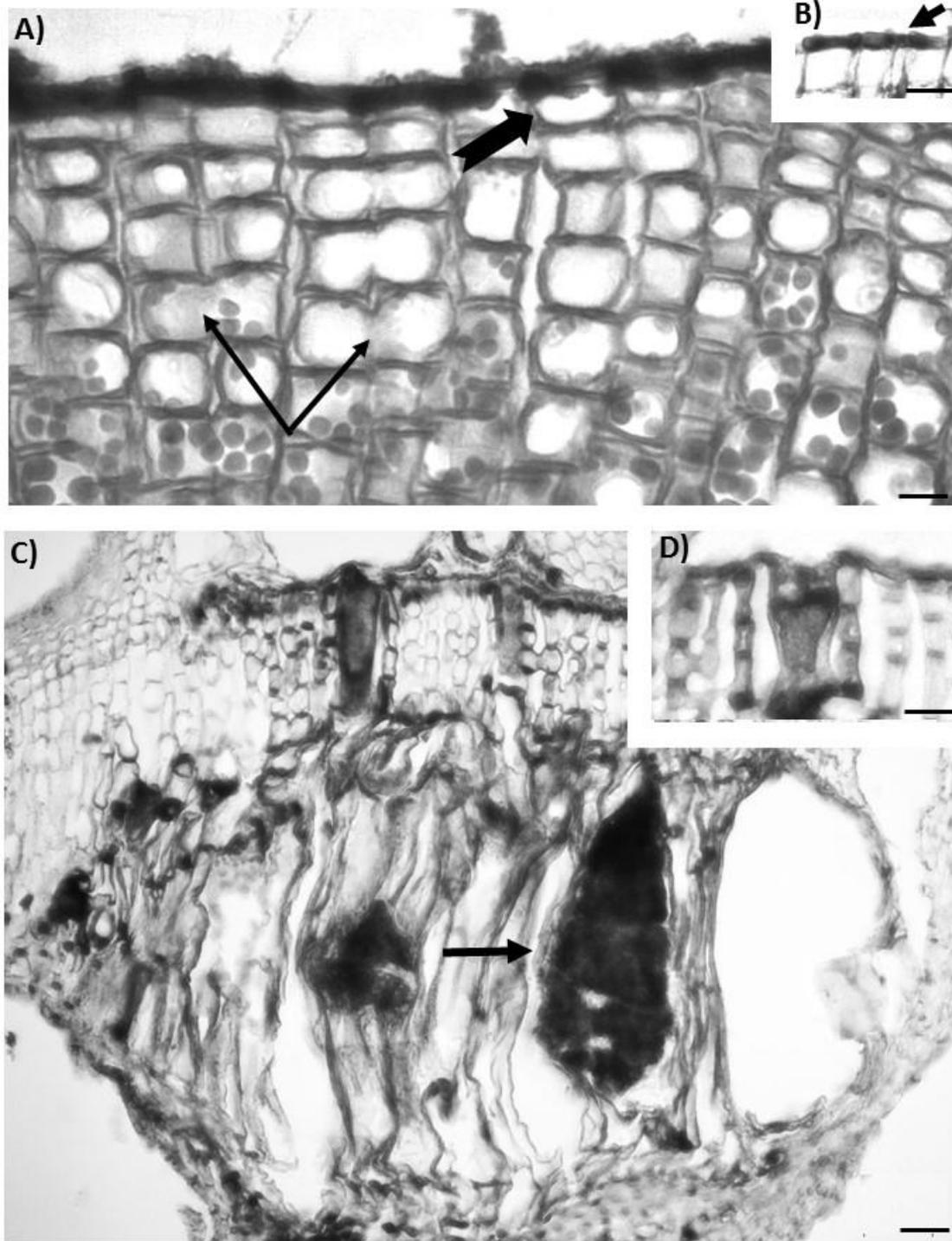


Figura 8.- Caracteres anatómicos vegetativos y reproductivos de *Lithothamnion cf. muelleri* (A y D, 30IC; B, 1E; C, 19IC). A) Células subepiteliales cortas o iguales que sus derivados inmediatos (flecha con muesca); fusiones celulares entre filamentos adyacentes (flechas). B) Paredes distales de las células epiteliales con forma aplanada (flecha). C) Cámara del conceptáculo multiporado, con un tetraesporangio zonado (flecha). D) Sección del techo de la cámara del conceptáculo

multiporado, con un canal tapón del poro (flecha) con filamentos adyacentes de células vegetativas de igual forma y tamaño. Las barras de escala representan: A, 100  $\mu\text{m}$ ; B-D, 20  $\mu\text{m}$ .

### 8.3. Determinación taxonómica mediante análisis molecular

#### 8.3.1. Extracción de ADN

Un total de 69 ejemplares de algas rojas coralinas no geniculadas formadoras de rodolitos fueron utilizadas para la extracción de ADN, de los cuales se logró extraer ADN de 15 ejemplares. El protocolo con mayor éxito de extracción fue el propuesto por Rojas-Herrera *et al.* (2008). Mientras que con los protocolos DNeasy Plant Mini Kit®; DNeasy Blood & Tissue Kit®; Gabrielson *et al.* (2011) y Sales no se logró observar ADN de las muestras. Sin embargo, con el protocolo propuesto por Vidal *et al.* (2002), se visualizaron bandas tenues (Fig. 9).

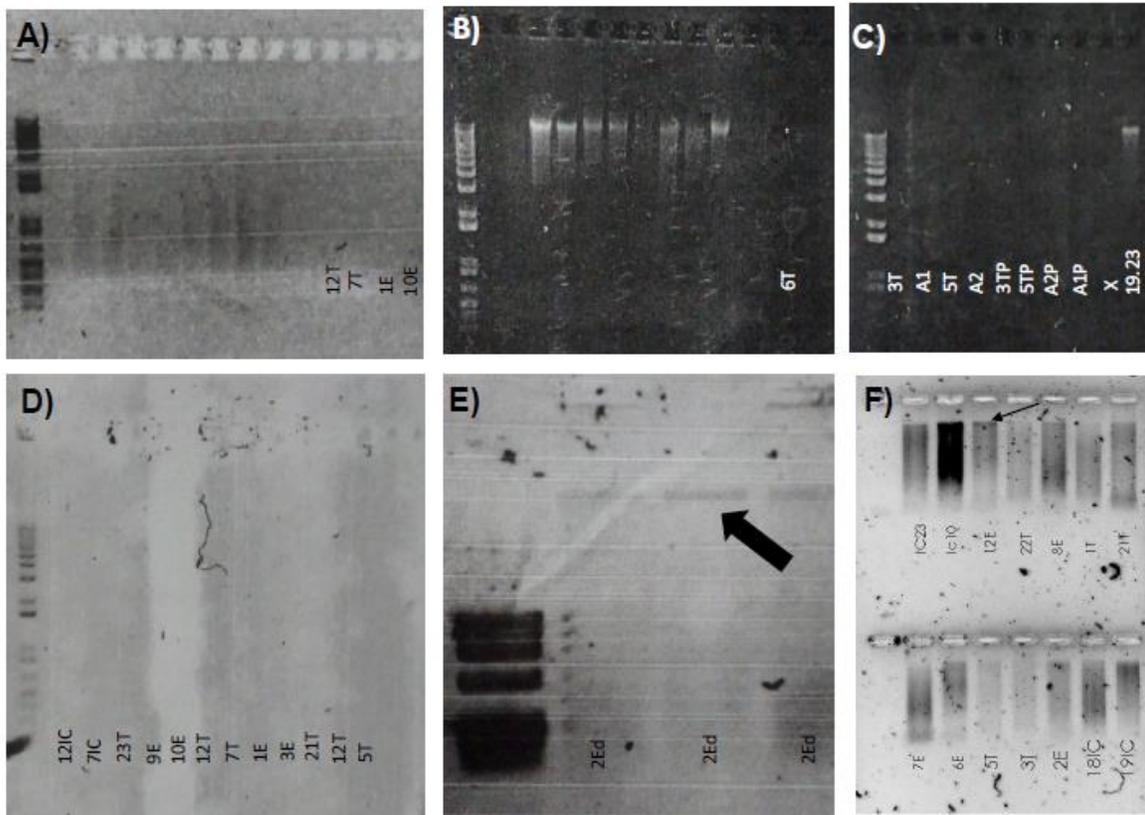


Figura 9.- Extracción de ADN. Se muestran geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio de cada uno de los protocolos de extracción probados. A) DNeasy Plant Mini Kit; B) DNeasy Blood & Tissue Kit; C) Gabrielson *et al.* 2011; D) Sales; E, Vidal *et al.* 2002; F, Rojas-Herrera *et al.* 2008).

A-D) No se observa presencia de ADN. E) Se observa la presencia de ADN con el uso de fenol cloroformo, la flecha señala la banda de ADN. F) Se observa la presencia de ADN con el uso de sílice, pero estas se encuentran degradadas.

### 8.3.2. Estandarización y amplificación por PCR

Para la optimización de la PCR, con la curva de temperatura, se obtuvo que para los genes *COI* y *psbA*, la temperatura de alineamiento óptima es de 50 °C. Mientras que para el par de primers *LithpsbA* es de 57 °C (Fig. 10). De las 15 muestras de ADN, solo se lograron amplificar dos muestras con los marcadores moleculares *COI*, *LithpsbA* y solo una muestra con el marcador molecular *psbA* (Fig. 11). Las muestras amplificadas corresponden al ejemplar 31IC. Con respecto a la variación en la concentración de magnesio, al no haber efecto alguno en la reacción, se decidió utilizar 2.5 mM, ya que es la concentración recomendada para la enzima.

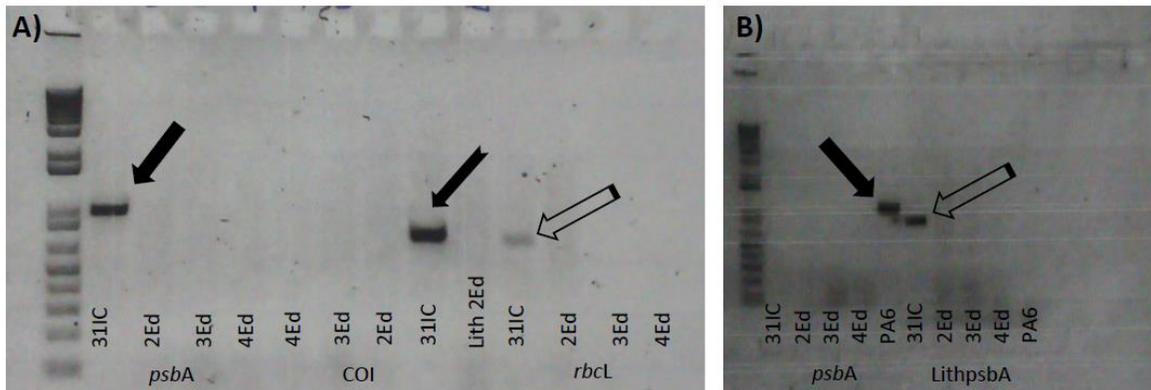


Figura 10.- Optimización de la PCR. A) Amplificación a 50 °C. Gel de agarosa en donde se observa la amplificación del marcador molecular *psbA* con un tamaño de 850 pb (flecha con relleno) y los marcadores moleculares *COI* de 650 pb (flecha con muesca) y *rbcL* de 650 pb (flecha sin relleno). B) Amplificación a 57 °C. Gel de agarosa en donde se observa la amplificación del control positivo con el marcador molecular *psbA*, pero no de las muestras (flecha rellena), mientras que con el marcador molecular *LithpsbA* con un tamaño de 950 pb, se observa la amplificación de la muestra 31IC (flecha sin relleno).

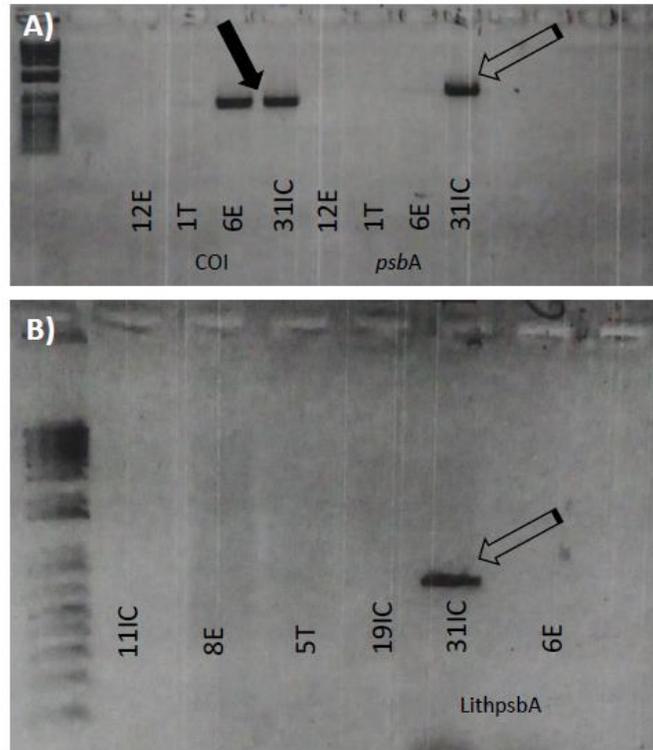


Figura 11.- A) Gel de agarosa en donde se observa la amplificación de las muestras 31IC y 6E con el marcador molecular *COI* de 650 pb (flecha con relleno) y con el marcador molecular *psbA* de 850 pb (flecha sin relleno). B) Gel de agarosa en donde se observa la amplificación de la muestra 31IC con el marcador molecular *LithpsbA* de 950 pb (flecha sin relleno).

### 8.3.3. Análisis de secuencias

A partir de la secuenciación, para el marcador molecular *COI* se obtuvieron las secuencias *forward* de 683 pb y *reverse* de 700 pb. Por otra parte, para el *psbA*, el tamaño de la secuencia *forward* fue de 830 pb y para el *reverse* fue de 730 pb. Posteriormente para cada marcador molecular se obtuvo una secuencia consenso de 710 pb para *psbA* y una de 490 pb para *COI*.

A partir de las secuencias consensos, con el fin de representar las relaciones filogenéticas de las especies formadoras de rodolitos se construyeron dos alineamientos: el primero fue para el marcador molecular *psbA* de 450 pb, que incluye 18 secuencias del Genbank y una correspondiente al presente estudio. El segundo alineamiento corresponde al marcador molecular *COI* de 477pb, con 16 secuencias del GenBank y una perteneciente a este estudio (Anexo IV).

El modelo de evolución o de sustitución nucleotídica se escogió de acuerdo a los criterios de Información Akaike “AIC” (Akaike 1973) y al Criterio de Información Bayesiana “BIC” (Schwarz 1978). El modelo de sustitución que mejor se ajusta a la región amplificada del marcador *COI* con las secuencias nucleotídicas, ha sido el modelo *general time-reversible* con el uso de la distribución Gamma (GTR + G) (Tabla IX), mientras que para las secuencias de aminoácidos es el modelo general de sustitución de aminoácidos mitocondriales con el uso de la distribución gamma (Mtzoa + G) (Tabla X). Por otra parte, el modelo de sustitución que se ajusta mejor a la región amplificada del marcador *psbA* con las secuencias nucleotídicas ha sido el modelo *general time-reversible* con el uso de la distribución Gamma y asumiendo sitios invariables (GTR + G + I) (Tabla XI), mientras que para los datos con las secuencias de aminoácidos es el modelo general de sustitución de aminoácidos mitocondriales con el uso de la distribución gamma (Mtzoa + G) (Tabla XII).

Tabla IX.- Modelos de sustitución para las secuencias nucleotídicas del marcador *COI* determinados por PhyML de acuerdo a los mejores valores de máxima verosimilitud de los criterios AIC y BIC. AIC= Criterio de información de Akaike, BIC= Criterio de Información Bayesiana.

<b>Modelo</b>	<b>Criterio AIC</b>	<b>Criterio BIC</b>
GTR+ G	3845.30234	4012.00299
GTR +G + I	3847.30208	4018.17025
GTR + I	3848.57008	4015.27073
TN93 + G	3853.21502	4007.41313
GTR	3993.21788	4155.75102

Tabla X.- Modelos de sustitución para las secuencias de aminoácidos del marcador *COI* determinados por PhyML de acuerdo a los mejores valores de máxima verosimilitud de los criterios AIC y BIC. AIC= Criterio de información de Akaike, BIC= Criterio de Información Bayesiana.

<b>Modelo</b>	<b>Criterio AIC</b>	<b>Criterio BIC</b>
MtZoa+ G	1168.70226	1266.70530
MtZoa +G + I	1169.54332	1270.60895
MtArt + G	1174.20978	1272.21282
MtZoa + G + F	1182.37424	1338.56658
LG	1182.68266	1338.87500

Tabla XI.- Modelos de sustitución para las secuencias nucleotídicas del marcador *psbA* determinados por PhyML de acuerdo a los mejores valores de máxima verosimilitud de los criterios AIC y BIC. AIC= Criterio de información de Akaike, BIC= Criterio de Información Bayesiana.

Modelo	Criterio AIC	Criterio BIC
GTR+ G+ I	3446.57432	3631.49046
GTR +G	3451.82542	3632.63231
TN93 + G + I	3455.91156	3628.49995
GTR + I	3461.64136	3642.44825
GTR	3647.37642	3824.07406

Tabla XII.- Modelos de sustitución para las secuencias de aminoácidos del marcador *psbA* determinados por PhyML de acuerdo a los mejores valores de máxima verosimilitud de los criterios AIC y BIC. AIC= Criterio de información de Akaike, BIC= Criterio de Información Bayesiana.

Modelo	Criterio AIC	Criterio BIC
MtZoa+ G	1019.92802	1128.07008
MtZoa +G + I	1021.92658	1133.07259
CpREV + G	1022.57182	1130.71388
Blosum62 + G	1028.71638	1136.85844
MtArt + G	1030.05690	1138.19896

### 8.3.3.1. Reconstrucción filogenética con el marcador molecular *COI*

Una vez obtenido el mejor modelo de sustitución, este se empleó para realizar la reconstrucción filogenética por medio del método de máxima verosimilitud con las secuencias nucleotídicas del marcador molecular *COI* (Fig. 12). En este análisis se empleó al género *Lithophyllum* como grupo externo, 15 secuencias de las especies del género *Lithothamnion* del GenBank y una secuencia del presente estudio. La reconstrucción filogenética, reveló la presencia de una especie genéticamente semejante a la que se encuentra distribuida en el Pacífico de Panamá PHYKOS7249 (KU504277).

En este análisis, los miembros del género *Lithothamnion* comprenden un clado monofilético con un soporte para *bootstrap* de 500. Así mismo se observa que el orden de ramificación dentro de este linaje se encuentra resuelto, ya que no hay politomía compuesta por nodos con bajos valores de soporte.

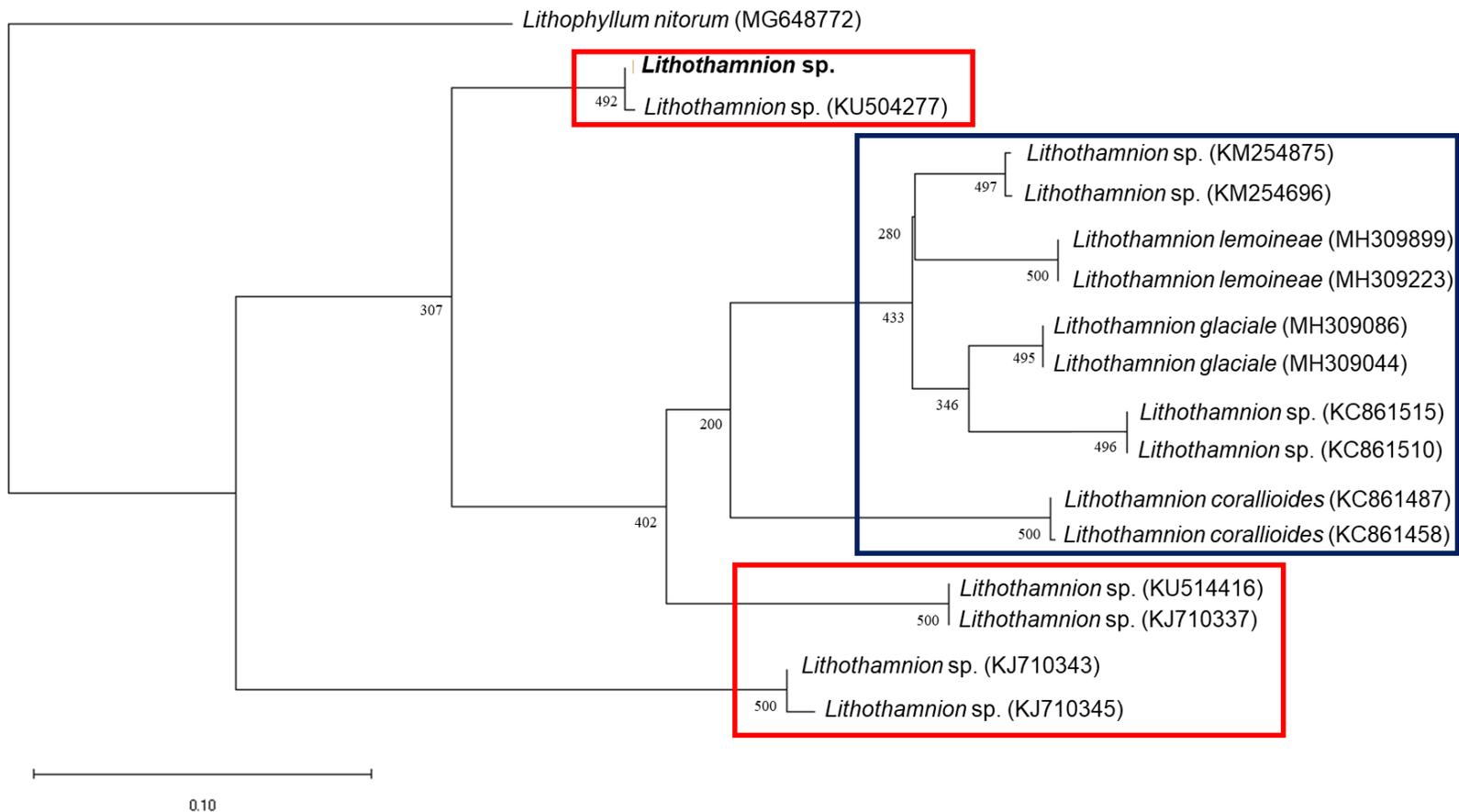


Figura 12.- Reconstrucción filogenética de las secuencias nucleotídicas de la región *COI* con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución nucleotídica GTR + G, en 16 especies de *Lithothamnion* y una de *Lithophyllum*. Los valores de *bootstrap* se muestran debajo de las ramas. La secuencia obtenida en el presente trabajo se señala en negritas (31IC) (*Lithothamnion* sp.), las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank se encuentran indicadas con el número de acceso. El recuadro negro indica las especies pertenecientes a la región templada y los recuadros rojos a la región tropical.

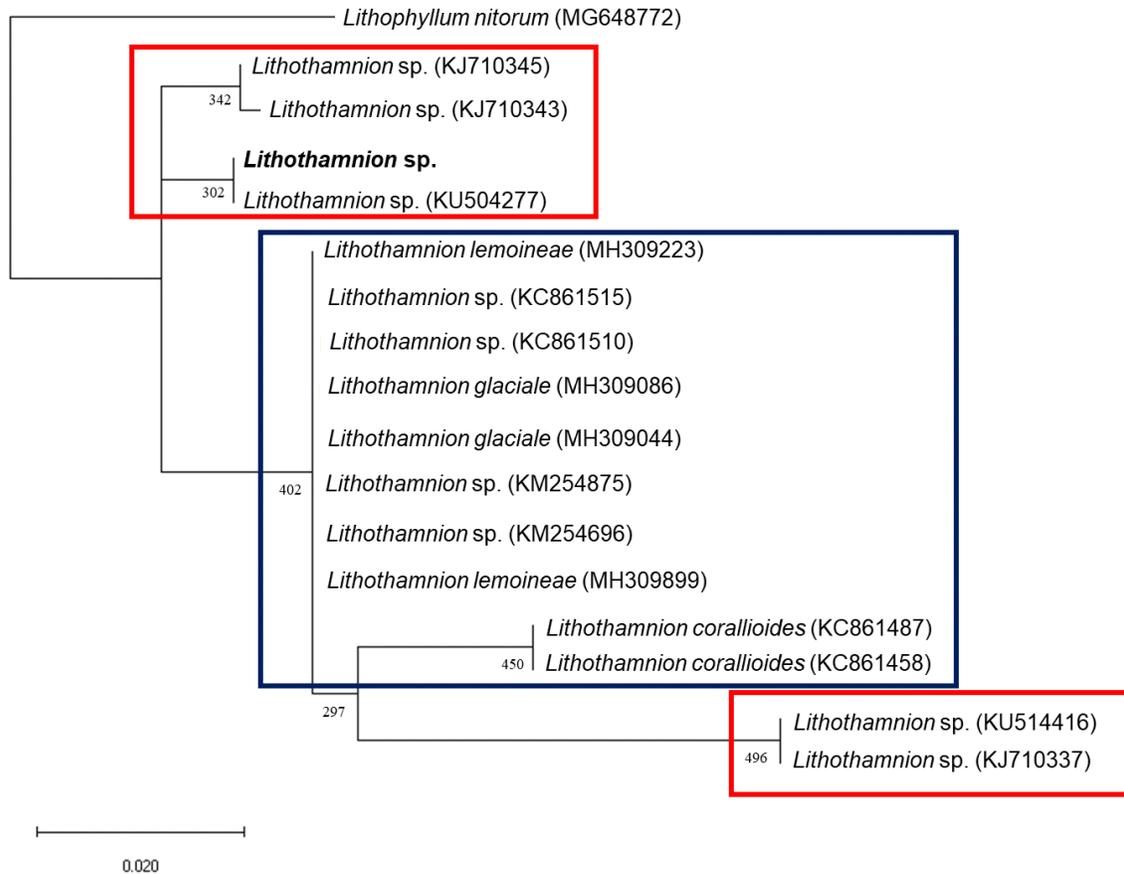


Figura 13.- Reconstrucción filogenética de las secuencias de aminoácidos de la región *COI*, con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo Mtzoo + G, en 16 especies de *Lithothamnion* y una de *Lithophyllum*. Los valores *bootstrap* se muestran debajo de las ramas. La secuencia obtenida en el presente trabajo se señala en negritas (311C) (*Lithothamnion* sp.), las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank se encuentran indicadas con el número de acceso. El recuadro negro indica las especies pertenecientes a la región templada y los recuadros rojos a la región tropical.

El grado de similitud de la especie descrita en el presente estudio vs la especie *Lithothamnion* sp. PHYKOS7249 (KU504277) reportada por Richards *et al.* (2016), es alta, debido a que se observa una distancia genética del 0.42% (Tabla XIII) y que corresponde a dos sitios variables o polimórficos.

Tabla XIII.- Distancias genéticas para el marcador *COI*, con el modelo de distancias pareadas, mediante el parámetro de distancia de Kimura 2-parámetros, con *bootstrap* de 500 réplicas. En paréntesis se muestra el Id. No., de cada secuencia.

	K2P	Desviación estándar
<i>Lithothamnion</i> sp. vs <i>Lithothamnion</i> sp. (PHYKOS7249)	0.004210551 2	0.0028631325

Así mismo, al realizar el análisis de distancia media entre grupos, observamos que el grupo 1 compuesto por la especie determinada en el presente estudio y la especie *Lithothamnion* sp. PHYKOS7249 (KU504277), presentan una distancia genética de 12 a 15% con respecto a los demás grupos (Tabla XIV).

Tabla XIV.- Distancias genéticas para el marcador *COI*, con el modelo de distancia media entre grupos, mediante el parámetro de distancia de Kimura 2-parámetros, con *bootstrap* de 500 réplicas. En negritas se muestran los grupos formados. En paréntesis se muestra el Id. No., de cada secuencia. El grupo 1 corresponde a las especies *Lithothamnion* sp. y *Lithothamnion* sp. PHYKOS7249 (KU504277).

	K2P	Desviación estándar
<b>Grupo 1 vs Grupo 2</b>		
<i>L. lemoineae</i> (GWS024053)	0.1291	0.0169
<i>L. lemoineae</i> (GWS042059)		
<b>Grupo 1 vs Grupo 3</b>		
<i>L. corallioides</i> (CPVP-1167)	0.1398	0.0178
<i>L. corallioides</i> (CPVP-649)		
<b>Grupo 1 vs Grupo 4</b>		
<i>L. glaciale</i> (GWS018166)	0.1419	0.0174
<i>L. glaciale</i> (GWS029946)		
<b>Grupo 1 vs Grupo 5</b>		
<i>Lithothamnion</i> sp. (GWS020939)	0.1290	0.0169
<i>Lithothamnion</i> sp. (GWS022118)		
<b>Grupo 1 vs Grupo 6</b>		
<i>Lithothamnion</i> sp. (CPVP-28)	0.1291	0.0170
<i>Lithothamnion</i> sp. (CPVP-30)		

**Grupo 1 vs Grupo 7**

<i>Lithothamnion</i> sp. (FRA2177)	0.1107	0.0151
<i>Lithothamnion</i> sp. (LAF6970C)		

**Grupo 1 vs Grupo 8**

<i>Lithothamnion</i> sp. (FRA1148)	0.1569	0.0192
<i>Lithothamnion</i> sp. (FRA1059)		

---

A partir de las secuencias nucleotídicas, se muestra un patrón biogeográfico entre las especies, en este caso solo se generan dos regiones a partir de la temperatura (templadas y tropicales) (Fig. 12). Este mismo patrón se corrobora con el análisis realizado con las secuencias de aminoácidos (Fig. 13), ya que de igual forma quedan en el mismo clado las secuencias PHYKOS7249 (KU504277) y la determinada en el presente estudio. Finalmente, podemos sugerir que el marcador molecular *COI*, es de utilidad para resolver la variación a nivel específico de las algas rojas coralinas no geniculadas.

**8.3.3.2. Reconstrucción filogenética con el marcador molecular *psbA***

Del análisis filogenético, con el marcador molecular *psbA* (Fig. 14) que utiliza a un miembro del género *Lithophyllum* como grupo externo, 17 secuencias de las especies del género *Lithothamnion* (Corallinales) y una del presente estudio. Este análisis reveló la presencia de una especie distinta a *L. muelleri* GALW:15734 (JQ896241), pero genéticamente semejante a la que se encuentra distribuida en el Pacífico de Panamá PHYKOS7249 (KP844865).

En este análisis, los miembros del género *Lithothamnion* comprenden un clado monofilético con un soporte *bootstrap* de 500. Así mismo se observa que el orden de ramificación dentro de este linaje, se encuentra resuelto, sin embargo, en el clado compuesto por dos individuos de *L. glaciale* BM000657610 (KY042230), *L. glaciale* US170936 (KP142722) y *L. erinaceum* NCCA0137 (MG191373), observamos una politomía (nodo con más de tres ramas) con un soporte bajo de *bootstrap* de 174.

Así mismo, el análisis filogenético nos agrupa en un clado a las especies *L. muelleri* GALW:15734 (JQ896241) y *Lithothamnion* sp. FRA2177 (KJ710349), por lo

que podríamos suponer que son la misma especie. Por otra parte, en el análisis filogenético con las secuencias de aminoácidos, se observa un alto grado de politomía, por lo que la ramificación de los nodos no se encuentra resuelto (Fig. 15).

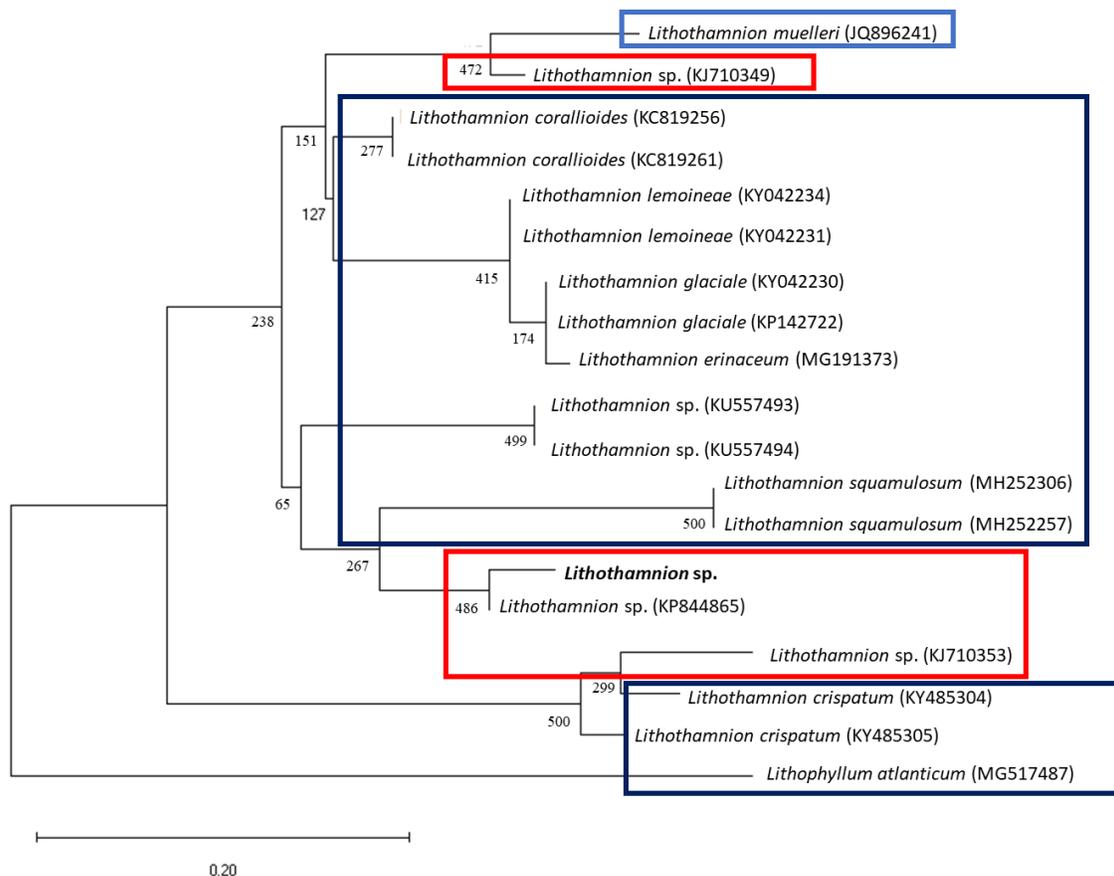


Figura 14.- Reconstrucción filogenética de las secuencias nucleotídicas de la región *psbA*, con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo de sustitución nucleotídica GTR + G + I, en 18 especies de *Lithothamnion* y una de *Lithophyllum*. Los valores de *bootstrap* se muestran en las ramas. La secuencia obtenida en el presente trabajo se señala en negritas (31IC) (*Lithothamnion* sp.), las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank se encuentran indicadas con el número de acceso. El recuadro negro indica las especies pertenecientes a la región templada, el recuadro azul perteneciente a regiones subtropicales y el recuadro rojo a la región tropical.

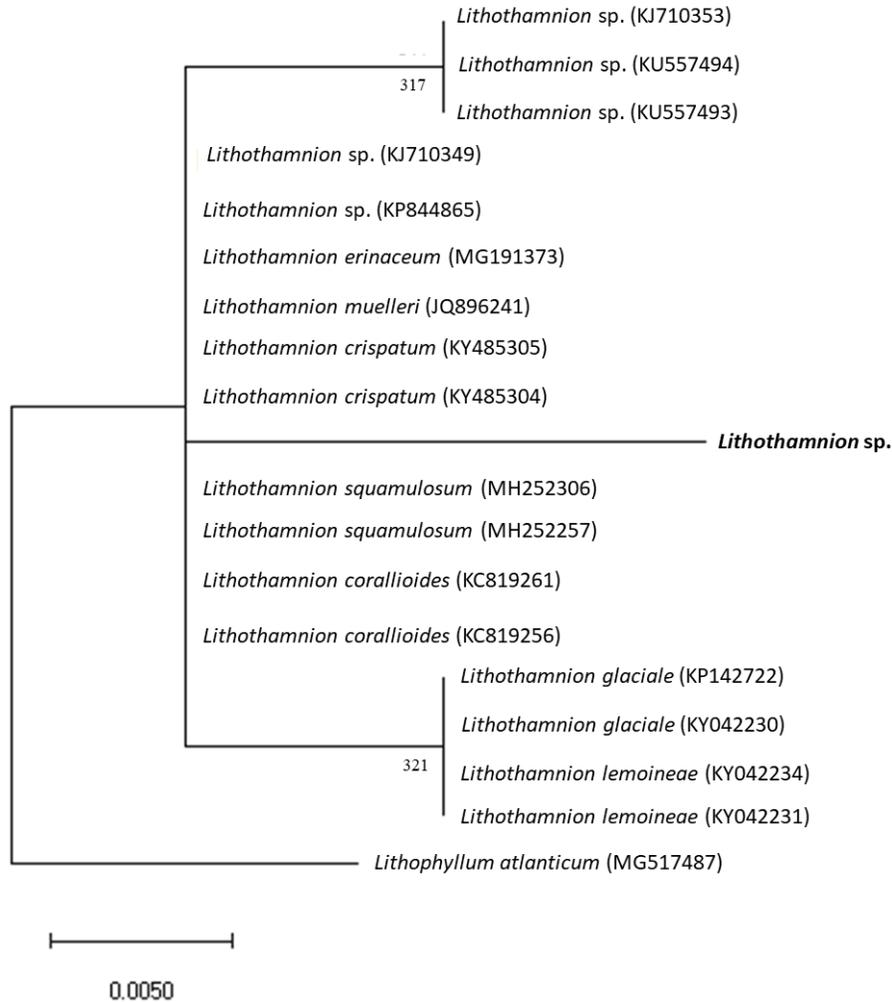


Figura 15.- Reconstrucción filogenética de las secuencias de aminoácidos de la región *psbA*, con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo Mtzoo + G, en 16 especies de *Lithothamnion* y una de *Lithophyllum*. Los valores *bootstrap* se muestran debajo de las ramas. La secuencia obtenida en el presente trabajo se señala en negritas (31IC) (*Lithothamnion sp.*), las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank se encuentran indicadas con el número de acceso

El análisis de la distancia genética mediante el método de distancias pareadas determinó que el grado de similitud entre *Lithothamnion sp.* y *Lithothamnion sp.* PHYKOS7249 (KP844865) es alta, ya que observamos una distancia de 1% que representa a siete sitios variables o polimórficos. Así mismo se calculó la distancia genética para *Lithothamnion sp.* vs *L. muelleri* GALW:15734 (JQ896241) y en donde observamos una distancia genética del 9.81% (Tabla XV), que representa a 41 sitios variables o polimórficos.

Tabla XV.- Distancias genéticas para el marcador *psbA*, con el modelo de distancias pareadas, mediante el parámetro de distancia de Kimura 2-parámetros, con *bootstrap* de 500 réplicas. En negritas la especie descrita en el presente estudio. En paréntesis se muestra el Id. No., de cada secuencia.

	K2P	Desviación estándar
<b><i>Lithothamnion sp.</i></b> vs <i>Lithothamnion sp.</i> (PHYKOS7249)	0.0157195676	0.0059110356
<b><i>Lithothamnion sp.</i></b> vs <i>L. muelleri</i> (GALW:15734)	0.0981026357	0.0157979864

Por otra parte, al determinar la distancia genética entre *L. glaciale* BM000657610 (KY042230), *L. glaciale* US 170936 (KP142722) y *L. erinaceum* NCCA0137 (MG191373), se observan distancias menores a 0.67% (Tabla XVI). Así mismo, en el clado compuesto por *L. muelleri* GALW:15734 (JQ896241) y *Lithothamnion sp.* FRA2177 (KJ710349), se observa una distancia genética del 4.15% (Tabla XVI), que representan 18 sitios variables o polimórficos.

Tabla XVI.- Distancias genéticas para el marcador *psbA*, con el modelo de distancias pareadas, mediante el parámetro de distancia de Kimura 2-parámetros, con *bootstrap* de 500 réplicas. En paréntesis se muestra el Id. No., de cada secuencia.

	K2P	Desviación estándar
<i>L. glaciale</i> (BM000657610) vs <i>L. glaciale</i> (US 170936)	0.0000000000	0.0000000000
<i>L. glaciale</i> (BM000657610) vs <i>L. erinaceum</i> (NCCA0137)	0.0067002379	0.0038824119
<i>L. glaciale</i> (US 170936) vs <i>L. erinaceum</i> (NCCA0137)	0.0067002379	0.0038824119
<i>L. muelleri</i> (GALW:15734) vs <i>Lithothamnion sp.</i> (FRA2177)	0.0415981189	0.0102638312

Para observar la distancia genética entre grupos o clados, se realizó el análisis de distancia media entre grupos. En el cual, se obtuvo que el grupo 1, compuesto por la especie determinada en el presente estudio y la especie *Lithothamnion sp.* PHYKOS7249 (KP844865), presentan distancias que van de 6 a 13% con respecto a los demás grupos (Tabla XVII).

Tabla XVII.- Distancias genéticas para el marcador *psbA*, con el modelo de distancia media entre grupos, mediante el parámetro de distancia Kimura 2-parámetros, con *bootstrap* de 500 réplicas. En negritas se muestran los grupos formados. En paréntesis se muestra el Id. No., de cada secuencia. El grupo 1 corresponde a las especies *Lithothamnion* sp. y *Lithothamnion* sp. (KP844865).

	K2P	Desviación estándar
<b>Grupo 1 vs Grupo 2</b>		
<i>L. corallioides</i> (GALW:15750)	0.0618	0.0117
<i>L. corallioides</i> (CPVP-691)		
<b>Grupo 1 vs Grupo 3</b>		
<i>L. lemoineae</i> (US170970)	0.0765	0.0133
<i>L. lemoineae</i> (BM000044415)		
<b>Grupo 1 vs Grupo 4</b>		
<i>L. glaciale</i> (BM000657610)		
<i>L. glaciale</i> (US 170936)	0.0758	0.0133
<i>L. erinaceum</i> (NCCA0137)		
<b>Grupo 1 vs Grupo 5</b>		
<i>L. squamulosum</i> (S169)	0.0866	0.0156
<i>L. squamulosum</i> (BM000044392)		
<b>Grupo 1 vs Grupo 6</b>		
<i>L. Crispatum</i> (ND226)		
<i>L. Crispatum</i> (RB623156)	0.1325	0.0170
<i>Lithothamnion</i> sp. (FRA1993)		
<b>Grupo 1 vs Grupo 7</b>		
<i>L. muelleri</i> (GALW:15734)	0.0894	0.0138
<i>Lithothamnion</i> sp. (FRA2177)		
<b>Grupo 1 vs Grupo 8</b>		
<i>Lithothamnion</i> sp. (LAF5421)	0.0818	0.0135
<i>Lithothamnion</i> sp. (LAF6494)		

Se confirma un patrón de distribución disyunta en el clado compuesto por *L. muelleri* GALW:15734 (JQ896241) perteneciente a las costas del golfo de California y *Lithothamnion* sp. FRA2177 (KJ710349) perteneciente a las costas del Atlántico, con un soporte *bootstrap* de 472. Así mismo, se generan tres regiones biogeográficas a partir de la temperatura: templadas, subtropicales y tropicales.

La especie secuenciada en el presente estudio, al encontrarse en el mismo clado que la especie perteneciente a las costas del Pacífico de Panamá con un soporte *bootstrap* de 486 y con una distancia genética del 1%, sugiere una distribución biogeográfica que va desde las costas del Pacífico Sur de México hasta las costas de Panamá.

Finalmente, podemos deducir que el marcador molecular *psbA* es de utilidad para resolver la variación de especies de las algas rojas coralinas formadoras de rodolitos.

## 9. Discusión

### 9.1. Determinación taxonómica mediante análisis anatómico

Para el caso de la determinación taxonómica mediante el análisis de caracteres morfológicos y anatómicos, se confirmó la presencia de *L. cf. muelleri*, pero no se observó la presencia de *P. lenormandii* y *S. fructiculosus*, ambas especies previamente citadas por Peralta-García & Rosas-Alquicira (2014) y Fragoso & Rodríguez (2002) respectivamente. Esto pudo deberse a que los organismos fueron determinados con base en caracteres hoy en día no válidos para las especies. Para el caso de *S. fructiculosus*, Fragoso & Rodríguez (2002) no describen la presencia de esporas dentro de los conceptáculos uniporados, mientras que para *P. lenormandii*, al revisar la descripción del material tipo y la descrita por Peralta-García & Rosas-Alquicira (2014), se observa que no coinciden los caracteres distintivos como son: conceptáculo esporangial multiporado por encima de la región vegetativa, nunca inmerso y la presencia de células estériles en el interior de la cámara del conceptáculo (Irvine & Chamberlain 1994). Con lo mencionado anteriormente es importante revisar de nueva cuenta los ejemplares, para tener una mejor identificación de las especies.

En el PSM, se tiene el registro de *Lithothamnion*, *Lithophyllum*, *Phymatolithon* y *Spongites*, como géneros de algas rojas coralinas no geniculadas (León-Álvarez & González-González 1993, Mateo-Cid & Mendoza-González 1997, 1998, Mendoza-González & Mateo-Cid 1999, Fragoso & Rodríguez 2002, Peralta-García & Rosas-Alquicira 2014). De los anteriores géneros, solo se pudo confirmar la presencia de

*Lithothamnion*, como un género formador de rodolitos. Entre los caracteres que distinguen a dicho género se encuentran las células epiteliales con forma de tazón, el tamaño de las células subepiteliales que van de largas a más larga que sus derivados inmediatos, la presencia de fusiones celulares y de conceptáculos tetraesporangiales multiporados (Harvey & Woelkerling 2007) (Tabla XVIII).

Tabla XVIII.- Caracteres vegetativos y reproductivos a nivel de género. Información compilada de Womersley (1994) y Harvey & Woelkerling (2007).

Géneros	Forma de la célula epitelial	Caracteres		
		Tamaño de las células subepiteliales	Fusiones celulares	Conceptáculo tetraesporangial
<i>Lithothamnion</i>	Tazón	Largas	Presentes	Multiporado
<i>Lithophyllum</i>	Aplanada	Largas	Ausentes	Uniporado
<i>Phymatolithon</i>	Redonda	Cortas	Presentes	Multiporado
<i>Spongites</i>	Aplanada	Largas	Presentes	Uniporado

Con respecto a los registros de *Lithothamnion*, en el PSM, se tiene a *Lithothamnion australe* Foslie 1904 en las costas de Oaxaca (León-Álvarez & González-González 1993) y *Lithothamnion phymatodeum* Foslie 1902, en la Ropa, Zihuatanejo, Guerrero (Fragoso & Rodríguez 2002).

Wiliks & Woelkerling (1995) sugieren que la forma del conceptáculo esporangial, la forma y tamaño de las células adyacentes al poro y la presencia o ausencia de depresiones en el techo de los conceptáculos esporangiales, son los caracteres más importantes para diferenciar entre las especies de *Lithothamnion* en la región templada del Índico. En el lectotipo de la especie nominal los conceptáculos esporangiales son de forma ovalada y sin depresiones en el techo, las células que se encuentran rodeando el canal del poro del conceptáculo esporangial son de igual forma y tamaño (Womersley 1994). Los caracteres anteriores fueron observados en el presente estudio

Por otra parte, en las descripciones de *L. australe*, realizadas en el PSM, solo mencionan la presencia de conceptáculos con forma prominente pero no se hace

mención de la presencia o ausencia de depresiones en el techo de la cámara de los conceptáculos y tampoco sobre la forma y tamaño de las células que rodean los canales de los poros (Foslie 1899, Dawson 1953, 1960). Mientras que en *L. phymatodeum*, se menciona la presencia de conceptáculos con formas convexas a discoidales, el techo de la cámara de los conceptáculos se encuentra ligeramente deprimido, pero no se describen las formas y tamaños de las células que rodean los canales de los poros. (Foslie 1902, Fragoso & Rodríguez 2002). Por lo que se sugiere revisar de nueva cuenta el material recolectado por León-Álvarez & González-González (1993) y Fragoso & Rodríguez (2002).

*Lithothamnion muelleri* es una especie que tiene registros en diferentes regiones del planeta, aunque el material tipo se encuentra descrito para regiones templadas, específicamente en las costas de Nueva Zelanda (Robinson *et al.* 2013). Al comparar los caracteres encontrados en el presente estudio versus en el Golfo de California y Nueva Zelanda, se observa variación en los tamaños de las estructuras como son la altura de las células epiteliales, siendo más altas las del Golfo de California y las de menor altura las de Australia, por otra parte, no se tiene información morfométrica de las células sub-epiteliales para el Golfo de California y Australia. Para el caso de los caracteres reproductivos, los de mayor tamaño son los descritos en el presente estudio (Tabla XIX).

Tabla XIX.- Características reproductivas y vegetativas morfo-métricas de *L. cf. muelleri* de las localidades del PSM, así como para *L. muelleri* para el golfo de California, México y sur de Australia.

Característica	PSM	Golfo de California	Sur de Australia
Localidad	Playa Tijera, La Entrega e Isla Cacaluta, Oaxaca	Bahía Concepción	Western Port, Victoria, sur de Australia
Hábitat	10-30 m de profundidad	1-16 m de profundidad	-
Sustrato	Arenoso	-	-

#### MORFÓLOGICAS

Forma de crecimiento del talo	Fruticosa, grumosa, verugosa	Fruticoso	Incrustantes a verrugosas
Altura de las células epiteliales	3-5 $\mu\text{m}$	7-10 $\mu\text{m}$	1-8 $\mu\text{m}$
Diámetro de las células epiteliales	5-6 $\mu\text{m}$	2-5 $\mu\text{m}$	2-8 $\mu\text{m}$
Células sub-epiteliales		Largas o más largas que sus derivados inmediatos	Largas o más largas que sus derivados inmediatos
Diámetro	6-10 $\mu\text{m}$	-	-
Altura	6-9 $\mu\text{m}$	-	-
Diámetro de las células medulares	5-6 $\mu\text{m}$	-	2-15 $\mu\text{m}$
Altura de las células medulares	6-8 $\mu\text{m}$	-	2-30 $\mu\text{m}$
<b>REPRODUCTIVAS</b>			
Posición del conceptáculo tetraesporangial en el talo vegetativo	Superficiales e inmersos	-	-
Número de células en el techo de la cámara del conceptáculo	6-10	3-5	5-9
Forma de la cámara del conceptáculo esporangial	Ovales	-	-
Diámetro	500-600 $\mu\text{m}$	210-350 $\mu\text{m}$	280-750 $\mu\text{m}$
Altura	200-250 $\mu\text{m}$	100-210 $\mu\text{m}$	150-200 $\mu\text{m}$
Diámetro de las tetraesporas	40-60 $\mu\text{m}$	25-60 $\mu\text{m}$	30-140 $\mu\text{m}$
Altura de las tetraesporas	40-70 $\mu\text{m}$	50-120 $\mu\text{m}$	100-175 $\mu\text{m}$
Fuente	Presente estudio	Robinson <i>et al.</i> (2013)	Womersley (1994)

Como se mencionó anteriormente, en el PSM, Peralta-García & Rosas-Alquicira (2014) y Antonio-Sánchez (2015) registran la presencia de *L. muelleri* como una especie de algas rojas coralinas formadora de rodolitos. En la tabla XX, podemos observar que para los trabajos se registraron todos los caracteres distintivos de la especie nominal, así como sus medidas correspondientes. De la comparación

meristemática para los tres registros estos se encuentran en un mismo intervalo o los intervalos se traslapan; por ejemplo, el diámetro de las células epiteliales; aunque para el caso del diámetro de los esporangios en el trabajo de Peralta-García & Rosas-Alquicira (2014) estos son muy pequeños con respecto a los descritos por Antonio-sánchez (2015) y en el presente estudio. Sin embargo, los esporangios con mayor altura son los registrados por Peralta-García & Rosas-Alquicira (2014).

Tabla XX.- Características reproductivas y vegetativas morfo-métricas de *L. cf. muelleri* del PSM.

Característica	PSM		
Localidad	Playa Manzanillo y Carey, Guerrero e isla Cacaluta, Oaxaca	Playa Manzanillo y Carey, Guerrero e isla Cacaluta, Oaxaca	Playa Tijera, La Entrega e isla Cacaluta, Oaxaca
Hábitat	Submareal de 12-30 m de profundidad	Submareal de 12-30 m de profundidad	Submareal de 10-20 m de profundidad
Sustrato	Roca, Coral, algas (formando rodolitos)	Roca, Coral, algas (formando rodolitos)	Roca y coral
<b>MORFÓLOGICAS</b>			
Crecimiento del talo	verrugoso y fruticoso	Incrustante a verrugoso y fruticoso	Incrustante a verrugoso y fruticoso
Altura de las células epiteliales	2-4	8-9 $\mu\text{m}$	3-5 $\mu\text{m}$
Diámetro de las células epiteliales	3-8	2-4 $\mu\text{m}$	5-6 $\mu\text{m}$
Células sub-epiteliales	Largas a más largas	Igual de largas que sus derivados inmediatos	Cortas o iguales que sus derivados inmediatos
Diámetro	2.8-5	8-9 $\mu\text{m}$	6-10 $\mu\text{m}$
Altura	4.8-9	6-7 $\mu\text{m}$	6-9 $\mu\text{m}$
Diámetro de las células medulares	2.6-5.2	5-5.5 $\mu\text{m}$	7-10 $\mu\text{m}$
Altura de las células medulares	3.5-7.7	7-7.5 $\mu\text{m}$	6-8 $\mu\text{m}$
<b>REPRODUCTIVAS</b>			

Posición del conceptáculo tetraesporangial en el talo vegetativo	-	Inmerso y Superficial	Inmerso y Superficial
Número de células en el techo de la cámara del conceptáculo	5-6	5-12	6-10
Forma de la cámara del conceptáculo esporangial	-	Ovales	Ovales
Diámetro	220-466	500-600 $\mu\text{m}$	300-450 $\mu\text{m}$
Altura	106-190	200-250 $\mu\text{m}$	118-250 $\mu\text{m}$
Diámetro de las tetraesporas	25-50	40-60 $\mu\text{m}$	35-52 $\mu\text{m}$
Altura de las tetraesporas	80-120	40-70 $\mu\text{m}$	33-70 $\mu\text{m}$
Fuente	Peralta-García & Rosas-Alquicira (2014)	Antonio-Sánchez (2015)	Presente estudio

## 9.2. Determinación taxonómica mediante análisis molecular

### 9.2.1. Extracción de ADN

En el presente estudio se aplicaron siete métodos de extracción, de los cuales solo dos resultaron exitosos: el propuesto por Vidal *et al.* (2002) y el modificado de Rojas-Herrera *et al.* (2008), siendo este último el de mejor calidad y de menor costo.

El método propuesto por Rojas-Herrera *et al.* (2018) y modificado en el presente estudio, es muy sencillo, económico y acelera el trabajo requerido. Para este protocolo no se requiere gran cantidad de tejido, con solo 3 mm<sup>3</sup> se obtuvo ADN. Es importante mencionar que mientras el tejido es fresco, el éxito de obtener un ADN de mejor calidad es mayor, ya que con muestras preservadas más de un año en silica gel, el ADN obtenido se encontraba degradado y al amplificar, las secuencias presentaban baja calidad para análisis posteriores. La utilización de sílice (SiO<sub>2</sub>) al 4% y de una pequeña cantidad de tejido, resultaron importantes para lograr la extracción de ADN. La sílice ayudó a conservar mejor el ADN ya que lo encapsula evitando contaminación alguna (Rojas-Herrera *et al.* 2018).

El método propuesto por Vidal *et al.* (2002) no se utilizó, debido a que no se observaron bandas intensas y porque los reactivos utilizados son dañinos para la salud y difíciles de desechar, como es el cloroformo y el Beta-mercaptoetanol.

Finalmente, en los protocolos DNeasy Plant Mini Kit®; DNeasy Blood & Tissue Kit®; Gabrielson *et al.* (2011) y Sales, no se logró observar ADN alguno de las muestras, esto pudo deberse a que el tejido presentaba exceso de carbonato o al método y tiempo de preservación. En este trabajo los ejemplares fueron preservados en sílica gel, mismo que se recomienda en trabajos anteriores. El problema fue que, a lo largo del tiempo, se observó la formación de hongos y la descomposición del tejido, por lo que se recomienda usar sílica gel solo para retirar el exceso de humedad y no como un método de preservación, para ello es recomendable preservar las muestras en congelación y alcohol al 70-90%.

## 9.2.2. Análisis de secuencias

### 9.2.2.1. Reconstrucción filogenética con el marcador molecular *COI*

En el análisis filogenético con las secuencias de *COI*, no se pudo contrastar con alguna secuencia perteneciente a la especie nominal *L. muelleri*, debido a que no existe alguna en el GenBank. Por otra parte, la secuencia PHYKOS7249 (KU504277) perteneciente a *Lithothamnion* sp., registrada para la costa de Panamá por Richards *et al.* (2016), se agrupó con la especie determinada en el presente estudio. Al observar un soporte *bootstrap* de 492 para el clado (Fig. 12) y al obtener una distancia genética del 0.4% (Tabla XIII), se sugiere que ambos especímenes pertenecen a la misma especie.

Al respecto de los caracteres anatómicos descritos para *Lithothamnion* sp. PJKOS7249 (KU504277) por Richards *et al.* (2016, Fig. 15A-F), se tiene que la especie se encuentra formando rodolitos, posee un talo sin protuberancias, creciendo sobre roca y de forma incrustante, se observan fusiones celulares entre filamentos adyacentes. Las vistas superficiales de las células epiteliales muestran que las células poseen un contorno poligonal y de manera transversal las células son aplanadas. Las células subepiteliales son más grandes o cortas que sus derivados inmediatos.

Aunque los caracteres vegetativos de *Lithothamnion* sp. PJKOS7249 (KU504277), coinciden con los caracteres descritos para la especie del presente

estudio, faltaría contrastar los caracteres reproductivos entre ambas especies, debido a que en el trabajo de Richards *et al.* (2016) no se describieron estructuras reproductivas. Es importante mencionar que los caracteres reproductivos asociados a la anatomía del techo del conceptáculo esporangial, han sido descritos como importantes para distinguir entre especies de *Lithothamnion* (Woemersley 1994).

#### 9.2.2.2. Reconstrucción filogenética con el marcador molecular *psbA*

Al realizar el análisis genético con el marcador molecular *psbA*, se corrobora lo obtenido con la reconstrucción filogenética con el marcador *COI*, ya que la especie determinada en el presente estudio quedo en el mismo clado que *Lithothamnion* sp. PJKOS7249 (KP844865), secuencia perteneciente al espécimen descrito por Richards *et al.* (2016, Fig. 15A-F) para las costas de Panamá.

En el árbol filogenético las especies *L. muelleri* GALW:15734 (JQ896241) perteneciente a un ejemplar de la Isla San José en el Golfo de California, México y *Lithothamnion* sp. FRA2177 (KJ710349) perteneciente a un ejemplar del archipiélago de Guadalupe, Francia en el Caribe, se agrupan en un mismo clado, por lo que asumimos que son la misma especie, esto se pudo corroborar con el análisis de distancia pareada, ya que se obtuvo una distancia genética de 4% (Tabla XVI).

Al realizar el análisis de distancia media entre grupos, el clado perteneciente a la especie descrita en el presente estudio versus el clado en donde se encuentra la especie denominada *L. muelleri*, se obtuvo una distancia genética de 9% (Tabla XVII), lo que sugiere la existencia de especies crípticas, es decir especies que morfológicamente son semejantes pero que genéticamente son distintas (Richards *et al.* 2016).

Aunque no se tenga descripción alguna de la especie sugerida como *Lithothamnion muelleri*, se puede tomar como referencia lo descrito por Peña *et al.* (2014c) para *Lithothamnion* sp. FRA2177 (KJ710349) con el objetivo de ser comparado con la descrita en el presente estudio. A continuación, se presenta la descripción de *Lithothamnion* sp. FRA2177 (KJ710349), realizada por Peña *et al.* (2014c, Fig. 9A-D), para la provincia de MEN:

Talo formando rodolitos, con crecimiento verrugosa a grumosa y discoidal, se observa una construcción monómera y una organización radial de las ramas. Las células adyacentes presentan fusiones celulares, no se observaron conexiones pit secundarias. Las células epiteliales se producen en una sola capa y se encuentran aplanadas. Las células subepitales son tan largas o más cortas que sus derivados inmediatos. No se observaron estructuras reproductivas.

Como se mencionó anteriormente, uno de los caracteres para poder separar al género *Lithothamnion* dentro de la familia Lithothamniaceae, es la forma de las células subepiteliales, que en este caso son largas a más largas que sus derivados inmediatos (Womersley 1994, Harvey & Woelkerling 2007). Sin embargo, en el presente estudio las células van de ser cortas o iguales que sus derivados inmediatos, cabe mencionar que este patrón se observó en lo descrito por Richards *et al.* (2016) y en Peña *et al.* (2014c). Este resultado nos da un indicio de que existe una carencia de caracteres anatómicos que puedan separar a las especies. Peña *et al.* (2014c) sugieren volver a examinar de nueva cuenta el concepto de células subepiteliales como un carácter diagnóstico para delimitar géneros, ya que la división celular es muy activa en dichas células, esto mismo se observa en los resultados de Antonio-Sánchez (2015).

Richards *et al.* (2016), sugieren que para estudios futuros y con la finalidad de tener una mejor resolución de *L. muelleri* en el hemisferio norte versus en el hemisferio sur, es importante analizar las secuencias de ADN generadas a partir del lectotipo y la secuencia obtenida por Hernández-Kantún para el Golfo de California.

### **9.3. Distribución de la especie nominal *Lithothamnion muelleri***

La especie nominal ha sido registrada para América oriental, desde Alaska hasta Chile, en el Atlántico oriental tropical y subtropical, Atlántico occidental, en el sureste de Asia, en la Antártida y las islas sub-antárticas. Pero debido a que la localidad tipo es Western Port, Victoria, sur de Australia (Womersley 1994), se generan cuestionamientos en relación a la identificación de la especie en diferentes regiones.

En el análisis con el marcador molecular *psbA* (Fig. 13), se observa una distribución disyunta, con la especie propuesta como *Lithothamnion muelleri* GALW:15734 (JQ896241) ya que se distribuye en el Pacífico Oriental subtropical y con

la especie *Lithothamnion* sp. FRA2177 (KJ710349), que se encuentra en el Atlántico tropical. Este patrón de distribución puede deberse a la gran resistencia que presentan las esporas en el ambiente y al poder sujetarse a algún sustrato flotante vivo o inerte (“rafting”) (Thiel & Gutow 2005, Lyons & Scheibling 2009).

Fraser *et al.* (2013) analizaron el genotipo del alga roja no coralina *Bostrychia intricata* (Bory de Saint-Vincent) Montagne 1852, en distintas localidades y encontraron que la especie presenta una distribución amplia, desde Chile hasta las islas Malvinas en Argentina e isla Marion en África (6,500 km) y lo atribuyen a la viabilidad de la reproducción de los organismos maduros y a la gran resistencia de sus esporas.

Por otra parte, Peña *et al.* (2014b), al identificar a la especie *Phymatolithon calcareum*, a partir de gametofitos con análisis genéticos, observaron que la distribución o propagación del alga se debe principalmente a la fragmentación de ramas con conceptáculos esporangiales y no a la reproducción sexual, ya que este último se encontraba con muy poca frecuencia, llegando a concluir que los gametofitos pasan la mayor parte de su historia de vida como plantas vegetativas.

Aunque no podamos sugerir que *L. muelleri* GALW:15734 (JQ896241) y *Lithothamnion* sp. FRA2177 (KJ710349), correspondan a la especie nominal, es importante realizar un estudio filogeográfico para observar y comprender el mecanismo de distribución de dichas especies.

Finalmente de manera descriptiva, los caracteres vegetativos anatómicos descritos en el trabajo de Richards *et al.* (2016) y Peña *et al.* (2014c), coinciden con lo descrito en el presente estudio, es importante mencionar que para poder discriminar a las especies del género *Lithothamnion* se deben observar las estructuras reproductivas como son la forma y posición de la cámara del conceptáculo, la forma y tamaño de las células que bordean los canales de los poros de los conceptáculos y número de células en el techo de la cámara del conceptáculo.

Por lo que se recomienda revisar de nueva cuenta el material analizado por Hernández-Kantún, Richards *et al.* 2016, Peña *et al.* (2014c) y el material de la colección tipo (i.e. lectotipo/topotipo), para así contrastarlo de manera morfo-anatómica y molecular con la especie descrita en el presente estudio.

## 10. Conclusión

- No podemos asumir la validación de *L. muelleri* como una especie formadora de rodolitos en el PSM, debido a que no se comparó con alguna secuencia del material tipo, sin embargo, resultó altamente similar a *Lithothamnion* sp. PHYKOS7249 identificada previamente en Panamá por Richards *et al.* (2016).
- Confirmamos parcialmente, que el uso de la genética como una herramienta para la identificación de especies en conjunto con el análisis de caracteres morfo-anatómicos, nos brinda una mejor resolución de la riqueza de especies.
- El análisis de las secuencias de *psbA* *Lithothamnion muelleri* GALW:15734 (JQ896241) y *Lithothamnion* sp. FRA2177 (KJ710349), disponibles en el GenBank, nos demuestra la presencia de especies con distribución disyunta.
- El análisis filogenético y de divergencia, nos da indicios de que la especie descrita en el presente estudio es semejante a *Lithothamnion* sp. PHYKOS7249, descrita para el Pacífico de Panamá.
- Es importante revisar de nueva cuenta el ejemplar descrito por Hernández-Kantún y el material lectotipo/topotipo de *L. muelleri*, esto para tener una mejor resolución de la especie.
- Es necesario continuar trabajando con estudios morfológicos y genéticos de las algas rojas coralinas formadoras de rodolitos utilizando morfología tipo y poder diferenciar a las especies.
- Para poder confirmar la presencia de una especie, se requiere de las secuencias de los especímenes tipo.
- Es importante generar más secuencias con los marcadores *COI* y *psbA* para el PSM y poder ampliar el conocimiento de este grupo.

- Se recomienda el uso de material fresco, para la extracción ADN, debido a que en las muestras que se tuvieron más de un año en preservación, se dificultó la obtención del ADN.
- El uso de la silica gel, solo se recomienda para disminuir la humedad, pero no para la preservación de los ejemplares. Sin embargo, se recomienda preservar las muestras en congelación.

## 11. Referencias

- Adey, W.H., J.J. Hernández-Kantún, G. Johnson & P.W. Gabrielson. 2015. DNA sequencing, anatomy, and calcification patterns support a monophyletic, subarctic, carbonate reef-forming *Clathromorphum* (Hapalidiaceae, Corallinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 51(1): 189–203.
- Aguirre, J., J.C. Braga & R. Riding. 2002. La diversificación de las algas rojas inarticuladas (Corallinales, Rhodophyta). *In* Soler, M. (ed.), *Evolución: la base de la biología*. Proyecto Sur de Ediciones, Granada, España, 527-534 pp.
- Akaike, H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. *Second International Symposium on Information Theory*. Akademia Kiado, Budapest. Septiembre 1971, 267-281 pp.
- Amado-Filho, G.M., G.W. Maneveldt, G.H. Pereira-Filho, R.C.C. Manso, R.G. Bahia, M.B. Barros-Barreto & S.M.P.B. Guimarães. 2010. Diversidad de macroalgas asociada con un manto de rodolitos tropical de Brasil. *Ciencias Marinas* 36(4): 371-391.
- Antonio-Sánchez, J.M. 2015. Algas rojas coralinas no geniculadas formadoras de rodolitos (Rhodophyta: Corallinales) de las playas Manzanillo y Carey, Guerrero, e isla Cacaluta, Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura. Universidad del Mar. Puerto Ángel, Oaxaca, México.

- Antonio-Sánchez, J.M., S. Sánchez-Palestino & E.F. Rosas-Alquicira. 2015. Técnica histológica para algas calcáreas. *Ciencia y Mar* XVII (49): 59-69.
- Anglès d'Auriac, M.B., L. Le Gall, V. Peña, J.M. Hall-Spencer, R.S. Steneck, S. Fredriksen & E. Rinde. 2019. Efficient coralline algal *psbA* mini barcoding and High Resolution Melt (HRM) analysis using a simple custom DNA preparation. *Scientific Reports*, 9(578): 1-9.
- Barton, E.D., M.F. Lavín & A. Trasviña. 2009. Coastal circulation and hydrography in the Gulf of Tehuantepec, Mexico, during winter. *Continental Shelf Research* 29(1): 485-500.
- Basso, D., A. Caragnano & G. Rodondi. 2014. Trichocytes in *Lithophyllum kotschyianum* and *Lithophyllum* spp. (Corallinales, Rhodophyta) from the NW Indian Ocean. *Journal of Phycology* 50(1): 711-717.
- Basso, D., A. Caragnano, L. Le Gall & G. Rodondi. 2015. The genus *Lithophyllum* in the north-western Indian Ocean, with description of *L. yemenense* sp. nov., *L. socotraense* sp. nov., *L. subplicatum* comb. et stat. nov., and the resumed *L. affine*, *L. kaiserii*, and *L. subreduncum* (Rhodophyta, Corallinales). *Phytotaxa* 208(1): 183-200.
- Bittner, L., S. Halary, C. Payri, C. Cruaud, B. De Reviers, P. Lopez & E. Bapteste. 2010. Some considerations for analyzing biodiversity using integrative metagenomics and gene networks. *Biology Direct* 5(47): 1-17.
- Bolivar, A.M., A. Rojas & P. García-Lugo. 2014. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina* 3(1): 25-33.

- Bordehore, C., A.A. Ramos-Esplá & R. Ríosmena-Rodríguez. 2003. Comparative study of two maërl beds with different otter trawling history, SE Iberian Peninsula. *Aquatic conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 13(1): 543-554.
- Broom, J.E.S., D.R. Hart, T.J. Farr, W.A. Nelson, K.F. Neil, A.S. Harvey & W.J. Woelkerling. 2008. Utility of *psbA* and *nSSU* for phylogenetic reconstruction in the Corallinales based on New Zealand taxa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46(1): 958-973.
- Carranza, A., L. Rosales & R. Lozano. 1988. Estudio sedimentológico de las playas del estado de Oaxaca. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología* 15(2): 23-37.
- Chapa-Balcorta, C., J.M. Hernández-Ayón, R. Durazo, E. Beier, S.R. Alin, & A. López-Pérez. 2015. Influence of post-Tehuano oceanographic processes in the dynamics of the CO<sub>2</sub> system in the Gulf of Tehuantepec, Mexico. *Journal of Geophysical Research: Oceans* 120(12): 7752-7770.
- Cox, A.J. & P.D. Hebert. 2001. Colonization, extinction and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology* 10(1): 371-386.
- Dawson, E.Y. 1953. Marine red algae of Pacific Mexico. Part 1 Bangiales to Corallinaceae subf. Corallinoidae. *Allan Hancock Pacific Expedition* 17(1): 1-239.
- Dawson, E.Y. 1960. Mexican red algae. *Pacific Naturalist*: 2(1): 20-25.
- Erlich H.A. 1990. *PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification*. New York: Stockton, 246 pp.

- Farr, T., J. Broom, D. Hart, K. Neill & W. Nelson. 2009. Common coralline algae of northern New Zealand: identification guide. NIWA Information series 1(70): 1-125.
- Foslie, M. 1899. Some new or critical *Lithothamnium*. Det Kongelige Norske Videnskabers Selskabs Skrifter 1898(6): 1-19.
- Foslie, M. 1902. New species or forms of Melobesieae. Det Kongelige Norske Videnskabers Selskabs Skrifter 1902(2): 1-11.
- Foster, M.S. 2001. Rhodoliths: Between rocks and soft places. Journal of Phycology 37(5): 659-667.
- Foster, M.S., L.M. McConnico, L. Lundsten, T. Wadsworth, T. Kimball, L.B. Brooks, M. Medina-Lopez, R. Riosmena-Rodríguez, G. Hernández-Carmona, R. M. Vasquez-Elizondo, S. Johnson & D.L. Steller. 2007. Diversidad e historia natural de una comunidad de *Lithothamnium muelleri* y *Sargassum horridum* en el golfo de California. Ciencias Marinas 33(4): 367-384.
- Fiedler, P.C. 1992. Seasonal climatology and variability of Eastern tropical Pacific surface waters. NOAA Technical Report. Southwest Fisheries Science Center 1(109): 1-65.
- Fragoso, D. & D. Rodríguez. 2002. Algas coralinas no geniculadas (Corallinales: Rhodophyta) en el Pacífico tropical mexicano. Anales del Instituto de Biología, serie Botánica 73(2): 97-136.
- Fraser, C.I., G.C. Zuccarello, G.S. Hamish, L.C. Salvatore, G.R. Garcia & J.M. Waters. 2013. Genetic Affinities between Trans-Oceanic Populations of Non-Buoyant Macroalgae in the High Latitudes of the Southern Hemisphere. PLoS ONE 8(7): 1-12.

- Gabrielson, P.W., K.A. Miller & P. Martone. 2011. Morphometric and molecular analyses confirm two distinct species of *Calliarthron* (Corallinales, Rhodophyta), a genus endemic to the northeast Pacific. *Phycologia* 50(1): 298-316.
- García, E. 1989. Climas. IV.4.10. En la obra Atlas Nacional de México. Escala 1:4,000,000. Volumen II. Instituto de Geografía.
- Glynn, P.W. & G.E. Leyte-Morales. 1997. Coral reefs of Huatulco, west México. Reef development in upwelling Gulf of Tehuantepec. *Revista de Biología Tropical* 45(1): 1033-1047.
- Gómez-Rojo, V.R., J.M. Domínguez-Licona & T.D. González-Hernández. 2006. Análisis territorial de la micro-cuenca y bahía del río Cacaluta, Santa María Huatulco, Oaxaca. *Investigaciones Geográficas* 60(1): 22-45.
- Guindon S., J.F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk & O. Gascuel. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59(3): 307-21.
- Guiry, M.D. & G.M. Guiry. 2019. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Consultado el 12 de marzo del 2017 en: <http://www.algaebase.org>.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41(1): 95-98.
- Hall-Spencer, J. & P.G. Moore. 2000. Scallop dredging has profound, long-term impacts on maërl habitats. *ICES Journal of Marine Science* 57(5): 1407-1415.

- Hall-Spencer, J., N. White, G. Gillespie, K. Gillham & A. Foggo. 2006. Impact of fish farms on maërl beds in strongly tidal areas. *Marine Ecology Progress Series* 326(1): 1-9.
- Hall-Spencer, J.N., J. Kelly & C.A. Maggs. 2010. Background document for maërl. OSPAR Commission, 491/2010, 36 pp.
- Harvey, A.S., S.T. Broadwater; W.J. Woelkerling & P.J. Mitrovski. 2003. *Choreonema* (Corallinales, Rhodophyta): 18S rDNA phylogeny and resurrection of the Hapalidiaceae for the subfamilies Choreonematoideae, Austrolithoideae and Melobesioideae. *Journal of Phycology* 39(1): 988-998.
- Harvey, A.S., W.J. Woelkerling, T. Farr, K. Neill & W. Nelson. 2005. Coralline algae of central New Zealand: an identification guide to common “crustose” species. NIWA Information series 1(57): 1-145.
- Harvey, A.S. & W.J. Woelkerling. 2007. A guide to nongeniculate coralline red algal (Corallinales, Rhodophyta) rhodolith identification. *Ciencias Marinas* 33(4): 411-426.
- Hernández-Kantún, J.J., R. Riosmena-Rodríguez, W. Adey & F. Rindi. 2014. Analysis of the *cox2-3* spacer region for population diversity and taxonomic implications in rhodolith-forming species (Rhodophyta: Corallinales). *Phytotaxa* 190(1): 331-354.
- Hernández-Kantún, J.J., F. Rindi, H.W. Adey, L. Le Gall, V. Peña & P. Gabrielson. 2015. Sequencing type material resolves the identity and distribution of the generitype *Lithophyllum incrustans*, and related European species *L. hibernicum* and *L. bathyporum* (Corallinales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 51(1): 791-807.

- Hernández-Kantún, J.J., P. Gabrielson, J.R. Hughey, L. Pezzolesi, F. Rindi, N.M. Robinson, V. Peña, R. Riosmena-Rodríguez, L. Le Gall, & W. Adey. 2016. Reassessment of branched *Lithophyllum* spp. (Corallinales, Rhodophyta) in the caribbean Sea with global implications. *Phycologia* 55 (6): 619-639.
- Hinojosa-Arango, G. & R. Riosmena-Rodríguez. 2004. Influence of rhodolith-forming species and growth-form on associated fauna of rhodolith beds in the Central-West Gulf of California, México. *PSZNI Marine Ecology* 25(2):109–127
- Hind, K.R. & G.W. Saunders. 2013. A molecular phylogenetic study of the tribe Corallineae (Corallinales, Rhodophyta) with an assessment of genus-level taxonomic features and descriptions of novel genera. *Journal of Phycology* 49(1):103-14.
- Irvine, L.M. & Y.M. Chamberlain. 1994. *Seaweeds of the British Isles, 1 (2B). Corallinales, Hildenbrandiales*. London: Her Majesty's Stationery Office, 276 pp.
- Johansen, H.W. 1981. *Coralline Algae, a first synthesis*. CRC Press. Boca Ratón, Florida, 239 pp.
- Jesionek, M.B., R.G. Bahia, J.J. Hernández-Kantún, W.H. Adey, Y. Yoneshigue-Valentin, L.L. Longo & G. M. Amado-Filho. 2016. A taxonomic account of non-geniculate coralline algae (Corallinophycidae, Rhodophyta) from shallow reefs of the Abrolhos Bank, Brazil. *ALGAE* 31(4): 317–340.
- Kamenos, N.A., P.G. Moore & J.M. Hall-Spencer. 2004. Nursery-area function of maërl grounds for juvenile queen scallops *Aequipecten opercularis* and other invertebrates. *Marine Ecology Progress Series* 274(1): 183–189.
- Kessler, B. 2006. The circulation in the Eastern Tropical Pacific: a review. *Progress in Oceanography* 69(1): 181-217.

- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16(1): 111-120.
- Knowlton, N. & L.A. Weigt. 1998. New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Royal Society B: Biological Sciences* 265(1): 2257-2263.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz & K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35(1):1547-1549.
- León-Álvarez, D. & J. González-González. 1993. Algas costrosas del Pacífico tropical. *In* S.I. Salazar-Vallejo & N.E. González (ed.). *Biodiversidad marina y costera de México*, México: CONABIO y CIQROO, pp: 456-474.
- Lavine, M.F., E. Beier & A. Badan. 1997. Estructura hidrográfica y circulación del Golfo de California: Escalas estacionales e interanuales. *Contribuciones a la oceanografía, Unión Geofísica Mexicana* 3(1):141-171.
- Leyte-Morales, G.E. 2001. Estructura de la comunidad de corales y características geomorfológicas de los arrecifes coralinos de Bahías de Huatulco, Oaxaca, México. Tesis de Maestría. Universidad del Mar. Puerto Ángel, Oaxaca, México.
- Littler, M., D.S. Littler & M.D. Hanisak. 1991. Deep-water rhodolith distribution, productivity, and growth history at sites of formation and subsequent degradation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 150(2): 163-182.

- Littler, M.M. & D.S. Littler. 2008. Coralline algal rhodoliths from extensive benthic communities in the Gulf of Chiriqui, Pacific Panama. *Coral Reefs* 27(3): 553-553.
- López-Benito, M. 1963. Estudio de la composición química del *Lithothamnion calcareum* (Aresch.) y su aplicación como corrector de cultivo. *Investigación Pesquera* 23(1): 53-70.
- Lynch, M. & P.E. Jarrell. 1993. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics* 135(1): 1197-1208.
- Lyons, D.A. & R.E. Scheibling. 2009. Range expansion by invasive marine algae: rates and patterns of spread at a regional scale. *Biodiversity Research* 15(5): 762-775.
- Melbourne, L. A., J. J. Hernández-Kantún, S. Russell, & J. Brodie. 2017. There is more to maerl than meets the eye: DNA barcoding reveals a new species in Britain, *Lithothamnion erinaceum* sp. nov. (Hapalidiales, Rhodophyta). *European Journal of Phycology* 52(2): 166-178.
- Mateo-Cid, L.E. & A.C. Mendoza-González. 1997. Nuevos registros de algas marinas para Oaxaca, México. *Polibotánica* 4(1): 54-74.
- Mateo-Cid, L.E., C. Mendoza-González & P.W. Gabrielson. 2014. *Neogoniolithon* (Corallinales, Rhodophyta) on the Atlantic coast of Mexico, including *N. siankanensis* sp. *Phytotaxa* 190(1): 64-93.
- Mendoza-González, A.C. & L.E. Mateo-Cid. 1999. Adiciones a la ficoflora marina bentónica de las costas de Oaxaca, México. *Polibotánica* 10(1): 39-58.

- Mitchell-Arana, L.M. 1994. Perfil del coral y especies asociadas en La Entrega, Bahías de Huatulco, Oax. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mullis K.B, Faloona F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155(1): 335–350.
- Pacheco, P. & O.M. Ayala. 1991. Pacífico Tropical Mexicano: Oceanografía Física. En: De la Lanza. *Oceanografía de Mares Mexicanos*. AGT. México, 518 pp.
- Pardo, C., L. López, V. Peña, J.J. Hernández-Kantún, L. Le Gall, I. Bárbara & R. Barreiro. 2014. A multilocus species delimitation reveals a striking number of species of coralline algae forming maërl in the OSPAR maritime area. *PLoS ONE* 9(1): e104073.
- Pennington, J.T., K.L. Mahoney, S.V. Kuwahara, D.D. Kolber, R. Calienes & F.P. Chavez. 2006. Primary production in the eastern tropical Pacific: A review. *Progress in Oceanography* 69(1): 285-317.
- Peña, V. & I. Bárbara. 2007. Los fondos de maërl en Galicia. *Algas* 37(4): 1-37.
- Peña, V. & I. Bárbara. 2008. Maërl community in the northwestern Iberian Peninsula: a review of floristic studies and longterm changes. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 18(1): 339-366.
- Peña, V., I. Bárbara, J. Grall, C.A. Maggs & J.M. Hall-Spencer. 2014a. The diversity of seaweeds on maërl in the NE Atlantic. *Marine Biodiversity* 44(4): 533-551.
- Peña, V., J.J. Hernández-Kantún, J. Grall, C. Pardo, L. López, I. Bárbara, L. Le Gall & R. Barreiro. 2014b. Detection of gametophytes in the maërl -forming species

*Phymatolithon calcareum* (Melobesioideae, Corallinales) assessed by DNA barcoding. *Cryptogamie, Algologie* 35(1): 15-25.

Peña, V., F. Rousseau, B. De Reviers & L. Le Gall. 2014c. First assessment of the diversity of coralline species forming maerl and rhodoliths in Guadeloupe, Caribbean using an integrative systematic approach. *Phytotaxa* 190(1): 190-215.

Peña, V., C. Pardo, L. López, B. Carro, J.J. Hernández-Kantún, W.H. Adey, I. Bárbara, R. Barreiro & L. Le Gall. 2015. *Phymatolithon lusitanicum* sp. nov. (Hapalidiales, Rhodophyta): the third most abundant maerl-forming species in the Atlantic Iberian Peninsula. *Cryptogamie, Algologie* 36(1): 429-459.

Peña, V., J.J. Hernández-Kantún, W.H. Adey & L. Le Gall. 2018. Assessment of Coralline Species Diversity in the European Coasts Supported by Sequencing of Type Material: The Case Study of *Lithophyllum nitorum* (Corallinales, Rhodophyta). *Cryptogamie, Algologie* 39(19): 123-137.

Peralta-García, E.C. & E.F. Rosas-Alquicira. 2014. Range extension and morphological characterization of rhodolith-forming species (Corallinales, Rhodophyta) from shallow water in the Mexican South Pacific. *Helgoland Marine Research* 68(4): 503-510.

Richards, J.L., P.W. Gabrielson & S. Fredericq. 2014. New Insights into the genus *Lithophyllum* (Lithophylloideae, Corallinaceae, Corallinales) from deep water rhodolith beds offshore the NW Gulf of Mexico. *Phytotaxa* 190 (1): 162-175.

Richards, J.L., W. Schmidt & T. Sauvage. 2016. Molecular and morphological diversity of *Lithothamnion* spp. (Hapalidiales, Rhodophyta) from Deepwater rhodoliths beds in the Northwestern Gulf of Mexico. *Phytotaxa* 278(2): 81-114.

- Riosmena-Rodríguez, R., W.J. Woelkerling & M.S. Foster. 1999. Taxonomic reassessment of rhodolith-forming species of *Lithophyllum* (Corallinales, Rhodophyta) in the Gulf of California, Mexico. *Phycologia* 38(5): 401-417.
- Riosmena-Rodríguez, R., D.L. Steller & M.S. Foster. 2007. Trabajos selectos de investigación sobre rodolitos. *Ciencias Marinas* 33(4): 1-2.
- Robinson, M.N. 2013. Sistemática de las especies de algas coralinas (Corallinophycidae, Rhodophyta) formadoras de mantos de rodolitos en el Pacífico Tropical Oriental. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California Sur. La Paz, Baja California.
- Robinson, M.N., G.I. Hansen, C. Fernández-García & R. Riosmena-Rodríguez. 2013. A taxonomic and distributional study of the rhodolith-forming species *Lithothamnion muelleri* (Corallinales, Rhodophyta) in the Eastern Pacific Ocean. *Algae* 28(1): 63-71.
- Rojas-Herrera, R., J. Narváez-Zapata, M. Zamudio-Maya & M.E. Mena-Martínez. 2008. A simple silica-based Method for Metagenomic DNA Extraction from soil and sediments. *Molecular Biotechnology* 40(1): 13-17.
- Rosas-Alquicira, E.F. 2002. Dinámica de frondas y reproducción de *Amphiroa beauvoisii* Lamoroux (Corallinales: Rhodophyta) en bahía Asunción, B.C.S. Tesis de Licenciatura. Universidad del Mar, Oaxaca, México.
- Saiki.R.K, Gelfand.D.H, Stoffel.S. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(1): 487-491.
- Saunders, G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360(1): 1879-1888.

- Saunders, G.W. 2014. Long distance kelp rafting impacts seaweed biogeography in the Northeast Pacific: the kelp conveyor hypothesis. *Journal of Phycology* 50(6): 968–974.
- Schwarz, G. 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* 6(2): 461–464.
- Secretaría de Desarrollo Social (SEDESOL). 2013. Unidad de Microregiones. Consultado el 3 de marzo del 2017 en: <http://www.microrregiones.gob.mx/catloc/LocdeMun>.
- Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2002. Programa de manejo del Parque Nacional Huatulco, México, 164 pp.
- Seo, K.S., T. Cho, J.S. Park, E.C. Yang, H.S. Yoon & S.M. Boo. 2003. Morphology, basiphyte range, and plastid DNA phylogeny of *Campylaephora borealis* stat. nov. (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Taxon* 52(1): 9-19.
- Simmons, R.B. & S.J. Weller. 2001. Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 20(1): 196-210.
- Spalding, M.D., H.E. Fox, G.R. Allen, N. Davison, Z.A. Ferdaña, M. Finlayson, B.S. Halpern, M.A. Jorge, A. Lombana, S.A. Lourie, K.D. Martin, E. McManus, J. Molnar, C.A. Recchia & J. Robertson. 2007. Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience* 57(7): 573-583.
- Soltis, P. & J.J. Soltis. 1998. *Molecular Systematics of Plants II: DNA sequencing*. 1a ed. Cornell University, department of Botany, 574 pp.

- Steller, D.L., R. Riosmena-Rodríguez, C. Roberts & M.S. Foster. 2003. Rhodolith bed diversity in the Gulf of California: The importance of rhodolith structure and consequences of anthropogenic disturbances. *Aquatic Conservation Marine and Freshwater Ecosystems* 13(1): S5-S20.
- Thiel, M. & L. Gutow. 2005. The ecology of rafting in the marine environment the floating substrata. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* (42): 181-263.
- Trasviña, A., D. Lluch, A. Filonov & A. Gallegos. 1999. El Pacífico Tropical Mexicano y “El Niño”. Cap. 3; pp: 69-101 *In*: Magaña V., Impacto de El Niño en México. Centro de ciencias de la Atmosfera, Universidad Nacional Autónoma de México, con dirección General de Protección civil, Secretaria de Gobernación, México. Consultado el 15 de enero del 2014 en <https://www.atmosfera.unam.mx/ciencias-atmosfericas/cambio-climatico-y-radiacion-solar/>.
- Vidal, R., I. Meneses & M. Smith. 2002. Enhanced DNA extraction and PCR amplification of SSU ribosomal genes from crustose coralline algae. *Journal of Applied Phycology* 14(1): 223-227.
- Vieira-Pinto, T., M.C. Oliveira, J. Bouzon, M. Sissini, J.L. Richards, R. Riosmena-rodríguez & P.A. Horta. 2014. *Lithophyllum* species from Brazilian coast: range extension of *Lithophyllum margaritae* and description of *Lithophyllum atlanticum* sp. nov. (Corallinales, Corallinophycidae, Rhodophyta). *Phytotaxa* 190(1): 355-369.
- Wares, J.P. & C.W. Cunningham. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution* 12(1): 2455-2469.
- Wicader, R. & J.S. Monroe. 2000. *Fundamentos de Geología*. 2a ed., International Thomson Editores, Ciudad de México, 440 pp.

- Wilks, K.M. & W.J. Woelkerling. 1995. An account of southern Australian species of *Lithothamnion* (Corallinaceae, Rhodophyta). Australian Systematic Botany 8(4): 549-583.
- Woelkerling, J.W. 1983. A taxonomic reassessment of *Lithothamnium* (Corallinaceae, Rhodophyta) based on studies of R. A. Philippi's original collections. British Phycological Society 18(2): 165-197.
- Woelkerling, J.W. 1988. The coralline red algae: An analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate Corallinaceae. Oxford University Press, Oxford, 662 pp.
- Woelkerling, W.J., L.M. Irvine & A.S. Harvey. 1993. Growth-forms in non-geniculate coralline red algae (Corallinales, Rhodophyta). Australian Systematic Botany 6(6): 77-293.
- Womersley, H.B.S. 1994. The marine benthic flora of Southern Australia Rhodophyta part. IIIB. The Botanic Gardens Adelaide and State Herbarium and the Department of Botany, University of Adelaide South Australia, 391 pp.
- Yang, E.C. & S.M. Boo. 2004. Evidence for two independent lineages of *Griffithsia* (Ceramiaceae, Rhodophyta) based on plastid protein-coding *psaA*, *psbA*, and *rbcL* gene sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 31(1): 680-688.
- Yoon, H.S., D.J. Hackett & D. Bhattacharya. 2002. A single origin of the peridinin and fucoxanthin containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis. Proceedings of the National Academy of Sciences 99(18): 11724-11729.

## 12. Anexos

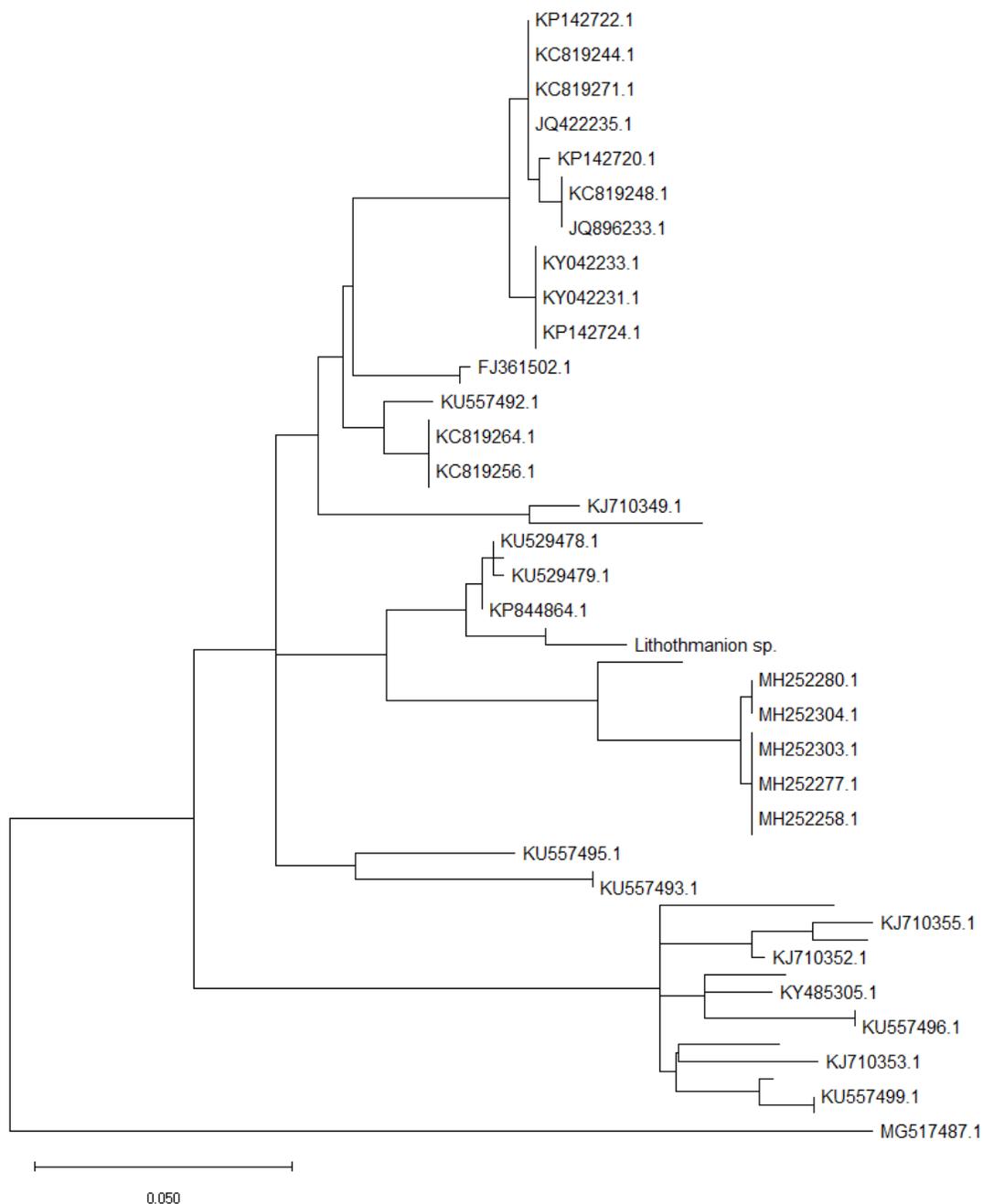
Anexo I.- Colección de datos, números de acceso y vouchers en GenBank, de las especies de *Lithothamnion* y *Lithophyllum* utilizados en los análisis del presente estudio.

Id. No.	Especie	Referencia	Localidad	Número de acceso en Genbank	
				<i>COI</i>	<i>psbA</i>
CPVP-1167	<i>Lithothamnion corallioides</i>	Pardo <i>et al.</i> (2014)	Reino Unido	KC861487	
CPVP-649	<i>Lithothamnion corallioides</i>	Pardo <i>et al.</i> (2014)	España	KC861458	
CPVP-691	<i>Lithothamnion corallioides</i>	Pardo <i>et al.</i> (2014)	España		KC819261
GALW:15750	<i>Lithothamnion corallioides</i>	Hernandez-Kantún (no publicado)	Francia		KC819256
ND226	<i>Lithothamnion crispatum</i>	Farr <i>et al.</i> (2009)	Nueva Zelanda		KY485304
RB623156	<i>Lithothamnion crispatum</i>	Jesionek <i>et al.</i> (2016)	Brazil		KY485305
BM000657610	<i>Lithothamnion glaciale</i>	Melbourne <i>et al.</i> (2017)	Reino Unido		KY042230
US 170936	<i>Lithothamnion glaciale</i>	Adey <i>et al.</i> (2015)	Canadá		KP142722
GWS018166	<i>Lithothamnion glaciale</i>	Bringloe & Saunders (no publicado)	Maine USA	MH309044	
GWS029946	<i>Lithothamnion glaciale</i>	Bringloe & Saunders (no publicado)	Nuevo Brunswick Canadá	MH309086	
BM000044415	<i>Lithothamnion lemoineae</i>	Melbourne <i>et al.</i> (2017)	Canadá		KY042231
US170970	<i>Lithothamnion lemoineae</i>	Melbourne <i>et al.</i> (2017)	Maine, USA		KY042234
GWS024053	<i>Lithothamnion lemoineae</i>	Bringloe & Saunders (no publicado)	Maine, USA	MH309899	
GWS042059	<i>Lithothamnion lemoineae</i>	Bringloe & Saunders (no publicado)	Nome, Alaska	MH309223	

BM000044392	<i>Lithothamnion squamulosum</i>	Adey <i>et al.</i> (2018)	Reino Unido		MH252257
S169	<i>Lithothamnion squamulosum</i>	Adey <i>et al.</i> (2018)	Nueva Escocia, Canadá		MH252306
GALW:15734	<i>Lithothamnion muelleri</i>	Hernandez-Kantún (no publicado)	Baja California Sur, Mex.		JQ896241
NCCA0137	<i>Lithothamnion erinaceum</i>	Anglès d'Auriac <i>et al.</i> (2019)	Noruega		MG191373
CPVP-28	<i>Lithothamnion</i> sp.	Pardo <i>et al.</i> (2014)	Islandia	KC861515	
CPVP-30	<i>Lithothamnion</i> sp.	Pardo <i>et al.</i> (2014)	Islandia	KC861510	
FRA1993	<i>Lithothamnion</i> sp.	Peña <i>et al.</i> (2014c)	Archipiélago de Guadalupe		KJ710353
FRA1148	<i>Lithothamnion</i> sp.	Peña <i>et al.</i> (2014c)	Archipiélago de Guadalupe	KJ710343	
FRA1059	<i>Lithothamnion</i> sp.	Peña <i>et al.</i> (2014c)	Archipiélago de Guadalupe	KJ710345	
FRA2177	<i>Lithothamnion</i> sp.	Peña <i>et al.</i> (2014c)	Archipiélago de Guadalupe	KJ710337	KJ710349
LAF6970C	<i>Lithothamnion</i> sp.	Richards <i>et al.</i> (2016)	Florida, USA	KU514416	
LAF6494	<i>Lithothamnion</i> sp.	Richards <i>et al.</i> (2016)	Luisiana USA		KU557494
LAF5421	<i>Lithothamnion</i> sp.	Richards <i>et al.</i> (2016)	Luisiana USA		KU557493
PHYKOS7249	<i>Lithothamnion</i> sp.	Richards <i>et al.</i> (2016)	Isla Tintonera, Panamá Columbia	KU504277	KP844865
GWS020939	<i>Lithothamnion</i> sp.	Saunders (2014)	Británica, Canadá	KM254875	
GWS022118	<i>Lithothamnion</i> sp.	Saunders (2014)	California, USA	KM254696	
NCU 649885	<i>Lithophyllum atlanticum</i>	Richards <i>et al.</i> (2018)	Carolina del Norte, USA		MG517487
LLG4608A	<i>Lithophyllum nitorum</i>	Peña <i>et al.</i> (2018)	España	MG648772	



Anexo III.- Reconstrucción filogenética de las secuencias nucleotídicas de la región *psbA* basado en el algoritmo de distancias, con el método de Máxima Verosimilitud y el modelo GTR + G, en *Lithothamnion*.



Anexo IV.- Alineación de las secuencias nucleótídicas. A) marcador *COI*; B) marcador *psbA*.

A)

Lithothamnion sp.	AAATCATTCTTTTATTAGGAAATCATCAAGTTTACAAATGTTTT
Lithophyllum nitorum (MG648772)	AAATCAATTTATTGTTAGGAAATCATCAAGTTTACAAATGTTTT
Lithothamnion sp. (KC861515)	AAATCACCTTTTACTTGGAAATCACCAGTTTATAAATGTTTT
Lithothamnion sp. (KC861510)	AAATCACCTTTTACTTGGAAATCACCAGTTTATAAATGTTTT
Lithothamnion corallioides (KC861487)	AAACCATCTTTTATTAGGAAACCATCAAATTTATAAATGTTTT
Lithothamnion corallioides (KC861458)	AAACCATCTTTTATTAGGAAACCATCAAATTTATAAATGTTTT
Lithothamnion glaciale (MH309086)	AAACCATCTTTTACTTGGAAACCCCAAGTTTATAAATGTTTT
Lithothamnion glaciale (MH309044)	AAACCATCTTTTACTTGGAAACCCCAAGTTTATAAATGTTTT
Lithothamnion sp. (KJ710345)	TAAATCAATTTATTACTTGGAAATCATCAAGTTTATAAATGTTTT
Lithothamnion sp. (KJ710343)	TAAATCAATTTATTACTTGGAAATCATCAAGTTTATAAATGTTTT
Lithothamnion sp. (KU504277)	AAATCATTCTTTTATTAGGAAATCATCAAGTTTACAAATGTTTT
Lithothamnion sp. (KM254875)	AAACCATCTTTTACTTGGAAACCATCAAGTTTACAAATGTTTT
Lithothamnion sp. (KM254696)	AAACCATCTTTTACTTGGAAACCATCAAGTTTACAAATGTTTT
Lithothamnion lemoineae (MH309899)	AAACCATCTTTTACTTGGAAACCATCAAGTTTACAAATGTTTT
Lithothamnion lemoineae (MH309223)	AAACCATCTTTTACTTGGAAACCATCAAGTTTACAAATGTTTT
Lithothamnion sp. (KJ710337)	AAATCTCTTTTATAATGGGGAAATCATCAAATATAAATGTTTT
Lithothamnion sp. (KU514416)	AAATCTCTTTTATAATGGGGAAATCATCAAATATAAATGTTTT

B)

Lithothamnion corallioides (KC819256)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion corallioides (KC819261)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion lemoineae (KY042234)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion lemoineae (KY042231)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion glaciale (KY042230)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion squamulosum (MH252306)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion squamulosum (MH252257)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion crispatum (KY485305)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion crispatum (KY485304)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion glaciale (KP142722)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion muelleri (JQ896241)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion erinaceum (MG191373)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
KP844865.1	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion sp. (KJ710353)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion sp. (KJ710349)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion sp. (KU557494)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithothamnion sp. (KU557493)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
LP-PR conc	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC
Lithophyllum atlanticum (MG517487)	TTGCATTTCGTTGCTGCACCTCCAGTTGATATCGATGGTATTCGTGAGCC

Anexo V.- Alineación de las secuencias de aminoácidos. A) marcador *COI*; B) marcador *psbA*.

A)

Lithothamnion sp.	NHLLLGNHCVYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithophyllum nitorum (MG648772)	NQLLLGNHCQYNVLITAHAILMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion sp. (KC861515)	NHLLLGNHCVYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion sp. (KC861510)	NHLLLGNHCVYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion corallioides (KC861487)	NHLLLGNHQIYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion corallioides (KC861458)	NHLLLGNHQIYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion glaciale (MH309086)	NHLLLGNHCVYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion glaciale (MH309044)	NHLLLGNHCVYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion sp. (KJ710345)	NHLLLGNHCVYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion sp. (KJ710343)	NHLLLGNHCVYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion sp. (KU504277)	NHLLLGNHCVYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion sp. (KM254875)	NHLLLGNHCVYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion sp. (KM254696)	NHLLLGNHCVYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion lemoineae (MH309899)	NHLLLGNHCVYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion lemoineae (MH309223)	NHLLLGNHCVYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion sp. (KU514416)	NSFLMGNHCQIYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN
Lithothamnion sp. (KJ710337)	NSFLMGNHCQIYNVLITAHAFLMIFFLVMPVMIGGFGN

B)

Lithothamnion corallioides (KC819256)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion corallioides (KC819261)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion lemoineae (KY042234)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAVIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion lemoineae (KY042231)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAVIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion glaciale (KY042230)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAVIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion squamulosum (MH252306)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion squamulosum (MH252257)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion crispatum (KY485305)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion crispatum (KY485304)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion glaciale (KP142722)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAVIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion muelleri (JQ896241)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion erinaceum (MG191373)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
KP844865.1	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion sp. (KJ710353)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion sp. (KJ710349)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion sp. (KU557494)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion sp. (KU557493)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithothamnion sp.	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY
Lithophyllum atlanticum (MG517487)	AFVAAPPVVDIDGIREPVGSLLYGNNIISGAIIPSSAAIGIHFY