



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Variación genética de las poblaciones de *Hydropuntia cornea*
(Gracilariaceae, Rhodophyta) en las costas del Golfo de México
y el Caribe mexicano

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

M. EN C. MARÍA LUISA NÚÑEZ RESENDIZ

CO-DIRECTORES:

Dr. Abel Senties Granados

Dra. Jhoana Díaz Larrea

ASESOR:

Dr. Kurt Martin Dreckmann Estay

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2015

“El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

El Jurado designado por la

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis que presentó

M. en C. María Luisa Núñez Resendiz

El día 03 de Diciembre del 2015

JURADO DE EXAMEN

Dr. Abel Sentíes Granados (Presidente)



Dra. Jhoana Díaz Larrea (Secretaria)



Dr. Kurt Dreckmann Estay (Vocal)



Dra. Hilda Patricia León Tejera (Vocal)



Dra. Alejandra Serrato Díaz (Vocal)



*A mis tres padres,
Mis hermanas,
Mi bebé,
Mi amor...
Son mi refugio.*

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE APÉNDICES

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN

- 1.1. CONCEPTOS DE ESPECIE Y MODELOS DE ESPECIACIÓN
- 1.2. ALGUNOS CONCEPTOS RELACIONADOS CON LOS ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA
- 1.3. LOS MARCADORES MOLECULARES

2. ANTECEDENTES

- 2.1. ASPECTOS TAXONÓMICOS DEL GÉNERO *Hydropuntia*
- 2.2. EL COMPLEJO *Hydropuntia cornea* E *Hydropuntia usneoides*
- 2.3. ESTUDIOS TAXONÓMICOS MOLECULARMENTE ASISTIDOS

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

4. HIPÓTESIS

5. OBJETIVOS

- 5.1. OBJETIVO GENERAL
- 5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

6. MATERIAL Y MÉTODO

- 6.1. ÁREA DE ESTUDIO
 - 6.1.1. Características generales
 - 6.1.2. Oceanografía
 - 6.1.3. Geología
 - 6.1.4. Cierre del Istmo de Panamá
- 6.2. TRABAJO DE CAMPO
 - 6.2.1. Muestreo
 - 6.2.2. Preservación de las muestras
- 6.3. TRABAJO DE LABORATORIO

- 6.3.1. Análisis molecular
- 6.3.2. Extracción de ADN
- 6.3.3. Amplificación de ADN
- 6.3.4. Purificación y secuenciación
- 6.3.5. Análisis morfológico
- 6.3.6. Cortes histológicos, observaciones al microscopio y toma de medidas
- 6.4. ANÁLISIS DE DATOS
- 6.4.1. Variación genética
- 6.4.2. Inferencia filogenética
- 6.4.3. Distancias genéticas
- 6.5. ANÁLISIS MORFOLÓGICO

7. RESULTADOS

- 7.1. VARIACIÓN GENÉTICA
 - 7.1.1. Estructura genética
 - 7.1.1.1. Región espaciadora de la RuBisCo
 - 7.1.1.2. Región espaciadora *cox2-3*
 - 7.1.1.3. ITS
 - 7.1.2. Distribución haplotípica
 - 7.1.2.1. Distribución de los haplotipos de la región espaciadora de la RuBisCo
 - 7.1.2.2. Distribución de los haplotipos de la región espaciadora *cox2-3*
 - 7.1.3. Medidas de diversidad genética, flujo génico e historia demográfica
 - 7.1.3.1. Medidas de diversidad genética
 - 7.1.3.2. Flujo génico
 - 7.1.3.3. Historia demográfica
 - 7.1.4. SAMOVA
 - 7.1.5. AMOVA
 - 7.1.6. Aislamiento por distancia
- 7.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS
 - 7.2.1. *rbcL*
 - 7.2.2. COI
- 7.3. DISTANCIAS GENÉTICAS
- 7.4. VARIACIÓN MORFOLÓGICA

8. DISCUSIÓN

- 8.1. VARIACIÓN GENÉTICA
 - 8.1.1. Estructura genética
 - 8.1.2. Distribución haplotípica
 - 8.1.3. Medidas de diversidad genética y flujo genético
 - 8.1.4. Historia demográfica
 - 8.1.5. SAMOVA, AMOVA y aislamiento por distancia
- 8.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS
 - 8.2.1. Distancias genéticas

8.3. ANÁLISIS MORFOLÓGICO

9. CONCLUSIONES

10. CONSIDERACIONES FINALES

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12. PRODUCTOS DEL TRABAJO DE TESIS

12.1. PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

12.2. PUBLICACIONES

AGRADECIMIENTOS

APÉNDICES

ÍNDICE DE FIGURAS

	PAGINA
FIGURA 1. Representación esquemática de los principales caracteres que definen a <i>Hydropuntia cornea</i> , resaltando a las estructuras vegetativas: médula y corteza (izquierda) y a las estructuras reproductoras: cistocarpos, espermatangios y tetrasporangios (derecha). Modificado de Dreckmann 2012 y Dreckmann & Senties 2014).	20
FIGURA 2. Espectro de variación morfológica en poblaciones del Caribe mexicano de <i>Hydropuntia cornea</i> . Ejemplares de herbario referidos en Dreckmann (2012). Barra de escalas= 4 cm.	22
FIGURA 3. Representación esquemática del patrón actual de corrientes superficiales en el Golfo de México y el Mar Caribe. Tomado de Dreckmann & Senties (2013).	42
FIGURA 4. Representación de la dirección de las paleocorrientes en el tiempo geológico durante el cierre de Istmo de Panamá. Modificado de Coates & Stallar (2013).	46
FIGURA 5. Sitios de recolecta en el Golfo de México y el Caribe mexicano. Los puntos señalan la posición geográfica de los sitios visitados (Coordenadas GPS en Tabla 3) y los números corresponden con la localidad.	47
FIGURA 6. Red haplotípica de la región espaciadora de la RuBisCo para las secuencias de <i>Hydropuntia cornea</i> . El cuadrado representa al posible haplotipo ancestral. Los haplotipos en color blanco, corresponden al haplogrupo GI y, los haplotipos en color gris, corresponden al haplogrupo GII. Las líneas representan un paso mutacional; los circulitos negros indican haplotipos no muestreados o perdidos. El tamaño de muestras con secuencia idéntica está indicado con <i>n</i> ; en aquellos haplotipos que sólo tuvieron una muestra no se indica <i>n</i> .	62
FIGURA 7. Red haplotípica de la región espaciadora <i>cox2-3</i> para las secuencias de <i>Hydropuntia cornea</i> . El cuadrado representa al posible haplotipo ancestral. Los haplotipos en color blanco,	64

corresponden al haplogrupo GI y, el haplotipo en color gris, corresponde al haplogrupo GII. Las líneas representan un paso mutacional; los circulitos negros indican haplotipos no muestreados o perdidos. El tamaño de muestra con secuencia idéntica está indicado con *n*.

FIGURA 8. Red de ribotipos del gen ITS para las secuencias de *Hydropuntia cornea*. A. Ribogrupos I. B. Ribogrupos II. Los cuadros representan a los posibles ribotipos ancestrales. Los ribotipos en color blanco, corresponden con el haplogrupo GI y, los ribotipos en color gris corresponden con el haplogrupo GII. La línea continua representa más de 40 pasos mutacionales; los circulitos negros indican ribotipos no muestreados o perdidos. El tamaño de muestras con secuencia idéntica está indicado con *n*.

66

FIGURA 9. Distribución de los haplotipos de la región espaciadora de la RuBisCo en las poblaciones de *Hydropuntia cornea* estudiadas a lo largo del Golfo de México y el Caribe. Cada haplotipo está representado con un color. El tamaño de la muestra se indica entre paréntesis a un lado del nombre de cada población, mismas que se indican en el mapa con números (1-14).

68

FIGURA 10. Distribución de los haplotipos de la región espaciadora *cox2-3* en las poblaciones de *Hydropuntia cornea* estudiadas a lo largo del Golfo de México y el Caribe. Cada haplotipo está representado con un color. El tamaño de la muestra se indica entre paréntesis a un lado del nombre de cada población, mismas que se indican en el mapa con números (1-6).

70

FIGURA 11. Distribución Mismatch para la región espaciadora de la RuBisCo en *Hydropuntia cornea*. La distribución observada está representada con la línea negra mientras que la distribución simulada bajo un modelo de expansión repentina, está representado con la línea gris.

74

FIGURA 12. Gráficos de la Distribución Mismatch para la región espaciadora de la RuBisCo en grupos definidos (GI, gráfico superior y GII, gráfico inferior) de *Hydropuntia cornea*. La distribución observada está representada con la línea negra mientras que la distribución simulada bajo un modelo de expansión reciente, está representado con la línea gris.

76

FIGURA 13. Distribución geográfica de los grupos de poblaciones pre definidos por SAMOVA para la Península de Yucatán (indicados con óvalos), y el patrón de las corrientes oceanográficas

79

en el Caribe (indicado por las flechas azules). Cada color representa a un grupo, en la leyenda se indica a qué grupo corresponde cada color.

FIGURA 14. Topología Bayesiana con datos de secuencias del gen *rbcL* para muestras de *Hydropuntia cornea*. En las ramas se indican los valores de PPB y de bootstrap para ML. Los valores por debajo del 95% no se muestran. En los cuadros se remarcan los dos grupos genéticamente diferenciados (Grupo I y Grupo II). PM, Puerto Morelos; PT, Puerto Telcach; PS, Puerto Sisal; PC, Puerto Chicxulub; PP, Puerto Progreso. Las especies de *Gracilariopsis* fueron definidas como grupo externo. Las secuencias generadas en la presente tesis, están remarcadas en negrita, las no resaltadas provienen del GenBank.

82

FIGURA 15. Topología Bayesiana con datos de secuencias del gen COI para muestras de *Hydropuntia cornea*. En las ramas se indican los valores de PPB y de bootstrap para ML. Los valores por debajo del 95% no se muestran. En los cuadros se remarcan los dos grupos genéticamente diferenciados (Grupo I y Grupo II). PM, Puerto Morelos; PT, Puerto Telcach; PS, Puerto Sisal; PC Puerto Chicxulub; PP, Puerto Progreso. Las especies de *Gracilariopsis* fueron definidas como grupo externo. Las secuencias generadas en la presente tesis, están remarcadas en negrita, las no resaltadas provienen del GenBank.

84

FIGURA 16. Espectro de variación morfológica encontrado al interior de *Hydropuntia cornea* en Campeche. El número de voucher se indica en la figura. Barra de escalas= 5 cm.

87

FIGURA 17. Espectro de variación morfológica encontrado al interior de *Hydropuntia cornea* en Yucatán y Quintana Roo. El número de voucher se indica en la figura. Barra de escalas= 5 cm.

88

FIGURA 18. Caracteres diagnósticos de *Hydropuntia cornea*. En A, B y D, se muestra el patrón y número de ramificaciones, Grupo I a la izquierda y Grupo II a la derecha. Barra de escalas=3 cm. En C (Grupo I) y E (Grupo II), se muestra el número y diámetro de capas corticales y medulares. Barra de escalas=400 μ m y 350 μ m respectivamente. En F (Grupo I) y G (Grupo II), se muestran el diámetro de los cistocarpos y el número de capas celulares en el pericarpo. Barra de escalas=300

91

µm. En H (Grupo I) y G (Grupo II), se muestran los tetrasporangios. Barras de escala 30 µm.

FIGURA 19. Gráfica del análisis de componentes principales de los datos morfológicos. El eje de la X muestra la varianza del CP1, y el eje de la Y muestra la varianza del CP2. Los valores de varianza están indicados en los paréntesis. Los puntos negros representan a las muestras del Grupo I y los puntos grises al Grupo II. Los números indican el número de muestra.

93

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
TABLA 1. Principales marcadores moleculares comúnmente empleados en estudios de filogenia, diversidad genética y/o filogeografía de especies de Gracilariales.	30
TABLA 2. Listado de localidades (poblaciones) muestreadas en los estados del Golfo de México y en el Caribe mexicano. Se incluyen al final, las poblaciones de Venezuela y Brasil. Para cada localidad se indica el número de individuos muestreados por población.	48
TABLA 3. Resumen del muestreo por cada población, con datos de localidades, fechas, referencias de herbario, de campo y de extracción de ADN, así como la información de los genes secuenciados (indicados con “X”) para cada individuo.	49
TABLA 4. Genes secuenciados en el presente trabajo para las poblaciones de <i>Hydropuntia cornea</i> , marcadores específicos, condiciones de PCR en las que amplificaron los genes y referencias bibliográficas de los marcadores.	54
TABLA 5. Haplotipos encontrados en las regiones espaciadoras RuBisCo y <i>cox2-3</i> y en el gen ITS para las poblaciones de <i>Hydropuntia cornea</i> estudiadas. El número indica la frecuencia haplotípica. En color negro se resalta la afinidad genética con el haplogrupo o ribogrupo GI, y en gris la afinidad con el haplogrupo o ribogrupo GII.	60

TABLA 6. Proporción de sitios variables en secuencias de ADN de <i>Hydropuntia cornea</i> para haplotipos de la región espaciadora de la RuBisCo. Los haplotipos del haplogrupo GI están en color negro y los haplotipos del haplogrupo GII están marcados con color gris. El punto indica misma base respecto de la secuencia del haplotipo R1.	61
TABLA 7. Proporción de sitios variables en secuencias de ADN de <i>Hydropuntia cornea</i> para haplotipos de la región espaciadora <i>cox2-3</i> . Los haplotipos del haplogrupo GI están en color negro y los haplotipos del haplogrupo GII están marcados con color gris. El punto indica una misma base respecto de la secuencia del haplotipo C1.	64
TABLA 8. Medidas de diversidad genética para poblaciones de <i>Hydropuntia cornea</i> basadas en secuencias de la región espaciadora de la RuBisCo.	72
TABLA 9. Estadísticos de neutralidad calculados para las secuencias de la región espaciadora de la RuBisCo, en conjunto y por grupo (GI y GII), y ajustes de la distribución Mismatch bajo los modelos de expansión repentina y expansión espacial (τ).	74
TABLA 10. Estructura genética definida por SAMOVA.	77
TABLA 11. Valores de significancia calculados para los índices de fijación correspondientes a cada estructura de grupos definida por SAMOVA.	78
TABLA 12. Análisis de varianza (AMOVA) para la región espaciadora de la RuBisCo en las poblaciones de <i>Hydropuntia cornea</i> .	80
TABLA 13. Análisis de varianza molecular (AMOVA) y estructura genética para tres grupos de la región espaciadora de la RuBisCo en las poblaciones de <i>Hydropuntia cornea</i> .	80
TABLA 14. Matriz de distancias corregidas (en la posición superior de la matriz, resaltados en negritas) y distancias <i>p</i> no corregidas (en la posición de la matriz, no resaltados) de las secuencias de ADN correspondientes con los haplotipos encontrados en las poblaciones de <i>Hydropuntia cornea</i> para los cinco genes trabajados, y, en secuencias del GenBank	85

relacionadas con *H. cornea*.

TABLA 15. Distribución de los caracteres diagnósticos observados, de acuerdo con Dreckmann (2012) y Ardito *et al.* (2014), en 20 muestras representativas de los grupos genéticos GI y GII, en diferentes poblaciones de *Hydropuntia cornea*. **90**

TABLA 16. Resumen de la varianza total explicada en componentes principales. **92**

ÍNDICE DE APÉNDICES

	PÁGINA
APÉNDICE 1. Modificación al método de extracción de ADN por Chelax (Zuccarello 1999a).	137
APÉNDICE 2. Matriz de caracteres morfológicos diagnósticos (Dreckmann 2012 y Ardito <i>et al.</i> 2014) analizados estadísticamente.	138
APÉNDICE 3. Matriz genética de la región espaciadora de la RuBisCo para análisis en ARLEQUIN en formato ARP.	139
APÉNDICE 4. Matriz geográfica para análisis en SAMOVA en formato arp.	143
APÉNDICE 5. Matriz genética para análisis en SAMOVA en formato arp.	144
APÉNDICE 6. Matriz geográfica en formato geo para análisis en MANTEL.	146
APÉNDICE 7. Matriz genética en formato dist para análisis en MANTEL.	147
APÉNDICE 8. Secuencias del GenBank utilizadas en los análisis filogenéticos. Se proporciona para cada secuencia, la información de la localidad, números de acceso al GenBank y la referencia de la publicación.	148

APÉNDICE 9. Números de acceso al GenBank de los especímenes secuenciados en la presente tesis. En la tabla se indican los grupos genéticos (GI y GII), número de campo y números de acceso al GenBank para cada uno de los cuatro genes utilizados en los análisis de variación genética y filogenéticos.	149
APÉNDICE 10. Resumen de haplotipos encontrados para cada muestra con cada uno de los genes secuenciados. Se indica la localidad, clave de ADN, grupo genético (GI y GII) y haplotipos.	151
APÉNDICE 11. Productos del trabajo de tesis: Artículo 1.	134

RESUMEN

Hydropuntia cornea es una especie de alga roja estrictamente marina común en el Golfo de México y el Mar Caribe, caracterizada por presentar un amplio espectro de plasticidad fenotípica. Para determinar la variación genética al interior de sus poblaciones en México, se utilizaron 133 muestras recolectadas en 11 localidades a lo largo de la Península de Yucatán y tres en Venezuela y Brasil, las cuales fueron analizadas bajo la información de cinco marcadores moleculares organizados en dos grupos: las regiones espaciadoras RuBisCo, *cox2-3* y el gen ITS que fueron utilizados para análisis de variación genética y, los genes *rbcL* y COI utilizados para filogenia. Los resultados con el primer grupo de marcadores revelaron que al interior de las poblaciones mexicanas de *H. cornea*, existen dos grupos genéticamente diferenciados, GI y GII. El segundo grupo de marcadores reveló que estos grupos genéticos corresponden con dos especies conocidas para el área: *H. cornea* e *H. usneoides*. El mejor marcador para estudios de variación genética en la especie fue la región espaciadora de la RuBisCo. La emersión del Bloque de la Península de Yucatán durante el Mioceno temprano (hace 19 ma), inició el proceso de especiación que aisló geográficamente a Campeche y, que tras el cierre del Istmo de Panamá durante el Plioceno medio (hace 3.1 ma), terminó con la separación de la especie ancestral en las actuales especies *H. cornea* e *H. usneoides*. Dado que el proceso de especiación ente ellas ha sido muy reciente, su separación no fue completa. Aunque el flujo genético entre ambas especies se ha interrumpido, permanecen interconectadas en las redes haplotípicas. A diferencia de la región espaciadora *cox2-3*, la cual mostró tres haplotipos (C1-C3), la región espaciadora de la RuBisCo, reveló la mayor diversidad genética con 12 haplotipos (R1-R12). Dado que el haplotipo R1 (designado como posible ancestro) corresponde con *H.*

usneoides, se infiere que esta especie es la más parecida al ancestro de ambas especies. La reducción del tamaño poblacional de *H. cornea* e *H. usneoides*, favoreció, como resultado de un proceso de expansión demográfica reciente en ambas especies, el incremento de la variación genética al interior de sus poblaciones, principalmente para las poblaciones de Campeche, las cuales mostraron la mayor variación genética. La presencia del haplotipo R1 a ambos lados de la Península de Yucatán así como la composición haplotípica que revela una ruptura genética en Puerto Sisal, sugieren que la especie ancestral de *H. cornea* e *H. usneoides*, se originó en Campeche y desde ahí migró al resto del Mar Caribe hasta el norte de Brasil. Dada la distribución de los haplotipos R1-R12 al interior de las poblaciones, el Mar Caribe resultó ser un ambiente homogéneo en contraste con el Golfo de México, el cual, tanto por los constantes aportes de agua dulce, la falta de sustratos rocosos que faciliten el establecimiento de las especies y la convergencia de corrientes oceanográficas, lo convierten en un ambiente heterogéneo. Así pues, existe una relación entre la distancia genética y la distancia geográfica. La distribución de *H. cornea* está restringida al Caribe, mientras que a *H. usneoides* se le encuentra tanto en el Caribe, en simpatria con *H. cornea*, como en el Golfo de México, en donde es muy abundante y conspicua. Ambas especies están ausentes en Tabasco y Veracruz. A pesar de que Pernambuco es la localidad tipo de *H. cornea*, no se le encontró en esta localidad. Un tercer grupo genético, correspondiente con el haplotipo R12 exclusivo de Pernambuco, parece estar involucrado en la estructura genética de *H. cornea* e *H. usneoides*. Existe una alta variación morfológica al interior de *H. cornea* e *H. usneoides*, pero el rango de plasticidad fenotípica de ambas especies se sobrepone en un cien por ciento. La ausencia de caracteres morfológicos que las separen las coloca como un complejo morfológico de especies crípticas: *H. cornea*/*H. usneoides*.

ABSTRACT

Hydropuntia cornea is a strictly marine species of red algae common in the Gulf of Mexico and Caribbean Sea, characterized by having a broad spectrum of phenotypic plasticity. To determine the genetic variation within populations in Mexico, 133 samples collected from 11 localities along the Yucatan Peninsula and three in Venezuela and Brazil, were analyzed under the information of five molecular markers organized into two groups: RuBisCo spacer, *cox2-3* spacer and ITS for genetic variation analysis and *rbcL* and COI for phylogenetic analysis. The results with the first group of markers revealed that within the Mexican populations of *H. cornea*, there are two genetically distinct groups, GI and GII. The second group of markers revealed that these genetic groups correspond to two species known for the area: *H. cornea* and *H. usneoides*. The best marker for studies of genetic variation in the species was RuBisCo spacer. The emergence of the block the Yucatan Peninsula during the Early Miocene (last 19 my), began the process of speciation that geographically isolated Campeche and that after the closure of the Isthmus of Panama during the middle Pliocene (makes 3.1 m), finished with the separation of the ancestral species into the current species *H. cornea* and *H. usneoides*. Since the speciation process between them has been very recent, the separation between both species was not complete. Although gene flow between the two species has been discontinued, they remain interconnected networks haplotype. Unlike *cox2-3* spacer, which showed three haplotypes (C1-C3), RuBisCo spacer, revealed the greatest genetic diversity with 12 haplotypes (R1-R12). Since R1 haplotype (designated as a possible ancestor) corresponds to *H. usneoides*, it follows that this species is most similar to the ancestor of both species. The reduction in population size of *H. cornea* and *H. usneoides* favored as a result of a process of recent

demographic expansion in both species, increased genetic variation within populations, especially for populations of Campeche, which showed the greatest genetic variation. The presence of haplotype R1 on both sides of the Yucatan Peninsula as well as the haplotype genetic composition that reveals a genetic break in Puerto Sisal, suggests that the ancestral species of *H. cornea* and *H. usneoides*, originated in Campeche and migrated from there to the rest of the Caribbean Sea to the north of Brasil. Given the distribution of R1-R12 haplotypes within populations, the Caribbean Sea proved a homogeneous environment in contrast to the Gulf of Mexico, which, therefore the constant input of fresh water, lack of rocky substrates to facilitate the establishment of the species and the convergence of oceanographic currents, make it a heterogeneous environment. Thus there is a relationship between genetic distance and geographical distance. *Hydropuntia cornea* distribution is restricted to the Caribbean, while *H. usneoides* it is found in the Caribbean, in sympatric with *H. cornea*, as in the Gulf of Mexico, where it is abundant and conspicuous. Both species are absent in Tabasco and Veracruz. Although Pernambuco is the type locality of *H. cornea*, it was not found in this location. A third genetic group, corresponding to the unique haplotype R12 from Pernambuco, appears to be involved in the genetic structure of *H. cornea* and *H. usneoides*. There is a high morphological variation within *H. cornea* and *H. usneoides*, but the range of phenotypic plasticity of both species is superimposed on one hundred percent. The absence of morphological characters that separate them, places them as a morphological complex of cryptic species: *H. cornea/H. usneoides*.

1. INTRODUCCIÓN

Hydropuntia cornea (J. Agardh) M.J. Wynne es una especie de alga roja del orden Gracilariales (Rhodophyta) común en el Atlántico americano. Se distribuye desde el sur de Florida hasta el norte de Brasil en Pernambuco, siendo esta su localidad tipo (Taylor 1960; Wynne 2011). Particularmente en México, ha sido registrada al sur de Veracruz y alrededor de toda la Península de Yucatán (Dreckmann 2012), donde es muy abundante. El alto contenido de agar en su pared celular (70%), la han convertido en un recurso económicamente muy importante (Robledo & Freile 1997), por lo que, aunque en México no se haga un manejo sustentable de la especie, su recolección y exportación constituye una alternativa económica para los pescadores del área en temporada de veda (Orduña *et al.* 2002). Es una especie bentónica, básicamente epilítica (creciendo en rocas) o pasmofítica (creciendo en arena), no existen formas sésiles; es estrictamente marina (requiere altos niveles de salinidad para su desarrollo) y se reproduce tanto de manera sexual, por meiosporas (tetrasporas) y mitosporas (carposporas), como de manera asexual, por fragmentación del talo. Ambas formas de reproducción son dispersadas por corrientes oceánicas (Dreckmann 2012).

Morfológicamente, *Hydropuntia cornea* se caracteriza por presentar un talo erecto, robusto, ligeramente elástico, de consistencia cornea, muy frecuentemente irregular y con protuberancias, 8-25 (30) cm de altura; verde pálido a café oscuro, con manchas más claras (amarillo paja) a lo largo del talo. Ramificación abundante e irregular. Ramas complanadas a cilíndricas y de bases continuas (sin constricciones). Segmentos apicales con tendencia a la unilateralidad (ramificación pectinada). Pie de fijación inconspicuo, discoidal. Superficie lisa. Ápices redondeados. Estípites largo y robusto. Células subcorticales de 30-40 (45) μm

en diámetro. Células medulares de 100-320 μm en diámetro que van disminuyendo su tamaño hacia la superficie, más de 10 capas a lo largo de una línea media imaginaria. Células corticales superficiales claviformes o piriformes, 10-15 μm en diámetro. Espermatangios en conceptáculos multicavitarios, subcorticales y muy variables en forma, 50-70 (100) μm en diámetro por 60-80 (100)-120 μm de largo. Cistocarpos amplios, 800-2100 μm en diámetro, sésiles y no apiculados, en corte la masa carposporangial madura tiene aspecto de media luna y se distingue claramente de la zona estéril o interfértil del gonimoblasto, este es amplio y masivo, una pequeña línea de luz es visible entre las carposporas maduras y el pericarpo externo. Células tubulares en contacto entre el gonimoblasto y el pericarpo interno. Tetrasporangios localizados a lo largo de la corteza, 25-30 (35) μm en diámetro, delimitados por células corticales alargadas (Dreckmann 2012) (Figura 1).

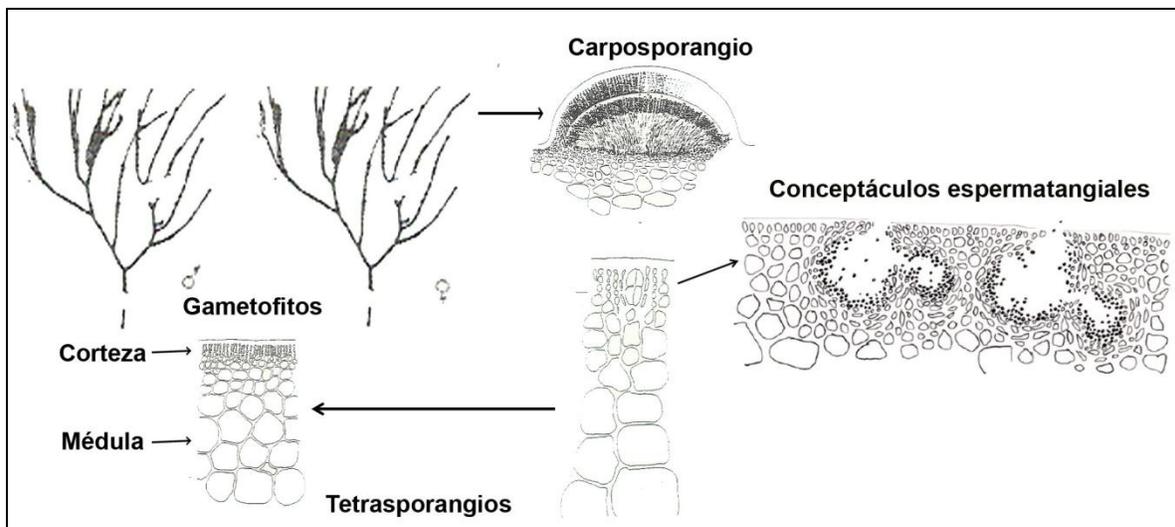


FIGURA 1. Representación esquemática de los principales caracteres que definen a *Hydropuntia cornea*, resaltando a las estructuras vegetativas: médula y corteza (izquierda) y a las estructuras reproductoras: cistocarpos, espermatangios y tetrasporangios (derecha). Modificado de Dreckmann 2012 y Dreckmann & Sentíes 2014).

Sin embargo, el amplio espectro de plasticidad morfológica que exhibe al interior de sus poblaciones (Figura 2), ha dificultado el establecimiento de sus límites con otras de las especies del género con quienes comparte distribución en la Península de Yucatán. Tal es el caso con *Hydropuntia usneoides* (C. Agardh) Gurgel & Fredericq, especie morfológicamente muy parecida con quien no sólo comparte el intervalo de distribución (Núñez-Resendiz *et al.* 2015), sino que además, se sobrepone en casi la totalidad de sus caracteres morfológicos, “diferenciándose” únicamente en que *H. usneoides* es “más suave, más delgada (0.8-1.0 mm) y ligeramente más ramificada” (Dreckmann 2012).

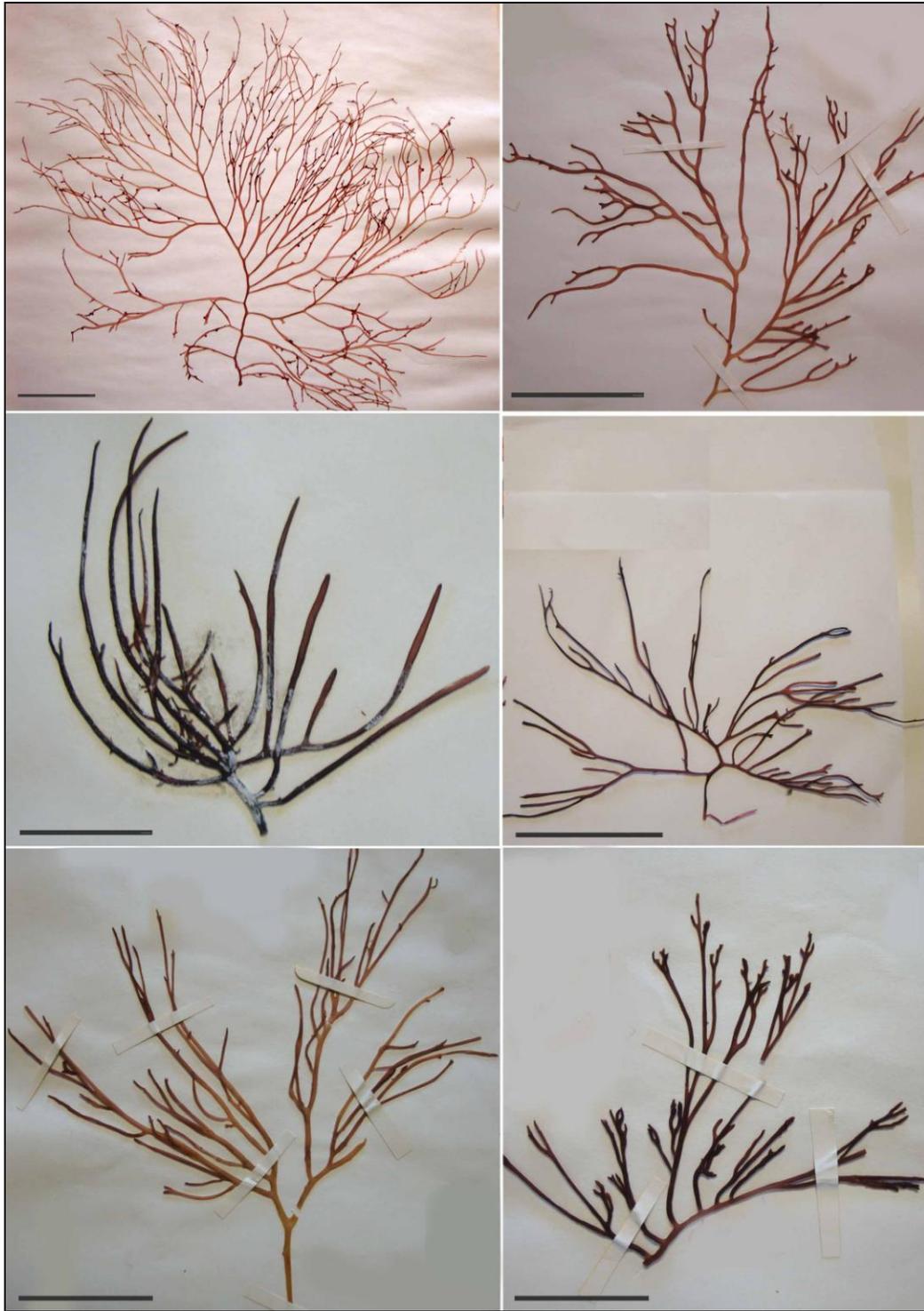


FIGURA 2. Espectro de variación morfológica en poblaciones del Caribe mexicano de *Hydropuntia cornea*. Ejemplares de herbario referidos en Dreckmann (2012). Barra de escalas= 4 cm.

La taxonomía asistida molecularmente (Cianciola *et al.* 2010), ha ayudado a clarificar nuestro conocimiento sistemático, ya que permite una mejor comprensión de las relaciones entre grupos cuyos individuos son muy difíciles de identificar debido a la convergencia evolutiva y/o a la influencia del ambiente sobre la expresión fenotípica (Núñez-Resendiz *et al.* 2015).

Los estudios de diversidad genética por lo tanto, constituyen un componente fundamental de la biodiversidad que cuantifica la magnitud de la variabilidad genética al interior de las poblaciones de una especie, y, que a través de las medidas de diversidad genética, han contribuido a la comprensión de la naturaleza de las fuerzas evolutivas que actúan sobre los patrones de variación genética y la historia evolutiva de las especies (Yow *et al.* 2011).

1.1. CONCEPTOS DE ESPECIE Y MODELOS DE ESPECIACIÓN

A lo largo de la historia de la sistemática se han propuesto numerosos conceptos de especie (Morrone 2013). Los principales conceptos de especie relacionados con la temática del presente trabajo de tesis son: (1) el concepto de **especie biológica**, referido a un grupo de poblaciones naturales, genéticamente similares, interfértiles y aisladas reproductivamente de otros grupos semejantes (Mayr 1957); (2) el concepto de especie **genética**, referido a un grupo de organismos que poseen el potencial de intercambio genético (referido a los límites para la difusión de nuevas variantes genéticas mediante flujo genético) o demográfico (referido a los factores que definen el nicho fundamental de la especie) (Dobzhansky 1950; Simpson 1943; Templeton 1989); (3) el concepto de **especie morfológica o morfoespecie**, referido a individuos morfológicamente similares, generalmente asociados a una distribución geográfica; (4) concepto de **especie tipológica**, asociado a un grupo de

organismos que se asignan a una especie si comparten ciertos atributos fijos o esenciales (Ruse 1987); (5) concepto de **especie críptica** referido a especies genéticamente aisladas pero indistinguibles morfológicamente y; (6) concepto de especie **filogenética**, referido a conjunto de organismos agrupados a partir de evidencia monofilética, usualmente por sinapomorfías (Morrone 2013).

Por otro lado, están los **modelos de especiación** referidos al conjunto de procesos que explican el origen de nuevas especies por **factores intrínsecos** (cambios genéticos y cromosómicos que ocurren en los linajes) y **extrínsecos** (atributos espaciales o geográficos que aíslan a los linajes). Los principales modelos aquí referidos son: (1) **especiación alopátrica**, que consiste en la separación geográfica de dos poblaciones relativamente grandes a partir de una población ancestral, a cual adquiere independencia como linajes (Morrone 2013) y; (2) **especiación simpátrica**, la cual ocurre cuando se diferencian una o más especies nuevas a partir de una especie ancestral sin que exista segregación geográfica de las poblaciones (Wiley 1981).

1.2. ALGUNOS CONCEPTOS RELACIONADOS CON LOS ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

Entendemos como **plasticidad fenotípica** a la propiedad de un genotipo de producir más de un fenotipo para un organismo como respuesta a diferentes condiciones ambientales (Schilling & Pigliucci 2004). Sin embargo, no todos los genotipos responden diferencialmente al ambiente y no todos los cambios ambientales provocan fenotipos diferentes, es decir, en organismos que comparten las mismas condiciones ambientales, es posible encontrar más de un genotipo (**variación genética**) bajo un mismo fenotipo. Así,

cuando se producen dos fenotipos diferentes asociados a una estructura genética, estamos hablando de verdadera **variación morfológica** (Pigliucci 2001). En este sentido, la **genética de poblaciones** tiene como objetivo describir la estructura genética (oculta bajo la plasticidad y/o monotonía fenotípica) y la distribución de las frecuencias alélicas para explicar la evolución a micro escala. La **estructura genética** de una población, es el resultado de los procesos microevolutivos y demográficos que actúan entre y dentro de las poblaciones, así como la biogeografía histórica de los linajes genéticos (Wenink *et al.* 1996). La **frecuencia alélica**, se refiere a la proporción observada de un alelo específico respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado en la población (Rodríguez-Arnaiz *et al.* 2009). A una **población** la entendemos como un grupo local de individuos que pertenecen a la misma especie (Rodríguez-Arnaiz *et al.* 2009).

La **diversidad genética** dentro de una población tiene efectos ecológicos sobre su establecimiento, desarrollo y sostenibilidad, así como en sus interacciones dentro de una comunidad o ecosistema (Hughes *et al.* 2008). Dichos efectos e interacciones son estudiados por la **filogeografía**, que es la rama de la biogeografía que trata de los principios y procesos que rigen las distribuciones geográficas de los linajes genealógicos o filogenéticos, especialmente entre y dentro de las especies cercanamente relacionadas (Avice 1998; 2000). El análisis de éstos y su interpretación, requieren de datos provenientes tanto de la **filogenia molecular** (macroevolución) y la **genética de poblaciones** (microevolución), como de la geología y la geografía histórica (Hernández-Baños *et al.* 2005). Los estudios filogeográficos requieren de una serie de análisis que permitan la obtención de resultados robustos sobre la relación entre la estructura poblacional y la distribución e historia de las especies. Los análisis más comúnmente empleados para dicho propósito son primeramente la construcción de árboles. Principalmente son de dos tipos, los

árboles de parsimonia y los árboles probabilísticos (Máxima verosimilitud e inferencia Bayesiana).

Los árboles de parsimonia consisten básicamente en una **red haplotípica**, la cual se define como el conjunto de nodos que trazan las relaciones evolutivas entre haplotipos. Existen varios métodos para la construcción de redes, sin embargo, el método empleado con mayor frecuencia es el método de parsimonia estadística, ya que es el método más adecuado para la evaluación de la robustez de la construcción de árboles a partir de datos que contienen pocos sitios parsimoniosamente informativos (Templeton *et al.* 1992; Templeton & Sing 1993). Los árboles de parsimonia se construyen con base en los haplotipos de la población. Un **haplotipo** es un arreglo único en la composición alélica dentro de una población y tienden a heredarse juntos. Se manifiestan como **haplotipos ancestrales**, que son haplotipos ya existentes en una población que pueden sufrir, a lo largo de muchas generaciones, recombinaciones que pueden alterar las combinaciones de los polimorfismos de un gen y que se reconocen por el número de conexiones con otros haplotipos en un red y el número de individuos en la población que lo presentan (Templeton *et al.* 1992); **haplotipos únicos**, presentes en un sólo organismo o; **haplotipos compartidos**, conformados por individuos de distintas poblaciones. La presencia de estos últimos indica que existe conexión genética entre las poblaciones. Si no existe conexión genética entre ellas se dice que las poblaciones están aisladas, es decir, existe **aislamiento por distancia** (Wright 1943), el cual se calcula mediante una prueba de **MANTEL** que evalúa la significancia estadística de la correlación de una matriz alélica y una matriz geográfica (Sokal 1979).

Las variaciones moleculares genéticas (alélicas o nucleotídicas) dentro de las secuencias, proporcionan la descripción de la variación genética de los organismos (Hedrick 2000).

Una vez obtenida la red haplotípica, es posible utilizar esta variación para conocer las relaciones evolutivas entre los alelos o haplotipos, así como sus frecuencias y distribución espacial (Templeton 1998).

Por otro lado, los **estadísticos de F** (Wright 1951) describen la estructura genética de los organismos diploides a partir de las frecuencias alélicas obtenidas de diferentes localidades geográficas para estudiar el flujo génico o para cuantificar la subdivisión de la población (Wright 1931). Estos estadísticos son **F_{is}** (correlación entre alelos homólogos en los individuos con referencia a la población local), **F_{it}** (correlación alélica con referencia a la población local) y **F_{st}** (varianza de la frecuencia alélica de las poblaciones). Este último es el más utilizado. Cuando una población llega a un estado de equilibrio como resultado del balance entre la mutación, la deriva génica y el intercambio genético, el **flujo génico** dentro y entre las poblaciones reales puede expresarse como una **tasa de migración m** . Ésta se define como la proporción de alelos en cada generación que es de origen migratorio. Aún cuando es difícil de separar la influencia de la deriva génica y del flujo génico, el producto de Nm (donde N es el tamaño de una población subdividida equitativamente bajo un “modelo de isla” y que intercambia alelos con igual probabilidad) puede estimarse a partir de los estadísticos F de Wright, de los alelos privados (aquellos que se encuentran solo en una población) y de las filogenias alélicas (Avice 1994; Hey & Machado 2003).

Con base en las distancias genéticas entre los individuos, obtenidas a partir de un análisis de AMOVA, se pueden obtener estimaciones provisionales de tiempo absoluto de coancestría. Estos estimados de tiempo dan como resultado frecuencias pareadas de distribuciones de tiempos de coancestría conocidas como **distribuciones *Mismatch***, las cuales pueden ser **unimodales** (en poblaciones que han sufrido reciente expansión demográfica) o **multimodales** (en poblaciones en equilibrio demográfico) (Schneider *et al.*

2000). Los datos de distribución Mismatch, son representados en un histograma (**distribución observada**), en donde son comparados con un modelo de una población en expansión repentina (**distribución esperada**) (Rogers & Harpending 1992).

El **AMOVA** (Análisis de Varianza Molecular), es un análisis de varianza poblacional, a partir de datos moleculares, que estima diferentes niveles de diversidad genética expresados en los índices **F_{CT}** (asociado a la variación entre grupos), **F_{ST}** (asociado con la variación dentro de poblaciones) y **F_{SC}** (asociado a la variación entre poblaciones dentro de los grupos), con la intención de evaluar la existencia de estructura genética en una población. Para ello, es importante conocer la **diversidad haplotípica** (probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes) y la **diversidad nucleotídica** (probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición y tomados al azar sean distintos) (Excoffier *et al.* 1992).

El **SAMOVA** (Análisis espacial de varianza molecular), es un análisis espacial de varianza que permite estimar si existe una diferencia significativa entre los haplotipos de una especie a través de la definición de grupos geográficamente homogéneos (Dupanloup *et al.* 2002). También permite identificar barreras geográficas entre los grupos.

1.3. LOS MARCADORES MOLECULARES

El ADN es la molécula informativa para los análisis filogenéticos y de genética de poblaciones. La mayoría de los estudios de filogeografía se basan en datos de secuencias obtenidas de diferentes genes, ya que a diferencia de los primeros análisis de genética de poblaciones realizados con aloenzimas (electroforesis de proteínas) en los que se reveló poca o nula diferenciación genética intraespecífica (Zink *et al.* 1991; Avise 2000), los

estudios realizados con ADN proporcionaron los primeros datos accesibles de genealogías de genes a nivel intraespecífico.

Por lo tanto, el empleo de marcadores moleculares, juega un papel prioritario en el establecimiento de la diversidad genética de las especies altamente plásticas (Bird & McLachlan 1982), como lo son las especies del género *Gracilaria* en sentido amplio (Lyra *et al.* 2015a). Los **marcadores moleculares** son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético. Las biomoléculas que pueden ser marcadores moleculares son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida). Un marcador molecular **monomórfico** es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es **polimórfico**. A veces el grado de variación es tal que se denominan **hipervariable**. Los avances de la tecnología del DNA recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN, consiguiendo estabilidad y precisión en la identificación de especies y variedades (Claros-Díaz 2015).

Bajo este panorama, en estudios de filogenia, diversidad genética y/o filogeografía de algas altamente plásticas, los cuales se describen en la sección de antecedentes (Estudios taxonómicos molecularmente asistidos), han sido empleados diversos marcadores moleculares. Los más comunes, utilizados en Gracilariales, se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1. Principales marcadores moleculares comúnmente empleados en estudios de filogenia, diversidad genética y/o filogeografía de especies de Gracilariales.

Genoma	Marcadores moleculares	Referencia	Tipo de estudios en los que se utilizan
Cloroplasto	Región espaciadora de la RuBisCo	Destombe & Douglas 1991; Byrne <i>et al.</i> 2002; Iyer <i>et al.</i> 2005; Guillemin <i>et al.</i> 2008	Variación genética y filogeografía
	<i>rbcL</i>	Gurgel & Fredericq 2004; Gurgel <i>et al.</i> 2004; M.S. Kim <i>et al.</i> 2006	Filogenia
Mitocondria	Región espaciadora <i>cox2-3</i>	Rueness 2005; Destombe <i>et al.</i> 2010; Pareek <i>et al.</i> 2010; García-Rodríguez <i>et al.</i> 2013; Yang <i>et al.</i> 2013	Variación genética y filogeografía
	COI	Yang <i>et al.</i> 2008; Yow <i>et al.</i> 2011, 2013	Filogenia, Código de barras, variación genética y filogeografía
Núcleo	ITS	Goff <i>et al.</i> 1994	Filogenia y variación genética

El uso de estos marcadores en estudios a nivel intraespecífico, han permitido, entre otras cosas, encontrar estructura genética, especies crípticas, especies introducidas mal identificadas, patrones de distribución geográfica, identidad taxonómica y restablecimiento de especies (Díaz-Larrea *et al.* 2015).

Bajo lo anteriormente expuesto, el objetivo principal del presente estudio fue determinar si existía variación genética al interior de las poblaciones mexicanas de *Hydropuntia cornea*, así como las causas y el significado evolutivo de dicha variación, a partir de la información proporcionada por cinco marcadores moleculares (las regiones espaciadoras RuBisCo y *cox2-3*, *rbcL*, COI e ITS1 y 2).

2. ANTECEDENTES

El orden Gracilariales S. Fredericq & M. H. Hommersand reúne a un conjunto de 6 398 especies (Norton *et al.* 1996; Dawes & Mathieson 2008) de amplia distribución mundial, caracterizadas por presentar talos uniaxiales bien definidos en ejes, ramas y un pie de fijación, así como una estructura anatómica pseudoparenquimatosa con desarrollo de subcorteza y corteza (Dreckmann 2002, 2012; Dreckmann & Senties 2014). La única familia en el orden es Gracilariaceae, la cual a su vez, está integrada por los géneros *Gracilaria* Greville, dividido en los subgéneros *Textoriella* Yamamoto y *Gracilaria* Yamamoto (Dreckmann & Senties 2009); *Gracilariopsis* E. Y. Dawson; *Gracilariophila* Setchell *et* Wilson; *Congracilaria* Yamamoto; *Hydropuntia* Montagne; *Curdiea* Harvey y, *Melanthalia* Montagne (Gurgel & Fredericq 2004; Fredericq & Hommersand 1990; Guiry & Guiry 2015). Sin embargo, la sistemática del grupo ha sido altamente controvertida debido a la alta plasticidad fenotípica que exhiben varios de los miembros del grupo (Bird & MacLachlan 1982; Santelices & Valera 1993). Consecuentemente, la delimitación taxonómica de estos taxa ha sido difícil, y en algunos casos casi imposible, a partir de la base sólo morfológica (Gurgel & Fredericq 2004; Guillemin *et al.* 2008).

En los litorales mexicanos han sido registrados cuatro géneros: *Gracilariophila* sólo en el Pacífico, *Gracilaria* y *Gracilariopsis* en el Pacífico y el Atlántico e *Hydropuntia* sólo en el Atlántico (Dreckmann & Senties 2014). De estos géneros, los más comunes en el Atlántico son *Gracilaria* e *Hydropuntia* (Wynne 2011).

2.1. ASPECTOS TAXONÓMICOS DEL GÉNERO *Hydropuntia*

Desde la circunscripción del género *Hydropuntia*, su independencia respecto de *Gracilaria* ha sido ampliamente debatida por los especialistas en el grupo debido al gran parecido morfológico que presentan las especies de ambos géneros, siendo la única diferencia entre ellas, la estructura y organización de sus espermatangios (Wynne 1989; Fredericq & Hommersand 1990; Dreckmann 2012). Originalmente, las especies del género *Hydropuntia* fueron descritas como un grupo de especies de *Gracilaria* diferenciadas del resto por presentar conceptáculos espermatangiales subcorticales multicavitarios. Bajo esta característica, se crea al género *Polycavernosa* C.F.Chang & B.M.Xia (Zhang & Xia 1963), el cual, fue pronto puesto en sinonimia con *Hydropuntia* debido a que era el nombre más antiguo disponible (Wynne 1989). Dos años después de la validación del género *Hydropuntia*, se describió una nueva especie (*Gracilaria mixta* I.A. Abbott, Zhang et Xia), la cual presentaba tanto conceptáculos del tipo de *Gracilaria* como del tipo *Hydropuntia* (Abbott et al. 1991). En consecuencia, dado que la característica de los conceptáculos ya no era exclusiva de los miembros del grupo, se propuso la reintegración de las especies de *Hydropuntia* nuevamente al género *Gracilaria*. Sin embargo, previa a la publicación de *G. mixta*, Fredericq & Hommersand (1990) habían propuesto como otro carácter discriminante entre las especies de *Gracilaria* e *Hydropuntia*, a la formación de las fusiones celulares en el gonimoblasto posteriores a la fecundación, característica que no presentaba *G. mixta*. Aunque dicha propuesta fue aceptada por un buen número de especialistas (Papenfuss 1966; Yamamoto 1975; Abbott & Norris 1985; Abbott et al. 1991; Gargiulo et al. 1992; Dreckmann 2012), la validez diagnóstica del carácter no convenció a todos. A pesar de la controversia, a la fecha existe suficiente evidencia proporcionada por marcadores

moleculares, para sustentar la independencia de ambos géneros (Bellorin *et al.* 2004; Gurgel & Fredericq 2004; Gargiulo *et al.* 2006; Kim *et al.* 2008a). Sin embargo, en la última filogenia molecularmente asistida para el grupo (Lyra *et al.* 2015a), se demostró la naturaleza parafilética de *Hydropuntia*, por lo que se propuso el traslado de las especies nuevamente a *Gracilaria* (Guiry & Guiry 2015). Si bien el género *Hydropuntia* es de naturaleza parafilética, la filogenia mostrada por Lyra *et al.* (2015a) reveló de igual manera subclados genéricos al interior de *Gracilaria s.l.* que no fueron resueltos en dicha publicación, por lo que algunos autores continúan manteniendo el nombre *Hydropuntia* (Núñez-Resendiz *et al.* 2015).

Bajo el género *Hydropuntia*, han sido registradas 16 especies cuya distribución está restringida al Indo-Pacífico, norte de Australia, Sudáfrica y Atlántico tropical americano (Dreckmann & Sentíes 2014). Particularmente para el Golfo de México y el Caribe mexicano se han registrado cuatro especies (*H. caudata* (J. Agardh) Gurgel & Fredericq, *H. cornea*, *H. crassissima* (P.L. Crouan & H.M. Crouan) M.J. Wynne y *H. usneoides*) exclusivamente marinas (Dreckmann 2012), características de los ambientes arrecifales sumergidos de la Península de Yucatán (Dreckmann & Sentíes 2014). Pocos son los estudios taxonómicos relacionados con estas especies en el área. Los trabajos de tipo monográfico con que se cuentan son los de Taylor (1928, 1935, 1960) y Dreckmann (1998, 2012). Debido a su abundancia e importancia económica, *Hydropuntia cornea* no sólo ha sido registrada más a menudo en la zona sino que también ha sido el blanco de diversos estudios aplicados (Robledo & Freile 1997; Freile & Robledo 1997; Orduña & Robledo 1999).

2.2. EL COMPLEJO *Hydropuntia cornea* E *Hydropuntia usneoides*

Hydropuntia cornea fue descrita por Agardh (1852) a partir de un espécimen recolectado en Pernambuco, Brasil. Morfológicamente, esta especie es muy similar a *H. usneoides* (como *Sphaerococcus usneoides* C. Agardh) recolectada en una localidad imprecisa también en Brasil (Agardh 1822). Los caracteres que han sido empleados como diagnósticos para segregar a una especie de otra, han sido básicamente el patrón de ramificación, las tallas celulares y el número de capas en la médula y la corteza. Bajo estos criterios, *H. cornea* se caracterizaba por presentar tres a seis capas de células corticales y 17 a 18 capas de células medulares, mientras que *H. usneoides*, se caracterizaba por presentar dos capas de células corticales y de seis a nueve capas de células medulares (Taylor 1960; Fredericq & Hommersand 1989; Schneider & Searles 1991; Ardito *et al.* 2014). Sin embargo, para las poblaciones mexicanas, estos caracteres se sobreponen casi en su totalidad (Dreckmann 2012), incluso el número de capas corticales y medulares, varió a lo largo (ápice, medio, base) de un mismo individuo (Núñez-Resendiz *et al.* 2015). A pesar de ello, el enorme espectro de variación morfológica de una especie, está presente también en la otra. Taylor (1960), quien también notó el gran parecido entre ambas especies, propuso así a las medidas celulares como la única diferencia entre ellas, sin embargo, no proporcionó descripción alguna de estas medidas e incluso reportó a ambas especies como identificaciones erróneas de *Gracilaria debilis* (Forsskål) Børgesen. Bajo este panorama, Dreckmann (2012) propone como única diferencia entre ambas especies, que *H. usneoides* era más delgada, delicada y menos ramificada que *H. cornea*. A pesar de esta aparente sobreposición de caracteres morfológicos, cuando las especies han sido recolectadas en ambientes alopátricos, ha sido posible separarlas. Incluso, los estudios moleculares han

revelado que ambas especies corresponden con grupos genéticamente distintos (Gurgel & Fredericq 2004). Sin embargo, en condiciones similares, las morfologías de ambas se sobrepone a tal grado que identificar especies distintas es casi imposible (Dreckmann 2012). Esto podría explicar en gran parte por qué *Hydropuntia cornea* ha sido a menudo reportada como especie típica y abundante en las costas del Golfo de México y el Caribe mexicano, mientras que *H. usneoides* está restringida a Quintana Roo y ha sido registrada como especie rara (Mateo-Cid & Mendoza-González 1991; Dreckmann 2012).

En la actualidad, a partir de evidencia molecular combinando estudios de variación genética con filogenia y morfología, descritos a detalle en el cuerpo de la presente tesis, ambas especies fueron propuestas como parte de un complejo de especies crípticas alrededor de la Península de Yucatán (Núñez-Resendiz *et al.* 2015).

2.3. ESTUDIOS TAXONÓMICOS MOLECULARMENTE ASISTIDOS

Diferentes marcadores moleculares han sido empleados en estudios de taxonomía de Gracilariales molecularmente asistidos, entre estos están los mitocondriales, de cloroplasto y de núcleo. El empleo de estos marcadores ha permitido resolver diferentes problemáticas a niveles inter e intraespecíficos en estudios con diversos enfoques. De estos, los principales enfoques han sido diversidad genética y filogenia. En cuanto a los estudios de diversidad genética, dicha herramienta ha permitido detectar estructura genética y distribución haplotípica al interior de las poblaciones (Destombe & Douglas 1991; Yang *et al.* 2008, 2013; Yow *et al.* 2011; 2013; Gulbransen 2012; García-Rodríguez *et al.* 2013) especies crípticas (Cohen *et al.* 2014; Saunders 2009; Núñez-Resendiz *et al.* 2015); especies invasoras (Kim *et al.* 2010; García-Rodríguez *et al.* 2013); especie introducidas

(Gulbransen *et al.* 2012; Ruessens 2005); patrones biogeográficos y de distribución (Guillemin *et al.* 2014). En cuanto a los estudios filogenéticos y de taxonomía, están las filogenias moleculares (Gurgel & Fredericq 2004; Gurgel *et al.* 2004; Iyer *et al.* 2005; Gargiulo *et al.* 2006; Kim *et al.* 2006; Pareek *et al.* 2010; Lyra *et al.* 2015a); los estudios que han permitido la delimitación taxonómica de especies (Goff *et al.* 1994; Destombe *et al.* 2010); restablecimiento de especies (Gargiulo *et al.* 2006; Kim *et al.* 2008 a y b); descripción de nuevas especies (Bird *et al.* 1986; Muangmai *et al.* 2014; Lyra *et al.* 2015b); nuevos registros (Bellorin *et al.* 2004) y nuevas combinaciones (Conklin *et al.* 2014).

De estos trabajos, únicamente dos han sido realizados para México, ambos de diversidad genética: García-Rodríguez *et al.* (2013) para el Pacífico con *Gracilaria parvispora* y Núñez-Resendiz *et al.* (2015) para el Golfo de México y Caribe mexicano con *Hydropuntia cornea* e *H. usneoides*.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Las poblaciones de *Hydropuntia cornea* en el Atlántico mexicano constituyen una metapoblación homogénea o hay diferenciación genética y estructura poblacional?

Si hay diferenciación genética ¿El aislamiento geográfico entre las poblaciones de *Hydropuntia cornea* ha disminuido el flujo genético generando una diversidad y estructura genética? ¿Existen patrones biogeográficos en las poblaciones?

¿Existe flujo genético entre las poblaciones de *Hydropuntia cornea* del Golfo de México y las poblaciones del Caribe? ¿Existe variación genética entre las poblaciones de ambas regiones? Si existe variación genética entre las poblaciones de *Hydropuntia cornea* en ambas regiones ¿hay diferencias morfológicas asociadas? ¿Existen procesos de especiación al interior de las poblaciones de *Hydropuntia cornea* en el Atlántico mexicano?

4. HIPÓTESIS

Si la variabilidad morfológica descrita para *Hydropuntia cornea* es producto de una plasticidad fenotípica como respuesta a un medio ambiente dinámico y cambiante, entonces no habrá estructura genética al interior de las poblaciones del Golfo de México y el Caribe mexicano.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la variación genética en las poblaciones de *Hydropuntia cornea* en las costas del Golfo de México y el Caribe mexicano.

5.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener las secuencias nucleotídicas de los genes *rbcL*, COI e ITS, y, de las regiones espaciadoras RuBisCo y *cox2-3*.
- Describir la estructura genética al interior de las poblaciones de *Hydropuntia cornea*.
- Obtener medidas de diversidad genética haplotípicas y nucleotídicas para las poblaciones de *Hydropuntia cornea*.
- Describir la distribución de la estructura genética al interior de las poblaciones de *Hydropuntia cornea*.
- Evaluar las relaciones genealógicas, así como determinar las distancias e índices de diversidad genética entre las poblaciones, para estimar posibles eventos históricos y geológicos que influyeron en la distribución geográfica actual de la especie en México.
- Examinar la estructura jerárquica de las poblaciones.
- Caracterizar los patrones de distribución espacial de la variación genética y detectar posibles barreras genéticas.
- Determinar si existe alguna relación entre la distancia genética y la distancia geográfica.
- Determinar a qué corresponde la variación genética, si es que la hay, en las poblaciones de *Hydropuntia cornea*.
- Describir la variación morfológica asociada a la variación genética en las poblaciones de *Hydropuntia cornea*.
- Explorar si existe un proceso de especiación al interior de las poblaciones y en su caso, discutir de cuál se trata.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. ÁREA DE ESTUDIO

6.1.1. Características generales

El Atlántico es el segundo océano más extenso de la Tierra y comprende aproximadamente el 20% de su superficie. El Golfo de México y el Mar Caribe se encuentran comprendidos en este océano.

En el centro, emerge una plataforma continental que abarca una extensión de 300 000 km² que separa al Golfo de México y el Caribe, a esta plataforma la conocemos como Península de Yucatán, región en la que se llevó a cabo el presente estudio dada la ausencia de la especie en Veracruz y Tabasco (ver Tabla 2, en Muestreo).

La Península de Yucatán es una de las cinco zonas fisiográficas de la República mexicana y representa el 2% de la superficie del país. Dada la diversidad de habitats, representa una región propicia para el establecimiento de diferentes comunidades acuáticas, tales como arrecifes coralinos, pastos marinos, manglares y macroalgas marinas bentónicas (Dreckmann & Senties 2013).

Topográficamente, se puede dividir en planicie norte, Sierrita de Ticul y planicie del sur. Cabe mencionar que de norte a sur la elevación aumenta ligeramente, lo cual se explica más adelante. Esta zona abarca, como unidad fisiográfica/geológica, tanto el territorio mexicano, el Petén guatemalteco y el norte de Belice. En la península, los rasgos orogénicos (formación de montañas) están prácticamente ausentes, lo que es singular en el contexto nacional; 90% de su superficie está a menos de 200 msnm y la Sierrita de Ticul es

la única elevación prominente. La península carece de drenaje superficial debido a la litología (relativo a las rocas), y el río Hondo en la frontera con Belice es el único sistema fluvial de la península (Hernández-Cervantes 2015; Vilchis-Alfaro 2015).

El clima de la península de Yucatán es cálido-subhúmedo con lluvias en verano, sin embargo, presenta un gradiente de precipitación que aumenta de noroeste a sureste, lo cual se refleja en la vegetación, desde la de zonas áridas en el noroeste, pasando por selvas bajas y medianas subcaducifolias y caducifolias (es decir, que pierden en parte o totalmente las hojas en la estación de secas), hasta selvas altas en el sur, cerca de Chiapas. En verano se presentan huracanes y en invierno “nortes” (Ortiz-Pérez & De la Lanza-Espino 2006).

6.1.2. Oceanografía

El Golfo de México es un sistema semi-cerrado con una entrada de agua oceánica por el Mar Caribe a través del Canal de Yucatán, que tiene una profundidad de 1900 m, y con una salida al Océano Atlántico a través del Estrecho de la Florida, entre la Península de Florida y la Isla de Cuba, en donde la profundidad es de alrededor de 900 m (De la Lanza 2004).

En el Golfo de México son de particular relevancia los vientos sobre la plataforma continental. La dirección de los vientos y la forma cóncava del golfo provocan que existan regiones en donde las corrientes estacionales van en el sentido de las manecillas del reloj, mientras que en otras van en la dirección contraria (Zavala-Hidalgo *et al.* 2003). Esto hace que durante otoño e invierno, las corrientes a lo largo de las costas de Tamaulipas y Veracruz sean, en promedio, hacia el sur, yendo en sentido contrario a las manecillas del reloj, mientras que en los estados de Campeche y Yucatán, van predominantemente en el sentido de las manecillas del reloj (Aguirre 2002).

Durante el verano, cuando los vientos sobre la plataforma de Tamaulipas y Veracruz tienen una componente hacia el norte, las corrientes son predominantemente en esa dirección y la confluencia se da cerca de la frontera con los Estados Unidos (Cao-Romero 2002).

La surgencia de Yucatán se ubica en el Banco de Campeche, y se debe al paso de la Corriente del Caribe a través del Canal de Yucatán. El desplazamiento de la surgencia hacia el oeste, siguiendo el contorno de la Península de Yucatán hasta las costas de Tabasco, se debe tanto al efecto de los vientos alisios, que en verano tienen una dirección Este-Sur Este y en invierno Este-Nor-Este, como a la dinámica de la corriente del Caribe que penetra hasta el sur del Golfo de México (Salmerón-García & Aguirre-Gómez 2003).

La dinámica oceanográfica del Golfo de México tiene una fuerte influencia de la Corriente de Yucatán. Al entrar al Golfo, esta corriente se llama Corriente del Lazo (por la forma que tiene) la cual penetra hacia el Norte, luego gira hacia el Este, posteriormente hacia el Sur y hacia el Este saliendo por el Estrecho de Florida. Pasa después a integrarse a la Corriente del Golfo, que es la corriente más caudalosa del Océano Atlántico Norte (Figura 3). Las corrientes de Yucatán y del Lazo son parte del giro subtropical del Atlántico Norte que es generado por la transferencia de momento de los vientos alisios (Candela *et al.* 2003).

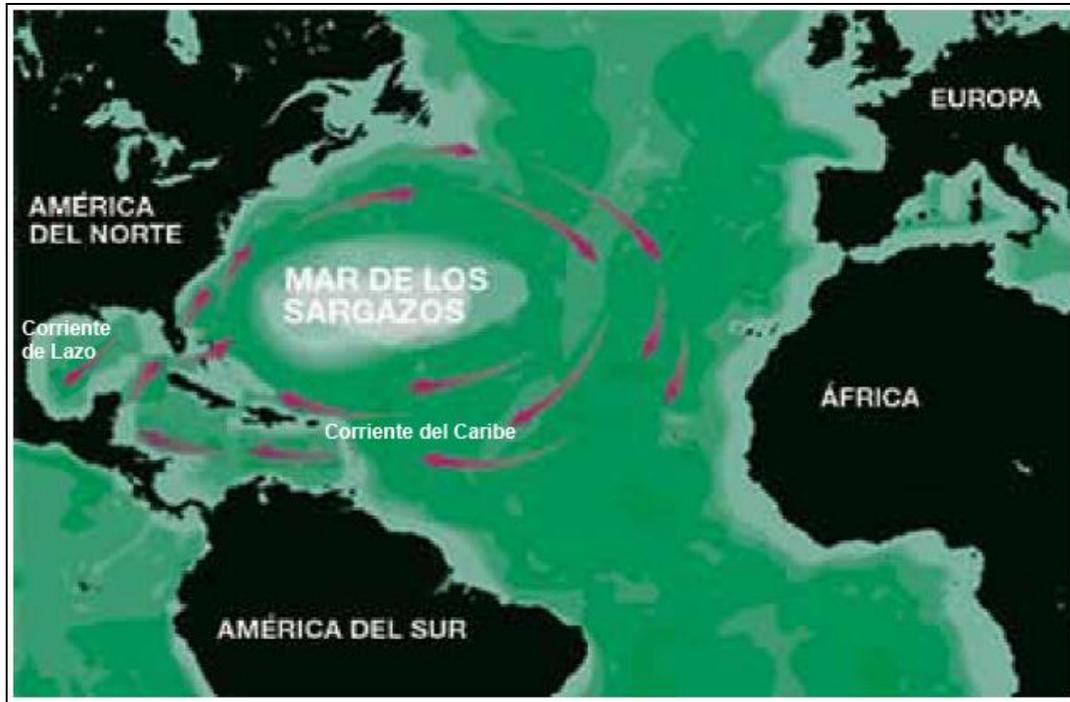


FIGURA 3. Representación esquemática del patrón actual de corrientes superficiales en el Golfo de México y el Mar Caribe. Tomado de Dreckmann & Sentfés (2013).

Por otro lado, el Mar Caribe se encuentra en la zona de los alisios del Norte, por lo que se caracteriza por la constante presencia de vientos de componente Este. Las mayores precipitaciones tienen lugar a lo largo del cálido verano tropical. En esta época también se produce la llegada de la mayoría de los huracanes procedentes del Atlántico, mientras que son escasos los ciclones tropicales que se forman localmente (Cao-Romero 2002).

Las aguas del Caribe son claras, con menor salinidad que las del Atlántico y circulan en sentido anticiclónico. El agua fluye hacia el Caribe principalmente a través de los estrechos de las Antillas Menores, donde se calienta, y abandona la región por el Canal de Yucatán en dirección al Golfo de México, dando origen a la Corriente del Golfo (Biggs 1992).

El Mar Caribe está dominado por la Corriente del Caribe que corre de Sur a Norte, frente al estado de Quintana Roo. Esta corriente está caracterizada por aguas cálidas y salinas, que al pasar por el Canal de Yucatán reciben el nombre de Corriente de Yucatán. Dicho flujo de agua es la fuente principal que irriga al Golfo de México y da origen a la Corriente de Lazo, que sale al Atlántico Norte por el Estrecho de Florida, como la Corriente del Golfo (Monreal-Gómez *et al.* 2004; Wilkinson *et al.* 2009).

La Corriente de Yucatán es una parte integral de la circulación del Giro Subtropical del Atlántico Norte con una contribución importante del intercambio inter-hemisférico termohalino global. Asimismo, representa el ramal del giro que fluye del Mar Caribe al Golfo de México donde da origen a la Corriente de Lazo, y a su salida del mismo, a las Corrientes de la Florida y del Golfo (González *et al.* 1991).

6.1.3. Geología

El Bloque Yucatán es un bloque tectónico único, sin plegamientos, del Paleozoico (543-248 ma), cuyo límite es la falla Montagua. Este basamento metamórfico de origen pangeico continental, se separa del Bloque Louisiana-Texas al momento de la apertura del Golfo de México; su posición actual viene desde finales del Triásico (200 ma). Sobre este basamento se ha acumulado una capa gruesa de sedimentos marinos del Paleozoico Tardío (323-248 ma), seguido por sedimentación continental en el Jurásico (206-144 ma), que a su vez subyacen a un depósito extenso de evaporitas (rocas sedimentarias formadas a partir de los residuos de antiguos mares o lagos evaporados) que corresponden a una cuenca carbonatada limitada por arrecifes del Cretácico Temprano (144-40 ma). Sobre éstas se encuentran calizas (rocas sedimentarias porosas formadas por carbonatos) depositadas en

plataforma durante el Cretácico Tardío (40-65 ma); la frontera entre el Cretácico (144-65 ma) y el Terciario (65-24 ma) presenta la estructura de impacto Chicxulub. La plataforma de Yucatán, conformada por calizas de periodos del Cretácico al Cenozoico-Cuaternario (65 ma al reciente), refleja un gradiente temporal en sentido norte-sur, lo cual indica una emergencia paulatina de la plataforma durante el Plioceno (5.2 a 1.8 ma). Esta emergencia paulatina explica la asimetría, que se extiende solamente unos 10 km en el margen del Caribe y hasta 200 km del lado del Golfo de México (Willis & McElwain 2002; Padilla & Sánchez 2007).

El tercio norte y la mitad oriental de la península están formados por karst (paisaje propio de terrenos calizos, por el efecto que la disolución del agua tiene sobre ellos) más recientes de planicie, con elevación máxima de 10 m, compuesta por secuencias de capas horizontales de calizas y dolomitas del Terciario Tardío (Plioceno, 5-1.8 ma) de la formación Carrillo Puerto, limitada por los depósitos periféricos del Cuaternario. La formación Carrillo Puerto tiene un espesor de entre 163 y 240 m, con la presencia del foraminífero (orden de microfósiles marinos) *Archaias angulatus*, que actualmente se asocia a algas endosimbiontes (que viven en simbiosis con su huésped, dentro de sus células) en aguas someras muy claras de plataformas continentales. Los depósitos del Cuaternario están restringidos a una franja periférica angosta a lo largo de la costa. A lo largo de la costa norte estos depósitos constan de calizas compuestas por conchas de bivalvos, compactadas densamente. En la costa noreste los depósitos del Cuaternario son del Pleistoceno y su extensión y topografía en la costa se interpretan como carbonatos supramareales (formados por encima del nivel de las mareas) que reflejan los movimientos de la línea de costa, lo cual es consistente con la formación de cavidades extensas de la

disolución subterránea asociada a la haloclina (capas de agua en donde la salinidad del agua cambia rápidamente con la profundidad) y su profundidad en relación con el nivel del mar en esa época (Schmitter-Soto *et al.* 2002; Willis & McElwain 2002; Padilla & Sánchez 2007; Blancas-Calva 2010).

6.1.4. Cierre del Istmo de Panamá

Durante el Cretácico Medio (hace 80 ma) comienza la formación del Istmo de Tehuantepec y tras su cierre, el patrón de corrientes actuales en el área (Figura 3). Todavía en el Mioceno Temprano (hace 20 ma) un océano cubría la zona en Panamá de hoy en día (Figura 4). Había una brecha entre los continentes de América del Norte y del Sur a través del cual las aguas de los océanos Atlántico y Pacífico fluían libremente en dirección Pacífico-Atlántico (Coates & Stallar 2013). Debajo de la superficie, dos placas de la corteza terrestre fueron poco a poco chocando entre sí, obligando a la placa del Pacífico a deslizarse lentamente bajo la placa del Caribe. La presión y el calor causado por esta colisión condujo a la formación de volcanes submarinos, algunos de los cuales habían crecido lo suficiente como para salir a la superficie del océano y formaron islas tempranas en el Mioceno (hace 15 ma). Más islas volcánicas fueron formándose en el área durante los próximos varios millones de años. En el Plioceno (hace 5 ma), el movimiento de las dos placas tectónicas también fue empujando desde el fondo del mar, finalmente, obligaron a algunas zonas a superar el nivel del mar (Coates & Stallar 2013). Con el tiempo, grandes cantidades de sedimentos (arena, tierra y barro) fueron acumulados desde América del Norte y del Sur por las fuertes corrientes marinas y cerraron las brechas entre las islas de reciente formación. Poco a poco, durante millones de años, los depósitos de sedimentos fueron añadidos a las islas hasta que las lagunas se llenaron completamente.

Hace aproximadamente 3 millones de años, un istmo se había formado entre América del Norte y del Sur (Cowman & Bellwood 2013).

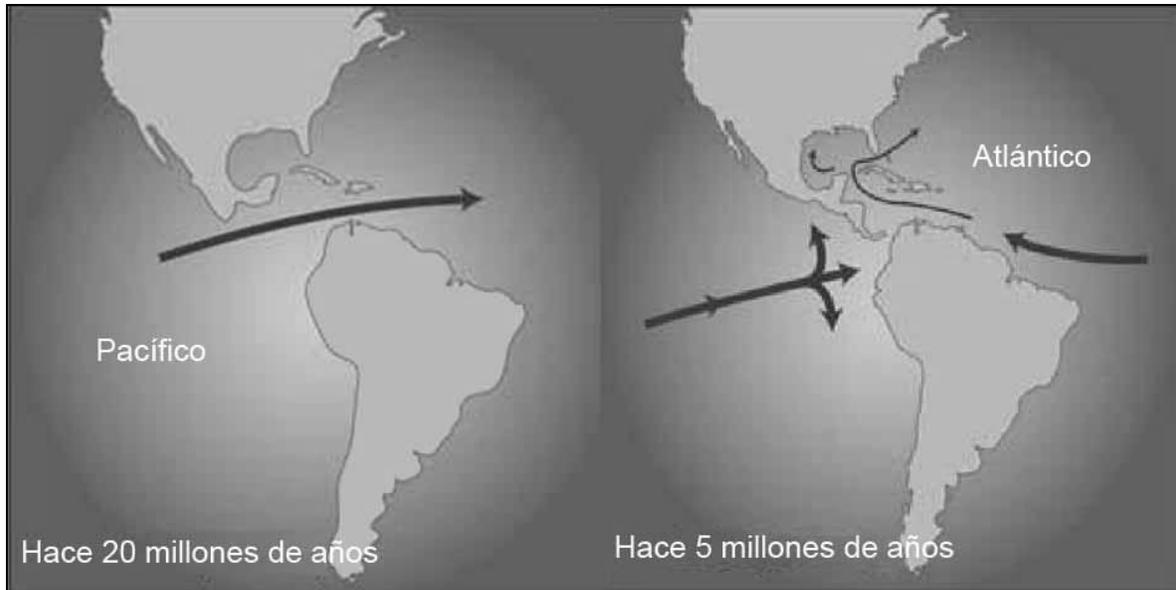


FIGURA 4. Representación de la dirección de las paleocorrientes en el tiempo geológico durante el cierre de Istmo de Panamá. Modificado de Coates & Stallar (2013).

Al cerrar el flujo de agua entre los dos océanos, la tierra del puente re-enruta las corrientes, tanto en el océano Atlántico como en el Pacífico (Figura 4). Las corrientes del Atlántico se vieron obligadas hacia el norte, y finalmente se estableció un patrón de una nueva corriente, la Corriente del Golfo (Porta 2003). Con las cálidas aguas del Caribe que fluyen hacia el noreste del Atlántico, el clima de las aguas cambió. El Atlántico, ya no se mezcla con el Pacífico, por lo que también aumentó la salinidad y concentración de nutrientes. Cada uno de estos cambios ayudaron a establecer el patrón de circulación oceánica mundial que vemos hoy (Figura 3) (Coates & Stallar 2013).

6.2. TRABAJO DE CAMPO

El trabajo de campo se realizó en 15 localidades de cinco estados del Golfo de México y el Caribe mexicano (Figura 5). Adicionalmente, con el fin de robustecer el análisis, se obtuvieron muestras de dos poblaciones de Venezuela (Península Paraguaná: Puerto Escondido y Tumatey) y una de Brasil (en Pernambuco: localidad tipo de *Hydopuntia cornea*), aunque estas no formaran parte de los objetivos de la presente tesis. El trabajo se llevó a cabo de la siguiente manera:

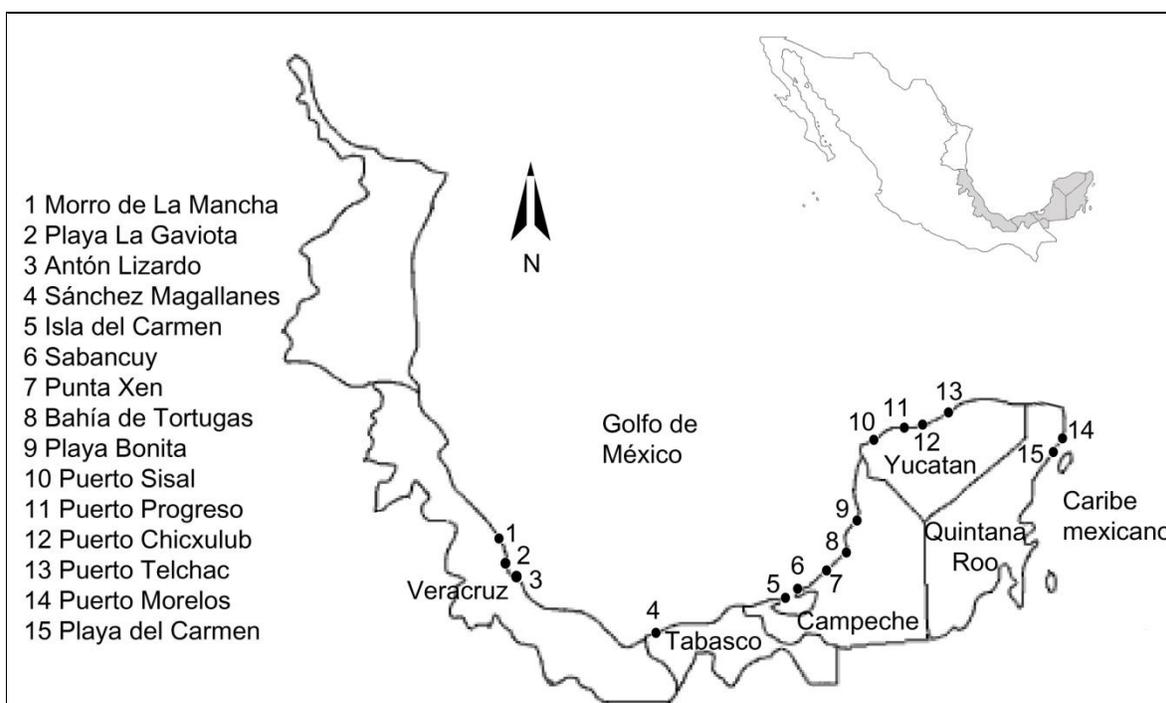


FIGURA 5. Sitios de recolecta en el Golfo de México y el Caribe mexicano. Los puntos señalan la posición geográfica de los sitios visitados (Coordenadas GPS en Tabla 3) y los números corresponden con la localidad.

6.2.1. Muestreo

Cada localidad visitada fue tratada como una población, y, en cada población se recolectaron de 10-15 individuos (Tabla 2) que estuvieran dentro del espectro de variación

morfológica descrito por Dreckmann (2012) para *Hydropuntia cornea* (referido en la introducción).

TABLA 2. Listado de localidades (poblaciones) muestreadas en los estados del Golfo de México y en el Caribe mexicano. Se incluyen al final, las poblaciones de Venezuela y Brasil. Para cada localidad se indica el número de individuos muestreados por población.

Estado	Localidades muestreadas	Siglas de la localidad	Número de individuos muestreadas por localidad
Veracruz	Morro de La Mancha	MM	0
	Playa La Gaviota	PG	0
	Antón Lizardo	AL	0
	Sánchez Magallanes	SM	0
Tabasco	Isla del Carmen	IC	10
	Sabancuy	S	10
	Punta Xen	PX	10
	Bahía de Tortugas	BT	15
Campeche	Playa Bonita	PB	12
	Puerto Sisal	PS	10
	Puerto Progreso	PP	10
	Puerto Chicxulub	PCH	10
Yucatán	Puerto Telchac	PT	10
	Puerto Morelos	PM	14
	Playa del Carmen	PC	13
	Puerto Escondido	PE	10
Venezuela	Tumatey	T	10
	Pernambuco	BP	9

Los individuos fueron recolectados en la zona intermareal, a no más de un metro de profundidad, desprendiéndolos desde la base; otros fueron recolectados de arribazón (Tabla 3). La selección de los individuos recolectados se hizo con base en tres criterios: 1) la abundancia de individuos en el área; 2) las diferencias morfológicas mostradas por los individuos presentes en una población, diferenciándolos siempre en morfo 1, morfo 2, o incluso, en una misma, población hasta morfo 7 (ver plasticidad morfológica en

Resultados); 3) particularmente en el caso de los especímenes recolectados en arribazones, se consideró el estado de los individuos: que estuvieran frescos, pigmentados y cuyos talos estuvieran completos. Todas las muestras fueron depositadas en sub-bolsas de cierre hermético, separadas por población y etiquetadas con el nombre de la localidad, coordenadas geográficas, número de campo, recolectores y fecha de recolecta (Tabla 3). Las muestras fueron trasladadas a las instalaciones en una bolsa oscura para proteger el tejido de la luz. Una vez ahí, el material fue limpiado de epífitas y arena, fotografiado y preservado.

TABLA 3. Resumen del muestreo por cada población, con datos de localidades, fechas, referencias de herbario, de campo y de extracción de ADN, así como la información de los genes secuenciados (indicados con “X”) para cada individuo.

Localidad ¹	Georeferencias	Fecha de recolecta	Voucher	Número de campo y clave de extracción de ADN ²	Genes secuenciados para cada muestra						
					Cloroplasto		Mitocondria		Núcleo		
					RuBisCo spacer	<i>rbcL</i>	<i>cox2-3</i> spacer	COI	ITS		
IC	18° 41' 59''N 91° 35' 24''W	05/09/14	UAMIZ- 1234	IC82-1	X						
				IC82-2	X						
				IC82-3	X						
				UAMIZ- 1229	IC82-4	X					
					IC82-5	X					
					IC82-6	X					
				UAMIZ- 1235	IC82-9	X					
			IC82-11		X						
			IC82-13		X						
			IC82-14		X						
			S	18°59'39''N 91°11'06''W	06/09/14	UAMIZ- 1228	S84-1	X			
							S84-2	X			
							S84-3	X			
							S84-4				
S84-5											
S84-6											
S84-7	X										
S84-8	X										
S84-9											
S84-11	X										
PX	19°8'21''N 91°57'49''W	14/11/13					UAMIZ- 1239	PXE15	X		X
			PXE17	X		X					
			PXE35	X		X					
			07/09/14	UAMIZ-	PX88-10	X					

			1230	PX88-11	X					
				PX88-12	X					
				PX88-13						
				PX88-14	X					
				PX88-15						
				PX88-16						
BT	19° 21' 35''N 90° 42' 35''W	06/09/14	UAMIZ- 1233	BT87-1	X					
				BT87-2	X					
				BT87-3	X					
				BT87-4	X					
				BT87-5	X					
				BT87-6	X					
				BT87-7	X					
				BT87-8	X					
				BT87-9	X					
				BT87-10	X					
				BT87-11	X					
				BT87-12	X					
				BT87-13	X					
				BT87-14	X					
				BT87-15						
PB	18°59'39''N 91°11'06''W	07/09/14	UAMIZ- 970	PBE50	X					
			UAMIZ- 1232	PB83-1	X					
				PB83-2						
				PB83-3	X					
				PB83-4	X					
				PB83-5	X					
				PB83-6	X					
				PB83-7						
				PB83-8	X					
				PB83-9	X					
				PB83-10						
				PB83-11	X					
PS	21°9'55''N 90°1'50''W	14/01/13	UAMIZ- 1282	PS68-1	X	X	X	X	X	
				PS68-2	X		X			
				PS68-3	X		X			
				PS68-4	X		X			
				PS68-5	X	X	X	X	X	
				PS68-6	X		X			
				PS68-7	X		X			
				PS68-8	X		X			X
				PS68-9	X		X			
				PS68-10	X		X			
PP	21°16'58''N 89°39'49''W	14/01/13	UAMIZ- 1285	PP67-1	X	X	X	X	X	
				PP67-2	X		X			
				PP67-3	X		X			
				PP67-4	X		X			
				PP67-5	X	X	X	X	X	
				PP67-6	X		X			
				PP67-7	X		X			
				PP67-8	X	X	X	X	X	
				PP67-9	X	X	X	X	X	
				PP67-10	X	X	X	X	X	
PCH	21°17'38''N 89°36'30''W	14/01/13	UAMIZ- 1286	PC70-1	X		X			X
				PC70-2	X	X	X	X	X	X

				PC70-3	X		X		
				PC70-4	X		X		
				PC70-5	X		X		
				PC70-6	X		X		
				PC70-7	X		X		X
				PC70-8	X		X		
				PC70-9	X		X		
				PC70-10	X	X	X	X	X
PT	21°20'26''N 89°15'47''W	14/01/13	UAMIZ- 1284	PT69-1	X		X		
				PT69-2	X		X		
				PT69-3	X		X		
				PT69-4	X		X		
				PT69-5	X	X	X	X	
				PT69-6	X		X		
				PT69-7	X		X		
				PT69-8	X		X		
				PT69-9	X		X		
				PT69-10	X		X		
PM	20°51'13''N 86°53'55''W	17/01/13	UAMIZ- 1283	PM66-1	X		X		
				PM66-2	X		X		
				PM66-3	X	X	X	X	X
				PM66-4	X	X	X	X	X
				PM66-5	X	X	X		X
				PM66-6	X		X		
				PM66-7	X		X		
				PM66-8	X		X		
				PM66-9	X		X		
				PM66-10	X		X		
			UAMIZ- 456	PME9	X				
			UAMIZ- 612	PME88			X		
			UAMIZ- 458	PME97			X		
			UAMIZ- 563	PME100			X		
PC	20°37'39''N 87°04'52''W	17/01/13	UAMIZ- 563	PCE4	X				
				PCE5	X				
				PCE103	X				
				PC-H9	X				
				PC-H10	X				
				PC-H11					
				PC-H12					
				PC-H13					
				PC-H15	X				
				PC-H19	X				
				PC-H20	X				
				PC-H22	X				
				PC-H25	X				
PE	12° 16' 11''N 69° 57' 35''W	20/05/15	UAMIZ- 1237	PE84-12	X				
				PE84-14	X				
				PE89-1	X				
				PE89-3	X				
				PE89-7	X				
				PE89-10	X				
				PE90-2	X				
				PE90-3	X				
				PE90-4	X				

T	11° 54' 36''N 69° 47' 59''W	20/05/15	UAMIZ- 1238	PE90-5	X
				T91-1	X
				T91-2	X
				T91-3	X
				T91-4	X
				T91-5	X
				T91-6	X
				T91-7	
				T91-8	
				T91-9	X
BP	8° 44' 24''N 35° 6' 35''W	24/09/14	UAMIZ- 1236	T91-10	
				BP88-1	X
				BP88-2	X
				BP88-3	X
				BP88-4	X
				BP88-5	X
				BP88-6	X
				BP88-7	X
				BP88-8	X
				BP88-9	X

¹Las siglas del nombre para cada localidad están descritas en la Tabla 2. ²En negritas están resaltados aquellos individuos que fueron recolectados en arribazón.

6.2.2. Preservación de las muestras

De cada uno de los individuos recolectados, se cortó con tijeras, del ápice de una rama, un pedazo de aproximadamente 3 cm de longitud, los cuáles fueron depositados en bolsitas de cierre hermético y preservados en sílica gel para análisis molecular. El resto del talo de cada individuo, fue prensado y posteriormente montado en hojas de herbario para su incorporación a la colección de algas del Herbario Metropolitano-UAMIZ, como referente morfológico. A todos los individuos de una misma población, se les asignó el mismo número de herbario (Tabla 3).

6.3. TRABAJO DE LABORATORIO

En el trabajo de laboratorio se llevaron a cabo dos tipos de análisis, el molecular y el morfológico, cada uno de la siguiente manera:

6.3.1. Análisis molecular

El análisis molecular consistió en la extracción de ADN, amplificación vía PCR (*Polymerase Chain Reaction*, por sus siglas en inglés) y la purificación de los productos de PCR para secuenciación. Se llevó a cabo utilizando cinco marcadores específicos de los diferentes genomas algales: cloroplasto, mitocondria y núcleo. Del cloroplasto se amplificaron la región espaciadora de la Ribulosa 1-5 Bifosfato, Carboxilasa-Oxigenasa (RuBisCO) y la subunidad larga de la RuBisCO (*rbcL*); de la mitocondria se amplificaron la región espaciadora de la Citocromo Oxidasa (COX) subunidades 2 y 3 (*cox2-3*) y la subunidad 1 (COI). Del núcleo sólo se amplificó el Internal Transcribed Spacer (ITS). Las regiones espaciadoras y el gen ITS se utilizó para estudiar la variación genética y los genes *rbcL* y COI se utilizaron para estudiar la filogenia.

A continuación se describen los procedimientos seguidos.

6.3.2. Extracción de ADN

En un tubo Eppendorf de 1.5 ml, previamente etiquetado con clave de extracción (Tabla 3), se depositaron 5-10 mg de tejido seco, el cual fue triturado manualmente con ayuda de un pistilo. La extracción de ADN se llevó a cabo de dos maneras: 1) para las muestras cuya clave de extracción es numérica, esta se realizó utilizando Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), siguiendo las instrucciones de manufactura y; 2) para las muestras cuya clave de extracción es precedida por inicial mayúscula “E”, la extracción se realizó utilizando la modificación descrita por Zuccarello *et al.* (1999a) al método de extracción con Chelax (Apéndice 1).

6.3.3. Amplificación de ADN

Las condiciones de PCR para cada uno de los cinco marcadores utilizados, se describen en la Tabla 4. Los genes que fueron secuenciados para cada muestra, están indicados en la Tabla 3.

TABLA 4. Genes secuenciados en el presente trabajo para las poblaciones de *Hydropuntia cornea*, marcadores específicos, condiciones de PCR en las que amplificaron los genes y referencias bibliográficas de los marcadores.

Genoma	Región	Marcadores	Secuencia del marcador (5' - 3')	Condiciones de PCR					Referencia		
				DI	D	A	E	EF			
Cloroplasto	RuBisCo	Spacer F	TGT GGACCTCTA CAAACAGC	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	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo			
		<i>rbcL</i>	F8	GGTGTAATTCATA CGCTAAAATG	95°C 5'	94°C 1'	45°C 1'	72°C 1'		72°C 1'	Shimada <i>et al.</i> 1999
			F765	TG AAA AGCTGAA TTCGCT AA	1 ciclo	38 ciclos				1 ciclo	Wang <i>et al.</i> 2000
			R753	GGAAGATATGT ATG AAA GAGC							Freshwater & Rueness 1994
	R1381	ATCTTTCCATA GATCT AAAGC									
Mitocondria	cox2-3	cox2-for	GTACCWTCTT TDRGRRKDAAATG TGATGC						Zuccarello <i>et al.</i> 1999b		
		cox3-rev	GGATCTACW AGATGRA AWGGATGTC								
	COI	GazF1	TCAACAAATCA TAAAGATATTGG						Saunders 2005		
		GazR1	ACTTCTGGATGT CCAAAAAYCA								
Núcleo	ITS	ITS3	GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC						Ramírez & de la Torre 2008		
		ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC								

6.3.4. Purificación y secuenciación

Los productos de PCR fueron purificados con el kit QIAquick Purification de Qiagen (Qiagen, Valencia, CA, USA) y enviados, para ser secuenciados, al laboratorio Divisional de Biología Molecular (División CBS, UAM-I) en un secuenciador 3100 Avant (Applied Biosystems TM).

6.3.5. Análisis morfológico

Para determinar si existe alguna relación entre la variación genética y la variación morfológica de las poblaciones muestreadas, se realizó un análisis morfológico en algunos individuos representativos del total muestreado. Para ello, se elaboró un listado de los caracteres morfológicos diagnósticos descritos por Dreckmann (2012) y Ardito *et al.* (2014) para *Hydropuntia cornea* (Apéndice 2). Siguiendo esta lista, se hicieron observaciones, a simple vista, de la morfología del talo (longitud, medida con una regla, y número de ramas), y observaciones anatómicas a partir de cortes histológicos.

6.3.6. Cortes histológicos, observaciones al microscopio y toma de medidas

Bajo el microscopio estereoscópico, se hicieron, manualmente y con ayuda de una navaja de rasurar de doble filo, cortes transversales de la parte basal, media y apical de cinco ramas del talo por individuo. Los cortes fueron teñidos con azul de anilina, montados en un portaobjetos con gelatina glicerizada y etiquetados para la observación posterior.

Bajo el microscopio compuesto, con ayuda de una reglilla, se tomaron medidas del diámetro mayor y diámetro menor de cinco células corticales y cinco células medulares por corte, a partir de las cuales se establecieron intervalos de medidas (ver Resultados) para el

diámetro de las células. Adicionalmente se contó el número de capas corticales y medulares y se tomaron medidas de diámetro en estructuras reproductoras. Se tomaron fotografías de los cortes.

6.4. ANÁLISIS DE DATOS

Las secuencias obtenidas del análisis molecular fueron limpiadas, editadas y alineadas utilizando el programa Bioedit (Hall 1999). Una vez generadas las matrices de datos para cada uno de los cinco genes trabajados, se analizaron por sets de datos con el fin de responder a cada uno de los objetivos y preguntas de investigación planteadas. Por lo tanto, el análisis de datos se dividió en análisis de variación genética (a partir de las regiones espaciadoras RuBisCo y *cox2-3* y el gen ITS), inferencia filogenética (a partir de *rbcl* y COI), distancias genéticas (con los cinco genes) y análisis morfológicos.

6.4.1. Variación genética

A partir de una matriz genética (en formato FASTA), para cada población se estimaron en el programa DNASP V.5 (Librado & Rozas 2009), medidas de diversidad genética bajo el modelo de sustitución de Jukes & Cantor. Estas medidas fueron: número de haplotipos (h), número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (π). Asimismo, se estimó el flujo genético mediante el número de migrantes (Nm) por generación (obtenido con base en los valores de Fst). Para determinar si existía o no estructura genética en las poblaciones estudiadas, así como para evaluar las relaciones y distribución de los haplotipos, se construyeron, a partir de matrices genéticas (en formato NEXUS), redes de parsimonia estadística utilizando el programa TCS v1.21 (Clement *et al.* 2000).

Para examinar la demografía histórica, se realizó, a partir de una matriz genética en formato ARP (ejemplo en Apéndice 3), un análisis de distribución de desajuste “Distribución Mismatch” (Rogers & Harpending 1992) para evaluar los eventos de expansión poblacional, cuellos de botella o eventos de selección. Esta distribución corresponde con la distribución de las frecuencias observadas, del número de diferencias mutacionales entre pares de secuencias. Se espera una distribución multimodal en poblaciones en equilibrio demográfico, y una distribución unimodal en poblaciones que han experimentado una expansión poblacional reciente. Para comprobar el ajuste de la distribución observada, con la distribución esperada bajo un modelo de expansión repentina (Rogers & Harpending 1992) y, de expansión geográfica (Excoffier & Lischer), se utilizó un bootstrap de 1000 réplicas. Para estimar desviaciones al modelo de evolución neutral de Wright-Fisher, se calcularon los estadísticos D de Tajima (Tajima 1989) y F_s de Fu (Fu 1997) con un grado de significancia mediante un bootstrap de 1000 réplicas. Para ambos índices, los valores cercanos a cero se presentan en poblaciones con un tamaño constante, los valores negativos indican exceso de haplotipos raros que podrían deberse a una expansión poblacional o fenómenos de selección positiva, y, los valores positivos que se relacionan con una disminución en el tamaño poblacional (cuello de botella) o de selección balanceadora. El AMOVA, que utiliza las frecuencias haplotípicas, se realizó para examinar la estructura jerárquica de las poblaciones, mediante la agrupación de las muestras en conjuntos genéticamente similares. Todos estos análisis, se llevaron a cabo utilizando el programa ARLEQUIN V.3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Para caracterizar los patrones de distribución espacial de la variación genética y detectar barreras genéticas, se realizó, a partir de dos matrices, una de distancias geográficas con formato GEO, y otra genética con formato ARP (Apéndices 4 y 5 respectivamente), un SAMOVA con en el programa

SAMOVA v.1.0 (Dupanloup *et al.* 2002), utilizando 1000 pasos de anidamiento simulado, y pre-definiendo una corrida inicial con 2 a 5 grupos, para definir agrupamientos entre poblaciones que estuvieran más relacionadas geográficamente entre sí. Adicionalmente, para determinar si existía relación entre la distancia genética y la distancia geográfica, se realizó una prueba de aislamiento por distancia en el programa MANTEL V. 2.0 (Liedloff 1999), a partir de una matriz de distancias geográficas en formato GEO (Apéndice 6) y una matriz de distancias genéticas en formato DIST (Apéndice 7).

6.4.2. Inferencia filogenética

Para determinar la correspondencia genética de la estructura encontrada en las poblaciones de *Hydropuntia cornea*, las secuencias resultantes fueron comparadas con secuencias publicadas en el GenBank (Apéndice 8). Para ello se realizaron, a partir de dos matrices de secuencias (en formato NEXUS), dos tipos de análisis filogenéticos: un análisis de Máxima Verosimilitud (ML) y un análisis Bayesiano, ambos con partición de codón. El cálculo del mejor modelo de evolución de secuencias para cada conjunto de datos, se realizó con el programa ModelTest v.3.7 con el Criterio de Información Akaike (AIC por sus siglas en inglés “Akaike Information Criterion”) (Posada & Crandall 1998). El modelo seleccionado para el conjunto de datos de *rbcL* fue HKY+G+I (Hasegawa-Kishino-Yano + gamma distribution + invariable sites) y, para el conjunto de datos de COI fue GTR+G+I (General Time Reversible + Gamma Distribution + Invariable sites). El análisis de ML se realizó en el programa RaxML (Stamatakis 2006), de acuerdo con el modelo seleccionado para cada conjunto de datos. Para calcular el soporte de las ramas, se corrió un bootstrap con 1000 réplicas. El análisis Bayesiano, se realizó con el programa MrBayes 3.1.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001), utilizando cuatro cadenas Markov de Monte Carlo comenzando con un

árbol al azar y pre-definiendo un muestreo de los datos cada 100 generaciones durante 1×10^6 generaciones. El *score* de probabilidad se estabilizó después de 200 000 árboles muestreados; sin embargo, se utilizó un “bur-in” del 25%. Los árboles resultantes de los dos análisis fueron visualizados y editados en el programa TreeView (Page 1996).

6.4.3. Distancias genéticas

Para los cinco marcadores utilizados, se calcularon valores de distancias intra e interespecíficas, corregidas con el modelo Tamura-Nei (Tamura & Nei 1993) y no corregidas (*p*-distances), usando el programa Mega 5 (Tamura *et al.* 2011).

6.5. ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Para determinar el grado de variación morfológica entre los individuos observados, se realizó un análisis de componentes principales (CP) y un análisis discriminante en PASW Statistics 18 (SPSS 2009). Para ello se construyó, en una hoja de Excel, una matriz de caracteres diagnósticos (Apéndice 2). Para cada variable, los valores fueron tratados en crudo. Este análisis fue seleccionado, de otro tipo de análisis, porque además de explicar la variabilidad de los datos morfológicos, en un número pequeño de componentes principales, los datos no requieren presentar una distribución normal.

7. RESULTADOS

A continuación se describen por conjuntos de datos los resultados obtenidos con los cinco marcadores secuenciados y con las observaciones morfológicas. Las secuencias que ya cuentan con números de acceso al GenBank, pueden consultarse en el Apéndice 9.

7.1. VARIACIÓN GENÉTICA

Los resultados asociados a la variación genética de las poblaciones de *Hydropuntia cornea*, obtenidos a partir de las regiones espaciadoras RuBisCo, *cox2-3* y el gen ITS, revelaron lo siguiente:

7.1.1. Estructura genética

En la Tabla 5 se presenta un resumen de los haplotipos encontrados por población para cada gen referido. El detalle de las muestras que conformaron a cada haplotipo puede consultarse en el Apéndice 10.

TABLA 5. Haplotipos encontrados en las regiones espaciadoras RuBisCo y *cox2-3* y en el gen ITS para las poblaciones de *Hydropuntia cornea* estudiadas. El número indica la frecuencia haplotípica. En color negro se resalta la afinidad genética con el haplogrupo o ribogrupo GI, y en gris la afinidad con el haplogrupo o ribogrupo GII.

Población ³	Región espaciadora RuBisCo												Región espaciadora <i>cox2-3</i>			ITS				
	R												C			RA		RB		
Haplotipo ⁴	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	1	2	1	2	3
IC	5	2	1			1	1													
S	6																			
PX				3		2	2						3							
BT	1	6	4		2	1														
PB	6	1		1	1															
PS	2							1	5		2		2	8				3		
PP	3								7				3	6				3	1	
PCH	1								8		1		2	9		2	2			
PT	10												10							
PM	10									1		12		1	3				1	
PC	4			6																
PE	2								8											
T									7											
BP						4						5								
Total	50	9	5	10	3	8	3	1	35	1	3	5	15	16	24	3	2	8	1	1

³Las siglas para cada población se describen en la Tabla 2. ⁴Haplotipos R=R1-R12; C=C1-C3; RA=RA1 y RA2 y RB=RB1-RB3.

7.1.1.1. Región espaciadora de la RuBisCo

El conjunto de datos consistió en 133 secuencias (Tabla 3 y Apéndice 10) con 365 pb (pares de bases) de longitud, 16 (4%) de las cuales fueron variables (Tabla 6).

TABLA 6. Proporción de sitios variables en secuencias de ADN de *Hydropuntia cornea* para haplotipos de la región espaciadora de la RuBisCo. Los haplotipos del haplogrupo GI están en color negro y los haplotipos del haplogrupo GII están marcados con color gris. El punto indica misma base respecto de la secuencia del haplotipo R1.

Haplotipos/ Sitios variables	7	20	42	43	57	67	82	84	86	140	150	255	313	339	345	364
R1	A	G	T	T	C	T	C	A	A	G	T	T	G	A	A	C
R2	T
R3	.	A
R4	T
R5	T	.	A	T
R6	A	.	.	T
R7	T	T
R8	C	A	.	G	.
R9	C	.	.	.	A	A	C	A	.	G	.
R10	C	.	.	.	A	A	C	A	.	G	T
R11	.	.	.	G	.	C	.	.	.	A	A	C	A	.	G	.
R12	A	.	T	T	G	C	.	.

La red haplotípica reveló 12 haplotipos (R1-R12) interconectados (Figura 6). El haplotipo R1 fue el que agrupó al mayor número de secuencias (n=50) y el que mostró un mayor número de conexiones, seguido por el haplotipo R9 (n=35). Asimismo, se observó una cierta estructuración en dos haplogrupos denominados haplogrupo I (GI) y haplogrupo II (GII), los cuales estuvieron separados entre ellos por seis pasos mutacionales.

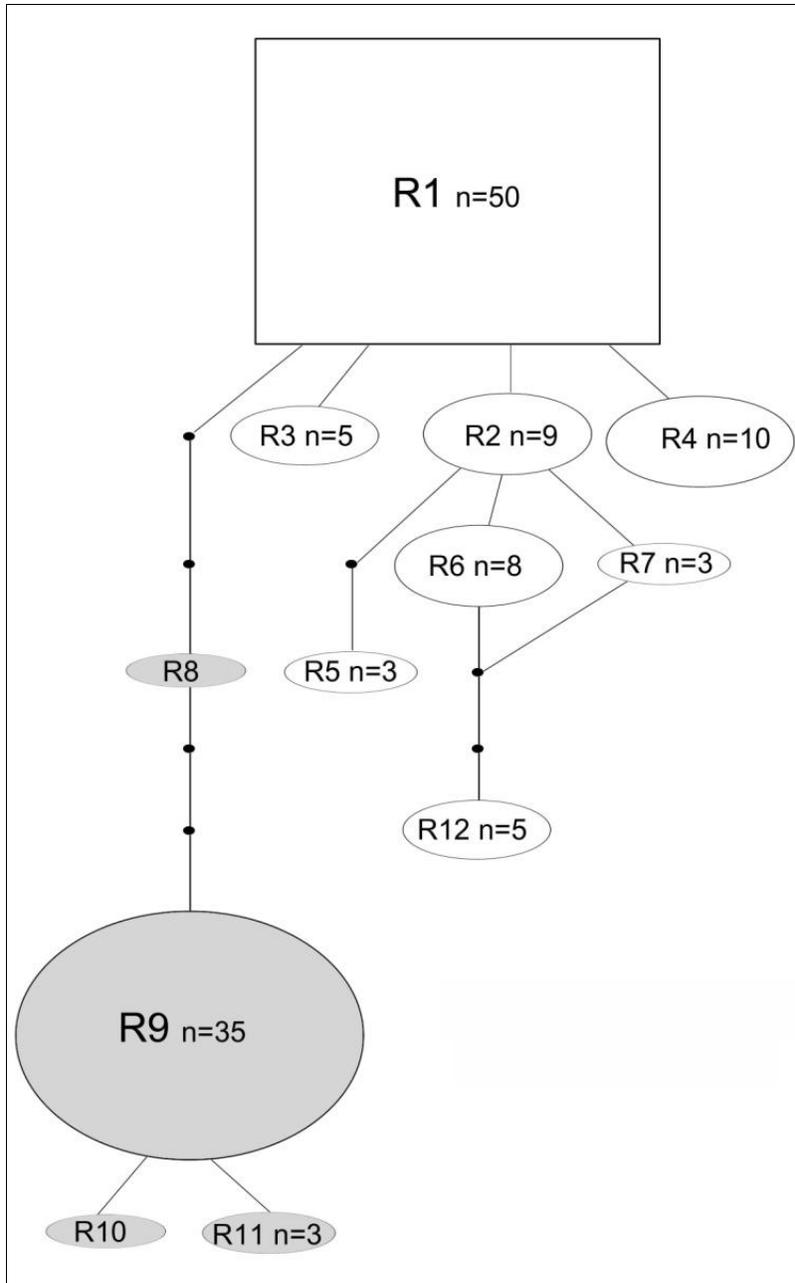


FIGURA 6. Red haplotípica de la región espaciadora de la RuBisCo para las secuencias de *Hydropuntia cornea*. El cuadrado representa al posible haplotipo ancestral. Los haplotipos en color blanco, corresponden al haplogrupo GI y, los haplotipos en color gris, corresponden al haplogrupo GII. Las líneas representan un paso mutacional; los circulitos negros indican haplotipos no muestreados o perdidos. El tamaño de muestras con secuencia idéntica está indicado con n ; en aquellos haplotipos que sólo tuvieron una muestra no se indica n .

El haplogrupo GI, estuvo conformado por los haplotipo R1-R7 y R12. El haplotipo R1 estuvo separado de R2, R3 y R4 por un paso mutacional: de R2 por un cambio de A-T en la posición 84, de R3 por un cambio de G-A en la posición 20 y de R4 por un cambio de C-T en la posición 364. A su vez, R2 estuvo separado de R6 y R7 por un paso mutacional y de R5 por dos pasos mutacionales: de R6 por un cambio de C-A en la posición 57, de R7 por un cambio de C-T en la posición 82 y de R5 por un cambio de A-T y T-A en las posiciones 7 y 42 respectivamente. Finalmente, el haplotipo R12 estuvo separado de los haplotipos R6 y R7 por tres pasos mutacionales: un cambio de C-T, A-G y A-C en las posiciones 82, 86 y 339 respectivamente. El haplogrupo GII, estuvo conformado por los haplotipos R8- R10 y R11. El haplotipo R9 estuvo separado de los haplotipos R10 y R11 por un paso mutacional: de R10 por un cambio de C-T en la posición 364, y de R11 por un cambio de T-G en la posición 43. El haplotipo R8, fue un haplotipo intermedio entre R1 y R9 de los cuales se encuentra separado por tres pasos mutacionales respectivamente: de R1 por un cambio de T-C, G-A y A-G en las posiciones 67, 313 y 345 respectivamente, y, de R9 por un cambio de G-A, T-A y T-C en las posiciones 140, 150 y 255 respectivamente (Tabla 6). Sólo los haplotipos R8 y R10 fueron únicos, presentes sólo en un individuo, el resto fueron compartidos por más de un individuo.

7.1.1.2. Región espaciadora *cox2-3*

El conjunto de datos consistió en 55 secuencias (Tabla 3 y Apéndice 10), con 247 pb de longitud, cinco (2%) de las cuales fueron variables (Tabla 7).

TABLA 7. Proporción de sitios variables en secuencias de ADN de *Hydropuntia cornea* para haplotipos de la región espaciadora *cox2-3*. Los haplotipos del haplogrupo GI están en color negro y los haplotipos del haplogrupo GII están marcados con color gris. El punto indica una misma base respecto de la secuencia del haplotipo C1.

Haplotipos/ Sitios variables	101	140	175	197	207
C1	A	T	C	A	T
C2	C
C3	G	C	A	T	.

La red haplotípica reveló tres haplotipos (C1-C3) interconectados (Figura 7). El haplotipo C3 fue el que agrupó al mayor número de secuencias (n=24), seguido por el haplotipo C2 (n=16) y finalmente por el haplotipo C1 (n=15), que mostró el mayor número de conexiones. Asimismo, se observó la misma estructura en los haplogrupos GI y GII que mostró el gen RuBisCo, los cuales estuvieron separados entre ellos por cuatro pasos mutacionales.

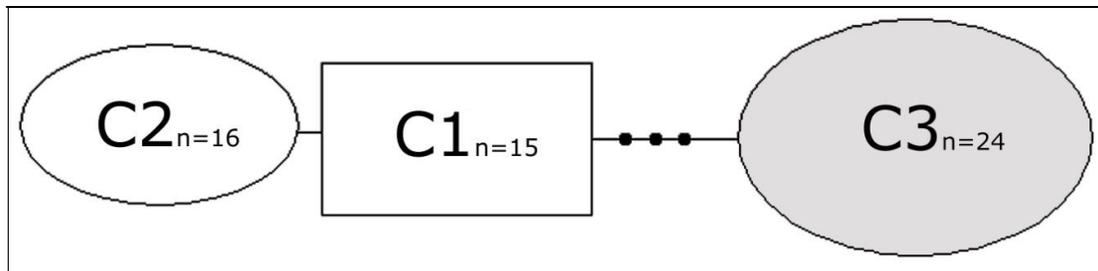


FIGURA 7. Red haplotípica de la región espaciadora *cox2-3* para las secuencias de *Hydropuntia cornea*. El cuadrado representa al posible haplotipo ancestral. Los haplotipos en color blanco, corresponden al haplogrupo GI y, el haplotipo en color gris, corresponde al haplogrupo GII. Las líneas representan un paso mutacional; los circulitos negros indican haplotipos no muestreados o perdidos. El tamaño de muestra con secuencia idéntica está indicado con *n*.

El haplogrupo GI estuvo conformado por los haplotipos C1 y C2, que estuvieron separados entre sí por un paso mutacional: un cambio de T-C en la posición 207. El haplogrupo GII estuvo conformado sólo por el haplotipo C3, el cual a su vez, estuvo separado de C1 por cuatro pasos mutacionales: un cambio de A-G, T-C, C-A y A-T en las posiciones 101, 140, 175 y 197 respectivamente. (Tabla 7). Todos los haplotipos fueron compartidos por más de un individuo.

7.1.1.3. ITS

El conjunto de datos consistió en 15 secuencias (Tabla 3 y Apéndice 10) con 508 pb de longitud, extremadamente variables y con un gran número de gaps que dificultaron el alineamiento. La red haplotípica reveló dos ribogrupos (A y B) fuertemente separados (Figura 8). El ribogrupo A, consistió de dos ribotipos denominados RA1 y RA2 (Figura 8 A), separados entre sí por más de 40 pasos mutacionales. El ribotipo RA1 (n=3) agrupó al mayor número de secuencias idénticas, seguido del RA2 (n=2). El ribogrupo B, consistió de tres ribotipos denominados RB1, RB2 y RB3 (Figura 8 B). El ribotipo RB1 (n=8), agrupó al mayor número de secuencias idénticas, seguido de los ribotipos RB2 y RB3 (ribotipos únicos), separados del ribotipo RB1 por más de cuarenta pasos mutacionales.

Este gen no compartió el agrupamiento revelado con las regiones espaciadoras, con él, los haplogrupos GI y GII mostraron mezcla de individuos.

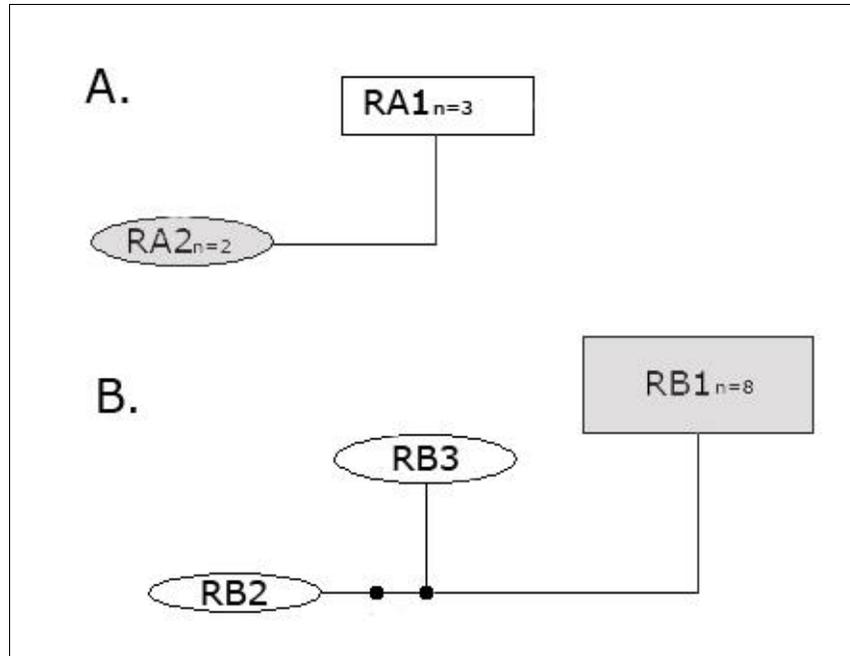


FIGURA 8. Red de ribotipos del gen ITS para las secuencias de *Hydropuntia cornea*. A. Ribogrupos I. B. Ribogrupos II. Los cuadros representan a los posibles ribotipos ancestrales. Los ribotipos en color blanco, corresponden con el haplogrupos GI y, los ribotipos en color gris corresponden con el haplogrupos GII. La línea continua representa más de 40 pasos mutacionales; los circulitos negros indican ribotipos no muestreados o perdidos. El tamaño de muestras con secuencia idéntica está indicado con *n*.

7.1.2. Distribución haplotípica

Se muestra la distribución haplotípica para las regiones espaciadoras RuBisCo y *cox2-3*. Debido al escaso número de secuencias del gen ITS, resultado de su alta variación genética, no fue posible mostrar la distribución ribotípica. Dado que RuBisCo mostró mayor variación genética en contraste con *cox2-3*, su distribución haplotípica es más completa que con *cox2-3*, la cual se restringe sólo a algunas localidades de la Península de Yucatán.

7.1.2.1. Distribución de los haplotipos de la región espaciadora de la RuBisCo

Con la región espaciadora de la RuBisCo se encontraron 12 haplotipos distribuidos en las 14 localidades estudiadas. Su distribución se muestra en la Figura 9.

El haplotipo dominante en las poblaciones estudiadas fue R1, presente en 11 de las 14 localidades muestreadas; también fue el que representó al mayor número del total de individuos (50), por lo que podría ser considerado como el ancestro. Para la Península de Yucatán, este haplotipo se encontró en todas las localidades excepto en Punta Xen. Para las poblaciones de Sabancuy y Puerto Telchac, este haplotipo representó la totalidad en los individuos muestreados. Sin embargo, en Venezuela y Brasil estuvo ausente, sólo se encontraron dos representantes de este haplotipo en Puerto Escondido, Venezuela.

Tanto en el estado de Yucatán como en Venezuela, el haplotipo dominante fue R9, presente en todas las poblaciones aquí muestreadas (cinco), excepto Puerto Telchac. Junto con R1, R9 representó a un gran número del total de los individuos muestreados (35). Sin embargo, este haplotipo no fue encontrado en las poblaciones de Campeche, Quintana Roo y Brasil.

La mayor diversidad haplotípica se encontró en el estado de Campeche (siete haplotipos). Los haplotipos R2, R3, R5 y R7 fueron exclusivos en las poblaciones de este estado. Las poblaciones más diversas, con cinco haplotipos, fueron Isla del Carmen y Bahía de Tortugas. No hubo haplotipos exclusivos para una de las poblaciones de este estado.

La diversidad haplotípica para el estado de Yucatán fue menor (cuatro haplotipos). En las cuatro poblaciones muestreadas estuvieron presentes básicamente por los haplotipos R1 y

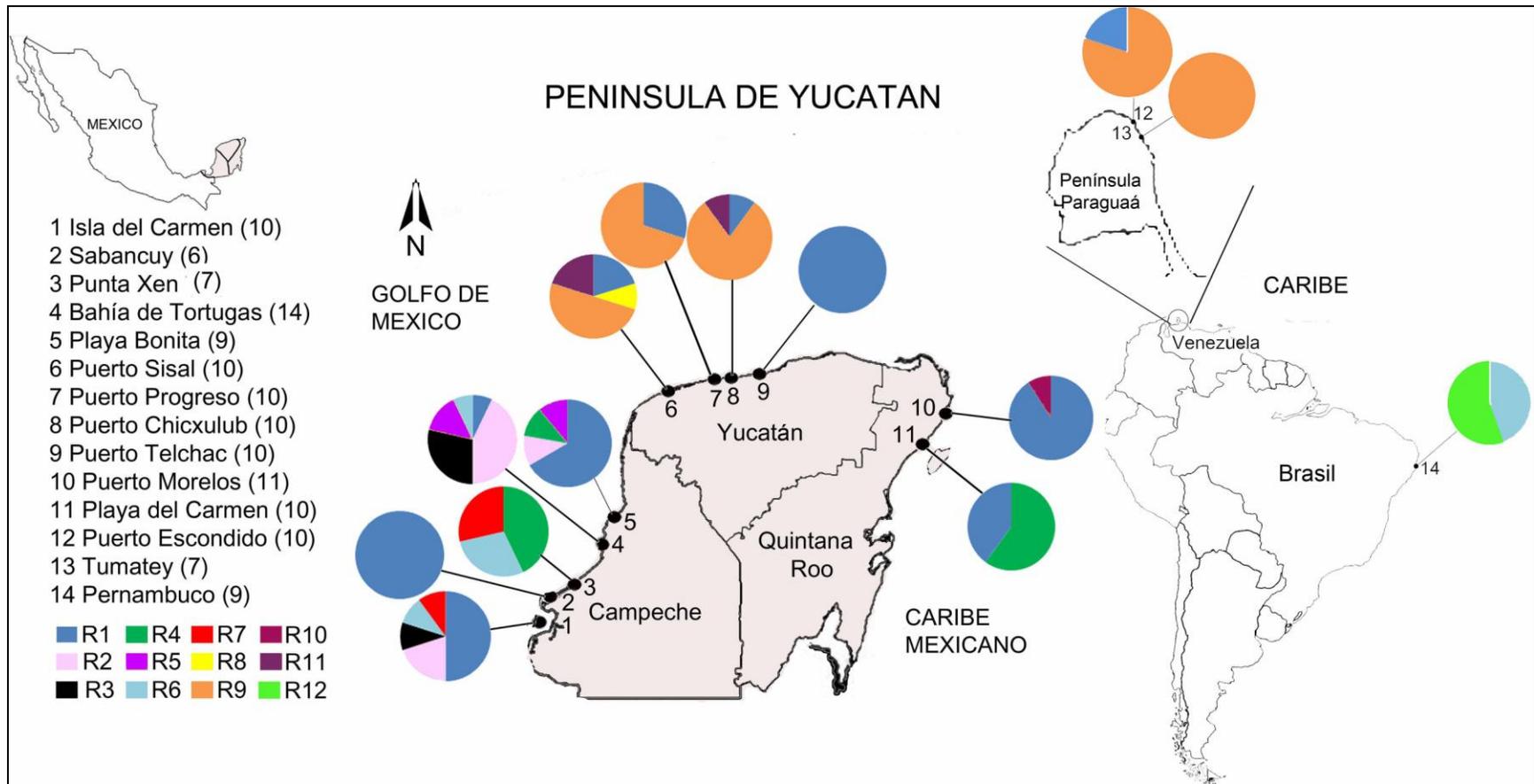


FIGURA 9. Distribución de los haplotipos de la región espaciadora de la RuBisCo en las poblaciones de *Hydropuntia cornea* estudiadas a lo largo del Golfo de México y el Caribe. Cada haplotipo está representado con un color. El tamaño de la muestra se indica entre paréntesis a un lado del nombre de cada población, mismas que se indican en el mapa con números (1-14).

R9, este último en mayor proporción. Los haplotipos R8 y R11 fueron exclusivos de este estado. Puerto Sisal fue la localidad más diversa, presentando los cuatro haplotipos registrados para Yucatán. El haplotipo R8 fue exclusivo de esta población.

En Quintana Roo, al igual que en Yucatán, se encontraron cuatro haplotipos. El haplotipo dominante en las dos poblaciones muestreadas fue R1. El haplotipo R4, fuera de Campeche, sólo se encontró en Playa del Carmen, representado por seis individuos. El haplotipo R10 fue exclusivo para este estado, específicamente para la población de Puerto Morelos.

En Venezuela, la diversidad haplotípica fue casi nula (dos haplotipos). El haplotipo dominante fue R9, el haplotipo R1 sólo se encontró en Puerto Escondido.

En Pernambuco, Brasil, se encontraron los haplotipos R6, sólo presente en las poblaciones de Campeche, y R12 exclusivo para esta población. En esta localidad no se encontraron los haplotipos R1 ni R9.

La distribución geográfica de los haplotipos, en consistencia con la red haplotípica, mostró una regionalización de los haplotipos del haplogrupo GII (R8, R9, R10 y R11) respecto de los haplotipos del haplogrupo GI (Fig. 8). Sin embargo, el haplotipo R1 estuvo presente en casi todas las poblaciones estudiadas.

7.1.2.2. Distribución de los haplotipos de la región espaciadora *cox2-3*

Con la región espaciadora *cox2-3* se encontraron tres haplotipos distribuidos en seis de las localidades estudiadas en el Golfo de México y el Caribe. Su distribución se muestra en la Figura 10.

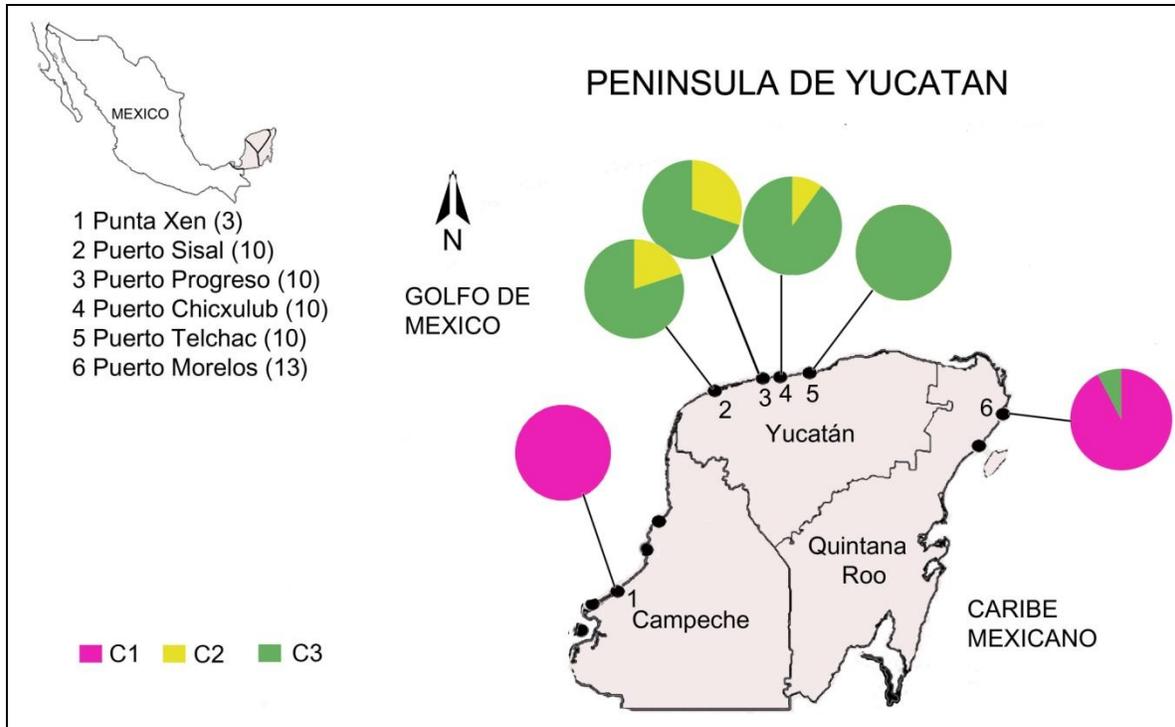


FIGURA 10. Distribución de los haplotipos de la región espaciadora *cox2-3* en las poblaciones de *Hydropuntia cornea* estudiadas a lo largo del Golfo de México y el Caribe. Cada haplotipo está representado con un color. El tamaño de la muestra se indica entre paréntesis a un lado del nombre de cada población, mismas que se indican en el mapa con números (1-6).

El haplotipo dominante en las poblaciones estudiadas fue el haplotipo C3, presente en cuatro de las seis localidades muestreadas; también fue el que representó al mayor número de la totalidad de los individuos muestreados (24). Este haplotipo se encontró en todas las poblaciones de Yucatán, excepto en Puerto Telchac y en Quintana Roo, en Puerto Morelos (1). A partir de los datos de distribución podría considerarse como el posible ancestro, sin embargo no presentó un gran número de conexiones. Seguido del haplotipo C3, el haplotipo C2 se encontró en todas las localidades de la Península de Yucatán, para la población de Puerto Telchac, este haplotipo representó la totalidad en los individuos muestreados (10). Sin embargo, no se encontró en Quintana Roo ni Campeche. El haplotipo

C1 por otro lado, se encontró en Quintana Roo, dónde representó casi la totalidad de los individuos muestreados para Puerto Morelos (12), y en Campeche, dónde representó la totalidad en los individuos muestreados para Punta Xen (3). A pesar de su baja frecuencia en las poblaciones, este haplotipo reveló el mayor número de conexiones en la red haplotípica (Figura 7), por lo que podría considerársele como el haplotipo ancestral.

En general, con excepción de Puerto Telchac y Punta Xen en dónde sólo se encontró un haplotipo, en todas las poblaciones muestreadas se encontró la misma diversidad haplotípica (2 haplotipos). La combinación de los haplotipos C2 y C3 estuvieron presentes en Puerto Sisal, Puerto Progreso y Puerto Chicxulub y la combinación de los haplotipos C1 y C3 estuvieron en Puerto Morelos.

La distribución geográfica de los haplotipos, en consistencia con la red haplotípica, mostró una regionalización de los haplotipos del haplogrupo GI (C1 y C2) respecto de los haplotipos del haplogrupo GII (C1). Sin embargo, en todas las poblaciones, excepto en Puerto Telchac, ambos grupos estuvieron mezclados.

7.1.3. Medidas de diversidad genética, flujo génico e historia demográfica

Debido a que la región espaciadora *cox2-3* mostró muy baja variación genética y el gen ITS presentó un alto número de gaps que dificultaron el alineamiento de las secuencias, los análisis de medidas de diversidad genética, flujo genético, historia demográfica, SAMOVA, AMOVA y aislamiento por distancia, se realizaron sólo para la región espaciadora de la RuBisCo. Por estas mismas razones, el número de secuencias generadas para este gen fue considerablemente mayor.

7.1.3.1. Medidas de diversidad genética

Con la región espaciadora de la RuBisCo se encontraron 14 haplotipos y 16 sitios polimórficos. La diversidad haplotípica (Hd) y nucleotídica (π) al interior de *Hydropuntia cornea* fue 0.776 y 0.010 respectivamente (Tabla 8). La mayor diversidad genética fue encontrada en Punta Xen ($Hd= 0.76190$ y $\pi= 0.00574$), Bahía Tortuga ($Hd= 0.75824$ y $\pi= 0.00440$), Isla del Carmen ($Hd= 0.75556$ y $\pi= 0.00311$) y Puerto Sisal ($Hd= 0.73333$ y $\pi= 0.00773$). Se encontró alta diversidad también en Playa Bonita ($Hd= 0.58333$ y $\pi= 0.00289$), Pernambuco ($Hd= 0.55556$ y $\pi= 0.00457$) y Playa del Carmen ($Hd= 0.53333$ y $\pi= 0.00146$). Sin embargo, se encontró muy baja diversidad en Puerto Chicxulub ($Hd= 0.37778$ y $\pi= 0.00384$) y Puerto Escondido ($Hd= 0.35556$ y $\pi= 0.00584$). En Sabancuy, Puerto Telchac y Tumathey no hubo variación genética. El número de haplotipos y sitios polimórficos por población se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8. Medidas de diversidad genética para poblaciones de *Hydropuntia cornea* basadas en secuencias de la región espaciadora de la RuBisCo.

Población	N	h	S	Hd	Π
Isla del Carmen	10	5	4	0.75556	0.00311
Sabancuy	6	1	0	0	0
Punta Xen	7	3	4	0.76190	0.00574
Bahia de Tortuga	14	5	5	0.75824	0.00440
Playa Bonita	9	4	4	0.58333	0.00289
Puerto Sisal	10	4	7	0.73333	0.00773
Puerto Progreso	10	2	6	0.46667	0.00767
Puerto Chicxulub	10	3	7	0.37778	0.00384
Puerto Telchac	10	1	0	0	0
Puerto Morelos	11	2	7	0.18182	0.00349
Playa del Carmen	10	2	1	0.53333	0.00146
Puerto Escondido	10	2	6	0.35556	0.00584
Tumathey	7	1	0	0	0
Pernambuco	9	2	3	0.55556	0.00457
Total	133	12	16	0.77694	0.01002

n =tamaño de la población; h =número de haplotipos; S =número de sitios polimórficos; Hd =diversidad haplotípica; π = diversidad nucleotídica.

7.1.3.2. Flujo génico

Las tasas de migración entre poblaciones (Nm) calculadas bajo diferentes modelos, mostraron valores menores a 1, lo que reveló ausencia de flujo genético. Bajo el modelo de Nei (1973), la tasa de migrantes calculada a partir de la información proporcionada por los haplotipos, fue $Nm=0.35$ con un valor de $G_{st}=0.41356$. Las tasas de migración calculadas a partir de datos de secuencias nucleotídicas fueron, con base en el modelo de Nei (1982), $Nm=0.13$ ($\Delta St=0.00653$, $\Gamma St=0.65738$); con base en el modelo de Lynch y Crease (1990, con la corrección de Jukes y Cantor), $Nm=0.13$ ($Nst=0.65667$); y, con base en el modelo de Hudson, Slatkin y Maddison (1992), $Nm=0.13$ ($Fst=0.65537$).

7.1.3.3. Historia demográfica

El análisis de distribución Mismatch en conjunto, mostró una distribución multimodal en discrepancia total con la distribución esperada bajo el modelo de expansión repentina (Figura 11). Los valores de los estadísticos D de Tajima ($D=0.50333$; $p=0.71700$) y F_s de Fu ($F_s=0.63862$; $p=0.64300$), fueron positivos aunque no significativos (Tabla 9), lo que sugiere que la población probablemente se encuentra en un periodo de estabilidad demográfica tras un periodo de expansión antiguo, con lo que se rechaza al mismo tiempo la hipótesis nula de expansión poblacional reciente.

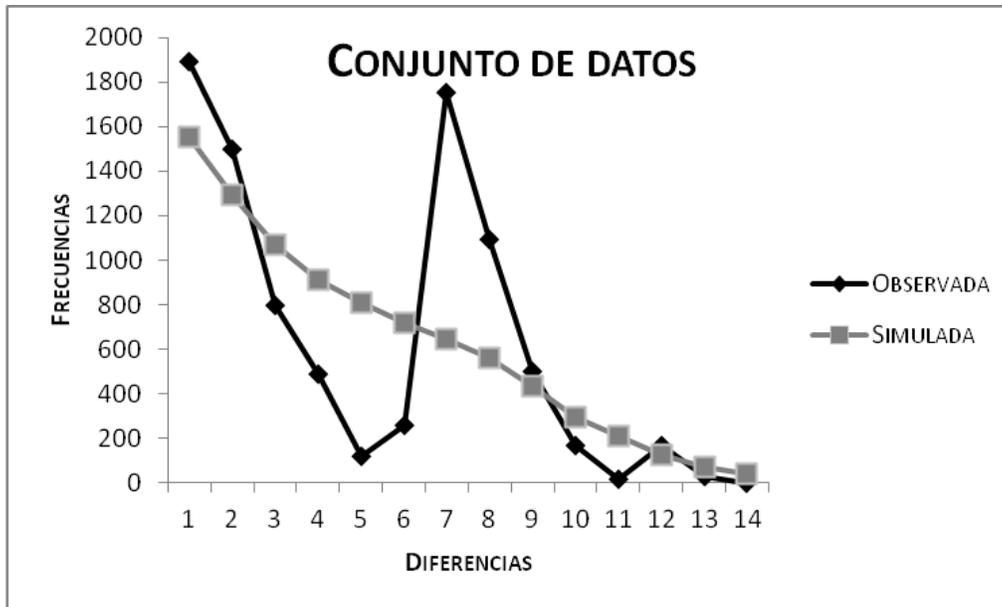


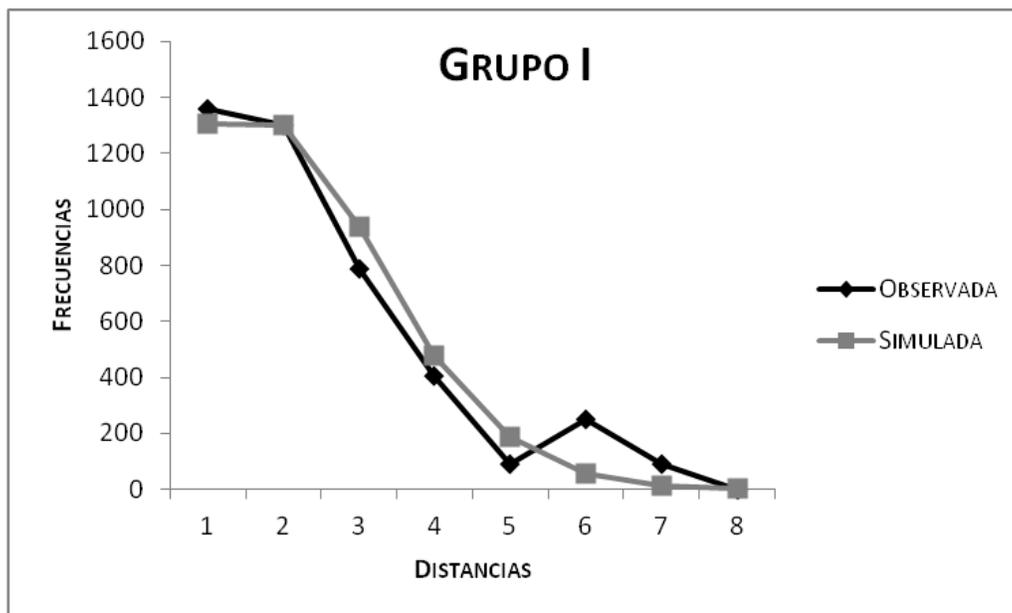
FIGURA 11. Distribución Mismatch para la región espaciadora de la RuBisCo en *Hydropuntia cornea*. La distribución observada está representada con la línea negra mientras que la distribución simulada bajo un modelo de expansión repentina, está representado con la línea gris.

TABLA 9. Estadísticos de neutralidad calculados para las secuencias de la región espaciadora de la RuBisCo, en conjunto y por grupo (GI y GII), y ajustes de la distribución Mismatch bajo los modelos de expansión repentina y expansión espacial (τ).

	<i>D</i> Tajima	<i>F_s</i> <i>F_u</i>	τ repentina	τ espacial
Conjunto	0.50333 p=0.71700	0.63862 p=0.64300	4.717 p=0.30400	2.126 p=0.43300
GI	-0.4391 p=0.03660	-0.7357 p=0.4110	2.996 p=0.7160	1.019 p=0.6680
GII	-1.4962 p=0.0480	-2.01803 p=0.15400	0.455 p=0.4890	0.001 p=0.0370

La distribución mismatch para los dos grupos (GI y GII), mostró una distribución ligeramente multimodal para el grupo GI, en total desajuste con el modelo de expansión

repentina y unimodal para el grupo GII, completamente ajustada al modelo de expansión repentina (Figura 12). Los valores de los estadísticos D de Tajima ($D=-0.4391$; $p=0.03660$ para GI y $D=-1.4962$; $p=0.0480$ para GII) y F_s de Fu ($F_s=-0.7357$; $p=0.4110$ para GI y $F_s=-2.01803$; $p=0.15400$ para GII), fueron negativos pero sólo significativos para el grupo GII (Tabla 9). La distribución Mismatch del grupo GI sugiere que la población está en equilibrio demográfico tras un proceso de expansión demográfico reciente, mientras que la distribución Mismatch del grupo GII, sugiere que la población se encuentran en un periodo de expansión demográfica reciente.



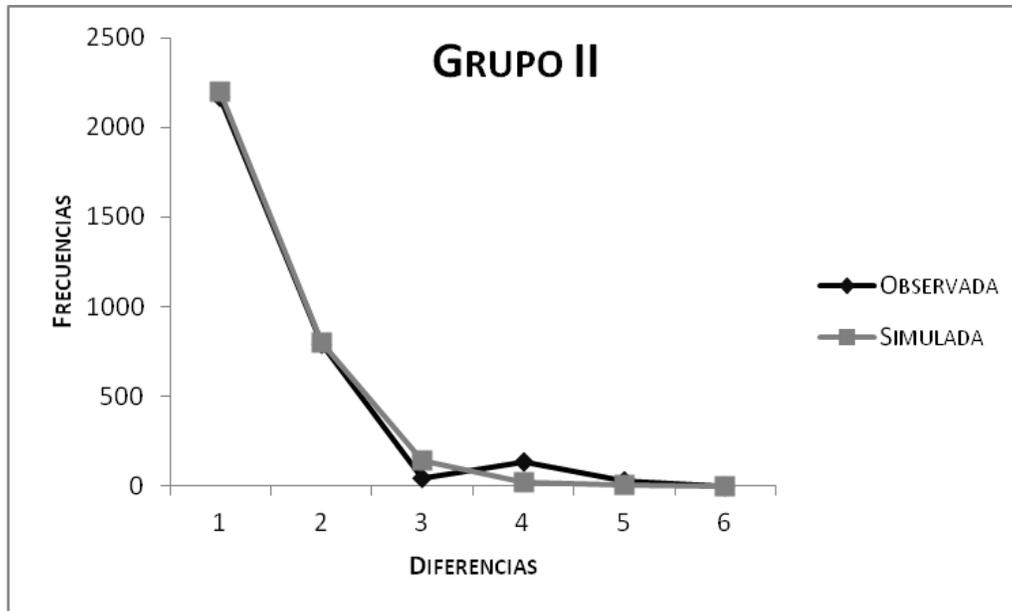


FIGURA 12. Gráficos de la Distribución Mismatch para la región espaciadora de la RuBisCo en grupos definidos (GI, gráfico superior y GII, gráfico inferior) de *Hydropuntia cornea*. La distribución observada está representada con la línea negra mientras que la distribución simulada bajo un modelo de expansión reciente, está representado con la línea gris.

7.1.4. SAMOVA

El SAMOVA reveló en *Hydropuntia cornea*, una estructura genética definida por tres grupos de poblaciones genéticamente diferenciados y aislados geográficamente (Tabla 10). El grupo 1 estuvo conformado únicamente por la población de Pernambuco, Brasil; el grupo 2, estuvo integrado por las cinco poblaciones de Campeche, Puerto Telchac en Yucatán y las dos poblaciones de Quintana Roo, en total ocho poblaciones; y el grupo 3 estuvo integrados por las tres poblaciones restantes de Yucatán y las dos poblaciones de Venezuela, cinco en total. El grupo que juntó al mayor número de poblaciones fue el número 2.

TABLA 10. Estructura genética definida por SAMOVA.

Grupos definidos por }	
Grupo 1={	
"per"	Pernambuco
}	
Grupo 2={	
"ica"	Isla del Carmen
"sab"	Sabancuy
"pux"	Punta Xen
"bat"	Bahía Tortuga
"pbo"	Playa Bonita
"pte"	Puerto Telchac
"pmo"	Puerto Morelos
"pca"	Playa del Carmen
}	
Grupo 3={	
"psi"	Puerto Sisal
"pro"	Puerto Progreso
"pch"	Puerto Chicxulub
"pes"	Puerto Escondido
"tum"	Tumatey
}	

Los índices de fijación calculados para tres grupos presentaron los valores de significancia más altos (Tabla 11). El porcentaje de diferenciación entre grupos geográficos fue de F_{CT} : **0.71972**; mientras que dentro de las poblaciones F_{ST} : 0.74662 y entre las poblaciones al interior de los grupos fue de F_{SC} : 0.09598.

El valor de significancia de F_{ST} , cercano al 1, corroboró que existe, aunque no total, una cierta estructuración en las poblaciones estudiadas.

TABLA 11. Valores de significancia calculados para los índices de fijación correspondientes a cada estructura de grupos definida por SAMOVA.

2 Grupos	3 Grupos	4 Grupos	5 Grupos
F _{SC} : 0.24934	F _{SC} : 0.09598	F _{SC} : 0.28076	F _{SC} : 0.10033
F _{ST} : 0.76201	F _{ST} : 0.74662	F _{ST} : 0.73198	F _{ST} : 0.72481
F _{CT} : 0.68296	F_{CT} : 0.71972	F _{CT} : 0.62735	F _{CT} : 0.69412

Este análisis también fue consistente en la diferenciación de dos grupos genéticamente diferentes, que aunque en el agrupamiento parecieran estar ligeramente aislados geográficamente, se encuentran mezclados en las poblaciones. El posible aislamiento parece ser más evidente en Campeche que en el resto del Caribe, donde las poblaciones se encuentran más mezcladas. Esto sugiere la existencia de barreras geográficas (ver área de estudio) que podría explicarse por las corrientes oceanográficas (Figura 13) y por otro lado, por el surgimiento mismo del bloque de la Península de Yucatán.

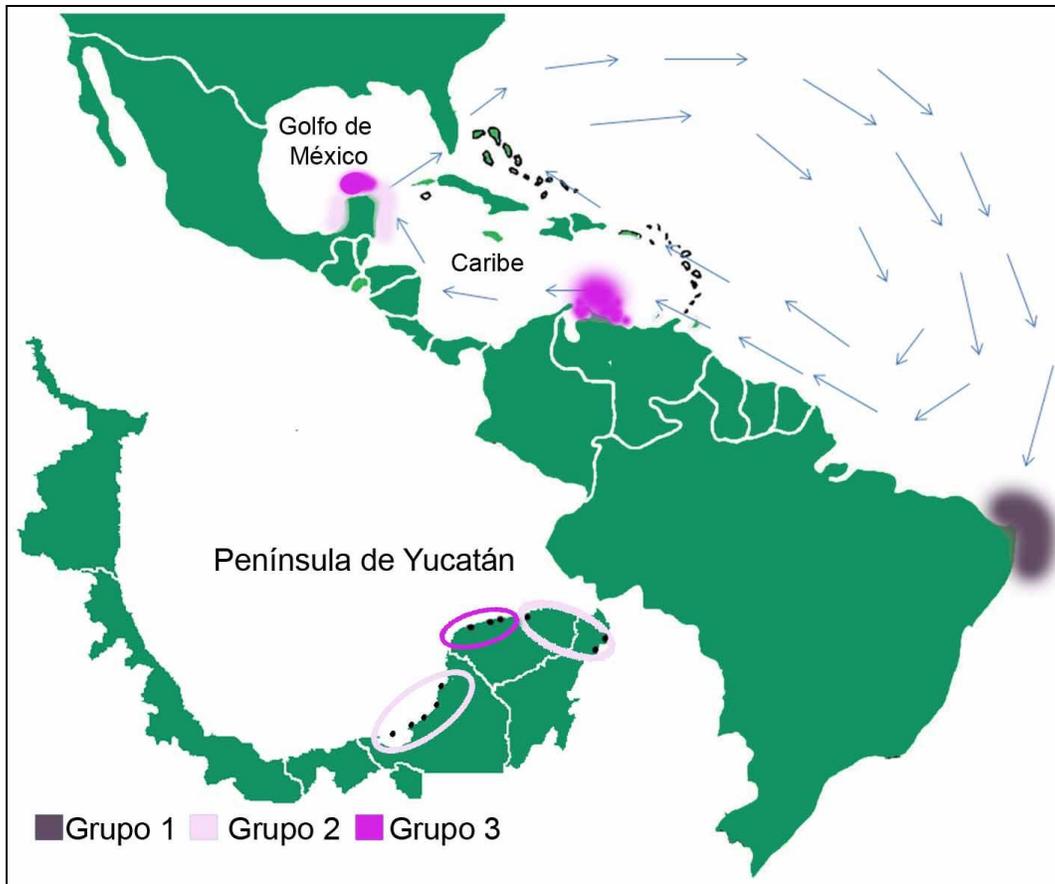


FIGURA 13. Distribución geográfica de los grupos de poblaciones pre definidos por SAMOVA para la Península de Yucatán (indicados con óvalos), y el patrón de las corrientes oceanográficas en el Caribe (indicado por las flechas azules). Cada color representa a un grupo, en la leyenda se indica a qué grupo corresponde cada color.

7.1.5. AMOVA

El análisis de estructura jerárquica de varianza para la región espaciadora de la RuBisCo, calculada para todas las poblaciones como un conjunto, mostró que la varianza debida a la diferenciación entre poblaciones fue de 63%, mucho mayor que 37% correspondiente a la varianza al interior de las poblaciones (Tabla 12). El valor de F_{ST} (0.63206) calculado fue estadísticamente significativo. Por otro lado, la varianza calculada para los tres grupos definidos por SAMOVA, mostró una varianza entre grupos geográficos de 72%, mucho

mayor que la varianza de 3% mostrado entre poblaciones al interior de los grupos y que la varianza de 25% al interior de las poblaciones (Tabla 13). Todos los estadísticos fueron significativos (Tabla 11).

TABLA 12. Análisis de varianza (AMOVA) para la región espaciadora de la RuBisCo en las poblaciones de *Hydropuntia cornea*.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	158.981	1.21642	63.20569
Al interior de las poblaciones	84.267	0.70812	36.79431
Total	243.248	1.92455	

TABLA 13. Análisis de varianza molecular (AMOVA) y estructura genética para tres grupos de la región espaciadora de la RuBisCo en las poblaciones de *Hydropuntia cornea*.

Fuente de variación	d.f.	Suma de los cuadrados	Componentes de la varianza⁵	Porcentaje de variación
Entre grupos	2	143.279	1.97322 Va	71.97
Entre poblaciones al interior de los grupos	11	15.332	0.07375 Vb	2.69
Al interior de las poblaciones	119	82.667	0.69468 Vc	25.34
Total	132	241.278	2.74166	

⁵Va=Varianza del componente a; Vb=Varianza del componente b y Vc= Varianza del componente c.

7.1.6. Aislamiento por distancia

Finalmente, la prueba de aislamiento por distancia para la región espaciadora de la RuBisCo, mostró un valor de la variable normal estándar ($g=2.835$) significativamente mayor al valor crítico (1.645, $p=0.05$), por lo que, efectivamente, si existe una relación entre la distancia genética y la distancia geográfica.

7.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

A continuación se describen los resultados filogenéticos a partir de los genes *rbcL* y COI.

7.2.1. *rbcL*

El conjunto de datos consistió en 13 secuencias (Tabla 3 y Apéndice 10) con 1311 pb de longitud, mismas que fueron alineadas con secuencias publicadas en el GenBank (Apéndice 8). El análisis de ML y el análisis Bayesiano, presentaron topologías idénticas, por lo que sólo se presenta el análisis Bayesiano con los valores de ML integrados (Figura 14). La topología resultante, mostró dos grupos monofiléticos (GI y GII) fuertemente soportados por los valores de Probabilidad Posterior Bayesiana (PPB) y bootstrap (1.0/98, respectivamente). El Grupo I integró seis secuencias de Quintana Roo y Yucatán con cuatro secuencias de *Hydropuntia usneoides* del GeneBank. Por otro lado, el Grupo II integró siete muestras de Yucatán con dos secuencias de *Hydropuntia cornea* del GenBank.

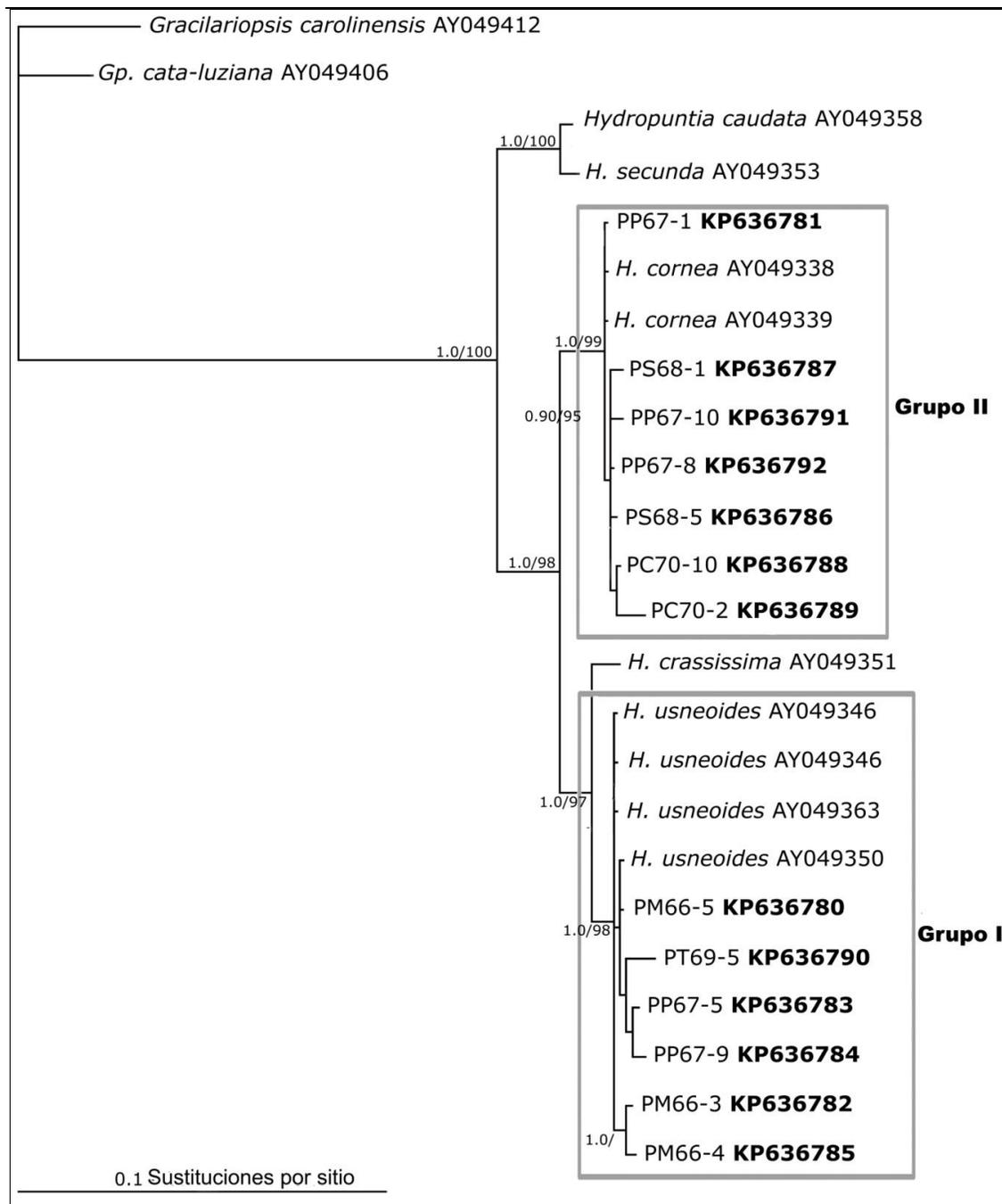


FIGURA 14. Topología Bayesiana con datos de secuencias del gen *rbcL* para muestras de *Hydropuntia cornea*. En las ramas se indican los valores de PPB y de bootstrap para ML. Los valores por debajo del 95% no se muestran. En los cuadros se remarcan los dos grupos genéticamente diferenciados (Grupo I y Grupo II). PM, Puerto Morelos; PT, Puerto Telcach; PS, Puerto Sisal; PC, Puerto Chicxulub; PP, Puerto Progreso. Las

especies de *Gracilariopsis* fueron definidas como grupo externo. Las secuencias generadas en la presente tesis, están remarcadas en negrita, las no resaltadas provienen del GenBank.

7.2.2. COI

El conjunto de datos consistió en 12 secuencias (Tabla 3 y Apéndice 10) con 671 pb de longitud, mismas que fueron alineadas con secuencias publicadas en el GenBank (Apéndice 8). El análisis de ML y el análisis Bayesiano, presentaron topologías idénticas, por lo que sólo se presenta el análisis Bayesiano con los valores de ML integrados (Figura 15). La topología resultante, mostró dos grupos monofiléticos (GI y GII), uno fuertemente soportando por los valores de PPB y bootstrap (GI, 0.99/100 respectivamente), y el otro grupo (GII) no lo estuvo. El Grupo I, estuvo integrado por cinco secuencias de Yucatán y Quintana Roo, mientras que el Grupo II integró siete muestras también de Yucatán con cinco secuencias de *Hydropuntia cornea* del GenBank.

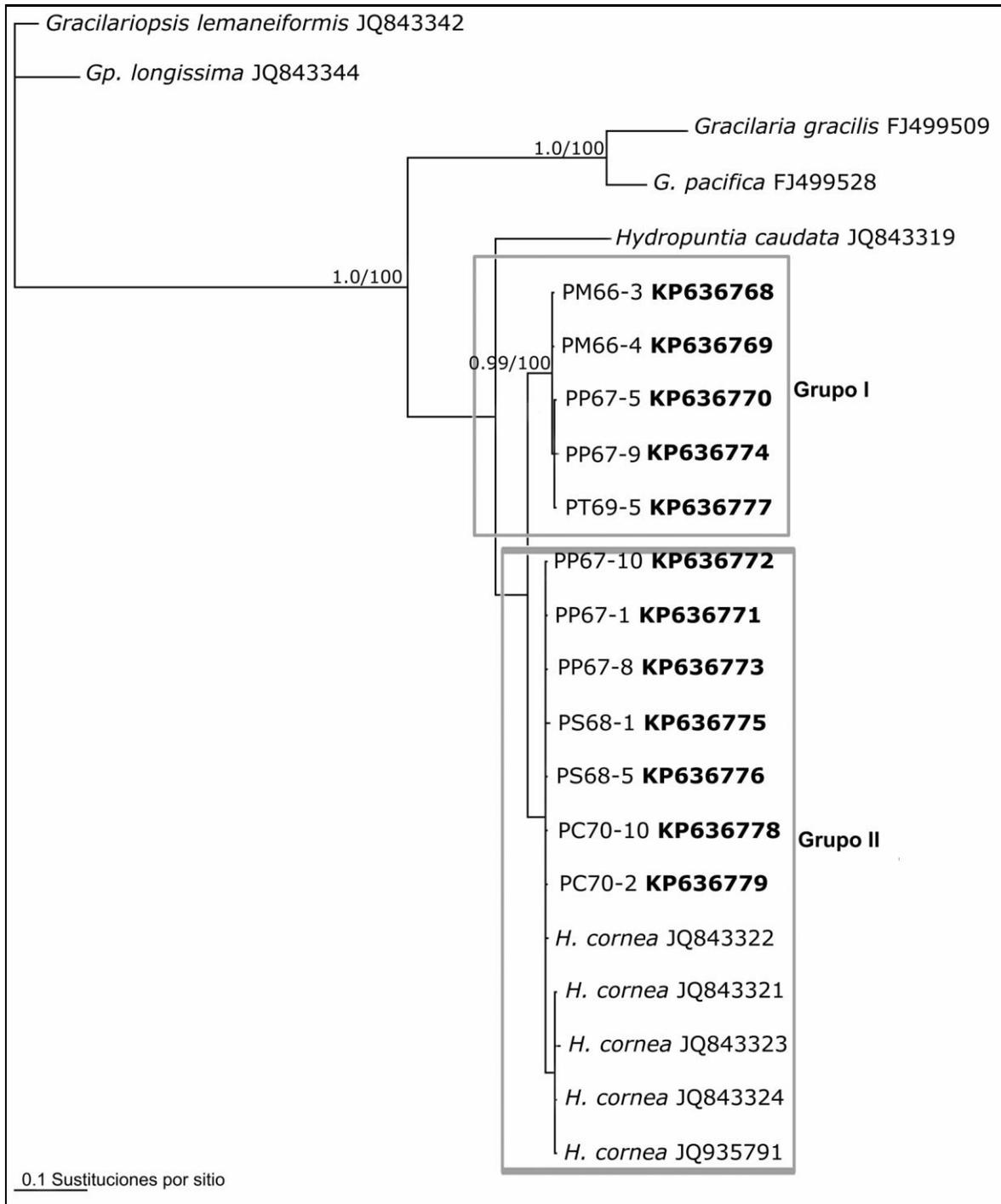


FIGURA 15. Topología Bayesiana con datos de secuencias del gen COI para muestras de *Hydropuntia cornea*. En las ramas se indican los valores de PPB y de bootstrap para ML. Los valores por debajo del 95% no se muestran. En los cuadros se remarcan los dos grupos genéticamente diferenciados (Grupo I y Grupo II). PM, Puerto Morelos; PT, Puerto Telcach; PS, Puerto Sisal; PC Puerto Chicxulub; PP, Puerto Progreso. Las

especies de *Gracilariopsis* fueron definidas como grupo externo. Las secuencias generadas en la presente tesis, están remarcadas en negrita, las no resaltadas provienen del GenBank.

7.3. DISTANCIAS GENÉTICAS

Para cada conjunto de datos de los cinco marcadores trabajados, se calcularon las distancias (corregidas y no corregidas p) interespecíficas e intraespecíficas para los grupos genéticos I y II (Tabla 14). La distancia interespecífica entre el Grupo I y el Grupo II (corregida y no corregida, respectivamente) fue de 3.4% y 3.3% con RuBisCo, 2% y 2% con la región espaciadora *cox2-3*, 2.8% y 2.7% con *rbcL* y, 4.3% y 4.4% con COI. La distancia intraespecífica del Grupo I, fue la misma corregida y no corregida, 1.6% con RuBisCo y 0.4% con la región espaciadora *cox2-3*; al interior del Grupo II, la distancia genética fue la misma, corregida y no corregida, 1.1% con RuBisCo y con la región espaciadora *cox2-3* no hubo diferencia. Con el gen ITS, la distancia interespecífica entre los ribogrupos 1 y 2 (corregida y no corregida, respectivamente) fue 90% y 61%.

TABLA 14. Matriz de distancias corregidas (en la posición superior de la matriz, resaltados en negritas) y distancias p no corregidas (en la posición de la matriz, no resaltados) de las secuencias de ADN correspondientes con los haplotipos encontrados en las poblaciones de *Hydropuntia cornea* para los cinco genes trabajados, y, en secuencias del GenBank relacionadas con *H. cornea*.

I.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 PT69-1	-	0.0028	0.0028	0.0028	0.0083	0.0055	0.0055	0.0084	0.0169	0.0198	0.0198	0.0140
2 IC82-4	0.0027	-	0.0055	0.0055	0.0055	0.0028	0.0028	0.0112	0.0198	0.0227	0.0226	0.0111
3 IC82-6	0.0028	0.0055	-	0.0055	0.0111	0.0083	0.0083	0.0112	0.0198	0.0228	0.0227	0.0168
4 PBE50	0.0028	0.0055	0.0055	-	0.0111	0.0083	0.0083	0.0112	0.0198	0.0169	0.0227	0.0168
5 PB83-11	0.0083	0.0055	0.0111	0.0111	-	0.0083	0.0083	0.0168	0.0255	0.0285	0.0285	0.0168
6 IC82-11	0.0055	0.0027	0.0083	0.0083	0.0083	-	0.0055	0.0140	0.0226	0.0256	0.0255	0.0083
7 IC82-9	0.0055	0.0028	0.0083	0.0083	0.0083	0.0055	-	0.0140	0.0227	0.0257	0.0256	0.0083
8 PS68-8	0.0083	0.0111	0.0112	0.0111	0.0167	0.0139	0.0139	-	0.0083	0.0112	0.0111	0.0226
9 PP67-10	0.0167	0.0195	0.0196	0.0196	0.0252	0.0223	0.0224	0.0083	-	0.0028	0.0028	0.0315
10 PME9	0.0196	0.0224	0.0225	0.0167	0.0280	0.0252	0.0253	0.0111	0.0028	-	0.0055	0.0346
11 PS68-2	0.0195	0.0223	0.0224	0.0224	0.0280	0.0252	0.0252	0.0111	0.0027	0.0055	-	0.0345
12 BP88-1	0.0138	0.0111	0.0167	0.0167	0.0166	0.0083	0.0083	0.0223	0.0309	0.0339	0.0338	-
II.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 PP67-1	-	0.0031	0.0008	0.0031	0.0031	0.0218	0.0227	0.0244	0.0235	0.0269	0.0937	0.0937
2 PS68-1	0.00309	-	0.0024	0.0047	0.0047	0.0252	0.0260	0.0260	0.0252	0.0286	0.0957	0.0957
3 PP67-8	0.00310	0.00466	-	0.0024	0.0024	0.0227	0.0235	0.0235	0.0227	0.0261	0.0927	0.0927
4 PS68-5	0.00388	0.00544	0.00390	-	0.0016	0.0252	0.0260	0.0260	0.0252	0.0286	0.0956	0.0956
5 PCH70-10	0.00311	0.00466	0.00312	0.00156	-	0.0252	0.0260	0.0260	0.0252	0.0286	0.0957	0.0957
6 <i>H. usneoides</i>	0.02059	0.02393	0.02400	0.02481	0.02403	-	0.0008	0.0024	0.0016	0.0047	0.0935	0.0935

USA												
7 <i>H. usneoides</i>	0.02136	0.02471	0.02478	0.02560	0.02482	0.00076	-	0.0031	0.0008	0.0039	0.0924	0.0924
Mex												
8 PM66-4	0.02470	0.02636	0.02409	0.02569	0.02490	0.00387	0.00464	-	0.0024	0.0055	0.0924	0.0924
9 PT 69-5	0.02903	0.02477	0.02405	0.02486	0.02408	0.00840	0.00764	0.00233	-	0.0031	0.0914	0.0914
10 PP67-9	0.02548	0.02710	0.02715	0.02798	0.02720	0.00464	0.00387	0.00542	0.00310	-	0.0955	0.0955
11 <i>G. backeri</i>	0.08009	0.08265	0.08290	0.08381	0.08302	0.08009	0.07933	0.08191	0.08561	0.08272	-	0.0128
12 <i>G. capensis</i>	0.08022	0.08282	0.08308	0.08401	0.08321	0.08022	0.07946	0.08209	0.08576	0.08290	0.01221	-
III.												
	1	2	3									
1 PSNE17	-	0.0041	0.0166									
2 PT69-10	0.00405	-	0.0209									
3 PC70-4	0.01619	0.02024	-									
IV.												
	1	2	3	4	5	6						
1 PM66-1	-	0.0045	0.0382	0.0433	0.1399	0.1682						
2 PP67-9	0.00447	-	0.0434	0.0485	0.1467	0.1756						
3 PCH70-10	0.03577	0.04024	-	0.0106	0.1470	0.1582						
4 <i>H. cornea</i>	0.04024	0.04471	0.01043	-	0.1399	0.1603						
5 <i>G. pacifica</i>	0.11624	0.12072	0.12072	0.11624	-	0.1069						
6 <i>G. gracilis</i>	0.13413	0.13860	0.12817	0.12966	0.08942	-						
V.												
	1	2	3	4	5							
1 PP67-9	-	0.1004	3.9062	4.2200	4.0303							
2 PCH70-10	0.08873	-	3.0201	3.2180	3.1189							
3 PS68-1	0.61568	0.60072	-	0.0665	0.6041							
4 PP67-5	0.61980	0.60620	0.06093	-	0.0063							
5 PM66-3	0.61764	0.60414	0.05908	0.00550	-							

I. Región espaciadora de la RuBisCo; II. *rbcL*; III. Región espaciadora *cox2-3*; IV. COI; V. ITS.

7.4. VARIACIÓN MORFOLÓGICA

Para las poblaciones mexicanas muestreadas, diferenciamos trece morfos (Figuras 16 y 17) dentro del espectro de variación morfológica de *Hydropuntia cornea*. La mayor diversidad de formas se encontró en Campeche (7), seguido de Yucatán (5) y Quintana Roo (1). Las muestras de Venezuela y Brasil, presentaron una morfología similar a la encontrada en las poblaciones del Caribe mexicano.

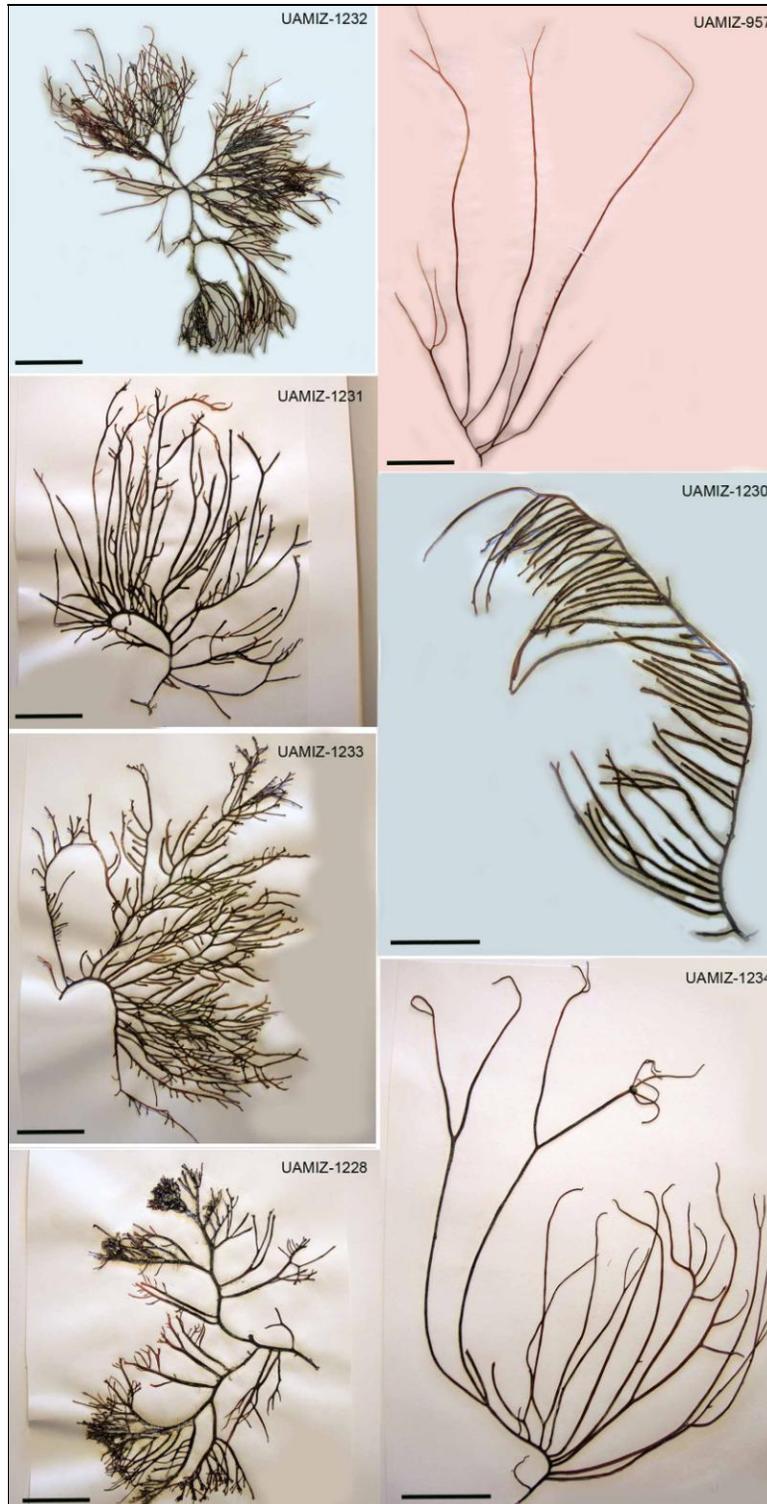


FIGURA 16. Espectro de variación morfológica encontrado al interior de *Hydropuntia cornea* en Campeche.

El número de voucher se indica en la figura. Barra de escalas= 5 cm.

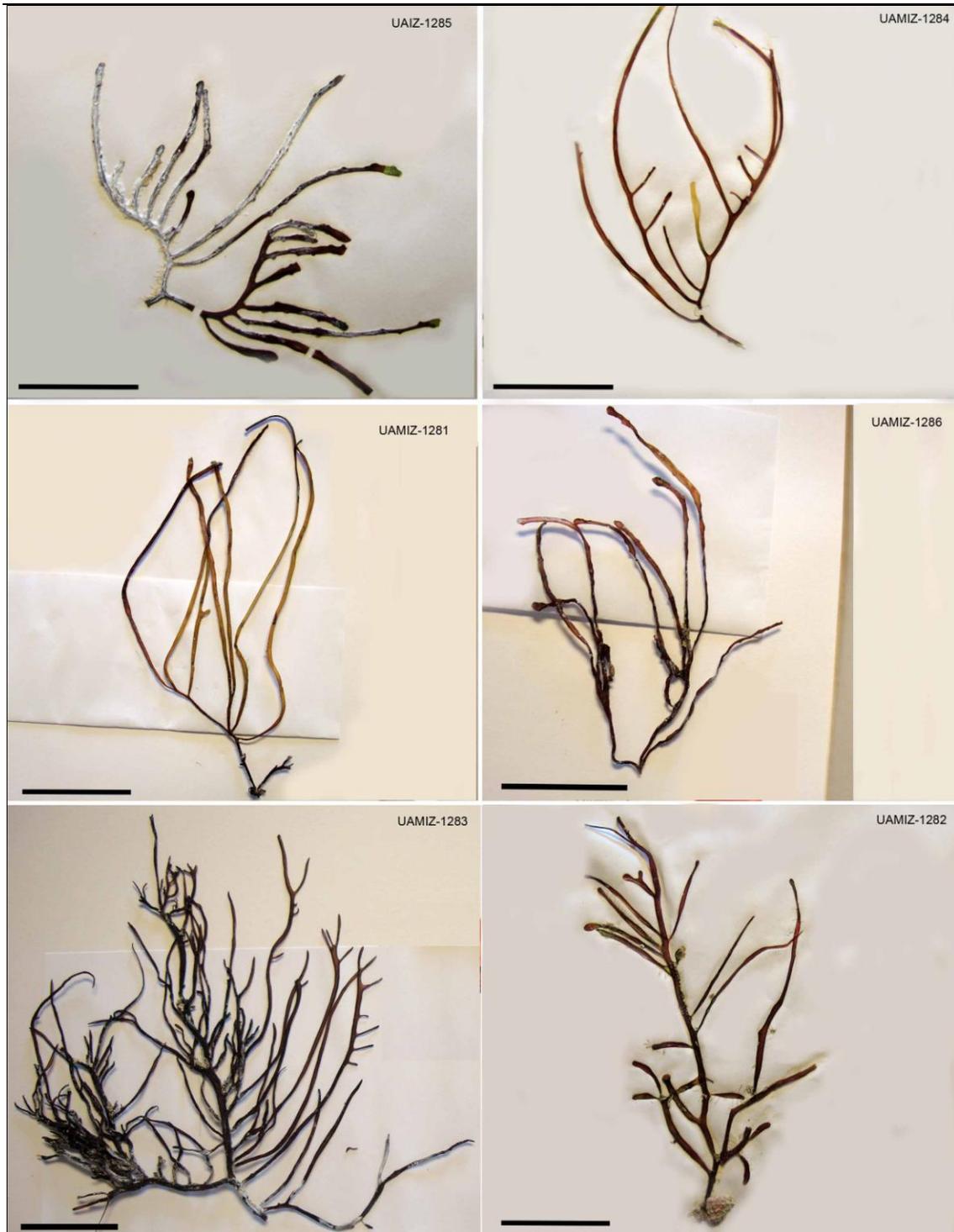


FIGURA 17. Espectro de variación morfológica encontrado al interior de *Hydropuntia cornea* en Yucatán y Quintana Roo. El número de voucher se indica en la figura. Barra de escalas= 5 cm.

Para el análisis de Componentes Principales, se consideraron siete caracteres (Tabla 15) que fueron observados en 20 individuos representantes de los dos grupos genéticos (GI y GII). Los primeros tres componentes explicaron el 80% de la varianza (Tabla 16). El componente 1 (CP1) explicó el 57.1% de la varianza, el componente 2 (CP2) explicó el 14.6% y el componente 3 (CP3) explicó el 8.6%. Sin embargo, no se observaron diferencias morfológicas entre ambos grupos (Tabla 15 y Figura 18).

TABLA 15. Distribución de los caracteres diagnósticos observados, de acuerdo con Dreckmann (2012) y Ardito *et al.* (2014), en 20 muestras representativas de los grupos genéticos GI y GII, en diferentes poblaciones de *Hydropuntia cornea*.

ID Muestra ⁶	Longitud del talo (cm)	Número de ramificaciones en el talo	Número de capas corticales	Diámetro de las células corticales (µm)		Número de capas medulares	Diámetro de las células medulares (µm)		Diámetro de los tetrasporangios (µm)	Grupo molecular
				Largo	Ancho		Largo	Ancho		
PM66-6	16	18	4	10-12.5	4-5	14	120-340	80-200	-	GI
PME9	30	14	4	10-12.5	5-7.5	12	110-250	60-190	-	GII
PME88	20	8	4	10-15	5-7.5	16	140-240	80-160	-	GI
PME97	17	7	2	10-12	5-7.5	12	110-250	60-110	-	GII
PME100	11.25	9	2	10-15	7.5	16	160-200	100-150	-	GI
PP67-2	28	12	3	10-12	5-7.5	14	190-280	100-200	-	GII
PP67-4	13	12	2	10	5	16	200-500	100-220	-	GII
PP67-7	18	8	2	10-15	5-6.25	14	150-250	80-110	-	GII
PP67-9	14	7	1	10-13.8	5	11	80-200	60-150	25-30	GI
PS68-5	20	4	3	10-11.5	4-5	12	240-400	130-280	-	GII
PS68-10	24	12	1	15	7.5	16	180-300	100-200	25-30	GII
PT69-5	19	3	1	12.5-15	5-7.5	14	100-260	70-210	20-30	GI
PT69-8	13	3	2	10-12.5	4-7.5	10	120-280	80-200	-	GI
PT69-10	22	5	2	10-15	5	10	220-310	70-150	20-25	GI
PCH70-1	28	7	2	10	5	12	160-200	60-160	20-30	GII
PCH70-5	40	16	2	10-12.5	4.5-7.5	10	180-300	100-180	20-25	GII
PCH70-9	20.5	5	1	12-12.5	7.5	12	180-320	80-160	-	GII
PCE5	7	9	4	12-15	5-7.5	18	90-150	70-120	-	GI
PCE4	11	12	2	10-12.5	5-7.5	11	80-150	60-110	-	GI
PCE103	24	8	2	10-12.5	5	10	90-150	60-140	-	GII

⁶ID referido al número de campo y clave de extracción de ADN con la que se identifica a los individuos que fueron analizados morfológicamente. Cada clave, la cual incluye las siglas de la población y número de individuo, se describe en la Tabla 3.

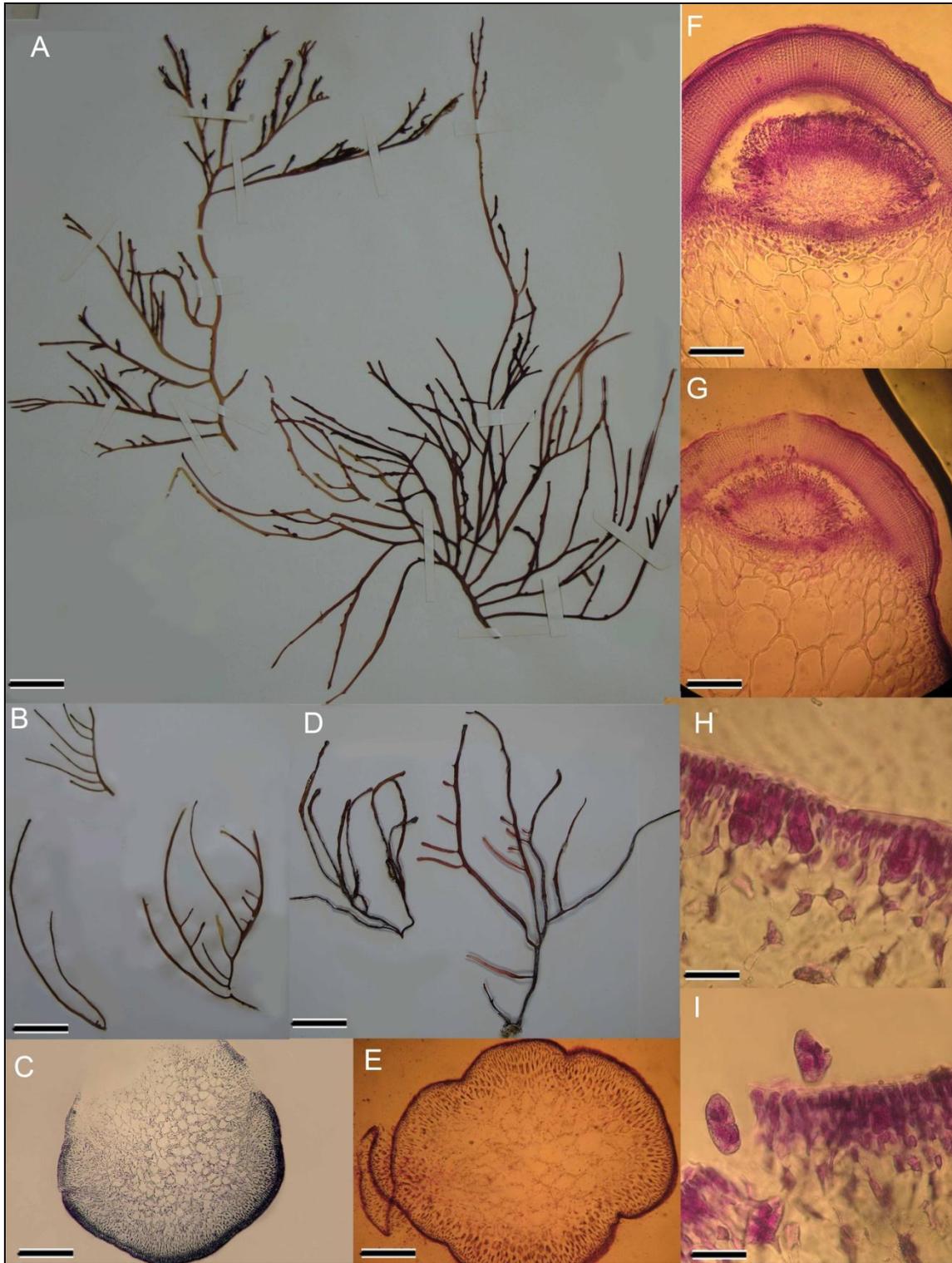


FIGURA 18. Caracteres diagnósticos de *Hydropuntia cornea*. En A, B y D, se muestra el patrón y número de ramificaciones, Grupo I a la izquierda y Grupo II a la derecha. Barra de escalas=3 cm. En C (Grupo I) y E

(Grupo II), se muestra el número y diámetro de capas corticales y medulares. Barra de escalas=400 μm y 350 μm respectivamente. En F (Grupo I) y G (Grupo II), se muestran el diámetro de los cistocarpos y el número de capas celulares en el pericarpo. Barra de escalas=300 μm . En H (Grupo I) y G (Grupo II), se muestran los tetrasporangios. Barras de escala 30 μm .

TABLA 16. Resumen de la varianza total explicada en componentes principales.

Componentes	Valores propios iniciales			Suma de extracción de cargas al cuadrado			Suma de rotación de cargas al cuadrado		
	Total	% de Varianza	% Acumulada	Total	% de Varianza	% Acumulada	Total	% de Varianza	% Acumulada
	1	6.852	57.100	57.100	6.852	57.100	57.100	5.652	47.097
2	1.751	14.593	71.693	1.751	14.593	71.693	2.123	17.692	64.789
3	1.033	8.607	80.300	1.033	8.607	80.300	1.861	15.511	80.300
4	.647	5.388	85.688						
5	.468	3.899	89.587						
6	.398	3.316	92.904						
7	.346	2.883	95.787						
8	.237	1.977	97.764						
9	.176	1.467	99.231						
10	.078	.647	99.878						
11	.012	.101	99.979						
12	.003	.021	100.000						

Por otro lado, el análisis discriminante mostró normalidad y homogeneidad de varianza ($F=2.92$, $P < 0.05$) en los datos. El valor obtenido para la lambda de Wilks's (λ) a su vez, fue $\lambda=0.997$ con una significancia de $P < 0.05$, lo que mostró que no existe diferencia significativa entre las muestras (Figura 19).

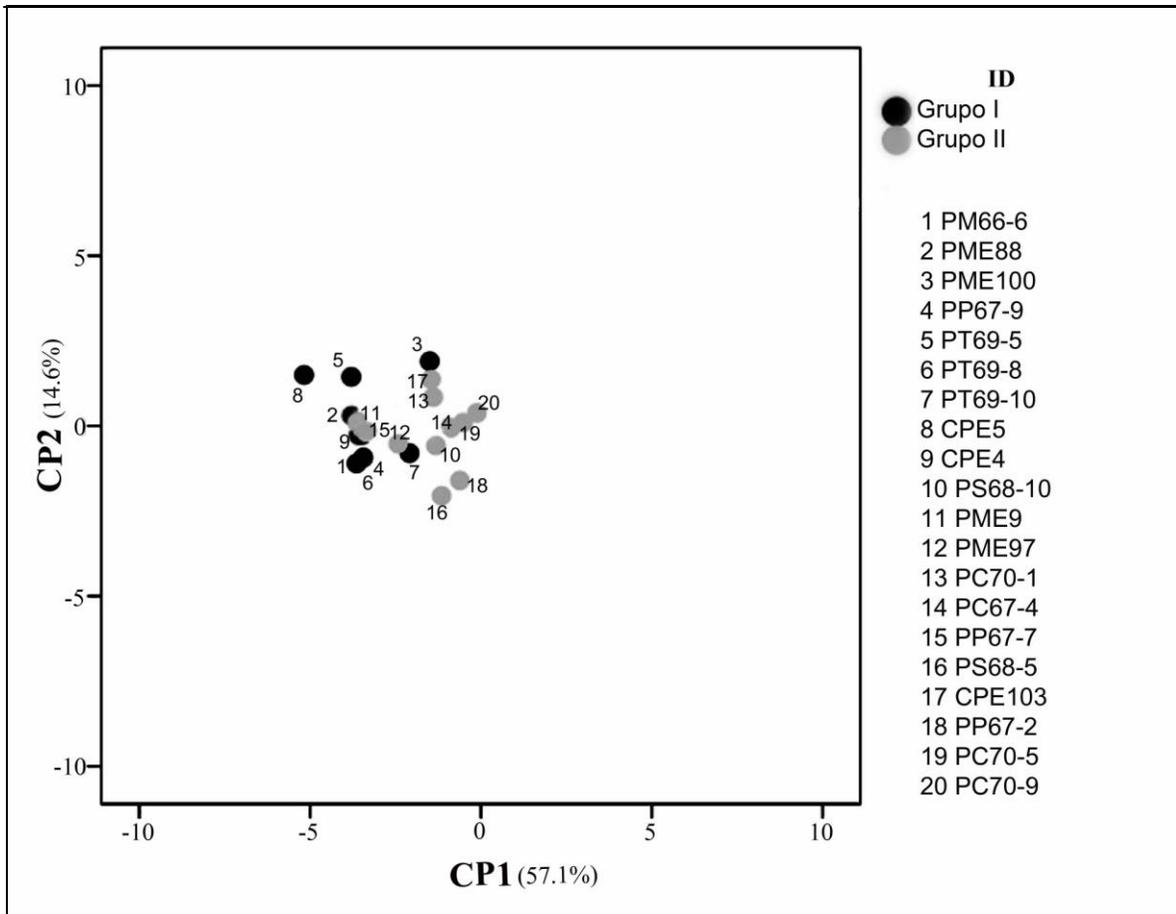


FIGURA 19. Gráfica del análisis de componentes principales de los datos morfológicos. El eje de la X muestra la varianza del CP1, y el eje de la Y muestra la varianza del CP2. Los valores de varianza están indicados en los paréntesis. Los puntos negros representan a las muestras del Grupo I y los puntos grises al Grupo II. Los números indican el número de muestra.

Con base en estos valores, se aceptó la hipótesis nula “Grupo I y Grupo II no son morfológicamente diferentes”.

8. DISCUSIÓN

Los cinco marcadores moleculares utilizados y todos los análisis realizados con ellos, revelaron estructura genética al interior de las poblaciones de *Hydropuntia cornea* en el Golfo de México y el Caribe. De los tres marcadores moleculares utilizados para analizar la variación genética, la región espaciadora *cox2-3* mostró muy baja variación genética intra e interespecífica, la región espaciadora de la RuBisCo mostró baja variación interespecífica pero suficiente variación intraespecífica y, el gen ITS reveló una muy alta variación intra e interespecífica y un gran número de gaps; por lo que el gen recomendado para estudios de variación genética en especies de *Hydropuntia* es la región espaciadora de la RuBisCo. Los genes *rbcL* y COI, utilizados en análisis filogenéticos, aunque son conservados fueron suficientemente variables para revelar afinidades interespecíficas.

8.1. VARIACIÓN GENÉTICA

Tanto la región espaciadora de la RuBisCo como la región espaciadora *cox2-3*, mostraron baja variación genética entre grupos (3.4% y 3.3% y 2% y 2% corregida y no coreegida, respectivamente). Sin embargo, el número de haplotipos encontrados con la región espaciadora de la RuBisCo (12) fue considerablemente mayor al número de los haplotipos encontrados con *cox2-3* (3), en una proporción 4:1. Contrariamente a lo que ha sido registrado en publicaciones previas con especies del grupo (García-Rodríguez *et al.* 2013; Yang *et al.* 2013), la región espaciadora *cox2-3* no mostró suficiente variación al interior de las poblaciones de *Hydropuntia cornea*. A menudo este gen ha sido referido como una región altamente variable, ideal para estudios de genética de poblaciones en algas rojas (Zuccarello *et al.* 1999), nuestros resultados por el contrario, mostraron que la región

espaciadora *cox2-3* es altamente conservada, en consecuencia, la región espaciadora de la RuBisCo es un mejor gen para los estudios de genética de las especies de *Hydropuntia*.

Por otro lado, la notable diferencia en el número de haplotipos encontrados con ambos genes, podría ser consecuencia de la diferencia en las tallas de las muestras (133 RuBisCo y 55 *cox2-3*). Sin embargo, este muestreo diferencial fue consecuencia de los resultados previamente reportados en Núñez-Resendiz *et al.* (2015), donde la cantidad de haplotipos encontrados con *cox2-3* mostró una proporción 2:1. El gen ITS se discute en la siguiente sección.

8.1.1. Estructura genética

Las redes haplotípicas resultantes del análisis de haplotipos para ambas regiones, revelaron una estructuración en dos haplogrupos genéticos (GI y GII). Sin embargo, en ambas redes los grupos permanecieron interconectados por no más de seis pasos mutacionales (seis en RuBisCo y cuatro en *cox2-3*), lo que sugiere un posible intercambio genético entre ellos. Sin embargo, la correspondencia genética entre los haplogrupos GI y GII para ambos genes se mantuvo, es decir, cada haplogrupo GI de RuBisCo correspondió con el haplogrupo GI de *cox2-3*, de igual manera sucedió con los haplogrupos GII, lo que apoya un aislamiento reproductivo.

Por otro lado, para la región espaciadora de la RuBisCo (Figura 6), en el haplogrupo GI todos los haplotipos estuvieron separados por un solo paso mutacional, con excepción del haplotipo R12, el cual estuvo separado del resto por tres pasos mutacionales. Esta diferencia es equiparable con el número de pasos mutacionales que separaron al haplogrupo GI de GII, los cuales permanecieron interconectados por un haplotipo intermedio (R8), que

a su vez separó a los haplogrupos GI y GII por tres pasos mutacionales, respectivamente. Este dato sugiere la posible presencia de un tercer grupo genético representado por R12. Para la región espaciadora *cox2-3*, no fue posible confirmar dicha estructura ya que no se amplificaron las muestras de Brasil con este gen, pero el haplotipo intermedio R8, quedó integrado dentro del haplogrupo GII de *cox2-3*.

Los pasos mutacionales que separaron a los haplogrupos GI y GII en ambos genes, correspondieron con transiciones y transversiones de una base a otra. Con ninguno de los marcadores hubo deleciones o inserciones de bases.

En la red haplotípica de la región espaciadora de la RuBisCo, el haplogrupo GI mostró una estructura jerárquica de los haplotipos, mientras que el haplogrupo GII mostró una organización estrellada de los haplotipos. Esta forma particular del haplogrupo GII sugiere un proceso reciente de expansión demográfica de este grupo en el área (Slatkin & Hudson 1991). Por el contrario, la red haplotípica con *cox2-3* (Figura 7), mostró una estructura lineal en la organización de los haplotipos para ambos haplogrupos, sin embargo, como ya se discutió anteriormente, la talla de la muestra y la cantidad de variación haplotípica entre ambos genes, podrían justificar dicha conformación.

Dado que ambos genes mostraron una hipótesis similar y que la variación genética entre ambos marcadores fue muy baja, se piensa que la divergencia entre ambos grupos ha sido un evento reciente.

Por el contrario, el gen ITS reveló una altísima diversidad genética (90% corregida y 61% no corregida) entre ribogrupos (A y B). En la red haplotípica incluso, ambos grupos estuvieron separados por más de 40 pasos mutacionales (Figura 8), lo que sugiere que los

ribogrupos A y B corresponden con dos especies diferenciadas, incluso a nivel de orden. Sin embargo, los individuos del Grupo I y del Grupo II definidos con las regiones espaciadoras RuBisCo y *cox2-3*, estuvieron mezclados en A y B lo que sugiere que existe intercambio genético entre estos grupos. En organismos fotosintéticos, los genes nucleares son de naturaleza variable con gran número de GAPS (Leliaert *et al.* 2014) en sus secuencias de ADN, en consecuencia el alto nivel de variación intra-individuo con ITS (Fama *et al.* 2000; Lange *et al.* 2002) dificulta el alineamiento de las secuencias. Por estas razones, el número de secuencias generadas con este gen fue reducido, en consecuencia no fue considerado para el resto de los análisis mostrados en la presente tesis. A pesar de dicha condición, un gran número de estudios filogenéticos en algas marinas han empleado los genes ITS (Yow *et al.* 2013).

8.1.2. Distribución haplotípica

Los haplotipos de las regiones espaciadoras *cox2-3* y RuBisCo, mostraron un patrón común de distribución. Aunque el muestreo entre los dos marcadores fue significativamente desigual, ambos mostraron que el haplogrupo GII estuvo ausente en Campeche (Figuras 9 y 10). Sin embargo, a partir de Yucatán hasta el Gran Caribe (Brasil), los haplogrupos GI y GII mostraron una distribución simpátrica, siendo el haplogrupo GII el dominante, excepto en Quintana Roo en donde predominó el haplogrupo GI.

La región espaciadora de la RuBisCo reveló una alta variación haplotípica en Campeche (siete haplotipos). Con excepción del haplotipo R1 que se encontró en casi la totalidad de las poblaciones estudiadas (11 de 14 poblaciones), el haplotipo R4 que se encontró en una población de Quintana Roo y el haplotipo R6 que se encontró en Brasil, los haplotipos de

Campeche estuvieron restringidos al Golfo de México y no se compartieron con el Caribe. Por otro lado, el Caribe mostró una marcada monotonía haplotípica respecto del Golfo de México. Esta ausencia de variación puede explicarse por las condiciones ambientales homogéneas en el área. Esta observación concuerda con lo registrado en estudios sobre riqueza florística, en los que se ha reportado una mayor diversidad asociada a condiciones heterogéneas del ambiente, desde Puerto Sisal hacia el Golfo de México, en contraste con las condiciones homogéneas del Caribe, en donde la diversidad disminuye (Tapia *et al.* 2015). Por el contrario, en Campeche, la convergencia de al menos dos corrientes oceánicas (de Lazo y Caribe) y el constante aporte de aguas dulces (como la Laguna de Términos), sumado a la fisiografía de la zona que imposibilita el establecimiento de las especies por la ausencia de sustratos rocosos, convierten a la zona en un ambiente muy heterogéneo en el que las presiones de selección actúan con mayor intensidad; en consecuencia, las poblaciones están variando todo el tiempo.

Cabe destacar sin embargo que Yucatán y Venezuela mostraron una composición haplotípica similar mientras que Campeche y Quintana Roo revelaron otra composición afín de haplotipos compartidos, excepto por el haplotipo R12 que fue exclusivo para Brasil. Tanto la presencia del haplotipo R8 que es intermedio entre los haplogrupos GI y GII, así como el cambio en la composición haplotípica entre Campeche y el resto del Mar Caribe, desde Puerto Sisal hasta el norte de Brasil, sugieren una ruptura genética justo en Puerto Sisal (Lee *et al.* 2014), donde el cambio en la composición haplotípica fue más notorio (Figura 9). Esto indica que en este punto ocurrió el último intercambio genético entre los haplogrupos. El área de Yucatán, ha sido ya previamente referida como una zona de transición entre las floras del Golfo de México y el Caribe (Pedroche & Senties 2003).

Incluso, en estudios de diversidad de grandes macroalgas, en la zona de Yucatán a la altura de Puerto Progreso, se ha detectado un nodo panbiogeográfico en donde chocan las biotas (Vilchis-Alfaro 2015), dato que es congruente con nuestros resultados.

Los eventos geológicos que tuvieron lugar en el área, el levantamiento de la Península de Yucatán y el cierre del Istmo de Panamá (Willis & McElwain 2002), jugaron un importante papel en el establecimiento y distribución de los haplotipos actuales de *Hydropuntia cornea*. Hace aproximadamente 20 ma, cuando lo que ahora es el Istmo de Tehuantepec estaba cubierto por agua, existió una especie ancestral cuya distribución era continua en el Atlántico americano. Con la emersión del bloque de la Península de Yucatán, que separó al Golfo de México del Mar Caribe, comenzó el aislamiento geográfico de Campeche. Sin embargo, dado el patrón de paleocorrientes imperante en el Mioceno, cuya dirección era Pacífico-Atlántico y asu vez de norte a sur (Coates & Stallar 2013), el intercambio genético entre las poblaciones de Campeche y las poblaciones del Mar Caribe se mantenía. Este patrón de paleocorrientes sumado a la presencia de haplotipos de nuestros haplogrupos GI y GII a ambos lados de la Península, sugieren que el patrón de colonización de los haplotipos fue desde el Golfo de México hacia el mar Caribe. Tanto el patrón de paleocorrientes como la ausencia de *Hydropuntia* en el Pacífico (Dreckmann & Senties 2014), apoyan dicha hipótesis. Hace aproximadamente 3 ma, tras el cierre del Istmo de Panamá, la masa de agua que antes ocupaba ese espacio, comenzó a chocar con la placa terrestre, por lo cual se vio forzada a desplazarse hacia el norte, cambiando radicalmente el patrón de corrientes en dos direcciones, dando origen a la corriente de Lazo (con movimientos cíclicos) y la corriente del Caribe (en dirección sur a norte). Este nuevo patrón de corrientes superficiales, terminó

por interrumpir el flujo genético ($Nm=0.13$) entre las poblaciones del Caribe y la de Campeche al aislarlas completamente.

Con el cambio de las corrientes, también cambiaron las condiciones medioambientales (salinidad, nutrientes, sustratos, etc.) en el Mar Caribe, principalmente la temperatura y la salinidad. De esta manera, los haplotipos más actuales (R8, R9, R10 y R11) se adaptaron pronto a las nuevas condiciones ambientales y se expandieron en el Mar Caribe. Mientras tanto, de los haplotipos más ancestrales, solo los haplotipos R1, R4 y R6 se mantuvieron en el Mar Caribe, aunque en menor proporción (Figura 9); el resto de los haplotipos ancestrales, fueron paulatinamente extinguiéndose después de dar origen a los actuales R8, R9, R10 y R11, tal como lo sugieren las redes haplotípicas (Figuras 6 y 7). De esta manera, en el Golfo de México se mantiene el haplogrupo GI, incrementando la variabilidad en sus haplotipos y; en el Mar Caribe, se establece el haplogrupo GII, colonizando el Caribe, aunque continua compartiendo distribución con GI. La dominancia del haplogrupo GII en el Caribe y la marcada disminución del haplogrupo GI en el resto del Caribe en comparación con su abundancia en Campeche, así como la ruptura genética observada en Puerto Sisal, proporcionan evidencia sólida para soportar esta hipótesis sobre el origen de los actuales haplogrupos hermanos GI y GII y su distribución en el Golfo de México y el Mar Caribe.

Tanto la presencia como la abundancia del haplotipo R1 en las poblaciones de *Hydropuntia cornea* así como el número de conexiones con otros haplotipos en la red haplotípica, sugieren que R1 es el haplotipo ancestral. Por otro lado, los resultados mostrados con la región espaciadora *cox2-3*, sugieren también que el haplogrupo GI es más parecido a la especie ancestral de GI y GII.

Dado que la separación de la especie ancestral (hace 19 ma) y la interrupción del flujo genético entre los haplogrupos GI y GII (hace 3.1 ma) han sido eventos muy recientes, ambos grupos no se han separado completamente, es por eso que en las redes haplotípicas permanecen interconectados y su distribución actual continúa siendo simpátrica en el Mar Caribe.

A partir de estos datos, se esperaría que el haplogrupo GI estuviera presente en el resto del Golfo de México y quizá hasta Florida. Sin embargo, tanto en Tabasco como en Veracruz, *Hydropuntia cornea* estuvo ausente. De acuerdo con lo reportado por Dreckmann & Senties (2014), *H. cornea* es una especie estrictamente marina, y, tanto Veracruz como Tabasco, son sitios estuarinos en donde el aporte constante de agua dulce, los convierte en ambientes salobres. Quizá las corrientes podrían llevar a las poblaciones de *H. cornea* a Florida, sin embargo, quizá los haplotipos encontrados ahí sean completamente diferentes, ya que dicha zona ya no es tropical sino templada. Aún así, sería necesario ampliar el muestreo a esa zona en estudios futuros.

8.1.3. Medidas de diversidad genética y flujo genético

Las medidas de diversidad genética calculadas para las poblaciones de *Hydropuntia cornea*, mostraron una alta diversidad haplotípica ($Hd=0.776$, >0.5) y una baja diversidad nucleotídica ($\pi=0.010$, <0.5), lo que sugeriría que *H. cornea* ha mantenido grandes tamaños poblacionales en el tiempo (Kim *et al.* 2012). Por otro lado, las medidas de diversidad mostradas en la tabla 8, mostraron que la mayor diversidad haplotípica se encontró en las poblaciones de Campeche, cuyos valores de Hd fueron mayores o iguales a 0.5 para todas las poblaciones, excepto para Sabancuy donde no hubo variación. En contraste, todas las

poblaciones desde Yucatán hasta el norte de Brasil, con excepción de Puerto Sisal que mostró un valor de $Hd=0.73333$, mostraron valores de Hd menores a 0.5 e incluso iguales a 0 para Puerto Telchac y Tumatéy. Estos valores de $Hd>0.5$ y de $\pi<0.5$, sugieren que hubo una rápida expansión poblacional tras un periodo de tamaños bajos de la población (Grant & Bowen 1998). Estos datos, sumados a la presencia del haplotipo R1 en las poblaciones desde el Caribe al Golfo de México, a la presencia de los haplotipos R4 y R6 en ambos lados, y, a la ausencia de *Hydropuntia cornea* en Tabasco y Veracruz, sugieren que el origen de la especie fue en Campeche y desde ahí migró hacia el resto del Caribe hasta el norte de Brasil, cuando la población era continua. Tras la emersión de la Península de Yucatán y el cierre del Istmo de Panamá, las poblaciones de Campeche quedaron aisladas; en consecuencia hubo una notoria reducción en las tallas de las poblaciones. Tras la interrupción del flujo genético, dichas poblaciones sufrieron un proceso de expansión demográfica reciente.

Los valores calculados para las tasas de migración entre poblaciones bajo los diferentes modelos referidos ($Nm=0.34$ para haplotipos y $Nm=0.13$ para secuencias), demuestran no sólo la interrupción del flujo genético entre las poblaciones, sino que estas no están en equilibrio (expansión demográfica reciente), por lo que no existe intercambiando constante de migrantes. Estos datos apoyan también la diferenciación entre los grupos GI y GII.

8.1.4. Historia demográfica

Considerando a todas las poblaciones de *Hydropuntia cornea* como un solo grupo genético, la distribución *Mismatch* muestra una distribución multimodal (Figura 11) que sugiere un equilibrio demográfico en las poblaciones. Sin embargo, el resto de los análisis revelan que

dicha hipótesis es improbable, ya que hasta ahora todos los análisis apoyan una estructura genética en *H. cornea*. Por el contrario, la distribución *Mismatch* para grupos separados, revelaron una distribución ligeramente multimodal para el grupo GI y unimodal para el grupo GII (Figura 12 A y B, respectivamente). Sin embargo, las pruebas de neutralidad revelaron sólo valores significativos para el grupo GII (Tabla 9). Estos datos sugieren que el grupo GI podría estar en un periodo de equilibrio demográfico tras un evento de expansión reciente y que el grupo GII sufrió un evento de expansión demográfica reciente. Para el grupo GII, tanto la red haplotípica en forma de estrella, como la distribución unimodal y los test de neutralidad (Slatkin & Hudson 1991), soportan dicha hipótesis, aunque los valores de *Hd* sean menores a 0.5. Por el contrario, para el grupo GI los valores de neutralidad no fueron significativos, y los valores de *Hd* fueron mayores a 0.5, además, en la gráfica de la distribución *Mismatch*, la distribución es más tendenciosa hacia la unimodalidad, excepto hacia el final, donde presenta un pico multimodal. Por lo tanto, el grupo GI podría ser unimodal, tal como sugieren los altos valores de *Hd*. De acuerdo con la red haplotípica mostrada en la Figura 6, y discutida en la sección de estructura genética y distribución haplotípica, en Brasil, el haplotipo R12 (exclusivo del área), se encuentra separado del resto de los haplotipos en el grupo GI por tres pasos mutacionales, lo que corresponde con el número de pasos mutacionales que separan a los grupos GI y GII tanto en la región espaciadora de la RuBisCo como en *cox2-3*. Esto sugiere que el haplotipo R12 podría corresponder con una estructura genética diferente de GI y GII, o sea un tercer grupo genético. Sin embargo, se requeriría un muestreo mayor en el área para confirmar dicha hipótesis.

8.1.5. SAMOVA, AMOVA y aislamiento por distancia

El análisis en SAMOVA, reveló tres grupos genéticos separados geográficamente. Estos grupos corresponden con Brasil (R12); Yucatán y Venezuela que comparten la misma composición haplotípica (R9 como haplotipo dominante); y Campeche y Quintana Roo, cuya composición haplotípica es similar. De acuerdo con este análisis, los tres grupos definidos por SAMOVA, podrían corresponder con tres grupos genéticos diferentes separados por barreras geográficas (Figura 13). Este resultado está plenamente apoyado por todos los resultados anteriores y por los estadísticos F (Tabla 11), cuyos valores fueron muy cercanos a 1, lo que confirma la estructura genética al interior de las poblaciones de *H. cornea*. De acuerdo con este análisis, existen barreras que mantienen separadas a las poblaciones, sin embargo, los tres grupos son simpátricos en el Caribe, aunque genéticamente se confirma que existe una barrera entre ellos.

Los valores de F_{ST} calculados con AMOVA ($F_{ST}=0.63206$) y con SAMOVA ($F_{ST}=0.74662$), mostraron una ligera diferencia, siendo la F_{ST} de SAMOVA mayor que la de AMOVA. Sin embargo, ambos valores fueron estadísticamente significativos para apoyar la estructura genética en las poblaciones de *Hydropuntia cornea*. Los valores de varianza calculados para los tres grupos definidos por SAMOVA (Tabla 13), fueron igualmente significativos al apoyar la estructura en tres grupos genéticos. Adicionalmente, el valor del estadístico $g=2.835>1.645$ proporcionado por la prueba de MANTEL, corroboró que existe una relación entre la variación genética y la distancia geográfica.

Hasta ahora, todos los resultados de diversidad genética han apoyado una estructura genética en al menos dos grupos genéticos (GI y GII), los cuales se encuentran aislados

reproductiva y geográficamente, uno en el Golfo de México y otro en el Caribe. De acuerdo con el concepto biológico de Mayr (1957), ambos grupos son buenas especies.

8.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Los análisis filogenéticos con *rbcL* y COI, mostraron dos clados hermanos monofiléticos (Figuras 14 y 15), los cuales fueron consistentes con los haplogrupos GI y GII mostrados en las redes haplotípicas de las regiones espaciadoras RuBisCo y *cox2-3*.

La distancia genética entre los clados I y II (2.8% y 2.7% corregida y no corregida respectivamente, para *rbcL* y 4.3% y 4.4% para COI, respectivamente), fueron correspondientes con valores de distancia interespecífica encontrados por otros autores en especies del orden Gracilariales [1.2-5.8% (Kim *et al.* 2008a), mayores a 2% (Gurgel & Fredericq 2004) para *rbcL* y 3.2-9.4% (Saunders 2005), 3.2-16.1% (Yang *et al.* 2008) para COI]. Estos resultados sugieren que los grupos GI y GII podrían ser especies diferentes. La filogenia con *rbcL*, la cual incluyó secuencias del GenBank, reveló una afinidad genética entre el grupo GI y secuencias de *Hydropuntia usneoides* y entre el grupo GII y secuencias de *H. cornea*. Para la filogenia con COI, sin embargo, no hubo secuencias de *H. usneoides* disponibles para comparar, pero el grupo GII mostró afinidad genética con secuencias de *H. cornea*.

Estos datos sugieren que la estructura genética encontrada en las poblaciones de *Hydropuntia cornea*, corresponde con *H. usneoides* (grupo GI) y con *H. cornea* (grupo GII).

8.2.1. Distancias genéticas

Respecto del uso de distancias genéticas corregidas y no corregidas, no hubo diferencias entre ellas con ninguno de los cinco genes. Cuando fueron usadas para evaluar la distancia al interior de una especie, no hubo diferencias entre ambos tipos de distancias. Cuando fueron usadas para evaluar las distancias entre especies, para los grupos GI y GII sólo variaron en 0.001%, entre los grupos GI y GII y las otras especies de *Hydropuntia* y *Gracilaria*, las distancias corregidas fueron de 2.5% a 3.5% mayores a las distancias no corregidas (Tabla 14). Esto se explica porque las distancias corregidas son más comúnmente utilizadas en análisis de filogenia y no en análisis de genética de poblaciones (Leliaert *et al.* 2014).

8.3. ANÁLISIS MORFOLÓGICO

Dentro del espectro de variación morfológica de *Hydropuntia cornea*, se encontraron 12 morfotipos, siete en Campeche y cinco en Yucatán (Figuras 16 y 17). Sin embargo, a pesar de la alta plasticidad fenotípica al interior de *H. cornea*, el análisis morfométrico mostró que no existen diferencias morfológicas entre los grupos GI y GII. De acuerdo con el análisis de los caracteres diagnósticos de las especies de *Hydropuntia* publicado en Ardito *et al.* (2014), tanto el número de capas como la talla de las células corticales y medulares, son caracteres diagnósticos que separan a *H. cornea* de *H. usneoides*. Sin embargo, los análisis morfológicos realizados entre los dos grupos genéticamente diferenciados, mostraron que estas características, no son diagnósticas. Para ambos grupos se encontraron especímenes con un rango de 2-4 capas de células corticales y 9-18 capas de células medulares. Anteriormente, otros autores habían sugerido también que la separación

morfológicamente entre *H. cornea* e *H. usneoides* no era fácil (Taylor 1960; Bird *et al.* 1986; Plastino & Oliveira 2002; Gurgel y Fredericq 2004). Incluso, ambas especies han sido identificadas erróneamente como especímenes de *Gracilaria debilis* (Taylor 1960). Recientemente Dreckmann (2012), siguiendo las descripciones originales de J. Agardh (1852), propuso que tanto el grosor como la textura y el número de ramificaciones en los talos, podrían ser más útiles para la delimitación entre ambas especies, que el número de capas de células corticales y medulares. Sin embargo, los análisis aquí presentados, revaloraron que en los grupos GI y GII es posible encontrar especímenes tanto gruesos como muy delgados, y de poco a muy ramificados (Tabla 15 y Figura 18). Por lo tanto, dichos caracteres tampoco son válidos como diagnósticos entre ambas especies.

Dado que los grupos GI y GII son genéticamente diferentes (es decir especie válidas) pero morfológicamente indistinguibles, se propuso integrar a ambos como parte del complejo de especies crípticas *Hydropuntia cornea/H. usneoides*, en el que las especies quizá podrían ser reconocidas sólo en circunstancias limitadas, en ambientes alopátricos por ejemplo, pero no en la Península de Yucatán (Núñez-Resendiz *et al.* 2015). Estos resultados podrían explicar la falta de registros para *H. usneoides* en la zona (Mateo-Cid & Mendoza-González 1991; Mendoza-González & Mateo-Cid 1992; Dreckmann 2012), ya que la tradición ha sido describir a los especímenes bajo este conjunto de caracteres generales, y de acuerdo con lo registrado, *H. cornea* es la especie dominante en el área.

Sin embargo, si *Hydropuntia cornea* e *H. usneoides* son morfológicamente idénticas, aunque genéticamente diferente, ¿cómo es que se nombró a las secuencias de GenBank para ambas especies? ¿Cuáles fueron los criterios taxonómicos empleados para nombrar estas muestras (Gurgel & Fredericq 2004)? De acuerdo con Gurgel & Fredericq (2004) las

identificaciones de las especies que muestran en su publicación, se basaron "en las descripciones originales, análisis crítico de la literatura publicada, y en el método de tipo de Silva (1952)". Esto sugiere que las secuencias publicadas en GenBank (Gurgel & Frederiq 2004) fueron nombrados con base en muestras recolectadas en condiciones alopátricas que coincidían con los dos fenotipos extremos para *H. cornea* e *H. usneoides*. El entorno influye en la morfología de las especies, y podría ser que en diferentes sitios, y diferentes condiciones ambientales, las especies pudieran ser identificadas. Sin embargo, los resultados aquí mostrados sugieren que estas especies en simpatría tienen una amplia sobreposición morfológica, por lo que la asignación correcta de las especies sólo se puede hacer mediante técnicas moleculares.

A pesar de la disponibilidad de los nombres *Hydropuntia cornea* e *H. usneoides*, no es posible asignar uno u otro nombre a uno u otro de los dos grupos GI y GII, ya que los holotipos respectivos de Agardh (1852) no se han analizado molecularmente. Pero, incluso si ambos holotipos tuviesen diferentes secuencias, el problema de la sobreposición de caracteres en los holotipos y en la literatura persistirían (Bird *et al.* 1982). Si las especies se encuentran en condiciones alopátricas, la variación morfológica entre ellas podría ser más evidente, por lo que los caracteres diagnósticos serían más fáciles de encontrar. Sin embargo, en simpatría y en entornos presumiblemente más uniformes, la variación morfológica entre las especies puede disminuir generando que los caracteres diagnósticos sean más difíciles de reconocer. Este es especialmente el caso en las especies con alta plasticidad y pocos caracteres diagnósticos, como en muchas algas rojas y especialmente en Gracilariales. En consecuencia, la diversidad de especies suele ser a menudo subestimada en condiciones simpátricas.

9. CONCLUSIONES

De los tres marcadores moleculares utilizados para analizar la variación genética, la región espaciadora *cox2-3* mostró muy baja variación genética intra e interespecífica, la región espaciadora de la RuBisCo mostró baja variación interespecífica pero suficiente variación intraespecífica y, el gen ITS reveló una muy alta variación intra e interespecífica y un gran número de gaps; por lo que el gen recomendado para estudios de variación genética en la especie es la región espaciadora de la RuBisCo. Los genes *rbcL* y COI, utilizados en análisis filogenéticos, aunque son conservados fueron suficientemente variables para revelar afinidades interespecíficas.

Al interior de las poblaciones mexicanas de *Hydropuntia cornea*, existen dos grupos genéticamente diferenciados, GI y GII. Estos grupos genéticos corresponden con dos especies conocidas para el área: *H. cornea* e *H. usneoides*.

La emersión del Bloque de la Península de Yucatán durante el Mioceno temprano (hace 19 ma), inició el proceso de especiación que aisló geográficamente a Campeche y, que tras el cierre del Istmo de Panamá durante el Plioceno medio (hace 3.1 ma), terminó con la separación de la especie ancestral en las actuales especies *H. cornea* e *H. usneoides*. Dado que el proceso de especiación entre *Hydropuntia cornea* e *H. usneoides* ha sido muy reciente, la separación entre ellas no fue completa. Aunque el flujo genético entre ambas especies se ha interrumpido, permanecen interconectadas en las redes haplotípicas.

A diferencia de la región espaciadora *cox2-3*, la cual mostró tres haplotipos (C1-C3), la región espaciadora de la RuBisCo, reveló la mayor diversidad genética con 12 haplotipos (R1-R12). Dado que el haplotipo R1 (designado como posible ancestro) corresponde con

Hydropuntia usneoides, se infiere que esta especie es la más parecida al ancestro de ambas especies.

La reducción del tamaño poblacional de *Hydropuntia cornea* e *H. usneoides*, favoreció, como resultado de un proceso de expansión demográfica reciente en ambas especies, el incremento de la variación genética al interior de sus poblaciones, principalmente para las poblaciones de Campeche, las cuales mostraron la mayor variación genética.

La presencia del haplotipo R1 a ambos lados de la Península de Yucatán, así como la composición haplotípica que revela una ruptura genética en Puerto Sisal, sugieren que la especie ancestral de *Hydropuntia cornea* e *H. usneoides*, se originó en Campeche y desde ahí migró al resto del Mar Caribe hasta el norte de Brasil.

Dada la distribución de los haplotipos R1-R12 al interior de las poblaciones, el Mar Caribe resultó ser un ambiente homogéneo en contraste con el Golfo de México, el cual, tanto por los constantes aportes de agua dulce, la falta de sustratos rocosos que faciliten el establecimiento de las especies y la convergencia de corrientes oceanográficas, lo convierten en un ambiente heterogéneo.

Existe una relación entre la distancia genética y la distancia geográfica. La distribución de *Hydropuntia cornea* está restringida al Caribe, mientras que a *H. usneoides* se le encuentra tanto en el Caribe, en simpatría con *H. cornea*, como en el Golfo de México, en donde es muy abundante y conspicua. Ambas especies están ausentes en Tabasco y Veracruz. A pesar de que Pernambuco es la localidad tipo de *H. cornea*, no se le encontró en esta localidad. Un tercer grupo genético (correspondiente con el haplotipo R12 exclusivo de

Pernambuco), parece estar involucrado en la estructura genética de *H. cornea* e *H. usneoides*.

Existe una alta variación morfológica al interior de *Hydropuntia cornea* e *H. usneoides*, pero el rango de plasticidad fenotípica de ambas especies se sobrepone en un cien por ciento. La ausencia de caracteres morfológicos que las separen las coloca como un complejo morfológico de especies crípticas: *H. cornea/H. usneoides*.

10. CONSIDERACIONES FINALES

Dada la heterogeneidad ambiental resultado de la historia geológica de la Península de Yucatán, convierten al área en una excelente candidata para estudios profundos de diversidad florística en todos los grupos biológicos.

Los resultados mostrados en la presente tesis, demuestran que puede existir un gran número de especies escondidas en otras especies ya descritas, que serán reveladas sólo con empleo de marcadores moleculares.

Por otro lado, es importante continuar con los estudios de variación genética de las especies altamente plásticas como lo son los representantes de la familia Gracilariaceae en el área, ya que los eventos geológicos recientes que iniciaron el proceso de especiación entre el complejo *Hydropuntia cornea/H. usneoides*, de igual manera afectaron a otros grupos de algas al separarlos biogeográficamente. Además, es importante conocer el origen y la historia evolutiva de las especies para un mejor entendimiento y reconstrucción de las actuales filogenias que en la actualidad, cuantifican la diversidad biológica.

Dado que lo que se reconoce en el campo son morfoespecies, se debe encontrar un conjunto robusto de caracteres diagnósticos que permitan discriminar especies crípticas tanto en condiciones alopátricas como en condiciones simpátricas. Para ello, los análisis de morfometría estadística son la mejor herramienta. Sin embargo, ya que en ambientes alopátricos el reconocimiento de las especies no representa problema alguno, es en condiciones simpátricas en donde este tipo de análisis debe llevarse a cabo, ya que los caracteres capaces de discriminar especies encontrados en simpatría, serán capaces de

discriminar en cualquier tipo de condición. Para estos casos la Península de Yucatán ofrece las condiciones adecuadas.

La falta de estudios que combinen herramientas moleculares con la morfología tradicional en el área, son por otra parte, igualmente necesarios, ya que la diversidad real está siendo subestimada.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott I.A. & Norris J.N. (Eds.).1985. Taxonomy of economic seaweeds with reference to some Pacific and Caribbean species. Vol. 1. California Sea Grant College Program. California. 167 pp.

Abbott I.A., Zhang J. & Xia B. 1991. *Gracilaria mixta* sp. nov. and other western Pacific species of the genus (Rhodophyta: Gracilariaceae). *Pacific Science* 45:12-27.

Agardh C.A. 1822. *Species algarum, Vol. 1, Part 2*. Berling, Lund, Sweden. 169-398 pp.

Agardh J.G. 1852. *Species genera et ordines algarum, seu descriptiones succinctae specierum, generum et ordinum, quibus algarum regnum constituitur. Volumis secundi: Algas florideas complectens. Part 2, fasc. 2. 577-700 pp. [701-720, Addenda and Index].* Lundae [Lund]: C.W.K. Gleerup.

Aguirre R. 2002. Los mares mexicanos a través de la percepción remota III.1. Instituto de Geografía, UNAM. Editorial Plaza y Valdés, S.A. de C.V. pp. 93. México.

Ardito S.M., Senties G.A. & Dreckmann M.K. 2014. Caracterización morfoanatómica de *Hydropuntia usneoides* (Gracilariaceae, Rhodophyta) para la costa venezolana. *Interciencia* 39: 49-53.

Avisé J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall.

Avisé J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Evolution* 7: 371-379.

Avice J.C. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge.

Bellorin A.M., Oliveira M.C. & Oliveira E.C. 2004. *Gracilaria vermiculophylla*: a western Pacific species of Gracilariaceae (Rhodophyta) first recorded from the eastern Pacific. *Phycological Research* 52: 69-79.

Biggs D.C. 1992. Nutrients, plankton, and productivity in a warm-core ring in the western Gulf of Mexico. *Journal of Geophysical Research* 97(C2): 2143-2154.

Bird C.J. & McLachlan J. 1982. Some underutilized taxonomic criteria in *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina* 25: 557-62.

Bird C.J., McLachlan J. & Oliveira E.C. 1986. *Gracilaria chilensis* sp. nov. (Rhodophyta, Gigartinales), from Pacific South America. *Canadian Journal of Botany* 64: 2928-34.

Blancas-Calva E., Navarro A.G. & Morrone J.J. 2010. Patrones biogeográficos de la avifauna de la Sierra Madre del Sur. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81: 561-568.

Byrne K., Zuccarello G.C., West J., Liao M.L. & Kraft G.T. 2002. *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta) from southeastern Australia, including a new species, *Gracilaria perplexa* sp. nov.: morphology, molecular relationships and agar content. *Phycological Research* 50: 295-311.

Candela-Pérez J., Sheinbaum-Pardo J., Ochoa de la Torre J.L. & Badan-Dangon A. 2003. La Corriente de Yucatán. *GEOS*, Vol. 23, No. 2. México.

Cao-Romero C.M. 2002. Biogeografía de la clase Asteroidea (Blainville, 1830) en las aguas mexicanas del Golfo de México y Caribe mexicano. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Marina), Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México.

Cianciola E., Popolizio T., Schneider C. & Lane C. 2010. Using molecular-assisted alpha taxonomy to better understand red algal biodiversity in Bermuda. *Diversity* 2: 946-958.

Claros-Díaz. 2015. Marcadores moleculares: Qué son, cómo se obtienen y para qué valen. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga. *Publicación digital* www.ndsu.nodak.edu/instruct/mcclean/plsc431/markers/.

Clement M., Posada D. & Crandall K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-9.

Coates A. G. & Stallard R.F. 2013. *How old is the Isthmus of Panama?*. *Bulletin of Marine Science* 89(4): 801-814.

Cohen S., Faugeron S., Martinez E.A., Correa J.A., Viard F., Destombe C. & Valero M. 2004. Molecular identification of two sibling species under the name *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gracilariales). *Journal of Phycology* 40: 742-747.

Conklin K.Y., O'doherty D.C. & Sherwood A.R. 2014. *Hydropuntia perplexa*, n. comb. (Gracilariaceae, Rhodophyta), first record of the genus in Hawai'i. *Pacific Science* 68: 421-434.

Costa E.S., Plastino E.M., Petti R., Oliveira E.C. & Oliveira M.C. 2012. The Gracilariaceae Germplasm Bank of the University of Sao Paulo, Brasil-a DNA barcoding approach. *Journal of Applied Phycology* 24: 1643-1653.

Cowman P.F. & Bellwood D.R. 2013. Vicariance across major marine biogeographic barriers: temporal concordance and the relative intensity of hard versus soft barriers. *Proceedings of the Royal Society* 280: 20131541.

Dawes C.J. & Mathieson A.C. 2008. *The Seaweeds of Florida*. University Press of Florida. Gainesville. 591 p.

De la Lanza G. & Gomez C. 2004. Características físicas y químicas del Golfo de México. 105-134. *In*: Caso M., Pisanty I. & Ecurra E. (eds.). Diagnóstico ambiental del Golfo de México. 1ª. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Instituto de Ecología, A.C. y Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studie. Distrito Federal, México. Vol. 1, 626 pp.

Destombe C. & Douglas S.E. 1991. Rubisco spacer sequence divergence in the rhodophyte alga *Gracilaria verrucosa* and closely related species. *Current Genetics* 19: 395-8.

Destombe C., Valero M. & Guillemín M.L. 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.

Díaz-Larrea J., Senties A., Núñez-Resendiz M.L., López-Valdez M.L. & Dreckmann K.M. 2015. “La genética de poblaciones como herramienta útil en diversos estudios de macroalgas marinas”. *Cymbella* 1: 1-11.

Dobzhansky T. 1950. Mendelian populations and their evolution. *American Naturalist* 74: 312-321.

Dreckmann K.M. 1998. Clasificación y nomenclatura de las algas marinas bentónicas del Atlántico mexicano. Conabio. México, D. F. 140 p.

Dreckmann K.M. 2002. El género *Gracilaria* (Gracilariaceae, Rhodophyta) en el Pacífico centro-sur mexicano. In Monografías ficológicas, A. Senties & K. M. Dreckmann (eds.). UAM Iztapalapa y Red Latinoamericana de Botánica. 77-118 pp.

Dreckmann K.M. 2012. Los géneros *Gracilaria* e *Hydropuntia* (Gracilariaceae, Rhodophyta) en las costas mexicanas del Golfo de México y Caribe. In: *Monografías ficológicas vol. 4* (Ed. by A. Senties & K.M. Dreckmann), pp. 111-203. UAM-Iztapalapa, México y Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

Dreckmann K.M. & Senties A. 2009. *Gracilaria*, subgenus *Textoriella* (Gracilariaceae, Rhodophyta) in the Gulf of Mexico and the Mexican Caribbean. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 80: 593-601.

Dreckmann K.M. & Senties A. 2013. Las arribazones de algas marinas en el Caribe mexicano, evento biológico natural o basura en las playas. *Biodiversitas* 107: 7-11.

Dreckmann K.M. & Senties A. 2014. Biodiversidad de Gracilariaceae (Rhodophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: S69-S75.

Dupanloup I., Schneider S. & Excoffier L. 2002 A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11(12): 2571-81.

Excoffier L., Smouse P. E. & Quattro J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Excoffier L. & Lischer H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetic analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564–567.

Fama P., Olsen J.L., Stam W.T. & Procaccini G. 2000. High levels of intra- and inter-individual polymorphism in the rDNA ITS1 of *Caulerpa racemosa* (Chlorophyta). *European Journal of Phycology* 35: 349-356.

Fredericq S. & Hommersand M.H. 1989. Proposal of the Gracilariales ord. nov. (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa*. *Journal of Phycology* 25: 213-227.

Fredericq S. & Hommersand M.H. 1990. Diagnoses and key to the genera of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204/205: 173-178.

Freile-Pelegri Y. & Robledo D. 1997. Effects on season on the agar content and chemical characteristics of *Gracilaria cornea* from Yucatan Mexico. *Botanica Marina* 40: 285-290.

Freshwater D.W. & Rueness J. 1994. Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33:187-94.

Fu Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.

García-Rodríguez L.D., Riosmena-Rodríguez R., Kim S.Y., López-Meyer M., López-Vivas J.J.M. & Boo S.M. 2013. Recent introduction of *Gracilaria parvispora* (Gracilariales, Rhodophyta) in Baja California, Mexico. *Botanica Marina* 56: 143-150.

Gargiulo G.M., De Masi F. & Tripodi G. 1992. Morphology, reproduction and taxonomy of the Mediterranean species of *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). *Phycologia* 31: 53-80.

Gargiulo G.M., Morabito M., Genovese G. & De Masi F. 2006. Molecular systematics and phylogenetics of Gracilariaceae species from the Mediterranean Sea. *Journal of Applied Phycology* 18: 497-504.

Goff L.J., Moon D.A. & Coleman A.W. 1994. Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *Journal of Phycology* 30:521-37.

González M.A., Chávez E.A. De la Cruz G. y Torruco D. 1991. Distribution patterns of gastropods and bivalves at the Yucatan Peninsula, Mexico. *Ciencias Marinas* 17(3): 147-172.

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.

Guillemin M.L., Akki S.A., Givernaud T., Mouradi A., Valero M. & Destombe C. 2008. Molecular characterisation and development of rapid molecular methods to identify species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco. *Aquatic Botany* 89:324-30.

Guillemin M.L., Valero M., Faugeron S., Nelson W., Destombe C. 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.

Guiry M.D. & Guiry G.M. 2015. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 02 January 2015.

Gulbransen D.J., Mcglathery J.K., Marklund M., Norris J.N. & Gurgel C.F.D. 2012. *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta, Gracilariales) in the Virginia coastal bays, USA: *cox1* analysis reveals high genetic richness of an introduced macroalga. *Journal of Phycology* 48: 1278-1283.

Gurgel C.F.D., Liao L.M., Fredericq S. & Hommersand H.M. 2003. Systematics of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) based on *rbcL* sequence analyses and morphological evidence. *Journal of Phycology* 39 (1): 154-171.

Gurgel C.F.D. & Fredericq S. 2004. Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): A critical assessment based on *rbcL* sequence analyses. *Journal of Phycology* 40: 138-159.

Gurgel C.F.D., Fredericq S. & Norris J.N. 2004. Phylogeography of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariaceae, Rhodophyta): a study of genetic discontinuity in a continuously distributed species based on molecular evidence. *Journal of Phycology* 40: 748-758.

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.

- Hedrick P. 2000. *Genetics of Populations*. Jones & Barlett Publishers, Boston.
- Hernández-Baños B., Peterson A.T., Navarro-Sigüenza A. & Escalante T. 1995. Bird faunas of the humid montane forests of Mesoamerica: Biogeographic patterns and priorities for conservation. *Bird Conservation International* 5: 251-277.
- Hernández-Cervantes O.E. 2015. Análisis Biogeográfico del género *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F., México. 132 p.
- Hey J. & Machado C. A. 2003. The study of structure populations-New hope for a difficult and divided science. *Genetics*: 4: 535-543.
- Huelsenbeck J.P. & Ronquist F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-5.
- Hughes A.R., Inouye B.D., Johnson M.T.J., Underwood N. & Vellend M. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters* 11: 609-623.
- Iyer R., Tronchin E.M., Bolton J.J. & Coyne V.E. 2005. Molecular systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) with emphasis on Southern Africa. *Journal of Phycology* 41: 672-684.
- Kim M.S., Yang E.C. & Boo S.M. 2006. Taxonomy and phylogeny of flattened species of *Gracilaria* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Korea based on morphology and protein-coding plastid *rbc L* and *psb A* sequences. *Phycologia* 45: 520-528.

Kim M.S., Yang E.C., Kim S.Y., Hwang I.K. & Boo S.M. 2008a. Reinstatement of *Gracilariopsis chorda* (Gracilariaceae, Rhodophyta) based on plastid *rbcL* and mitochondrial *cox1* sequences. *Algae* 23: 209-217.

Kim G.H., Shim J.B., Klochkova T.A. West J.A. & Zuccarello G.C. 2008b. The utility of proteomics in algal taxonomy: *Bostrychia radicans/B. moritziana* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) as a model study. *Journal of Phycology* 44: 1519-28.

Kim S.Y., Weinberger F. & Boo S.M. 2010. Genetic data hint at a common donor region for invasive Atlantic and Pacific populations of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 46: 1346-1349.

Kim K.M., Hoarau G., Boo S.M. 2012. Genetic structure and distribution of *Gelidium elegans* (Gelidiales, Rhodophyta) in Korea based on mitochondrial *cox1* sequence data. *Aquatic Botany* 98:27–33.

Lange M., Chen Y.Q. & Medlin L.K. 2002. Molecular genetic delineation of *Phaeocystis* species (Prymnesiophyceae) using coding and non-coding regions of nuclear and plastid genomes. *European Journal of Phycology* 37: 77-92.

Lee K.M., Boo G.H., Coyer J.A., Nelson W.A., Miller K.A. & Boo S.M. 2014. Distribution patterns and introduction pathways of the cosmopolitan brown alga *Colpomenia peregrine* using mt *cox3* and *atp6* sequences. *Journal of Applied Phycology* 26: 491–504.

Leliaert F., Verbruggen H., Vanormelingen P., Steen F., López-Bautista J.M, Zuccarello G.C. & De Clerck O. DNA-based species delimitation in algae. 2014. *European Journal Phycology* 49(2): 179-196.

Librado P. & Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Liedloff A. 1999. Mantel Versión 2.0 Mantel Non-Parametric Test Calculator. School of Natural Resource Sciences. Queensland University of Technology, Brisbane, Australia.

Lyra G.D.M., Costa E.D.S., De Jesus P.B., De Matos J.C.G., Caires T.A., Oliveira M.C., Oliveira E.C., Xi Z., Nunes J.M.D.C. & Davis C.C. 2015a. Phylogeny of Gracilariaceae (Rhodophyte): evidence from plastid and mitochondrial nucleotide sequences. *Journal of Phycology* 51: 356-366.

Lyra G. de M., Gurgel C.F.D., Costa E. da Silva, Barreto de Jesus P., Caires T.A., Gama de Matos J.C., Oliveira M.C., Oliveira E.C. & Nunes J.M.C. 2015b. A new tropical species of Gracilariaceae (Rhodophyta, Gracilariales): *Gracilaria silviae* sp. nov. *Phytotaxa* 222(3): 199-210, 12 figs.

Maggs C.A., Douglas S.E., Fenety J. & Bird C.J. 1992. A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *Journal of Phycology* 28: 214-232.

Mateo-Cid L.E. & Mendoza-González A.C. 1991. Algas marinas bénticas de la Isla Cozumel, Quintana Roo, México. *Acta Botánica Mexicana* 16: 57-87.

Mayr E. 1957. Species concepts and definitions. En: *The species problema: A symposium presented at the Atlanta Meeting of the American Association for the Advancement of Science*, E. Mayr (ed.), American Association for the Advancement of Science, Washington, D.C., pp. 1-22.

Mendoza-González A.C. & Mateo-Cid L.E. 1992. Algas marinas bentónicas de Isla Mujeres, Quintana Roo, México. *Acta Botánica Mexicana* 19: 37-61.

Monreal-Gómez M.A., Salas-de-León D.A. & Velasco-Mendoza H. 2004. La hidrodinámica del Golfo de México. Pp. 47-68. In: Caso M., Pisanty I. & Escurra E. (eds.). Diagnóstico ambiental del Golfo de México. 1ª. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Instituto de Ecología, A.C. y Harte Research Institute for Gulf of Mexico Studie. Distrito Federal, México. Vol. 1, 626 pp.

Morrone J.J. 2013. Sistemática Fundamentos, métodos, aplicaciones. UNAM, México D.F. 505 pp.

Muangmai N., Zuccarello G.C., Noiraksa T. & Lewmanomont K. 2014. A new flat *Gracilaria*: *Gracilaria lantaensis* sp. nov. (Gracilariales, Rhodophyta) from the Andaman coast of Thailand. *Phycologia* 53: 137-145.

Norton T.A., Melkonian M. & Andersen R.A. 1996. Algal biodiversity. *Phycologia* 35: 308-325.

Núñez-Resendiz M.L., Dreckmann K.M., Senties A., Díaz-Larrea J. & Zuccarello G.M. 2015. Genetically recognizable but not morphologically: The cryptic nature of *Hydropuntia*

cornea and *H. usneoides* (Gracilariales, Rhodophyta) in the Yucatan Peninsula. *Phycologia* 54(4): 1-10.

Orduña-Rojas J. & Robledo D. 1999. Effects of irradiance and temperature on the release and growth of carpospores from *Gracilaria cornea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina* 42: 315-319.

Orduña-Rojas J., Robledo D. & Dawes C. J. 2002. Studies on the tropical agarophyte *Gracilaria cornea* Agardh (Rhodophyta, Gracilariales) from Yucatán, Mexico. Seasonal physiological and biochemical responses. *Botanica Marina* 45: 453-458.

Ortiz-Perez M. A, & de la Lanza-Espino G. 2006. Diferenciación del espacio costero de México, un inventario regional. 1a. Instituto de Geografía, UNAM. Distrito Federal, México. 3: 138 pp.

Padilla M. & Sánchez R.J. 2007. Evolución geológica del sureste mexicano desde el Mesozoico al presente en el contexto regional del Golfo de México. *Boletín de la Sociedad Geológica mexicana* tomo lix 1: 19-42.

Page R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.

Papenfuss G.F. 1966. Notes on algal nomenclature. V. Various Chlorophyceae and Rhodophyceae. *Phykos* 5: 95-105.

Pareek M., Mishra A. & Jha B. 2010. Molecular phylogeny of *Gracilaria* species inferred from molecular markers belonging to three different genomes. *Journal of Phycology* 46: 1322-1328.

Pedroche F.F. & Sentíes G.A. 2003. Ficología marina mexicana. Diversidad y problemática actual. *Hidrobiológica* 13: 23-32.

Pigliucci M. 2001. *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture*. Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press. 344p.

Plastino E.M. & Oliveira E. 2002. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. *Phycologia* 41: 389-396.

Posada D. & Crandall K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

Robledo D. & Freile P. 1997. Chemical and Mineral composition of six potentially edible seaweed Species of Yucatan. *Botanica Marina* 40: 301-306.

Rodríguez-Arnaiz R., Castañeda-Sortibrán A. & Ordáz M. G. 2009. Conceptos básicos de genética. Las Prensas de Ciencias, 1-279.

Rogers A. R. & Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.

Rueness J. 2005. Life history and molecular sequences of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta), a new introduction to European waters. *Phycologia* 44: 120-128.

Ruse M. 1987. Biological species: Natural kinds, individuals, or what? *British Journal of Philosophy of Science* 38: 225-242.

Salmerón-García O. & Aguirre-Gómez R. 2003. Estudio espacio-temporal de la Surgencia de Yucatán y Banco de Campeche, México; a través de imágenes Seawifs, 1999-2000. *GEOS*, Vol. 23, No. 2. México.

Santelices B. & Valera D. 1993. Intra-clonal variation in the red seaweed *Gracilaria chilensis*. *Marine Biology* 116: 543-552.

Saunders G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future application. *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B* 360: 1879-1888.

Saunders G.W. 2009. Routine DNA barcoding of Canadian Gracilariales (Rhodophyta) reveals the invasive species *Gracilaria vermiculophylla* in British Columbia. *Molecular Ecology Resources* 9 (SUPPL S1): 140-150.

Schilling L. & M. Pigliucci. 2004. Phenotypic plasticity. Phenotypic evolution: a reaction norm perspective, 1-18.

Schmitter-Soto J.J., Escobar-Briones E., Alcocer J., Suárez-Morales E., Elías-Gutiérrez E. & Marín L.E. 2002. Los cenotes de la Península de Yucatán. *In: De la Lanza-Espino, G. & J. L. García-Calderón (Comps.). Lagos y Presas de México*. AGT. México, pp. 337-381.

Schneider C.W. & Searles R.B. 1991. *Seaweeds of the Southeastern United States. Cape Hatteras to Cape Canaveral*. Duke University Press, Durham and London. 553 pp.

Schneider S., Roessli D. & Excoffier L. 2000. Arlequin ver. 2000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. URL: <http://lgb.unige.ch/arlequin>.

Shimada S., Horiguchi T. & Masuda M. 1999. Phylogenetic affinities of genera *Acanthopeltis* and *Yatabella* (Gelidiales, Rhodophyta) inferred from molecular analyses. *Phycologia* 3: 528-540.

Silva P.C. 1952. A review of nomenclatural conservation in the algae from the point of view of the type method. *University of California Publications in Botany* 25: 241-323.

SPSS Inc. Released 2009. *PASW Statistics for Windows, Version 18.0*. Chicago: SPSS Inc.

Simpson G.G. 1943. Criteria for genera, species, and subspecies in zoology and paleontology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 44: 145-178.

Slatkin M. & Hudson R.R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.

Sokal R.R. 1979. Testing statistical significance of geographic variation patterns. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 28: 227 -231.

Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.

Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

Tamura K. & M. Nei. 1993. Estimation of number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology Evolution*, 10: 512-526.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., & Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.

Tapia-Silva F.O., Hernández-Cervantes O.E., Vilchis-Alfaro M.I., Senties A. y Dreckmann K.M. 2015. "Mapping of algae richness using spatial data interpolation". *The International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sciences* 40(7/W3): 1005-1008.

Taylor W.R. 1928. The marine algae of Florida with special reference to the Dry Tortugas. *Publications of the Carnegie Institute Washington* 379: 1-220.

Taylor W. R. 1935. Marine algae from the Yucatan Peninsula. *Publications of the Carnegie Institute Washington* 461: 115-124.

Taylor W. R. 1960. *Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas*. University of Michigan Press, Ann Arbor. 870 pp.

Templeton A. R. 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. En: *Speciation and its consequences*, D. Otte & J.A. Endler (eds.), Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts, pp. 3-27.

Templeton A. R. 1998. Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and populations history. *Molecular Ecology* 7: 381-397.

Templeton A.R., Crandall K.A. & Sing C.F. 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.

Templeton A.R. & C.F. Sing. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134: 659-669.

Vilchis-Alfaro M.I. 2015. Biogeografía de las grandes macroalgas en el Golfo de México y Caribe mexicano. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F., México. 104 p.

Wang H.W., Kawaguchi S., Horiguchi T. & Masuda M. 2000. Reinstatement of *Grateloupia catenata* (Rhodophyta, Halymeniaceae) on the basis of morphology and *rbcL* sequences. *Phycologia* 39: 228-237.

Wenink P.W., Baker A.J., Rösner H-U. & Tilanus M.G.J. 1996. Global mitochondrial DNA phylogeography of holarctic breeding dunlins (*Calidris alpina*). *Evolution* 50: 318-330.

Wiley E. O. 1981. *Phylogenetics: The theory and practice of phylogenetic systematic*. John Wiley and Sons, Nueva York. ishevski L., Madden C. Morgan L. & Padilla M. 2009. Ecorregiones marinas de América del Norte. Comisión para la cooperación Ambiental, Montreal.

Wilkinson T., Wiken E., Bezaury-Creel J., Hourigan T., Hermann H., Jan

Willis K.J. & McElwain J.C. 2002. The evolution of plants. Oxford University Press. Oxford. 392 p.

- Wright S., 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97–169.
- Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Wright S. 1951 The genetical structure of populations. *Ann. Eugen* 15: 323-354.
- Wynne M. J. 1989. The re-instatement of *Hydropuntia* Montagne (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Taxon* 38: 476-479.
- Wynne M.J. 2011. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: third revision. *Nova Hedwigia Beih* 140: 1-166.
- Yamamoto H. 1975. The relationship between *Gracilariopsis* and *Gracilaria* from Japan. *Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University* 26(3): 217-222.
- Yang E.C., Kim M.S., Geraldino P.J.L., Sahoo D., Shin J.A. & Boo S.M. 2008. Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20: 161-168.
- Yang M.Y., Geraldino P.J.L. & Kim M.S. 2013. DNA barcode assessment of *Gracilaria salicornia* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Southeast Asia. *Botanical Studies* 54: 27.
- Yow Y.Y., Lim P.E. & Phang S.M. 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.
- Yow Y.Y., Lim P.E. & Phang S.M. 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: 831-838.

Zavala-Hidalgo J., Morey S.L. & O'Brien J.J. 2003. Seasonal circulation on the western shelf of the Gulf of Mexico using a high-resolution numerical model. *Journal of Geophysical Research* 108(C12): 3389.

Zhang C.F. & Xia B. 1963. *Polycavernosa*, a new genus of the Gracilariaceae. *Studia Marina Sinica* 3:119-126.

Zink R.M., Rootes S. & Dittmann D.L. 1991. Mitochondrial DNA variation, population structure and evolution of the common grackle (*Quiscalus quiscula*). *The Condor* 93:318-329.

Zuccarello G.C., West J., Kamiya M. & King R. 1999a. A rapid method to 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., Burger G., West J.A. & King R.J. 1999b. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443-1447.

12. PRODUCTOS DEL TRABAJO DE TESIS

Los resultados del trabajo de la presente tesis fueron presentados en los siguientes congresos y artículos publicados:

12.1. PRESENTACIÓN EN CONGRESOS

1. X. Congreso de Ficología de Latinoamérica y El Caribe. VIII. Reunión Iberoamericana de Ficología. **Núñez Resendiz María Luisa**, Zuccarello Joe, Dreckmann Kurt, Díaz Larrea Jhoana y Senties Abel. “*Hydropuntia cornea* e *H. usneoides* (Rhodophyceae) en el Atlántico mexicano, ¿especies conespecíficas? Evidencias moleculares y morfológicas”. México-Lerma. **05 al 10 de Octubre, 2014**, México.
2. Primer Congreso de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud. **Núñez-Resendiz María Luisa**, Dreckmann Kurt, Díaz-Larrea Jhoana y Senties Abel. “Variación genética de las poblaciones de *Hydropuntia cornea* (Gracilariaceae, Rhodophyceae) en las costas del Golfo de México y el Caribe mexicano”. Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco. **25 al 26 de Septiembre, 2014**, México, D.F.

12.2. PUBLICACIONES

1. **Núñez-Resendiz M.L.**, Dreckmann K.M., Senties A., Díaz-Larrea J. y Zuccarello G.M. 2015. “Genetically recognizable but not morphologically: The cryptic nature of *Hydropuntia cornea* and *H. usneoides* (Gracilariales, Rhodophyta) in the Yucatan Peninsula”. *Phycologia* 54(4): 407-416. DOI: 10.2216/15-009.1. (Apéndice 11).

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis contiene los resultados finales del proyecto doctoral “Variación genética de las poblaciones de *Hydropuntia cornea* (Gracilariaceae, Rhodophyta) en las costas del Golfo de México y el Caribe mexicano”, el cuál fue propuesto como parte de los requisitos para optar por el grado de Doctor en Ciencias, en el programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana.

El desarrollo de esta tesis fue subsidiado tanto por el proyecto divisional “Estudios filogenéticos y biogeográficos de las clases Ulvophyceae, Phaeophyceae y Florideophyceae en el litoral mexicano” del área de Ficología comparada, como por el proyecto PROMEP “Variación de *Hydropuntia cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) en las costas del Golfo de México y el Caribe mexicano” (PROMEP/103.5/13/13/6732).

Algunas de las actividades académicas (congresos y estancias) relacionadas con el doctorado, fueron apoyadas económicamente por el Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud y por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT), este último en las modalidades de beca de subsidio, otorgada durante los tres años de duración del doctorado (Número de beca 239902), y beca mixta para estancias académicas en el extranjero.

Para el trabajo de laboratorio, se utilizó la infraestructura tanto del laboratorio de Macroalgas marinas y del laboratorio de Biología molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, como del laboratorio de Biología Molecular de la Universidad de Victoria en Wellington, Nueva Zelanda.

El material biológico analizado, proveniente de Brasil y Venezuela, fue proporcionado por las doctoras Mutue Fuji y Sonia Ardito, respectivamente.

El análisis e interpretación de los resultados, así como la comunicación de los mismos, ha sido asesorado por el Dr. Giuseppe C. Zuccarello de la Universidad de Victoria en Wellington, Nueva Zelanda.

El trabajo de investigación, las actividades académicas, la discusión y comunicación de resultados, han sido dirigidos y supervisados en todo momento por los doctores Kurt Dreckmann y Abel Senties, quienes integraron el comité tutorial junto con la Dra. Jhoana Díaz Larrea.

La revisión final de la comunicación escrita, así como de la comunicación oral de los resultados de la presente tesis doctoral, estuvo a cargo del comité tutorial y de las doctoras Hilda León Tejera y Alejandra Serrato Díaz, quienes conformaron el jurado ampliado para el examen de grado.

Los buenos momentos, las risas, la compañía, la solidaridad, los chistes, las comidas, la atmósfera y el mejor ambiente de trabajo que hicieron de este doctorado una de las experiencias más gratas, queridas y atesoradas de mi vida, estuvieron a cargo de los miembros del laboratorio de macroalgas marinas del área de Ficología Comparada en el departamento de Hidrobiología de la UAM-I: Isabel Vilchis, Oscar Hernández, Mariela López, Ilse Martínez y los doctores Kurt Dreckmann y Abel Senties.

APÉNDICE 1. Modificación al método de extracción de ADN por Chelax (Zuccarello 1999a).

- 1) Preparar la solución Chelax:

Agregar 5% resina 100 de Chelax a 10Mm Tris con pH 8.0. Mezclar hasta que la resina se disuelva completamente. Poner en hielo.

- 2) Colocar una pequeña parte (5 mm aprox.) de tejido en un tubo eppendorf estéril.
- 3) Agregar 200-500 μ l (dependiendo de la cantidad de tejido) al tubo eppendorf y triturar con pistilo. La solución debe colorearse.
- 4) Calentar (95-100°C) por 10 minutos. Apretar las tapas de los tubos eppendorf después de 30 segundos de calentado, para ejercer presión.
- 5) Colocar los tubos en hielo. Centrifugar por 10 minutos a 13 000 rpm. Remover el sobrenadante y transferirlo a un nuevo tubo eppendorf. No tomar ningún resto de tejido.
- 6) Utilizar directamente para PCR. Normalmente 1 μ l de ADN para una solución de 30 μ l de PCR funciona.
- 7) Almacenar ADN a -20°C.

APÉNDICE 2. Matriz de caracteres morfológicos diagnósticos (Dreckmann 2012 y Ardito *et al.* 2014) analizados estadísticamente.

ID ⁷	Long	NumRam	NumCortCel	LsCortCel	LiCortCel	DsCortCel	DiCortCel	NumMedCel	LsMedCel	LiMedCel	DsMedCel	DiMedCel
1	16	18	4	10	12.50	4	5	14	120	340	80	200
1	20	8	4	10	15	5	7.5	16	140	240	80	160
1	11.25	9	2	10	15	7.5	7.5	16	160	200	100	150
1	14	7	1	10	13.75	5	5	11	80	200	60	150
1	19	3	1	12.5	15	5	7.5	14	100	260	70	210
1	13	3	2	10	12.5	4	7.5	10	120	280	80	200
1	22	5	2	10	15	5	5	10	220	310	70	150
1	7	9	4	12	15	5	7.5	18	90	150	70	120
1	11	12	2	10	12.5	5	7.5	11	80	150	60	110
2	24	8	2	10	12.5	5	5	10	90	150	60	140
2	30	14	4	10	12.5	5	7.5	12	110	250	60	190
2	17	7	2	10	12	5	7.5	12	110	250	60	110
2	28	12	3	10	12	5	7.5	14	190	280	100	200
2	13	12	2	10	10	5	5	16	200	500	100	220
2	18	8	2	10	15	5	6.25	14	150	250	80	110
2	20	4	3	10	11.5	4	5	12	240	400	130	280
2	24	12	1	15	15	7.5	7.5	16	180	300	100	200
2	28	7	2	10	10	5	5	12	160	200	60	160
2	40	16	2	10	12.5	4.5	7.5	10	180	300	100	180
2	20.5	5	1	12	12.5	7.5	7.5	12	180	320	80	160

Long= Longitud

NumRam= Número de ramas

NumCortCel= Número de células corticales

LsCortCel= Largo superior de las células corticales

LiCortCel= Largo inferior de las células corticales

DsCortCel= Diámetro superior de las células corticales

DiCortCel= Diámetro inferior de las células corticales

NumMedCel= Número de células medulares

LsMedCel= Largo superior de células medulares

LiMedCel= Largo inferior de células medulares

DsMedCel= Diámetro superior de las células medulares

DiMedCel= Diámetro inferior de las células medulares

⁷ El número 1 identifica a las muestras que correspondieron genéticamente con *Hydropuntia usneoides* y el número 2 a las que correspondieron con *H. cornea*.

APÉNDICE 3. Matriz genética de la región espaciadora de la RuBisCo para análisis en ARLEQUIN en formato ARP.

[Profile]

Title="RuBisCo sequences en Hydropuntia cornea"

#Data from :
#Nuñez-Resendiz.

NbSamples=14

GenotypicData=0
DataType=DNA
LocusSeparator=NONE
MissingData="?"

[Data]

[[Samples]]

```

SampleName="Isla_Carmen"
#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=10
SampleData= {
001 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
002 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
003 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
004 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
005 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
006 1 TTGTGGACCTCTACAAACAACCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
007 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
008 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAAT
009 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
010 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
}

SampleName="Sabancuy_Campeche"
#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=6
SampleData= {
011 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
012 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
013 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
014 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
015 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
016 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
}

SampleName="Punta_Xen"
#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=7
SampleData= {
017 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
018 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
019 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
020 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
021 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
022 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAAT
023 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAAT
}

SampleName="Bahia_Tortugas"

```

```

#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=14
SampleData= {
024 1 TTGTGGACCTCTACAAACAAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
025 1 TTGTGGTCCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATAAATAGCTTTAATTATACTT
026 1 TTGTGGACCTCTACAAACAAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
027 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
028 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
029 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAAT
030 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
031 1 TTGTGGACCTCTACAAACAAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
032 1 TTGTGGTCCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATAAATAGCTTTAATTATACTT
033 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
034 1 TTGTGGACCTCTACAAACAAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
035 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
036 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
037 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
}

```

```

SampleName="Playa_Bonita"
#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=9
SampleData= {
038 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
039 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
040 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
041 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
042 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
043 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
044 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
045 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
046 1 TTGTGGTCCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATAAATAGCTTTAATTATACTT
}

```

```

SampleName="Puerto_Sisal"
#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=10
SampleData= {
047 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
048 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATGAGCTTTAATTATACTT
049 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
050 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
051 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
052 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
053 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATGAGCTTTAATTATACTT
054 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
055 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
056 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
}

```

```

SampleName="Puerto_Progreso"
#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=10
SampleData= {
057 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
058 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
059 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
060 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
061 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
062 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
063 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
064 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
065 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
066 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
}

```

```

SampleName="Puerto_Chicxulub"
#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=10
SampleData= {
067 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
068 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
069 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
070 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
071 1 TTGTTGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
072 1 TTGTTGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
073 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
074 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
075 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
076 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATGAGCTTTAATTATACTT
}

```

```

SampleName="Puerto_Telchac"
#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=10
SampleData= {
077 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
078 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
079 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
080 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
081 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
082 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
083 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
084 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
085 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
086 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
}

```

```

SampleName="Puerto_Morelos"
#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=11
SampleData= {
087 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
088 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
089 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
090 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
091 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
092 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
093 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
094 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
095 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
096 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
097 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
}

```

```

SampleName="Playa_Carmen"
#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=10
SampleData= {
098 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
099 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
100 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
101 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
102 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
103 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
104 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
105 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
106 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
107 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
}

```

```

SampleName="Puerto_Esccondido"

```

```

#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=10
SampleData= {
108 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
109 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
110 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
111 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
112 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
113 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
114 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
115 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
116 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
117 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
}

```

```

SampleName="Tumatey_Paraguana"
#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=7
SampleData= {
118 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
119 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
120 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
121 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
122 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
123 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
124 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATACTT
}

```

```

SampleName="Pernambuco_Brasil"
#Reference: Nuñez-Resendiz.
SampleSize=9
SampleData= {
125 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAATT
126 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAATT
127 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAATT
128 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAATT
129 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAATT
130 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAATT
131 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAATT
132 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAATT
133 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTATAAATT
}

```

[[Structure]]

```

StructureName="New Edited Structure"
NbGroups=1

Group={
  "Isla_Carmen"
  "Sabancuy_Campeche"
  "Punta_Xen"
  "Bahia_Tortugas"
  "Playa_Bonita"
  "Puerto_Sisal"
  "Puerto_Progreso"
  "Puerto_Chicxulub"
  "Puerto_Telchac"
  "Puerto_Morelos"
  "Playa_Carmen"
  "Puerto_Escondido"
  "Tumatey_Paraguana"
  "Pernambuco_Brasil"
}

```

APÉNDICE 4. Matriz geográfica para análisis en SAMOVA en formato arp.

1	"ica"	91.59	18.70	1
2	"sab"	91.18	18.99	1
3	"pux"	91.04	19.05	1
4	"bat"	90.71	19.36	1
5	"pbo"	90.66	19.70	1
6	"psi"	90.04	21.17	1
7	"pto"	89.66	21.29	1
8	"pch"	89.59	21.24	1
9	"pte"	89.25	21.34	1
10	"pmo"	86.86	20.85	1
11	"pca"	87.06	20.59	1
12	"pes"	69.96	12.17	1
13	"tum"	69.80	11.91	1
14	"per"	35.11	8.74	1

APÉNDICE 5. Matriz genética para análisis en SAMOVA en formato arp.

#

[Profile]

Title = "Hcornea"
NbSamples = 14
DataType = DNA
GenotypicData = 0
LocusSeparator = NONE
MissingData = "?"
CompDistMatrix = 1

[Data]

[[Samples]]

SampleName = "ica"
SampleSize = 10
SampleData = {
 Hap_1 5 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTA
 Hap_2 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTA
 Hap_3 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTA
 Hap_4 1 TTGTGGACCTCTACAAACAACCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTA
 Hap_5 2 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTA

}

SampleName = "sab"
SampleSize = 6
SampleData = {
 Hap_1 6

}

SampleName = "pux"
SampleSize = 7
SampleData = {
 Hap_2 2
 Hap_3 2
 Hap_6 3 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTA

}

SampleName = "bat"
SampleSize = 14
SampleData = {
 Hap_1 1
 Hap_3 1
 Hap_4 4
 Hap_5 6
 Hap_7 2 TTGTGGTCCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATAATAGCTTTAATTA

}

SampleName = "pbo"
SampleSize = 9
SampleData = {
 Hap_1 6
 Hap_5 1
 Hap_6 1
 Hap_7 1

}

SampleName = "psi"
SampleSize = 10

```

SampleData = {
  Hap_1 2
  Hap_8 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTA
  Hap_9 5 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATTA
  Hap_10 2 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATGAGCTTTAATT
}
SampleName = "pro"
SampleSize = 10
SampleData = {
  Hap_1 3
  Hap_9 7
}
SampleName = "pch"
SampleSize = 10
SampleData = {
  Hap_1 1
  Hap_9 8
  Hap_10 1
}
SampleName = "pte"
SampleSize = 10
SampleData = {
  Hap_1 10
}
SampleName = "pmo"
SampleSize = 11
SampleData = {
  Hap_1 10
  Hap_11 1 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATT
}
SampleName = "pca"
SampleSize = 10
SampleData = {
  Hap_1 4
  Hap_6 6
}
SampleName = "pes"
SampleSize = 10
SampleData = {
  Hap_1 2
  Hap_9 8
}
SampleName = "tum"
SampleSize = 7
SampleData = {
  Hap_9 7
}
SampleName = "per"
SampleSize = 9
SampleData = {
  Hap_3 4
  Hap_12 5 TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATTAGCTTTAATT
}

```

APÉNDICE 6. Matriz geográfica en formato geo para análisis en MANTEL.

0
0 0
0 0 0
0 0 0 0
0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0
0 0 0 0 0 0 0 0 0
365 365 365 365 365 365 365 365 365 365
365 365 365 365 365 365 365 365 365 365 0
365 365 365 365 365 365 365 365 365 365 0 0
406 406 406 406 406 406 406 406 406 406 41 41 41
406 406 406 406 406 406 406 406 406 406 41 41 41 0
323 323 323 323 323 323 323 323 323 323 42 42 42 84 84
323 323 323 323 323 323 323 323 323 323 42 42 42 84 84 0
323 323 323 323 323 323 323 323 323 323 42 42 42 84 84 0 0
323 323 323 323 323 323 323 323 323 323 42 42 42 84 84 0 0 0
323 323 323 323 323 323 323 323 323 323 42 42 42 84 84 0 0 0 0
323 323 323 323 323 323 323 323 323 323 42 42 42 84 84 0 0 0 0 0
323 323 323 323 323 323 323 323 323 323 42 42 42 84 84 0 0 0 0 0 0
323 323 323 323 323 323 323 323 323 323 42 42 42 84 84 0 0 0 0 0 0 0
360 360 360 360 360 360 360 360 360 6 6 6 48 48 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36
365 365 365 365 365 365 365 365 365 365 0 0 0 41 41 42 42 42 42 42 42 42 42 42 6
365 365 365 365 365 365 365 365 365 365 0 0 0 41 41 42 42 42 42 42 42 42 42 42 6 0
365 365 365 365 365 365 365 365 365 365 0 0 0 41 41 42 42 42 42 42 42 42 42 42 6 0 0
365 365 365 365 365 365 365 365 365 365 0 0 0 41 41 42 42 42 42 42 42 42 42 42 6 0 0 0
365 365 365 365 365 365 365 365 365 365 0 0 0 41 41 42 42 42 42 42 42 42 42 42 6 0 0 0 0
365 365 365 365 365 365 365 365 365 365 0 0 0 41 41 42 42 42 42 42 42 42 42 42 6 0 0 0 0 0
406 406 406 406 406 406 406 406 406 406 41 41 41 0 0 84 84 84 84 84 84 84 84 84 48 41 41 41 41 41 41
406 406 406 406 406 406 406 406 406 406 41 41 41 0 0 84 84 84 84 84 84 84 84 84 84 48 41 41 41 41 41 41 0
406 406 406 406 406 406 406 406 406 406 41 41 41 0 0 84 84 84 84 84 84 84 84 84 84 48 41 41 41 41 41 41 0 0
406 406 406 406 406 406 406 406 406 406 41 41 41 0 0 84 84 84 84 84 84 84 84 84 84 48 41 41 41 41 41 41 0 0 0 0
406 406 406 406 406 406 406 406 406 406 41 41 41 0 0 84 84 84 84 84 84 84 84 84 84 48 41 41 41 41 41 41 0 0 0 0 0
360 360 360 360 360 360 360 360 360 6 6 6 48 48 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 0 6 6 6 6 6 6 48 48 48 48 48 48
360 360 360 360 360 360 360 360 360 6 6 6 48 48 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 0 6 6 6 6 6 6 48 48 48 48 48 48 0
360 360 360 360 360 360 360 360 360 6 6 6 48 48 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 0 6 6 6 6 6 6 48 48 48 48 48 48 0 0
360 360 360 360 360 360 360 360 360 6 6 6 48 48 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 0 6 6 6 6 6 6 48 48 48 48 48 48 0 0 0
360 360 360 360 360 360 360 360 360 6 6 6 48 48 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 0 6 6 6 6 6 6 48 48 48 48 48 48 0 0 0 0
360 360 360 360 360 360 360 360 360 6 6 6 48 48 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 0 6 6 6 6 6 6 48 48 48 48 48 48 0 0 0 0 0
360 360 360 360 360 360 360 360 360 6 6 6 48 48 36 36 36 36 36 36 36 36 36 36 0 6 6 6 6 6 6 48 48 48 48 48 48 0 0 0 0 0 0

APÉNDICE 8. Secuencias del GenBank utilizadas en los análisis filogenéticos. Se proporciona para cada secuencia, la información de la localidad, números de acceso al GenBank y la referencia de la publicación.

Taxa	Localidad	Números de acceso al GenBank		Referencia de la publicación
		<i>rbcL</i>	COI	
<i>Hydropuntia caudata</i>	Brasil: Ceara, Guajiru, Trairi		JQ843319	Costa <i>et al.</i> 2012
	USA: Bahía Vero	AY049359		Gurgel & Fredericq (unpublished)
<i>H. cornea</i>	Venezuela	AY049338		Gurgel & Fredericq 2004
	Venezuela	AY049339		Gurgel & Fredericq (unpublished)
	Israel		JQ843322	Costa <i>et al.</i> 2012
	Brasil: Ceara, Trairi, Guajiru		JQ843321	
	Brasil: Ceara, Guajiru, Trairi		JQ843323	
	Brasil: Ceara, Trairi, Guajiru		JQ843324	
	Brasil: Ceara, Guajiru, Trairi		JQ935791	
	<i>H. crassissima</i>	Panamá	AY049351	
<i>H. secunda</i>	Panamá		AY049353	
<i>H. usneoides</i>	México: Bahía de Campeche	AY049346		
	USA: Walton Rocks, Florida	AY049363		Gurgel & Fredericq (unpublished)
	México: Yucatán	AY049350		
<i>Gracilaria gracilis</i>	Portugal		FJ499509	Saunders 2009
<i>G. pacifica</i>	Canadá: Columbia Británica		FJ499528	
<i>Gracilariopsis carolinensis</i>	USA: Carolina del Norte, Willmington	AY049412		Gurgel <i>et al.</i> 2003
<i>Gp. cata-luziana</i>	México: Golfo de México, Veracruz, Antón Lizardo	AY049406		
<i>Gp. longissima</i>	Reino Unido		JQ843344	Costa <i>et al.</i> 2012
<i>Gp. lemaneiformis</i>	Ecuador		JQ843342	

APÉNDICE 9. Números de acceso al GenBank de los especímenes secuenciados en la presente tesis. En la tabla se indican los grupos genéticos (GI y GII), número de campo y números de acceso al GenBank para cada uno de los cuatro genes utilizados en los análisis de variación genética y filogenéticos.

Grupo genético	Número de campo	Número de acceso al GenBank			
		RuBisCo spacer	Cox2-3 spacer	<i>rbcL</i>	COI
GI	PM66-1	KT026232	KT005890		
GI	PM66-2	KT026233	KT005891		
GI	PM66-3	KT026234	KT005892	KP636782	KP636768
GI	PM66-4	KT026235	KT005893	KP636785	KP636769
GI	PM66-5	KT026236	KT005894	KP636780	
GI	PM66-6	KT026237	KT005895		
GI	PM66-7	KT026238	KT005896		
GI	PM66-8	KT026239	KT005897		
GI	PM66-9	KT026240	KT005898		
GI	PM66-10	KT026241	KT005899		
GII	PME9	KT026289			
GI	PME88		KT005900		
GI	PME97		KT005902		
GI	PME100		KT005901		
GI	CPE4	KT026258			
GI	CPE5	KT026259			
GI	CPE103	KT026260			
GII	PP67-1	KT026266		KP636781	KP636771
GII	PP67-2	KT026267	KT005903		
GII	PP67-3	KT026268	KT005904		
GII	PP67-4	KT026269	KT005905		
GI	PP67-5	KT026242	KT005906	KP636783	KP636770
GI	PP67-6	KT026243	KT005907		
GII	PP67-7	KT026270	KT005908		
GII	PP67-8	KT026271	KT005909	KP636792	KP636773
GI	PP67-9	KT026244	KT005910	KP636784	KP636774
GII	PP67-10	KT026272	KT005911	KP636791	KP636772
GII	PS68-1	KT026273	KT005912	KP636787	KP636775
GII	PS68-2	KT026286	KT005913		
GI	PS68-3	KT026245	KT005914		
GI	PS68-4	KT026246	KT005915		
GII	PS68-5	KT026274	KT005916	KP636786	KP636776
GII	PS68-6	KT026275	KT005917		
GII	PS68-7	KT026287	KT005918		

GII	PS68-8	KT026265	KT005919		
GII	PS68-9	KT026276	KT005920		
GII	PS68-10	KT026277	KT005921		
GI	PT69-1	KT026247	KT005922		
GI	PT69-2	KT026248	KT005923		
GI	PT69-3	KT026249	KT005924		
GI	PT69-4	KT026250	KT005925		
GI	PT69-5	KT026251	KT005926	KP636790	KP636777
GI	PT69-6	KT026252	KT005927		
GI	PT69-7	KT026253	KT005928		
GI	PT69-8	KT026254	KT005929		
GI	PT69-9	KT026255	KT005930		
GI	PT69-10	KT026256	KT005931		
GII	PC70-1	KT026278	KT005932		
GII	PC70-2	KT026279	KT005933	KP636789	KP636779
GI	PC70-3	KT026257	KT005934		
GII	PC70-4	KT026280	KT005935		
GII	PC70-5	KT026281	KT005936		
GII	PC70-6	KT026288	KT005937		
GII	PC70-7	KT026282	KT005938		
GII	PC70-8	KT026283	KT005939		
GII	PC70-9	KT026284	KT005940		
GII	PC70-10	KT026285	KT005941	KP636788	KP636778
GI	PXE15	KT026261	KT005942		
GI	PXE17	KT026262	KT005943		
GI	PXE35	KT026263	KT005944		
GI	PBE50	KT026264			

APÉNDICE 10. Resumen de haplotipos encontrados para cada muestra con cada uno de los genes secuenciados. Se indica la localidad, clave de ADN, grupo genético (GI y GII) y haplotipos.

Localidad	Clave de extracción de ADN	Genes secuenciados para cada muestra					
		Cloroplasto		Mitocondria		Núcleo	
		RuBisCo spacer	<i>rbcL</i>	<i>cox2-3</i> spacer	COI	ITS	
México: Isla del Carmen	IC82-1	GI-R1					
	IC82-2	GI-R1					
	IC82-3	GI-R1					
	IC82-4	GI-R2					
	IC82-5	GI-R1					
	IC82-6	GI-R3					
	IC82-9	GI-R7					
	IC82-11	GI-R6					
	IC82-13	GI-R1					
	IC82-14	GI-R2					
	México: Sabancuy	S84-1	GI-R1				
		S84-2	GI-R1				
		S84-3	GI-R1				
		S84-7	GI-R1				
S84-8		GI-R1					
S84-11		GI-R1					
México: Punta Xen	PXE15	GI-R4		GI-C1			
	PXE17	GI-R4		GI-C1			
	PXE35	GI-R4		GI-C1			
	PX88-10	GI-R7					
	PX88-11	GI-R6					
	PX88-12	GI-R6					
	PX88-14	GI-R7					
México: Bahía de Tortugas	BT87-1	GI-R3					
	BT87-2	GI-R5					
	BT87-3	GI-R3					
	BT87-4	GI-R2					
	BT87-5	GI-R2					
	BT87-6	GI-R6					
	BT87-7	GI-R2					
	BT87-8	GI-R3					
	BT87-9	GI-R5					
	BT87-10	GI-R1					
	BT87-11	GI-R3					
	BT87-12	GI-R2					
	BT87-13	GI-R2					
	BT87-14	GI-R2					
México: Playa Bonita	PBE50	GI-R4					
	PB83-1	GI-R1					
	PB83-3	GI-R1					
	PB83-4	GI-R1					
	PB83-5	GI-R1					
	PB83-6	GI-R2					
	PB83-8	GI-R1					

	PB83-9	GI-R1					
	PB83-11	GI-R5					
México: Puerto Sisal	PS68-1	GII-R9	GII	GII-C3	GII	R2-RB1	
	PS68-2	GII-R11		GII-C3			
	PS68-3	GI-R1		GI-C2			
	PS68-4	GI-R1		GI-C2			
	PS68-5	GII-R9	GII	GII-C3	GII	R2-RB1	
	PS68-6	GII-R9		GII-C3			
	PS68-7	GII-R11		GII-C3			
	PS68-8	GII-R8		GII-C3		R2-RB1	
	PS68-9	GII-R9		GII-C3			
	PS68-10	GII-R9		GII-C3			
México: Puerto Progreso	PP67-1	GII-R9	GII	GII-C3	GII	R2-RB1	
	PP67-2	GII-R9		GII-C3			
	PP67-3	GII-R9		GII-C3			
	PP67-4	GII-R9		GII-C3			
	PP67-5	GI-R1	GI	GI-C2	GI	R2-RB2	
	PP67-6	GI-R1		GI-C2			
	PP67-7	GII-R9		GII-C3			
	PP67-8	GII-R9	GII	GII-C3	GII	R2-RB1	
	PP67-9	GI-R1	GI	GI-C2	GI	R1-RA1	
	PP67-10	GII-R9	GII	GII-C3	GII	R2-RB1	
México: Puerto Chicxulub	PC70-1	GII-R9		GII-C3		R1-RA2	
	PC70-2	GII-R9	GII	GII-C3	GII	R2-RB1	
	PC70-3	GI-R1		GI-C2			
	PC70-4	GII-R9		GII-C3			
	PC70-5	GII-R9		GII-C3			
	PC70-6	GII-R11		GII-C3			
	PC70-7	GII-R9		GII-C3		R2-RB1	
	PC70-8	GII-R9		GII-C3			
	PC70-9	GII-R9		GII-C3			
	PC70-10	GII-R9	GII	GII-C3	GII	R1-RA2	
México: Puerto Telchac	PT69-1	GI-R1		GI-C2			
	PT69-2	GI-R1		GI-C2			
	PT69-3	GI-R1		GI-C2			
	PT69-4	GI-R1		GI-C2			
	PT69-5	GI-R1	GI	GI-C2	GI		
	PT69-6	GI-R1		GI-C2			
	PT69-7	GI-R1		GI-C2			
	PT69-8	GI-R1		GI-C2			
	PT69-9	GI-R1		GI-C2			
	PT69-10	GI-R1		GI-C2			
México: Puerto Morelos	PM66-1	GI-R1		GI-C1			
	PM66-2	GI-R1		GI-C1			
	PM66-3	GI-R1	GI	GI-C1	GI	R1-RB3	
	PM66-4	GI-R1	GI	GI-C1	GI	R1-RA1	
	PM66-5	GI-R1	GI	GI-C1		R1-RA1	
	PM66-6	GI-R1		GI-C1			
	PM66-7	GI-R1		GI-C1			
	PM66-8	GI-R1		GI-C1			
	PM66-9	GI-R1		GI-C1			
	PM66-10	GI-R1		GI-C1			
	PME9	GII-R10					
	PME88			GI-CI			

	PME97		GII-C3
	PME100		GI-CI
México: Playa del Carmen	PCE4	GI-R4	
	PCE5	GI-R4	
	PCE103	GI-R4	
	PC-H9	GI-R1	
	PC-H10	GI-R1	
	PC-H11		
	PC-H12		
	PC-H13		
	PC-H15	GI-R1	
	PC-H19	GI-R1	
	PC-H20	GI-R4	
	PC-H22	GI-R4	
	PC-H25	GI-R4	
Venezuela: Puerto Escondido	PE84-12	GI-R1	
	PE84-14	GI-R1	
	PE89-1	GII-R9	
	PE89-3	GII-R9	
	PE89-7	GII-R9	
	PE89-10	GII-R9	
	PE90-2	GII-R9	
	PE90-3	GII-R9	
	PE90-4	GII-R9	
	PE90-5	GII-R9	
Venezuela: Tumatey	T91-1	GII-R9	
	T91-2	GII-R9	
	T91-3	GII-R9	
	T91-4	GII-R9	
	T91-5	GII-R9	
	T91-6	GII-R9	
	T91-9	GII-R9	
Brasil: Pernambuco	BP88-1	GI-R6	
	BP88-2	GI-R6	
	BP88-3	GI-R12	
	BP88-4	GI-R12	
	BP88-5	GI-R6	
	BP88-6	GI-R6	
	BP88-7	GI-R12	
	BP88-8	GI-R12	
	BP88-9	GI-R12	

Genetically recognizable but not morphologically: the cryptic nature of *Hydropuntia cornea* and *H. usneoides* (Gracilariales, Rhodophyta) in the Yucatan Peninsula

MARÍA LUISA NÚÑEZ-RESENDIZ^{1,2*}, KURT M. DRECKMANN², ABEL SENTÍES², JHOANA DÍAZ-LARREA² AND GIUSEPPE C. ZUCCARELLO³

¹Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A.P. 55-535, Mexico, D.F. 09340, Mexico

²Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, A.P. 55-535, Mexico, D.F. 09340, Mexico

³School of Biological Sciences, Victoria University of Wellington, Wellington 6140, New Zealand

ABSTRACT: Species recognition in algae is often extremely difficult due to the paucity of morphological characters and high environmental plasticity. If environment is important to morphology, then related species growing in sympatry are good candidates to discover diagnostic characters. We studied algae collected in sympatric populations in tropical Atlantic Mexico. *Hydropuntia cornea* and *H. usneoides* have high morphological variation and have been difficult to diagnose morphologically. We used four molecular markers (RuBisCo spacer, *cox2–3* spacer, *rbcL* and COI) to investigate the genetic relationship between samples that correspond to either *H. cornea* or *H. usneoides*; in addition, we determined if molecular-characterized groups were morphologically distinguishable. RuBisCo and *cox2–3* spacers revealed low genetic variation but showed two genetic groups: groups I and II. *rbcL* and COI phylogenies also showed a separation into two groups, corresponding with *cox2–3* spacer groups I and II. Group I matched sequences in GenBank of *H. usneoides* and group II with *H. cornea*. Populations were mixed for these genetic groups, with group I prominent in Quintana Roo populations. Morphological analysis of samples in both genetic clades showed that they are not distinguishable. As the difference between the two groups is only genetic, they are, consequently, cryptic species. While the extremes of morphology in allopatric populations may be distinguishable, we do not feel that in most cases these species can be recognized. Therefore, we propose that these two ‘species’ should be designated as a species complex (the *Hydropuntia cornea/H. usneoides* complex).

KEY WORDS: COI, *cox2–3* spacer, Morphology, *rbcL*, RuBisCo spacer, Species complex, Variation

INTRODUCTION

Most species of the order Gracilariales are distributed in temperate-tropical areas and exhibit high morphological plasticity (Bird & McLachlan 1982; Santelices & Valera 1993). As a consequence, identification is difficult and in some cases almost impossible based only on morphology (Gurgel & Fredericq 2004; Guillemain *et al.* 2008). This morphological plasticity has led to the uncovering of cryptic species (Saunders 2009) and confusion in species descriptions, making the systematics of this group problematic, and some species are consequently often misidentified (Byrne *et al.* 2002; Cohen *et al.* 2004). Molecular-assisted taxonomy (Cianciola *et al.* 2010) can help clarify our taxonomy since it allows a better understanding of relationships between groups whose individuals are very difficult to identify due to evolutionary convergence and/or the influence of environmental factors on phenotype expression.

The genus *Hydropuntia* Montagne (Gracilariales) is separated from other genera of Gracilariales by the structure and organization of its spermatangia (Wynne 1989; Fredericq & Homersand 1990; Dreckmann 2012). Despite this morphological differentiation and the current molecular tools that have proved to be very useful to establish the evolutionary independence of *Hydropuntia* (Bellorin *et al.* 2004; Gurgel & Fredericq 2004; Gargiulio *et al.* 2006; M.S.

Kim *et al.* 2008), controversy remains. Thus, its relationship with the genus *Gracilaria* Greville is still in polemic (Lyra *et al.* 2015). *Hydropuntia* has 16 recognized species (Guiry & Guiry 2015) whose distributions are restricted to the Indian, eastern and central Pacific, and tropical Atlantic, mostly in the subtidal environment (Dreckmann 2012; Conklin *et al.* 2014). In the Caribbean Sea and Gulf of Mexico, four species are found: *H. caudata* (J. Agardh) Gurgel & Fredericq, *H. cornea* (J. Agardh) M.J. Wynne, *H. crassissima* (P.L. Crouan & H.M. Crouan) M.J. Wynne and *H. usneoides* (C. Agardh) Gurgel & Fredericq. *Hydropuntia cornea* is the most often recorded and also the most economically important (Dreckmann 2012).

Hydropuntia cornea was described by J. Agardh (1852) from a specimen collected in Pernambuco, Brazil. Morphologically, it is very similar to *H. usneoides* (as *Sphaerococcus usneoides* C. Agardh) collected from an imprecise locality in Brazil (Agardh 1822). Characters such as branching pattern, cell size measurements and the number of cortical and medullary layers have been the main diagnostic features to segregate one from the other. Accordingly, *H. cornea* has three to six cortical cell layers and 17 to 18 medullary cells layers, and *H. usneoides* has two cortical cell layers and six to nine medullary cell layers (Taylor 1960; Fredericq & Homersand 1989; Schneider & Searles 1991; Ardito *et al.* 2014); however, these characters overlap (Dreckmann 2012). In Mexican populations of ‘*H. cornea*’, the number of cortical and medullary layers, a supposed diagnostic character between the species, varies along one individual (basal, middle or apical parts). The morphological variation

* Corresponding author: (mlnr@ciencias.unam.mx).

DOI: 10.2216/15-009.1

© 2015 International Phycological Society

of *H. usneoides* largely coincides with the spectrum of variation of *H. cornea*, the only difference being that *H. cornea* is somewhat thinner and slightly more branched than *H. usneoides* (Dreckmann 2012). Despite this apparent morphological overlap, samples of the two species, collected allopatrically, have been sequenced and appear to be genetically distinct (Gurgel & Fredericq 2004). This raises the situation that samples from allopatric populations can display extreme and divergent morphologies based on different environments that can be given different names. However, in more similar environments, these morphologies will overlap and specimens be indistinguishable. *Hydropuntia cornea* is often described in the flora of the Gulf of Mexico and Caribbean; whereas, *H. usneoides* is considered to be found more southerly, and records in Mexico are scarce (Mateo-Cid & Mendoza-Gonzalez 1991; Dreckmann 2012).

Different molecular markers have been employed in studies of phylogeny and genetic diversity of Gracilariales; these include mitochondrial markers, like COI (Yang *et al.* 2008; Yow *et al.* 2011, 2013) and the *cox2-cox3* spacer (Rueness 2005; Destombe *et al.* 2010; Pareek *et al.* 2010; Garcia-Rodríguez *et al.* 2013; Yang *et al.* 2013); plastid-encoded markers, like the RuBisCo spacer (Destombe & Douglas 1991; Byrne *et al.* 2002; Iyer *et al.* 2005; Guillemín *et al.* 2008) and *rbcL* (Gurgel & Fredericq 2004; Gurgel *et al.* 2004; M.S. Kim *et al.* 2006); and nuclear markers, like ITS (Goff *et al.* 1994). The use of these markers in intraspecific studies has been used to detect genetic population structure, cryptic species, misidentified introduced species (Rueness 2005; Yang *et al.* 2008; S.Y. Kim *et al.* 2010; Gulbransen *et al.* 2012; García-Rodríguez *et al.* 2013; Conklin *et al.* 2014; Guillemín *et al.* 2014), taxonomic identity and reestablishment of species (M.S. Kim *et al.* 2008; Muangmai *et al.* 2014) and patterns of geographic distribution (Yow *et al.* 2011).

In this study, our aim was to investigate the genetic and morphological relationship of samples designated as *H. cornea* or *H. usneoides*, according to Dreckmann (2012) and Ardito *et al.* (2014), from the Yucatan Peninsula. To do this, we used multiple molecular markers to determine if genetic groups match the morphology of these two species. We hypothesized that while the molecular markers may show evolutionary groups and even geographic structure, this does not correspond to any morphologically identifiable groups.

MATERIAL AND METHODS

Sixty-one samples of *Hydropuntia* matching the general descriptions of either *H. cornea* or *H. usneoides* were sampled in eight populations in different localities from the Gulf of Mexico and the Mexican Caribbean (Table 1, Fig. 1). Samples were collected to a depth of about 1 m and detached from the base with a spatula. Samples collected for molecular analysis were preserved in silica gel until DNA extraction. Samples collected for morphological analysis were mounted on herbarium paper, numbered and integrated into the algal collection of the Metropolitan-UAMIZ Herbarium (Table 1). All samples were designated with a field number (e.g. PM66-6) and are part of a voucher, or a herbarium sheet, with a voucher number (e.g. PM66-1 to PM66-10 is part of a same voucher UAMIZ-2183).

DNA was extracted from 5–10 mg of dried tissue using a Qiagen DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California USA) according to the manufacturer's protocols or using a Chelex extraction method (Zuccarello *et al.* 1999b).

PCR was performed using specific primers for each genome. The RuBisCo spacer region was amplified using the primers spacer-F and spacer-R following Maggs *et al.* (1992). Alternatively, this region was amplified using the primers *rbcF1* and *rbcR2-M2* (Zuccarello *et al.* 1999b). The *cox2-3* spacer was amplified using the primers *cox2-for* and *cox3-rev* (Zuccarello *et al.* 1999a). The *rbcL* region was amplified using two pairs: F8 (Shimada *et al.* 1999), F765 (Wang *et al.* 2000), R753 and R1381 (Freshwater & Rueness 1994). The mitochondrial COI region was amplified using the primers *GazF1* and *GazR1* (Saunders 2005). The PCR conditions for all genes were as follows: initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 38 cycles of denaturing at 94°C for 1 min, annealing at 45°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min. This was followed by a final extension at 72°C for 5 min.

The sequences were edited and aligned using the program Bioedit (Hall 1999). The *rbcL* sequences and COI sequences were aligned with sequences from GenBank of other species of *Hydropuntia*, *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (both used as out-groups; Table S1).

For the RuBisCo and *cox2-3* spacers data sets, a statistical parsimony network using the program TCS v1.21 was generated (Clement *et al.* 2000). For the *rbcL* and COI data sets, phylogenetic analyses used maximum likelihood (ML), and Bayesian analyses were performed separately with codons partitioned. The optimal models of sequence evolution for each data set were estimated with Modeltest v3.7 with the Akaike information criterion (Posada & Crandall 1998). The model selected for the *rbcL* data set was HKY+G+I (Hasegawa-Kishino-Yano + gamma distribution + invariable sites) and GTR+G+I (general time reversible + gamma distribution + invariable sites) for the COI data set. ML phylogenetic analysis was performed in RAxML software (Stamatakis 2006) under the heuristic search algorithm and using the appropriate models. Support for each branch was obtained from 1000 bootstrap replications using the same substitutions models and RAxML program settings. The Bayesian analysis used MrBayes v3.1.1 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Four chains of Markov chain Monte Carlo were used, starting with a random tree and sampling the data every 100 generations for 1×10^6 generations. The likelihood scores stabilized after 200,000, and we used a burn-in of 25% of trees. Pairwise distance values (*p* distances) were calculated using PAUP v4.0.10 (Swofford 2001).

For the morphological analysis, the external morphology of 20 samples was measured under a stereomicroscope (see vouchers numbers for each field number in Table 1). Internal anatomy was investigated using hand sections made with a double-edged razor blade. Cross sections were made 1–2 cm from the base, middle and 0.5–1 cm from apical portions of the main axis of the thallus. Using the compound microscope, diagnostic characters considered important for delimiting *Hydropuntia* species (Fredericq & Hommersand 1989; Scheneider & Searles 1991; Abbott 1999; Dreckmann 2012; Ardito *et al.* 2014) were measured. The main

Table 1. Samples and specimens sequenced in this study. Collection location, GPS coordinates, voucher numbers (UAMIZ = herbarium of Metropolitan Autonomous University). GI belong to *H. usneoides*, and GII belong to *H. cornea* (see text); *cox2-3* spacer and RuBisCo spacer haplotypes designations.¹

Locality	GPS coordinates	Voucher	Field number	RuBisCo spacer	<i>cox2-3</i> spacer	<i>rbcL</i>	COI
Quintana Roo Puerto Morelos	20°51'13"N, 86°53'55"W	UAMIZ-1283	PM66-1	GI-R1	GI-C1		
			PM66-2	GI-R1	GI-C1		
			PM66-3	GI-R1	GI-C1	GI	GI
			PM66-4	GI-R1	GI-C1	GI	GI
			PM66-5	GI-R1	GI-C1	GI	
			PM66-6	GI-R1	GI-C1		
			PM66-7	GI-R1	GI-C1		
			PM66-8	GI-R1	GI-C1		
			PM66-9	GI-R1	GI-C1		
			PM66-10	GI-R1	GI-C1		
Playa del Carmen	20°37'39"N, 87°04'52"W	UAMIZ-456	PME9	GII-R6			
			PME88		GI-C1		
		UAMIZ-612	PME97		GII-C3		
		UAMIZ-458	PME100		GI-C1		
		UAMIZ-563	CPE4	GI-R2			
			CPE5	GI-R2			
			CPE103	GI-R2			
Yucatan Puerto Progreso	21°16'58"N, 89°39'49"W	UAMIZ-1285	PP67-1	GII-R4		GII	GII
			PP67-2	GII-R4	GII-C3		
			PP67-3	GII-R4	GII-C3		
			PP67-4	GII-R4	GII-C3		
			PP67-5	GI-R1	GI-C2	GI	GI
			PP67-6	GI-R1	GI-C2		
			PP67-7	GII-R4	GII-C3		
			PP67-8	GII-R4	GII-C3	GII	GII
			PP67-9	GI-R1	GI-C2	GI	GI
			PP67-10	GII-R4	GII-C3	GII	GII
Puerto Sisal	21°9'55"N, 90°1'50"W	UAMIZ-1282	PS68-1	GII-R4	GII-C3	GII	GII
			PS68-2	GII-R5	GII-C3		
			PS68-3	GI-R1	GI-C2		
			PS68-4	GI-R1	GI-C2		
			PS68-5	GII-R4	GII-C3	GII	GII
			PS68-6	GII-R4	GII-C3		
			PS68-7	GII-R5	GII-C3		
			PS68-8	GII-R3	GII-C3		
			PS68-9	GII-R4	GII-C3		
			PS68-10	GII-R4	GII-C3		
Puerto Telchac	21°20'26"N, 89°15'47"W	UAMIZ-1284	PT69-1	GI-R1	GI-C2		
			PT69-2	GI-R1	GI-C2		
			PT69-3	GI-R1	GI-C2		
			PT69-4	GI-R1	GI-C2		
			PT69-5	GI-R1	GI-C2	GI	GI
			PT69-6	GI-R1	GI-C2		
			PT69-7	GI-R1	GI-C2		
			PT69-8	GI-R1	GI-C2		
			PT69-9	GI-R1	GI-C2		
			PT69-10	GI-R1	GI-C2		
Puerto Chicxulub	21°17'38"N, 89°36'30"W	UAMIZ-1286	PC70-1	GII-R4	GII-C3	GII	GII
			PC70-2	GII-R4	GII-C3		
			PC70-3	GI-R1	GI-C2		
			PC70-4	GII-R4	GII-C3		
			PC70-5	GII-R4	GII-C3		
			PC70-6	GII-R5	GII-C3		
			PC70-7	GII-R4	GII-C3		
			PC70-8	GII-R4	GII-C3		
			PC70-9	GII-R4	GII-C3		
			PC70-10	GII-R4	GII-C3	GII	GII
Campeche Punta Xen	19°8'21"N, 91°57'49"W	UAMIZ-1290	PXE15	GI-R2	GI-C1		
			PXE17	GI-R2	GI-C1		
			PXE35	GI-R2	GI-C1		
Playa Bonita	18°59'39"N, 91°11'06"W	UAMIZ-970	PBE50	GI-R2			

¹ GI, group I; GII, group II.

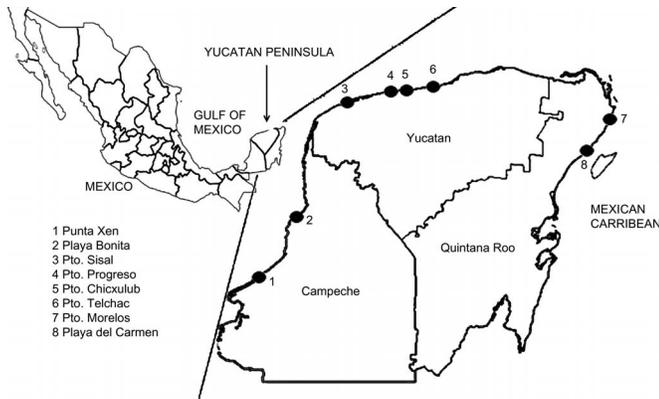


Fig. 1. Map of the Yucatan Peninsula (its position is indicated by an arrow) showing the sites where were collected the samples of *H. cornea*/*H. usneoides* used in this study. Black dots indicate the location of the sampling sites (GPS coordinates are indicated in Table 1). The numbers correspond with the names of the sites.

characters observed were number of cortical layers, number of medullar layers, cell measurements (approximately 15 cells per thallus) and size of tetrasporangia (approximately five per thallus). A morphological matrix was constructed that was subsequently used for a principal component analysis and discriminant analysis in PASW Statistics v18 (SPSS Inc. 2009); for each variable, we used raw numbers. These analyses were chosen from other types of analyses because they allow us to explain the variability of the morphological data in a smaller number of principal components and do not require a normal distribution.

RESULTS

RuBisCo spacer

The data set consisted of 58 sequences (Table 1) that were 365 base pairs (bp) long. The haplotype network (Fig. 2) of *Hydropuntia* samples showed six interconnected haplotypes, R1–R6 (Tables 1, 2). R1 had the largest number of samples ($n = 26$) followed by R4 ($n = 20$; Table 2). Haplotype R1 formed a group with R2 (designated group I) separated by a single mutational step. Haplotype R4 formed a group (designated group II) with haplotypes R5 and R6, again separated by a

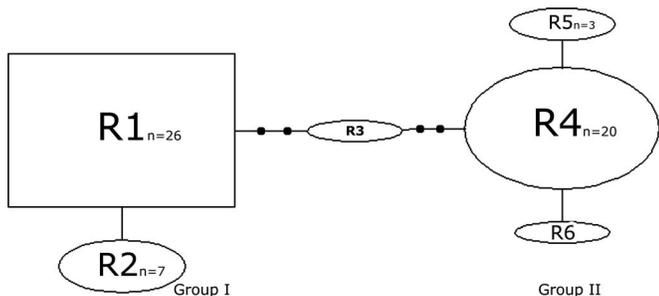


Fig. 2. Haplotype network for plastid RuBisCo spacer of *Hydropuntia* samples. Lines representing one mutational step; the small black circles indicate missing haplotypes. $n =$ number of samples with identical sequence. In haplotypes with only one sample, sample size is not indicated.

Table 2. Haplotypes found in spacer regions RuBisCo and *cox2–3* for the populations of *Hydropuntia* studied. The numbers indicate haplotype frequency.

	RuBisCo spacer						Cox2–3 spacer		
	Group I			Group II			Group I		Group II
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	C1	C2	C3
Quintana Roo									
Puerto Morelos	10					1	12		1
Playa del Carmen		3							
Yucatan									
Puerto Telchac	10							10	
Puerto Chicxulub	1			8	1			1	9
Puerto Progreso	3			7				3	6
Puerto Sisal	2		1	5	2			2	8
Campeche									
Playa Bonita		1							
Punta Xen		3						3	
Total	26	7	1	20	3	1	15	16	24

single mutational step. A haplotype (R3) was intermediate between groups I and II and separated from both groups by three mutational steps.

cox2–3 spacer

The data set consisted of 55 sequences and a length of 247 bp. The haplotype network (Fig. 3) indicated three interconnected haplotypes (C1–C3; Tables 1, 2). Haplotype C1 was found in 15 samples. C1 and C2 (with 16 samples; designated as group I) were separated by one mutational step. The C3 haplotype, with 24 samples, was separated from group I by four mutational steps (designated as group II).

RbcL

The alignment consisted of 13 sequences from our study, plus sequences from GenBank, and was 1311 bp long. The ML analysis (not shown) and Bayesian analysis (Fig. 4) had identical topologies in which two strongly supported monophyletic groups (group I and group II) were differentiated. Group I contained six sequences from Quintana Roo and Yucatan with four sequences of *H. usneoides* from GenBank. Group II contained seven samples from Yucatan with two sequences of *H. cornea* from GenBank.

COI

The alignment consisted of 12 sequences from our study, plus sequences from GenBank, and was 671 bp long. ML (not shown) and Bayesian analyses (Fig. 5) revealed identical

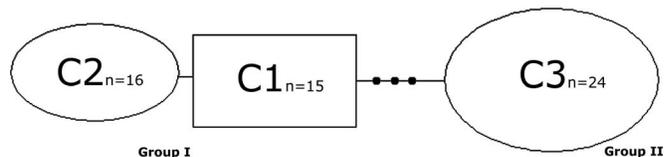


Fig. 3. Haplotype network for the mitochondrial *cox2–3* spacer of *Hydropuntia* samples. Lines representing one mutational step; the small black circles indicate missing haplotypes; $n =$ number of samples with identical sequence. In haplotypes with only one sample, sample size is not indicated.

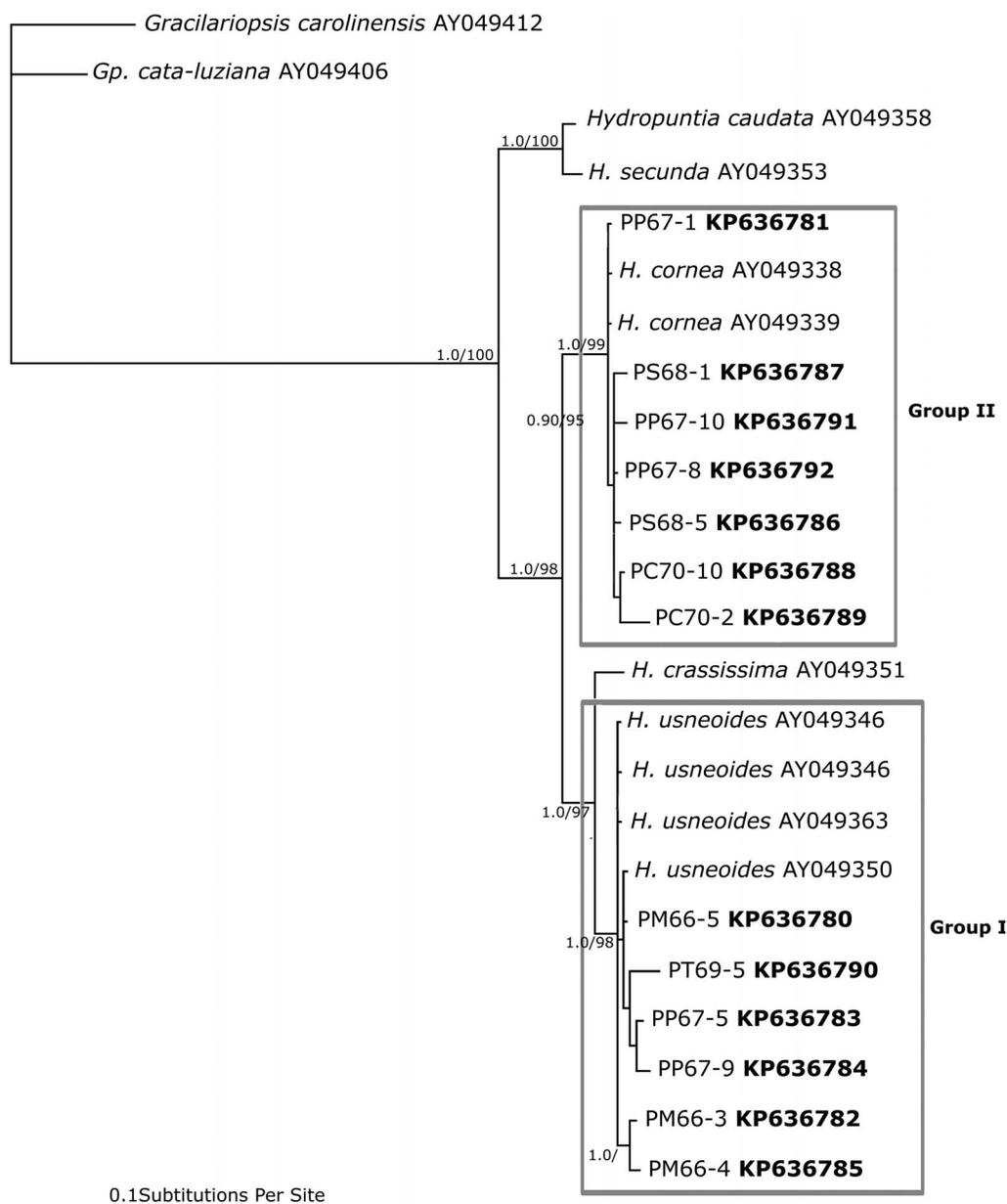


Fig. 4. Bayesian topology of *rbcL* gene sequence data of samples of *Hydropuntia*. Bayesian posterior probabilities followed by ML bootstrap values on branches. Two groups highlighted: group I and group II. Values below 95% are not indicated. PM, Puerto Morelos; PT, Puerto Telchac; PS, Puerto Sisal; PC, Puerto Chicxulub; PP, Puerto Progreso. *Gracilariopsis* species as out-groups. Sequences generated in this study are in boldface; otherwise, they are from GenBank.

topologies in which one monophyletic group (group I) was strongly supported, and the other (group II) was not. Group I contained five samples from Yucatan and Quintana Roo. Group II had seven samples also from Yucatan with five sequences of *H. cornea* from GenBank.

Uncorrected distances

Uncorrected *p* distances were determined for the RuBisCo spacer, *cox2-3* spacer, *rbcL* and COI data sets to obtain distances within and between group I and group II. The genetic distance between group I and group II was 2.1% for RuBisCo spacer, 2% for *cox2-3* spacer, 2.7% for *rbcL* and 4.4% for COI. The intragroup distance within group I was

0.2% for the RuBisCo spacer and 0.4% for the *cox2-3* spacer; within group II, it was 1% for the RuBisCo spacer, and there was no difference in the *cox2-3* spacer.

Morphological observations

Seven characters were considered for the principal component analysis (Table 3 and Fig. 6). The first three components explained 80.3% of the variance. Component 1 (PC1) explained 57.1% of the variance, component 2 (PC2) explained 14.6% and component 3 (PC3) explained 8.6%. The discriminant analysis showed that the data showed normality and homogeneity of variance ($F = 2.92$, $P < 0.05$). A value of Wilks's lambda (λ) = 0.997 with a significance of $P < 0.05$ was

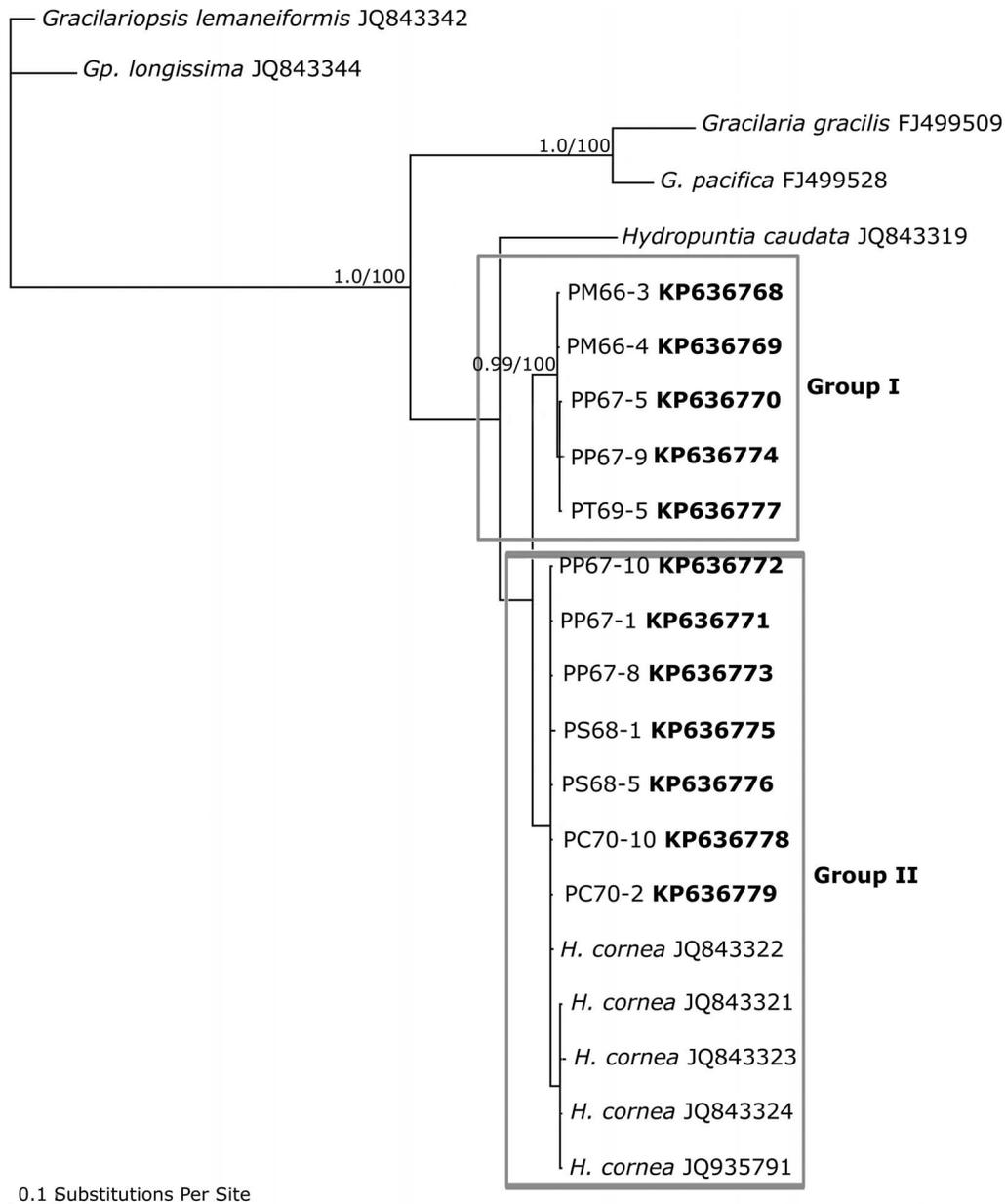


Fig. 5. Bayesian topology of COI gene sequence data of samples of *Hydropuntia*. Bayesian posterior probabilities followed by ML bootstrap values on branches. Two groups highlighted, groups I and II. Values below 95% are not indicated. PM, Puerto Morelos; PT, Puerto Telchac; PS, Puerto Sisal; PC, Puerto Chicxulub; PP, Puerto Progreso. *Gracilariopsis* species as out-groups. Sequences generated in this study are in boldface; otherwise, they are from GenBank.

obtained, indicating no significant difference between samples of genetic groups I and II collected in the Gulf of Mexico and the Mexican Caribbean.

DISCUSSION

All molecular markers suggest that samples collected from the Yucatan Peninsula form two groups (designated groups I and II) and that these groups are sympatric (e.g. Puerto Sisal, Puerto Progreso). The RuBisCo spacer and *cox2-3* spacer showed genetic variation within some of the studied populations (e.g. Puerto Sisal). Interestingly, there is an

intermediate RuBisCo haplotype between groups I and II (R3), which with other markers places that sample in group II. All other samples that had a group I RuBisCo haplotype also had group I *cox2-3* spacer haplotypes. Both spacers showed low intergroup variation (2.1% in RuBisCo and 2% in *cox2-3* spacer). The *cox2-3* spacer is often highly variable in intraspecific studies of red algae, with numerous haplotypes (García-Rodríguez *et al.* 2013; Yang *et al.* 2013). With both markers, groups I and II were very similar. These results suggest that the separation between the groups is recent. We observed mostly group I samples in Quintana Roo; whereas, samples from Yucatan had both groups, with a slight

Table 3. Distribution of diagnostic characters, following Ardito *et al.* (2014), for 20 samples from different populations of *Hydropuntia (H. cornea/H. usneoides)*.

Sample ID	Number of branches on the thallus		Diameter of cortical cells (µm)		Number of medullar layers	Diameter of medullar cells (µm)			Diameter of tetrasporangia (µm)	Molecular grouping ¹
	Length (cm)	Number of cortical layers	Length	Width		Length	Width	Length		
PM66-6	16	18	10-12.5	4-5	14	120-340	80-200	—	—	GI
PME9	30	14	10-12.5	5-7.5	12	110-250	60-190	—	—	GII
PME88	20	8	10-15	5-7.5	16	140-240	80-160	—	—	GI
PME97	17	7	10-12	5-7.5	12	110-250	60-110	—	—	GII
PME100	11.25	9	10-15	7.5	16	160-200	100-150	—	—	GI
PP67-2	28	12	10-12	5-7.5	14	190-280	100-200	—	—	GII
PP67-4	13	12	10	5	16	200-500	100-220	—	—	GII
PP67-7	18	8	10-15	5-6.25	14	150-250	80-110	—	—	GII
PP67-9	14	7	10-13.8	5	11	80-200	60-150	25-30	—	GI
PS68-5	20	4	10-11.5	4-5	12	240-400	130-280	—	—	GII
PS68-10	24	12	15	7.5	16	180-300	100-200	25-30	—	GII
PT69-5	19	3	12.5-15	5-7.5	14	100-260	70-210	20-30	—	GI
PT69-8	13	3	10-12.5	4-7.5	10	120-280	80-200	—	—	GI
PT69-10	22	5	10-15	5	10	220-310	70-150	20-25	—	GI
PC70-1	28	7	10	5	12	160-200	60-160	20-30	—	GII
PC70-5	40	16	10-12.5	4.5-7.5	10	180-300	100-180	20-25	—	GII
PC70-9	20.5	5	12-12.5	7.5	12	180-320	80-160	—	—	GII
CPE5	7	9	12-15	5-7.5	18	90-150	70-120	—	—	GI
CPE4	11	12	10-12.5	5-7.5	11	80-150	60-110	—	—	GI
CPE103	24	8	10-12.5	5	10	90-150	60-140	—	—	GII

¹ GI, group I; GII, group II.

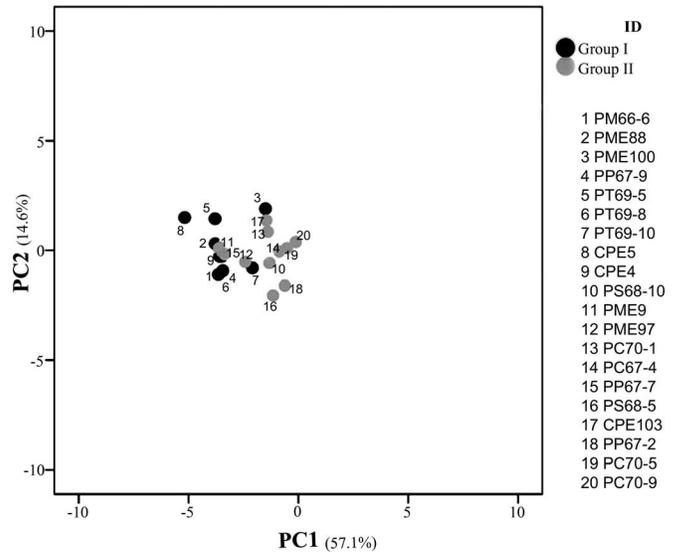


Fig. 6. Principal component analysis graph of morphological data. The X axis shows the variance of the PC1, and the Y axis shows the variance of the PC2. Variance values are indicated in parentheses. The black dots represent the group I samples, and grey dots represent the group II samples. Numbers are indicating sample number.

preponderance of group II samples (16 vs 24). It is possible that the Yucatan area is a transition zone between the Gulf of Mexico and more southern Mexican Caribbean floras, as has been suggested previously (Pedroche & Senties 2003).

Phylogenetic analysis of *rbcL* and COI showed two sister clades, and these corresponded to the haplotype groups. The genetic distance between groups I and II (2.7% and 4.4% for *rbcL* and COI, respectively) corresponded to the values of interspecific distance found by other authors for Gracilariales (for *rbcL*, 1.2%–5.8%, G.H. Kim *et al.* 2008; greater than 2%, Gurgel & Fredericq 2004; for COI, 3.2%–9.4%, Saunders 2005; 3.2%–16.1%, Yang *et al.* 2008). This suggests that groups I and II could be different species. The *rbcL* phylogeny, which included GenBank sequences, revealed a genetic affinity between group I and sequences of *H. usneoides* and between group II and sequences of *H. cornea*. The COI phylogeny, although without published sequences of *H. usneoides* to compare, showed affinity between group II and sequences of *H. cornea*. On the one hand, this would indicate that our group I samples could belong to *H. usneoides* and group II to *H. cornea*.

On the other hand, morphometric analysis showed no morphological differences between groups I and II. The most recently characterized differences between *H. cornea* and *H. usneoides* were the number of layers of cortical and medullar cells (Ardito *et al.* 2014). Our analysis of molecularly delineated groups showed that for groups I and II, these characters, thought to be diagnostic (number of layers of cortical and medullar cells, Ardito *et al.* 2014), are not. In both groups, we found specimens with a range of two to four layers of cortical cells, and nine to 18 layers of medullar cells. Previous authors have also suggested that the morphological separation of *H. cornea* and *H. usneoides* is difficult (Taylor 1960; Bird *et al.* 1986; Plastino & Oliveira 2002; Gurgel & Fredericq 2004). Both species have even

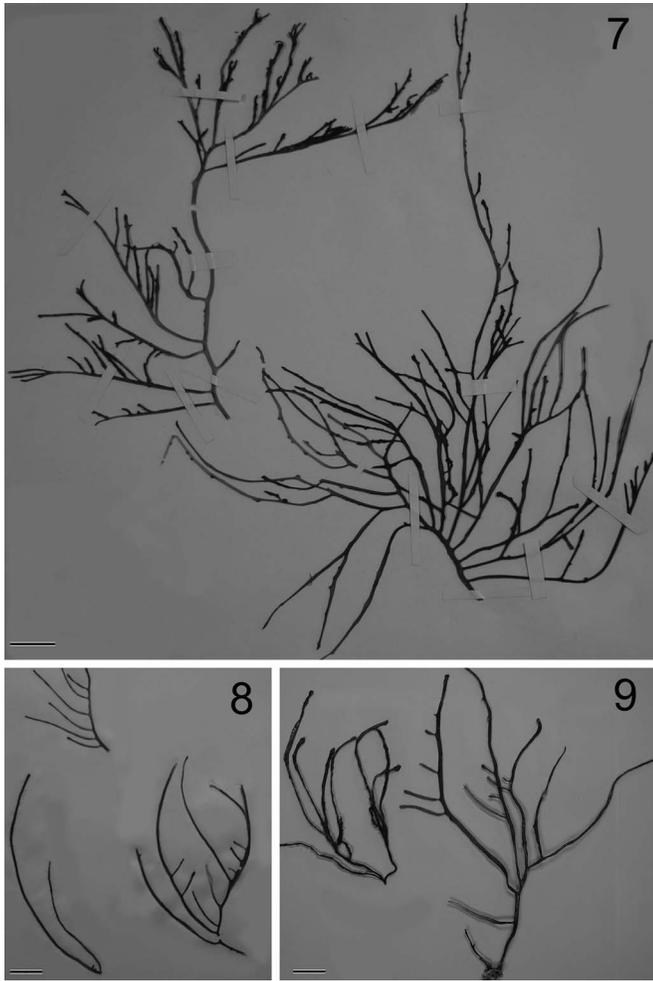


Fig. 7. *Hydropuntia usneoides* (left) and *H. cornea* (right) from Puerto Morelos, Quintana Roo. Scale bar = 10 mm.

Fig. 8. *Hydropuntia usneoides* from Puerto Telchac, Yucatan. Scale bar = 10 mm.

Fig. 9. *Hydropuntia cornea* from Puerto Chicxulun, Yucatan. Scale bar = 10 mm.

been erroneously identified as specimens of *Gracilaria debilis* (Taylor 1960). Recently, Dreckmann (2012), following the original descriptions of J. Agardh (1852), proposed that the thickness, texture and number of branches could be more useful than the number of layers of cortical and medullary cells, but our analysis revealed that, in groups I and II, it is possible to find both thick and very thin and slightly to very branched specimens (Figs 7–9). There appears to be no diagnostic morphological characters for these two species.

Since groups I and II are genetically different but morphologically indistinguishable, they should be considered part of a cryptic species complex in which species can only occasionally be recognized in limited circumstances and not in southern Mexico. This explains the lack of records for *H. usneoides* in the area (Mateo-Cid & Mendoza-Gonzalez 1991; Mendoza-González & Mateo-Cid 1992; Dreckmann 2012), as the tradition has been to describe specimens with these general characters as *H. cornea*. However, if *H. cornea* and *H. usneoides* are morphologically identical although genetically different, how is it that the GenBank sequences have

designated names for both species and they fall into two groups? What were the taxonomic criteria used to name these samples (Gurgel & Fredericq 2004)? Gurgel & Fredericq (2004) state that their species identifications were based ‘on the original descriptions, critical analysis of published literature, and on the type method of Silva (1952)’. We believe that the sequences published in GenBank (Gurgel & Fredericq 2004) were named based on samples collected allopatrically that matched the two extreme phenotypes for *H. cornea* and *H. usneoides*. The environment influences species morphology, and it could be that in different sites and different environments, the species can be identified. However, our data suggest that these species in sympatry have extensive morphological overlap, and correct species assignment can be done only using molecular techniques.

Despite the availability of the names *H. cornea* and *H. usneoides*, it is not possible to assign one or other to one of the two groups, inasmuch as the respective holotypes (Agardh 1852) have not been molecularly analyzed. But even if they have different sequences, overlapping characters in holotypes (Bird *et al.* 1982) and the literature persist. If species are allopatric, morphological variation between them could be more evident, making diagnostic characters easier to find. However, in sympatry and in presumably more uniform environments, morphological variation between species can decrease, making diagnostic characters difficult to recognize. This is especially the case in species with high plasticity and few diagnosable characters, as in many red algae and especially the Gracilariales. Therefore, species diversity could be underestimated in sympatry. We believe that for morphology to be useful in field studies, it needs to be applicable in most cases and that studies of species in sympatry are key to determining diagnosable characters.

In conclusion, our results indicate that two genetic entities exist in the Yucatan Peninsula but that they are morphologically indistinguishable and probably correspond to *H. cornea* and *H. usneoides*. This study highlights the importance of sampling in similar environments to determine if diagnostic characters are useful in species recognition, especially when species are highly plastic.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Biological Sciences and Health, UAM, the National Council for Science and Technology (CONACyT number of scholarship 239902) and the financing of PROMEP project PROMEP/103.5/13/13/6732: ‘Variación de *Hydropuntia cornea* (Gracilariales, Rhodophyta) en las costas del Golfo de México y el Caribe mexicano’. This article contains some results from the doctoral thesis of María Luisa Núñez in the Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud graduate program of the Universidad Autónoma Metropolitana.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data associated with this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.2216/15-009.1.s1>.

REFERENCES

ABBOTT I.A. 1999. *Marine red algae of the Hawaiian Islands*. Bishop Museum Press, Honolulu. 477 pp.

AGARDH C.A. 1822. *Species algarum*, vol. 1, pt. 2. Berling, Lund, Sweden pp. 169–398.

AGARDH J.G. 1852. *Species genera et ordines algarum, seu descriptiones succinctae specierum, generum et ordinum, quibus algarum regnum constituitur*. Volumis secundi: Algas florideas complectens, pt. 2, fasc. 2. C.W.K. Gleerup, Lund, Sweden. 786 pp.

ARDITO S.M., SENTÍES G.A. & DRECKMANN M.K. 2014. Caracterización morfoanatómica de *Hydropuntia usneoides* (Gracilariaceae, Rhodophyta) para la costa venezolana. *Interciencia* 39: 49–53.

BELLORIN A.M., OLIVEIRA M.C. & OLIVEIRA E.C. 2004. *Gracilaria vermiculophylla*: a western Pacific species of Gracilariaceae (Rhodophyta) first recorded from the eastern Pacific. *Phycological Research* 52: 69–79.

BIRD C.J. & McLACHLAN J. 1982. Some underutilized taxonomic criteria in *Gracilaria* (Rhodophyta, Gigartinales). *Botanica Marina* 25: 557–562.

BIRD C.J., McLACHLAN J. & OLIVEIRA E.C. 1986. *Gracilaria chilensis* sp. nov. (Rhodophyta, Gigartinales), from Pacific South America. *Canadian Journal of Botany* 64: 2928–2934.

BYRNE K., ZUCCARELLO G.C., WEST J., LIAO M.L. & KRAFT G.T. 2002. *Gracilaria* species (Gracilariaceae, Rhodophyta) from southeastern Australia, including a new species, *Gracilaria perplexa* sp. nov.: morphology, molecular relationships and agar content. *Phycological Research* 50: 295–311.

CIANCIOLA E., POPOLIZIO T., SCHNEIDER C. & LANE C. 2010. Using molecular-assisted alpha taxonomy to better understand red algal biodiversity in Bermuda. *Diversity* 2: 946–958.

CLEMENT M., POSADA D. & CRANDALL K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.

COHEN S., FAUGERON S., MARTINEZ E.A., CORREA J.A., VIARD F., DESTOMBE C. & VALERO M. 2004. Molecular identification of two sibling species under the name *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gracilariales). *Journal of Phycology* 40: 742–747.

CONKLIN K.Y., O'DOHERTY D.C. & SHERWOOD A.R. 2014. *Hydropuntia perplexa*, n. comb. (Gracilariaceae, Rhodophyta), first record of the genus in Hawai'i. *Pacific Science* 68: 421–434.

DESTOMBE C. & DOUGLAS S.E. 1991. Rubisco spacer sequence divergence in the rhodophyte alga *Gracilaria verrucosa* and closely related species. *Current Genetics* 19: 395–398.

DESTOMBE C., VALERO M. & GUILLEMIN M.L. 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.

DRECKMANN K.M. 2012. Los géneros *Gracilaria* e *Hydropuntia* (Gracilariaceae, Rhodophyta) en las costas mexicanas del Golfo de México y Caribe. In: *Monografías ficológicas*, vol. 4 (Ed. by A. Senties & K.M. Dreckmann), pp. 111–203. UAM-Iztapalapa, México y Universidad de La Laguna, Tenerife, España.

FREDERICQ S. & HOMMERSAND M.H. 1989. Proposal of the Gracilariales ord. nov. (Rhodophyta) based on an analysis of the reproductive development of *Gracilaria verrucosa*. *Journal of Phycology* 25: 213–227.

FREDERICQ S. & HOMMERSAND M.H. 1990. Diagnoses and key to the genera of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204/205: 173–178.

FRESHWATER D.W. & RUENESS J. 1994. Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33:187–194.

GARCIA-RODRIGUEZ L.D., RIOSMENA-RODRIGUEZ R., KIM S.Y., LOPEZ-MEYER M., LOPEZ-VIVAS J.J.M. & BOO S.M. 2013. Recent introduction of *Gracilaria parvispora* (Gracilariales, Rhodophyta) in Baja California, Mexico. *Botanica Marina* 56: 143–150.

GARGIULO G.M., MORABITO M., GENOVESE G. & DE MASI F. 2006. Molecular systematics and phylogenetics of Gracilariaceae species from the Mediterranean Sea. *Journal of Applied Phycology* 18: 497–504.

GOFF L.J., MOON D.A. & COLEMAN A.W. 1994. Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *Journal of Phycology* 30:521–537.

GUILLEMIN M.L., AKKI S.A., GIVERNAUD T., MOURADI A., VALERO M. & DESTOMBE C. 2008. Molecular characterisation and development of rapid molecular methods to identify species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco. *Aquatic Botany* 89:324–330.

GUILLEMIN M.L., VALERO M., FAUGERON S., NELSON W., DESTOMBE C. 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.

GUIRY M.D. & GUIRY G.M. 2015. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 02 January 2015.

GULBRANSEN D.J., MCGLATHERY J.K., MARKLUND M., NORRIS J.N. & GURDEL C.F.D. 2012. *Gracilaria vermiculophylla* (Rhodophyta, Gracilariales) in the Virginia coastal bays, USA: *cox1* analysis reveals high genetic richness of an introduced macroalga. *Journal of Phycology* 48: 1278–1283.

GURDEL C.F.D. & FREDERICQ S. 2004. Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): a critical assessment based on *rbcL* sequence analyses. *Journal of Phycology* 40: 138–159.

GURDEL C.F.D., FREDERICQ S. & NORRIS J.N. 2004. Phylogeography of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariaceae, Rhodophyta): a study of genetic discontinuity in a continuously distributed species based on molecular evidence. *Journal of Phycology* 40: 748–758.

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.

HUELSENBECK J.P. & RONQUIST F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.

IYER R., TRONCHIN E.M., BOLTON J.J. & COYNE V.E. 2005. Molecular systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta) with emphasis on Southern Africa. *Journal of Phycology* 41: 672–684.

KIM G.H., SHIM J.B., KLOCHKOVA T.A. WEST J.A. & ZUCCARELLO G.C. 2008. The utility of proteomics in algal taxonomy: *Bostrychia radicans*/*B. moritziana* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) as a model study. *Journal of Phycology* 44: 1519–1528.

KIM M.S., YANG E.C. & BOO S.M. 2006. Taxonomy and phylogeny of flattened species of *Gracilaria* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Korea based on morphology and protein-coding plastid *rbcL* and *psbA* sequences. *Phycologia* 45: 520–528.

KIM M.S., YANG E.C., KIM S.Y., HWANG I.K. & BOO S.M. 2008. Reinstatement of *Gracilariopsis chorda* (Gracilariaceae, Rhodophyta) based on plastid *rbcL* and mitochondrial *cox1* sequences. *Algae* 23: 209–217.

KIM S.Y., WEINBERGER F. & BOO S.M. 2010. Genetic data hint at a common donor region for invasive Atlantic and Pacific populations of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 46: 1346–1349.

LYRA G.D.M., COSTA E.D.S., DE JESUS P.B., DE MATOS J.C.G., CAIRES T.A., OLIVEIRA M.C., OLIVEIRA E.C., XI Z., NUNES J.M.D.C. & DAVIS C.C. 2015. Phylogeny of Gracilariaceae (Rhodophyta): evidence from plastid and mitochondrial nucleotide sequences. *Journal of Phycology* 51: 356–366.

MAGGS C.A., DOUGLAS S.E., FENETY J. & BIRD C.J. 1992. A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *Journal of Phycology* 28: 214–232.

MATEO-CID L.E. & MENDOZA-GONZÁLEZ A.C. 1991. Algas marinas bentónicas de la Isla Cozumel, Quintana Roo, México. *Acta Botánica Mexicana* 16: 57–87.

MENDOZA-GONZÁLEZ A.C. & MATEO-CID L.E. 1992. Algas marinas bentónicas de Isla Mujeres, Quintana Roo, México. *Acta Botánica Mexicana* 19: 37–61.

MUANGMAI N., ZUCCARELLO G.C., NOIRAKSA T. & LEWMANOMONT K. 2014. A new flat *Gracilaria*: *Gracilaria lantaensis* sp. nov.

- (Gracilariales, Rhodophyta) from the Andaman coast of Thailand. *Phycologia* 53: 137–145.
- PAREEK M., MISHRA A. & JHA B. 2010. Molecular phylogeny of *Gracilaria* species inferred from molecular markers belonging to three different genomes. *Journal of Phycology* 46: 1322–1328.
- PEDROCHE F.F. & SENTIES G.A. 2003. Ficología marina mexicana. Diversidad y problemática actual. *Hidrobiológica* 13: 23–32.
- PLASTINO E.M. & OLIVEIRA E. 2002. *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta) a new species from the tropical South American Atlantic with a terete frond and deep spermatangial conceptacles. *Phycologia* 41: 389–396.
- POSADA D. & CRANDALL K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- RUENESS J. 2005. Life history and molecular sequences of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariales, Rhodophyta), a new introduction to European waters. *Phycologia* 44: 120–128.
- SANTELCES B. & VALERA D. 1993. Intra-clonal variation in the red seaweed *Gracilaria chilensis*. *Marine Biology* 116: 543–552.
- SAUNDERS G.W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future application. *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B* 360: 1879–1888.
- SAUNDERS G.W. 2009. Routine DNA barcoding of Canadian Gracilariales (Rhodophyta) reveals the invasive species *Gracilaria vermiculophylla* in British Columbia. *Molecular Ecology Resources* 9, supplement S1: 140–150.
- SCHNEIDER C.W. & SEARLES R.B. 1991. *Seaweeds of the southeastern United States. Cape Hatteras to Cape Canaveral*. Duke University Press, Durham, NC. 553 pp.
- SHIMADA S., HORIGUCHI T. & MASUDA M. 1999. Phylogenetic affinities of genera *Acanthopeltis* and *Yatabella* (Gelidiales, Rhodophyta) inferred from molecular analyses. *Phycologia* 3: 528–540.
- SILVA P.C. 1952. A review of nomenclatural conservation in the algae from the point of view of the type method. *University of California Publications in Botany* 25: 241–323.
- SPSS Inc. 2009. PASW statistics for Windows, version 18.0. Chicago: SPSS Inc., Chicago.
- STAMATAKIS A. 2006. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- SWOFFORD D.L. 2001. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- TAYLOR W.R. 1960. *Marine algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas*. University of Michigan Press, Ann Arbor. 870 pp.
- WANG H.W., KAWAGUCHI S., HORIGUCHI T. & MASUDA M. 2000. Reinstatement of *Grateloupia catenata* (Rhodophyta, Halymeniaceae) on the basis of morphology and *rbcL* sequences. *Phycologia* 39: 228–237.
- WYNNE M. J. 1989. The re-instatement of *Hydropuntia* Montagne (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Taxon* 38: 476–479.
- YANG E.C., KIM M.S., GERALDINO P.J.L., SAHOO D., SHIN J.A. & BOO S.M. 2008. Mitochondrial *cox1* and plastid *rbcL* genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20: 161–168.
- YANG M.Y., GERALDINO P.J.L. & KIM M.S. 2013. DNA barcode assessment of *Gracilaria salicornia* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Southeast Asia. *Botanical Studies* 54: 27.
- YOW Y.Y., LIM P.E. & PHANG S.M. 2011. Genetic diversity of *Gracilaria changaii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from west coast, Peninsular Malaysia based on mitochondrial *cox1* gene analysis. *Journal of Applied Phycology* 23: 219–226.
- YOW Y.Y., LIM P.E. & PHANG S.M. 2013. Assessing the use of mitochondrial *cox1* gene and *cox2-3* spacer for genetic diversity study of Malaysian *Gracilaria changaii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Peninsular Malaysia. *Journal of Applied Phycology* 25: 831–838.
- ZUCCARELLO G.C., BURGER G., WEST J.A. & KING R.J. 1999a. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443–1447.
- ZUCCARELLO G.C., WEST J., KAMIYA M. & KING R. 1999b. A rapid method to plastid haplotypes in red seaweeds and its use in determining parental inheritance of plastids in the red alga *Bostrychia* (Ceramiales). *Hydrobiologia* 401: 207–214.

Received 26 January 2015; accepted 11 June 2015
Associate Editor: Mariana Cabral Oliveira