



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVERSIDAD GENÉTICA Y PATRONES DE DISTRIBUCIÓN
HAPLOTÍPICA DE LAS POBLACIONES DE *MERISTOTHECA*
CYLINDRICA (SOLIERIACEAE, RHODOPHYTA) DEL LITORAL
DE CAMPECHE, MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

PALMA ORTIZ CARLOS ADÁN



TUTOR:

DR. KURT MARTIN DRECKMANN
ESTAY

Ciudad Univesitaria, CD. MX., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Palma
Ortiz
Carlos Adán
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309121006

2. Datos del tutor

Dr.
Kurt Martin
Dreckmann
Estay

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Dení Claudia
Rodríguez
Vargas

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Hilda Patricia
León
Tejera

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Abel
Senties
Granados

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Erick Alejandro
García
Trejo

7. Datos del trabajo escrito.

Diversidad genética y patrones de distribución haplotípica de las poblaciones de *Meristotheca cylindrica* (Solieriaceae, Rhodophyta) del litoral de Campeche, México
123 p.
2018

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	6
ÍNDICE DE ANEXOS	8
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO	16
2.1 MODELOS DE ESPECIACIÓN	
2.2 CONCEPTOS RELEVANTES EN LA GENÉTICA DE POBLACIONES	
2.2.1 Polimorfismos de DNA: Parámetros de diversidad y variación genética	
2.2.2 Parámetros de diferenciación y estructura genética	
2.2.3 Pruebas de neutralidad selectiva e historia demográfica	
2.3 HERRAMIENTAS MOLECULARES EN LA DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA DE ALGAS	
3. ANTECEDENTES	32
3.1 LA FAMILIA SOLIERIACEAE J. AGARDH, 1876	
3.2 EL GÉNERO <i>MERISTOTHECA</i> J. AGARDH, 1872	
3.2.1 Aspectos taxonómicos del género	
4. JUSTIFICACIÓN	42
5. HIPÓTESIS	43
6. OBJETIVOS	43
6.1 OBJETIVOS GENERALES	
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	
7. MATERIALES Y MÉTODOS	45
7.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ÁREA DE ESTUDIO	
7.1.1 Características particulares y delimitación de la muestra	
7.2 ANÁLISIS MOLECULAR	
7.2.1 Extracción de DNA	
7.2.2 Amplificación mediante PCR	
7.2.3 Electroforesis en gel de agarosa 0.8%	

7.2.4	Purificación de los amplificados
7.2.5	Secuenciación de los amplificados
7.3	EDICIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS
7.3.1	Variación y diversidad genética
7.3.2	Estructura y diferenciación genética
7.3.3	Prueba de Mantel
7.3.4	Pruebas de neutralidad selectiva e historia demográfica
7.3.5	Análisis de haplotipos
7.3.6	Análisis filogenéticos
7.3.7	Distancias genéticas
7.4	ANÁLISIS MORFOLÓGICO
7.4.1	MANOVA

8. RESULTADOS 60

8.1	VARIACIÓN Y DIVERSIDAD GENÉTICA
8.2	ESTRUCTURA Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA
8.3	PRUEBA DE MANTEL
8.4	PRUEBAS DE NEUTRALIDAD SELECTIVA E HISTORIA DEMOGRÁFICA
8.5	ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS
8.6	ANÁLISIS FILOGENÉTICOS
8.7	DISTANCIAS GENÉTICAS
8.8	ANÁLISIS MORFOLÓGICO

9. DISCUSIÓN 80

9.1	VARIACIÓN Y DIVERSIDAD GENÉTICA
9.2	ESTRUCTURA, DIFERENCIACIÓN Y FLUJO GÉNICO
9.3	DIFERENCIACIÓN GENÉTICA VS. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
9.4	PRUEBAS DE NEUTRALIDAD Y EVENTOS DEMOGRÁFICOS
9.5	DISTRIBUCIÓN HAPLOTÍPICA Y REDES DE HAPLOTIPOS
9.6	ANÁLISIS FILOGENÉTICOS
9.7	DISTANCIAS GENÉTICAS Y DIVERGENCIA
9.8	ANÁLISIS MORFOLÓGICO CUANTITATIVO Y CUALITATIVO
9.9	VARIACIÓN GENÉTICA VS. VARIACIÓN MORFOLÓGICA

10. CONCLUSIONES 90

11. PERSPECTIVAS 91

12. REFERENCIAS 92

13. AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES 103

14. ANEXOS 104

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Hábito vegetativo en ejemplares de herbario pertenecientes a *Meristotheca cylindrica*. Se indica el número de herbario en la esquina superior izquierda de cada ejemplar. Barra de escalas =5 cm. 13
- Figura 2.** Efecto hipotético de los mecanismos evolutivos sobre la variación genética presente en las poblaciones de una especie (modificado de Hedrick 2011). 19
- Figura 3. Fig. 3-4.** Isotipo UAMIZ-1251. Corte transversal que muestra la médula filamentosa y la corteza pseudoparenquimatoso. Barra de escala= 120 μm . **Fig. 3-7.** Vista de filamentos axiales paralelos al plano longitudinal del eje, portando células periaxiales (pc) Filamentos medulares adventicios (cwf) atravesando el eje (UAMIZ-1251). Barra de escala =30 μm . **Fig. 3-9.** Tetrasporangios divididos zonalmente comunicados mediante pit connections laterales a la célula parental (flecha) (UAMIZ-1250). Barra de escala =20 μm . **Fig. 3-12.** Corte transversal que muestra cistocarpos inmaduros (UAMIZ-1246). Barra de escala= 120 μm . (modificado de Núñez-Resendiz *et al.* 2017a). 36
- Figura 4.** Topología bayesiana basada en secuencias de *rbcl* para los representantes de Solieriaceae. Se muestran los valores de probabilidad posterior (izquierda) y bootstrap (derecha) en cada rama, con asteriscos indicando el máximo valor de soporte filogenético. Se indican las localidades y los números de acceso al Genbank para cada secuencia. El recuadro indica el clado conformado por las muestras de *Meristotheca* (recuperado de Núñez-Resendiz *et al.* 2017a). 38
- Figura 5.** Árboles filogenéticos obtenidos con secuencias de la subunidad larga de RuBisCo (*rbcl*) mediante máxima parsimonia (MP) para el complejo *Meristiella/Meristotheca*. Se indican los valores de bootstrap en los nodos y las ramas. Los recuadros resaltan los grupos monofiléticos conformados por las especies del complejo; modificado según Fredericq *et al.* (1999) (A) y Faye *et al.* (2004) (B). 41
- Figura 6.** Sitios de muestreo en el litoral de Campeche. Los puntos señalan la posición geográfica de los sitios visitados y los números corresponden con la localidad descrita (modificado de Núñez-Resendiz *et al.* 2017a, Palma Ortiz *et al.* 2017). 46
- Figura 7.** Esquema de la extracción de DNA con el kit DNeasy Plant Minikit (Qiagen) con modificaciones menores a la técnica del fabricante. 50
- Figura 8.** Muestras sometidas a electroforesis, con su respectiva clave de laboratorio, vistas mediante el transiluminador (arriba, vista a blanco y negro; abajo, vista a color). El marcador empleado para para su amplificación es el espaciador de RuBisCo; no se incluyó el marcador de peso molecular ya que habían sido trabajadas con anterioridad. 52
- Figura 9.** Muestras sometidas a electroforesis, amplificadas con los oligonucleótidos del marcador mitocondrial *cox2-3* (izquierda, vista a color; derecha, vista a blanco y negro). Se indica la clave de laboratorio; aquellas muestras con * indican un amplificado insatisfactorio por la presencia de doble banda, por lo que fueron repetidas. 52
- Figura 10.** Esquema del proceso de purificación de amplificadores de DNA con el kit QIAquick Purification Kit (Qiagen) según lo descrito por el fabricante. 53
- Figura 11.** Amplificados previamente purificados, sometidos a electroforesis y vistos mediante el transiluminador (izquierda, vista a color; derecha, vista a blanco y negro). Se detalla su respectiva clave de laboratorio. Se prescindió del marcador de peso molecular. 54
- Figura 12.** Resumen de la parte metodológica en laboratorio del trabajo de tesis. 59
- Figura 13.** Relación entre Φ_{PT} pareada y distancias geográficas de las poblaciones estudiadas de *Meristotheca cylindrica*, ubicadas en el litoral de Campeche, con el marcador plastidial (espaciador de RuBisCo) (A) y el marcador mitocondrial (espaciador de *cox2-3*) (B). 66
- Figura 14.** Redes de parsimonia estadística de las regiones espaciadoras RuBisCo (A) y *cox2-3* (B) de *Meristotheca cylindrica*. Para la región espaciadora *cox2-3*, los dos grupos genéticos encontrados se indican como GI y GII. Para ambas redes, los rectángulos corresponden con el posible haplotipo ancestral; las líneas sencillas indican un paso mutacional; los círculos negros indican haplotipos extintos o no muestreados; n= número de individuos con el mismo

haplotipo; los valores ubicados en la parte basal indican las probabilidades de peso de grupo externo por cada haplotipo (modificado de Palma Ortiz <i>et al.</i> 2017).	70
Figura 15. Distribución haplotípica de las regiones espaciadoras de RuBisCo (derecha) y de <i>cox2-3</i> (izquierda) para <i>Meristotheca cylindrica</i> de Campeche. Las localidades están indicadas en el mapa con número (1-5) y la clave de localidad se indica entre paréntesis. n= número de individuos pertenecientes a cada haplotipo por población (modificado de Núñez-Reséndiz <i>et al.</i> 2017, Palma Ortiz <i>et al.</i> 2017).	71
Figura 16. Topología bayesiana obtenida con secuencias de la región espaciadora de RuBisCo para las poblaciones de <i>Meristotheca cylindrica</i> . Las secuencias obtenidas en el presente estudio están indicadas en las ramas de color morado y las restantes fueron obtenidas del GenBank, cuyos números de acceso se indican a un lado. Los valores de probabilidad posterior bayesiana (izquierda) y los valores de bootstrap (derecha) están indicados en los nodos de las ramas. Los valores por debajo de 95% no son mostrados.	73
Figura 17. Topología bayesiana obtenida con secuencias de la región espaciadora de <i>cox2-3</i> para las poblaciones de <i>Meristotheca cylindrica</i> . Las secuencias obtenidas en el presente estudio están indicadas en las ramas de color azul (GII) y rojo (GI); las restantes fueron obtenidas del GenBank, cuyos números de acceso se indican a un lado. Los valores de probabilidad posterior bayesiana (izquierda) y los valores de bootstrap (derecha) están indicados en los nodos. Los valores por debajo de 95% no son mostrados.	74
Figura 18. Estructuras y caracteres cuantificados en cortes transversales bajo el microscopio óptico. A: parte apical de UAMIZ 1257 (10X); B: parte apical de UAMIZ 1249 (40X); C: parte media de UAMIZ 1250 (20X); D: parte basal de UAMIZ 1252 (40X); E: parte basal de UAMIZ 1259 (10X); F: parte apical de UAMIZ 1246 (40X). M=médula; Ci=corteza interna; Ce=corteza externa; dCi=diámetro de células de la corteza externa; dCe=diámetro de células de la corteza interna; hfm=haces de filamentos medulares; dT=diámetro del talo; dM=diámetro de la médula. Se indica la escala en cada imagen. Barra de escalas según el aumento: 10X=10 µm; 20X=5 µm; 40X=2.5 µm.	78
Figura 19. Representantes de los grupos morfológicos reportados en <i>Meristotheca cylindrica</i> (Palma Ortiz <i>et al.</i> 2017). Grupo 1: UAMIZ 1257. Grupo 2: UAMIZ 1250. Barra de escalas =5 cm.	79
Figura 20. Esquema de la relación entre los haplotipos del marcador plastidial y los grupos genéticos del marcador mitocondrial.	84

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Resumen de los principales parámetros utilizados en la genética de poblaciones (modificado de Casillas & Barbadilla 2017, Ramírez-Soriano <i>et al.</i> 2008).	28
Tabla 2. Principales marcadores moleculares utilizados en estudios filogenéticos y microevolutivos de especies de algas rojas (modificado de Núñez-Resendiz 2015 y Díaz-Larrea <i>et al.</i> 2015).	29
Tabla 3. Características de las cinco localidades muestradas en el litoral de Campeche.	47
Tabla 4. Muestras y especímenes de <i>Meristotheca cylindrica</i> procedentes de las costas de Campeche. Se describen los datos de localidad, coordenadas geográficas (latitud, longitud) y números de herbario, así como las claves de campo y laboratorio. UAMIZ = Herbario de la Universidad Autónoma Metropolitana (modificado de Palma Ortiz <i>et al.</i> 2017).	48
Tabla 5. Marcadores moleculares utilizados en el presente trabajo; se detalla la secuencia de los oligonucleótidos empleados así como el ciclo en el que se realizó la amplificación de DNA y su referencia en literatura. DI=desnaturalización inicial, D=desnaturalización, A=alineamiento, E=extensión, EF=extensión final (modificado de Núñez-Resendiz 2015).	51
Tabla 6. Sitios variables en el alineamiento de secuencias de DNA de <i>Meristotheca cylindrica</i> para haplotipos de la región espaciadora de RuBisCo y sus números de acceso al GenBank; en rojo se destacan las mutaciones singleton, en verde se destacan los sitios parsimoniosamente informativos (modificado de Palma Ortiz <i>et al.</i> 2017).	60

- Tabla 7.** Medidas de diversidad genética para las poblaciones de *Meristotheca cylindrica*, basadas en las regiones espaciadoras de RuBisCo y de *cox2-3*. S = sitios segregantes, h = número de haplotipos, Hd = diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica. IA= Isla Aguada, PX= Punta Xen, PB= Playa Bonita, S= Sabancuy, BT= Bahía de Tortuga, Total= índice general de todas las poblaciones. Los valores totales se indican con su respectiva desviación estándar (modificado de Palma Ortiz *et al.* 2017). 61
- Tabla 8.** Sitios variables en el alineamiento de secuencias de DNA de *Meristotheca cylindrica* para haplotipos de la región espaciadora de *cox2-3* y sus números de acceso al GenBank. En negrita se resaltan los haplotipos pertenecientes al Grupo I (GI), en tipografía normal se indican los haplotipos del Grupo II (GII), en rojo se destacan las mutaciones singleton, en verde se destacan los sitios parsimoniosamente informativos. H= haplotipos, S= sitios segregantes, #= no. de acceso al GenBank (modificado de Palma Ortiz *et al.* 2017). 62
- Tabla 9.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) para ambos marcadores en las cinco poblaciones de *Meristotheca cylindrica* (modificado de Palma Ortiz *et al.* 2017). 64
- Tabla 10.** Valores pareados de Φ_{PT} obtenidos mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA) en las cinco poblaciones de *Meristotheca cylindrica*, con el marcador plastidial (A) y el marcador mitocondrial (B). Se resaltan con negritas los valores más altos. IA=Isla Aguada, S=Sabancuy, PX=Punta Xen, BT=Bahía de Tortuga, PB=Playa Bonita. 64
- Tabla 11.** Valores pareados de Nm obtenidos mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA) en las cinco poblaciones de *Meristotheca cylindrica*, con el marcador plastidial (A) y el marcador mitocondrial (B). Se resaltan con negritas los valores más altos, en rojo los más bajos y con * aquellos valores asociados con Φ_{PT} pareada tal que $\Phi_{PT}=0$. IA=Isla Aguada, S=Sabancuy, PX=Punta Xen, BT=Bahía de Tortuga, PB=Playa Bonita 65
- Tabla 12.** Matriz de distancias geográficas entre los pares de poblaciones ubicadas en el litoral de Campeche. Se detalla la distancia en kilómetros. 65
- Tabla 13.** Estimados de los parámetros de variación y diversidad genética, así como de las pruebas de neutralidad selectiva e historia demográfica para cada marcador. En rojo se destacan los valores P de estimados carentes de significancia estadística. k= desajuste nucleotídico, π = diversidad nucleotídica, θ =theta. 67
- Tabla 14.** Haplotipos observados con la región espaciadora de RuBisCo y la región espaciadora de *cox2-3* de las muestras de *Meristotheca cylindrica* procedentes de Campeche. Se detallan las secuencias incluidas y su ubicación por localidad; en negritas, se destaca el grupo GI del espaciador de *cox2-3*; en cursiva, se destacan los haplotipos ancestrales designados con la parsimonia estadística. n= secuencias incluidas en el haplotipo, #número de acceso al GenBank. 69
- Tabla 15.** Matriz de distancias genéticas *p* no corregidas, correspondientes con los haplotipos encontrados en las poblaciones de *Meristotheca cylindrica* para la región espaciadora de RuBisCo. Se resaltan en negritas los valores superiores de divergencia, mientras que los valores menores son subrayados. 75
- Tabla 16.** Matriz de distancias genéticas *p* no corregidas, correspondientes con el total de haplotipos encontrados en las poblaciones de *Meristotheca cylindrica* para la región espaciadora de *cox2-3*. Se resaltan en negritas los valores superiores de divergencia, mientras que los valores menores son subrayados. 75
- Tabla 17.** Matrices de distancias genéticas *p* no corregidas, correspondientes con los grupos genéticos GI (A) y GII (B) y sus respectivos haplotipos en las poblaciones de *Meristotheca cylindrica* para la región espaciadora de *cox2-3*. Se resaltan en negritas los valores superiores de divergencia, mientras que los valores menores son subrayados. 76
- Tabla 18.** Cuantificación de caracteres morfológicos de 11 muestras de *Meristotheca cylindrica*. Los caracteres diagnósticos se establecieron según Ardito *et al.* (2014) modificado para *M. cylindrica*, con la adición del número de filamentos medulares y el diámetro de células de las cortezas externa (CE) e interna (CI). IA= Isla Aguada, S=Sabancuy, BT=Bahía de Tortuga, PX=Punta Xen, PB=Playa Bonita; áp=ápice, med= media, bas=basal. 77
- Tabla 19.** Comparación de características morfológicas entre las especies *Meristotheca cylindrica* y *Tepoztequiella rhizoidea* (modificado de Núñez-Resendiz *et al.* 2017c). CI=corteza interna. 88

ÍNDICE DE ANEXOS

Página

Anexo 1. Extracción de DNA y purificación; modificación a la técnica del fabricante con Kit: DNeasy Plant Minikit (QIAGEN).	104
Anexo 2. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% para productos de PCR.	105
Anexo 3. Purificación de amplificaciones (PCR); modificación a la técnica del fabricante con Kit: PCR Purification kit (QIAGEN).	106
Anexo 4. Conjunto de secuencias del espaciador de RuBisCo utilizadas en los análisis moleculares. Las secuencias de <i>Meristotheca cylindrica</i> obtenidas en el presente estudio presentan el prefijo Mc en conjunto con el número de haplotipo (solo secuencias representativas), localidad, número de muestra, oligonucleótido empleado y el número de acceso de GenBank (solo secuencias representativas); las abreviaturas de cada localidad se detallan en la Tabla 1. Las secuencias restantes, pertenecientes a géneros de Solieriaceae y al grupo externo (<i>Hydropuntia cornea</i>), contienen el nombre de la especie, localidad y número de acceso de GenBank.	107
Anexo 5. Conjunto de secuencias del espaciador de <i>cox2-3</i> utilizadas en los análisis moleculares. Las secuencias de <i>Meristotheca cylindrica</i> obtenidas en el presente estudio presentan el prefijo Mc en conjunto con el número de haplotipo (solo secuencias representativas), localidad, número de muestra, oligonucleótido empleado y número de acceso de GenBank (solo secuencias representativas); las abreviaturas de cada localidad se detallan en la Tabla 1. Las secuencias restantes, pertenecientes a géneros de Solieriaceae y al grupo externo (<i>Hydropuntia cornea</i>), contienen el nombre de la especie, localidad y número de acceso de GenBank.	113
Anexo 6. Publicación en revista arbitrada.	117

Para mis amores

Laura, Constanza y Bernardo.

Para mis padres, Laura y Noé,

y mis hermanos, Edén y Alan.

Gracias por todo. Los amo.

RESUMEN

Meristotheca cylindrica es una especie de alga roja común descrita recientemente para las costas de Campeche, potencialmente importante como recurso en la región por su contenido en carragenanos. Sin embargo, por su morfología, es habitualmente confundida con otras especies de algas rojas cuya distribución geográfica es compartida. En la presente tesis, se propusieron los siguientes objetivos: 1) evaluar la variación genética y su relación con la variación morfológica en las poblaciones de *M. cylindrica*; 2) describir la posible estructura genética y la distribución haplotípica en las localidades muestreadas; 3) determinar posibles eventos de especiación. A partir de 45 individuos de *M. cylindrica*, procedentes de cinco poblaciones registradas para Campeche, se determinaron medidas de variación, distancias, estructura y diferenciación genética, utilizando secuencias de DNA de las regiones espaciadoras de RuBisCo y de *cox2-3* amplificadas vía PCR. Adicionalmente, para ambos marcadores, se realizaron análisis filogenéticos integrando secuencias de especies de la familia Solieriaceae provenientes del GenBank. Considerando 10 ejemplares de herbario, se realizó un análisis de varianzas a partir de 30 caracteres morfológicos. Como resultado, la región espaciadora de la RuBisCo reveló cuatro haplotipos interconectados (R1-R4), así como parámetros moderados de diversidad genética ($Hd=0.46458$, $\pi=0.00785$). El análisis filogenético mostró un único grupo monofilético que incluyó a todos los haplotipos. En cambio, la región espaciadora de *cox2-3* reveló nueve haplotipos (C1-C9) estructurados en los grupos GI y GII, así como parámetros elevados de diversidad, diferenciación y distancias genéticas ($Hd=0.81$, $\pi=0.06476$; Φ_{PT} , $F_{ST}>0.35$; $>10\%$ de diferencias, porcentajes mayores a los observados interespecíficamente). El análisis filogenético mostró dos grupos monofiléticos congruentes con GI y GII. En lo que respecta a la variación morfológica, el análisis de varianzas mostró diferencias estadísticamente no significativas entre los grupos morfológicos previos. Por consiguiente, a partir de la estructura genética revelada, la distribución haplotípica, los grupos filogenéticos encontrados y las distancias genéticas observadas, se sugieren grupos genéticos diferenciados a nivel de género en la muestra estudiada de *M. cylindrica*.

Palabras clave: Diversidad genética, estructura genética, espaciador de *cox2-3*, espaciador de RuBisCo, haplotipos.

ABSTRACT

Meristotheca cylindrica is a common species of red algae recently described for the coast of Campeche, potentially important as an economic resource by its content in carrageenans. However, due to its morphological variation it is usually confused with other cartilaginous red algal species whose geographical distribution is shared. In the current thesis, the following objectives were proposed: 1) to evaluate the genetic variation and its relationship with the morphological variation in *M. cylindrica* populations; 2) to describe the possible genetic structure and the haplotypic distribution in the sampled localities; 3) to determine possible speciation events. From 45 individuals of *M. cylindrica* of five populations recorded for Campeche, measurements of variation, genetic structure, differentiation and distances were determined using DNA sequences from the RuBisCo and *cox2-3* spacer regions. Additionally, for both markers, phylogenetic analyses were performed adding sequences of species of the Solieriaceae family retrieved from GenBank. A statistical analysis was performed from 10 herbarium specimens, considering 30 morphological characters. As a result, the Rubisco spacer region revealed four interconnected haplotypes (R1-R4), as well as moderated genetic diversity parameters ($Hd=0.46458$, $\pi=0.00785$). Phylogenetic analysis showed a single monophyletic group that included all haplotypes. The *cox2-3* spacer region revealed nine haplotypes (C1-C9) structured in the GI and GII groups, as well as elevated parameters of genetic diversity, distances and differentiation ($Hd=0.81$, $\pi=0.06476$; $>10\%$ of differences, higher than those observed interspecifically; Φ_{PT} and $F_{ST}>0.35$). Phylogenetic analysis showed two monophyletic groups congruent with GI and GII. Apropos of morphological variation, the variance analysis showed statistically insignificant differences among the previous morphological groups. Hence, as from the revealed genetic structure, the haplotypic distribution, the phylogenetic groups and the observed genetic distances, differentiated genetic groups at gender level are suggested in this *M. cylindrica* sample.

Key words: *cox2-3* spacer, genetic structure, genetic diversity, haplotypes, Rubisco spacer.

1. INTRODUCCIÓN

Meristotheca cylindrica M.L. Núñez-Resendiz, Dreckmann & Senties es un alga roja de la familia Solieriaceae J. Agardh y orden Gigartinales F. Schmitz, recientemente descrita a partir de especímenes recolectados a lo largo de la costa de Campeche siendo la Bahía de Tortuga su localidad tipo (Núñez-Resendiz *et al.* 2017a). Como miembro de Solieriaceae, familia que posee el mayor intervalo de diversidad estructural de carragenanos (Chiovitti *et al.* 2001; Watt *et al.* 2003), y dada su abundancia en las costas del estado de Campeche, *M. cylindrica* constituye un recurso económico potencialmente redituable que no se explota en México (Núñez-Resendiz *et al.* 2017a,b).

Meristotheca cylindrica presenta talos erectos, solitarios y sujetos al sustrato por discos de fijación; sin embargo, se diferencia del resto de las especies del género por presentar un talo cilíndrico en sección transversal, el cual se conforma por múltiples ejes principales, cartilaginosos en consistencia y cilíndricos o complanados, de 5-30 cm de longitud y 1-5 mm de grosor (Figura 1); el grado de ramificación varía entre talos al estar altamente ramificados (4, 5 o más ramificaciones) así como poco ramificados (≤ 3 ramificaciones) (Guiry & Guiry 2018, Núñez-Resendiz *et al.* 2017a). Al igual que otras especies del género, posee tetrasporangios elipsoidales y zonados que se desarrollan lateralmente a partir de una célula nutritiva en la región cortical, y cistocarpos elipsoidales inmersos formados en proliferaciones marginales (Faye *et al.* 2004, 2005, 2007, 2008). El epíteto específico *cylindrica*, derivado del latín, hace referencia al talo y ramificaciones cilíndricas, los cuales son considerados caracteres morfológicos principales que excluyen a la especie del resto del género, en el cual se había reportado hábito aplanado exclusivamente (Núñez-Resendiz *et al.* 2017a).

Anatómicamente, *Meristotheca cylindrica* se caracteriza por una médula filamentosa que comprende tanto filamentos primarios (paralelos al plano longitudinal del eje, con 4.5-7 μ m de diámetro) como adventicios (conectados por conexiones secundarias a las células de la corteza interna), además de una corteza pseudoparenquimatosa dividida en dos zonas: a) corteza interna, compuesta por 4-5 capas de células grandes, sin pigmentación o ligeramente pigmentadas, irregulares o estrelladas, de 40-80 μ m de diámetro; b) corteza externa, compuesta por 1-2 capas de células pequeñas, elongadas o subesféricas, con 9-15 μ m de diámetro y altamente pigmentadas (Núñez-Resendiz *et al.* 2017a).

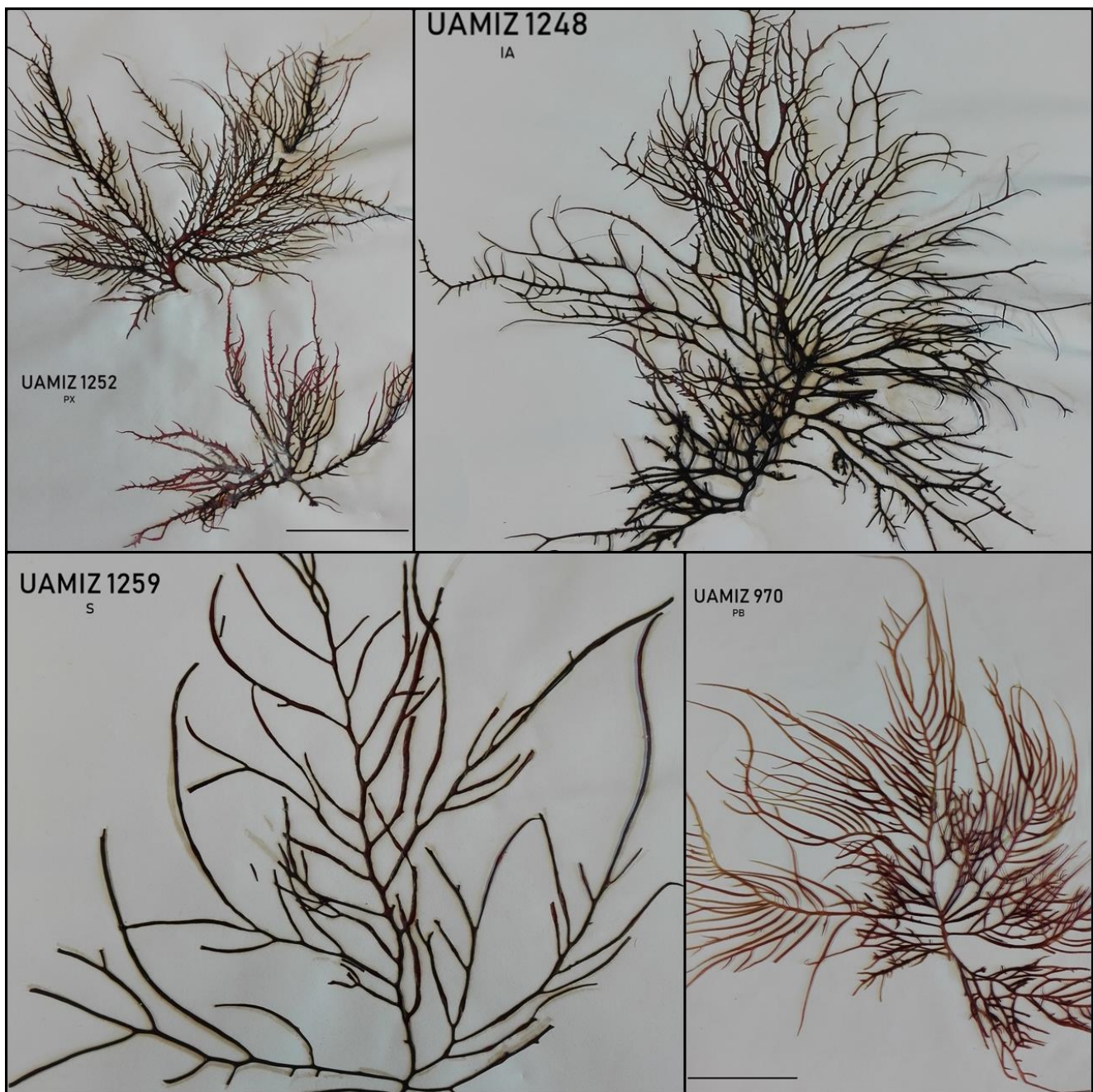


Figura 1. Hábito vegetativo en ejemplares de herbario pertenecientes a *Meristotheca cylindrica*. Se indica el número de herbario en la esquina superior izquierda de cada ejemplar. Barra de escalas =5 cm.

Las poblaciones de *Meristotheca cylindrica* son abundantes y sin limitaciones estacionales, con picos en otoño e invierno; forman parte del dosel algal en comunidades sumergidas (0.5-1 m de profundidad) y son un componente conspicuo de la deriva algal (Dreckmann & Senties 2013, Núñez-Resendiz *et al.* 2017a,b).

Debido a la particularidad del talo cilíndrico de *Meristotheca cylindrica*, en la Península de Yucatán esta especie se identificó erróneamente como *Eucheuma isiforme* (C. Agardh) J. Agardh (Callejas-Jiménez *et al.* 2005), otra especie con talo cilíndrico perteneciente a la familia Solieriaceae, fenotípicamente plástica, con quien comparte su intervalo de distribución (Núñez-Resendiz *et al.* 2017a,b, Wynne *et al.* 2017). En el muestreo previo a su estudio, los especímenes con talos y ramificaciones cilíndricas colectados por Núñez-Resendiz *et al.* (2017a) molecularmente correspondieron con *Meristotheca*, aunque sus secuencias resultaron únicas dentro del género. En adición, la morfología presentada resultó incompatible con la descripción de especies previamente descritas del género, las cuales presentan hábitos peltados (el caso de *M. peltata* N'Yeurt & Pairi, de Fiji) o aplanados (el resto de las especies).

Posteriormente a la descripción de *Meristotheca cylindrica*, fue descrito el género *Tepoztequiella* Núñez-Resendiz, Dreckmann & Senties a partir de su especie tipo *Tepoztequiella rhizoidea* Núñez-Resendiz, Dreckmann & Senties (Solieriaceae, Gigartinales) en las costas de Campeche, la cual comparte tanto el área de distribución como el hábito externo de las rodofitas *Gracilaria cornea* Montagne, *Eucheuma isiforme* y *M. cylindrica*. En adición, la disposición y la forma de las células corticales, así como el hábito terete, son caracteres morfológicos similares entre las especies *T. rhizoidea* y *M. cylindrica* (Núñez-Resendiz *et al.* 2017b,c). En esta última, a través de un análisis emitido desde la genética de poblaciones, se evidenció la diferenciación en dos grupos genéticos a partir de poblaciones muestreadas en el litoral de Campeche con datos mitocondriales, aunque con un laxo respaldo de la hipótesis con datos moleculares plastidiales y morfológicos (Palma Ortiz *et al.* 2017)¹.

Los ejemplos citados anteriormente hacen patente cierta incertidumbre en cuanto a la taxonomía, sistemática, filogeografía y niveles de variación y diversidad genética (microevolución) al interior de los representantes de la familia Solieriaceae en México, ya que existe escasa información referente al grupo (Núñez-Resendiz *et al.* 2017a,b,c, Palma Ortiz *et al.* 2017). La identificación errónea de especies morfológicamente similares en la Península de Yucatán ha llevado a una estimación de valores bajos de diversidad para la región, por lo que una mayor cantidad de muestreo y análisis desde las perspectivas mencionadas deberían ser llevadas a cabo, con el objetivo de

¹ Esta cita refiere resultados preliminares de la presente tesis, publicados en 2017 (ver artículo en Anexo 6). La información aquí presentada resulta complementaria.

esclarecer la diversidad taxonómica de la familia Solieriaceae para la región y particularmente en las costas de Campeche (Núñez-Resendiz *et al.* 2017c).

Con el objetivo principal de la contribución al conocimiento taxonómico del género *Meristotheca* en Campeche, a través del estudio de las poblaciones de *Meristotheca cylindrica*, la realización del presente estudio se fundamenta en las siguientes cuestiones: la similitud morfológica entre *M. cylindrica* y otros representantes de Solieriaceae como *Eucheuma* sp., el hábito aplanado único entre las especies del género y la división de la muestra en dos grupos morfológicos, basada en el patrón y grado de ramificación del talo. El estudio provisto desde la genética de poblaciones, a través del uso de dos marcadores extranucleares, permitirá comparar la variación y diversidad genética entre las poblaciones que conforman a la especie, la segregación de los individuos en distintos haplotipos y la distribución geográfica de estos en la región y, finalmente, encontrar la relación entre los grupos genéticos y morfológicos, estos últimos asociados con la variación morfológica previamente reportada.

2. MARCO TEÓRICO

El conocimiento de la diversidad taxonómica tradicionalmente ha sido construido mediante el análisis de la morfología y la anatomía. Sin embargo, a través de la implementación reciente de herramientas moleculares, se han conformado diversos enfoques integrales como la genética de poblaciones y la filogeografía, con la finalidad de documentar aspectos y mecanismos relevantes en la evolución de los linajes tales como los procesos de especiación, la distribución de los individuos en haplotipos y la interacción de los mecanismos evolutivos a nivel poblacional (deriva génica, selección natural, flujo génico, mutación). A continuación, se definirán y contextualizarán en la presente tesis tales elementos.

2.1 MODELOS DE ESPECIACIÓN

La **especiación** es cualquier proceso de divergencia que resulta en el reconocimiento de especies taxonómicas a partir de distintos grupos de organismos; la formación de nuevas especies se explica mediante factores **intrínsecos** (cambios genéticos, fisiológicos o conductuales en los linajes) y **extrínsecos** (atributos espaciales o geográficos que caracterizan la distribución de los linajes) (Fitzpatrick *et al.* 2008, Núñez-Resendiz 2015). Los modelos principales de interés en este trabajo son los siguientes: 1) especiación **alopátrida**, que consiste en la generación de nuevas especies a partir de poblaciones geográficamente aisladas, lo cual se produce por la disyunción o separación física de una población ancestral en dos subpoblaciones cuya evolución ocurre de manera independiente (Mayr 1942, Morrone & Escalante 2012); 2) especiación **simpátrida**, que es la formación de especies a partir de un mecanismo de aislamiento (v.g. barreras al flujo génico) entre los miembros de una población local con entrecruzamiento, lo cual ocurre en ausencia de segregación espacial o disyunción geográfica (Mayr 1942, Fitzpatrick *et al.* 2008, Morrone & Escalante 2008).

2.2 CONCEPTOS RELEVANTES EN LA GENÉTICA DE POBLACIONES

La diversidad genética es el componente fundamental detrás de la diversidad biológica, por lo que su estudio provee importantes pistas acerca del entendimiento de los mecanismos que moldean la variación genética, sus patrones, niveles e historias evolutivas de los taxones, tanto a nivel macroevolutivo como microevolutivo (Conklin *et al.* 2014, Guillemin *et al.* 2014, Muangmai *et al.* 2015, Núñez-Resendiz *et al.* 2016).

La **genética de poblaciones** es una disciplina que documenta la distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones de una especie, además del estudio de los principales mecanismos evolutivos (mutación, flujo génico, selección natural y deriva génica) y su efecto en la estructura genética poblacional (Brodie & Lewis 2007, Hartl & Clark 2007). A grandes rasgos, la genética de poblaciones estudia la evolución de las poblaciones a través de los cambios en las frecuencias alélicas (aplicándose también a las sustituciones de nucleótidos en secuencias de DNA); debido a la causalidad generalmente aleatoria de estos cambios, la teoría utilizada en este campo se basa en modelos estocásticos, como el modelo simple de población de Wright-Fisher en el cual se idealiza una población, con tamaño poblacional finito y constante, panmíctica, con generaciones discretas y carente de recombinación, por lo que las desviaciones a modelos neutros como éste proveen las herramientas para el estudio de la dinámica de los mecanismos evolutivos en las poblaciones (Hartl & Clark 2007, Ramírez-Soriano *et al.* 2008, Crane 2016).

Una **población** está definida como un grupo local de individuos con potencial de entrecruzamiento, coexistentes en tiempo y espacio (Brodie & Lewis 2007, Hedrick 2011, Núñez-Resendiz 2015). Sin embargo, las poblaciones naturales frecuentemente se subdividen en unidades más pequeñas (subpoblaciones) debido a factores geográficos o ecológicos, por lo que la relación genética entre sus partes puede ser distinta: esta conectividad genética depende principalmente del flujo génico efectivo establecido entre los subgrupos o subpoblaciones (Hedrick 2011). El **flujo génico**, según Endler (1977), es el movimiento de individuos entre grupos que deriva en intercambio génico reflejado en Nm (número absoluto de migrantes por generación) (Hartl & Clark 2007), concepto que dista de aquellos de migración y dispersión (Hedrick 2011). Cuando los estimados de flujo génico son altos, la variación genética en las subpoblaciones tiende a homogenizarse; en cambio, con valores bajos de flujo génico, ciertos mecanismos evolutivos (deriva génica, selección natural e incluso mutaciones) pueden conducir a la diferenciación entre los subgrupos mediante una distribución diferencial de la variación genética, lo que se denomina **estructura genética** (Hedrick 2011). El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional ya que determina

hasta qué punto cada población local de una especie constituye una unidad evolutiva independiente (Slatkin 1994).

La **deriva génica** es el muestreo aleatorio de gametos en cada generación en una población finita, lo que resulta en una fluctuación aleatoria de frecuencias alélicas a través de las generaciones y también en la pérdida de variación genética; ocasiona el mismo efecto esperado en todo el genoma y provoca la fijación o eliminación de los alelos en función de su frecuencia alélica inicial para tamaños poblacionales relativamente pequeños. (Casillas & Barbadilla 2017, Hedrick 2011). En general, se ha sugerido que los efectos de la deriva génica pueden contrarrestarse con la provisión de al menos un migrante por generación ($Nm=1$ con $\hat{F}=0.20$ y $Nm=2$ con $\hat{F}=0.11$), aunque también se considera que este número debe ser mayor para una adecuada conectividad entre poblaciones naturales (Hedrick 2011).

La **selección natural** es la reproducción y supervivencia diferencial de entidades² al diferir en una o más características, no debida a procesos estocásticos, por lo que también se define como la contribución diferencial determinista de las distintas entidades a las generaciones subsecuentes, ya que las diferencias usualmente son heredadas (Nature Scitable 2014). Este mecanismo evolutivo genera cambios en las frecuencias relativas de tales entidades en función de su adaptación relativa al interior de una población (Eguiarte *et al.* 2007), y en términos moleculares puede considerarse de dos tipos según la frecuencia de las entidades favorecidas:

La selección **positiva**, direccional o adaptativa, es el mecanismo evolutivo mediante el cual nuevos mutantes poseen adecuaciones mayores que el promedio de la población, y sus frecuencias se incrementan en la siguiente generación; de manera similar, la selección balanceadora (o ventaja del heterócigo) promueve la diversidad genética (Eguiarte *et al.* 2007, Li 1997).

La selección **negativa**, purificadora o estabilizadora, está caracterizada por los mutantes novedosos que poseen adecuaciones menores al promedio de la población y su frecuencia disminuye en las siguientes generaciones: esta variante de selección disminuye o purga la diversidad genética eliminando las variantes de la población (Eguiarte *et al.* 2007, Li 1997).

Kimura (1968) estableció una de las bases más importantes para la genética de poblaciones: la **teoría neutral de evolución molecular**, la cual implica que la gran mayoría de los cambios evolutivos, en

² Entidades: Alelos, fenotipos, genotipos o subconjuntos de éstos (Nature Scitable n.d., Eguiarte *et al.* 2007)

una escala molecular, son generados a partir de mutaciones selectivamente neutras o casi neutras al presentarse un efecto preponderante de la deriva génica en la estructura de las poblaciones (cuyo tamaño naturalmente es finito), por lo que la probabilidad de fijación de un gen mutante en la población es igual a su frecuencia inicial: nuevos alelos o variantes se producen a una tasa constante por individuo al igual que son sustituidas en la población mediante la evolución. Por lo tanto, a nivel molecular las variantes emergentes carecen de significado adaptativo: Los postulados de Kimura (1968) nos permiten establecer qué patrones de evolución de las secuencias se deben esperar si existen desviaciones del modelo neutro originadas por la mutación y la deriva génica sin la participación de la selección (Eguiarte *et al.* 2007).

El funcionamiento diferencial de los mecanismos evolutivos deriva en semejanzas o diferencias en el tipo, la cantidad y los patrones de la variación genética entre las poblaciones, lo cual es resumido de manera simple en los siguientes supuestos, según Hedrick (2011) (Figura 2):

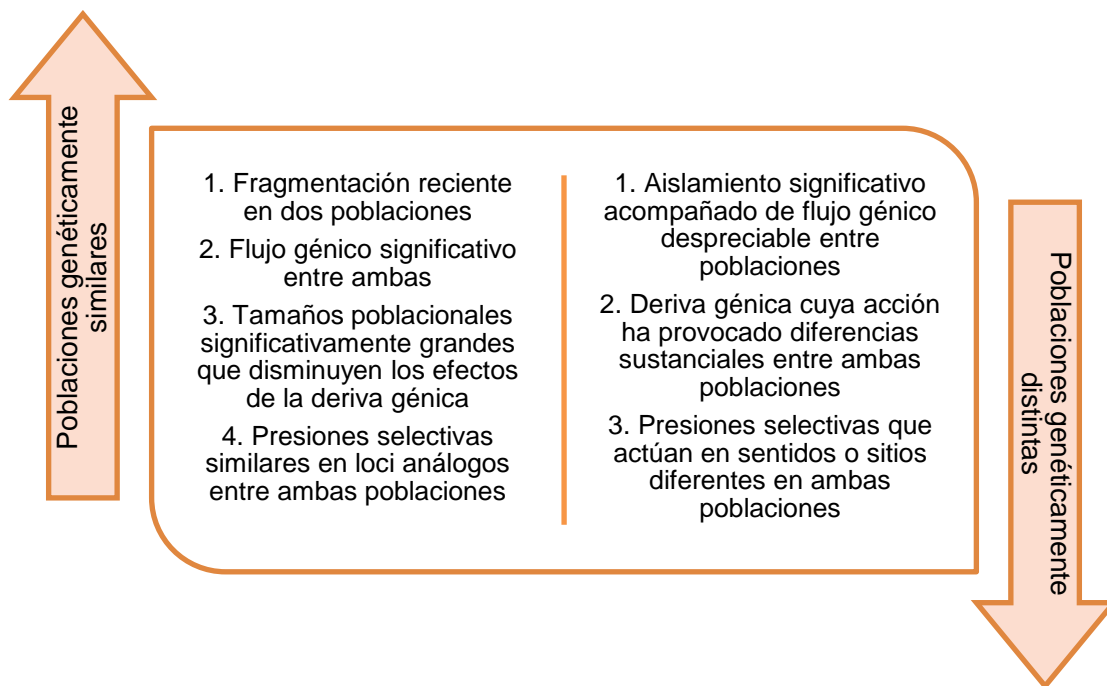


Figura 2. Efecto hipotético de los mecanismos evolutivos sobre la variación genética presente en las poblaciones de una especie (modificado de Hedrick 2011).

2.2.1 Polimorfismos de DNA: Parámetros de diversidad y variación genética

Un **polimorfismo de DNA**, etimológicamente definido como la propiedad de muchas formas, se refiere a la existencia en una población de uno o más alelos en un locus, así como las diferencias a nivel de nucleótidos posicionados en sitios homólogos (Hamilton 2009).

El método más sencillo y fundamental para cuantificar la evolución a nivel molecular es a través de la comparación de secuencias de DNA, lo cual se lleva a cabo en dos procesos: a) alineamiento de secuencias, de tal manera que los sitios homólogos entre las secuencias se alineen en las mismas columnas, y b) la determinación en posición y número de los sitios variables (Hamilton 2009). Las secuencias de DNA pueden diferir entre sí debido a la sustitución de nucleótidos en uno o más sitios, la cual ocurre en dos tipos: transiciones, en donde la sustitución ocurre entre purinas-purinas (A reemplazando a T o viceversa) o pirimidinas-pirimidinas (G reemplazando a C o viceversa) y transversiones, en donde la sustitución ocurre entre pirimidinas-purinas o purinas-pirimidinas (A por C, C por G. A por T y T por G, o viceversa en todos los casos) (Morrone 2013). A partir de la comparación de secuencias de DNA mediante un alineamiento múltiple, se puede obtener una serie de parámetros o medidas que caracterizan los patrones del polimorfismo de DNA en una muestra, los cuales se describirán a continuación.

Diversidad nucleotídica (π) es el número promedio de nucleótidos distintos por sitio entre dos secuencias de DNA tomadas al azar; es una medida independiente del tamaño de la muestra y de la longitud del marcador, por lo que es una medida del polimorfismo de DNA útil y comparable entre distintos marcadores y poblaciones, incluso entre organismos de distintas especies (Eguiarte *et al.* 2007, Kartavtsev 2015, Nei & Li 1979, Nei & Tajima 1981). La diversidad nucleotídica se obtiene a partir de: $\pi = \frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n \sum_{j>1}^n d_{ij}$, donde i y j representan cada par de secuencias de DNA a comparar, d_{ij} son las diferencias a nivel de nucleótido entre las anteriores y n es el tamaño de muestra (Hamilton 2009, Nei & Li 1979, Nei & Tajima 1981).

Diversidad haplotípica (H_d o h): Es una medida de la singularidad de un haplotipo en la población, o la probabilidad de que dos haplotipos al azar sean distintos; es un equivalente de la heterocigosis esperada y, al igual que ésta, presenta las mismas propiedades estadísticas y el valor esperado bajo el modelo de alelos infinitos (Kartavsev 2015, Nei 1987, Nei & Tajima 1981). A partir de una muestra de n secuencias, con l haplotipos y una frecuencia de muestreo x_i del i ésimo haplotipo, se obtiene la diversidad haplotípica mediante: $h = \frac{n(1 - \sum_{i=1}^l x_i^2)}{(n-1)}$ (Nei & Tajima 1981).

Theta (θ): Estima la proporción esperada de sitios nucleotídicos polimórficos en la muestra (Watterson 1975). Este parámetro se puede obtener de dos maneras: 1) a partir del número de sitios segregantes, $\theta = S/a$, donde $a = \sum_{i=1}^{n-1} 1/i$ y n =tamaño de la muestra o el número total de secuencias; 2) a partir del desajuste nucleotídico, que bajo el modelo de sitios infinitos es igual a theta ($\theta = \Pi$) (Hartl & Clark 2007, Watterson 1975). Según Hartl & Clark (2007), el desajuste nucleotídico (Π , k) es el número de sitios en la muestra que difieren en la comparación de cada par de secuencias y su proporción entre el total de las comparaciones; al eliminar la limitación de la longitud de las secuencias y expresar a S y Π como una proporción del total de sitios, se establece que $\pi = \frac{\Pi}{L}$, donde L =longitud de las secuencias.

Proporción de sitios segregantes (P_s o S^*): Detalla la relación entre número de sitios segregantes (S) y el total de sitios comparados en una secuencia (N), por lo que $P_s = S/N$ (Hedrick 2011). Debido a que no se tiene un consenso en el establecimiento de un símbolo para este parámetro, también se denomina polimorfismo nucleotídico *sensu* Hartl & Clark (2007).

Análisis de haplotipos. Un **haplotipo** es un grupo particular de genes heredado en conjunto a partir de un organismo parental (Editorial Board 2012). Este término es una contracción de “genotipo haploide”, en donde “haploide” describe la ploidía “ n ” o un juego único de cromosomas por célula, por lo tanto, una copia de un gen por locus; “genotipo” se refiere al conjunto de genes de un organismo y su composición genética en un locus específico o en loci determinados (Editorial Board 2012, Nature Scitable 2014). En función de las conexiones por pasos mutacionales con otros haplotipos, su frecuencia, su ubicación en los cladogramas y su presencia en n poblaciones, se distinguen varios tipos de haplotipos: **ancestrales**, los cuales generalmente reúnen aquellas secuencias representadas con mayor frecuencia en la muestra y presentan mayor conexión a través de pasos mutacionales con otros haplotipos; **únicos**, representados por un solo organismo o restringidos a una población; **compartidos**, conformados por individuos de distintas poblaciones; **terminales**, aquellos con una sola conexión con otro haplotipo a través de un paso mutacional; **internos**, aquellos con más de una conexión mutacional; **no muestreados o extintos**, los cuales se representan como un paso mutacional inmediato entre haplotipos y no forman parte del conjunto de secuencias original (Crandall & Templeton 1993, Clement *et al.* 2000, Núñez-Resendiz 2015).

A partir del análisis de los haplotipos presentes en una población se pueden obtener parámetros de interés como la diversidad haplotípica (H_d , mencionada anteriormente) y el número de haplotipos

en el total de la muestra y por población (H_T y H , respectivamente); sin embargo, también es posible la construcción de árboles de parsimonia, los cuales se representan de manera gráfica como redes de haplotipos: estas se definen como el conjunto de nodos que trazan las relaciones evolutivas entre los haplotipos contemplados (Núñez Resendiz 2015). Existen distintos métodos para su realización; sin embargo, uno de los más utilizados es el de la **parsimonia estadística**, ya que es el más adecuado para la evaluación de la robustez de la hipótesis a partir de datos con pocos sitios parsimoniosamente informativos (Núñez-Resendiz 2015, Templeton *et al.* 1992). Las redes haplotípicas mediante parsimonia estadística arrojan el agrupamiento de secuencias en conjuntos de haplotipos separados, conocidos también como grupos genéticos, los cuales consisten en haplotipos cercanamente relacionados y conectados por pasos mutacionales libres de homoplasia (Núñez-Resendiz 2015, Thormann *et al.* 2016). Debido a que en este tipo de reconstrucción filogenética intraespecífica es impráctico el enraizamiento de los árboles por la similitud entre sus partes, se opta por la elección de aquel haplotipo que mejor represente al grupo externo con base en tres criterios: mayor antigüedad, mayor frecuencia en las subpoblaciones y mayor número de conexiones con otros haplotipos; de esta manera, su peso como grupo externo se define en función de su frecuencia como $p(\text{haplotipo } i \text{ más antiguo}) = \frac{n_i}{n}$, i.e. la probabilidad de que el *i*-ésimo haplotipo con frecuencia n_i sea el de mayor antigüedad en la muestra de tamaño n (Crandall & Templeton 1993).

Es importante resaltar que el análisis de parsimonia estadística, a través de la estructuración de las muestras de interés en grupos genéticos, constituye uno de los distintos criterios de **delimitación molecular de especies**, entre los que se incluyen los métodos de distancia, el modelado mixto generalizado Yule-coalescente (GMYC) y el modelado de procesos de árboles de Poisson (PTP), los cuales complementan los estudios de diversidad específica según Thormann *et al.* (2016).

2.2.2 Parámetros de diferenciación y estructura genética

Debido a que no siempre es posible obtener estimados directos de flujo génico o del grado de divergencia entre las subpoblaciones, v. g. registros de natalidad y análisis de parentesco, se han utilizado medidas indirectas obtenidas a partir del análisis de los marcadores moleculares, como las distancias genéticas y los estimados de diferenciación genética, los cuales son útiles para confirmar observaciones no concluyentes de los fenómenos en las poblaciones naturales y evaluar el impacto

de la distribución geográfica en la estructura de las mismas (Hedrick 2011). Los parámetros más utilizados son los siguientes:

Estadísticos F de Wright (1951). Sewall Wright desarrolló tres coeficientes (F_{ST} , F_{IT} y F_{IS}) utilizados para determinar la variabilidad al nivel poblacional total (T), en subpoblaciones (S) e individual (I) (Hedrick 2011, Wright 1951). F_{ST} , también conocido como índice de fijación, es una medida de la diferenciación genética entre subpoblaciones; F_{IS} y F_{IT} cuantifican desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en las subpoblaciones y en el total, respectivamente, indicando una deficiencia de heterocigos con valores positivos y viceversa (Hedrick 2011). La comparación de los distintos niveles de jerarquía, basados en los estadísticos F, origina las variantes observadas como F_{SR} (subpoblaciones S con relación a los agregados regionales R) o F_{RT} (agregados regionales R respecto del total T); sin embargo, generalmente el nivel ST es el nivel más inclusivo en la subdivisión de las poblaciones (Hartl & Clark 2007). Wright (1978) provee una interpretación de los distintos intervalos para el valor del F_{ST} o índice de fijación: 0-0.05 indica poca variación genética; 0.05-0.15 indica moderada diferenciación genética; 0.15-0.25 indica gran diferenciación genética, y >0.25 indica bastante diferenciación genética (Hartl & Clark 2007). De esta manera, en casos extremos de aislamiento y estructura entre subpoblaciones, los valores del número de migrantes y el índice de fijación son $Nm=0$ y $F_{ST}=1$, respectivamente.

Estadísticos Φ de Excoffier *et al.* (1992). Análogos a los estadísticos F, se utilizan los estadísticos Φ (Φ_{PT} , Φ_{RT} y Φ_{PR}), que reflejan la correlación entre la diversidad haplotípica en distintos niveles de subdivisión jerárquica; de manera concreta, Φ_{PT} provee un estimado de la proporción de varianza genética de los individuos al interior de las poblaciones respecto a la varianza total, Φ_{RT} detalla la correlación de individuos dentro de una región respecto al total, y finalmente Φ_{PR} señala la correlación de los individuos al interior de las poblaciones respecto a la región (Excoffier *et al.* 1992, Peakall *et al.* 1995, Flanagan *et al.* 2006).

Los estadísticos de diferenciación y estructura usualmente se obtienen al realizar un análisis de varianza molecular (**AMOVA**), el cual permite la partición jerárquica de la variación genética entre poblaciones y regiones a partir de una matriz del cuadrado de las distancias entre todos los pares de haplotipos, y que además utiliza un enfoque permutacional para evaluar la significancia estadística de los componentes de la varianza y los estadísticos Φ (Excoffier *et al.* 1992, Peakall *et al.* 1995). Las pruebas de significancia parten de la hipótesis nula de que no existe estructura genética en los respectivos niveles jerárquicos ($\Phi_{PT}=0$, $\Phi_{RT}=0$, $\Phi_{PR}=0$) y generalmente se utilizan 1000

permutaciones (Flanagan *et al.* 2006). A partir del estimado de Φ_{PT} determinado mediante un AMOVA, es posible obtener un estimado indirecto de flujo génico en genoma haploide, a través de la siguiente ecuación: $Nm = \frac{[(1/\Phi_{PT}) - 1]}{2}$ (Peakall & Smouse 2006, 2012).

Prueba de Mantel (1967). El objetivo de este método es evaluar la significancia estadística de la relación existente entre la distancia geográfica y la divergencia genética entre poblaciones, a partir de la asociación de dos matrices con datos geográficos y datos de diferenciación o distancias genéticas (Mantel 1967, Diniz-Filho *et al.* 2013, Núñez-Resendiz 2015). La ecuación original de la prueba de Mantel es la siguiente: $Z_m = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n g_{ij} d_{ij}$, donde g_{ij} y d_{ij} son las matrices de distancias genéticas y geográficas, respectivamente, considerando n poblaciones, por lo que Z_m es dependiente de la cantidad de poblaciones estudiadas y la magnitud de las diferencias (Mantel 1967, Diniz-Filho *et al.* 2013). La estandarización de las matrices previa a la prueba de Mantel (media aritmética de cero, varianza de 1), o la utilización de la ecuación estandarizada $Z_N = \frac{\sum_{i \neq j}^n (g_{ij} - \bar{G})(d_{ij} - \bar{D})}{\sqrt{[var(G)var(D)]}}$, arrojan un valor de correlación de Mantel tal que $Z_m = Z_N$, ambos valores a su vez iguales al coeficiente de correlación de Pearson (r) que aplicado a la genética de poblaciones se denomina correlación de Mantel (r_m) (Diniz-Filho *et al.* 2013). Valores estadísticamente significativos cercanos a 1 indican que el incremento en distancia geográfica entre las poblaciones i y j está relacionado con un incremento en la diferenciación o distancia genética entre las mismas, *i.e.*, proporcionalidad directa; los valores cercanos a -1 indican el patrón opuesto, *i.e.*, proporcionalidad inversa; valores cercanos a cero indican que no existe relación lineal entre las matrices (Diniz-Filho *et al.* 2013).

Distancias genéticas. Un enfoque alternativo comúnmente utilizado para cuantificar el grado de diferenciación entre grupos o especies, está constituido por las **distancias genéticas**: estas consolidan grandes cantidades de datos asociados a distintos loci y poblaciones en proporciones que ayudan a visualizar las relaciones generales entre poblaciones (Hedrick 2011). A nivel de nucleótidos, el número total de sitios variables entre dos secuencias de DNA dividido entre el número total de sitios comparados arroja la proporción de sitios distintos, denominado **p-distances** (distancias p), una medida básica de los eventos evolutivos ocurridos desde que dos secuencias de DNA descendieron de una ancestral en común, cuando aún eran copias idénticas de la secuencia original; de esta manera, la distancia p entre dos secuencias muestreadas a partir de poblaciones totalmente independientes incrementará en el tiempo debido a que las sustituciones en cada población reemplazarán al nucleótido originalmente compartido a través de la identidad por

descendencia (Hamilton 2009). Estas distancias genéticas pueden ser representadas a través de matrices, ya que surgen de la comparación entre dos secuencias, y posteriormente transformadas a porcentajes.

2.2.3 Pruebas de neutralidad selectiva e historia demográfica

La relación entre los parámetros que afectan la variación genética (*v.g.* S , π , θ) ocurre bajo un modelo y una serie de supuestos en los que ocurre la evolución en las secuencias de DNA. El modelo más simple es el **modelo de sitios infinitos** (*ingl.* ISM, Kimura 1969), en el cual las secuencias están constituidas por un número infinito de sitios nucleotídicos sin recombinación, con sustituciones selectivamente neutrales ocurridas en distintas posiciones; eventualmente la población alcanza un equilibrio en el que S y π son constantes (Hartl & Clark 2007). Las diferencias entre los estimados de los parámetros de variación genética constituyen un criterio para detectar desviaciones al equilibrio logrado bajo el modelo de sitios infinitos, lo cual deriva en la detección de ciertos tipos de selección o eventos demográficos (Eguiarte 2007, Fu & Li 1993, Hartl & Clark 2007, Ramírez-Soriano *et al.* 2008). Los estadísticos que a continuación se detallarán se dividen en dos categorías según Ramírez-Soriano *et al.* (2008): a) **clase I**, estadísticos que se basan en la frecuencia de las mutaciones y en las diferencias entre estimadores de la tasa de mutación poblacional ($\theta=4N_e\mu$ para loci autosómicos y $\theta=2N_e\mu$ para haploides (Fu 1997), donde N_e =tamaño efectivo poblacional y μ =tasa de mutación de determinado gen) como D de Tajima, F y F^* de Fu & Li; b) **clase II**, estadísticos basados en la distribución haplotípica, los cuales se muestran más afectados por la recombinación, como F_s de Fu. Es importante destacar que, debido a la distribución de los estimados, el límite inferior o izquierdo corresponde con crecimientos en el tamaño poblacional y la mayoría de los cuellos de botella, en tanto que el límite superior o derecho corresponde con disminuciones en el tamaño poblacional o cuellos de botella sucedidos recientemente (Ramírez-Soriano *et al.* 2008).

D de Tajima (Tajima 1989). A partir de las maneras mencionadas en las que se obtiene el valor de θ , tanto del número de sitios segregantes como del desajuste nucleotídico, Tajima (1989) propuso que la diferencia entre el estimado de theta en ambas ecuaciones podría ser utilizado como un test de bondad de ajuste al modelo de sitios infinitos. Esto radica en que el número de sitios segregantes difiere del promedio de desajustes nucleotídicos al ser indiferente a las frecuencias relativas de los nucleótidos polimórficos en un sitio (Hartl & Clark 2007). La estimación del

parámetro D según Tajima (1989) y Hartl & Clark (2007) se obtiene de esta manera: $D = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{V(\pi - \theta)}}$, en la que cada elemento se ha descrito anteriormente. Según Hartl & Clark (2007), al estimar el parámetro D pueden ocurrir 3 casos:

- D=0, si $\pi - S/a = 0$ por tanto $\pi = \theta$, por lo que se ajusta al modelo de sitios infinitos o las diferencias son estadísticamente no significativas.
- D adquiere valor positivo y las frecuencias de los nucleótidos polimórficos son casi iguales, por lo que este patrón incrementa el número promedio de diferencias pareadas sobre la expectativa neutral ($\pi - S/a$ es positivo, por lo que $\pi > \theta$) (Hartl & Clark 2007). Se sugiere un tipo de selección balanceadora (genotipos heterocigos se favorecen) o diversificadora (genotipos poco comunes se favorecen), al igual que la hipótesis de que la población se formó a partir de la reciente unión entre dos poblaciones.
- D adquiere valor negativo y las frecuencias de los nucleótidos polimórficos son muy desiguales, con un exceso en la frecuencia de la variante más común y bastantes sitios con variantes poco representadas, lo que ocasiona un decrecimiento de la proporción de diferencias pareadas ($\pi - S/a$ es negativo, por lo que $\pi < \theta$) (Hartl & Clark 2007). Se sugiere la selección contra genotipos con mutaciones deletéreas (purificadora), poblaciones en expansión o un evento reciente de cuello de botella (Tajima 1989, 1993).

Los intervalos de confianza para el valor de D en función del tamaño de la muestra (n) se pueden obtener a partir de la tabla 2 de Tajima (1989), lo que proporciona un soporte estadístico en el rechazo o no rechazo de la hipótesis nula (desviaciones estadísticamente no significativas bajo los supuestos del ISM) (Tajima 1989, 1993).

F* de Fu & Li (1993). Este parámetro está basado directamente en la coalescencia y en ausencia de recombinación, por lo que Fu & Li (1993) propusieron un enfoque distinto al estadístico anterior en el que las mutaciones son clasificadas según su ubicación en una genealogía de secuencias: las mutaciones externas (η_e) ocurren en ramas externas y las mutaciones internas (η_i) en ramas internas, de manera que las mutaciones antiguas tienden a aparecer en las partes profundas y las mutaciones novedosas en las partes más recientes, por lo que esta prueba se basa en la comparación del número de mutaciones externas e internas con sus valores esperados bajo neutralidad para detectar selección natural así como en la correlación existente entre el número de

mutaciones totales (η) y π_n . En este estadístico, se compara el número de mutaciones singleton³ (η_s) y el promedio de la diferencia pareada entre secuencias, tomando en cuenta datos intraespecíficos solamente (F^*) o con la adición de un grupo externo (F) (Ramírez-Soriano *et al.* 2008), por lo que

se estima de la siguiente manera: $F^* = \frac{\pi - \eta S^{\frac{n-1}{n}}}{\sqrt{V(\pi - \eta S^{\frac{n-1}{n}})}}$ (Fu & Li 1993). Aunque un exceso de *singletons*

pueden ser el resultado de expansiones poblacionales recientes, se sugiere que estas mutaciones representan variantes deletéreas sostenidas en bajas frecuencias por selección (Hartl & Clark 2007). En presencia de selección negativa o purificadora, habrá un exceso de mutaciones en las ramas externas debido a la presencia de mutaciones deletéreas en bajas frecuencias; sin embargo, el exceso de mutaciones también ocurrirá en presencia de mutaciones ventajosas recientemente fijadas en la población. Por otro lado, en presencia de selección balanceadora se observará una deficiencia de mutaciones en las ramas externas (Fu & Li 1993).

F_s de Fu (1997). Este estadístico se basa en el número distinto de haplotipos en la muestra, partiendo del supuesto de que $p(k|\theta)$ como la probabilidad de tener k haplotipos en una muestra de n secuencias dado θ ; en una muestra con k_0 haplotipos y el promedio de diferencias nucleotídicas entre dos secuencias como θ_n , se define $S' = p(k_0 \leq k | \theta = \theta_n)$ como la probabilidad de tener no menos de k_0 haplotipos al azar, siendo $\theta = \pi$ (Fu 1997, Ramírez-Soriano *et al.* 2008). En una muestra con exceso de mutaciones, θ estimado en θ_n será menor que su valor en el número de haplotipos (θ_n^k), por lo que S' puede ser un buen indicador de mutaciones recientes y al aplicar el ln, se obtiene el estadístico $F_s = \ln\left(\frac{S'}{1-S'}\right)$ (ver ecuaciones en Fu 1997). F_s tiende a ser negativo con un exceso de mutaciones recientes (de ahí un exceso en el número de haplotipos), por lo que la simple obtención de valores elevados negativos sirve como evidencia contra la neutralidad de las mutaciones indicando una reciente expansión poblacional; por lo tanto, la prueba se basa en un solo límite o vía, en donde el estimado positivo evidencia una deficiencia de variantes, como lo esperado en reducciones recientes del tamaño poblacional (cuellos de botella) o a partir de selección balanceadora (Fu 1997).

³ Mutación singleton: En un sitio, es la mutación ocurrida solo una vez entre todo el grupo de secuencias que constituyen la muestra (Fu & Li 1993).

Cabe destacar que las pruebas mencionadas (F^* de Fu & Li, D de Tajima) no distinguen claramente entre los eventos de selección natural y los eventos demográficos (expansión-contracción en tamaño poblacional, cuellos de botella, subdivisión poblacional) al tratarse de análisis de un solo locus, por lo que se sugiere el análisis de dos o más loci: la selección natural actúa en locus específicos, en tanto que los eventos demográficos actúan de manera similar en todo el genoma (genes y regiones) ocasionando desviaciones significativas a lo esperado bajo neutralidad en los parámetros ya mencionados (Tajima 1993, Ramírez-Soriano *et al.* 2008). Sin embargo, Ramírez-Soriano *et al.* (2008) evidenciaron un mayor poder estadístico de F_S de Fu ante eventos demográficos que los estadísticos mencionados, aunque se afecta en gran medida en presencia de recombinación.

A manera de resumen, se presenta una recapitulación de los distintos parámetros utilizados en el presente trabajo de tesis, divididos en tres categorías: variación y diversidad genética, estructura y diferenciación, y pruebas de neutralidad selectiva e historia demográfica (Tabla 1).

Tabla 1. Resumen de los principales parámetros utilizados en la genética de poblaciones (modificado de Casillas & Barbadilla 2017, Ramírez-Soriano *et al.* 2008).

Medida o parámetro	Descripción	Referencia(s)
A) Medidas de variación y diversidad genética		
S	Número de nucleótidos segregantes por sitio	Nei (1987)
P_s, S^*	Relación entre el número de sitios segregantes y el total de sitios de la muestra	Hedrick (2011)
H_d, h	Probabilidad de que dos haplotipos al azar sean distintos ($=H_E$)	Nei & Tajima (1981)
π	Diversidad nucleotídica: número promedio de nucleótidos distintos por sitio entre dos secuencias al azar	Nei & Li (1979) Nei & Tajima (1981)
θ	Proporción de sitios polimórficos esperados ($=\pi$ bajo neutralidad)	Watterson (1975)
B) Medidas de diferenciación y estructura		
F_{ST}	Medida de la diferenciación genética entre subpoblaciones	Wright (1951)
Estadísticos Φ	Correlación de la diversidad haplotípica en distintos niveles de subdivisión jerárquica	Excoffier <i>et al.</i> (1992) Peakall <i>et al.</i> (1995)

Prueba de Mantel	Estructuración de la variación genética en el espacio geográfico	Mantel (1967)
C) Pruebas de neutralidad selectiva e historia demográfica		
D de Tajima	Comparación entre los estimados de π y θ en función del modelo neutral	Tajima (1989)
F* de Fu & Li	Comparación entre el número de mutaciones singleton y la diversidad haplotípica	Fu & Li (1993)
F _s de Fu	Basado en la distribución de muestreo de Ewens, toma en cuenta el número de haplotipos en la muestra y su comparación con π	Fu (1997)

2.3 HERRAMIENTAS MOLECULARES EN LA DETERMINACIÓN DE LA VARIACIÓN GENÉTICA EN ALGAS

Los **marcadores moleculares** son biomoléculas (DNA, proteínas) asociadas con un rasgo genético y una región particular en los distintos genomas (Núñez-Resendiz 2015). En función de su variación, un marcador **monomórfico** es invariable en todos los organismos estudiados, mientras que se habla de un marcador **polimórfico** cuando se presentan diferencias en características tales como el peso molecular, actividad enzimática, sitios de restricción o conformación estructural (proteínas o ácidos nucleicos) (ibíd.).

En estudios microevolutivos de índole filogeográfica y de genética de poblaciones se han empleado distintos marcadores moleculares para la evaluación de la diversidad y variación genética de especies con poca o alta plasticidad fenotípica (Graur & Li 2000, West-Eberhard 2003). Núñez-Resendiz (2015) resume los principales marcadores utilizados en algas rojas y el enfoque aplicado en la literatura (Tabla 2).

Tabla 2. Principales marcadores moleculares utilizados en estudios filogenéticos y microevolutivos de especies de algas rojas (modificado de Núñez-Resendiz 2015 y Díaz-Larrea *et al.* 2015).

Genoma	Marcador molecular	Referencia	Enfoque utilizado
Cloroplasto	Espaciador de RuBisCo	Guillemin <i>et al.</i> 2008; Núñez-Resendiz <i>et al.</i> 2015, 2016; Palma <i>et al.</i> 2017; Zuccarello <i>et al.</i> 2005	Variación genética, estructura y filogeografía

		Destombe <i>et al.</i> 2010; Palma <i>et al.</i> 2017; Pareek <i>et al.</i> 2010; García- Rodríguez <i>et al.</i> 2013; Núñez-Resendiz <i>et al.</i> 2015	Variación genética, estructura y filogeografía
Mitocondria	Espaciador de <i>cox2-3</i>		
	COI	Yang <i>et al.</i> 2008, 2015; Yow <i>et al.</i> 2011, 2013; Muangmai <i>et al.</i> 2015	Sistemática filogenética, filogeografía, código de barras
Núcleo	ITS	Goff <i>et al.</i> 1994	Sistemática filogenética y variación genética

El empleo de los marcadores moleculares, en combinación con estudios de morfología, ha proporcionado evidencias sólidas para la solución de conflictos de identificación errónea de especies, el hallazgo de nuevas especies o la solución de complejos de especies crípticas (Díaz-Larrea *et al.* 2015, Muangmai *et al.* 2015, Núñez-Resendiz *et al.* 2015, 2016).

Particularmente, la utilización de marcadores moleculares extranucleares a partir de secuencias de DNA ha sido popular en el estudio de macroalgas marinas, debido a la facilidad y rapidez en la obtención de las secuencias, la reducción de costos y su disponibilidad en bases de datos especializadas; además, su resolución y la variación genética arrojada han sido útiles en estudios poblacionales y demográficos de algas rojas (Díaz-Larrea *et al.* 2015, Núñez-Resendiz *et al.* 2016, Palma Ortiz *et al.* 2017, Zuccarello *et al.* 1999a,b). La aplicación de los marcadores moleculares en estudios de diversidad genética y variación en algas ha sido esencial, ya que provee mayor conocimiento en materia de conservación, administración de recursos y selección de cepas para cultivo en especies económicamente importantes (Yow *et al.* 2013).

Marcadores moleculares empleados en el presente trabajo de tesis. Se seleccionaron marcadores correspondientes a secuencias de regiones espaciadoras de dos genomas extranucleares haploides, el cloroplasto (espaciador de Rubisco) y mitocondria (espaciador de *cox2-3*). La razón principal radica en que las secuencias de DNA contienen más información sobre la variación genética que otros tipos de análisis moleculares, como la electroforesis de proteínas, debido a que los polimorfismos nucleotídicos son detectados incluso si forman polimorfismos sinónimos⁴ o si están presentes en regiones no codificantes, además de que cada nucleótido puede ser tratado

⁴ Polimorfismo sinónimo: Cambio de nucleótidos presente en regiones codificantes pero que no deriva en el reemplazo del aminoácido por la redundancia del código genético (Hartl & Clark 2007).

individualmente en un conjunto de secuencias alineadas (Hartl & Clark 2007). De esta manera, la variación genética en secuencias de DNA es evaluada de acuerdo con el número de sitios nucleotídicos polimórficos presentes en un conjunto de secuencias.

Los espaciadores de DNA (ingl. *Intergenic spacer, IGS*) son secuencias de DNA no codificante que separan copias de secuencias génicas codificantes; adquieren importancia en la estructura cromosómica y la regulación génica, además de mostrar niveles de polimorfismo de secuencia generalmente mayores que los de las regiones codificantes, por lo que son útiles como marcadores moleculares (Chávez 2006, Hedrick 2011).

Por otra parte, los genomas extranucleares (mitocondrial y plastidial) tienen características particulares que las hacen buenos candidatos para el análisis en materia de genética de poblaciones, sistemática y filogeografía: son de naturaleza haploide, por tanto carecen de recombinación por meiosis, y son de herencia uniparental (Zuccarello *et al.* 1999a,b, Yow *et al.* 2011). A continuación, se describirá brevemente la función de las enzimas codificadas, separadas por las regiones en cuestión, y algunas características de estas últimas.

- **Región intergénica espaciadora de la Rubisco.**

La ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco, EC 4.1.1.39), liasa, es la enzima que interviene durante la principal reacción de reducción de CO₂ en el Ciclo de Calvin-Benson-Bassham: la unión de CO₂ al aceptor ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP) que deriva en la formación de 2 moléculas de 3-fosfoglicerato; esto es, la fijación de carbono y la carboxilación del aceptor RuBP por su actividad carboxilasa (Andersson & Backlund 2008). De manera opuesta actúa como oxigenasa en el proceso de fotorrespiración al fijar el O₂ en el mismo aceptor, RuBP, en forma de glicolato y con la consecuente liberación de CO₂ y energía (Koolman & Roehm 2005).

Estructuralmente, RuBisCO consta de dos subunidades (*rbcL* y *rbcS*) transcritas en un mRNA de aproximadamente 2.7 kb, los cuales están separados por un espaciador cuya longitud fluctúa entre 100 y 200 pb; en rodofitas, este gen en su totalidad está codificado en el genoma plastidial, como se reportó en *Antithamnion* sp. y *Gracilaria verrucosa* (Kostrzewa *et al.* 1990; Destombe & Douglas 1991; Zuccarello *et al.* 1999b).

- **Región intergénica espaciadora de *cox2-3*.**

La enzima citocromo *c* oxidasa (COX, EC 1.9.3.1), oxidorreductasa, es la enzima catalizadora del paso final de la cadena respiratoria (Complejo IV); recibe electrones del citocromo *c* y los transfiere al oxígeno molecular, el cual eventualmente se reduce en forma de agua y tiene como proceso acoplado la producción de ATP por la ATP sintasa (Koolman & Roehm 2005).

Estructuralmente, las subunidades 2 (*cox2*) y 3 (*cox3*) de la enzima citocromo *c* oxidasa están separadas por un espaciador intergénico que varía en longitud, desde ~50 pb en *Cyanidium* sp. hasta ~190 pb en *Porphyra* sp. (Zuccarello *et al.* 1999a, Yow *et al.* 2011).

3. ANTECEDENTES

3.1 LA FAMILIA SOLIERIACEAE J. AGARDH, 1876

Solieriaceae es una familia de algas rojas marinas ampliamente distribuida en el mundo; con alrededor de 20 géneros y alrededor de 90 especies taxonómicamente aceptadas (Guiry & Guiry 2018), por lo que constituye una de las familias de carragenofitas más diversa del orden Gigartinales (Fredericq *et al.* 1999, Núñez-Resendiz *et al.* 2017a,b,c, Watt *et al.* 2003), conspicuas y económicamente importantes (Freile-Pelegrin & Robledo 2006, 2008; Freile-Pelegrin *et al.* 2006). Según Guiry & Guiry (2018), los géneros aceptados subordinados a esta familia son los siguientes: *Agardhiella* Schmitz, *Betaphycus* Doty, *Eucheuma* J. Agardh, *Euryomma* Schmitz, *Flahaultia* Bornet, *Gardneriella* Kylin, *Kappaphycus* Doty, *Lenormandia* Montagne, *Mammea* J. Agardh, *Melanema* Min-Thein & Womersley, *Meristotheca* J. Agardh, *Neoagardhiella* M.J.Wynne & W.R.Taylor, *Placentophora* Kraft, *Sarcodiotheca* Kylin, *Sarconema* Zanardini, *Solieria* J. Agardh (género tipo), *Tacanoosca* Norris, Gabrielson & Cheney, *Tepoztequiella* Núñez-Resendiz, Dreckmann & Senties, *Tikvahiella* Kraft & Gabrielson y *Wurdemmania* Harvey.

Estructuralmente, todos los representantes de Solieriaceae se caracterizan por la presencia de una médula filamentosa y una corteza pseudoparenquimatosa (Núñez-Resendiz *et al.* 2017a,b,c). Además de la presencia de tetrasporangios zonados, esta familia se caracteriza por la formación de

células auxiliares y carpogonios⁵ en ramificaciones distintas, por lo que la transferencia del núcleo diploide hacia la célula auxiliar ocurre a través de estructuras largas tubulares denominadas filamentos de conexión, caracter compartido con la familia Furcellariaceae; en adición, se presentan cistocarpos⁶ en los cuales el gonimoblasto⁷ se desarrolla internamente a partir de la célula auxiliar, y a menudo se conectan con filamentos del gametofito masculino por medio de fusiones celulares o *pit connections* secundarias (Fredericq *et al.* 1999, Núñez-Resendiz *et al.* 2017b).

Según las características del carposporofito⁸ maduro, se hizo la distinción de dos grupos morfológicos al interior de Solieriaceae: los géneros *Betaphycus*, *Callophycus* Trevisan, *Eucheuma*, *Kappaphycus*, *Melanema*, *Solieria*, *Reticulobotrys* Dawson, *Sarconema*, *Tacanoosca* y *Tikvahiella*, los cuales presentan una célula central única de la cual derivan los filamentos diploides periféricos del gonimoblasto, en tanto que los géneros *Agardhiella*, *Anatheca* F. Schmitz, *Euryomma*, *Flahaultia*, *Gardneriella*, *Meristiella* Cheney, *Meristotheca*, *Placentophora* y *Sarcodiotheca* presentan una masa pseudoparenquimatosa central de células estériles que origina los gonimoblastos periféricos (Núñez-Resendiz *et al.* 2017b, Watt *et al.* 2003).

Los representantes de esta familia se distribuyen ampliamente en aguas tropicales y templadas del mundo (Núñez-Resendiz *et al.* 2017a,b,c). En los litorales de México se distribuyen 10 de los 17 géneros actualmente válidos de la familia Solieriaceae, lo cual representa un 59% de diversidad genérica a nivel mundial, mientras que a nivel específico se han registrado 19 de las 89 especies actualmente en uso (21%): 11 especies (12%) en litorales del Pacífico y 9 especies (10%) en litorales del Atlántico; en particular, la Península de Yucatán es una de las regiones con la mayor riqueza taxonómica en el país, siendo Campeche uno de los estados con mayor número de géneros (5) y especies (7) registrados, por lo que en conjunto con la Península de California son las áreas con mayor riqueza taxonómica a nivel nacional (Núñez-Resendiz *et al.* 2017b). Las siete especies registradas en el estado de Campeche son las siguientes: *Agardhiella ramosissima* (Harvey) Kylin, *A. subulata* (C. Agardh) Kraft & M. J. Wynne, *E. isiforme*, *Kappaphycus inermis* (F. Schmitz) Doty ex H.

⁵ Carpogonio: Estructura en la que se producen los gametos femeninos, denominada así en el caso de las rodofitas. Sinónimo de arquegonio (Carmona *et al.* 2004).

⁶ Cistocarpo: Estructura que comprende el carposporofito y cualquier cubierta o pericarpo que lo proteja (ibíd.).

⁷ Gonimoblasto: Filamento que surge posteriormente de la singamia y que origina al carposporangio (ibíd.).

⁸ Carposporofito: Talo esporofítico que parasita al gametofito femenino. Es la generación esporofítica que produce carposporas y darán origen al tetrasporofito.

D. Nguyen & Q. N. Huynh, *M. cylindrica*, *M. gelidium* y *Solieria filiformis* (Kützinger) P. W. Gabrielson (Callejas-Jiménez *et al.* 2005, Ortega *et al.* 2001, Núñez-Resendiz *et al.* 2017b).

Sin embargo, dados los límites morfológicos vagamente definidos entre las especies registradas para la región, y la inexistencia de trabajos de índole morfológica y taxonómica para Solieriaceae en México, no existen argumentos suficientes para sostener los nombres incluidos en los listados realizados en trabajos previos, por lo que se han hecho identificaciones erróneas o dudosas acerca de nuevos registros, lo que en consecuencia conllevaría una estimación equívoca de diversidad para el país (Núñez-Resendiz 2017b).

3.2 EL GÉNERO *MERISTOTHECA* J. AGARDH, 1872

El género *Meristotheca*, cuya especie tipo es *Meristotheca papulosa* (Montagne) J. Agardh, se describió en 1872 para agrupar a las especies *M. papulosa* (originalmente descrita como *Kallymenia papulosa* Montagne) y *M. duchassaingii* J. Agardh (Agardh 1872, Faye *et al.* 2004). En la actualidad, se registran 13 especies aceptados taxonómicamente: *Meristotheca coacta* Okamura, *M. cylindrica*, *M. dakarensis* Faye & Masuda, *M. decumbens* Grunow, *M. fergusonii* Grunow ex Mazza, *M. gelidium* (J. Agardh) E. J. Faye & M. Masuda, *M. imbricata* E. J. Faye & M. Masuda, *M. papulosa*, *M. peltata*, *M. polychotoma* (Kützinger) Millar, *M. procumbens* P. W. Gabrielson & Kraft, *M. senegalense* Feldmann y *M. tobagensis* W. R. Taylor, mientras que las siguientes especies son consideradas sinónimos nomenclaturales: *M. duchassaingii* [sinónimo de *Halymenia duchassaingii* (J. Agardh) Kylin], *M. echinocarpa* (Areschoug) E. J. Faye & M. Masuda y *M. schrammii* (P. Crouan & H. Crouan) J. H. Price, D. M. John & G. W. Lawson [ambos sinónimos de *M. gelidium*], *M. floridana* Kylin y *M. gigartinooides* A. B. Joly & Ugadim ex A. B. Joly *et al.* [ambos sinónimos de *Agardhiella floridana* (Kylin) P. W. Gabrielsen ex Guimarães & Oliviera], *M. japonica* Kylin (sinónimo de *M. papulosa*), *M. natalensis* J. Agardh [sinónimo de *Cryptonemia natalensis* (J. Agardh) Chiang] y *M. tasmanica* J. Agardh [sinónimo de *Austrophyllis harveyana* (J. Agardh) Womersley & R. E. Norris] (Guiry & Guiry 2018, Faye *et al.* 2004, Watt *et al.* 2003).

Este género posee las siguientes características vegetativas: talos de ~25 cm de altura; solitarios o gregarios, psamofíticos o epilíticos; erectos, postrados o imbricado, sujetos al sustrato mediante un disco basal principal o con discos secundarios; textura lisa, cartilaginosa, rígida o semirígida; coloración púrpura o negruzca; sin calcificaciones; rotación en 360° de las células periaxiales

alrededor a las células sucesivas de los filamentos del eje central (Figura 3); ramificaciones presentes, escasas o abundantes; ramas transversalmente circulares (teretes o cilíndricas) o complanadas; ápices agudos o redondeados; origen de ramificación simpodial en uno o varios planos, siendo en ejes y ramas principales opuesta, alternada o dicotómica, mientras que en ramas derivadas la ramificación es opuesta en un plano (pinnada opuesta), alternada o subdicotómica; ramificaciones carpogoniales con 3 células, ocasionalmente las células basales portan una célula estéril (Guiry & Guiry 2018, Frey 2017, Núñez-Resendiz *et al.* 2017a, Watt *et al.* 2003).

En cuanto a las estructuras reproductivas, se presentan tetrasporangios zonados en ápices productores de tétradas zonadas de meiosporas (Figura 3); gametofitos masculinos con nematecios⁹ espermatangiales en las ramificaciones carpogoniales; carposporofitos consistentes en una placenta central formada a partir de la fusión parcial del gametofito y células del gonimoblasto, formados en cistocarpos con pericarpo consolidado (Figura 3); carposporangios individuales, terminales y liberados por el ostiolo del pericarpo; gametofitos monoicos con células espermatangiales formadas en la superficie de nematecios carpogoniales (Frey 2017, Guiry & Guiry 2018, León-Álvarez *et al.* 2017, Núñez-Resendiz *et al.* 2017a, Watt *et al.* 2003).

Anatómicamente, se muestra una médula central, amplia, con filamentos angostos lateralmente entrelazados por conexiones secundarias; la médula se rodea por una corteza interna compuesta de células subsodiamétricas ovoides, elípticas, ovaladas o estrelladas, de mayor tamaño que las medulares y que disminuyen en tamaño progresivamente hasta la corteza externa, la cual se compone de células pequeñas y pigmentadas (Figura 3) (León-Álvarez *et al.* 2017, Watt *et al.* 2003).

⁹ Nematecio: elevación a manera de almohadilla que contiene estructuras reproductoras; es un soro especializado que puede ocurrir en franjas (Carmona *et al.* 2004).

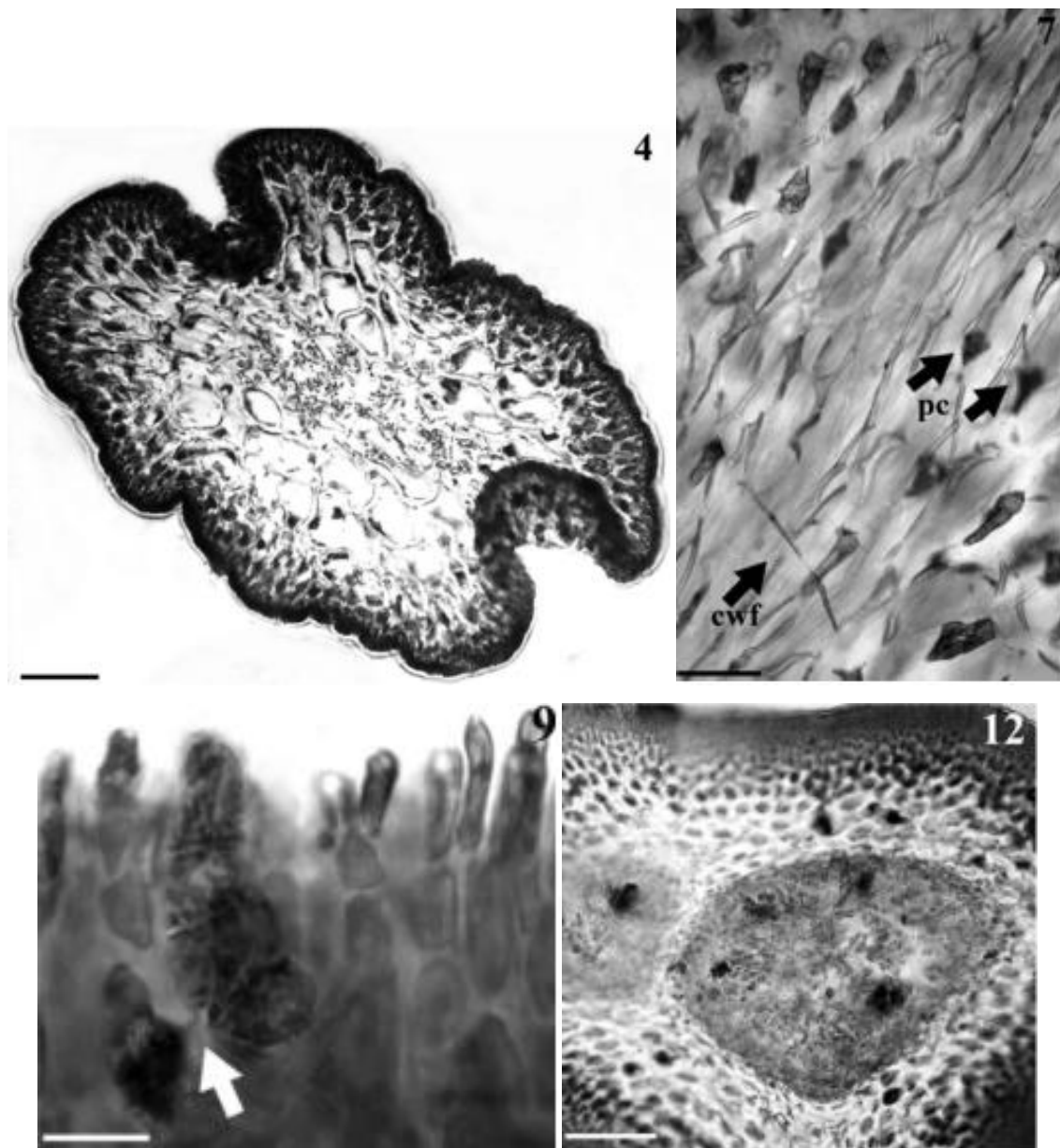


Figura 3. Fig. 3-4. Isotipo UAMIZ-1251. Corte transversal que muestra la médula filamentosa y la corteza pseudoparenquimatosa. Barra de escala= 120 μ m. **Fig. 3-7.** Vista de filamentos axiales paralelos al plano longitudinal del eje, portando células periaxiales (pc) Filamentos medulares adventicios (cwf) atravesando el eje (UAMIZ-1251). Barra de escala =30 μ m. **Fig. 3-9.** Tetrasporangios divididos zonalmente comunicados mediante *pit connections* laterales a la célula parental (flecha) (UAMIZ-1250). Barra de escala =20 μ m. **Fig. 3-12.** Corte transversal que muestra cistocarpos inmaduros (UAMIZ-1246). Barra de escala= 120 μ m. (modificado de Núñez-Resendiz *et al.* 2017a).

Las especies de este género se distribuyen ampliamente en el área del Indo-Pacífico y a través de los trópicos de ambos hemisferios (Frederiq *et al.* 1999, Núñez-Resendiz 2017a). En los litorales del Golfo de México se han registrado tres especies del género *Meristotheca*: *M. cylindrica*, *M. gelidium* y *M. tobaguensis* W. R. Taylor (Ortega *et al.* 2001, Faye *et al.* 2004, Callejas-Jiménez *et al.* 2005, Núñez-

Resendiz *et al.* 2017a). Sin embargo, la inclusión de *M. tobagensis* W. R. Taylor en los registros para esta localidad es cuestionable, ya que la identidad taxonómica de la especie no se ha resuelto vía sistemática filogenética y por el desconocimiento de una serie de caracteres morfológicos reproductivos: complejo de células auxiliares, células estériles en ramas carpogoniales, el número de células en estas últimas y la posición de las *pit connections*, por lo que se propuso una reexaminación molecular del material tipo y la comparación con secuencias de DNA con las especies reportadas en el Golfo de México y el Caribe (Faye *et al.* 2004, Núñez-Resendiz *et al.* 2017a).

Los estudios filogenéticos realizados tanto por Faye *et al.* (2004) como Núñez-Resendiz *et al.* (2017) han provisto hipótesis robustas acerca de las relaciones existentes al interior de *Meristotheca*, así como su posición dentro de Solieriaceae (Figura 4). En ambos estudios, *M. dakarensis* aparece consistentemente como el linaje más antiguo por ser el grupo basal del resto de especies involucradas, en tanto que *M. cylindrica* y las especies provenientes de los océanos Índico y Pacífico conforman el grupo hermano del linaje proveniente del Mar Caribe, conformado por *M. gelidium*.

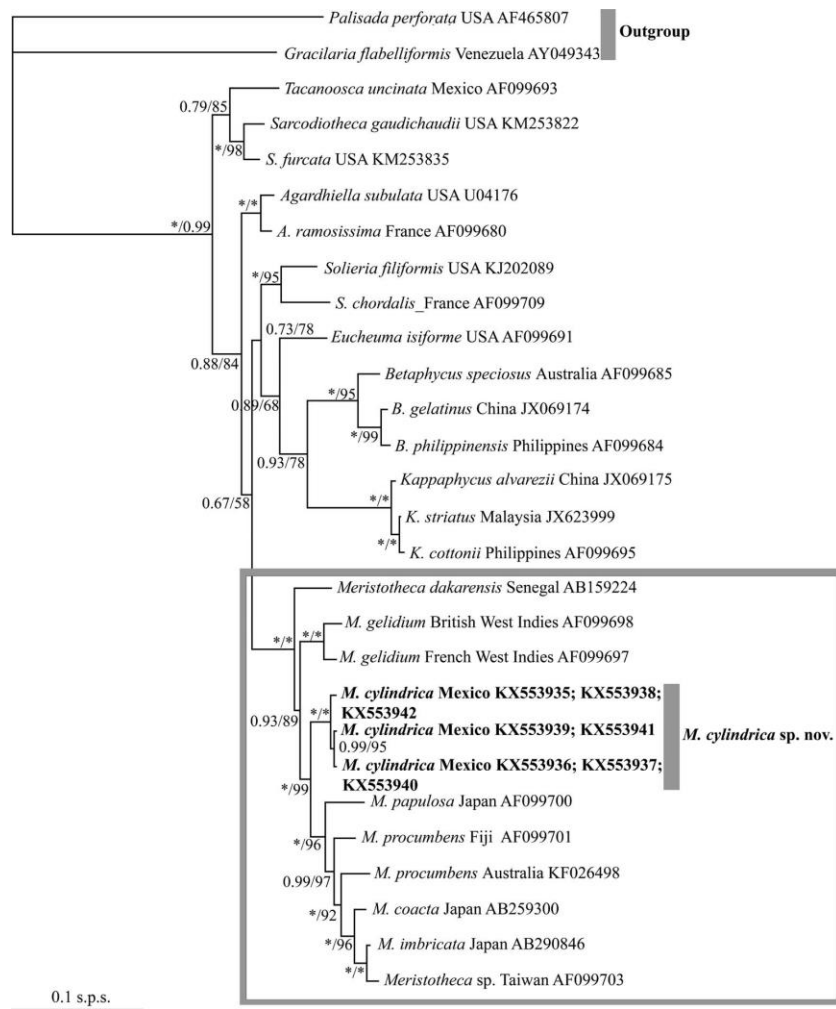


Figura 4. Topología bayesiana basada en secuencias de *rbcL* para los representantes de Solieriaceae. Se muestran los valores de probabilidad posterior (izquierda) y *bootstrap* (derecha) en cada rama, con asteriscos indicando el máximo valor de soporte filogenético. Se indican las localidades y los números de acceso al Genbank para cada secuencia. El recuadro indica el clado conformado por las muestras de *Meristotheca* (recuperado de Núñez-Resendiz *et al.* 2017a).

3.2.1 Aspectos taxonómicos del género

Propuesta del género *Meristiella* Cheney. Debido a la importancia económica del género *Eucheuma* por su contenido en carragenanos kappa e iota, y los subsecuentes estudios fisiológicos, bioquímicos y taxonómicos realizados con mayor ímpetu en la región del Atlántico occidental durante las décadas de los años 1970 y 1980, Gabrielson & Cheney (1987) consideraron la necesidad de revisiones taxonómicas del género a partir de los resultados de diversos autores:

- Cheney & Babbel (1978) presentaron evidencia electroforética de que las cuatro especies de *Eucheuma* reportadas en Florida [*E. acanthocladum* (Harvey) J. Agardh, *E. gelidium* (J. Agardh)

J. Agardh, *E. isiforme* y *E. nudum* J. Agardh] conformaban dos grupos pareados, *E. isiforme*-*E. nudum* y *E. acanthocladum*-*E. gelidium*, concluyendo que estas últimas son manifestaciones de la misma especie. Los valores de identidad genética al interior de los grupos mostraron diferencias similares a las observadas en poblaciones intraespecíficas, en tanto que entre los grupos se arrojaron diferencias observadas intergenéricamente en la familia.

- Cheney & Dawes (1980) propusieron la exclusión de las especies *E. gelidium*, *E. acanthocladum*, *E. echinocarpum* Areschoug y *E. schrammii* (P. et H. Crouan) del género *Eucheuma* aunque mantenidas aún dentro de Solieriaceae, debido a la condición de los cistocarpos: en las especies de *Eucheuma* están caracterizadas por la presencia de una célula de fusión central rodeada por carposporangios y filamentos del gonimoblasto, mientras que en las especies excluidas el centro de los cistocarpos está caracterizado como una placenta celular.
- En 1982, Norris y Bucher, en estudios realizados en Belice, cuestionaron la posición de *E. echinocarpum* y *E. schrammii* en el género, incluso sugiriendo la asignación de esta última en el género *Meristotheca* por su similitud con *M. papulosa* en la anatomía de los cistocarpos maduros; de manera similar, Schmitz en 1895 sugiere la exclusión de las especies *E. chondriforme* J. Agardh, *E. acanthocladum*, *E. echinocarpum*, *E. gelidium* y *E. schrammii* así como su transferencia al género *Meristotheca*, aunque sin la provisión de evidencia para tal efecto (Gabrielson & Cheney 1987).

Como resultado, se propuso el género *Meristiella*, cuya especie tipo es *Meristiella gelidium* (J. Agardh) D. P. Cheney & P. W. Gabrielson, para la transferencia de las especies del Atlántico reportadas en Florida y el Caribe previamente incluidas en el género *Eucheuma*: *M. gelidium*, *M. echinocarpa* y *M. schrammii*, especies caracterizadas por los cistocarpos con placenta central y que en su momento no fueron asignadas a *Meristotheca* por la circunscripción del género (Gabrielson & Cheney 1987).

El nombre genérico *Meristiella* deriva de las características compartidas con los géneros *Meristotheca* y *Agardhiella*. Según Gabrielson & Cheney (1987), los caracteres compartidos con *Meristotheca* son: la rotación en 360° de las células periaxiales alrededor de las células sucesivas a los filamentos centrales, la médula laxamente organizada y los cistocarpos placentados; sin embargo, la distinción entre ambos géneros se hizo con base en los siguientes caracteres: 1) las ramas carpogoniales y las células auxiliares se forman en porciones levemente erectas en la hoja¹⁰ como ocurre en *Meristotheca*

¹⁰ Nematecio *sensu* Gabrielson & Cheney 1987 (Fredericq *et al.* 1999, Faye *et al.* 2004).

y en porciones no erectas en *Meristiella*, 2) la presencia de un complejo de células auxiliares en *Meristiella* y su ausencia en *Meristotheca*, y 3) cistocarpos con paredes lisas en *Meristotheca* y con espinas conspicuas en *Meristiella* (Faye *et al.* 2004). Por otra parte, los caracteres compartidos con *Agardhiella* incluyen un complejo de células auxiliares, una médula laxamente organizada, filamentos de conexión sencillos o dobles y cistocarpos placentados; sin embargo, difiere en la rotación de las células periaxiales. En resumen, *Meristiella* tiene como caracteres exclusivos la presencia de espinas en los cistocarpos en desarrollo, la presencia del complejo auxiliar de células especializadas con un teñido oscuro y adyacente a la célula auxiliar, además de tetrasporangios no nemateciales (Fredericq *et al.* 1999, Gabrielson & Cheney 1987).

Sinonimia con *Meristotheca* J. Agardh. Mediante estudios filogenéticos a partir de secuencias de *rbcL* y datos morfológicos de géneros pertenecientes a la familia Solieriaceae, Fredericq *et al.* (1999) determinaron complejos de especies entre los cuales se ubicó el de *Meristiella*/*Meristotheca*, evidenciando en su interior la posición basal del género *Meristiella*, ubicado en el Atlántico, y una posición terminal para las especies ubicadas en el Indo-Pacífico de *Meristotheca* (Figura 5A). Sin embargo, la diferencia entre ambos géneros radicó solamente en su distribución geográfica, ya que los caracteres originalmente utilizados para su diferenciación presentaron dificultad para ser confirmados y se sugirió que ambos géneros deberían ser fusionados (Faye *et al.* 2004).

Con un enfoque similar, Faye *et al.* (2004), a partir de análisis filogenéticos de máxima parsimonia y máxima verosimilitud basados en secuencias de *rbcL* tras la descripción de la especie *Meristotheca dakarensis* Faye *et Masuda*, indicaron la pertenencia de esta a un clado monofilético conformado por especies ubicadas tanto en *Meristiella* como *Meristotheca*, mientras que un agrupamiento parafilético con el reconocimiento de ambos géneros independientes (Figura 5B). De igual manera, las características anatómicas previamente utilizadas para diferenciarlos (la ausencia de nematecios carpogoniales, la presencia de un complejo de células auxiliares y cistocarpos con espinas conspicuas) se distribuyen de manera inconsistente entre especies del clado, y existe dificultad en la determinación de los estados de carácter tales como la relativa prominencia o indistinción de los complejos de células auxiliares y el grado de “levantamiento nematecial”, por lo que tanto los resultados morfológicos como moleculares sugirieron que *Meristiella* debía ser subsumido en el género *Meristotheca* reduciéndolo formalmente como sinonimia, con las nuevas combinaciones binomiales como consecuencia.

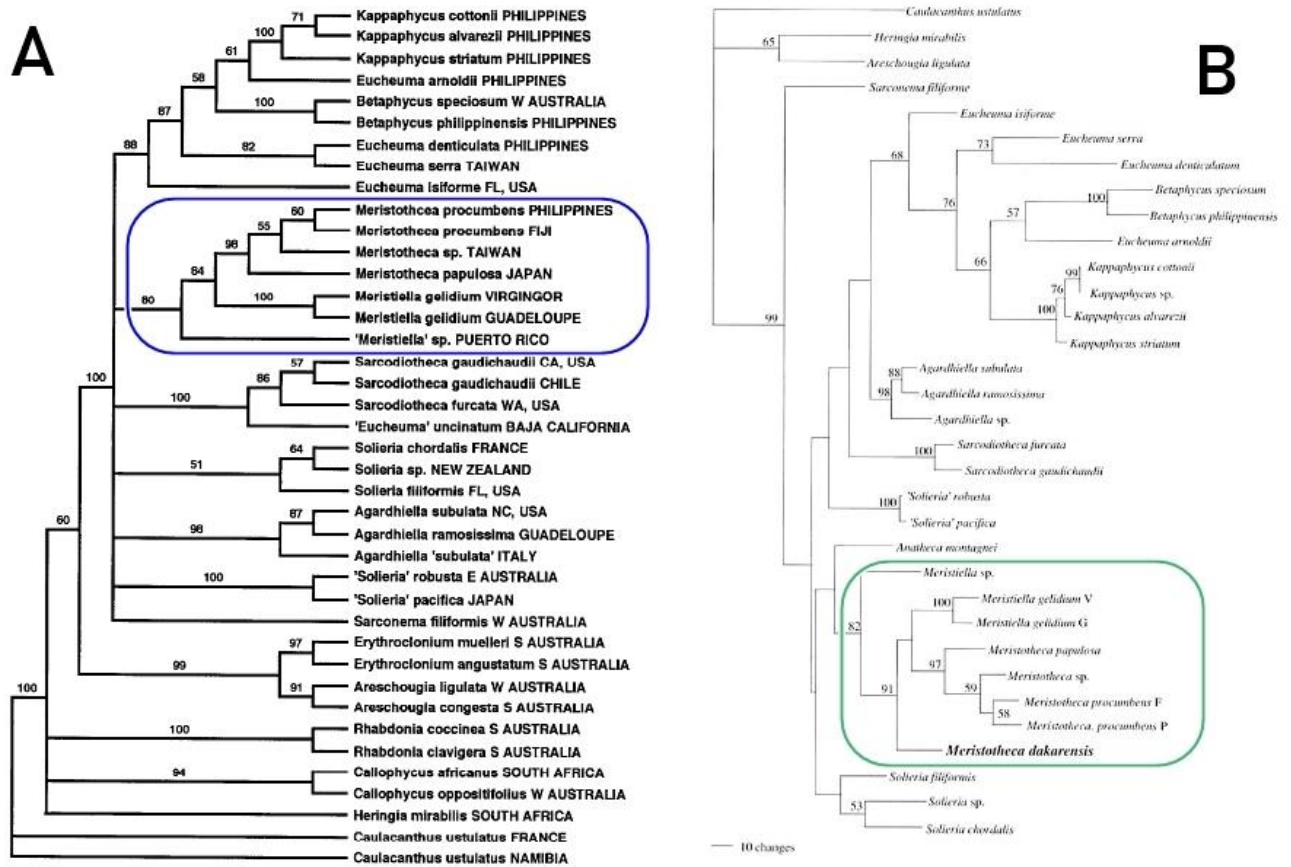


Figura 5. Árboles filogenéticos obtenidos con secuencias de la subunidad larga de RuBisCo (*rbcl*) mediante máxima parsimonia (MP) para el complejo *Meristiella*/*Meristotheca*. Se indican los valores de *bootstrap* en los nodos y las ramas. Los recuadros resaltan los grupos monofiléticos conformados por las especies del complejo; modificado según Fredericq *et al.* (1999) (A) y Faye *et al.* (2004) (B).

4. JUSTIFICACIÓN

La Península de Yucatán representa una región propicia para el establecimiento de diferentes comunidades marinas de macroalgas bentónicas, entre las que destaca la división Rhodophyta. Dentro de esta, las familias Gracilariaceae y Solieriaceae son las más conspicuas y económicamente importantes. No obstante, han sido pocos los trabajos de variación genética y filogeografía que se han realizado con algas presentes en litorales mexicanos, como anteriormente se mencionó con la familia Gracilariaceae (García-Rodríguez *et al.* 2013, Núñez-Resendiz *et al.* 2015, 2016) y recientemente Solieriaceae (Palma Ortiz *et al.* 2017). En el estado de Campeche, los estudios realizados de diversidad genética aplicados a recursos florísticos, se han enfocado mayoritariamente en especies terrestres ornamentales, de consumo e importancia económica así como patógenos de cultivos (Villalobos-Zapata & Mendoza 2010).

Aunado a lo anterior, por la morfología similar que presenta con otras especies de Solieriaceae, la posible relación entre grupos genéticos y morfológicos, y por su potencial utilización como recurso económico por su contenido en carragenanos, se considera importante la realización del presente estudio, el cual constituye uno de los primeros trabajos de enfoque microevolutivo para Solieriaceae en México, así como para el género *Meristotheca*.

Preguntas de investigación.

¿Las poblaciones de *Meristotheca cylindrica* del litoral de Campeche constituyen una unidad genéticamente homogénea, o existe diferenciación genética significativa acompañada de estructura poblacional?

Si existe tal diferenciación y estructura, ¿se esperan bajos valores que contrarresten tal heterogeneidad, *i. e.*, parámetros de flujo génico como el número de migrantes por generación?

¿Es lineal la relación entre la diferenciación genética observada entre las poblaciones y la distancia geográfica que las separa?

¿Qué mecanismos evolutivos han interactuado e influenciado la variación genética y la dinámica poblacional observada en el presente estudio?

¿Existe una asociación entre la variación morfológica cuantitativa y los grupos morfológicos basados en el patrón y grado de ramificación reportados en la descripción de la especie?

¿Existe relación entre los haplotipos de ambos marcadores?

5. HIPÓTESIS

Si las poblaciones de *Meristotheca cylindrica* proveen estimados de estructura y diferenciación genética significativas, así como porcentajes elevados de distancias genéticas, entonces se presentan entidades genéticamente diferenciadas en la especie.

Si la diferenciación en grupos genéticos muestra relación con las diferencias morfológicas establecidas previamente, entonces puede plantearse la existencia de una especie distinta en simpatria con *M. cylindrica* con hábito similar y conectividad genética presente.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivos generales

- Determinar la variación y diferenciación genética al interior y entre las poblaciones de *Meristotheca cylindrica* registradas en Campeche.
- Determinar la estructura y la distribución de los haplotipos en el litoral de Campeche.
- Determinar si la variación morfológica, los estimados de los parámetros mencionados (variación, diversidad, diferenciación, estructura) y los grupos de haplotipos encontrados, son significativos para establecer entidades taxonómicas independientes.

6.2 Objetivos particulares

- Obtener las secuencias nucleotídicas de las regiones espaciadoras de RuBisCo y *cox2-3* en individuos de las localidades muestreadas.
- Obtener medidas de variación y diversidad genética al interior y entre las poblaciones de la especie en cuestión, generales y poblacionales, por cada marcador molecular.
- Obtener los estimados de diferenciación, estructura genética y flujo génico, generales y pareados, por cada marcador.
- Determinar si existe una relación lineal entre la diferenciación genética observada y la distancia geográfica existente entre las localidades muestreadas.
- Determinar posibles eventos de historia demográfica y neutralidad selectiva por cada marcador.
- Construir las redes haplotípicas mediante parsimonia estadística por cada marcador.
- Representar gráficamente la distribución y frecuencia de los haplotipos encontrados por localidad/población.
- Ubicar sistemáticamente a *Meristotheca cylindrica* mediante análisis filogenéticos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud con la incorporación de secuencias de especies de la familia Solieriaceae, por cada marcador.
- Determinar distancias genéticas no corregidas (*p*-distances), generales y representativas, por cada marcador.
- Determinar la relación entre caracteres anatómicos cuantitativos del talo y el patrón y grado de ramificación en los grupos *a priori*.
- Determinar la relación existente entre la variación morfológica y la variación genética en función de los grupos reportados previamente (genéticos y morfológicos).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL ÁREA DE ESTUDIO

El estado de Campeche representa la transición entre el Golfo de México y el Caribe mexicano al localizarse entre los estados de Tabasco (al oeste) y Yucatán (al noreste); su zona costera está conformada principalmente por sedimentos de composición calcárea (Pacheco-Cervera *et al.* 2009, López-Rosas *et al.* 2014). Según las regiones ecológicas marinas definidas en las aguas aledañas al subcontinente norteamericano, la zona se ubica en la provincia marina número V (Banco de Campeche), referente a las cuencas oceánicas, y la ecorregión marina de México de nivel II número 14.1 (plataforma del Golfo de México sur), referente a los ambientes bentónicos (Lara-Lara *et al.* 2008). Los litorales del estado, cuya extensión abarca 523 km proporcionales a 4.51% del total del país (Villalobos-Zapata & Mendoza 2010), comprenden dos regiones en la parte meridional del Golfo de México: la costa Centro-Sur (que comienza en la Laguna del Ostión, Veracruz, y finaliza en la Laguna de Términos, Campeche) y la costa Noroccidental de la Península de Yucatán (Ortíz-Pérez & de la Lanza-Espino 2006). La primera región, costa Centro-Sur, colindante con Tabasco, comprende sistemas deltaicos y estuarinos, con línea de costa baja y arenosa con islas de barrera producto de una fuente constante de sedimentos re TRABAJADOS por las corrientes de deriva costera, abarcando desde la desembocadura del río Tonalá hasta el complejo lagunar de Términos (Ortíz-Pérez & de la Lanza Espino 2006, López-Rosas *et al.* 2014). La segunda región, costa Noroccidental, carece de drenaje superficial ya que el escurrimiento se lleva a cabo a través del drenaje subterráneo, el cual se manifiesta en la llanura costera en forma de cenotes y/o petenes; además, dominan las planicies de playas bajas acumulativas (Ortíz-Pérez & de la Lanza Espino 2006, López-Rosas *et al.* 2014, Núñez-Resendiz 2015).

Existen dos corrientes marinas que intervienen en la dinámica del estado: a) la Corriente del Lazo, que transporta aguas superficiales y transfiere aguas cálidas subtropicales desde el Mar Caribe, a través del Estrecho de Yucatán, hacia el Golfo de México, tiene forma de herradura y fluye en el sentido de las agujas del reloj (Mateo-Cid *et al.* 2013); b) Corriente del Noroeste, formada por distintas corrientes y aquellas provenientes de la masa continental de EE. UU. y Canadá, cálidas y secas en estío y frías y húmedas en invierno, intervienen en la región (Villalobos-Zapata & Mendoza

2010). En general, al sur del Trópico de Cáncer la vertiente del Golfo de México es más húmeda que la del Pacífico, como resultado de la acción de los vientos alisios (Lara-Lara *et al.* 2008).

Desde la capa superficial hasta los 200 m de profundidad, se presentan temperaturas fluctuantes en el mar, registrándose en intervalos desde 15 hasta 25°C en invierno por acción de los frentes polares y “nortes”, en tanto que en verano se registran temperaturas de hasta 28°C debido a la influencia de las corrientes cálidas del Lazo y del Caribe, oscilando en su intrusión por el canal de Yucatán (Mateo-Cid *et al.* 2013). Dado que la dirección e intensidad de la circulación costera presenta un cambio estacional, no se presentan cambios repentinos en la temperatura de mar, por lo que se establecen gradientes fisicoquímicos semipermanentes de salinidad, pH, oxígeno disuelto y materia orgánica, principalmente debido al aporte de aguas epicontinentales y estuarinas propias de la zona costera (Pacheco-Cervera *et al.* 2009).

7.1.1 Características particulares y delimitación de la muestra

La muestra se delimitó a 45 individuos de *Meristotheca cylindrica* pertenecientes a cinco poblaciones, en cinco localidades del litoral de Campeche, México, con sus respectivas características (Figura 6, Tabla 3): Isla Aguada (IA), Sabancuy (S), Punta Xen (PX-PCH), Bahía de Tortuga (BT) y Playa Bonita (PB-H); se hizo la recolección durante el año 2015 por personal del Laboratorio de Macroalgas Marinas y Bentónicas de la División CBS de la UAM Iztapalapa. Cada conjunto de individuos por localidad se trató como una población para efectos del presente trabajo.

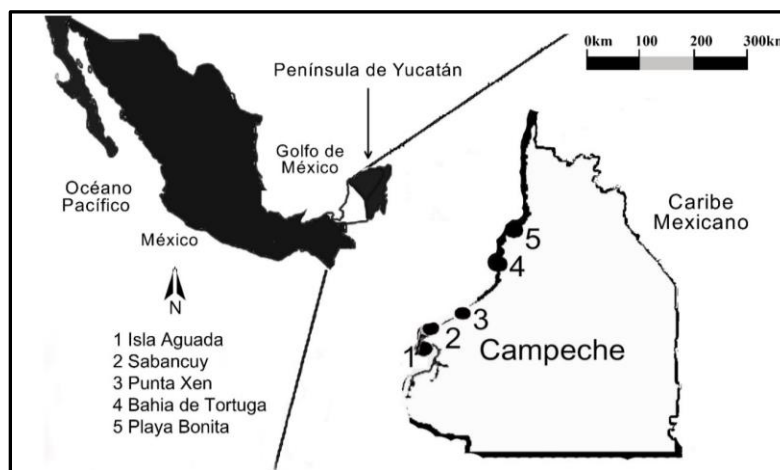


Figura 6. Sitios de muestreo en el litoral de Campeche. Los puntos señalan la posición geográfica de los sitios visitados y los números corresponden con la localidad descrita (modificado de Núñez-Resendiz *et al.* 2017a, Palma Ortiz *et al.* 2017).

Tabla 3. Características de las cinco localidades muestradas en el litoral de Campeche.

Localidad	Fisiografía	Tipo de oleaje	Incidencia de luz	Sitio específico de colecta	Observaciones
Isla Aguada	Playa abierta, arenosa, de arena gruesa y suelta, bloques rocosos pequeños sumergidos.	Barrido, intensidad moderada.	Directa cuando la marea baja e indirecta en marea alta.	Rocas sumergidas a 30 metro de profundidad.	Ambiente salobre, aún con aportes de agua dulce de la Laguna del Carmen. Poblaciones de algas rojas limitadas a la orilla de la playa.
Sabancuy	Bahía semi cerrada con oleaje disminuido por la presencia de la escollera. Playa arenosa con grandes bloques de roca sedimentaria aislados y enterrados que forman lagunas internas fangosas con marea baja.	Rompiente en la escollera y barrido en la playa.	Indirecta.	En las paredes de la escollera, a 50 metros de profundidad y en arribazones algales.	Ambiente marino, la escollera impide el intercambio de agua dulce con el río Santa Rosalía. Arribazones algales moderados, y concentrados en la cara izquierda de la escollera, de frente a mar abierto. Zona muy nublada y con lluvia.
Punta Xen	Playa de cantos rodados.	Barrido.	Indirecta.	Ambiente completamente marino. A ~20 metros de la playa. En las cuerdas que sujetan las redes de los pescadores y en los arribazones algales.	Abundantes algas de arribazón, en las que predominan algas rojas carnosas mayores a 15 cm de longitud. Mayoritariamente con pastos marinos del género <i>Thalasia</i> , que forman montículos de ~50 cm de altura a la orilla de la playa lo que agrega turbidez, además de contener restos de vegetación xerófila.
Bahía de Tortuga	Playa arenosa, campo tortuguero protegido.	Las olas rompen en la playa pero las poblaciones de algas se mantienen sumergidas.	Indirecta, poblaciones siempre sumergidas.	Ambiente completamente marino. Poblaciones de algas rojas creciendo sobre rocas aisladas como cantos rodados, a ~10 metros de la playa, a una profundidad de 1 a 1.5 m.	Arribazones algales moderados pero presentes en todo el año, predominan las algas rojas carnosas de las familias Gracilariaceae y Solieriaceae. Hay un campo tortuguero junto al balneario. Las poblaciones bajo el agua forman un jardín siempre sumergido.
Playa Bonita	Plataforma rocosa con grandes planchas de roca sedimentarias y cantos rodados, que forman una gran diversidad de ambientes como pozas de marea y canales.	Cubetazo o barrido.	Directa cuando la marea baja, las poblaciones de algas rojas quedan expuestas sobre la plataforma.	Ambiente completamente marino, a 20-40 m aprox. Agua cristalina.	Zona privada y cerrada al público.

Procedente al trabajo de campo, se dio el siguiente tratamiento a las muestras incorporadas: bajo el microscopio estereoscópico, se removieron los epibiontes de cada individuo y un fragmento de las porciones apicales de las ramas (~3 cm) se preservó en sílica gel hasta la posterior extracción de DNA. El resto fue montado en papel de herbario, numerado e integrado a la colección de algas del Herbario Metropolitano (UAMIZ) (Tabla 4). Todas las muestras fueron designadas con un número de campo y se añadieron a una hoja de herbario con su respectivo número de *voucher* (Tabla 4).

Tabla 4. Muestras y especímenes de *Meristotheca cylindrica* procedentes de las costas de Campeche. Se describen los datos de localidad, coordenadas geográficas (latitud, longitud) y números de herbario, así como las claves de campo y laboratorio. UAMIZ = Herbario de la Universidad Autónoma Metropolitana (modificado de Palma Ortiz *et al.* 2017).

Localidad	Coordenadas GPS	Número de Herbario	Clave de campo	Clave de laboratorio
Isla Aguada (IA)	18.8333333 -91.4475	UAMIZ-1239	IA:3-10	E10
			IA:1-1	E20
			IA:1-3	E26
			IA:3-9	E32
			IA:3-12	E51
			IA:3-11	E59
			IA:2-6	E73
			IA:2-7	E74
			IA:2-5	E93
Sabancuy (S)	18.9941667 -91.185	UAMIZ-1246	IA:2-8	E105
			S:5-17	E2
			S:2-6	E13
			S:3-9	E14
			S:1-4	E18
			S:1-3	E23
			S:5-18	E28
			S: H29	E38
			S:2-8	E58
Punta Xen (PX)	19.1391667	UAMIZ-1252	S:1-1	E65
			S:2-7	E98
			S:2-5	E104
			PX:1-13	E11

	-91.96361111		PX:1-2	E34
			PX:2-4	E41
			PX:1-1	E82
			PX:1-14	ICH44
			PX:1-15	ICH45
			PX:1-16	ICH46
			PX:H10	E3
			PX:H21	E44
			PX:H22	E54
<hr/>				
			BT:92-12	92-12
			BT:92-16	92-16
Bahía de Tortuga (BT)	19.3597222 -90.70972222	UAMIZ-1249	BT:92-13	92-13 (834)
			BT:92-15	92-15 (836)
			BT:93-1	93-1 (838)
			BT:93-2	93-2 (839)
<hr/>				
			PB:H6	E1
			PB:H70	PBH70
			PB:H5	E75 (H5)
Playa Bonita (PB)	19.7955556 -90.6175	UAMIZ-970	PB:H42	PBH42
			PB:H49	PBH49
			PB:H51	PBH51
			PB:H52	PBH52
			PB:H53	PBH53

7.2 ANÁLISIS MOLECULAR

Las muestras previamente clasificadas se sometieron a una serie de procedimientos, que incluyen aquellos procedimientos concernientes a la extracción del material genético (DNA) y la secuenciación de las regiones de interés, así como un breve análisis morfológico a partir de datos cuantitativos.

7.2.1 Extracción de DNA. Se realizó a partir de 5-10 mg de tejido seco, previamente etiquetado y almacenado a temperatura ambiente con sílica gel, gracias a la utilización del kit de extracción de Qiagen, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California USA) según la técnica descrita por el fabricante, con modificaciones menores al añadir una centrifugación por 1 minuto a 8000 rpm después de agregar por segunda vez el amortiguador AW2, y un aumento en el tiempo de incubación con amortiguador AE de 5 a 30 minutos (Figura 7, Anexo 1). Se asignó una clave de laboratorio por individuo.

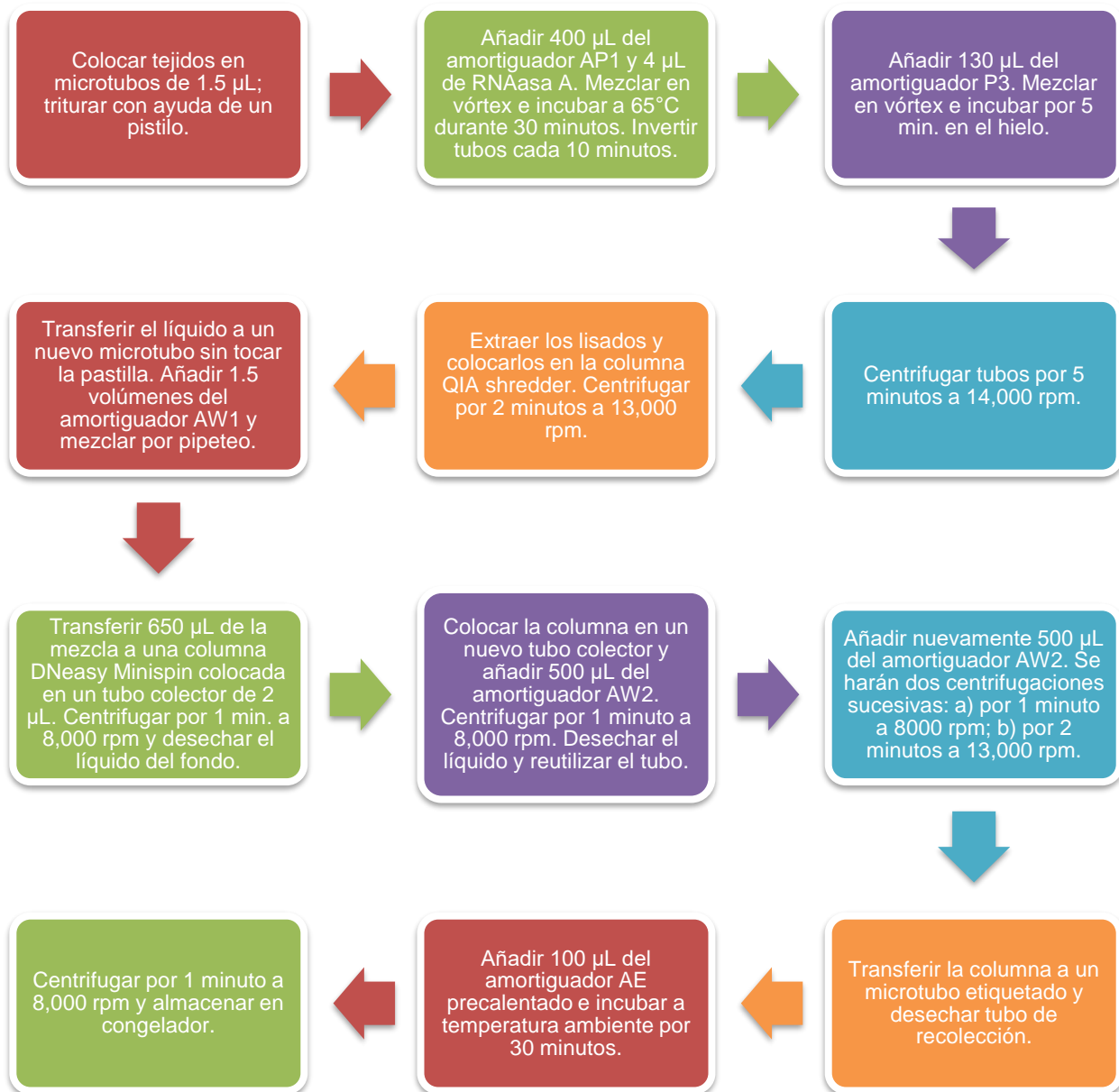


Figura 7. Esquema de la extracción de DNA con el kit DNeasy Plant Minikit (Qiagen) con modificaciones menores a la técnica del fabricante.

7.2.2 Amplificación mediante PCR. Se realizó con el kit Taq PCR Core Kit (Qiagen) y los oligonucleótidos específicos según la región de cada genoma por amplificar. El marcador molecular cloroplástico, la región espaciadora de RuBisCo, se amplificó con los cebadores spacer-F y spacer-R descritos en Maggs *et al.* (1992). Por otro lado, el espaciador de *cox2-3* se amplificó utilizando los cebadores *cox2-for* y *cox3-rev* (Zuccarello *et al.* 1999a).

El volumen total de PCR por muestra fue de 25 µL con los siguientes reactivos: 2.5 µL de amortiguador de PCR 10X, 1 µL de cebador forward 10µM, 1 µL de cebador reverse 10µM, 0.5 µL de solución de dNTP (10 mM por cada base), 0.5 µL de BSA 0.4%, 1 µL de MgCl₂ 25mM, 0.125 µL de Taq polimerasa 5U/µL, 17.375 µL de agua desionizada y 1 µL de DNA genómico. Las condiciones de PCR se introdujeron en el termociclador según Núñez-Resendiz *et al.* (2015) con el ciclo denominado “HYDROPUNTIA RBCLS” y una duración de 207 minutos (Tabla 5).

Tabla 5. Marcadores moleculares utilizados en el presente trabajo; se detalla la secuencia de los oligonucleótidos empleados así como el ciclo en el que se realizó la amplificación de DNA y su referencia en literatura. DI=desnaturalización inicial, D=desnaturalización, A=alineamiento, E=extensión, EF=extensión final (modificado de Núñez-Resendiz 2015).

Genoma	Región	Marcador molecular	Secuencia del oligonucleótido (5' →3')	Condiciones del ciclo de PCR					Referencia
				DI	D	A	E	EF	
Cloroplasto	RuBisCo	Spacer F	TGTGGACCTCT ACAAACAGC	95°C 2'	93°C 1'	50°C 1'	72°C 2'	72°C 3'	Maggs <i>et al.</i> 1992
		Spacer R	GTAAACCCCAT GTTCCCAAT						
Mitocondria	<i>cox2-3</i>	<i>cox2-for</i>	GTACCWTCTT TDRGRRKDAAA TGTGATGC	1 ciclo		35 ciclos		1 ciclo	Zuccarello <i>et al.</i> 1999b
		<i>cox3-rev</i>	GGATCTACWAG ATGRAAWGGAT GTC						

7.2.3 Electroforesis en gel de agarosa 0.8%. La amplificación vía PCR se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (0.8 g de agarosa UltraPure más 50 µL de amortiguador TBE 0.5X más 0.45 µL de GelRed); se vertieron 4 µL de muestra por marcador más 1µL de amortiguador de carga por pozo (Figura 8, Figura 9), además de 2 µL de marcador de peso molecular de 100 pb más 1 µL de amortiguador de carga en cada pozo inicial. Se realizó el proceso a 100V y 400 mA por 23 minutos (Anexo 2).

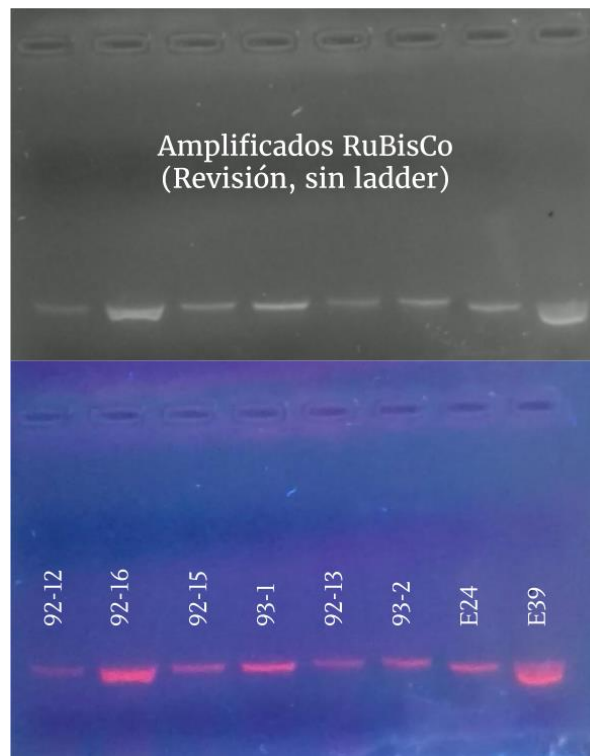


Figura 8. Muestras sometidas a electroforesis, con su respectiva clave de laboratorio, vistas mediante el transiluminador (arriba, vista a blanco y negro; abajo, vista a color). El marcador empleado para para su amplificación es el espaciador de RuBisCo; no se incluyó el marcador de peso molecular ya que habían sido trabajadas con anterioridad.

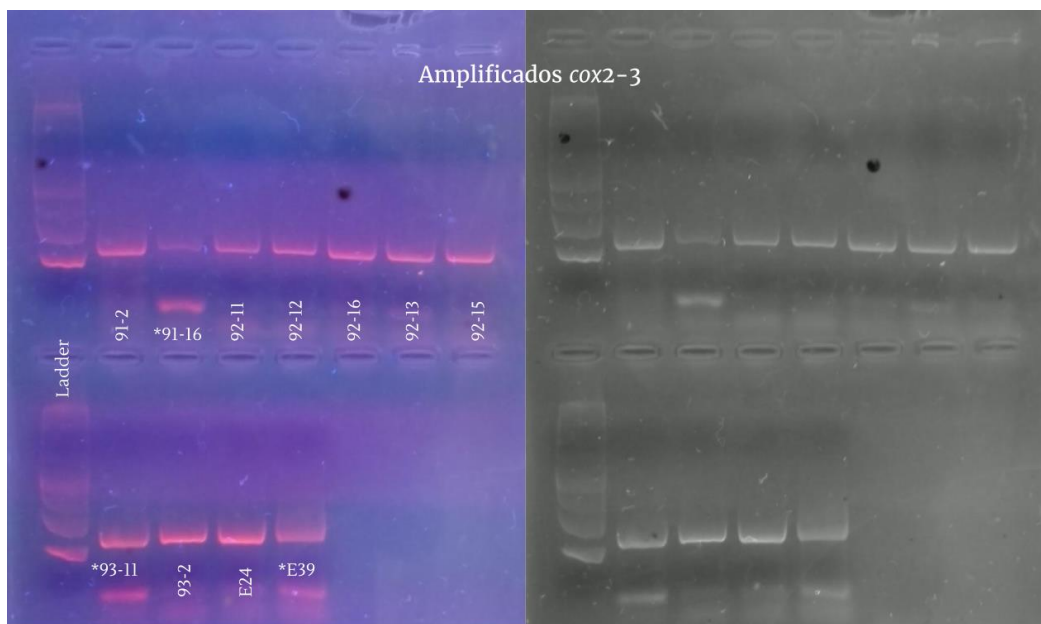


Figura 9. Muestras sometidas a electroforesis, amplificadas con los oligonucleótidos del marcador mitocondrial *cox2-3* (izquierda, vista a color; derecha, vista a blanco y negro). Se indica la clave de laboratorio; aquellas muestras con * indican un amplificado insatisfactorio por la presencia de doble banda, por lo que fueron repetidas.

7.2.4 Purificación de los amplificadores. Los productos de PCR obtenidos se purificaron con el kit QIAquick Purification Kit (Qiagen) según la técnica del fabricante (Figura 10, Anexo 3); posteriormente se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa con 1 μ L de muestra, según lo descrito con anterioridad (Figura 11).

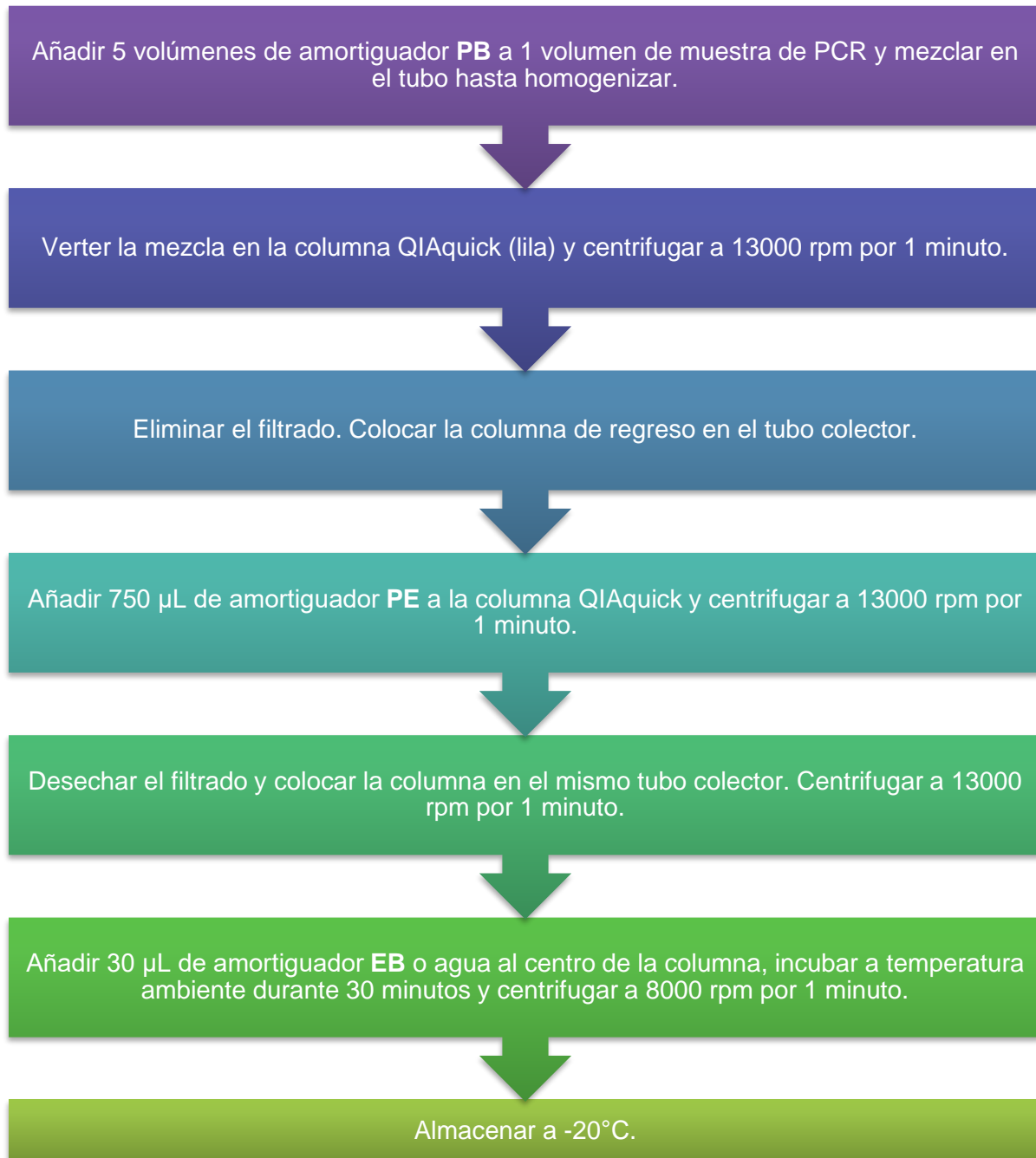


Figura 10. Esquema del proceso de purificación de amplificadores de DNA con el kit QIAquick Purification Kit (Qiagen) según lo descrito por el fabricante.

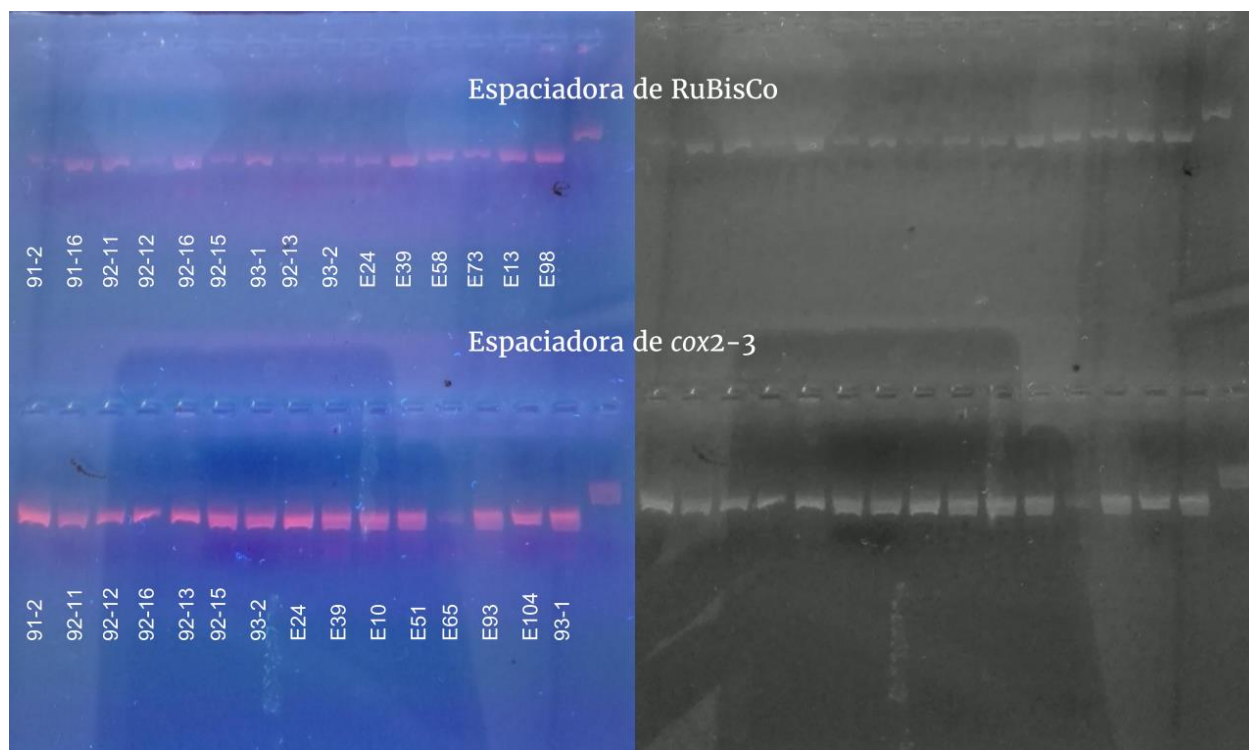


Figura 11. Amplificados previamente purificados, sometidos a electroforesis y vistos mediante el transiluminador (izquierda, vista a color; derecha, vista a blanco y negro). Se detalla su respectiva clave de laboratorio. Se prescindió del marcador de peso molecular.

7.2.5 Secuenciación de los amplificadas. Las muestras amplificadas se etiquetaron y enviaron para su secuenciación al laboratorio de Macrogen en la República de Corea (10F, 254 Beotkkot-ro, Geumcheon-gu, Seúl, 08511); se utilizó el kit de secuenciación BigDye en un secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Princeton, NJ, EE. UU.). Ambas regiones se secuenciaron con su respectivo oligonucleótido en dirección 5' → 3' (forward).

7.3 EDICIÓN Y ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE DNA

Una vez obtenidas las secuencias de cada individuo por cada marcador molecular y revisado su respectivo cromatograma, éstas se editaron y alinearon mediante ClustalW (Thompson *et al.* 1994) en su matriz particular: espaciador de RuBisCo (Anexo 4) y espaciador de *cox2-3* (Anexo 5) con el programa Bioedit (Hall 1999), además de MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013).

Como resultado, se obtuvieron dos archivos en formato FASTA (.fas), los cuales se sometieron a una búsqueda en BLAST de nucleótidos (Altschul *et al.* 1990) con una similitud de entre 75% y 90% con miembros de Solieriaceae (*Solieria* sp., *Eucheuma* sp.). Ambas matrices se convirtieron al formato PHYLIP (.phy) y NEXUS (.nex) en DNASp v.5 (Librado & Rozas, 2009) para su disponibilidad en análisis posteriores.

Según los objetivos planteados, se estimaron los valores por cada parámetro relevante para el presente estudio:

7.3.1 Variación y diversidad genética. La asignación de los individuos a su respectiva población, así como las siguientes medidas de diversidad y variación, se estimaron con el programa DnaSP v.5 (Librado & Rozas, 2009): número de sitios segregantes (S), número de haplotipos (H), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π) y theta (θ). Los sitios polimórficos se visualizaron gráficamente en las matrices generadas por el programa GenAlEx v.6.503 (Peakall & Smouse 2006, 2012).

7.3.2 Estructura y diferenciación genética. Se obtuvieron los estimados de flujo génico (N_m) e índice de fijación (F_{ST}) según Hudson, Slatkin & Maddison (1992) con el programa DnaSP v.5 (Librado & Rozas, 2009). Con la finalidad de observar la diferenciación y estructura genética al interior de *M. cylindrica*, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) para cada marcador mediante GenAlEx v.6.503 (Peakall & Smouse 2006, 2012): se importaron las matrices de secuencias en formato PHYLIP (.phy), con ambos marcadores haploides, por lo que se obtuvieron los estimados de flujo génico (N_m) y los estimados de Φ_{PT} según Peakall *et al.* (1995), parámetro análogo de F_{ST} , y su significancia estadística con 999 permutaciones. Se obtuvo tanto el valor general como los valores pareados (entre poblaciones) del número de migrantes por generación (N_m), así como de Φ_{PT} en conjunto con el valor P.

7.3.3 Prueba de Mantel. Con el objetivo de evaluar los procesos espaciales que potencialmente conllevan a la estructuración de las poblaciones y la probable relación lineal entre la diferenciación genética y la distancia geográfica, se estableció una comparación entre los estimados de

diferenciación genética de cada marcador y las distancias genéticas entre las localidades, a través de una prueba de Mantel (Mantel 1967, Diniz-Filho *et al.* 2013) mediante GenAlex v.6.503 (Peakall & Smouse 2006, 2012). En primer lugar, se trasladó la matriz de tamaño 5x5 de los estimados pareados de Φ_{PT} según Peakall *et al.* (1995) obtenidos en el apartado anterior, junto con la matriz de tamaño 5x5 de distancias geográficas obtenida a partir del análisis pareado de distancias geográficas dentro de GenAlex v.6.503 (Peakall & Smouse 2006, 2012). Para evaluar la significancia estadística, se eligieron 999 permutaciones y se obtuvo el valor del coeficiente de correlación de Pearson, que en este caso también se denomina correlación de Mantel (r_m) (Diniz-Filho *et al.* 2013).

7.3.4 Pruebas de neutralidad selectiva e historia demográfica. Para evaluar desviaciones a la teoría neutral de evolución molecular (Kimura 1968) o posibles eventos demográficos, se estimaron los estadísticos siguientes: D de Tajima (Tajima 1989), F^* de Fu & Li (Fu & Li 1993) y F_s de Fu (Fu 1997); la significancia estadística de D y F^* se obtuvo mediante 1000 réplicas, en tanto que los intervalos de confianza (límite inferior y superior) y el valor de la probabilidad del estimado, dado el valor de theta y los sitios segregantes, para los estimados de F_s de Fu se calcularon mediante simulaciones coalescentes, ambos con el programa DNASp v.5 (Librado & Rozas, 2009). Se trataron las siguientes hipótesis: H_0 : tamaños poblacionales constantes y/o neutralidad selectiva; H_1 : tamaños poblacionales discontinuos y/o selección natural operante. Una vez rechazada la hipótesis nula, mediante la magnitud y signo del estimado, se evaluó la ocurrencia de eventos demográficos reflejados actualmente en los parámetros poblacionales de interés, así como posibles influencias de la selección natural bajo sus distintos tipos (ver *Pruebas de neutralidad selectiva e historia demográfica* en *Introducción*). Utilizados en combinación, estas pruebas pueden proveer hipótesis mejor sustentadas acerca de la influencia de los mecanismos evolutivos o eventos demográficos.

7.3.5 Análisis de haplotipos. La evaluación de las relaciones haplotípicas se estimó mediante la construcción de redes de parsimonia estadística con TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000) a partir de las matrices en formato PHYLIP generadas anteriormente en DNASp v.5 (Librado & Rozas, 2009). Una secuencia representativa de cada haplotipo, de ambos marcadores moleculares, fue depositada en la base de datos del GenBank.

Se hizo una recopilación de las secuencias que conforman a cada haplotipo, así como su frecuencia por cada localidad en Excel (2016), en conjunto con su respectivo gráfico circular. Se elaboró un mapa que conjunta la ubicación geográfica de las localidades y la frecuencia haplotípica por marcador en PhotoScape v 3.7 (2014), modificado a partir de Núñez-Resendiz *et al.* (2017) y Palma Ortiz *et al.* (2017).

7.3.6 Análisis filogenéticos. La búsqueda del modelo óptimo de evolución de DNA se implementó mediante jModelTest v. 2.1.6 con el criterio de información Akaike (AIC) (Darriba *et al.* 2012, Guindon & Gascuel 2003). El modelo elegido para ambos conjuntos de secuencias fue el GTR G+I (ingl. *general time reversible* + distribución gamma + sitios invariables).

Los análisis filogenéticos de inferencia bayesiana (IB) y máxima verosimilitud (ML) se realizaron con el programa TOPALi v. 2.5 (Milne *et al.* 2004). La topología y los valores de probabilidad posterior de inferencia bayesiana se obtuvieron mediante la opción de Mr. Bayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001), dentro del mismo programa, con una frecuencia de muestreo de cada 100 generaciones durante 1×10^6 generaciones y burn-in del 25%. En el programa referido, tanto la topología como el cálculo del soporte de ramas mediante *bootstrap* (Felsenstein 1985) con 1000 réplicas, se determinaron vía RaxML (Stamatakis 2014). En ambos tipos de inferencia filogenética, se agregaron secuencias de distintas especies de la familia Solieriaceae en los conjuntos de datos de ambos marcadores; el grupo externo seleccionado fue *Hydropuntia cornea* Montagne. Los cuatro árboles resultantes se exportaron al formato New Hampshire Tree (.tre) con el objetivo de ser editados en MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013).

7.3.7 Distancias genéticas. Se estimaron distancias genéticas no corregidas (*p*-distances) a partir de matrices reducidas a los haplotipos resultantes, por marcador, en MEGA v. 6 (Tamura *et al.* 2013), con 1000 replicaciones de *bootstrap* y la inclusión de transiciones más transversiones (d). En el caso del espaciador de *cox2-3*, se estimaron distancias al interior de ambos grupos (GI y GII). Los valores más representativos, mínimos y máximos, se extrajeron de cada matriz y se convirtieron en porcentajes.

7.4 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Para determinar si el grado de variación anatómica a partir de caracteres cuantitativos corresponde con la variación observada a partir de los patrones de ramificación, se realizó un análisis de varianza múltiple (MANOVA) a partir de los caracteres observados en 10 ejemplares de herbario, pertenecientes a las poblaciones trabajadas molecularmente. Con este objetivo, se realizaron manualmente cortes transversales en tres partes del talo (ápice, basal y parte media) bajo el microscopio óptico Leica DMLB. Las muestras se dividieron *a priori* en dos grupos de acuerdo con la ramificación presentada: 1) patrón de ramificación alterno, poco ramificado (2 o 3 veces); 2) patrón de ramificación alterno-opuesto, altamente ramificado ($x \geq 4$) (Núñez-Resendiz *et al.* 2017a, Palma Ortiz *et al.* 2017).

7.4.1 MANOVA. Se construyó una matriz con la cuantificación de los siguientes caracteres: número de capas corticales, número de filamentos medulares, diámetro de la médula (largo y ancho), diámetro del talo (largo y ancho) y el diámetro de las células de ambas cortezas (interna y externa, largo y ancho de cada una) en tres partes del talo (apical, media y basal), por lo que constituyen un total de 30 caracteres. Dicha matriz se sometió a un análisis múltiple de varianza en STATISTICA 8.0.360 (StatSoft Inc. 2007) con el fin de determinar diferencias significativas entre los grupos independientes (1 y 2, conformados por los grupos morfológicos según su ramificación) a partir de las variables dependientes consideradas (cuantificación de los caracteres en las tres partes del talo).

A manera de resumen, se presenta una recapitulación del trabajo metodológico procedente al trabajo de campo: extracción del material genético, amplificación vía PCR, purificación, secuenciación y análisis de secuencias (Figura 12).

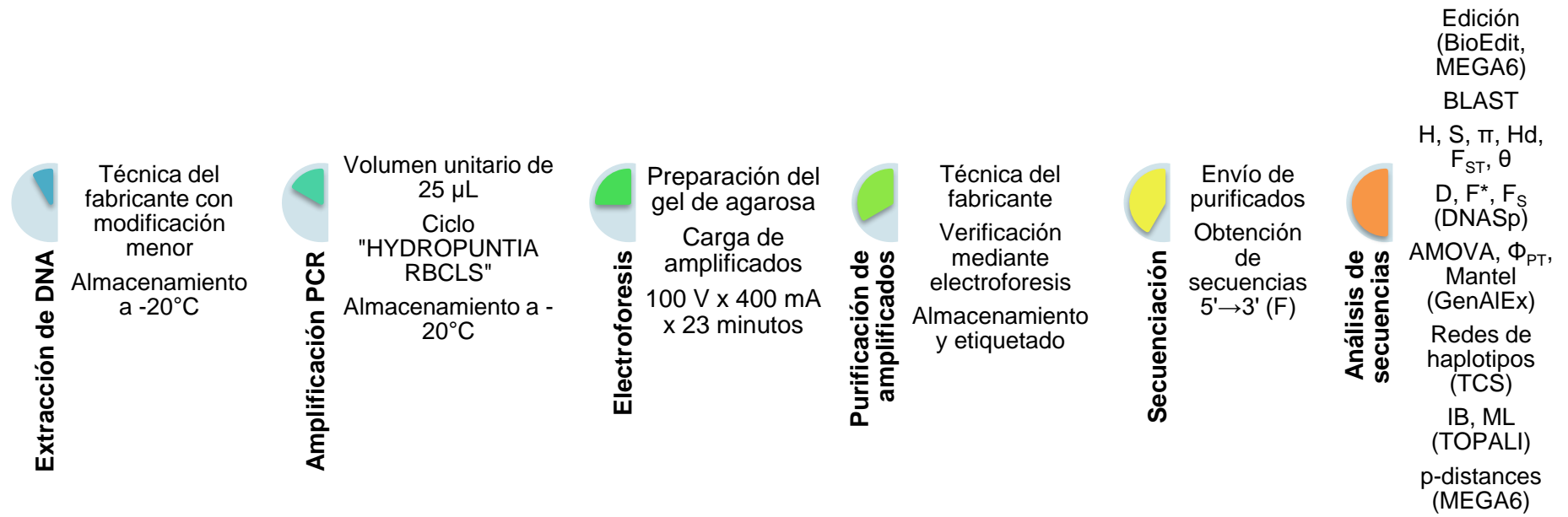


Figura 12. Resumen de la parte metodológica en laboratorio del trabajo de tesis.

8. RESULTADOS

8.1 VARIACIÓN Y DIVERSIDAD GENÉTICA

Espaciador de RuBisCo. El set de datos consistió en 42 secuencias con 185 pares de bases (pb) de longitud para el análisis poblacional. En general, resultaron siete sitios segregantes, por tanto 177 sitios invariables, cuatro mutaciones *singleton*, tres sitios parsimoniosamente informativos de dos variantes, un gap y la clasificación de las muestras en 4 haplotipos (Tabla 6). La proporción de sitios segregantes fue de $\sim 3.7\%$ ($P_s=0.03783$).

Las medidas totales de variación y diversidad genética mostraron valores moderados: diversidad haplotípica $Hd_T=0.46458$, diversidad nucleotídica $\pi_T=0.00785$, desajuste nucleotídico $k=1.44483$ y theta $\theta=0.00884$. Las poblaciones con la mayor diversidad haplotípica fueron Sabancuy y Punta Xen, ambas con la misma diversidad haplotípica ($Hd=0.38889$) así como diversidad nucleotídica ($\pi=0.006344$). Por el contrario, la población con menor variación fue Playa Bonita con valores de $Hd=0.25$ y $\pi=0.00272$ (Tabla 7).

Tabla 6. Sitios variables en el alineamiento de secuencias de DNA de *Meristotheca cylindrica* para haplotipos de la región espaciadora de RuBisCo y sus números de acceso al GenBank; en rojo se destacan las mutaciones *singleton*, en verde se destacan los sitios parsimoniosamente informativos (modificado de Palma Ortiz *et al.* 2017).

H/S	38	44	47	67	105	122	169	172	Número de acceso GenBank
R1	G	A	G	T	C	G	G	C	KY979260
R2	.	.	.	C	A	.	A	T	KY979261
R3	.	C	T	C	A	.	A	T	KY979262
R4	C	C	.	.	KY979263

Espaciador de *cox2-3*. El set de datos consistió en 37 secuencias con 210 pb de longitud para el análisis poblacional. En general, resultaron 34 sitios segregantes, por tanto 176 sitios invariables, tres mutaciones singleton, 29 sitios parsimoniosamente informativos de dos variantes y la clasificación de las muestras en 9 haplotipos (Tabla 8). La proporción de sitios segregantes fue de ~16%, ($P_s=0.1619$).

Las medidas totales de variación y diversidad genética mostraron valores elevados: diversidad haplotípica $HdT=0.81081$, diversidad nucleotídica $\pi_T=0.07285$, desajuste nucleotídico $k=15.29880$ y theta $\theta=0.03878$. La población con la mayor diversidad haplotípica fue Sabancuy ($Hd=0.71$) y diversidad nucleotídica ($\pi=0.06476$). Por el contrario, la población con menor variación fue Bahía de Tortuga ya que presentó solo un haplotipo, por lo que $Hd=0$ y $\pi=0$ (Tabla 7).

Tabla 7. Medidas de diversidad genética para las poblaciones de *Meristotheca cylindrica*, basadas en las regiones espaciadoras de RuBisCo y de *cox2-3*. S = sitios segregantes, h = número de haplotipos, Hd = diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica. IA= Isla Aguada, PX= Punta Xen, PB= Playa Bonita, S= Sabancuy, BT= Bahía de Tortuga, Total= índice general de todas las poblaciones. Los valores totales se indican con su respectiva desviación estándar (modificado de Palma Ortiz *et al.* 2017).

Localidad	Espaciador de RuBisCo					Espaciador de <i>cox2-3</i>				
	Número de secuencias	S	h	Hd	π	Número de secuencias	S	h	Hd	π
IA	10	3	2	0.35556	0.0058	10	31	5	0.6667	0.053
PX	9	3	2	0.38889	0.00634	6	32	3	0.6	0.0546
PB	8	2	2	0.25	0.00272	5	7	2	0.6	0.02
S	9	3	2	0.38889	0.00634	10	30	4	0.71	0.06476
BT	6	2	2	0.3	0.00362	6	0	1	0	0
Total	42	7	4	0.46458 ± 0.069	0.00785 ± 0.0012 7	37	34	9	0.81081 ± 0.039	0.07285 \pm 0.00349

Tabla 8. Sitios variables en el alineamiento de secuencias de DNA de *Meristotheca cylindrica* para haplotipos de la región espaciadora de *cox2-3* y sus números de acceso al GenBank. En negrita se resaltan los haplotipos pertenecientes al Grupo I (GI), en tipografía normal se indican los haplotipos del Grupo II (GII), en rojo se destacan las mutaciones *singleton*, en verde se destacan los sitios parsimoniosamente informativos. H= haplotipos, S= sitios segregantes, #= no. de acceso al GenBank (modificado de Palma Ortiz *et al.* 2017).

H/S	9	11	15	23	29	38	41	57	69	75	78	79	91	102	104	105	107	114	125	126	139	144	153	154	159	161	175	177	178	180	181	198	207	209	#	
C1	T	A	A	T	A	T	G	C	T	T	A	T	A	T	T	A	T	C	T	T	A	G	T	T	C	A	T	A	G	T	A	T	G	C	KY979264	
C2	.	G	G	.	G	.	A	T	A	A	G	.	.	C	C	G	.	T	C	A	G	A	C	C	T	G	A	T	A	A	C	A	A	T	KY979265	
C3	.	G	G	A	G	.	A	T	A	A	G	.	.	C	C	G	.	T	C	A	G	A	C	C	T	G	A	T	A	A	C	A	A	T	KY979266	
C4	.	G	G	.	.	.	A	C	A	KY979267
C5	.	.	.	A	.	G	KY979268
C6	.	G	G	.	.	.	A	T	A	A	G	A	C	C	C	G	.	T	C	A	G	A	C	C	T	G	A	T	A	A	.	A	A	T	KY979269	
C7	.	G	G	A	G	G	A	T	A	A	G	.	.	C	C	G	.	T	C	A	G	A	C	C	T	G	A	T	A	A	C	A	A	T	KY979270	
C8	G	A	KY979271
C9	.	.	G	.	G	KY979272

8.2 ESTRUCTURA Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

Espaciador de RuBisCo. Se obtuvieron valores de $Nm=0.55$ y de $F_{ST}=0.47420$ *sensu* Slatkin, Hudson & Maddison (1992). El AMOVA arrojó los siguientes resultados generales: valor de $\Phi_{PT}=0.268$ y un valor de $Nm=1.367$, con un 27% de la varianza explicada por las diferencias del marcador cloroplástico entre las poblaciones, en tanto que un 73% de la varianza explicada por la variación al interior de estas (Tabla 9).

Los valores pareados de Φ_{PT} resultaron de cero en la comparación entre Isla Aguada y las poblaciones de Sabancuy, Punta Xen y Playa Bonita, así como entre Sabancuy-Punta Xen, y finalmente entre Punta Xen-Playa Bonita, en tanto que el valor máximo se observó entre Bahía de Tortuga-Playa Bonita (Tabla 10). Los valores pareados de Nm obtenidos en función de Φ_{PT} mostraron el valor calculado más alto entre Sabancuy-Playa Bonita, en tanto que el valor más bajo entre Bahía de Tortuga-Playa Bonita. Sin embargo, los valores denotados como * indican la máxima conectividad genética entre las poblaciones en cuestión, debido a $\Phi_{PT}=0$ por lo que contienen los mismos haplotipos (Tabla 11 **Tabla 11**).

Espaciador de *cox2-3*. Se obtuvieron valores de $Nm=0.45$ y de $F_{ST}=0.52855$ *sensu* Slatkin, Hudson & Maddison (1992). El AMOVA arrojó los siguientes resultados generales: valor de $\Phi_{PT}=0.363$ y un valor de $Nm=0.879$, con un 36% de la varianza explicada por las diferencias del marcador mitocondrial entre las poblaciones, en tanto que un 64% de la varianza explicada por la variación al interior de estas (Tabla 9).

Los valores pareados de Φ_{PT} mostraron estimados mayores que con el marcador plastidial; la máxima diferenciación se detectó entre las poblaciones de Bahía de Tortuga-Playa Bonita, en tanto que la menor diferenciación se observó entre Isla Aguada-Sabancuy y Sabancuy-Punta Xen (Tabla 10). Los valores pareados de Nm arrojaron el valor calculado más alto entre Sabancuy-Punta Xen, en tanto que el valor más bajo entre Bahía de Tortuga-Playa Bonita. Sin embargo, el valor denotado como * indica la máxima conectividad genética entre las poblaciones en cuestión, debido a $\Phi_{PT}=0$ por lo que contienen los mismos haplotipos (Tabla 11).

Tabla 9. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para ambos marcadores en las cinco poblaciones de *Meristotheca cylindrica* (modificado de Palma Ortiz *et al.* 2017).

Fuente de variación	Espaciador de RuBisCo				Espaciador de <i>cox2-3</i>			
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	Porcentaje de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	Porcentaje de la variación
Entre poblaciones	4	3.104	0.776	27%	4	5.695	0.158	36%
Al interior de poblaciones	37	7.086	0.192	73%	32	8.900	0.278	64%
Estimados de diferenciación y flujo génico generales			$\Phi_{PT}=0.268$ $Nm=1.367$				$\Phi_{PT}=0.390$ $Nm=0.879$	

Tabla 10. Valores pareados de Φ_{PT} obtenidos mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA) en las cinco poblaciones de *Meristotheca cylindrica*, con el marcador plastidial (A) y el marcador mitocondrial (B). Se resaltan con negritas los valores más altos. IA=Isla Aguada, S=Sabancuy, PX=Punta Xen, BT=Bahía de Tortuga, PB=Playa Bonita.

A. Espaciador de RuBisCo (Φ_{PT})					
IA	S	PX	BT	PB	
0.000					IA
0.000	0.000				S
0.000	0.000	0.000			PX
0.584	0.436	0.552	0.000		BT
0.000	0.027	0.000	0.714	0.000	PB
B. Espaciador de <i>cox2-3</i> (Φ_{PT})					
IA	S	PX	BT	PB	
0.000					IA
0.000	0.000				S
0.291	0.277	0.000			PX
0.559	0.411	0.700	0.000		BT
0.289	0.333	0.400	0.727	0.000	PB

Tabla 11. Valores pareados de Nm obtenidos mediante el análisis de varianza molecular (AMOVA) en las cinco poblaciones de *Meristotheca cylindrica*, con el marcador plastidial (**A**) y el marcador mitocondrial (**B**). Se resaltan con negritas los valores más altos, en rojo los más bajos y con * aquellos valores asociados con Φ_{PT} pareada tal que $\Phi_{PT}=0$. IA=Isla Aguada, S=Sabancuy, PX=Punta Xen, BT=Bahía de Tortuga, PB=Playa Bonita.

A. Espaciador de RuBisCo (Nm)					
IA	S	PX	BT	PB	
0.000					IA
*	0.000				S
*	*	0.000			PX
0.356	0.646	0.407	0.000		BT
*	17.761	*	0.200	0.000	PB
B. Espaciador de <i>cox2-3</i> (Nm)					
IA	S	PX	BT	PB	
0.000					IA
*	0.000				S
1.216	1.306	0.000			PX
0.395	0.716	0.214	0.000		BT
1.228	1.000	0.750	0.188	0.000	PB

8.3 PRUEBA DE MANTEL

Se utilizó una matriz única en las pruebas de Mantel por cada marcador, obtenida a partir de las coordenadas de GPS cuyo resultado detalla las distancias geográficas entre los pares de poblaciones (Tabla 12).

Tabla 12. Matriz de distancias geográficas entre los pares de poblaciones ubicadas en el litoral de Campeche. Se detalla la distancia en kilómetros.

Poblaciones por localidad en el litoral de Campeche y su distancia geográfica					
IA	S	PX	BT	PB	
0.000					IA
32.899	0.000				S
68.877	35.990	0.000			PX
97.137	64.372	28.608	0.000		BT
137.962	107.161	74.809	49.416	0.000	PB

Espaciador de RuBisCo. Se obtuvo un valor del coeficiente de determinación de $R^2=0.0543$, por lo que $r_m=-0.2330$; sin embargo, el valor $P=0.421$ por lo que se carece de significancia estadística (Figura 13A).

Espaciador de *cox2-3*. Se obtuvo un valor del coeficiente de determinación de $R^2=0.0068$, por lo que $r_m=-0.0825$; sin embargo, el valor $P=0.448$ por lo que se carece de significancia estadística (Figura 13B).

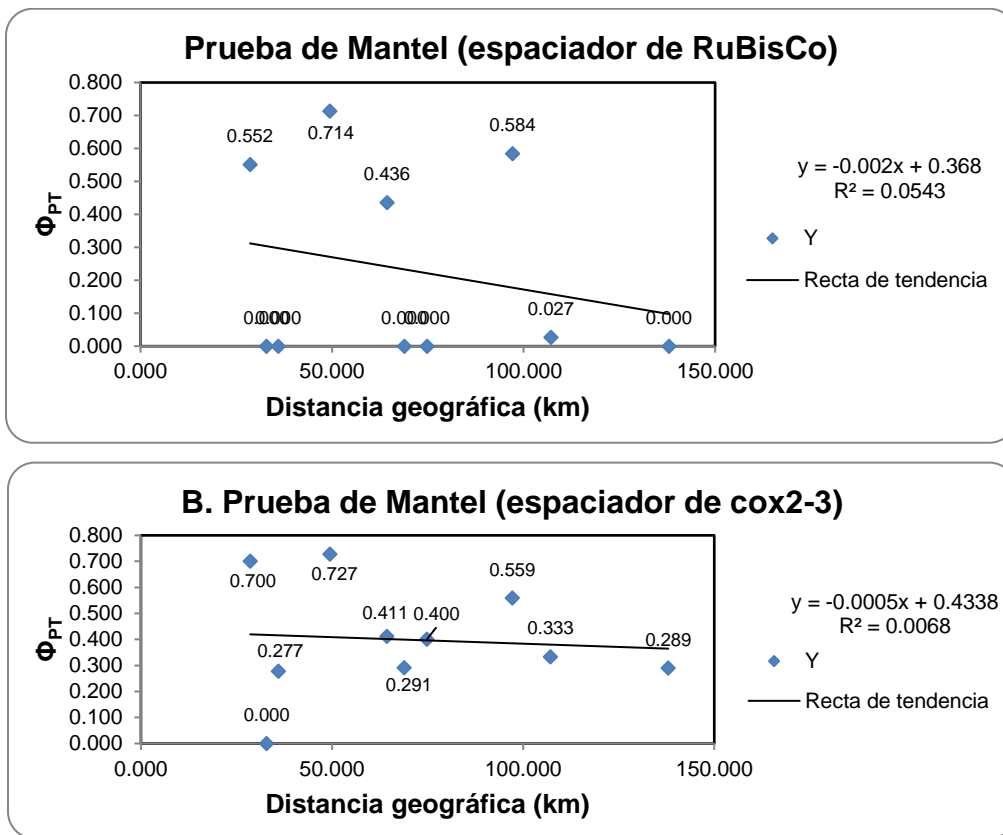


Figura 13. Relación entre Φ_{PT} pareada y distancias geográficas de las poblaciones estudiadas de *Meristotheca cylindrica*, ubicadas en el litoral de Campeche, con el marcador plastidial (espaciador de RuBisCo) (A) y el marcador mitocondrial (espaciador de *cox2-3*) (B).

8.4 PRUEBAS DE NEUTRALIDAD E HISTORIA DEMOGRÁFICA

Espaciador de RuBisCo. Se obtuvieron valores carentes de significancia estadística para todos los estimados. La hipótesis nula subyacente en cada parámetro (H_0 : tamaños poblacionales constantes y/o neutralidad selectiva) no fue rechazada, por lo que este marcador en particular no presenta desviaciones significativas de lo esperado bajo neutralidad (Tabla 13).

Espaciador de *cox2-3*. Todos los parámetros mostraron valores estadísticamente significativos y racionales positivos. Se rechazó la hipótesis nula subyacente en cada parámetro (H_0 : tamaños poblacionales constantes y/o neutralidad selectiva), mientras que se evaluaron los efectos de la hipótesis alternativa en cada caso (H_1 : tamaños poblacionales discontinuos y/o selección natural operante) (Tabla 13).

Tabla 13. Estimados de los parámetros de variación y diversidad genética, así como de las pruebas de neutralidad selectiva e historia demográfica para cada marcador. En rojo se destacan los valores P de estimados carentes de significancia estadística. k = desajuste nucleotídico, π = diversidad nucleotídica, θ =theta.

Marcador	k	π	θ	D Tajima	F* Fu & Li	F _s Fu
Espaciador de RuBisCo	1.44483	0.00785	0.00884	-0.30655 *P>0.10	-1.52348 *P>0.10	1.795 *P>0.10
Espaciador de <i>cox2-3</i>	15.29880	0.07285	0.03878	3.09120 P<0.01	1.97821 P<0.02	10.157 P<0.002

8.5 ANÁLISIS DE HAPLOTIPOS

Espaciador de RuBisCo. La red de parsimonia estadística reveló cuatro haplotipos interconectados: R1, R2, R3 y R4 (Figura 14A). El haplotipo que agrupó al mayor número de individuos fue R1 (n=29), seguido por el haplotipo R2 (n=11) y finalmente los haplotipos con menor número de individuos, R3 y R4 (ambos con n=1) (Figura 14A). El haplotipo R1, designado por el programa como el posible haplotipo ancestral con el mayor peso de grupo externo (=0.71) y dos conexiones con otros haplotipos, estuvo separado de R2 por cuatro pasos mutacionales y este, a su vez, estuvo separado de R3 por seis pasos mutacionales; en cuanto a R4, solo se separó por dos pasos mutacionales (Figura 14A).

Respecto de su distribución geográfica, el haplotipo ancestral y compartido R1 estuvo presente en todas las localidades muestreadas, R2 se presentó en todas las localidades exceptuando Playa Bonita y los haplotipos únicos R3 y R4 se restringieron a Bahía de Tortuga y Playa Bonita, respectivamente (Tabla 14, Figura 15). En todas las poblaciones se presentó el mismo número de haplotipos (h=2) (Tabla 14).

Espaciador de *cox2-3*. La red de parsimonia estadística reveló nueve haplotipos agrupados en dos redes, que correspondieron con dos grupos genéticamente diferenciados (GI y GII) con una estructuración total. La primera red (**GI**) estuvo conformada por cinco haplotipos: C1 (n=12), C8 (n=1), C5 (n=3), C9 (n=1) y C4 (n=4), mientras que la segunda red (**GII**) estuvo integrada por cuatro haplotipos: C3 (n=1), C2 (n=10), C6 (n=1) y C7 (n=4) (Figura 14B). En GI, el haplotipo C1 designado por el programa como el posible haplotipo ancestral con el mayor peso de grupo externo (=0.73) y tres conexiones con otros haplotipos, estuvo separado de C8, C5 y C9 por dos pasos mutacionales, y este a su vez, estuvo separado de C4 por cinco pasos mutacionales. En GII, el haplotipo C3 designado como posible haplotipo ancestral con el mayor peso de grupo externo (=0.53) y dos conexiones con otros haplotipos, se separó de C7 y C2 por un solo paso mutacional, mientras que cinco pasos mutacionales lo separaron de C6 (Figura 14B).

Respecto de su distribución geográfica, para **GI** el haplotipo ancestral y compartido C1 se presentó en las localidades de Punta Xen, Sabancuy e Isla Aguada; C4 y C5 se presentaron simultáneamente en Isla Aguada y Playa Bonita; C8 y C9 (únicos) se restringieron a Sabancuy (Tabla 14, Figura 15). Para **GII**, el haplotipo ancestral C3 (único) fue exclusivo de Isla Aguada; C2 estuvo presente en Sabancuy, Isla Aguada y Bahía de Tortuga; C6 y C7 (únicos) se delimitaron a Punta Xen (Tabla 14, Figura 15). En general, el número de haplotipos por población fue el siguiente: Isla Aguada (5), Sabancuy (4), Punta Xen (3), Playa Bonita (2) y Bahía de Tortuga (1) (Tabla 14).

Tabla 14. Haplotipos observados con la región espaciadora de RuBisCo y la región espaciadora de *cox2-3* de las muestras de *Meristotheca cylindrica* procedentes de Campeche. Se detallan las secuencias incluidas y su ubicación por localidad; en negritas, se destaca el grupo GI del espaciador de *cox2-3*; en cursiva, se destacan los haplotipos ancestrales designados con la parsimonia estadística. n= secuencias incluidas en el haplotipo, #número de acceso al GenBank.

Espaciador de RuBisCo				Espaciador de <i>cox2-3</i>							
Haplotipo	Secuencias	Localidades	#	Haplotipo	Secuencias	Localidades	#				
<i>R1</i> n=29	McIA_E10, McIA_E32, McIA_E51, McIA_E59, McIA_E73, McIA_E74, McIA_E93, McIA_E105, McPX_E41, McIC_H44, McIC_H45, McIC_H46, <i>McIC_E3,</i> <i>McIC_E44,</i> <i>McIC_E54,</i> <i>McPB_E1,</i> McPB_E75, McPB_H42, McPB_H49, McPB_H51, McPB_H52, McPB_H53, McS_E2, McS_E13, McS_E14, McS_E28, <i>McS_E38,</i> McS_E58, McS_E104	IA, PX, PB, S	KY979260	<i>C1</i> n=12	McIA_E10, McIA_E32, McIA_E51, McIA_E59, McIA_E73, McIA_E105, McPX_E41, McS_E13, McS_E14, McS_E28, McS_E98, McS_E104	IA, PX, S	KY979264				
	McIA_E20, McS_E18, McS_E23, McS_E65, McBT_92-12, McBT_92-16, McBT_92-13, McBT_92-15, McBT_93-1, McBT_93-2				S, BT, IA			KY979265			
	<i>C3</i> n=1								McIA_E26	IA	KY979266
	<i>C4</i> n=4								McIA_E74, McPB_H51, McPB_H52, McPB_H53	IA, PB	KY979267
	<i>C5</i> n=3								McIA_E93, McPB_H42, McPB_H49	IA, PB	KY979268
	<i>C6</i> n=1								McPX_E34	PX	KY979269
	<i>C7</i> n=4								McPX_E82, McIC_H44, McIC_H45, McIC_H46	PX	KY979270
	<i>C8</i> n=1								McS_E2	S	KY979271
	<i>C9</i> n=1								McS_E58	S	KY979272
	<i>R2</i> n=11								McIA_E20, McIA_E26, McPX_E11, McPX_E82, McS_E18, McS_E65, McBT_92-16, McBT_92-13, McBT_92-15, McBT_93-1, McBT_93-2	IA, PX, S, BT	KY979261
<i>R3</i> n=1	McBT_92-12	BT	KY979262								
<i>R4</i> n=1	McPB_H70	PB	KY979263								

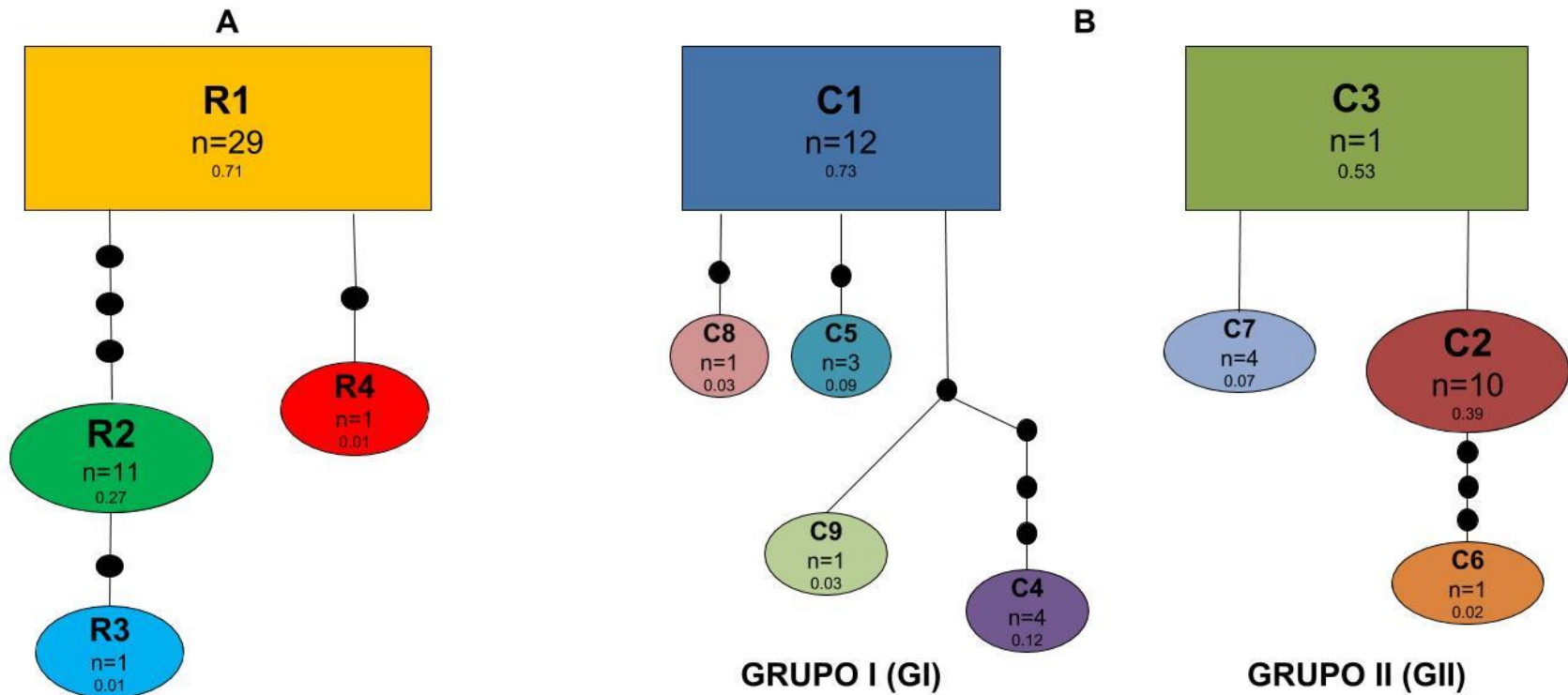


Figura 14. Redes de parsimonia estadística de las regiones espaciadoras RuBisCo (A) y *cox2-3* (B) de *Meristothecha cylindrica*. Para la región espaciadora *cox2-3*, los dos grupos genéticos encontrados se indican como GI y GII. Para ambas redes, los rectángulos corresponden con el posible haplotipo ancestral; las líneas sencillas indican un paso mutacional; los círculos negros indican haplotipos extintos o no muestreados; *n*= número de individuos con el mismo haplotipo; los valores ubicados en la parte basal indican las probabilidades de peso de grupo externo por cada haplotipo (modificado de Palma Ortiz *et al.* 2017).

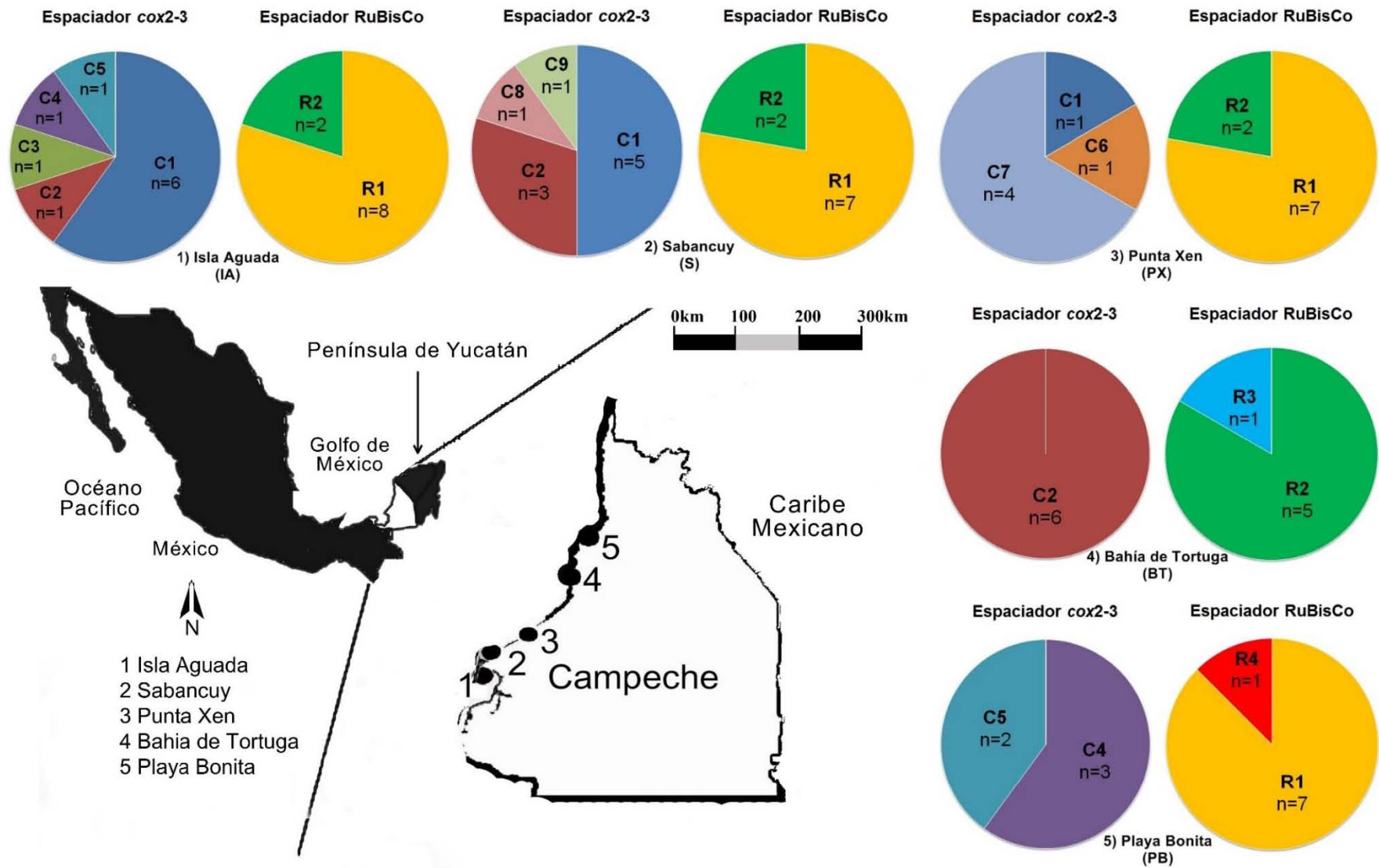


Figura 15. Distribución haplotípica de las regiones espaciadoras de RuBisCo (derecha) y de *cox2-3* (izquierda) para *Meristotheca cylindrica* de Campeche. Las localidades están indicadas en el mapa con número (1-5) y la clave de localidad se indica entre paréntesis. n= número de individuos pertenecientes a cada haplotipo por población (modificado de Núñez-Reséndiz *et al.* 2017, Palma Ortiz *et al.* 2017).

8.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Espaciador de RuBisCO. A partir de la matriz original de formato FASTA (.fas), se construyó una matriz secundaria con la adición de 11 muestras de distintas especies de la familia Solieriaceae obtenidas de GenBank, con *Hydropuntia cornea* (Gracilariaceae, Rhodophyta) como grupo externo, por lo que el conjunto de datos abarcó 53 secuencias en total (Figura 16). Debido a que los resultados de ambos análisis mostraron topologías sin diferencias, se escogió como base la topología bayesiana y se agregaron los estimados del soporte de ramas de tales análisis (probabilidad posterior bayesiana y *bootstrap*) en los nodos correspondientes.

Las muestras correspondientes a los cuatro haplotipos de *Meristotheca cylindrica* se agruparon en un solo clado soportado por una probabilidad posterior bayesiana y *bootstrap* de 0.97/90, respectivamente (Figura 16). En su interior, se ubicó un grupo conformado por las muestras de los haplotipos R2 y R3, soportado por valores de 1.0/96 (probabilidad posterior bayesiana y *bootstrap*, respectivamente). El grupo hermano de las muestras del presente estudio fue *Eucheuma isiforme*.

Espaciador de *cox2-3*. A partir de la matriz original de formato FASTA (.fas), se construyó una matriz secundaria con la adición de nueve muestras de distintas especies de la familia Solieriaceae obtenidas de GenBank, con *Hydropuntia cornea* (Gracilariaceae, Rhodophyta) como grupo externo, por lo que el conjunto de datos abarcó 46 secuencias en total (Figura 17). Debido a que los resultados de ambos análisis mostraron topologías sin diferencias, se escogió como base la topología bayesiana y se agregaron los estimados del soporte de ramas de tales análisis (probabilidad posterior bayesiana y *bootstrap*) en los nodos correspondientes.

Las muestras correspondientes a los nueve haplotipos de *Meristotheca cylindrica* se agruparon en dos grupos monofiléticos (GI, GII), con soporte de probabilidad posterior bayesiana y *bootstrap* de 0.98 y 0.95, respectivamente (Figura 17). El grupo I (**GI**) incluyó las muestras correspondientes a los haplotipos C1, C4, C5, C8 y C9 observados previamente mediante parsimonia estadística, en tanto que el grupo II (**GII**) agrupó las muestras correspondientes a C2, C3, C6 y C7. Al igual que con el marcador anterior, el grupo hermano de las muestras del presente estudio fue *Eucheuma isiforme*.

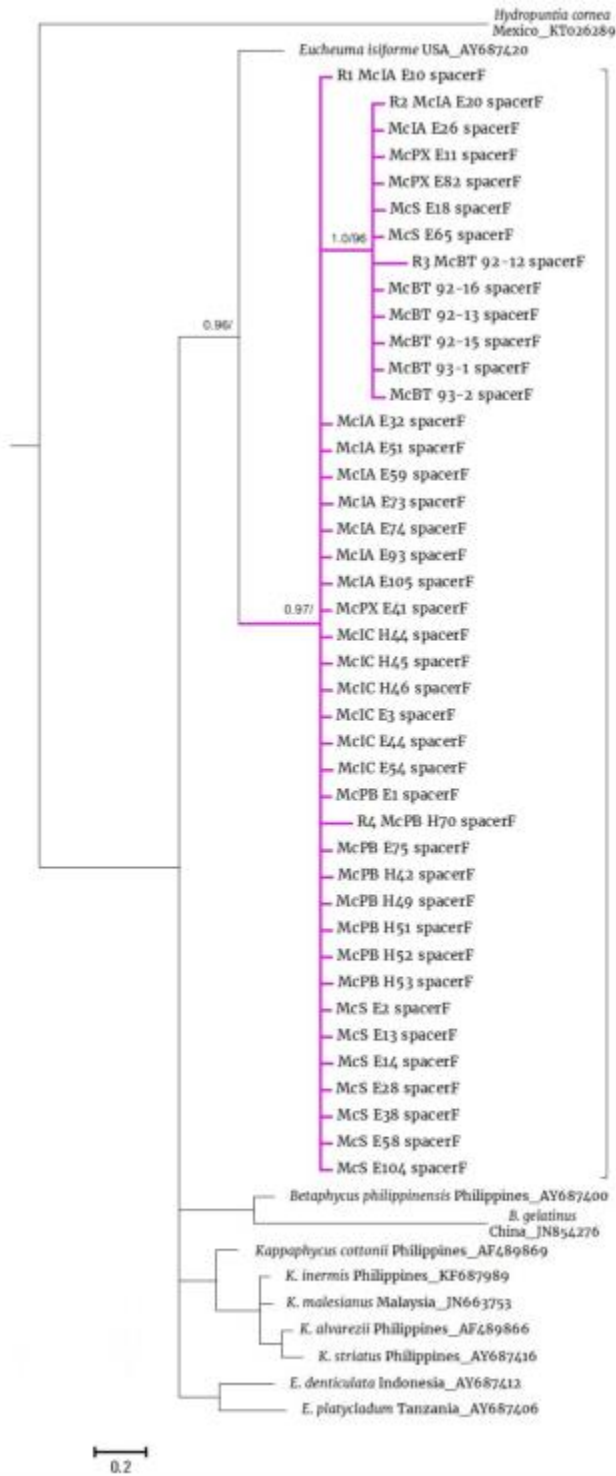


Figura 16. Topología bayesiana obtenida con secuencias de la región espaciadora de RuBisCo para las poblaciones de *Meristotheca cylindrica*. Las secuencias obtenidas en el presente estudio están indicadas en las ramas de color morado y las restantes fueron obtenidas del GenBank, cuyos números de acceso se indican a un lado. Los valores de probabilidad posterior bayesiana (izquierda) y los valores de *bootstrap* (derecha) están indicados en los nodos de las ramas. Los valores por debajo de 95% no son mostrados.

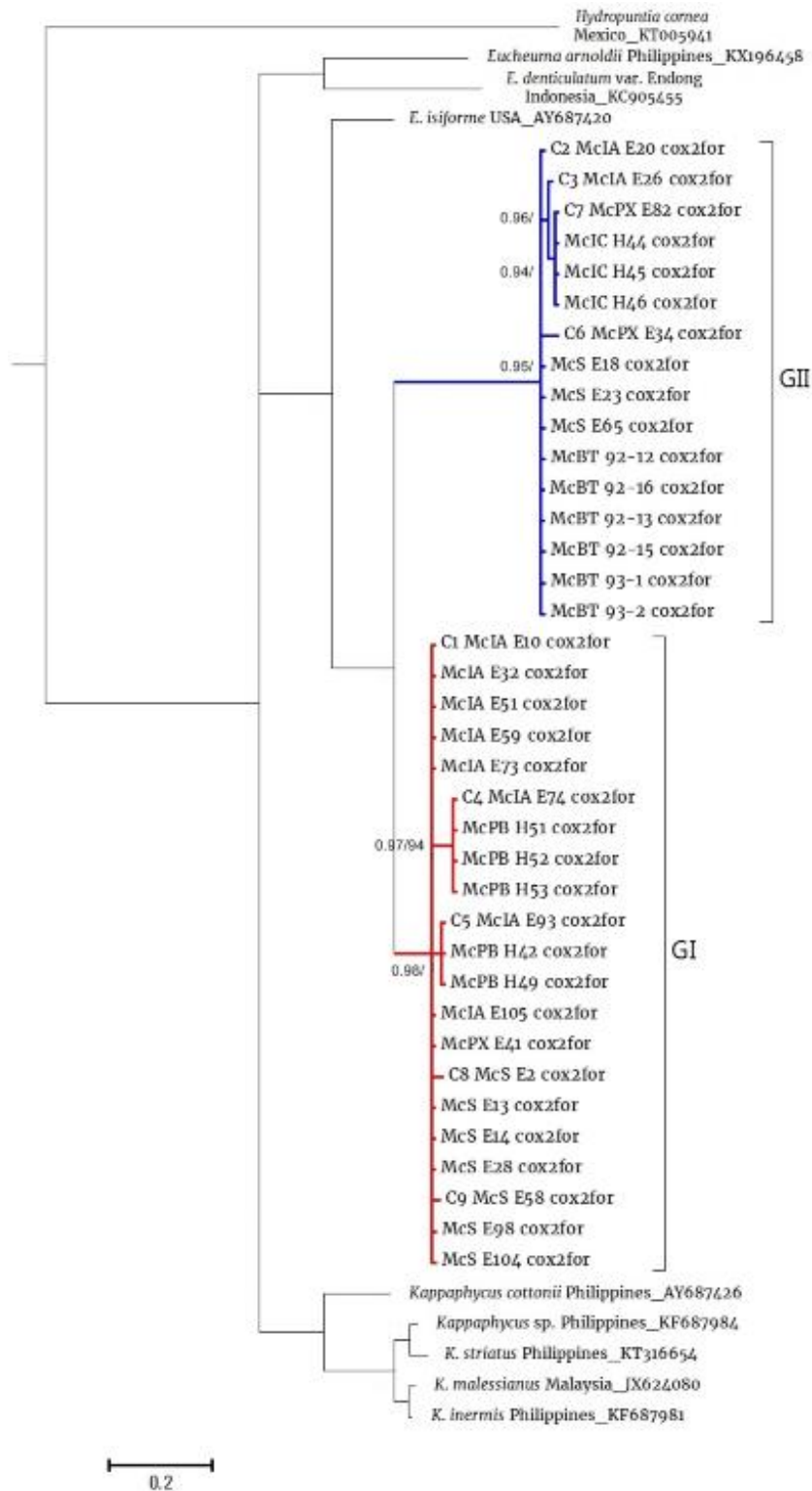


Figura 17. Topología bayesiana obtenida con secuencias de la región espaciadora de *cox2-3* para las poblaciones de *Meristothecha cylindrica*. Las secuencias obtenidas en el presente estudio están indicadas en las ramas de color azul (GII) y rojo (GI); las restantes fueron obtenidas del GenBank, cuyos números de acceso se indican a un lado. Los valores de probabilidad posterior bayesiana (izquierda) y los valores de *bootstrap* (derecha) están indicados en los nodos. Los valores por debajo de 95% no son mostrados.

7.6 DISTANCIAS GENÉTICAS

Espaciador de RuBisCO. Se obtuvieron los siguientes porcentajes relevantes de distancia genética, con distancias no corregidas, al interior de *M. cylindrica*: máxima de 4.3% (entre R3-R4) y mínima de 1.1% (entre R3-R2 y R4-R1); el promedio de distancia genética fue de 2.5% (Tabla 15).

Tabla 15. Matriz de distancias genéticas *p* no corregidas, correspondientes con los haplotipos encontrados en las poblaciones de *Meristotheca cylindrica* para la región espaciadora de RuBisCo. Se resaltan en negritas los valores superiores de divergencia, mientras que los valores menores son subrayados.

Haplotipo	R1	R2	R3	R4
R1	-			
R2	0.0216	-		
R3	0.0324	<u>0.0108</u>	-	
R4	<u>0.0108</u>	0.0324	0.0432	-

Espaciador de *cox2-3*. Se obtuvieron los siguientes porcentajes relevantes de distancia genética, con distancias no corregidas, al interior de *M. cylindrica* (entre ambos grupos): máxima de 14.76% (entre C8-C7 y C8-C3) y mínima de 0.48% (entre C3-C7 y C3-C2); la distancia genética promedio general fue de 8.3% (Tabla 16).

Tabla 16. Matriz de distancias genéticas *p* no corregidas, correspondientes con el total de haplotipos encontrados en las poblaciones de *Meristotheca cylindrica* para la región espaciadora de *cox2-3*. Se resaltan en negritas los valores superiores de divergencia, mientras que los valores menores son subrayados.

Haplotipo	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
C1	-								
C2	0.1333	-							
C3	0.1381	<u>0.0048</u>	-						
C4	0.0238	0.1238	0.1286	-					
C5	0.0095	0.1429	0.1381	0.0333	-				
C6	0.1333	0.019	0.0238	0.1238	0.1429	-			
C7	0.1429	0.0095	<u>0.0048</u>	0.1333	0.1333	0.0286	-		
C8	0.0095	0.1429	0.1476	0.0333	0.0143	0.1429	0.1476	-	
C9	0.0095	0.1238	0.1286	0.0238	0.019	0.1333	0.1333	0.019	-

Al interior de **GI**, la distancia mínima se detectó entre C1-C5, C1-C8 y C1-C9 (0.95%) y la máxima entre C4-C5 y C4-C8 (3.3%); la distancia genética promedio del grupo fue de 2% (Tabla 17A). Al interior de **GII**, la distancia genética mínima se detectó entre C2-C3 y C3-C7 (0.48%) y la máxima entre C6-C7 (2.86%); la distancia genética promedio fue de 1.5% para este grupo (Tabla 17B).

Tabla 17. Matrices de distancias genéticas p no corregidas, correspondientes con los grupos genéticos **GI (A)** y **GII (B)** y sus respectivos haplotipos en las poblaciones de *Meristotheca cylindrica* para la región espaciadora de *cox2-3*. Se resaltan en negritas los valores superiores de divergencia, mientras que los valores menores son subrayados.

A GI					
Haplotipos	C1	C4	C5	C8	C9
C1	-				
C4	0.0238	-			
C5	<u>0.0095</u>	0.0333	-		
C8	<u>0.0095</u>	0.0333	0.0143	-	
C9	<u>0.0095</u>	0.0238	0.019	0.019	-
B GII					
Haplotipos	C2	C3	C6	C7	
C2	-				
C3	<u>0.0048</u>	-			
C6	0.019	0.0238	-		
C7	0.0095	0.0048	0.0286	-	

7.8 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

El análisis múltiple de varianzas (MANOVA) a partir de datos cuantitativos asociados a estructuras y mediciones para las tres partes del talo (Tabla 18, Figura 18), indicó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos morfológicos analizados (Figura 19), ya que Wilk's $\Lambda=0.066267$; $F(8, 1)=1.76132$ y $p=0.527258>0.05$.

Tabla 18. Cuantificación de caracteres morfológicos de 11 muestras de *Meristotheca cylindrica*. Los caracteres diagnósticos se establecieron según Ardito *et al.* (2014) modificado para *M. cylindrica*, con la adición del número de filamentos medulares y el diámetro de células de las cortezas externa (CE) e interna (CI). IA= Isla Aguada, S=Sabancuy, BT=Bahía de Tortuga, PX=Punta Xen, PB=Playa Bonita; áp=ápice, med= media, bas=basal.

Muestra	Grupo morfológico	Localidad	Parte del talo	Núm. de capas corticales	Núm. de filamentos medulares	Diámetro del talo (µm)		Diámetro de células CI (µm)		Diámetro de células CE (µm)		Diámetro de médula (µm)		
						L	A	L	A	L	A	L	A	
UAMIZ 1257	1	IA	áp	7	78	880	884	90	85	17.5	7.5	350	353	
			med	7	263	1750	1290	130	105	15	5	1240	1540	
			bas	2	922	2825	2825	0	0	15	7.5	2770	2770	
UAMIZ 1259	1	S	áp	6	117	1620	1210	150	180	15	10	300	850	
			med	6	54	1280	980	140	110	20	10	570	330	
			bas	7	468	1710	1710	165	172.5	15	10	450	550	
UAMIZ 1250	2	BT	áp	5	92	1390	650	122.5	110	12.5	7.5	720	150	
			med	6	147	900	770	95	85	10	5	195	195	
			bas	8	119	1100	930	100	60	15	10	305	255	
UAMIZ 1248	2	IA	áp	8	241	930	695	75	45	12.5	7.5	425	215	
			med	9	131	1070	1460	55	65	12.5	5	320	430	
			bas	10	576	2360	2360	80	85	10	5	980	1130	
UAMIZ 1252	2	PX	áp	6	77	1050	655	77.5	55	12.5	5	680	220	
			med	7	213	1410	930	97.5	67.5	10	4	450	195	
			bas	8	209	1330	1140	85	60	10	5	455	300	
UAMIZ 970	2	PB	áp	9	96	1330	1070	100	55	15	5	200	145	
			med	11	251	2750	2540	132.5	130	10	5	450	420	
			bas	2	1112	2900	2380	0	0	10	5	2800	2320	
UAMIZ 1249	2	BT	áp	5	119	835	675	90	85	12.5	5	265	215	
			med	2	10	221	1180	1510	145	90	12.5	5	5	590
			bas	2	580	3400	160	0	0	12.5	5	3100	102.5	
UAMIZ 1251	2	BT	áp	5	70	670	765	105	67.5	12.5	5	280	200	
			med	6	153	1290	780	130	95	10	5	540	115	
			basal	5	211	1460	1290	135	105	10	5	575	445	
UAMIZ 1247	2	S	áp	7	108	1170	950	130	97.5	10	5	600	220	
			med	6	244	4120	1240	145	100	10	5	3420	240	
			bas	8	353	2640	1700	170	115	12.5	5	1920	500	
UAMIZ 1246	2	S	áp	8	332	1460	1180	125	77.5	12.5	5	1180	960	
			med	7	367	3680	1660	130	75	12.5	5	2500	440	
			bas	7	521	3580	1960	195	135	10	5	2090	560	

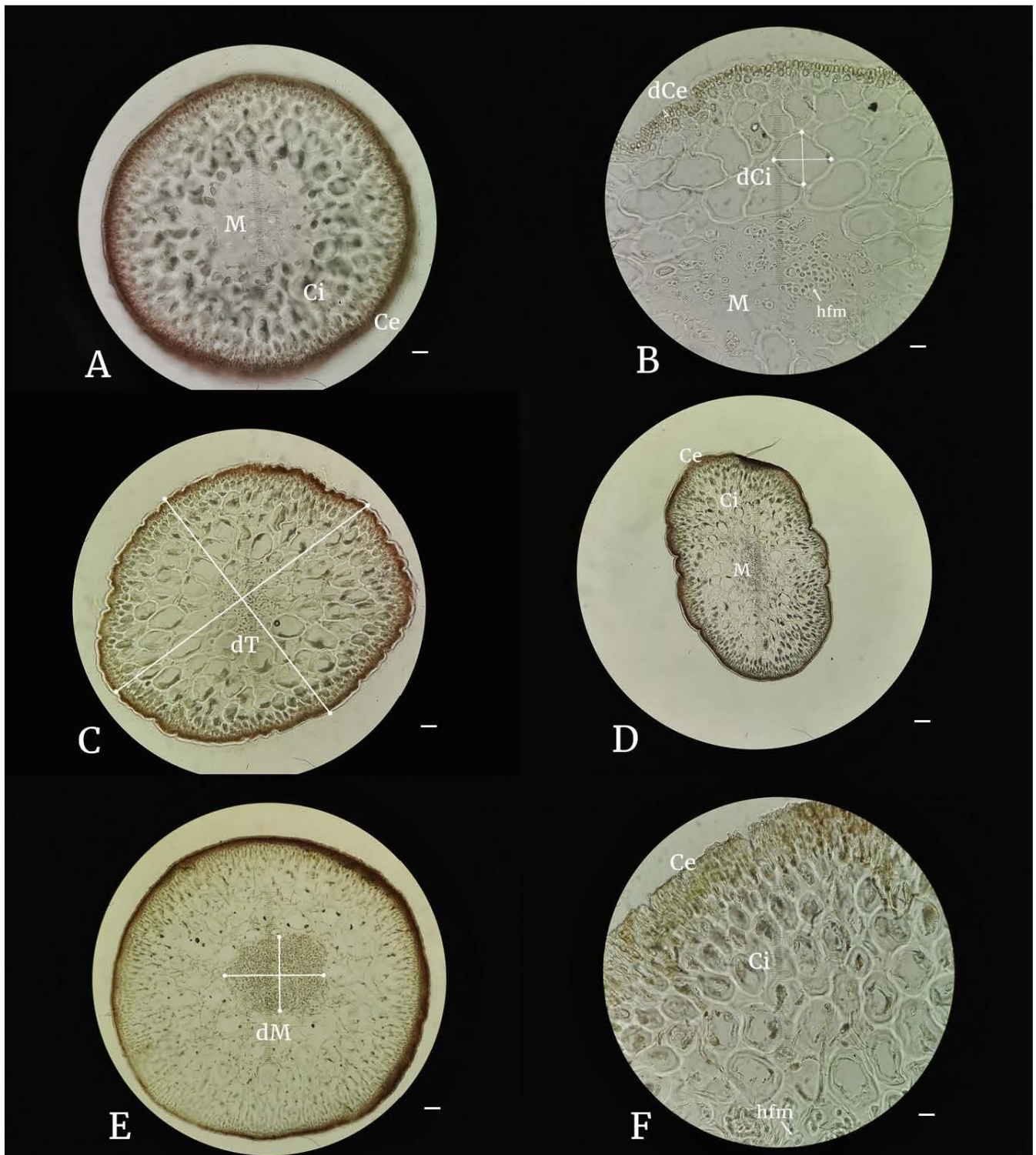


Figura 18. Estructuras y caracteres cuantificados en cortes transversales bajo el microscopio óptico. A: parte apical de UAMIZ 1257 (10X); B: parte apical de UAMIZ 1249 (40X); C: parte media de UAMIZ 1250 (20X); D: parte basal de UAMIZ 1252 (40X); E: parte basal de UAMIZ 1259 (10X); F: parte apical de UAMIZ 1246 (40X). M=médula; Ci=corteza interna; Ce=corteza externa; dCi=diámetro de células de la corteza externa; dCe=diámetro de células de la corteza interna; hfm=haces de filamentos medulares; dT=diámetro del talo; dM=diámetro de la médula. Se indica la escala en cada imagen. Barra de escalas según el aumento: 10X=10 μ m; 20X=5 μ m; 40X=2.5 μ m.

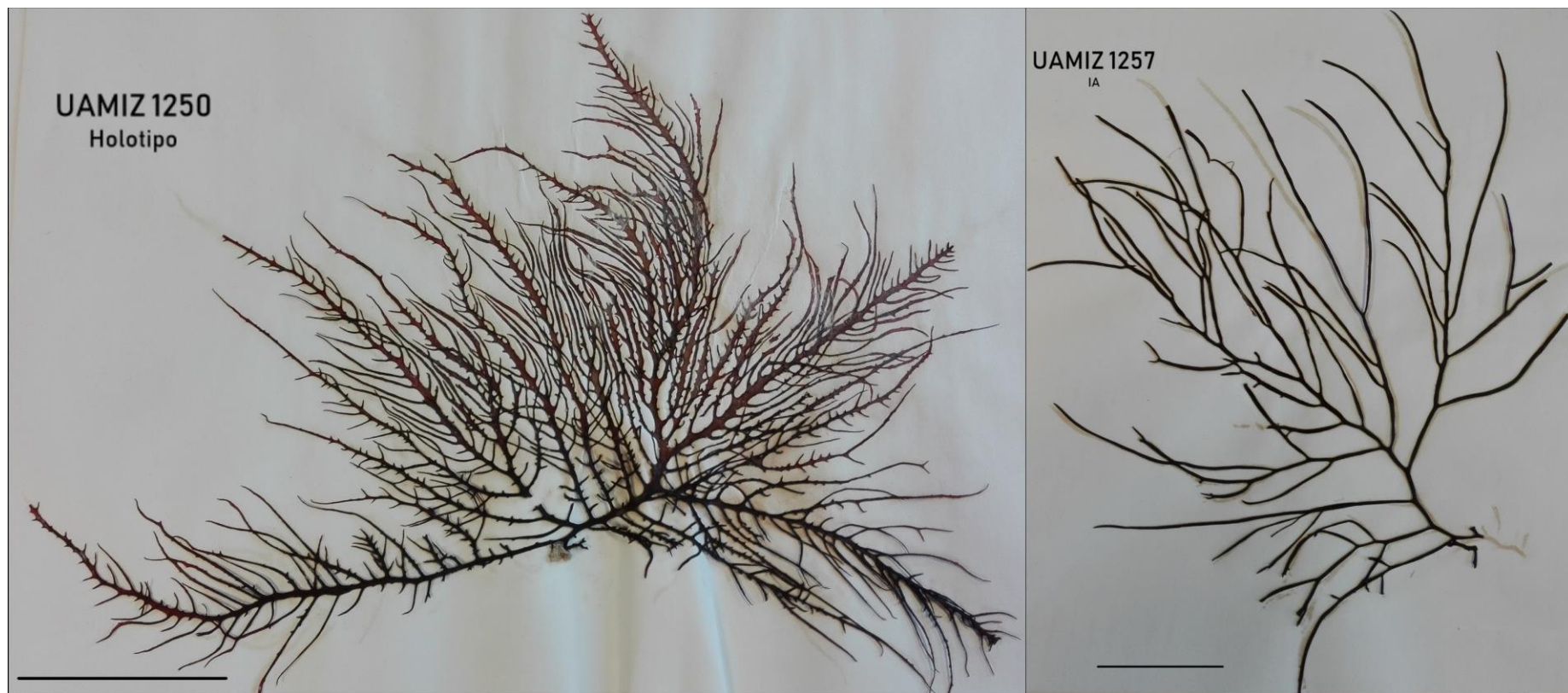


Figura 19. Representantes de los grupos morfológicos reportados en *Meristotheca cylindrica* (Palma Ortiz *et al.* 2017). Grupo 1: UAMIZ 1257. Grupo 2: UAMIZ 1250. Barra de escalas =5 cm.

9. DISCUSIÓN

9.1 VARIACIÓN Y DIVERSIDAD GENÉTICA

A nivel general, los estimados de variación y diversidad genética con el marcador mitocondrial mostraron valores más altos que el marcador plastidial: se encontraron alrededor de 5 veces más sitios segregantes ($34 > 7$), alrededor de dos veces más haplotipos ($9 > 4$), alrededor del doble de diversidad haplotípica ($0.81 > 0.46$) y alrededor de diez veces mayor diversidad nucleotídica ($0.072 > 0.0078$). Esto significa que en la muestra, bajo condiciones estocásticas, existe una mayor probabilidad de encontrar haplotipos distintos y variación a nivel de nucleótido entre cada par de secuencias (independientemente de la longitud del marcador) con la región espaciadora de *cox2-3* que con el espaciador de RuBisCo. De manera similar, tomando en cuenta la longitud de los marcadores, la proporción de sitios segregantes es alrededor de cuatro veces mayor con el marcador mitocondrial que con el plastidial, reflejo de la gran cantidad de variación presente en el genoma mitocondrial ($\sim 16\% > 3.7\%$). Sin embargo, estos resultados contrastan con el estudio provisto por Yow *et al.* (2013), ya que se reportan menos de cuatro diferencias en pares de bases en poblaciones de *Gracilaria changii* de Malasia, por lo que consideran poco variable a la región espaciadora de *cox2-3*.

Al comparar los estimados poblacionales de ambos marcadores, se ha encontrado que la localidad de Sabancuy es aquella con los parámetros más elevados de variación y diversidad genética, en tanto que las localidades de Playa Bonita y Bahía de Tortuga presentan los valores más bajos, incluso de cero en el parámetro de diversidad haplotípica con el espaciador de *cox2-3* para esta última. Sin embargo, debe considerarse que el tamaño de muestra de tales localidades con ambos marcadores es menor que el considerado para las localidades restantes, por lo que podría haber una subestimación de la variación genética en Playa Bonita y Bahía de Tortuga.

Según los resultados de la presente tesis y el estudio de Palma *et al.* (2017), la región espaciadora de *cox2-3* fue más variable que la región espaciadora de RuBisCo de manera consistente con lo descrito por Zuccarello *et al.* (1999a), quien originalmente describe al marcador mitocondrial como un marcador altamente recomendable en estudios de variación genética de algas rojas, en particular con *Bostrychia* Montagne y *Caloglossa leprieurii* (Montagne) G. Martens, géneros pertenecientes al orden Ceramiales. Yow *et al.* (2013) mencionan que los marcadores mitocondriales son más

variables que los cloroplásticos, aunque refieren al gen COI como un marcador incluso más variable que la región espaciadora *cox2-3* para *Gracilaria changii* (B. M. Xia & I. A. Abbott) I. A. Abbott, J. Zhang & B. M. Xia. Sin embargo, Núñez-Resendiz (2015) y Núñez-Resendiz *et al.* (2016) describieron a la región espaciadora de RuBisCo como un marcador más variable que la región espaciadora *cox2-3*, para el complejo *Hydropuntia cornea* / *Hydropuntia usneoides*.

9.2 ESTRUCTURA, DIFERENCIACIÓN Y FLUJO GÉNICO

Espaciador de RuBisCo

Estructura y diferenciación genética. El valor general de F_{ST} *sensu* Hudson, Slatkin & Maddison (1992) indicó una gran diferenciación genética según los intervalos delimitados por Wright (1978) y Hartl & Clark (2007) ya que $0.47420 > 0.25$, lo cual resultaría en una estructuración significativa de las poblaciones estudiadas. A través del AMOVA, el valor general de Φ_{PT} fue estadísticamente significativo y distinto de cero ($\Phi_{PT}=0.268$, $P=0.009$) lo que refleja cierta divergencia ocurrida entre las poblaciones muestreadas de *M. cylindrica*. Los porcentajes de varianza molecular se distribuyeron de la siguiente manera: la varianza al interior de las poblaciones respecto del total se reflejó en un 70% en tanto que el porcentaje de varianza entre las poblaciones fue de 30%, valores relacionados en una proporción de $>2:1$.

Flujo génico. Se observó un bajo valor bajo de flujo génico reflejado en el número de migrantes ($N_m=0.55 < 1$) *sensu* Hudson, Slatkin & Maddison (1992), lo que derivaría en el aislamiento y fragmentación de las poblaciones estudiadas como uno de los efectos de la deriva génica al no haber cierta conectividad genética (Hedrick 2011). Por otro lado, el estimado de N_m general obtenido a través del AMOVA para genoma haploide ($N_m=1.367 > 1$) refleja cierta conectividad genética entre las poblaciones lo cual ayudaría a homogenizar la variación encontrada en la muestra (Hedrick 2011, Peakall & Smouse 2006, 2012). Sin embargo, debe tomarse en cuenta que la estimación indirecta de N_m a través de Φ_{PT} involucra distintos supuestos frecuentemente atribuidos a poblaciones ideales: tamaños poblacionales constantes, flujo génico al azar, neutralidad selectiva y ausencia de estructura, por lo que deben ser interpretadas cautelosamente; sin embargo, proveen información útil acerca de la magnitud aproximada del flujo génico ocurrido de manera natural en las poblaciones (Wood & Garner 2007).

Espaciador de *cox2-3*

Estructura y diferenciación genética. El valor general de F_{ST} *sensu* Hudson, Slatkin & Maddison (1992) indicó una gran diferenciación genética según los intervalos delimitados por Wright (1978) y Hartl & Clark (2007) ya que $0.52822 > 0.25$ e incluso un estimado mayor que el valor obtenido con el marcador anterior ($0.52 > 0.47$) lo cual resulta en una estructuración significativa de las poblaciones estudiadas. A través del AMOVA, el valor general de Φ_{PT} fue estadísticamente significativo y distinto de cero ($\Phi_{PT}=0.363$, $P=0.001$); de manera similar a F_{ST} , refleja mayor divergencia ocurrida entre las poblaciones muestreadas de *M. cylindrica* que con el marcador anterior. Los porcentajes de varianza molecular se distribuyeron de la siguiente manera: la varianza al interior de las poblaciones respecto del total se reflejó en un 64% en tanto que el porcentaje de varianza entre las poblaciones fue de 36%, valores relacionados en una proporción de <2:1, ligeramente menor a la proporción y los porcentajes mencionados del espaciador de RuBisCo.

Flujo génico. Se observó un bajo valor bajo de flujo génico reflejado en el número de migrantes ($N_m=0.45 < 1$) *sensu* Hudson, Slatkin & Maddison (1992), menor al del espaciador de RuBisCo ($0.45 < 0.55$), lo que derivaría en menor conectividad genética entre las poblaciones que tal marcador (Hedrick 2011). Por otro lado, el estimado de N_m general obtenido a través del AMOVA ($N_m=0.867 < 1$), menor que el observado con el marcador plastidial, refuerza la aseveración basada en el estimado anterior, resaltando los posibles efectos de la deriva génica en la muestra (Hedrick 2011).

9.3 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA VS. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La falta de significancia estadística asociada a los resultados del estimado de r_m , con ambos marcadores, indica que no existe una relación lineal entre los estimados de diferenciación genética pareada (Φ_{PT}) y la distancia geográfica que separa a las poblaciones de cada localidad, por lo que no pueden establecerse relaciones de proporcionalidad observadas en la recta de ajuste lineal. Esto es, que las poblaciones más cercanas entre sí tienden a ser más similares genéticamente por efectos estocásticos en el caso de los marcadores estudiados (Diniz-Filho *et al.* 2013). Sin embargo, esto no indica la independencia entre variables (distancia geográfica y diferenciación genética), sino que potencialmente existen relaciones no lineales entre ambas. Los valores de probabilidad de la prueba de Mantel tienden a ser decrecientes al incrementar el área geográfica de estudio; sin embargo, la

falta de significancia estadística se ha observado en estudios en escalas geográficas menores, como el caso de *Hizikia fusiformis* (Harvey) Okamura con RAPD (Alberto *et al.* 1999) y *Porphyra umbilicalis* Kützing, esta última en un muestro restringido al Golfo de Maine, EE. UU. con microsatélites (Eriksen *et al.* 2016).

9.4 PRUEBAS DE NEUTRALIDAD Y EVENTOS DEMOGRÁFICOS

Espaciador de RuBisCo

Debido a las diferencias estadísticamente no significativas entre θ y π , los parámetros de D de Tajima, F^* de Fu & Li y F_s de Fu arrojaron valores esperados bajo neutralidad selectiva y tamaños poblacionales constantes. En asociación con la magnitud de los estimados de variación y diversidad genética reportados para este marcador, el espaciador de RuBisCo representa una región más conservada que aquella estudiada en el genoma mitocondrial (Núñez-Resendiz 2015, Núñez-Resendiz *et al.* 2016).

Espaciador de *cox2-3*

Los estimados obtenidos con este marcador, todos con significancia estadística y valores positivos, indican una deficiencia de variantes, reducciones en tamaños poblacionales en el pasado reciente y la injerencia de la selección natural de tipo balanceadora, favoreciendo a los genotipos heterocigotos. Debido al análisis de dos regiones en genomas cuya segregación es independiente entre sí, existe una gran probabilidad de que la selección natural haya actuado puntualmente en la muestra al mantener genotipos heterocigotos analizados con el locus mitocondrial (espaciador de *cox2-3*). Debido a la falta de significancia estadística de los estimados de neutralidad selectiva y los valores moderados de variación genética obtenidos con el marcador plastidial, *i. e.*, región más conservada que el marcador mitocondrial, es menos probable el efecto homogéneo en la variación genética ocasionado por la deriva génica en ambos marcadores.

9.5 DISTRIBUCIÓN HAPLOTÍPICA Y REDES DE HAPLOTIPOS

Debido a la aparente relación en forma de función matemática entre los haplotipos de ambos marcadores y existencia de dos entidades genéticamente diferenciadas con el marcador

mitocondrial, se trató de relacionar a los haplotipos plastidiales R1 y R4 con los haplotipos C1, C4, C5, C8 y C9 del grupo genético GI del marcador mitocondrial, en tanto que los haplotipos R2 y R3 relacionados con C2, C3, C6 y C7. Sin embargo, tal relación no se cumplió con las muestras del haplotipo R1 (ancestral) PX: 1-14, PX: 1-15 y PX :1-16 (H44, H45 y H46 en clave de laboratorio, respectivamente) de la población de Punta Xen, las cuales resultaron con haplotipo C7 del grupo GII con el marcador mitocondrial, por lo que se podría establecer un símil de una relación no inyectiva (Figura 20). Por lo tanto, en la muestra analizada no existe una relación directa entre los haplotipos encontrados con el marcador plastidial y los haplotipos mitocondriales, incluso entre individuos de dos entidades genéticamente diferenciadas bajo el supuesto de que sean dos especies distintas, según la red haplotípica resultante del marcador mitocondrial y los porcentajes de distancias genéticas posteriores. Debido a esto, se sugiere un posible entrecruzamiento entre individuos de ambos grupos genéticos.

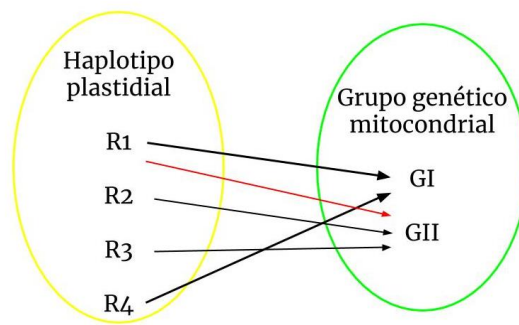


Figura 20. Esquema de la relación entre los haplotipos del marcador plastidial y los grupos genéticos del marcador mitocondrial.

Espaciador de RuBisCo

La red haplotípica obtenida reveló cuatro haplotipos interconectados a partir de diferencias moderadas entre las poblaciones muestreadas. La distribución haplotípica en las poblaciones de *M. cylindrica* evidenció que las poblaciones más parecidas en cuanto a su conformación haplotípica fueron Isla Aguada, Sabancuy y Punta Xen, más cercanas al estado de Tabasco y a su vez las más cercanas entre sí; se ubicaron los mismos haplotipos (R1 y R2) aunque con distinto tamaño de muestra en R1 de Isla Aguada. Empero, a medida que las poblaciones se acercaron más al estado de Yucatán surgieron haplotipos únicos y restringidos (R3 y R4) a las poblaciones de Bahía de Tortuga y Playa Bonita, respectivamente, los cuales no se encontraron en las primeras tres localidades, posible indicio de cierto aislamiento reproductivo entre Bahía de Tortuga-Playa Bonita

y las poblaciones mencionadas. Sin embargo, la presencia de los haplotipos compartidos R1 (ancestral) en Playa Bonita y R2 en Bahía de Tortuga, sugiere que existe intercambio genético escaso entre las poblaciones muestreadas o eventos de migración, desde las poblaciones más cercanas a Tabasco hacia aquellas más cercanas a Yucatán.

Espaciador de *cox2-3*

La red obtenida con la región espaciadora *cox2-3* mostró una estructuración total de la muestra en nueve haplotipos, agregados en dos grupos genéticos (GI y GII), correspondientes con dos grupos o entidades biológicas diferenciadas y subyacentes en *M. cylindrica*. En el grupo GII el haplotipo sugerido por el programa como el ancestro fue C3 por el mayor peso como grupo externo. Sin embargo, este haplotipo se restringió a la localidad de Isla Aguada y sólo estuvo representado por un individuo, por lo que se considera que el haplotipo compartido C2 sería el posible ancestro ya que presentó el mayor número de individuos (n=10), el mismo número de conexiones que C3 (2) y su localización en tres de cinco localidades. Las poblaciones más ricas en haplotipos y que presentaron el mayor número de haplotipos únicos fueron Isla Aguada (h=5), Sabancuy (h=4) y Punta Xen (h=3), poblaciones cuya localidad se encuentra más cercana al estado de Tabasco, mientras que la conformación haplotípica de Bahía de Tortuga y Playa Bonita fue más homogénea (h=2 en ambas). Esta distribución haplotípica sugiere un moderado intercambio genético entre las poblaciones, eventos de migración activos o la variación asociada al marcador mitocondrial, más variable que el marcador plastidial en la muestra (Palma Ortiz *et al.* 2017).

De manera similar a la región espaciadora de RuBisCo, con la región espaciadora de *cox2-3* se percibió cierta homogeneidad haplotípica en aquellas poblaciones más próximas al estado de Yucatán, aunque sin el surgimiento de haplotipos novedosos: en Bahía de Tortuga solamente se presentó el haplotipo C2 presente en Isla Aguada y Sabancuy, en tanto que en Playa Bonita se registraron los haplotipos C5 y C4 de Isla Aguada. Por otro lado, cierta heterogeneidad haplotípica se observó en aquellas poblaciones más cercanas al estado de Tabasco (Isla Aguada, Sabancuy, Punta Xen), tal como describieron Núñez-Resendiz *et al.* (2016) para el complejo *Hydropuntia cornea* / *Hydropuntia usneoides* (C. Agardh) Gurgel & Fredericq.

La forma en estrella de ambas redes haplotípicas indica un proceso reciente de expansión demográfica (Slatkin & Hudson 1991) lo que sugiere que las poblaciones de *M. cylindrica* no están

en equilibrio, similar a lo descrito por Núñez-Resendiz *et al.* (2016) para las poblaciones del complejo *Hydropuntia cornea* / *Hydropuntia usneoides* en Campeche.

9.6 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Los análisis filogenéticos del presente trabajo se mostraron coherentes con los resultados proporcionados por Núñez-Resendiz *et al.* (2017a), cuyo trabajo a partir del marcador plastidial *rbcL* y un análisis morfológico mostró la independencia de la especie *Meristotheca cylindrica* dentro de Solieriaceae, la cual se evidenció como grupo hermano del clado conformado por *M. papulosa*, *M. procumbens*, *M. coacta* y *M. imbricata*, y su diferenciación respecto a *Eucheuma*; de manera similar, en el estudio posterior de Núñez-Resendiz *et al.* (2017c) a partir de los marcadores moleculares COI-5P, espaciadora de RuBisCo y *rbcL*, se detallan las mismas relaciones de *Meristotheca cylindrica* dentro de Solieriaceae. Sin embargo, en este último estudio el análisis de seis muestras (H29, H6, H22, H10, H21 y H37), previamente identificadas como *Eucheuma* sp., permitió el establecimiento del género reciente *Tepoztequiella* a través de la especie *T. rhizoidea*, que junto con la secuencia de *Meristiella* sp. de Puerto Rico formó el grupo hermano de las especies del género *Meristotheca*. En la presente tesis, así como el estudio previo de Palma Ortiz *et al.* (2017), el análisis de tales muestras con el marcador plastidial (espaciador de RuBisCo) hasta entonces identificadas como *M. cylindrica* arrojó que todas pertenecen al haplotipo R1; sin embargo, la falta de las secuencias con el marcador mitocondrial y la relación observada entre los haplotipos de ambos marcadores no permiten establecer a qué grupo genético del marcador mitocondrial pertenecen las muestras de *T. rhizoidea*, aunque se conservó la división en dos grupos genéticos con sus respectivos haplotipos previamente obtenida con las redes haplotípicas.

Espaciador de RuBisCo

Los análisis filogenéticos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud fueron congruentes con la estructura genética definida con este marcador, carente de estructura tal que delimitara más de un grupo genético en la red haplotípica. Se detectó un grupo monofilético con la totalidad de las muestras, además de un conjunto en su interior constituido por las muestras pertenecientes a los haplotipos R2 y R3. Tales muestras, a excepción de PX: 1-13 (E11 en clave de laboratorio, haplotipo plastidial R2, sin marcador mitocondrial secuenciado), coincidieron con los haplotipos C2, C3 y C7 pertenecientes al grupo genético GII de la región espaciadora de *cox2-3*, como detallaron Palma Ortiz *et al.* (2017). El grupo hermano del clado monofilético de *M. cylindrica* fue *Eucheuma isiforme*.

Espaciador de *cox2-3*

Los análisis filogenéticos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud del marcador mitocondrial arrojaron un clado subdividido en los grupos GI y GII, consistente con los grupos genéticos y sus respectivos haplotipos obtenidos con la red haplotípica mediante parsimonia estadística. De igual manera, se ubicó sistemáticamente a *E. isiforme* como grupo hermano del clado conformado por los grupos genéticos subyacentes en *M. cylindrica*.

9.7 DISTANCIAS GENÉTICAS Y DIVERGENCIA

Espaciador de RuBisCo

Las distancias genéticas no corregidas mostraron dos valores entre los haplotipos observados: a) entre los conjuntos R1-R4 y R2-R3 (1.1%) y b) entre R3 y R4 (4.3%). Estos resultados se asemejan a las distancias genéticas interespecíficas reportadas por Núñez-Resendiz et al. (2017a) entre *M. cylindrica* y otras especies del género, las cuales varían de un mínimo de 2.8% (*M. procumbens* P. W. Gabrielson & Kraft, de Fiji) a un máximo de 4.4% (*Meristotheca* sp., de Taiwan), en tanto que contrastan significativamente con las distancias intraespecíficas cuyo intervalo de variación es de 0.2% a 0.4%.

Espaciador de *cox2-3*

Las distancias genéticas no corregidas, entre los haplotipos y los grupos genéticos, mostraron valores significativamente mayores que el marcador plastidial: entre GI y GII, con un máximo de 14.8% y un promedio de 8.3%. Este porcentaje es alrededor del triple de los porcentajes de diferencias entre las especies de *Meristotheca* sp. (Núñez-Resendiz 2017a). Por lo tanto, las distancias genéticas obtenidas con el marcador mitocondrial sugieren que ambos grupos genéticos corresponden con dos entidades diferenciadas a nivel de género, con valores similares a aquellos reportados entre géneros de la familia Gracilariaceae en un promedio de 8.8% así como una divergencia de 12.6% entre *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, McLachlan & E. C. Oliveira y *Gracilariopsis* sp. (Yang et al. 2008).

9.8 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Morfológicamente, existe homogeneidad entre los datos anatómicos cuantitativos obtenidos en las muestras registradas como *M. cylindrica* en el presente estudio de tesis. A través del análisis múltiple de varianza se pudo establecer que no existen diferencias significativas entre los datos en función de las variables independientes (grupo 1 y 2), esto es, que los estimados observados en la muestra podrían pertenecer a cualquiera de los grupos morfológicos definidos previamente a partir del grado y patrón de ramificación por Palma Ortiz *et al.* (2017), caracteres incluidos en la descripción original de la especie por Núñez-Resendiz *et al.* (2017a). Por lo tanto, las diferencias morfológicas entre ambos grupos morfológicos se limitan al patrón y grado de ramificación en el talo vegetativo y las diferencias en la corteza: Grupo 1, con patrón de ramificación solo alterna, grado de ramificación bajo o poco ramificado, con rizoides en la corteza interna; Grupo 2, con patrón de ramificación alterna-opuesta, grado de ramificación alto o altamente ramificado (Núñez-Resendiz *et al.* 2017a, Palma Ortiz *et al.* 2017).

Actualmente, los ejemplares de herbario del grupo 1 revisados en el presente trabajo (UAMIZ 1257, UAMIZ 1259) constituyen el isotipo de *Tepoztequiella rhizoidea* descrita recientemente por Núñez-Resendiz *et al.* (2017c), la cual se diferencia de *Meristotheca cylindrica* al comparar ciertos caracteres del talo vegetativo agregando algunos estados de carácter (Tabla 19).

Tabla 19. Comparación de características morfológicas entre las especies *M. cylindrica* y *T. rhizoidea* (modificado de Núñez-Resendiz *et al.* 2017c). CI=corteza interna.

Especie	Ramificación	Médula	Corteza
<i>Meristotheca cylindrica</i>	Dicotómica o alternada-opuesta; muy ramificada	Filamentos amplios y rizoides sin ramificar	Sin rizoides
<i>Tepoztequiella rhizoidea</i>	De alternada a pseudodicotómica; poco ramificada	Filamentos estrechos con numerosos rizoides	CI con rizoides de una a tres células

9.9 VARIACIÓN GENÉTICA VS. VARIACIÓN MORFOLÓGICA

En el estudio previo de Palma Ortiz *et al.* (2017) se planteó la existencia de dos grupos morfológicos al interior de la especie, basada en el patrón y grado de ramificación de los ejemplares de herbario analizados. Sin embargo, a través de los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis (en particular con los estimados de los parámetros de interés con la región espaciadora de *cox2-3*) y el

establecimiento del género *Tepoztequiella* con su especie *T. rhizoidea*, se hace patente la diferenciación en **dos géneros independientes con sus respectivas especies**, aunque con un espectro de variación morfológica similar por lo que se descarta un posible caso de plasticidad fenotípica al interior de *M. cylindrica*.

En el caso particular de *Meristotheca cylindrica*, la variación encontrada con la región espaciadora de RuBisCo fue significativamente menor que el espaciador mitocondrial con menos de 10 pb de diferencias. Sin embargo, Zuccarello *et al.* (2006) sugieren que, incluso con una sola diferencia en pares de base, se podría dar indicios de especies crípticas con aislamiento reproductivo, en tanto que la variación mostrada con la región de *cox2-3* ocurre en mayor medida al interior de las especies.

La existencia de dos grupos de haplotipos (GI y GII) y las distancias genéticas entre estos, así como la consistencia con los análisis filogenéticos, en un principio podrían establecer una relación excluyente entre los haplotipos mitocondriales y plastidiales de cada especie. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, no existe tal relación de independencia por lo que el análisis molecular de las muestras de *Meristotheca cylindrica* debe complementarse con su respectivo análisis morfológico. Tal asignación de haplotipos sugirió un posible entrecruzamiento entre individuos de ambos grupos de haplotipos.

Debido al intervalo de distribución reportado en el litoral del Atlántico mexicano para ambas especies, *M. cylindrica* y *T. rhizoidea*, se sugiere un evento de especiación simpátrica que dio origen a tales entidades biológicas, el cual se caracteriza por iniciar con barreras de tipo ecológico, fisiológico o conductual, y posteriormente culminar en la diferenciación en distintas especies a través de barreras reproductivas en un mismo intervalo de distribución geográfica. Los resultados de la prueba de Mantel constituyen un indicio de que la distribución geográfica de las poblaciones no corresponde de manera lineal con la diferenciación genética entre las mismas, por lo que los patrones de variación y estructura genética de las poblaciones pueden ser ocasionados por diferencias entre las variables ambientales que caracterizan a las localidades de origen.

10. CONCLUSIONES

La variación genética observada dentro y entre las poblaciones de *Meristotheca cylindrica*, en conjunto con el agrupamiento haplotípico de los individuos y su distribución geográfica, revela la presencia de distintos genotipos utilizando un fenotipo lo suficientemente similar como para confundir la identificación taxonómica.

Los estimados de estructura y diferenciación genética revelan mayores diferencias con el espaciador de *cox2-3* que el espaciador de RuBisCo. Tanto la red haplotípica obtenida por parsimonia estadística como los análisis filogenéticos muestran la asignación de los individuos en dos grupos genéticos distintos con el marcador mitocondrial, GI y GII.

Los estimados pareados de diferenciación genética y flujo génico efectivo, al comparar ambos marcadores, permitieron determinar que las poblaciones más similares son Sabancuy y Punta Xen, en tanto que las más diferenciadas son Bahía de Tortuga y Playa Bonita.

Entre la variación genética y la distribución geográfica de las poblaciones no existe una relación lineal, por lo que se descarta la idea de que la diferenciación genética en ambos marcadores incremente o disminuya linealmente en función de la distancia geográfica que separa a las localidades.

La distribución de los haplotipos, la relación entre los haplotipos del marcador plastidial y el marcador mitocondrial, además de los estimados de flujo génico entre las poblaciones, sugiere el entrecruzamiento entre los individuos de las entidades diferenciadas y subyacentes en *M. cylindrica*.

Las distancias genéticas obtenidas entre GI y GII con la región espaciadora de *cox2-3*, muestran diferencias similares a las reportadas a nivel de género; tales diferencias son congruentes con la delimitación de especies y la agrupación por parsimonia estadística. Adicionalmente, el análisis con *rbcL* y COI-5P de Núñez-Resendiz *et al.* (2017c) confirma la divergencia a nivel genérico.

Los grupos genéticos GI y GII corresponden con *Meristotheca cylindrica* y *Tepoztequiella rhizoidea*.

Las muestras pertenecientes al grupo morfológico a1 corresponde con las muestras de *T. rhizoidea*, en tanto que el grupo morfológico 2 corresponde con *M. cylindrica*.

La región espaciadora de *cox2-3* mostró mayor variabilidad que el marcador cloroplástico, por lo que se recomienda su utilización en estudios de genética de poblaciones y filogeografía en muestras pertenecientes a la familia Solieriaceae.

11. PERSPECTIVAS

Con la finalidad de establecer hipótesis más sólidas sobre los procesos que ocurren al interior de *M. cylindrica*, será necesario un incremento en el intervalo de muestreo a lo largo de la Península de Yucatán (o más general, al Golfo de México) así como el número de individuos por población. De esta manera, podrán utilizarse herramientas que permitan hacer inferencias mejor sustentadas sobre la estructura poblacional y la cantidad de variación genética en función de barreras y procesos geográficos (SAMOVA, MEM), o hipotetizar sobre estados anteriores de los tamaños poblacionales (skyline plots).

Por otra parte, será necesario el incremento en el número de marcadores moleculares o regiones (genes, genomas) susceptibles de ser analizados bajo los parámetros de variación, diversidad y diferenciación genética, ya que permitirán un mejor conocimiento de la variación genética y su fluctuación en función de los principales mecanismos evolutivos, así como de los eventos demográficos ocurridos en el pasado reciente que han modificado la dinámica poblacional de la especie en cuestión hasta lo reportado actualmente.

En particular, se deberá complementar el conjunto de datos de la región espaciadora de *cox2-3* con las secuencias faltantes (presentes en el conjunto de datos de la región espaciadora de RuBisCo), con el objetivo de homogeneizar la muestra en su totalidad y definir a qué grupo genético de la región espaciadora de *cox2-3* pertenecen las muestras correspondientes a *Tepoztequiella rhizoidea*.

Finalmente, debido al probable proceso de especiación simpátrica en la región, se deberá complementar el estudio con un análisis de las variables ambientales a las cuales están sujetas las poblaciones, tales como la temperatura, la salinidad y el pH, que efectivamente sugieran distintas condiciones ecológicas entre las localidades. De igual manera, estudios de ecofisiología podrían utilizarse para cuantificar la respuesta diferencial entre cada especie ante los estímulos ambientales.

12. REFERENCIAS

- Agardh, J. G. 1872. Bidrag till Florideernes systematik. *Lunds Universitets Års-Skrift, Afdelningen for Matematik och Naturvetenskap* 8: 1-60.
- Alberto, F., R. Santos, & J. Leitão. (1999). Assessing patterns of geographic dispersal of *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) through RAPD differentiation of populations. *Marine Ecology Progress Series* 191: 101-108.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andersson, I. & A. Backlund. 2008. Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 275-291. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.01.001
- Ardito, S. M., A. Senties & K. M. Dreckmann. 2014. Caracterización morfoanatómica de *Hydropuntia usneoides* (Gracilariaceae, Rhodophyta) para la costa venezolana. *Interciencia* 39(1): 49-53.
- Brodie, J. & J. Lewis. 2007. *Unravelling the algae: the past, present, and future of algal systematics*. CRC Press. Boca Raton, FL. Folio variado.
- Callejas-Jiménez, M. E., A. Senties & K. M. Dreckmann. 2005. Macroalgas bentónicas de Puerto Real, Faro Santa Rosalía y Playa Preciosa, Campeche, México, con algunas consideraciones florísticas y ecológicas para el estado. *Hidrobiológica* 15: 89-96.
- Carmona, J., M. A. Hernández & M. Ramírez. 2004. *Algas... glosario ilustrado*. Las Prensas de Ciencias. Coyoacán, CDMX. Folio variado.
- Casillas, S. & A. Barbadilla. 2017. Molecular Population Genetics. *Genetics* 205: 1003-1035. DOI: 10.1534/genetics.116.196493
- Chávez, N. 2006. *Glosario de Biotecnología*. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Ags. 88 p.
- Cheney, D. P. & G. R. Babbel. 1978. Biosystematic studies of the red algal genus *Eucheuma*. I. Electrophoretic variation among Florida populations. *Marine Biology* 47: 251. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00541003>
- Cheney, D. P. & C. J. Dawes. 1980. On the need for revision of the taxonomy of *Eucheuma* (Rhodophyta) in Florida and the Caribbean Sea. *Journal of Phycology* 16: 622-625. DOI: 10.1111/j.1529-8817.1980.tb03082.x

- Chiovitti, A., G. T. Kraft, A. Bacic & M. L. Liao. 2001. Gelling polysaccharides from Australian seaweeds: research and potential. *Marine and Freshwater Research* 52: 917-935. DOI: <https://doi.org/10.1071/MF01028>
- Clement, M., D. Posada & K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659. DOI:10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x
- Conklin, K. Y., D. C. O’Doherty & A.R. Sherwood. 2014. *Hydropuntia perplexa* comb. nov. (Gracilariaceae, Rhodophyta), the first record of the genus in Hawai’i. *Pacific Science* 68: 421–434. DOI: <http://dx.doi.org/10.2984/68.3.9>
- Crandall, K. A. & A. R. Templeton. 1993. Empirical Tests of Some Predictions From Coalescent Theory With Applications to Intraspecific Phylogeny Reconstruction. *Genetics* 134:959-969.
- Crane, H. 2016. The ubiquitous Ewens sampling formula. *Statistical science* 31: 1-19. DOI: 10.1214/15-STS529
- Darriba, D, G. L. Taboada, R. Doallo & D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9 (8): 772. DOI: 10.1038/nmeth.2109
- Destombe, C., M. Valero & M. L. Guillemin. 2010. Delineation of two sibling red algal species, *Gracilaria gracilis* and *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta), using multiple DNA markers: resurrection of the species *G. dura* previously described in the northern Atlantic 200 years ago. *Journal of Phycology* 46: 720-727. DOI:10.1111/j.1529-8817.2010.00846.x
- Díaz-Larrea, J., A. Senties, M. L. Núñez-Resendiz, M. L. López-Valdez & K. M. Dreckmann. 2015. La genética de poblaciones como herramienta útil en diversos estudios de macroalgas marinas. *Cymbella* 1: 2-11.
- Diniz-Filho, J., T. Soares, J. Lima, R. Dobrovolski, V. Landeiro, M. Pires de Campos, T. Rangel & L. Bini. 2013. Mantel test in population genetics. *Genetics and Molecular Biology* 36: 475-485
- Dreckmann, K. M. & A. Senties. 2013. Las arribazones de algas marinas en el Caribe mexicano, evento biológico natural o basura en las playas. *Biodiversitas* 107: 7-11. ISSN: 1870-1760.
- Editorial Board. 2012. *Concise Dictionary of Science*. V&S Publishers. Daryaganj, New Delhi. Folio variado.
- Eguiarte, L. E., V. Souza & X. Aguirre. 2007. *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología. Ciudad de México, CDMX. Folio variado.
- Endler, J. 1977. *Geographic variation, speciation, and clines*. Princeton University Press. Princeton, NJ. Folio variado.

- Eriksen, R. L., L. A. Green & A. S. Klein. Genetic variation within and among asexual populations of *Porphyra umbilicalis* Kützinger (Bangiales, Rhodophyta) in the Gulf of Maine, USA. *Botanica Marina* 59: 1–12. DOI: <https://dx.doi.org/10.1515/bot-2015-0017>
- Excoffier, L., P. E. Smouse & J. M. Quattro. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics* 131: 479-491.
- Faye, E. J., S. Shimada, K. Kogame & M. Masuda. 2004. A new red algal species *Meristotheca dakarensis* (Solieriaceae, Gigartinales) from Senegal, western Africa, with comments on the relegation of *Meristiella* Cheny to synonymy with *Meristotheca* J. Agardh. *Cryptogamie, Algologie* 25: 241-259.
- Faye, E. J., S. Shimada, S. Kawaguchi & M. Masuda. 2005. Characterization of the edible red alga *Meristotheca papulosa* (Solieriaceae, Gigartinales) from Japan. *Phycological Research* 53: 234-245. DOI: 10.1111/j.1440-183.2005.00391.x
- Faye, E. J., K. Kogame, S. Shimada, S. Kawaguchi & M. Masuda. 2007. Taxonomic features of the red alga *Meristotheca coacta* (Solieriaceae, Gigartinales). *Phycological Research* 55: 150-158. DOI: 10.1111/j.1440-1835.2007.00458.x
- Faye, E. J., K. Kogame, S. Shimada, S. Kawaguchi & M. Masuda. 2008. New red alga *Meristotheca imbricata* (Solieriaceae, Gigartinales) from Japan. *Phycological Research* 56: 115-126. DOI: 10.1111/j.1440-1835.2008.00492.x
- Fitzpatrick, B. M., J. A. Fordyce & S. Gavrillets. 2008. What, if anything, is sympatric speciation? *Journal of Evolutionary Biology* 21: 1452-1459. DOI: 10.1111/j.1420-9101.2008.01611.x
- Flanagan, N. S., R. Peakall, M. A. Clements & J. T. Otero. 2006. Conservation of taxonomically difficult species: the case of the Australian orchid, *Microtis angusii*. *Conservation Genetics* 7:847–859. DOI: 10.1007/s10592-006-9119-8
- Fredericq, S., D. Freshwater & M. Hommersand. 1999. Observations on the phylogenetic systematics and biogeography of the Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta) inferred from *rbcL* sequences and morphological evidence. *Hydrobiologia* 398/399: 25–38. DOI: doi.org/10.1023/A:1017077831840
- Freile-Pelegrin, Y. & D. Robledo. 2006. Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Yucatán, Mexico. II. Seasonal variations in carrageenan and biochemical characteristics. *Botanica Marina* 49: 72-78. DOI: <https://doi.org/10.1515/BOT.2006.009>

- Freile-Pelegri, Y. & D. Robledo. 2008. Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Nicaragua. *Journal of Applied Phycology* 20: 87-91. DOI: 10.1007/s10811-007-9270-8
- Freile-Pelegri, Y., D. Robledo & J. A. Azamar. 2006. Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Yucatán, Mexico. I. Effect of extraction conditions. *Botanica Marina* 49: 65-71. DOI: <https://doi.org/10.1515/BOT.2006.008>
- Frey, W. 2017. *Syllabus of Plant Families. A. Engler's Syllabus der Pflanzenfamilien Part 2/2: Photoautotrophic eukaryotic Algae. Rhodophyta*. 13th edition. Borntraeger Science Publishers. Johannesstrabe, Stuttgart. pp 125-126.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Fu, Y. X. & W. H. Li. 1993. Statistical Tests of Neutrality of Mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Gabrielson, P. W. & D. P. Cheney. 1987. Morphology and taxonomy of *Meristiella* gen nov. (Solieriaceae, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 23: 481-493.
- García-Rodríguez, L. D., R. Riosmena-Rodríguez, S. Y. Kim, M. Lopez-Meyer, J. J. M. Lopez-Vivas & S. M. Boo. 2013. Recent introduction of *Gracilaria parvispora* (Gracilariales, Rhodophyta) in Baja California, Mexico. *Botanica Marina* 56: 143-150.
- Goff, L. J., D. A. Moon & A. W. Coleman. 1994. Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *Journal of Phycology* 30: 521-537. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1994.00521.x
- Grant, W. A. S. & Bowen, B. W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89: 415-426. DOI: <https://doi.org/10.1093/jhered/89.5.415>
- Graur, D. & W. Li. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Second Edition. Sinauer Associates Inc., Publishers. Sunderland, MASS. 481 p.
- Guillemin, M. L., S. A. Akki, T. Givernaud, A. Mouradi, M. Valero & C. Destombe. 2008. Molecular characterization and development of rapid molecular methods to identify species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco. *Aquatic Botany* 89: 324–330. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2008.03.008>

- Guillemin, M. L., M. Valero, S. Faugeron, W. Nelson & C. Destombe 2014. Tracing the trans-Pacific evolutionary history of a domesticated seaweed (*Gracilaria chilensis*) with archaeological and genetic data. *PLoS ONE* 9 (12): e114039. DOI:10.1371/journal.pone.0114039
- Guindon, S. & O. Gascuel. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704. DOI: 10.1080/10635150390235520
- Guiry, M. D. & G. M. Guiry. 2018. *Meristotheca cylindrica* M.L. Núñez-Resendiz, Dreckmann & Senties. Available online at: http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=Cf907ce514ef6ecad (retrieved January 19th, 2018).
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium* 41: 95–98.
- Hamilton, M. B. 2009. *Population Genetics*. Wiley-Blackwell. Oxford, Ofc. Folio variado.
- Hartl, D. L. & A. G. Clark. 2007. *Principles of Population Genetics*. 4th Edition. Sinauer Associates. Sunderland, MASS. Folio variado.
- Hedrick, P. 2011. *Genetics of populations*. 4th Edition. Jones & Bartlett Publishers. Sudbury, MASS. Folio variado.
- Hudson, R. R., M. Slatkin & W. P. Maddison. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132:583-589.
- Huelsenbeck, J. P. & F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Kartavtsev, Y. 2015. *Molecular Evolution and Population Genetics for Marine Biologists*. CRC Press. Boca Raton, FL. Folio variado.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary Rate at the Molecular Level. *Nature* 217: 624–626. DOI: DOI:10.1038/217624a0
- Kimura, M. 1969. The Number of Heterozygous Nucleotide Sites Maintained in a Finite Population Due to Steady Flux of Mutations. *Genetics* 61: 893–903.
- Koolman, J. & K. H. Roehm. 2005. *Color Atlas of Biochemistry*. 2nd Edition. Thieme. Stuttgart, BW. Folio variado.

- Kostrzewa, M., K. Valentin, U. Maid, R. Radetzky & K. Zetsche. 1990. Structure of the rubisco operon from the multicellular red alga *Antithamnion spec.* *Current Genetics* 5:465-469.
- Lara-Lara, J. R., V. Arenas, C. Bazán, V. Díaz, E. Escobar, M. García, G. Gaxiola, G. Robles, R. Sosa, L. A. Soto, M. Tapia & J. E. Valdez-Holguín. 2008. Los ecosistemas marinos. *In: CONABIO. Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad.* Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, pp 135-159.
- León-Álvarez, D., N. A. López-Gómez, M. E. Ponce-Márquez, M. L. Núñez-Resendiz, C. Candelaria-Silva, A. Cruz-Rodríguez & D. Rodríguez-Vargas. 2017. *Géneros de algas marinas tropicales de México. Algas rojas.* Las Prensas de Ciencias. Coyoacán, CDMX. Folio variado.
- Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Li, W. H. 1997. *Molecular Evolution.* Sinauer Publishers, MASS. Folio variado.
- López-Rosas, H., P. Moreno-Casasola, D. Infante, I. Espejel, O. Jiménez-Orocio, N. Rodríguez-Revelo, M. L. Martínez, V. E. Espejel & R. Monroy. 2014. Diagnóstico por estado: Campeche. *In: Martínez, M. L., P. Moreno-Casasola, I. Espejel, O. Jiménez-Orocio, D. Infante, N. Rodríguez Revelo. Diagnóstico de las Dunas Costeras de México.* Inecol. México, pp. 169-180.
- Maggs, C. A., S. E. Douglas, J. Fenety & C. J. Bird. 1992. A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *Journal of Phycology* 28: 214-232. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1992.00214.x
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209–220.
- Mateo-Cid, L. E., A. C. Mendoza-González, A. G. Ávila-Ortiz & S. Díaz. Algas marinas bentónicas del litoral de Campeche, México. *Acta Botanica Mexicana* 104: 53-92.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist.* Columbia University Press. Columbia, NY. Folio variado.
- Milne I., F. Wright, G. Rowe, D. Marshal, D. Husmeier & G. McGuire. 2004. TOPALi: Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments. *Bioinformatics* 20 (11): 1806-1807. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth155

- Morrone, J. J. & T. Escalante. 2012. *Diccionario de biogeografía*. Las Prensas de Ciencias. Coyoacán, CDMX. Folio variado.
- Morrone, J. J. 2013. *Sistemática. Fundamentos, métodos, aplicaciones*. Las Prensas de Ciencias. Coyoacán, CDMX. Folio variado.
- Muangmai, N., I. C. Fraser & G. C. Zuccarello. 2015. Contrasting patterns of population structure and demographic history in cryptic species of *Bostrychia intricata* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from New Zealand. *Journal of Phycology* 51: 574–585. DOI: 10.1111/jpy.12305
- Nature Scitable. 2014. *Glossary*. Available online at: <https://www.nature.com/scitable/glossary> (retrieved October 30th 2017).
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. Columbia, NY. Folio variado.
- Nei, M. & W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76: 5269-5273. DOI: 10.1073/pnas.76.10.5269
- Nei, M. & F. Tajima. 1981. DNA Polymorphism Detectable by Restriction Endonucleases. *Genetics* 97: 145-163.
- Núñez-Resendiz, M. L. 2015. Variación genética de las poblaciones de *Hydropuntia cornea* (Gracilariaceae, Rhodophyta) en las costas del Golfo de México y el Caribe mexicano. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM, México. 163 p.
- Núñez-Resendiz, M. L., K. M. Dreckmann, A. Senties, J. Díaz-Larrea & G. C. Zuccarello. 2015. Genetically recognizable but not morphologically: The cryptic nature of *Hydropuntia cornea* and *H. usneoides* (Gracilariales, Rhodophyta) in the Yucatan Peninsula. *Phycologia* 54: 407-416. DOI: <http://dx.doi.org/10.2216/15-009.1>
- Núñez-Resendiz, M. L., G. C. Zuccarello, K. M. Dreckmann & A. Senties. 2016. Phylogeography of *Hydropuntia cornea*/*H. usneoides* complex (Gracilariales, Rhodophyta) in the Yucatan Peninsula. *Phycologia* 55: 522-531.
- Núñez-Resendiz, M. L., K. M. Dreckmann & A. Senties. 2017a. *Meristotheca cylindrica* sp. nov. (Solieriaceae, Rhodophyta) from the southern Gulf of Mexico. *Phycologia* 56 (4): 423-429. DOI: <http://dx.doi.org/10.2216/16-116.1>

- Núñez-Resendiz, M. L., A. Senties, K. M. Dreckmann & H. León-Tejera. 2017b. Biodiversidad de Solieriaceae (Gigartinales, Rhodophyta) en México. *Cymbella* 3: 21-31.
- Núñez-Resendiz, M. L., K. M. Dreckmann, A. Senties, G. C. Zucarello & H. León-Tejera. 2017c. *Tepoztequiella rhizoidea* gen. et sp. nov. (Solieriaceae, Rhodophyta) from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phycologia* 57: 90–99. DOI: <http://dx.doi.org/10.2216/17-60.1>
- Ortega, M., J. Godínez-Ortega & G. Garduño. 2001. *Catálogo de algas bénticas de las costas mexicanas del Golfo de México y Mar Caribe*. Cuadernos del IBUNAM no. 34. UNAM, CONABIO.
- Ortiz-Pérez, M. A, & G. de la Lanza-Espino. 2006. *Diferenciación del espacio costero de México, un inventario regional*. Instituto de Geografía, UNAM. Coyoacán, CDMX. Folio variado.
- Pacheco-Cervera, M. C., I. Pacheco-Ruíz, J. Ramos-Miranda, N. P. Cetz-Navarro & J. L. Soto-Ávila. 2009. Presencia del género *Caulerpa* en la Bahía de Campeche, Camp. *Hidrobiológica* 20: 57-69.
- Palma Ortiz, C. A., K. M. Dreckmann, M. L. Núñez-Resendiz & A. Senties. 2017. Variación genética en *Meristotheca cylindrica* (Solieriaceae, Rhodophyta) en Campeche, México. *Hidrobiológica* 27: 315-326. DOI:
- Pareek, M., A. Mishra & B. Jha. 2010. Molecular phylogeny of *Gracilaria* species inferred from molecular markers belonging to three different genomes. *Journal of Phycology* 46: 1322-1328. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2010.00903.x
- Peakall, R. & P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Peakall, R. & P. E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Peakall, R., P. E. Smouse & D.R. Huff. 1995. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloë dactyloides*. *Molecular Ecology* 4: 135-148. DOI:10.1111/j.1365-294X.1995.tb00203.x
- Ramírez-Soriano, A., S. E. Ramos-Onsins, J. Rozas, F. Calafell & A. Navarr. Statistical Power Analysis of Neutrality Tests Under Demographic Expansions, Contractions and Bottlenecks With Recombination. *Genetics* 179: 555-567. DOI: 10.1534/genetics.107.083006
- Slatkin, M. & R. R. Hudson. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.

- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313. DOI: doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033
- StatSoft Inc. 2007. STATISTICA (data analysis software system) version 8.0. www.statsoft.com
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tajima, F. 1993. Statistical analysis of DNA polymorphism. *The Japanese Journal of Genetics* 68: 567-595.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12):2725-2729. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Templeton, A. R., K. A. Crandall & C. F. Sing. 1992. A Cladistic Analysis of Phenotypic Associations With Haplotypes Inferred From Restriction Endonuclease Mapping and DNA Sequence Data. III. Cladogram Estimation. *Genetics* 132: 619–633.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- Thormann., B., D. Ahrens, D. Marín, M. K. Peters, T. Wagner & J. W. Wägele. 2016. Exploring the Leaf Beetle Fauna (Coleoptera: Chrysomelidae) of an Ecuadorian Mountain Forest Using DNA Barcoding. *PLoS ONE* 11:1-21. DOI:10.1371/journal.pone.0148268
- Villalobos-Zapata, G. J. & J. Mendoza (Coord.). 2010. *La Biodiversidad en Campeche: Estudio de Estado*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Gobierno del Estado de Campeche, Universidad Autónoma de Campeche, El Colegio de la Frontera Sur. México, 730 p.
- Watt, N. J., A. Chiovitti, D. J. Craik & G. T. Kraft. 2003. The cell wall galactans from Australian representatives of the genus *Meristotheca* (Solieriaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 42: 572–581. DOI: <http://dx.doi.org/10.2216/i0031-8884-42-6-572.1>
- Watterson, G. A. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* 7: 256-276. DOI: doi.org/10.1016/0040-5809(75)90020-9
- West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press. Oxford, Ofc. 794 p.

- Wood, A. R. & J. P. Gardner. 2007. Small spatial scale population genetic structure in two limpet species endemic to the Kermadec Islands, New Zealand. *Marine Ecology Progress Series* 349: 159-170. DOI: 10.3354/meps07110
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354. DOI: 10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x
- Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations: A Treatise. Vol. 4: Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press. Chicago, IL. Folio variado.
- Wynne, M. 2017. *A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical Western Atlantic: fourth revision*. Borntraeger Science Publishers. Science Publishers. Johannesstrabe, Stuttgart. Folio variado.
- Yang, E. C., M. S. Kim, P. J. Geraldino, D. Sahoo, J. A. Shin & S. M. Boo. 2008. Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20: 161-168. DOI: 10.1007/s10811-007-9201-8
- Yang, E. C. & S. K. Myung. 2015. Molecular analyses for identification of the Gracilariaceae (Rhodophyta) from the Asia–Pacific region. *Genes & Genomics* 37: 775–787. DOI: 10.1007/s13258-015-0306-1
- Yow, Y. Y., P. E. Lim & S. M. Phang. 2011. Genetic diversity of *Gracilaria changii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from west coast, Peninsular Malaysia based on mitochondrial *cox1* gene analysis. *Journal of Applied Phycology* 23: 219-226. DOI: 10.1007/s10811-010-9535-5
- Yow, Y. Y., P. E. Lim & S. M. Phang. 2013. Assessing the use of mitochondrial *cox1* gene and *cox2-3* spacer for genetic diversity study of Malaysian *Gracilaria changii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Peninsular Malaysia. *Journal of Applied Phycology* 25: 831. DOI: 10.1007/s10811-012-9942-x
- Zuccarello, G. C., G. Burger, J. A. West & R. J. King. 1999a. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443–1447. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1999.00710.x
- Zuccarello, G., J. A. West, M. Kamiya & R. J. King. 1999b. A rapid method to score plastid haplotypes in red seaweeds and its use in determining parental inheritance of plastids in the red alga *Bostrychia* (Ceramiales). *Hydrobiologia* 401: 207–214.
- Zuccarello, G. C., N. Schidlo, L. Mcivor & M. D. Guiry. 2005. A molecular re-examination of speciation in the intertidal red alga *Mastocarpus stellatus* (Gigartinales, Rhodophyta) in Europe. *European Journal of Phycology* 40: 337-344. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09670260500254743>

Zuccarello, G. C., A. T. Critchley, J. Smith, V. Sieber, G. B. Lhonneur & J. West. 2006. Systematics and genetic variation in commercial shape *Kappaphycus* and shape *Eucheuma* (Solieriaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 18: 643-651. DOI: 10.1007/s10811-006-9066-2

13. AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo de tesis se realizó con el financiamiento de los proyectos UAMI, Consejo de la División C.B.S. (Sesión 15.14-131014), y Secretaría de Educación Pública – PROMEP (UAMI-CA-117) por parte del Laboratorio de Macroalgas Marinas y Salobres, departamento de Hidrobiología, de la Universidad Autónoma Metropolitana sede Iztapalapa.

El material biológico examinado forma parte de la colección de algas del Laboratorio de Macroalgas Marinas y Salobres del Departamento de Hidrobiología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa, el cual fue proporcionado atentamente por los doctores Abel Sentíes Granados y Kurt M. Dreckmann Estay, responsables del laboratorio.

El trabajo molecular se llevó a cabo con la infraestructura del Laboratorio Especializado de Ficología Molecular del área de Ficología Comparada, Departamento de Hidrobiología, División Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM sede Iztapalapa. La supervisión y asesoramiento de las técnicas moleculares fue apoyado puntualmente por la Dra. María Luisa Núñez Resendiz y el M. en C. Óscar Eduardo Hernández Cervantes.

Los análisis filogenéticos y aquellos concernientes a la genética de poblaciones se realizaron con el apoyo de la Dra. María Luisa Núñez Resendiz. Se agradece a la M. en C. Isabel Vilchis por su ayuda en la realización de los análisis estadísticos y morfológicos.

14. ANEXOS

Anexo 1. Extracción de DNA y purificación; modificación a la técnica del fabricante con Kit: DNeasy Plant Minikit (QIAGEN).

Notas antes de comenzar:

- El kit de extracción DNeasy Plant Minikit puede ser almacenado a temperatura ambiente (15-25°C) por un año.
- Todos los pasos de centrifugación se llevarán a cabo a temperatura ambiente (15-25°C).
- Añadir etanol al 100% a los concentrados de amortiguador AW1 y AW2.
- Precalentar un termoblock a 65°C.
- Colocar los pistilos en un vaso de precipitados con solución de cloro.
- Colocar y etiquetar los tubos a utilizar por muestra (5): microtubo inicial, columna lila, microtubo de 1.5 mL, columna blanca, microtubo de 1.5 final.

1. Colocar tejidos en microtubos de 1.5 μ L; triturar con ayuda de un pistilo previamente enjuagado con agua desionizada.
2. Añadir 400 μ L del amortiguador AP1 y 4 μ L de RNAasa A. Mezclar en vórtex e incubar a 65°C durante 30 minutos. Invertir los tubos cada 10 minutos durante la incubación.

❖ **Una vez transcurrido este paso, el proceso puede ser detenido hasta 24 horas.*

❖ **Nota:** No mezclar amortiguador AP1 y RNAasa A antes de su uso.

3. Añadir 130 μ L del amortiguador P3. Mezclar en vórtex e incubar por 5 min. en el hielo.

❖ *Las muestras pueden ser incubadas en hielo hasta 8 horas.*

4. Centrifugar microtubos por 5 minutos a 14,000 rpm.
5. Extraer los lisados y colocarlos en la columna QIA shredder (lila). Centrifugar por 2 minutos a 13,000 rpm.
6. Transferir el líquido a un nuevo microtubo sin tocar el pellet. Añadir 1.5 volúmenes del amortiguador AW1 y mezclar por pipeteo.
7. Transferir 650 μ L de la mezcla a una columna DNeasy Minispin (transparente) colocada en un tubo colector de 2 μ L. Centrifugar por 1 min. a 8,000 rpm y desechar el líquido del fondo.

- ❖ Repetir el paso anterior añadiendo lo restante al filtro, si el volumen fue mayor a 650 μL .
 - ❖ De preferencia conservar las puntas utilizadas en su tubo correspondiente.
8. Colocar la columna en un nuevo tubo colector y añadir 500 μL del amortiguador AW2. Centrifugar por 1 minuto a 8,000 rpm. Desechar el líquido y reutilizar el tubo.
 9. Añadir nuevamente 500 μL del amortiguador AW2. Se harán dos centrifugaciones sucesivas: a) por 1 minuto a 8000 rpm; b) por 2 minutos a 13,000 rpm.
 10. Transferir la columna al microtubo final etiquetado. Evitar contacto con el sobrenadante.
 11. Añadir 100 μL del amortiguador AE precalentado a $\sim 60^\circ\text{C}$ en termoblock e incubar a temperatura ambiente por 30 minutos. Centrifugar por 1 minuto a 8,000 rpm.

Anexo 2. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% para productos de PCR.

a) Cámara grande (32 pozos).

1. Pesar 0.8 g de agarosa en la balanza electrónica.
2. Verter 50 mL de amortiguador **TBE 0.5X** en una probeta.
3. Preparar la placa de la cámara de electroforesis al colocar cinta papel en los bordes, lo que evitará que se desborde el amortiguador.
4. En un matraz de 50 mL, agregar la agarosa y el amortiguador; mezclar suavemente.
5. Colocar el matraz en el microondas por lapsos de 20 segundos; agitar y mezclar entre periodos.
6. Finalizar el calentado una vez que la mezcla se torne transparente, antes de ebullición.
7. Colocar 0.45 μL de GelRed al sacar el matraz; agitar.
8. Verter la mezcla caliente en la placa previamente sellada; colocar peines y dejar reposar.
9. Una vez solidificado el gel, colocar la placa dentro de la cámara de electroforesis y verter TBE 0.5X hasta donde indica la flecha.
10. Colocar 1 μL de amortiguador de carga y 4 μL de producto de PCR en un pedazo de parafilm y mezclar.
11. Con puntas estériles, colocar la muestra dentro de los pozos del gel de agarosa; colocar 2 μL de marcador de peso molecular en el primer pozo de cada fila.

12. Conectar adecuadamente los cables de la cámara de electroforesis, según su color, en la estación de carga.
13. Programar a 100 V y 400 mA durante 23 minutos.
14. Una vez que haya terminado la muestra, transferir el gel al transiluminador; observar y fotodocumentar los resultados.

b) Cámara pequeña (16 pozos).

1. Pesar 0.4 g de agarosa en la balanza electrónica.
2. Verter 25 mL de amortiguador TBE 0.5X en una probeta.
3. Preparar la placa de electroforesis con cinta papel en los bordes.
4. En un matraz de 50 mL, agregar la agarosa y el amortiguador; mezclar suavemente.

*Los siguientes pasos serán los mismos que los descritos para la cámara grande.

Anexo 3. Purificación de amplificaciones (PCR); modificación a la técnica del fabricante con Kit: PCR Purification kit (QIAGEN).

Antes de comenzar:

- Añadir etanol (96-100%) al amortiguador PE antes de utilizarlo (revisar el volumen en el envase).
 - Amortiguador EB: 10 mM Tris-Cl, pH 8.5.
 - Etiquetar una columna QIAquick y un tubo eppendorf de 1.5 mL por muestra.
1. Añadir 5 volúmenes de amortiguador PB a 1 volumen de muestra de PCR y mezclar en el tubo hasta homogenizar (eliminar consistencia aceitosa). No es necesario remover aceites minerales ni queroseno.
 2. Verter la mezcla en la columna QIAquick (lila) y centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.
 3. Eliminar el filtrado. Colocar la columna de regreso en el tubo colector.
 4. Añadir 750 μ L de amortiguador PE a la columna QIAquick y centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.

5. Desechar el filtrado y colocar la columna en el mismo tubo colector. Centrifugar a 13000 rpm por 1 minuto.

Nota: Repetir este paso.

6. Colocar columna en microtubo nuevo y etiquetado, añadir 30 µL de amortiguador EB o agua al centro de la columna QIAquick.
7. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y centrifugar a 8000 rpm por 1 minuto.

Nota: El amortiguador utilizado para la elución debe ser vertido directamente sobre la membrana QIAquick para una elución completa del DNA.

8. Almacenar a -20°C.

La eficiencia de la elución depende del pH. La elución máxima se alcanza entre pH 7.0 y 8.5. Cuando se use agua, asegúrese de que su pH se ubique en tal intervalo y almacenar el DNA a -20°C ya que el DNA puede degradarse en ausencia de amortiguador. El DNA purificado también puede ser eluido en amortiguador TE (10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 8.0); sin embargo, considere que el EDTA puede inhibir reacciones enzimáticas subsecuentes.

Anexo 4. Conjunto de secuencias del espaciador de RuBisCo utilizadas en los análisis moleculares. Las secuencias de *Meristotheca cylindrica* obtenidas en el presente estudio presentan el prefijo Mc en conjunto con el número de haplotipo (solo secuencias representativas), localidad, número de muestra, oligonucleótido empleado y el número de acceso de GenBank (solo secuencias representativas); las abreviaturas de cada localidad se detallan en la Tabla 4. Las secuencias restantes, pertenecientes a géneros de Solieriaceae y al grupo externo (*Hydropuntia cornea*), contienen el nombre de la especie, localidad y número de acceso de GenBank.

>Hydropuntia cornea Mexico_KT026289

```
GTTAATTATTTTAAACAGATACAAAAATATTAAGGAGTATTTATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTCTCTTT
CCTTCCAGACATGACAGATGATCAAATTAATAACAGATTCAATATGCTATTTTACAAAATTGGTCTATTAGTATT
GAATATAACCGAAGATCCACATCCGCGTAATAATT
```

>R1_McIA_E10_spacerF_KY979260

```
ATTAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT
```

>R2_McIA_E20_spacerF_KY979261

```
ATTAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCAATAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT
```

>McIA_E26_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCAATAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT

>McIA_E32_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McIA_E51_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McIA_E59_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McIA_E73_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McIA_E74_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McIA_E93_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McIA_E105_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McPX_E11_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCAATAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT

>McPX_E41_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McPX_E82_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCAATAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT

>McIC_H44_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McIC_H45_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McIC_H46_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McIC_E3_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McIC_E44_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McIC_E54_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McPB_E1_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>R4_McPB_H70_spacerF_KY979263

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGACTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McPB_E75_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McPB_H42_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McPB_H49_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McPB_H51_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McPB_H52_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McPB_H53_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McS_E2_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McS_E13_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McS_E14_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McS_E18_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCAATAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT

>McS_E28_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McS_E38_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCANCCAAGAAATAGTT

>McS_E58_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>McS_E65_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCAATAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT

>McS_E104_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCGCACCCAAGAAATAGTT

>R3_McBT_92-12_spacerF_KY979262

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACCTATTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCAATAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT

>McBT_92-16_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCAATAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT

>McBT_92-13_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCAATAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT

>McBT_92-15_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCAATAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT

>McBT_93-1_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCAATAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT

>McBT_93-2_spacerF

ATTAAAGATCTTATACAATTGCTTAACTATTTAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACCTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATCAATAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAAATTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT

>Kappaphycus alvarezii Philippines_AF489866

ATTAAAAATCTTATACCATTGTTTAACTATCAAAGGAGTATATATAGTGAGACTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGACCAAATTAATAACAGATTAATACTACGCCATATCTCAAACTGGGCTATTAATAT
AGAATTTACTGAGGATCCTCATCCAAGAAATAGTT

>Eucheuma denticulata Indonesia_AY687412

ATTAAAAATCTTATATAATTGTTTAACTATCAAAGGAGTATATATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATTC
CTACCAGATTTAACTGACGACCAAATTAATAACAGATTAATTACGCCGTATCTCAAACTGGGCTATCAATATA
GAATTTACTGAAGACCCACATCCAAGAAATAGTT

>K. inermis Philippines_KF687989

ATTAAAAATCTTATACCATTGTTTAACTATCAAAGGAGTATATATAGTGAGACTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGACCAAATCACTAAACAGATTAATACTACGCCATATCTCAAACTGGGCTATTAATAT
AGAATTTACTGAGGATCCTCATCCAAGAAATAGTT

>K. cottonii Phillipines_AF489869

ATTAAAAATCTTATACAATTGTTTAACTATCAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGACCAAATCACTAAACAAATTAATACTACGCCATATCTCAAACTGGGCTATTAATAT
AGAATTTACTGAGGATCCTCATCCAAGAAATAGTT

>E. platycladum Tanzania_AY687406

ATGAAAAATCTTATATAATTGTTTAACTATAAAAGGAGTATACATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGACCAAATCACTAAACAGATTAATTATGCCGTATCTCAAAATGGGCTATTAATAT
AGAATTTACTGAGGACCCACATCCAAGAAACAGTT

>E. isiforme USA_AY687403

ATTAAAAGTCTTATACAATTGTTTAACTATAAAAGGAGTATATATAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGACCAAATCACTAAACAAATTAATTACGCAATATCTCAAACTGGGCAATTAATAT
AGAATTTACTGAAGACCCCTCNNNNNNNNNNNNNNNNNN

>K. striatus Philippines_AY687416

ATTAAAAATCTTATACCATTGTTTAACTATCAAAGGAGTATATATAGTGAGACTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGACCAAATTAATAACAGATTAATACTATGCCATATCTCAAACTGGGCTATTAATAT
AGAATTTACTGAGGATCCTCATCCAAGAAATAGTT

>Betaphycus philippinensis Philippines_AY687400

GTAAAAATCTTATATAATTGTTTAACTATCAAAGGAGTATACACAGTGAGATTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGACCAAATCACTAAACAGATCAATTACGCTATATCTCAAAATGGGCTATTAATAT
AGAATTTACTGAAGATCCTCATCCAAGAAACAGTT

>K. malesianus Malaysia_JN663753

ATTAAAAATCTTATACCATTGTTTAACTATCAAAGGAGTATATATAGTGAGACTAACACAAGGAACTTTTTTCATT
CCTACCAGATTTAACTGACGACCAAATCACTAAACAGATTAATACTACGCCATATCTCAAACTGGGCTATTAATAT
AGAATTTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

>B. gelatinus China_JN854276

GTAAAAATCTTATATAATTGTTTAACTATCAAAGGAGTATACACAGTGAGACTAACACAAGGGCGGCCGCAAC
ACANN
NN

Anexo 5. Conjunto de secuencias del espaciador de *cox2-3* utilizadas en los análisis moleculares. Las secuencias de *Meristotheca cylindrica* obtenidas en el presente estudio presentan el prefijo Mc en conjunto con el número de haplotipo (solo secuencias representativas), localidad, número de muestra, oligonucleótido empleado y número de acceso de GenBank (solo secuencias representativas); las abreviaturas de cada localidad se detallan en la Tabla 4. Las secuencias restantes, pertenecientes a géneros de Solieriaceae y al grupo externo (*Hydropuntia cornea*), contienen el nombre de la especie, localidad y número de acceso de GenBank.

>Hydropuntia cornea Mexico_KT005941

```
CTGTAAAATTACCTAATTATATTTCTTGAATTTCTGAATAAACTAAACGAGTAAAGTAATGCGATTTTCCTTGTCAC
AAATAATCGTATTGCTTTTAAATATTTTAAATCTCTTTTCTTCAAATTTTGCAATAGCAAGAAAATTAATGAATTA
ATGAATCAATTTTAAATAATTTTAAATAAATATGATNTTACTTATCAAAAATA
```

>C1_McIA_E10_cox2for_KY979264

```
CCGTATCTTTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTCA
ATTTATATTAATAATTATATTTTATAATACTTTTCAAATCAAATTTTGTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTAAATAATTTAGATAAATAAATAATGACATCTTTTATCCAAGTCT
```

>C2_McIA_E20_cox2for_KY979265

```
CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGGATTTCTAATAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTTCATTTTTAC
AGTTTATATTAATAATTATATTTTACGATACTTTTAAATCAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTAAATAAATAAATAATGACATCTATTATCCAATTT
```

>C3_McIA_E26_cox2for_KY979266

```
CCGTATCTTTGCCTGATTATATAAATTGGATTTCTAATAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTTCATTTTTAC
AGTTTATATTAATAATTATATTTTACGATACTTTTAAATCAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTAAATAAATAAATAATGACATCTATTATCCAATTT
```

>McIA_E32_cox2for

```
CCGTATCTTTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTCA
ATTTATATTAATAATTATATTTTATAATACTTTTCAAATCAAATTTTGTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTAAATAATTTAGATAAATAAATAATGACATCTTTTATCCAAGTCT
```

>McIA_E51_cox2for

```
CCGTATCTTTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTCA
ATTTATATTAATAATTATATTTTATAATACTTTTCAAATCAAATTTTGTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTAAATAATTTAGATAAATAAATAATGACATCTTTTATCCAAGTCT
```

>McIA_E59_cox2for

```
CCGTATCTTTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTCA
ATTTATATTAATAATTATATTTTATAATACTTTTCAAATCAAATTTTGTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTAAATAATTTAGATAAATAAATAATGACATCTTTTATCCAAGTCT
```

>McIA_E73_cox2for

CCGTATCTTTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTCA
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAAAATTTTGTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>C4_McIA_E74_cox2for_KY979267

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGAATTTCTAATAAATTAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTCA
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATCAAACCTTTTCAAATCAAAAATTTTGTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>C5_McIA_E93_cox2for_KY979268

CCGTATCTTTACCTAATTATATAAATTGAATTTCTAAGAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTTC
AATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAAAATTTTGTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTT
TTATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>McIA_E105_cox2for

CCGTATCTTTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTCA
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAAAATTTTGTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>C6_McPX_E34_cox2for_KY979269

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGAATTTCTAATAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGATTATATTACTACTTATTATTTTCACGATACTTTTTAAATCAAAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McPX_E41_cox2for

CCGTATCTTTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTCA
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAAAATTTTGTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>C7_McPX_E82_cox2for_KY979270

CCGTATCTTTGCCTGATTATATAAATTGGATTTCTAAGAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTCACGATACTTTTTAAATCAAAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McIC_H44_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATAAATTGGATTTCTAAGAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTCACGATACTTTTTAAATCAAAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McIC_H45_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATAAATTGGATTTCTAAGAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTCACGATACTTTTTAAATCAAAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McIC_H46_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATAAATTGGATTTCTAAGAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTCACGATACTTTTTAAATCAAAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McPB_H42_cox2for

CCGTATCTTTACCTAATTATATAAAATTGAATTTCTAAGAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTC
AATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAAAATTTTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTT
TTATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>McPB_H49_cox2for

CCGTATCTTTACCTAATTATATAAAATTGAATTTCTAAGAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTC
AATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAAAATTTTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTT
TTATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>McPB_H51_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGAATTTCTAATAAAATTAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTC
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATCAAATCAAAAATTTTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>McPB_H52_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGAATTTCTAATAAAATTAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTC
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATCAAATCAAAAATTTTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>McPB_H53_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGAATTTCTAATAAAATTAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTC
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATCAAATCAAAAATTTTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>C8_McS_E2_cox2for_KY979271

CCGTATCTGTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAAAAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTC
AATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAAAATTTTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTT
TTATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>McS_E13_cox2for

CCGTATCTTTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTC
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAAAATTTTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>McS_E14_cox2for

CCGTATCTTTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTC
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAAAATTTTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>McS_E18_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGGATTTCTAATAAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTACGATACTTTTAAATCAAAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McS_E23_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGGATTTCTAATAAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTACGATACTTTTAAATCAAAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McS_E28_cox2for

CCGTATCTTTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTCA
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAATTTTTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>C9_McS_E58_cox2for_KY979272

CCGTATCTTTACCTGATTATATTAATTGGATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTCA
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAATTTTTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>McS_E65_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGGATTTCTAATAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTCACGATACTTTTTAAATCAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McS_E98_cox2for

CCGTATCTTTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTCA
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAATTTTTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>McS_E104_cox2for

CCGTATCTTTACCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAGTTAAACGAATAAATTCATGAAAATTTCTTTTTTTCA
ATTTATATTACTAATTATTATTTTTATAATACTTTTCAAATCAAATTTTTAGATAGTAAAAAATTGAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAAATGACATCTTTTATCCAAGTCT

>McBT_92-12_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGGATTTCTAATAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTCACGATACTTTTTAAATCAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McBT_92-16_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGGATTTCTAATAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTCACGATACTTTTTAAATCAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McBT_92-13_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGGATTTCTAATAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTCACGATACTTTTTAAATCAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McBT_92-15_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGGATTTCTAATAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTCACGATACTTTTTAAATCAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McBT_93-1_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGGATTTCTAATAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTTCAATTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTCACGATACTTTTTAAATCAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATTT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAATTT

>McBT_93-2_cox2for

CCGTATCTTTGCCTGATTATATTAATTGGATTTCTAATAAATTAACGAATAAATTTATGAAAATTCATTTTTAC
AGTTTATATTACTAATTATTATTTTCACGATACTTTTTAAATCAAAATCATTAGATAGTAAAGAATTAATAAATT
CCTATCTAGTTTTTTTTAAAAAATTAACAATAAAAAATGACATCTATTATCCAAATTT

>Eucheuma arnoldii Philippines_KX196458

CTGTATCTTTACCTAATTACATTAATTGACTTTCAAATAAATTAAGTGAATAACCTANTGAGAATTTTCATTTTTTC
AACTTATATTGTTAATTATTATTTTCATAGCCTTGTTTCGGTTCAAATTTTTAAACGGTAAAATTTTAAATAGATTT
CTATCTAATTTTTTTAAAAGACTAGAGAAGTAAANATGACGCCTCTCCTTAAAGTTT

>Kappaphycus sp. Philippines_KF687984

CTGTATCTTTACCTAACTATATTAACTGGATTTCGAATAAATTAAGCGAATAAATCTATGAGAATTTTCATTCTTTC
AATTCACGTTATTAGTTATTATTTTCATAGTTCTTTTTCAAATCTAATTTTCTGAGTAAGAAAACTTAAGTAAATTT
TTATCTGATTTTTCCAGAAAACCTGGGTAAATAAANATGACATCTCTCATCCAAATTT

>K. cottonii Philippines_AY687426

CCGTATCTTTACCTAACTATATTAACTGAATTTCGAATAAATTAAGCGAATAAATCTATGAGAATTTTCATTCTTTC
AATTTATATTATTAATTATTATCTTTGTAGCGCTTTTTCGATCAAAGCCTCTAAATAATAAAAATCTTGAATAAGTTT
TTATCTAATTTTTTACAAAAAACTAGATAAATAAAAATGACATCTCTTGTACAAAATTT

>E. isiforme USA_AY687420

CCGTACCTTTATCTAATTATATTAATTGAATTTCTAATAAATTAAGTGAATAAATTTATGAGAATTTTCATTTTTTCA
ATTTGTATTATTAGTTATCATTTTTTATAATATTATTCAGGTTAAAATTCCTAGATGGTAAAAAATTAATAAATTTT
TATCCAATTTTTTTAAAAAATTGGATAAATAAAAATGACATCTCTTATTCAAGTTT

>K. striatus Philippines_KT316654

CTGTAGCTTTACCTAACTATATTAACTGGATTTCGAATAAATTAAGCGAATAAATCTATGAGAATTTTCATTCTTTC
AATTCACGTTATTAGTTATTATTTTCATAGTTCTTTTTAAATCTAATTTTCCGAGTAATAAAAACTTAAGTAAATTT
TTATCTGATTTTTCCAAAAAACTGGGTAAATAAANATGACATCTTTCATTCAAATTT

>K. malessianus Malaysia_JX624080

CTGTATCTTTACCTAACTATATTAACTGGATTTCGAATAAATTAAGCGAATAAATCTATGAGAATTTTCATTTTTTC
AATTCACGTTATTAGTTATTGTTTTTCATAGTTCTTTTTCAAATCTAATTTTCTAAATAATAAAAACTTAAGTAAATTT
TTATCTGATTTTTCTAAAAAACTGGATAAATAAANATGATATCTCTCATCCAAATTT

>E. denticulatum var. Endong Indonesia_KC905455

CTGTGTCATTACCTAACTATATAAATTGAATTTCTAATAAATTAACGAATAAACTAATGAGAATTTTCATTTTTAC
AATTTATGCTTTTAGTTATTGTTTTGTAAATATTATCCGATTTAAATTTTCGGATAACAAAGTCTTAAATAAATTC
CTATCTAACTTCTTTAAAAAATTAGATAAATAAAAATGAAATCTTTCGTTCAAATTT

>K. inermis Philippines_KF687981

CTGTATCTTTACCTAACTATATTAACTGGATTTCGAATAAATTAAGCGAATAAATCTATGAGAATTTTCATTTTTTC
AATTCACGTTATTAGTTATTGTTTTTCATAGTTCTTTTTCAAATCTAATTTTCTAAATAATAAAAACTTAAGTAAATTT
TTATCTGATTTTTCTAAAAAACTGGATAAATAAANATGACATCTCTCATCCAAATTT

Anexo 6. Publicación en revista arbitrada.

Variación genética en *Meristotheca cylindrica* (Solieriaceae, Rhodophyta) en Campeche, MéxicoGenetic variation of *Meristotheca cylindrica* (Solieriaceae, Rhodophyta) in Campeche, MexicoCarlos Adán Palma Ortiz¹, Kurt M. Dreckmann², María Luisa Núñez Resendiz¹ y Abel Senties³¹Estudiante de la carrera de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A. P. 70-474, 04510, CDMX, México²Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UNAM), A. P. 70-520, 09340, Iztapalapa, México³Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A. P. 70-474, 04510, CDMX, México
e-mail: tochi.adan@protonmail.com

Recibido: 1 de junio de 2017.

Aceptado: 7 de noviembre de 2017.

Palma Ortiz C. A., K. M. Dreckmann, M. L. Núñez Resendiz y A. Senties. 2017. Variación genética en *Meristotheca cylindrica* (Solieriaceae, Rhodophyta) en Campeche, México. *Hidrobiología* 27 (3): 315-326.

RESUMEN

Antecedentes. *Meristotheca cylindrica* es un alga roja distribuida en las costas de Campeche, comúnmente mal identificada por el espectro de variación morfológica que exhibe en sus poblaciones. **Objetivos.** Se propuso evaluar la variación genética y su relación con la variación morfológica en las poblaciones de *M. cylindrica*, describir la posible estructura genética y su distribución haplotípica así como determinar posibles eventos de especiación. **Métodos.** Para 45 individuos de *M. cylindrica*, procedentes de cinco poblaciones de Campeche, se amplificaron vía PCR las regiones espaciadoras de *RubisCo* y de *cox2-3* con la finalidad de estimar medidas de diversidad, distancia y estructura genética. Adicionalmente, se realizaron análisis filogenéticos considerando secuencias de especies de la familia Solieriaceae provenientes del GenBank. A partir de 10 especímenes de herbario, se realizó un análisis múltiple de varianzas considerando 30 caracteres morfológicos. **Resultados.** La región espaciadora de *RubisCo* reveló cuatro haplotipos interconectados (R1-R4), así como parámetros moderados de diversidad genética ($Hd = 0.46458$, $s = 0.00785$). El análisis filogenético mostró un único grupo monofilético que incluyó a todos los haplotipos. La región espaciadora de *cox2-3* expuso nueve haplotipos (C1-C9) estructurados en los grupos G1 y G2, así como parámetros elevados de diversidad, diferenciación y distancia genética ($Hd = 0.81$, $s = 0.06476$, Φ_{PT} , $F_{ST} > 0.35$; $>10\%$ de diferencias). El análisis filogenético evidenció dos grupos monofiléticos congruentes con G1 y G2, mientras que el análisis de varianzas mostró homogeneidad morfológica entre las poblaciones. **Conclusiones.** Se sugiere un evento de especiación en curso para *M. cylindrica*.

Palabras clave: Diversidad genética, estructura genética, espaciador *cox2-3*, espaciador *RubisCo*, haplotipos.

ABSTRACT

Background. *Meristotheca cylindrica* is a red alga distributed in the Campeche coast, usually misidentified by the morphological variation spectrum exhibited in its populations. **Objectives.** We proposed to evaluate the genetic variation and its relationship with morphological variation in *M. cylindrica* populations, to describe the possible genetic structure and its haplotype distribution and to determine possible speciation events. **Methods.** We measured genetic variation, distances and structure of 45 individuals of *M. cylindrica* from five populations of Campeche, using DNA sequences of the spacer regions of *RubisCo* and *cox2-3*. Additionally, phylogenetic analyses were performed considering sequences of Solieriaceae species available in the GenBank. A statistical analysis covering 30 morphological characters was performed on 10 herbarium specimens. **Results.** The *RubisCo* spacer region revealed four interconnected haplotypes (R1-R4), as well as moderate genetic diversity parameters ($Hd = 0.46458$, $s = 0.00785$). Phylogenetic analysis showed a single monophyletic group that included all haplotypes. The *cox2-3* spacer region revealed nine haplotypes (C1-C9) structured in the G1 and G2 groups, as well as elevated parameters of genetic diversity, distances and differentiation ($Hd = 0.81$, $s = 0.06476$, $>10\%$ of differences; Φ_{PT} and $F_{ST} > 0.35$). Phylogenetic analysis showed two monophyletic groups congruent with G1 and G2. Analysis of variance showed morphological homogeneity among populations. **Conclusions.** Findings suggest a speciation event is currently occurring in *M. cylindrica*.

Key words: *cox2-3* spacer, genetic structure, genetic diversity, haplotypes, *RubisCo* spacer.

INTRODUCCIÓN

La diversidad genética es el componente fundamental detrás de la diversidad biológica, por lo que su estudio provee importantes pistas acerca de los mecanismos que moldean la variación genética, sus patrones, niveles e historia evolutiva de un taxón (Condon et al. 2014; Guilemo et al. 2014; Muangmai et al. 2015; Núñez-Resendiz et al. 2016). En estudios microevolutivos de índole filogeográfica y de genética de poblaciones se han empleado distintos marcadores moleculares para la evaluación de la diversidad genética de especies con poca o alta plasticidad fenotípica (Gou & Li 2000; West-Eberhard 2003). Tales marcadores moleculares incluyen regiones mitocondriales como COI (Yang et al. 2008, 2015; Yew et al. 2011, 2013; Muangmai et al. 2015), la región espaciadora *cox2-3* (Destombe et al. 2010; Pareek et al. 2010; García-Rodríguez et al. 2013; Núñez-Resendiz et al. 2015); marcadores cloroplásticos como la región espaciadora de la *RubisCo* (Guilemo et al. 2008; Núñez-Resendiz et al. 2015, 2016; Zuccarello et al. 2005); o marcadores nucleares como la región ITS (Goff et al. 1994). El empleo de estos marcadores, en combinación con estudios de morfología, ha proporcionado evidencias sólidas para la resolución de conflictos de identificación errónea de especies, el hallazgo de nuevas especies o la solución de complejos de especies crípticas (Muangmai et al. 2015; Núñez-Resendiz et al. 2016, 2017).

Por la diversidad de hábitats que contiene, la península de Yucatán representa una región propicia para el establecimiento de diferentes comunidades marinas, tales como arrecifes coralinos, pastos marinos, manglares y macroalgas herbáceas (Dreckmann & Senties 2013). Dentro de las comunidades algales destaca la división Rhodophyta, de la cual Solieriaceae es una de las familias más conspicuas y económicamente importantes (Freile-Peláez & Rubido 2006, 2008; Freile-Peláez et al. 2006).

Meristotheca cylindrica M. L. Núñez-Resendiz, Dreckmann & Senties es un alga roja de la familia Solieriaceae, recientemente descrita a partir de especímenes recolectados a lo largo de la costa de Campeche (Núñez-Resendiz et al. 2017). Se diferencia del resto de las especies del género por poseer un tallo cilíndrico, el cual se conforma por múltiples ejes principales, cartilaginosos, de 5-30 cm de longitud y 1-5 mm de grosor. Se han descrito tallos altamente ramificados (4, 5 o más veces) así como poco ramificados según lo registrado por Núñez-Resendiz et al. (2017). Al igual que otras especies del género, posee tetrasporangios elipsoidales y zooides que se desarrollan en las capas corticales, y cistocarpes elipsoidales inmersos formados en proliferaciones marginales (Paye et al. 2004, 2005, 2007, 2008). Anatómicamente posee una médula filamentosa y una corteza pseudoparenquimatosa, con células de 50-60 µm de longitud y 18-25 µm en diámetro (Núñez-Resendiz et al. 2017). Como miembro de Solieriaceae, familia que posee el mayor intervalo de diversidad estructural de carragenuanos (Chiovetti et al. 2001; Watt et al. 2003), y dada su abundancia en las costas del estado de Campeche, *M. cylindrica* constituye un recurso económico potencialmente explotable que no se explota en México (Núñez-Resendiz et al. 2017).

Debido a la particularidad del tallo cilíndrico de *M. cylindrica*, en la península de Yucatán esta especie se registró previamente como *Boerhaavia* (C. Agardh) J. Agardh (Callejas et al. 2005), oya especie cilíndrica de Solieriaceae fenotípicamente plástica con quien comparte su intervalo de distribución (Núñez-Resendiz et al. 2017; Zuccarello et al. 2006).

Con base en lo anterior, se establecieron cuatro objetivos en el presente estudio: 1) determinar la variación genética y morfológica dentro y entre las poblaciones de *M. cylindrica*; 2) determinar la estructura genética; 3) determinar la distribución haplotípica en las localidades muestradas en Campeche, y finalmente 4) evaluar si ocurre un evento de especiación entre las poblaciones de *M. cylindrica*. Se considera relevante la realización del presente estudio por la importancia económica y el espectro morfológico presente en *M. cylindrica* que la hace confundible con otras especies de Solieriaceae.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron 45 individuos de *Meristotheca cylindrica* pertenecientes a cinco poblaciones, en cinco localidades del litoral de Campeche, en la península de Yucatán (Tabla 1), a una profundidad de entre 1 y 1.5 m. Bajo el microscopio estereoscópico, se removieron los epitelios de cada individuo y un fragmento de las porciones apicales de los tallos (~3 cm) se preservó en silica gel hasta la posterior extracción de DNA. El resto fue montado en papel de herbario, numerado e integrado a la colección de algas del Herbario Metropolitano (JAMM). Todas las muestras fueron designadas con un número de campo y se añadieron a una hoja de herbario con su respectivo número de voucher (Tabla 1).

La extracción de DNA se realizó a partir de 5-10 mg de tejido seco con la utilización del kit de extracción de Qiagen, DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California USA) según la técnica descrita por el fabricante, con modificaciones menores al añadir una centrifugación por 1 minuto a 8000 rpm después de agregar por segunda vez el buffer AW2, y un aumento en el tiempo de incubación con buffer AE de 5 a 30 minutos.

La amplificación vía PCR se realizó con el kit Taq PCR Core Kit (Qiagen) y cebadores específicos según la región de cada genoma por amplificar. El marcador molecular cloroplástico, la región espaciadora de la *RubisCo* (rbc spacer), se amplificó con los cebadores spacer-F y spacer-R descritos en Maggs et al. (1992). Por otro lado, el espaciador de *cox2-3* se amplificó utilizando los oligonucleótidos *cox2-F* y *cox2-R* (Zuccarello et al. 1998). El volumen total de PCR por muestra fue de 25 µL con los siguientes reactivos: 2.5 µL de buffer de PCR 10X, 1 µL de primer forward 10µM, 1 µL de primer reverse 10µM, 0.5 µL de solución de dNTPs (10mM por cada uno), 0.5 µL de BSA, 1 µL de MgCl₂ 25mM, 0.125 µL de Taq polimerasa 5U/µL, 17.375 µL de agua desionizada y 1 µL de DNA genómico. Las condiciones de PCR fueron las descritas por Núñez-Resendiz et al. (2015). La amplificación vía PCR se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y los productos de PCR se purificaron con el kit QIAquick Purification Kit (Qiagen). Las muestras amplificadas se enviaron a Macrogen Korea (10F, 25-4 Bojeok-ro, Gancheon-gu, Seoul, 06511, República de Corea), donde se utilizó el kit de secuenciación BigDye en un secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Princeton, NJ, EE. UU.).

Las secuencias obtenidas se organizaron en una matriz, se editaron y alinearon mediante el algoritmo ClustalW (Thompson et al. 1994) con el programa Bioedit (Jalil 1996). La búsqueda del modelo óptimo de evolución de DNA se implementó mediante jModelTest v. 2.1.1 con el criterio de información Akaike (AIC) (Darriba et al. 2012; Guindon & Gascuel 2003). El modelo elegido para ambos conjuntos de secuencias fue el GTR G+I (general time reversible + distribución gamma + sitios invariantes), el cual se utilizó en los análisis filogenéticos posteriores.

Tabla 1. Muestras y especímenes de *Merostethus cymatrus* procedentes de las costas de Campeche. Se describen los datos de localidad, coordenadas geográficas y números de campo y herbario (UAMZ= Herbario de la Universidad Autónoma Metropolitana). Se indica el haplotipo al que pertenecen las muestras para ambas regiones genéticas; para el caso de la región espaciadora *cox2-3*, G1 y G2 corresponden con la estructura genética revelada por este marcador (ver texto).

Localidad	Coordenadas GPS	Número de Herbario	Clave de campo	RuBisCo	<i>cox2-3</i>			
Isla Aguada (IA)	18°50'00"N, 91°26'51"W	UAMZ-1239	IA-3-10	R1	G1 C1			
			IA-1-1	R2	G2 C2			
			IA-1-3	R2	G2 C3			
			IA-3-9	R1	G1 C1			
			IA-3-12	R1	G1 C1			
			IA-3-11	R1	G1 C1			
			IA-2-6	R1	G1 C1			
			IA-2-7	R1	G1 C4			
			IA-2-5	R1	G1 C5			
			IA-2-8	R1	G1 C1			
			IA-2-8	R1	G1 C1			
			IA-2-17	R1	G1 C8			
Sabancuy (SI)	18°59'39"N, 91°11'06"W	UAMZ-1246	SI-2-6	R1	G1 C1			
			SI-3-9	R1	G1 C1			
			SI-1-4	R2	G2 C2			
			SI-1-3	-	G2 C2			
			SI-5-18	R1	G1 C1			
			SI-H29	R1	-			
			SI-2-8	R1	G1 C9			
			SI-1-1	R2	G2 C2			
			SI-2-7	-	G1 C1			
			SI-2-5	R1	G1 C1			
Punta Xen (PX)	19°21'N, 91°57'49"W	UAMZ-1252	PX-1-13	R2	-			
			PX-1-2	-	G2 C6			
			PX-2-4	R1	G1 C1			
			PX-1-14	R1	G1 C7			
			PX-1-15	R1	G1 C7			
			PX-1-16	R1	G1 C7			
			PXH10	R1	-			
			PXH21	R1	-			
			PXH22	R1	-			
			Bahía de Tortuga (BT)	19°21'35"N, 90°42'35"W	UAMZ-1249	BT-90-12	R3	G3 C2
						BT-90-16	R2	G2 C2
						BT-90-13	R2	G2 C2
BT-90-15	R2	G2 C2						
BT-93-1	R2	G2 C2						
BT-93-2	R2	G2 C2						
Playa Bonita (PB)	18°59'39"N, 91°11'06"W	UAMZ-970	PB-H6	R1	-			
			PB-H70	R4	-			
			PB-H5	R1	-			
			PB-H42	R1	G1 C5			
			PB-H49	R1	G1 C5			
			PB-H51	R1	G1 C4			
			PB-H52	R1	G1 C4			
			PB-H53	R1	G1 C4			

Las siguientes medidas de diversidad genética se estimaron con el programa DnaSP v.5 (Librado & Rozas, 2009): número de sitios segregantes (S), número de haplotipos (H), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π) y sitios segregantes por cada marcador molecular, así como los estimados de flujo génico (F_{ST}) e índice de fijación (F_{ST}) según Hudson, Slatkin & Maddison (1992). Con la finalidad de observar la diferenciación genética, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) para cada marcador mediante GenAlEx v.6.503 (Peakall & Smouse 2006, 2012); de igual manera, se obtuvieron los valores de Φ_{ST} , según Peakall et al. (1995), análogo de F_{ST} .

La evaluación de las relaciones haplotípicas se estimó por medio de la construcción de redes de parsimonia estadística con TCS v.1.21 (Clement et al. 2000). Una secuencia representativa de cada haplotipo, por ambos marcadores moleculares, fue depositada en la base de datos del GenBank.

Los análisis filogenéticos de inferencia bayesiana (BI) y máxima verosimilitud (ML) se realizaron con el programa TOPAL v. 2.5 (Molnér et al. 2004); la inferencia bayesiana mediante Mr. Bayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001), con una frecuencia de muestreo de cada 100 generaciones durante 1×10^6 generaciones y burn-in del 25%. Asimismo, la máxima verosimilitud se determinó via RAxML (Stamatakis 2014); se utilizó un bootstrap con 1000 réplicas para el cálculo de soporte de ramas. El grupo externo seleccionado para ambos marcadores fue *Hydrogaster conica* Montagne. Se estimaron distancias genéticas no corregidas (*p*-distances) en MEGA v. 6 (Tamura et al. 2013).

El análisis morfológico se realizó a partir de caracteres anatómicos apreciados en 10 ejemplares de herbario pertenecientes a las poblaciones trabajadas molecularmente. Para ello, se realizaron manualmente cortes transversales observados con la ayuda del microscopio óptico Leica DMLB. Las muestras se dividieron en dos grupos según la ramificación presentada: 1) patrón de ramificación sólo alterna, poco ramificado (2 o 3 veces), 2) patrón de ramificación alterna-opuesta, altamente ramificado (>4). Se construyó una matriz con la cuantificación de los siguientes caracteres: número de capas corticales, número de filamentos medulares, diámetro de la médula (largo y ancho), diámetro del tallo (largo y ancho) y diámetro de las células de ambas cortezas (interna y externa, largo y ancho de cada una) en tres partes del tallo (apical, media y basal), lo que constituye un total de 30 caracteres.

Dicha matriz se sometió a un análisis múltiple de variantes en STATISTICA 8.0.360 (StatSoft Inc. 2007) con el fin de determinar diferencias significativas entre los grupos independientes (1 y 2) a partir de las variables dependientes consideradas (cuantificación de los caracteres en las tres partes del tallo).

RESULTADOS

Región espaciadora de RuBisCo. El set de datos consistió en 42 secuencias con 185 pares de bases (pb) de longitud para el análisis poblacional; el análisis filogenético incluyó muestras de especies de la familia Sotteriaceae obtenidas de GenBank, con *Hydrogaster conica* como grupo externo, por lo que el conjunto de datos abarcó 53 secuencias en total.

Se calcularon las medidas de diversidad y diferenciación genética para este marcador (Tablas 2 y 3), las cuales mostraron en general altos sitios segregantes (Tabla 4), una moderada diversidad haplotípica ($H_d=0.46458$) y una diversidad nucleotídica ($\pi = 0.00795$). Las poblaciones con la mayor diversidad haplotípica fueron Sabancuy y Punta Xen, ambas con la misma diversidad haplotípica (95=0.38889, así como diversidad nucleotídica ($\pi=0.006344$)). Por el contrario, la población con menor variación fue Playa Bonita con valores de $H_d=0.25$ y $\pi=0.00272$ (Tabla 2).

En cuanto a los índices de diferenciación, se obtuvieron valores de $N_{ST}=0.55$ y de $F_{ST}=0.47420$. El AMOVA arrojó un índice de $\Phi_{ST}=0.268$ y un valor de $N_{ST}=1.367$, con un 27% de la variación explicada por las diferencias del marcador cloroplástico entre las poblaciones, en tanto que un 73% de la variación explicada por la variación al interior de las mismas (Tabla 2).

Respecto a las relaciones haplotípicas, la red de parsimonia estadística reveló cuatro haplotipos interconectados: R1, R2, R3 y R4 (Fig. 1 y Tabla 1). El haplotipo que agrupó el mayor número de individuos fue R1 ($n=29$), seguido por el haplotipo R2 ($n=11$) y finalmente los haplotipos con menor número de individuos, R3 y R4 (ambos con $n=1$). El haplotipo R1 (designado por el programa como el posible haplotipo ancestral) estuvo separado de R2 por cuatro pasos mutacionales y este, a su vez, estuvo separado de R3 por seis pasos mutacionales; en cuanto a R4, sólo se separó por dos pasos mutacionales (Fig. 1).

Tabla 2. Medidas de diversidad genética para las poblaciones de *Merostethus cymatrus*, basadas en las regiones espaciadoras de RuBisCo y *cox2-3*.

Localidad	Espaciador de RuBisCo					Espaciador de <i>cox2-3</i>				
	Número de secuencias	S	H	H_d	π	Número de secuencias	S	H	H_d	π
IA	10	3	2	0.35356	0.0058	10	31	5	0.6667	0.053
PX	9	3	2	0.38889	0.00634	6	32	3	0.6	0.0546
PB	8	2	2	0.25	0.00272	5	7	2	0.6	0.02
SI	9	3	2	0.38889	0.00634	10	30	4	0.71	0.06478
BT	6	2	2	0.3	0.00362	6	0	1	0	0
Total	42	7	4	0.46458	0.00795	37	34	9	0.81081	0.07285

S = sitios segregantes, H = número de haplotipos, H_d = diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica, IA = Isla Aguada, PX = Punta Xen, PB = Playa Bonita, SI = Sabancuy, BT = Bahía de Tortuga, Total = índice general de todas las poblaciones.

Tabla 3. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para ambos marcadores en las cinco poblaciones de *Meristotheca cyathica*.

Fuente de variación	Espaciador de RubiCo				Espaciador de <i>cox2-3</i>			
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	Porcentaje de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	Porcentaje de la variación
Entre poblaciones	4	3.104	0.776	27%	4	5.895	0.158	36%
Al interior de poblaciones	37	7.086	0.192	73%	32	8.900	0.278	64%
			$\Phi_{st} = -0.268$ $Nm = 1.367$				$\Phi_{st} = -0.363$ $Nm = 0.879$	

Respecto de su distribución geográfica (Fig. 2), el haplotipo R1 estuvo presente en todas las localidades muestreadas, R2 se presentó en todas las localidades excluyendo Playa Bonita y los haplotipos R3 y R4 se restringieron a Bahía de Tortuga y Playa Bonita, respectivamente. En todas las poblaciones se presentó el mismo número de haplotipos (2) (Fig. 2).

En cuanto al análisis filogenético, las muestras correspondientes a cuatro haplotipos de *M. cyathica* se agruparon en un solo clado soportado por una probabilidad posterior bayesiana y bootstrap de 0.67/96, respectivamente. En su interior, se ubicó un grupo conformado por las muestras de los haplotipos R2 y R3, soportado por valores de 1.0/96 (probabilidad posterior bayesiana y bootstrap, respectivamente) (Fig. 3).

Los porcentajes de distancia genética al interior de *M. cyathica* con el espaciador de RubiCo fueron: máxima de 4.3% (entre R3-R4)

y mínima de 1.1% (entre R3-R2 y R4-R1); el promedio de distancia genética con este marcador fue de 2.5%.

Espaciador de *cox2-3*. El set de datos consistió en 37 secuencias con 210 pb de longitud para el análisis poblacional; el análisis filogenético incluyó muestras de especies de la familia Sclerotiaceae obtenidas de GenBank, con *Hydruntaria comera* (como grupo externo, por lo que el conjunto de datos abarcó 48 secuencias en total).

Las medidas de diversidad genética y diferenciación calculadas (Tablas 2 y 3), mostraron en general 34 sitios segregantes (Tabla 5), una alta diversidad haplotípica general ($Hd = 0.81061$) y una diversidad nucleotídica ($\pi = 0.07285$). La población con la mayor diversidad haplotípica ($Hd = 0.71$) y diversidad nucleotídica ($\pi = 0.06476$) fue Sabancuy. Por el contrario, la población con menor variación fue Bahía de Tortuga ya que presentó sólo un haplotipo ($Hd = 0$ y $\pi = 0$) (Tabla 2).

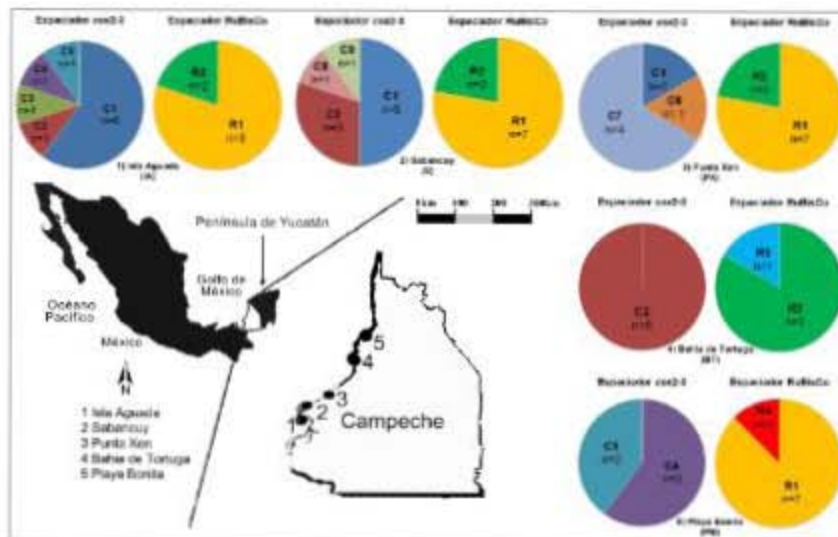


Figura 2. Distribución haplotípica de las regiones espaciadoras de RubiCo (derecha) y de *cox2-3* (izquierda) para *Meristotheca cyathica* de Campeche. Las localidades están indicadas en el mapa con número (1-5) y la clave de localidad en cada caso entre paréntesis (ver coordenadas GPS en Tabla 1). n = número de individuos pertenecientes a cada haplotipo por población (modificado de Rubio-Restrepo et al. 2017).

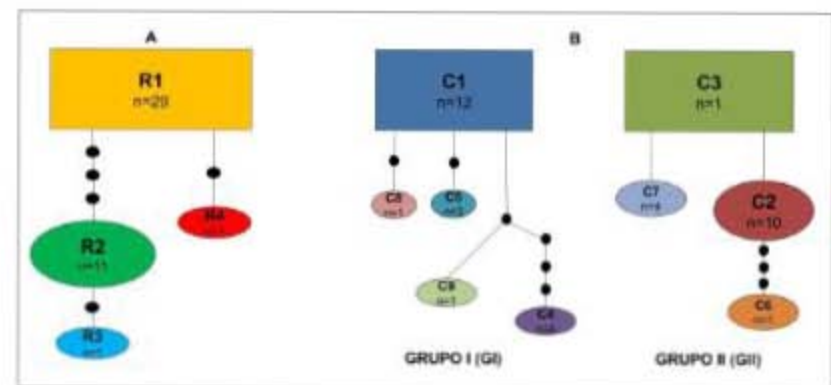


Figura 1. Redes de parsimonia estadística de las regiones espaciadoras de RubiCo (A) y de *cox2-3* (B) de *Meristotheca cyathica*. Para la región espaciadora de *cox2-3*, los dos grupos genéticos encontrados se indican como GI y GII. Para ambas redes, las rectángulos corresponden con el posible haplotipo ancestral; las líneas verticales indican un paso mutacional; los círculos negros indican haplotipos extintos o no muestreados; n = número de individuos con el mismo haplotipo.

En cuanto a los índices de diferenciación, se obtuvieron valores de $Nm = 0.45$ y de $F_{st} = 0.52855$. El AMOVA arrojó un índice de $\Phi_{st} = 0.363$ y un valor de $Nm = 0.879$, con un 36% de la varianza explicada por las diferencias del marcador mitocondrial entre las poblaciones, en tanto que un 64% de la varianza explicada por la variación al interior de las mismas (Tabla 3).

Respecto al análisis de haplotipos, la red de parsimonia estadística reveló nueve haplotipos agrupados en dos redes, que correspondieron con dos grupos genéticamente diferenciados (GI y GII) con una estructuración total. La primera red (GI) estuvo conformada por cinco haplotipos: C1 ($n = 12$), C2 ($n = 10$), C3 ($n = 1$) y C4 ($n = 1$) (Fig. 1 y Tabla 1), mientras que la segunda red (GII) por cuatro haplotipos: C5 ($n = 1$),

C6 ($n = 10$), C7 ($n = 1$) y C8 ($n = 1$) (Figura 1 y Tabla 1). En GI, el haplotipo C1 (designado por el programa como el posible haplotipo ancestral) estuvo separado de C2, C5 y C8 por dos pasos mutacionales, y a su vez, estuvo separado de C4 por cinco pasos mutacionales. En GII, el haplotipo C3 (designado como posible haplotipo ancestral incluso con $n = 1$) se separó de C7 y C2 por un solo paso mutacional, mientras que cinco pasos mutacionales lo separaron de C6 (Fig. 1).

Respecto de su distribución geográfica (Fig. 2), el haplotipo C1 se presentó en las localidades de Punta Xen, Sabancuy e Isla Aguada; C2 fue localizado en Sabancuy, Isla Aguada y Bahía de Tortuga; C3 fue exclusivo de Isla Aguada; C4 y C5 se encontraron simultáneamente en Isla Aguada y Playa Bonita; C6 y C7 se delimitaron a Punta Xen y final-

Tabla 4. Sitios variables en el alineamiento de secuencias de DNA de *Meristotheca cyathica* para los haplotipos de la región espaciadora de RubiCo y sus números de acceso al GenBank.

	NS	38	44	47	67	105	122	169	172	Número de acceso GenBank
R1	S	A	S	T	C	S	S	C		KY979260
R2	-	-	-	-	C	A	-	A	T	KY979261
R3	-	C	T	C	A	-	-	A	T	KY979262
R4	C	-	-	-	-	-	C	-	-	KY979263

- code. *Gigartinales*. *Phycological Research* 55: 150-158. DOI: 10.1111/1440-1825.2007.00458.x
- Fuji, E. J., K. Kawai, S. Sano, S. Kawanishi & M. Mizuno. 2008. New red alga *Mirosethira intricata* (Solieriaceae, Gigartinales) from Japan. *Phycological Research* 56: 115-128. DOI: 10.1111/j.1440-1825.2008.00492.x
- Fueller-Pulzjak, Y. & D. Reletho. 2006. Carageneration of *Eucheuma setosum* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Yucatán, Mexico. II. Seasonal variations in Carageneration and biochemical characteristics. *Botanica Marina* 49: 72-78. DOI: http://dx.doi.org/10.1515/BOT.2006.009
- Fueller-Pulzjak, Y. & D. Reletho. 2008. Carageneration of *Eucheuma setosum* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Nicaragua. *Journal of Applied Phycology* 20: 537-541. DOI: 10.1007/s10811-007-9270-8
- Fueller-Pulzjak, Y., D. Reletho & J. A. Aguilar. 2006. Carageneration of *Eucheuma setosum* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Yucatán, Mexico. I. Effect of extraction conditions. *Botanica Marina* 49: 65-71. DOI: 10.1515/BOT.2006.008
- García-Rodríguez, L. D., R. Rosales-Rodríguez, S. Y. Kai, M. Lirio-Moré, J. J. M. Llorca-Vega & S. M. Bor. 2012. Recent introduction of *Gracilaria parvifera* (Gracilariaceae, Rhodophyta) in Baja California, Mexico. *Botanica Marina* 56: 143-150.
- Gerr, L. J., D. A. Howe & A. W. Collins. 1994. Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agardhiophytes *Ceramium* and *Gracilaria* (Gracilariaceae). *Journal of Phycology* 30: 521-537. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1994.00521.x
- Giles, W. A. S. & B. W. Bowen. 1996. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89: 415-426. DOI: 10.1093/jhered/89.5.415
- Gravel, D. & W. H. Li. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Second Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Mass. 481 p. ISBN 10: 0878922666.
- Gullone, M. L., S. A. Am, T. Gorenkoff, A. Moncal, M. Valero & C. Dettman. 2008. Molecular characterization and development of rapid molecular methods to identify species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco. *Aquatic Botany* 89: 324-330. DOI: 10.1016/j.aquabot.2008.03.008
- Gullone, M. L., M. Valero, S. Fournier, W. Nelson & C. Dettman. 2014. Tracing the trans-Pacific evolutionary history of a domesticated seaweed (*Gracilaria chilensis*) with archaeological and genetic data. *PLoS ONE* 9 (12): e114039. DOI: 10.1371/journal.pone.0114039
- Guven, S. & O. Gullone. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704. DOI: 10.1080/10635150290235520
- Hall, T. A. 1998. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium* 41: 95-98.
- Hartl, D. L. & A. G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. 2nd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Folio variado.
- Harris, R. R., M. Slayba & W. P. Maddison. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583-589.
- Hickerson, J. P. & T. R. Miller. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Larkin, P. & J. Rust. 2009. DnaSP v1: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp187
- Macci, C. A., S. E. Douglas, J. Ferry & C. J. Bee. 1992. A molecular and morphological analysis of the *Lyngbyopsis stevensoni* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *Journal of Phycology* 28: 214-222. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1992.00214.x
- Mair, I., F. Wozniak, G. Riet, D. Moxon, D. Hoozem & G. McGee. 2004. TOPAL: Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments. *Bioinformatics* 20 (11): 1806-1807. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth155
- Munoz, N., I. C. Fariña & G. C. Zaccarello. 2015. Contrasting patterns of population structure and demographic history in cryptic species of *Astrophytia intricata* (Rhodomeleaceae, Rhodophyta) from New Zealand. *Journal of Phycology* 51: 574-585. DOI: 10.1111/jpy.12305
- Núñez-Rodríguez, M. L., K. M. DeWaalwa, A. Santos, J. Diaz-Loreto & G. C. Zaccarello. 2015. Genetically reproductible but not morphologically: The cryptic nature of *Hydrocolella cornuta* and *H. canaliculata* (Gracilariaceae, Rhodophyta) in the Yucatan Peninsula. *Phycologia* 54: 407-416. DOI: 10.2216/15-006.1
- Núñez-Rodríguez, M. L., G. C. Zaccarello, K. M. DeWaalwa & A. Santos. 2016. Phylogeography of *Hydrocolella cornuta*/*H. canaliculata* complex (Gracilariaceae, Rhodophyta) in the Yucatan Peninsula. *Phycologia* 55: 522-531.
- Núñez-Rodríguez, M. L., K. M. DeWaalwa & A. Santos. 2017. *Mirosethira cylindrica* sp. nov. (Solieriaceae, Rhodophyta) from the southern Gulf of Mexico. *Phycologia* 56 (4): 423-429. DOI: http://dx.doi.org/10.2216/16-116.1
- Pardo, M., A. Moncal & B. Jia. 2010. Molecular phylogeny of *Gracilaria* species inferred from molecular markers belonging to three different genomes. *Journal of Phycology* 46: 1322-1328. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2010.00903.x
- Parkall, R. & P. E. Serrão. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 286-295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Parkall, R. & P. E. Serrão. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts480
- Parkall, R., P. E. Serrão & D. R. Hill. 1995. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of diocious bullkelpgrass *Desmarestia dactyloides*. *Molecular Ecology* 4: 135-148. DOI: 10.1111/j.1365-294X.1995.tb02023.x
- Sarna, M. & R. R. Harris. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.
- Schwarze, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313. DOI: dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033
- StatSoft Inc. 2007. STATISTICA (data analysis software system) version 8.0. www.statsoft.com
- Tanaka, K., G. Strömberg, D. Pritchard, A. Farris & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12): 2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197
- Tompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research* 22: 4673-4680.
- Werr, N. J., A. Chiswick, D. J. Cole & G. T. Kerr. 2003. The cell wall galactans from Australian representatives of the genus *Mirosethira* (Solieriaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 42: 572-581. DOI: 10.2216/0031-8884-42-4-572.1
- Wirtz-Emmerich, M. J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, Oxford. 794 p. ISBN: 9780195122350.
- Yao, E. C., M. S. Kai, P. J. Gorenkoff, D. Santos, J. A. Sosa & S. M. Bor. 2008. Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20: 161-168. DOI: 10.1007/s10811-007-9201-8
- Yao, E. C. & S. K. Miao. 2015. Molecular analyses for identification of the Gracilariaceae (Rhodophyta) from the Asia-Pacific region. *Genes & Genomes* 37: 775-787. DOI: 10.1007/s13258-015-0206-1
- Yeo, Y. Y., P. E. Lee & S. M. Poon. 2011. Genetic diversity of *Gracilaria chuangii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from west coast, Peninsular Malaysia based on mitochondrial *cox1* gene analysis. *Journal of Applied Phycology* 23: 219-226. DOI: 10.1007/s10811-010-9535-5
- Yeo, Y. Y., P. E. Lee & S. M. Poon. 2013. Assessing the use of mitochondrial *cox1* gene and *cox2-3* spacer for genetic diversity study of Malaysian *Gracilaria chuangii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Peninsular Malaysia. *Journal of Applied Phycology* 25: 831. DOI: 10.1007/s10811-012-9942-x
- Zaccarello, G. C., G. Baines, J. A. West & R. J. Keir. 1998. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443-1447. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1999.00710.Zaccarello, G. C., N. Schidlo, I. Melzer & M. O. Güny. 2005. A molecular re-examination of speciation in the intertidal red alga *Medicarpus striolatus* (Gigartinales, Rhodophyta) in Europe. *European Journal of Phycology* 40: 337-344. DOI: 10.1080/09670260500254743
- Zaccarello, G. C., A. T. Crocker, J. Serrão, V. Serrão, G. B. Llewellyn & J. West. 2008. Systematics and genetic variation in commercial shape *Agardhiopsis* and shape *Eschschschira* (Solieriaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 18: 643-651. DOI: 10.1007/s10811-006-9066-2