Variación genética en *Meristotheca cylindrica* (Solieriaceae, Rhodophyta) en Campeche, México

Genetic variation of *Meristotheca cylindrica* (Solieriaceae, Rhodophyta) in Campeche, Mexico

Carlos Adán Palma Ortiz[1], Kurt M. Dreckmann[2], María Luisa Núñez Resendiz[3] y Abel Sentíes[2]

[1] Estudiante de la carrera de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A. P. 70-474, 04510, CDMX, México
[2] Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (UAM-I), A. P. 55-535, 09340, CDMX, México
[3] Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A. P. 70-474, 04510, CDMX, México
e-mail: foxh.adan@ciencias.unam.mx

Recibido: 1 de junio de 2017. ***Aceptado:*** 7 de noviembre de 2017.

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

RESUMEN

Antecedentes. *Meristotheca cylindrica* es un alga roja distribuida en las costas de Campeche, comúnmente mal identificada por el espectro de variación morfológica que exhibe en sus poblaciones. **Objetivos.** Se propuso evaluar la variación genética y su relación con la variación morfológica en las poblaciones de *M. cylindrica*, describir la posible estructura genética y su distribución haplotípica así como determinar posibles eventos de especiación. **Métodos.** Para 45 individuos de *M. cylindrica*, procedentes de cinco poblaciones de Campeche, se amplificaron vía PCR las regiones espaciadoras de RuBisCo y de *cox*2-3 con la finalidad de estimar medidas de diversidad, distancia y estructura genética. Adicionalmente, se realizaron análisis filogenéticos considerando secuencias de especies de la familia Solieriaceae provenientes del GenBank. A partir de 10 especímenes de herbario, se realizó un análisis múltiple de varianza considerando 30 caracteres morfológicos. **Resultados.** La región espaciadora de RuBisCo reveló cuatro haplotipos interconectados (R1-R4), así como parámetros moderados de diversidad genética (Hd= 0.46458, π= 0.00785). El análisis filogenético mostró un único grupo monofilético que incluyó a todos los haplotipos. La región espaciadora de *cox*2-3 expuso nueve haplotipos (C1-C9) estructurados en los grupos GI y GII, así como parámetros elevados de diversidad, diferenciación y distancia genética (Hd=0.81, π =0.06476; Φ_{PT}, F_{ST}>0.35; >10% de diferencias). El análisis filogenético evidenció dos grupos monofiléticos congruentes con GI y GII, mientras que el análisis de varianza mostró homogeneidad morfológica entre las poblaciones. **Conclusiones.** Se sugiere un evento de especiación en curso para *M. cylindrica*.

Palabras clave: Diversidad genética, estructura genética, espaciador *cox*2-3, espaciador RuBisCo, haplotipos.

ABSTRACT

Background. *Meristotheca cylindrica* is a red alga distributed in the Campeche coast, usually misidentified by the morphological variation spectrum exhibited in its populations. **Objectives.** We proposed to evaluate the genetic variation and its relationship with morphological variation in *M. cylindrica* populations, to describe the possible genetic structure and its haplotypic distribution and to determine possible speciation events. **Methods.** We measured genetic variation, distances and structure of 45 individuals of *M. cylindrica* from five populations of Campeche, using DNA sequences of the spacer regions of RuBisCo and *cox*2-3. Additionally, phylogenetic analyses were performed considering sequences of Solieriaceae species available in the GenBank. A statistical analysis covering 30 morphological characters was performed on 10 herbarium specimens. **Results.** The RuBisCo spacer region revealed four interconnected haplotypes (R1-R4), as well as moderated genetic diversity parameters (Hd= 0.46458, π= 0.00785). Phylogenetic analysis showed a single monophyletic group that included all haplotypes. The *cox*2-3 spacer region revealed nine haplotypes (C1-C9) structured in the GI and GII groups, as well as elevated parameters of genetic diversity, distances and differentiation (Hd = 0.81, π = 0.06476; >10% of differences; Φ_{PT} and F_{ST}> 0.35). Phylogenetic analysis showed two monophyletic groups congruent with GI and GII. Analysis of variance showed morphological homogeneity among populations. **Conclusions.** Findings suggest a speciation event is currently occurring in *M. cylindrica*.

Key words: *cox*2-3 spacer, genetic structure, genetic diversity, haplotypes, RuBisCo spacer.

INTRODUCCIÓN

La diversidad genética es el componente fundamental detrás de la diversidad biológica, por lo que su estudio provee importantes pistas acerca de los mecanismos que moldean la variación genética, sus patrones, niveles e historia evolutiva de un taxón (Conklin *et al*. 2014; Guillemin *et al*. 2014; Muangmai *et al*. 2015; Núñez-Resendiz *et al*. 2016). En estudios microevolutivos de índole filogeográfica y de genética de poblaciones se han empleado distintos marcadores moleculares para la evaluación de la diversidad genética de especies con poca o alta plasticidad fenotípica (Graur & Li 2000; West-Eberhard 2003). Tales marcadores moleculares incluyen regiones mitocondriales como COI (Yang *et al*. 2008, 2015; Yow *et al*. 2011, 2013; Muangmai *et al*. 2015), la región espaciadora *cox*2-3 (Destombe *et al*. 2010; Pareek *et al*. 2010; García-Rodríguez *et al*. 2013; Núñez-Resendiz *et al*. 2015); marcadores cloroplastidiales como la región espaciadora de la RuBisCo (Guillemin *et al*. 2008; Núñez-Resendiz *et al*. 2015, 2016; Zuccarello *et al*. 2005); o marcadores nucleares como la región ITS (Goff *et al*. 1994). El empleo de estos marcadores, en combinación con estudios de morfología, ha proporcionado evidencias sólidas para la resolución de conflictos de identificación errónea de especies, el hallazgo de nuevas especies o la solución de complejos de especies crípticas (Muangmai *et al*. 2015, Núñez-Resendiz *et al.* 2016, 2017).

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

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

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

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

MATERIAL Y MÉTODOS

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

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

La amplificación vía PCR se realizó con el kit Taq PCR Core Kit (Qiagen) y cebadores específicos según la región de cada genoma por amplificar. El marcador molecular cloroplástico, la región espaciadora de la RuBisCo (*rbc* spacer), se amplificó con los cebadores spacer-F y spacer-R descritos en Maggs *et al.* (1992). Por otro lado, el espaciador de *cox*2-3 se amplificó utilizando los oligonucleótidos *cox*2-for y *cox*3-rev (Zuccarello *et al*. 1999). El volumen total de PCR por muestra fue de 25 µL con los siguientes reactivos: 2.5 µL de buffer de PCR 10X, 1 µL de primer forward 10µM, 1 µL de primer reverse 10µM, 0.5 µL de solución de dNTPs (10mM por cada uno), 0.5 µL de BSA, 1 µL de $MgCl_2$ 25mM, 0.125 µL de Taq polimerasa 5U/µL, 17.375 µL de agua desionizada y 1 µL de DNA genómico. Las condiciones de PCR fueron las descritas por Núñez-Resendiz *et al*. (2015). La amplificación vía PCR se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y los productos de PCR se purificaron con el kit QIAquick Purification Kit (Qiagen). Las muestras amplificadas se enviaron a Macrogen Korea (10F, 254 Beotkkot-ro, Geumcheon-gu, Seúl, 08511, República de Corea), donde se utilizó el kit de secuenciación BigDye en un secuenciador ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Princeton, NJ, EE. UU.).

Las secuencias obtenidas se organizaron en una matriz, se editaron y alinearon mediante el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.* 1994) con el programa Bioedit (Hall 1999). La búsqueda del modelo óptimo de evolución de DNA se implementó mediante jModelTest v. 2.1.6 con el criterio de información Akaike (AIC) (Darriba *et al.* 2012, Guindon & Gascuel 2003). El modelo elegido para ambos conjuntos de secuencias fue el GTR G+I (general time reversible + distribución gamma + sitios invariables), el cual se utilizó en los análisis filogenéticos posteriores.

Tabla 1. Muestras y especímenes de *Meristotheca cylindrica* procedentes de las costas de Campeche. Se describen los datos de localidad, coordenadas geográficas y números de campo y herbario (UAMIZ= Herbario de la Universidad Autónoma Metropolitana). Se indica el haplotipo al que pertenecen las muestras para ambas regiones genéticas; para el caso de la región espaciadora *cox*2-3, GI y GII corresponden con la estructura genética revelada por este marcador (ver texto).

Localidad	Coordenadas GPS	Número de Herbario	Clave de campo	RuBisCo	*cox*2-3	
Isla Aguada (IA)	18º50'00"N, 91º26'51"O	UAMIZ-1239	IA:3-10	R1	GI	C1
			IA:1-1	R2	GII	C2
			IA:1-3	R2	GII	C3
			IA:3-9	R1	GI	C1
			IA:3-12	R1	GI	C1
			IA:3-11	R1	GI	C1
			IA:2-6	R1	GI	C1
			IA:2-7	R1	GI	C4
			IA:2-5	R1	GI	C5
			IA:2-8	R1	GI	C1
Sabancuy (S)	18°59'39"N, 91°11'06"O	UAMIZ-1246	S:5-17	R1	GI	C8
			S:2-6	R1	GI	C1
			S:3-9	R1	GI	C1
			S:1-4	R2	GII	C2
			S:1-3	-	GII	C2
			S:5-18	R1	GI	C1
			S:H29	R1		
			S:2-8	R1	GI	C9
			S:1-1	R2	GII	C2
			S:2-7	-	GI	C1
			S:2-5	R1	GI	C1
Punta Xen (PX)	19º8'21"N, 91º57'49"O	UAMIZ-1252	PX:1-13	R2	-	-
			PX:1-2	-	GII	C6
			PX:2-4	R1	GI	C1
			PX:1-1	R2	GII	C7
			PX:1-14	R1	GII	C7
			PX:1-15	R1	GII	C7
			PX:1-16	R1	GII	C7
			PX:H10	R1	-	-
			PX:H21	R1	-	-
			PX:H22	R1	-	-
Bahía de Tortuga (BT)	19°21'35"N, 90°42'35"O	UAMIZ-1249	BT:92-12	R3	GII	C2
			BT:92-16	R2	GII	C2
			BT:92-13	R2	GII	C2
			BT:92-15	R2	GII	C2
			BT:93-1	R2	GII	C2
			BT:93-2	R2	GII	C2
Playa Bonita (PB)	18°59'39"N, 91°11'06"O	UAMIZ-970	PB:H6	R1	-	-
			PB:H70	R4	-	-
			PB:H5	R1	-	-
			PB:H42	R1	GI	C5
			PB:H49	R1	GI	C5
			PB:H51	R1	GI	C4
			PB:H52	R1	GI	C4
			PB:H53	R1	GI	C4

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

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

Los análisis filogenéticos de inferencia bayesiana (IB) y máxima verosimilitud (ML) se realizaron con el programa TOPALi v. 2.5 (Milne *et al*. 2004): la inferencia bayesiana mediante Mr. Bayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001), con una frecuencia de muestreo de cada 100 generaciones durante $1x10^6$ generaciones y burn-in del 25%. Asimismo, la máxima verosimilitud se determinó vía RaxML (Stamatakis 2014); se utilizó un *bootstrap* con 1000 réplicas para el cálculo de soporte de ramas. El grupo externo seleccionado para ambos marcadores fue *Hydropuntia cornea* Montagne. Se estimaron distancias genéticas no corregidas (*p*-distances) en MEGA v. 6 (Tamura *et al*. 2013).

El análisis morfológico se realizó a partir de caracteres anatómicos apreciados en 10 ejemplares de herbario pertenecientes a las poblaciones trabajadas molecularmente. Para ello, se realizaron manualmente cortes transversales observados con la ayuda del microscopio óptico Leica DMLB. Las muestras se dividieron en dos grupos según la ramificación presentada: 1) patrón de ramificación sólo alterna, poco ramificado (2 o 3 veces); 2) patrón de ramificación alterna-opuesta, altamente ramificado ($x \geq 4$). Se construyó una matriz con la cuantificación de los siguientes caracteres: número de capas corticales, número de filamentos medulares, diámetro de la médula (largo y ancho), diámetro del talo (largo y ancho) y diámetro de las células de ambas cortezas (interna y externa, largo y ancho de cada una) en tres partes del talo (apical, media y basal), lo que constituye un total de 30 caracteres. Dicha matriz se sometió a un análisis múltiple de varianza en STATISTICA 8.0.360 (StatSoft Inc. 2007) con el fin de determinar diferencias significativas entre los grupos independientes (1 y 2) a partir de las variables dependientes consideradas (cuantificación de los caracteres en las tres partes del talo).

RESULTADOS

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

Se calcularon las medidas de diversidad y diferenciación genética para este marcador (Tablas 2 y 3), las cuales mostraron en general siete sitios segregantes (Tabla 4), una moderada diversidad haplotípica (H*d*= 0.46458) y una diversidad nucleotídica (π = 0.00785). Las poblaciones con la mayor diversidad haplotípica fueron Sabancuy y Punta Xen, ambas con la misma diversidad haplotípica (Hd=0.38889) así como diversidad nucleotídica (π= 0.006344) (Tabla 2). Por el contrario, la población con menor variación fue Playa Bonita con valores de H*d*=0.25 y π=0.00272 (Tabla 2).

En cuanto a los índices de diferenciación, se obtuvieron valores de Nm=0.55 y de F_{ST}=0.47420. El AMOVA arrojó un índice de Φ_{PT}=0.268 y un valor de Nm=1.367, con un 27% de la varianza explicada por las diferencias del marcador cloroplástico entre las poblaciones, en tanto que un 73% de la varianza explicada por la variación al interior de las mismas (Tabla 3).

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

Tabla 2. Medidas de diversidad genética para las poblaciones de *Meristotheca cylindrica*, basadas en las regiones espaciadoras de RuBisCo y *cox*2-3.

Localidad	Espaciador de RuBisCo					Espaciador de *cox*2-3				
	Número de secuencias	*S*	*h*	H*d*	π	Número de secuencias	*S*	*h*	H*d*	π
IA	10	3	2	0.35556	0.0058	10	31	5	0.6667	0.053
PX	9	3	2	0.38889	0.00634	6	32	3	0.6	0.0546
PB	8	2	2	0.25	0.00272	5	7	2	0.6	0.02
S	9	3	2	0.38889	0.00634	10	30	4	0.71	0.06476
BT	6	2	2	0.3	0.00362	6	0	1	0	0
Total	42	7	4	0.46458	0.00785	37	34	9	0.81081	0.07285

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

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

Fuente de variación	Espaciador de RuBisCo				Espaciador de *cox*2-3			
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	Porcentaje de la variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	Porcentaje de la variación
Entre poblaciones	4	3.104	0.776	27%	4	5.695	0.158	36%
Al interior de poblaciones	37	7.086	0.192	73%	32	8.900	0.278	64%
				Φ_{PT}=0.268 Nm=1.367				Φ_{PT}=0.363 Nm=0.879

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

En cuanto al análisis filogenético, las muestras correspondientes a cuatro haplotipos de *M. cylindrica* se agruparon en un solo clado soportado por una probabilidad posterior bayesiana y *bootstrap* de 0.97/90, respectivamente. En su interior, se ubicó un grupo conformado por las muestras de los haplotipos R2 y R3, soportado por valores de 1.0/96 (probabilidad posterior bayesiana y *bootstrap*, respectivamente) (Fig. 3).

Los porcentajes de distancia genética al interior de *M. cylindrica* con el espaciador de RuBisCo fueron: máxima de 4.3% (entre R3-R4) y mínima de 1.1% (entre R3-R2 y R4-R1); el promedio de distancia genética con este marcador fue de 2.5%.

Espaciador de *cox*2-3. El set de datos consistió en 37 secuencias con 210 pb de longitud para el análisis poblacional; el análisis filogenético incluyó muestras de especies de la familia Solieriaceae obtenidas de GenBank, con *Hydropuntia cornea* como grupo externo, por lo que el conjunto de datos abarcó 46 secuencias en total.

Las medidas de diversidad genética y diferenciación calculadas (Tablas 2 y 3), mostraron en general 34 sitios segregantes (Tabla 5), una alta diversidad haplotípica general (H*d*=0.81081) y una diversidad nucleotídica (π =0.07285). La población con la mayor diversidad haplotípica (H*d*=0.71) y diversidad nucleotídica (π=0.06476) fue Sabancuy. Por el contrario, la población con menor variación fue Bahía de Tortuga ya que presentó sólo un haplotipo (H*d*=0 y π=0) (Tabla 2).

Figura 1. Redes de parsimonia estadística de las regiones espaciadoras de RuBisCo (A) y de *cox*2-3 (B) de *Meristotheca cylindrica*. Para la región espaciadora de *cox*2-3, los dos grupos genéticos encontrados se indican como GI y GII. Para ambas redes, los rectángulos corresponden con el posible haplotipo ancestral; las líneas sencillas indican un paso mutacional; los círculos negros indican haplotipos extintos o no muestreados; n = número de individuos con el mismo haplotipo.

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

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

Respecto al análisis de haplotipos, la red de parsimonia estadística reveló nueve haplotipos agrupados en dos redes, que correspondieron con dos grupos genéticamente diferenciados (GI y GII) con una estructuración total. La primera red (GI) estuvo conformada por cinco haplotipos: C1 (n=12), C8 (n=1), C5 (n=3), C9 (n=1) y C4 (n=4) (Fig. 1 y Tabla 1), mientras que la segunda red (GII) por cuatro haplotipos: C3 (n=1), C2 (n=10), C6 (n=1) y C7 (n=4) (Figura 1 y Tabla 1). En GI, el haplotipo C1 (designado por el programa como el posible haplotipo ancestral) estuvo separado de C8, C5 y C9 por dos pasos mutacionales, y a su vez, estuvo separado de C4 por cinco pasos mutacionales. En GII, el haplotipo C3 (designado como posible haplotipo ancestral incluso con n=1) se separó de C7 y C2 por un solo paso mutacional, mientras que cinco pasos mutacionales lo separaron de C6 (Fig. 1).

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

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

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

mente C8 y C9 se restringieron a Sabancuy. El número de haplotipos por población fue el siguiente: Isla Aguada (5), Sabancuy (4), Punta Xen (3), Playa Bonita (2) y Bahía de Tortuga (1) (Fig. 2).

En el análisis filogenético, las muestras correspondientes a los nueve haplotipos de *M. cylindrica* se agruparon en dos grupos monofiléticos (GI, GII), con soporte de probabilidad posterior bayesiana y *bootstrap* de 0.98 y 0.95, respectivamente (Fig. 4). El grupo I (GI) incluyó las muestras correspondientes a los haplotipos C1, C4, C5, C8 y C9, en tanto que el grupo II (GII) agrupó las muestras correspondientes a C2, C3, C6 y C7 (Fig. 4, Tabla 1). Las muestras correspondientes a los haplotipos R2 y R3 del espaciador de RuBisCo se incluyen en GII del espaciador *cox*2-3 (Tabla1).

Los porcentajes de distancia genética al interior de *M. cylindrica* (entre ambos grupos) con el espaciador de *cox*2-3 fueron: máxima de 14.8% (entre C8-C7 y C8-C3) y mínima de 0.5% (entre C3-C7 y C3-C2); la distancia genética promedio fue de 8.3%. Al interior de GI, la distancia mínima se detectó entre C1-C5, C1-C8 y C1-C9 (1%) y la máxima entre C4-C5 y C4-C8 (3.3%); la distancia genética promedio del grupo fue de 2%. Al interior de GII, la distancia genética mínima se detectó entre C2-C3 y C3-C7 (0.5%) y la máxima entre C6-C7 (2.9%); la distancia genética promedio fue de 1.5% para este grupo.

Análisis morfológico. El análisis múltiple de varianzas (MANOVA) a partir de datos cuantitativos asociados a las tres partes del talo (Tabla 6), indicó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos morfológicos analizados, ya que Wilk's Λ=0.066267; F (8, 1) =1.76132 y p=0.527258>0.05.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con las regiones espaciadoras de RuBisCo y *cox*2-3, así como los análisis morfológicos, revelaron estructura genética al interior de *M. cylindrica* en Campeche.

La red haplotípica obtenida del análisis con la región espaciadora RuBisCo dejó al descubierto moderadas diferencias entre poblaciones con cuatro haplotipos interconectados, mientras que la red haplotípica obtenida con la región espaciadora *cox*2-3 mostró una estructuración total de nueve haplotipos en dos grupos genéticos (GI y GII), correspondientes con dos grupos o entidades biológicas subyacentes en *M. cylindrica*. En el grupo GII el haplotipo sugerido por el programa como el ancestro fue C3. Sin embargo, este se restringió a la localidad de Isla Aguada y sólo estuvo representado por un individuo, por lo que se considera que el haplotipo C2 sería el posible ancestro ya que presentó el mayor número de individuos (10), el mismo número de conexiones que C3 (2) y su localización en tres de cinco localidades. Las poblaciones más ricas en haplotipos y que presentaron el mayor número de haplotipos únicos fueron Isla Aguada, Sabancuy y Punta Xen, mientras que la conformación haplotípica de Bahía de Tortuga y Playa Bonita fue más homogénea. Esta distribución haplotípica sugiere un moderado intercambio genético entre las poblaciones. A diferencia de lo registrado en la región espaciadora de la RuBisCo, con la región espaciadora de *cox*2-3 se percibió cierta homogeneidad haplotípica en aquellas poblaciones más próximas al estado de Yucatán, mientras que la heterogeneidad haplotípica se observó en aquellas poblaciones más cercanas al estado de Tabasco, tal como describieron Núñez-Resendiz *et al*. (2016) para el complejo *Hydropuntia cornea* / *Hydropuntia usneoides* (C. Agardh) Gurgel & Fredericq.

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

Figura 4. Topología bayesiana obtenida con secuencias de la región espaciadora de *cox*2-3 para las poblaciones de *Meristotheca cylindrica*. Las secuencias obtenidas en el presente estudio están indicadas en las ramas de color azul (GII) y rojo (GI); las restantes fueron obtenidas del GenBank, cuyos números de acceso se indican a un lado. Los valores de probabilidad posterior bayesiana (izquierda) y los valores de *bootstrap* (derecha) están indicados en los nodos. Los valores por debajo de 95% no son mostrados.

Para los resultados de esta investigación, la región espaciadora de *cox*2-3 fue más variable que la región espaciadora de RuBisCo en una proporción de 9:4. Estos resultados son consistentes con lo descrito por Zuccarello *et al.* (1999), quien menciona a este gen como un marcador altamente recomendable en estudios de variación genética de algas rojas. Yow *et al.* (2013) mencionan que los marcadores mitocondriales son más variables que los cloroplásticos; a partir de sus resultados enmarca al gen COI como un marcador incluso más variable que la región espaciadora *cox*2-3. Sin embargo, Núñez-Resendiz *et al.* (2015) describieron a la región espaciadora de la RuBisCo como un marcador más variable que la región espaciadora *cox*2-3.

Tabla 5. Sitios variables en el alineamiento de secuencias de DNA de *Meristotheca cylindrica* para los haplotipos de la región espaciadora de *cox*2-3 y sus números de acceso al GenBank. En negrita se resaltan los haplotipos pertenecientes al Grupo I (GI). En tipografía normal se indican los haplotipos del Grupo II (GII). H = haplotipos, S = sitios segregantes, # = no. de acceso al GenBank.

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

Tabla 6. Cuantificación de caracteres morfológicos de 10 muestras de *Meristotheca cylindrica*. Los caracteres diagnósticos se establecieron según Ardito *et al*. (2014) modificado para *M. cylindrica*, con la adición del número de filamentos medulares y el diámetro de células de las cortezas externa (CE) e interna (CI). IA = Isla Aguada, S = Sabancuy, BT = Bahía de Tortuga, PX = Punta Xen, PB = Playa Bonita.

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

La distribución haplotípica en las poblaciones de *M. cylindrica*, con la región espaciadora de RuBisCo, evidenció que las poblaciones más parecidas en cuanto a su conformación haplotípica fueron Isla Aguada, Sabancuy y Punta Xen, mismas que a su vez son las poblaciones más cercanas entre sí. Empero, a medida que las poblaciones se acercaron más al estado de Yucatán (Bahía de Tortuga y Playa Bonita), surgieron haplotipos nuevos (R3 y R4) que no se encontraron en las primeras tres localidades (las más cercanas al estado de Tabasco) lo que podría indicar cierto aislamiento reproductivo. La presencia de los haplotipos R1 (ancestro) y R2 en Bahía de Tortuga y Playa Bonita sugiere que aún existe intercambio genético escaso en conjunto con un valor de Nm~1.

A pesar de la poca variación encontrada con la región espaciadora de la RuBisCo, se advirtió que las muestras cuyos haplotipos más lejanos genéticamente al ancestro (R2 y R3) pertenecen a la estructura genética equivalente al grupo GII de la región espaciadora *cox*2-3.

Entre las poblaciones de *M. cylindrica* se detectaron distintos niveles de diferenciación genética con ambos genes. Altos valores fueron encontrados en Punta Xen y Sabancuy con la región espaciadora de RuBisCo, mientras que en Sabancuy con el espaciador de *cox*2-3, resultados que podrían indicar que la poblaciones se encuentran estables o en equilibrio (Grant & Bowen, 1998). No obstante, la forma en estrella de las redes haplotípicas indica un proceso reciente de expansión demográfica (Slatkin & Hudson, 1991) lo que sugiere que las poblaciones de *M. cylindrica* no están en equilibrio, similar a lo descrito por Núñez-Resendiz *et al*. (2016) para las poblaciones del complejo *Hydropuntia cornea* / *Hydropuntia usneoides* en Campeche. Los valores generales de F_{ST}, para ambos marcadores, indicaron una gran diferenciación genética según Hartl &Clark (1997) ya que son mayores a 0.25, lo cual resulta en una estructuración significativa de las poblaciones estudiadas. Los valores de Φ_{PT} fueron significativamente distintos de cero (0.26 para el marcador cloroplástico y 0.36 para el mitocondrial), lo que refleja la divergencia ocurrida al interior de *M. cylindrica*.

Las distancias genéticas no corregidas obtenidas con la región espaciadora de RuBisCo mostraron dos valores entre sus haplotipos: a) entre los conjuntos R1-R4 y R2-R3 (1.1%) y b) entre R3 y R4 (4.3%). En cuanto al espaciador de *cox*2-3 las distancias fueron aún mayores entre GI y GII, con un máximo de 14.8% y un promedio de 8.3%. Las distancias genéticas interespecíficas reportadas por Núñez-Resendiz et al. (2017) entre *M. cylindrica* y otras especies del género varían de un mínimo de 2.8% (*M. procumbens* P. W. Gabrielson & Kraft, de Fiji) a un máximo de 4.4% (*Meristotheca* sp., de Taiwan), en tanto que las distancias intraespecíficas se distribuyen en un intervalo de 0.2% a 0.4%. Las distancias genéticas obtenidas sugieren que ambos grupos genéticos corresponden con dos entidades diferenciadas probablemente por encima del nivel de especie, como lo reportado entre géneros de la familia Gracilariaceae en un promedio de 8.8% así como una divergencia de 12.6% entre *Gracilaria chilensis* C. J. Bird, McLachlan & E. C. Oliveira y *Gracilariopsis* sp. (Yang *et al*., 2008).

Los análisis filogenéticos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud fueron congruentes con la estructura genética encontrada con ambos marcadores: en la región espaciadora de RuBisCo se detectó un grupo monofilético con un conjunto constituido por R2 y R3 al interior, lo que coincidió con los haplotipos agrupados en GII de la región espaciadora de *cox*2-3; con este marcador se encontró un clado subdividido en los grupos GI y GII con sus respectivos haplotipos. En ambos casos se ubicó sistemáticamente a *M. cylindrica* como grupo hermano de *Eucheuma isiforme*.

Anatómicamente, existe homogeneidad entre las muestras de *M. cylindrica*. Las diferencias se remiten a los caracteres cualitativos externos: el patrón y grado de ramificación en el talo vegetativo, los cuales conforman dos grupos morfológicos distintos.

Recapitulando, es posible concluir que la estructura y diferenciación genética, así como la variación intra e interpoblacional, revelan la presencia de distintos genotipos utilizando un fenotipo lo suficientemente similar como para confundir la identificación taxonómica. Esto muestra indicios de un proceso de especiación en curso: se inicia con barreras ecológicas y culmina con barreras reproductivas, dando lugar a especies crípticas con los grupos genéticos GI y GII como posiblemente ocurre en el presente caso, lo que manifiesta diferencias genéticas incluso a nivel de género exhibidas con la región espaciadora de *cox*2-3, el cual tuvo mayor variabilidad que el marcador cloroplástico. Posteriormente será necesario un incremento en el intervalo de muestreo a lo largo de la península de Yucatán (o más general, al Golfo de México) así como en el número de individuos por población, para establecer hipótesis más sólidas sobre los procesos que ocurren al interior de los grupos encontrados en *M. cylindrica*. De igual manera, será necesario el análisis de caracteres morfológicos cualitativos para describir la relación entre los grupos genéticos encontrados en este estudio y los grupos morfológicos reportados anteriormente. Por sí sola, la historia geológica de la península de Yucatán sugiere una alta probabilidad de encontrar diversidad críptica en los grupos biológicos reportados a lo largo de su litoral y puede ofrecer explicaciones a los procesos evolutivos en el área, por lo que la necesidad de emprender estudios de ecología evolutiva se hace manifiesta.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo de los proyectos UAMI, Consejo de la División Ciencias Biológicas y de la Salud (sesión 15.14-131014), y Secretaría de Educación Pública - PROMEP (UAMI-CA-117).

REFERENCIAS

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

Callejas-Jiménez, M. E., A. Sentíes & K. M. Dreckmann. 2005. Macroalgas bentónicas de Puerto Real, Faro Santa Rosalía y Playa Preciosa, Campeche, México, con algunas consideraciones florísticas y ecológicas para el estado. *Hidrobiológica* 15: 89-96.

Chiovitti, A., G. T. Kraft, A. Bacic & M. L. Liao. 2001. Gelling polysaccharides from Australian seaweeds: research and potential. *Marine and Freshwater Research* 52: 917-935. DOI: 10.1071/MF01028

Clement, M., D. Posada & K. A. Crandall. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657-1659. DOI:10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x

Conklin, K. Y., D. C. O'Doherty & A. R. Sherwood. 2014. *Hydropuntia perplexa* comb. nov. (Gracilariaceae, Rhodophyta), the first record of the genus in Hawai'i. *Pacific Science* 68: 421-434. DOI: 10.2984/68.3.9

Darriba. D, G. L. Taboada, R. Doallo & D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9 (8): 772. DOI: 10.1038/nmeth.2109

Destombe, C., M. Valero & M. L. Guillemin. 2010. Delineation of two sibling red algal species, *Gracilaria gracilis* and *Gracilaria dura* (Gracilariales, Rhodophyta), using multiple DNA markers: resurrection of the species *G. dura* previously described in the northern Atlantic 200 years ago. *Journal of Phycology* 46: 720-727. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2010.00846.x

Dreckmann, K. M. & A. Sentíes. 2013. Las arribazones de algas marinas en el Caribe mexicano, evento biológico natural o basura en las playas. *Biodiversitas* 107: 7-11. ISSN: 1870-1760.

Faye, E. J., S. Shimada, K. Kogame & M. Masuda. 2004. A new red algal species *Meristotheca dakarensis* (Solieriaceae, Gigartinales) from

Senegal, western Africa, with comments on the relegation of *Meristiella* Cheny to synonymy with *Meristotheca* J. Agardh. *Cryptogamie, Algologie* 25: 241-259.

Faye, E. J., S. Shimada, S. Kawaguchi & M. Masuda. 2005. Characterization of the edible red alga *Meristotheca papulosa* (Solieriaceae, Gigartinales) from Japan. *Phycological Research* 53: 234-245. DOI: 10.1111/j.1440-183.2005.00391.x

Faye, E. J., K. Kogame, S. Shimada, S. Kawaguchi & M. Masuda. 2007. Taxonomic features of the red alga *Meristotheca coacta* (Solieriaceae, Gigartinales). *Phycological Research* 55**:** 150-158. DOI: 10.1111/j.1440-1835.2007.00458.x

Faye, E. J., K. Kogame, S. Shimada, S. Kawaguchi & M. Masuda. 2008. New red alga *Meristotheca imbricata* (Solieriaceae, Gigartinales) from Japan. *Phycological Research* 56: 115-126. DOI: 10.1111/j.1440-1835.2008.00492.x

Freile-Pelegrin, Y. & D. Robledo. 2006. Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Yucatán, Mexico. II. Seasonal variations in carrageenan and biochemical characteristics. *Botanica Marina* 49: 72-78. DOI: https://doi.org/10.1515/BOT.2006.009

Freile-Pelegrin, Y. & D. Robledo. 2008. Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophya) from Nicaragua. *Journal of Applied Phycology* 20: 537-541. DOI: 10.1007/s10811-007-9270-8

Freile-Pelegrin, Y., D. Robledo & J. A. Azamar. 2006. Carrageenan of *Eucheuma isiforme* (Solieriaceae, Rhodophyta) from Yucatán, Mexico. I. Effect of extraction conditions. *Botanica Marina* 49: 65-71. DOI: 10.1515/BOT.2006.008

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

Goff, L. J., D. A. Moon & A. W. Coleman. 1994. Molecular delineation of species and species relationships in the red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *Journal of Phycology* 30: 521-537. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1994.00521.x

Grant, W. A. S. & Bowen, B. W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity* 89: 415-426. DOI: 10.1093/jhered/89.5.415

Graur, D. & W. H. Li. 2000. *Fundamentals of Molecular Evolution*. Second Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Mass. 481 p. ISBN 10: 0878932666.

Guillemin, M. L., S. A. Akki, T. Givernaud, A. Mouradi, M. Valero & C. Destombe. 2008. Molecular characterization and development of rapid molecular methods to identify species of Gracilariaceae from the Atlantic coast of Morocco. *Aquatic Botany* 89: 324-330. DOI: 10.1016/j.aquabot.2008.03.008

Guillemin, M. L., M. Valero, S. Faugeron, W. Nelson & C. Destombe. 2014. Tracing the trans-Pacific evolutionary history of a domesticated seaweed (*Gracilaria chilensis*) with archaeological and genetic data. *PLoS ONE* 9 (12): e114039. DOI:10.1371/journal.pone.0114039

Guindon, S. & O. Gascuel. 2003. A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704. DOI: 10.1080/10635150390235520

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.

Hartl, D. L. & A. G. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3rd ed. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. Folio variado.

Hudson R. R., M. Slatkin & W. P. Maddison. 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132:583-589.

Huelsenbeck, J. P. & F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.

Librado, P. & J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452. DOI: 10.1093/bioinformatics/btp187

Maggs, C. A., S. E. Douglas, J. Fenety & C. J. Bird. 1992. A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *Journal of Phycology* 28: 214-232. DOI: 10.1111/j.0022-3646.1992.00214.x

Milne I., F. Wright, G. Rowe, D. Marshal, D. Husmeier & G. McGuire. 2004. TOPALi: Software for Automatic Identification of Recombinant Sequences within DNA Multiple Alignments. *Bioinformatics* 20 (11): 1806-1807. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth155

Muangmai, N., I. C. Fraser & G. C. Zuccarello. 2015. Contrasting patterns of population structure and demographic history in cryptic species of *Bostrychia intricata* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from New Zealand. *Journal of Phycology* 51: 574-585. DOI: 10.1111/jpy.12305

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

Núñez-Resendiz, M. L., G. C. Zuccarello, K. M. Dreckmann & A. Sentíes. 2016. Phylogeography of *Hydropuntia cornea*/*H. usneoides* complex (Gracilariales, Rhodophyta) in the Yucatan Peninsula. *Phycologia* 55: 522-531.

Núñez-Resendiz, M. L., K. M. Dreckmann & A. Sentíes. 2017. *Meristotheca cylindrica* sp. nov. (Solieriaceae, Rhodophyta) from the southern Gulf of Mexico. *Phycologia* 56 (4): 423-429. DOI: http://dx.doi.org/10.2216/16-116.1

Pareek, M., A. Mishra & B. Jha. 2010. Molecular phylogeny of *Gracilaria* species inferred from molecular markers belonging to three different genomes. *Journal of Phycology* 46: 1322-1328. DOI: 10.1111/j.1529-8817.2010.00903.x

Peakall, R. & P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x

Peakall, R. & P. E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460

Peakall, R., P. E. Smouse & D.R. Huff. 1995. Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of dioecious buffalograss *Buchloë dactyloides*. *Molecular Ecology* 4: 135-148. DOI:10.1111/j.1365-294X.1995.tb00203.x

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

Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312-1313. DOI: doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033

StatSoft Inc. 2007. STATISTICA (data analysis software system) version 8.0. www.statsoft.com

Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski & S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (12):2725-2729. DOI: 10.1093/molbev/mst197

Thompson, J. D., D. G. Higgins & T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Watt, N. J., A. Chiovitti, D. J. Craik & G. T. Kraft. 2003. The cell wall galactans from Australian representatives of the genus *Meristotheca* (Solieriaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 42: 572-581. DOI: 10.2216/i0031-8884-42-6-572.1

West-Eberhard, M. J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press. Oxford. 794 p. ISBN: 9780195122350.

Yang, E. C., M. S. Kim, P. J. Geraldino, D. Sahoo, J. A. Shin & S. M. Boo. 2008. Mitochondrial cox1 and plastid rbcL genes of *Gracilaria vermiculophylla* (Gracilariaceae, Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology* 20: 161-168. DOI: 10.1007/s10811-007-9201-8

Yang, E. C: & S. K. Myung. 2015. Molecular analyses for identification of the Gracilariaceae (Rhodophyta) from the Asia-Pacific region. *Genes & Genomics* 37: 775-787. DOI: 10.1007/s13258-015-0306-1

Yow, Y. Y., P. E. Lim & S. M. Phang. 2011. Genetic diversity of *Gracilaria changii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from west coast, Peninsular Malaysia based on mitochondrial cox1 gene analysis. *Journal of Applied Phycology* 23: 219-226. DOI: 10.1007/s10811-010-9535-5

Yow, Y. Y., P. E. Lim & S. M. Phang. 2013. Assessing the use of mitochondrial cox1 gene and cox2-3 spacer for genetic diversity study of Malaysian *Gracilaria changii* (Gracilariaceae, Rhodophyta) from Peninsular Malaysia. *Journal of Applied Phycology* 25: 831. DOI: 10.1007/s10811-012-9942-x

Zuccarello, G. C., G. Burger, J. A. West & R. J. King. 1999. A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443-1447. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1999.00710.Zuccarello, G. C:, N. Schidlo, L. Mcivor & M. D. Guiry. 2005. A molecular reexamination of speciation in the intertidal red alga *Mastocarpus stellatus* (Gigartinales, Rhodophyta) in Europe. *European Journal of Phycology* 40: 337-344. DOI: 10.1080/09670260500254743

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