

T
1170

ATA INSTITUTO VENEZOLANO DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124075

124075

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud



Casa abierta al tiempo

**Sistemática molecular del complejo *Laurencia* (Ceramiales,
Rhodophyta) en el Caribe mexicano**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PRESENTA

M. EN C. JHOANA DÍAZ LARREA

Director de Tesis:

DR. ABEL SENTÍES GRANADOS

Asesores:

DR. FRANCISCO F. PEDROCHE

DRA. ALEJANDRINA ÁVILA ORTIZ

México D.F.

Junio 2008

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

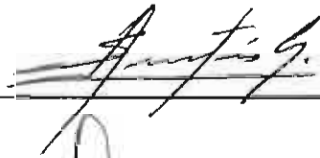
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presentó

Jhoana Díaz Larrea

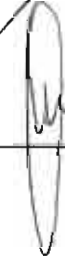
El día 25 de junio de 2008

Jurado:

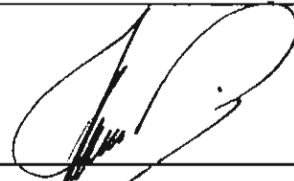
Dr. Abel Senties Granados (Presidente)



Dr. Arsenio Areces Mallea (Secretario)



Dr. Francisco Flores Pedroche (Vocal)



Dra. Alejandrina G. Ávila Ortiz (Vocal)



Dra. Mutue Toyota Fujii (Vocal)



A mis padres
A mis dos patrias: Cuba y México

CONTENIDO

Agradecimientos	I
Resumen	II
Abstract	III
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	7
3. MATERIAL Y MÉTODO	
3.1 Recolecta de muestras	9
3.2 Extracción y amplificación de ADN	13
3.3 Secuenciación	15
3.4 Divergencia nucleotídica	15
3.5 Evolución Molecular	15
3.6 Análisis filogenético	16
3.6.1 Análisis máxima parsimonia	16
3.6.2 Análisis máxima verosimilitud y bayesiano	17
3.6.3 Análisis particionados	18
4. RESULTADOS	
4.1 Características de los genes individuales de <i>Laurencia sensu lato</i>	19
4.1.1 Características del gen <i>rbcL</i>	19
4.1.2 Divergencia en las secuencias de <i>rbcL</i>	22
4.1.3 Características de la región RUBISCO espaciadora	23
4.1.4 Divergencia en las secuencias de RUBISCO espaciadora	26
4.1.5 Características del gen 18S	27
4.1.6 Divergencia en las secuencias de 18S	31
4.2 Evolución molecular	32
4.2.1 Saturación de los genes	32
4.2.2 Uso del codón	35
4.2.3 Estructura secundaria	39

4.3 Análisis Filogenético	43
4.3.1 Región <i>rbcL</i>	43
4.3.1.1 Análisis máxima parsimonia	43
4.3.1.2 Análisis máxima verosimilitud y bayesiano	49
4.3.2 Región RUBISCO espaciadora	52
4.3.2.1 Análisis máxima parsimonia	52
4.3.2.2 Análisis máxima verosimilitud y bayesiano	54
4.3.3 Región 18S	55
4.3.3.1 Análisis máxima parsimonia	55
4.3.3.2 Análisis máxima verosimilitud y bayesiano	58
4.4 Análisis Particionados	60
4.5 Análisis filogenético adicional	65
5. DISCUSIÓN	
5.1 Divergencia en las secuencias de <i>rbcL</i>	69
5.2 Análisis filogenético en <i>rbcL</i>	70
5.3 Divergencia en las secuencias de RUBISCO espaciadora	78
5.4 Análisis filogenético en RUBISCO espaciadora	79
5.5 Divergencia en las secuencias de 18S	81
5.6 Análisis filogenético en 18S	82
5.7 Evolución molecular	83
5.8 Análisis particionados	87
5.9 Análisis filogenético adicional	88
5.10 Implicaciones taxonómicas de la sistemática molecular	89
6. CONCLUSIONES	92
7. REFERENCIAS	95
8. APÉNDICES	113
9. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS	132

Agradecimientos

Este trabajo fue posible concluirlo con la ayuda de numerosas personas.

Entre estas, agradezco enormemente a los doctores que conformaron mi Comité Tutorial, por el apoyo incondicional y la asesoría brindada, y sobre todo por la PACIENCIA infinita que me tuvieron !!! En especial agradezco al Dr. Abel Senties y al Dr. Francisco Pedroche por la oportunidad brindada para poder encaminarme en este proyecto y culminarlo con éxito. **Me encantó la FILOGENIA !!**

Agradezco al Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la UAM-Iztapalapa y al CONACYT por el apoyo económico brindado.

Durante mi estancia en el laboratorio de Biología Molecular en la Universidad de Sao Paulo, Brasil recibí la ayuda de numerosas personas: Mariana Cabral de Oliveira, Daniela, Val, Lisia y la Dra Mutue... ..Gracias a todas....

Ale, Eren, Claudia, Abelito, Luis, Laura Márquez, Eren y Rober y kart gracias por su ayuda en el trabajo de laboratorio.

Quiero agradecer en especial a la Dra. Irene y al Dr. Javier por adentrarme en el camino de la filogenia y evolución molecular. Aprendí mucho de ustedes, gracias.

Mary, Violeta y Atenco gracias por su ayuda en los trámites administrativos.

A mis amigos, de aquí (México) y de allá (Cubita) gracias por brindarme su apoyo en los momentos más difíciles y enseñarme que en la vida tenemos que vencer los obstáculos: Anita, Suenza, Mireya, Yasmína, Alfredo, Castor, Castorcito, Dieguito, Roly, Vicente, Isa, Mercy, Betty, Ernestico.

Gracias burrito por todo el apoyo y la paciencia que me brindaste, GRACIAS.

A México le agradezco por abrirme sus puertas y a mi querida Cuba le debo TODO.

Finalmente quiero terminar agradeciendo a las personas que han sido la parte más importante en el logro de este proyecto..... *Mis padres y familia*, que aunque estando en Cuba, siempre sentí su apoyo incondicional, los amo.

Resumen

En el presente estudio se caracterizan molecularmente las especies del complejo *Laurencia* presentes en el Caribe mexicano, se brindan además las posibles relaciones filogenéticas a su interior y se emiten opiniones taxonómicas utilizando como fundamento esta información. Para lograr estos objetivos, material fresco de los distintos taxa fue recolectado en nueve localidades a lo largo de aproximadamente 500 kilómetros del litoral caribeño de la península de Yucatán. Un total de 41 muestras que incluyen a nueve de las especies previamente reportadas así como material que no pudo ser identificado adecuadamente fueron procesadas para la obtención de ADN. Los valores de divergencia genética en los tres genes permitieron segregar categorías taxonómicas a nivel específico. Los mayores valores de divergencia se obtuvieron para la región espaciadora y *rbcL*. El uso del codón en los taxa que conforman el grupo externo, *Laurencia*, *Palisada* y *Osmundea* fue similar, por tanto no permitió la segregación de dichos grupos. La comparación de las estructuras secundarias permitió la distinción de los clados pertenecientes a los géneros *Palisada* y *Laurencia*. Las hipótesis filogenéticas generadas a partir de secuencias parciales de los genes *rbcL* y RUBISCO del cloroplasto y 18S nuclear confirman que *Laurencia sensu lato* es monofilético y que en él se incluyen tres clados que corresponden a los géneros: *Laurencia sensu stricto*, *Palisada* y *Osmundea*, todos ellos también monofiléticos, lo que nos lleva a concluir que estas unidades son independientes y en términos taxonómicos no pueden corresponder a una agrupación de complejo. La combinación de dos ó más genes en los análisis filogenéticos respaldan con mayor fortaleza las relaciones postuladas. En los análisis realizados con 21 taxa comunes a los tres genes, las topologías más estables y mejor resueltas se obtuvieron con las secuencias de 18S. Los caracteres moleculares permitieron hacer modificaciones al esquema de clasificación de *Laurencia sensu lato* a nivel intragenérico. Se proponen dos nuevos registros para la zona de estudio: *Palisada perforata* y *Osmundea* sp. Se plantean dos combinaciones nuevas: *Palisada poiteaui* var. *gemmafera* (Harvey) Senties, Fujii et Díaz y *Palisada corallopsis* (Montagne) Senties, Fujii et Díaz. Así como la conespecificidad de *P. papillosa* y *P. perforata*. Los datos de divergencia genética sugieren la existencia de una posible especie nueva para la ciencia en el género *Laurencia*. De esta manera en el presente trabajo se reconocen como presentes en el Caribe mexicano cinco taxa de *Laurencia* (*L. caraibica*, *L. intricata*, *L. venusta*, *L. cf. filiformis* y *L. sp.*), uno de *Osmundea* (*O. sp.*) y cuatro de *Palisada* (*P. corallopsis*, *P. poiteaui* var *gemmafera*, *P. poiteaui* var *poiteaui* y *P. perforata*).

Abstract

In the current work the species from the *Laurencia* complex of the Mexican Caribbean were molecularly characterized. Furthermore, the work deals with phylogeny of *Laurencia* complex and taking into account these phylogenetic relationships, some taxonomic opinions were expressed. To carry out the already mentioned purposes, fresh samples were collected in nine localities through five-hundred kilometers around in the Caribbean coast of the Yucatán peninsula. A total of forty-one samples that includes nine species previously cited as well as the non-identified material were submitted to molecular treatment. The genetic divergence values obtained allow to split the taxonomic categories in specific levels. The highest genetic divergence values were obtained for RUBISCO spacer followed by *rbcL*. The codon usage for taxa included in grupo externo, *Laurencia*, *Palisada* and *Osmundea* was similar, because of this the mentioned method not allow the groups distinction. The secondary structure comparison allow the clades distinction that corresponding to *Palisada* and *Laurencia* genera. The phylogenetic hypothesis based on *rbcL*, RUBISCO spacer and 18S sequences comparisons corroborated that *Laurencia sensu lato* is monophyletic and includes three distinct monophyletic clades corresponding to the genera *Palisada*, *Laurencia sensu stricto* and *Osmundea*. Because of this the author conclude that the three genera are distinct units and they don't correspond to a complex assemblage. The combination of two or more genes in the phylogenetic analyses improve the support of the proposed phylogenetic hypothesis. The analyses with twenty-one coincident taxa to the three genes results in 18S better support and stable topologies. Molecular characters allow to improve the classification scheme of *Laurencia sensu lato* in intrageneric level. The following taxonomic proposals were made in the current work: two new records for the study zone, *Palisada perforata* and *Osmundea* sp; two new combinations, *Palisada poiteaui* var. *gemmifera* (Harvey) Senties, Fujii et Díaz and *Palisada corallopsis* (Montagne) Senties, Fujii et Díaz; the conspecificity of *P. papillosa* y *P. perforata*. The genetic divergence values suggests the existence of a possible new specie in *Laurencia* genus. In that sense, in the present work we recognize nine taxa for the Mexican Caribbean: five for the *Laurencia* genus (*L. caraibica*, *L. intricata*, *L. venusta*, *L. cf. filiformis* and *L. sp.*), one for *Osmundea* (*O. sp*) and four of *Palisada* genus (*P. corallopsis*, *P. poiteaui* var *gemmifera*, *P. poiteaui* var *poiteaui* and *P. perforata*).

1. INTRODUCCIÓN

La división Rhodophyta Wettstein cuenta con alrededor de 6000 especies repartidas en 700 géneros (Woelkerling, 1990). Esta división la constituyen especies predominantemente marinas, con excepción de algunos géneros de agua dulce que incluyen aproximadamente 200 especies (Sheath y Muller, 1999). El orden Ceramiales Oltmanns es considerado el más evolucionado de las algas rojas (Kraft, 1981; Bold y Wynne, 1985; Gabrielson y Garbary, 1987; Garbary y Gabrielson, 1990) y contiene casi la mitad de los géneros de algas rojas y una tercera parte de las especies de toda la división Rhodophyta (Kraft y Woelkerling, 1990). Conforman dicho orden cinco familias: Ceramiaceae Oltmanns, Dasyaceae Rosenberg, Delesseriaceae Nägeli, Rhodomelaceae Areschoug y Sarcomeniaceae Womersley (Garbary y Gabrielson, 1990; Womersley, 2003). Hommersand (1963) y Papenfuss (1966) propusieron que Ceramiaceae es la familia más primitiva del orden y a partir de éste se derivaron el resto de las familias del orden, siendo Rhodomelaceae la familia más evolucionada del orden. Dicha familia es la más diversa dentro de Rhodophyta e incluye un total de 909 especies (Guiry y Guiry, 2008). La conforman tres subfamilias: Bostrychioideae Hommersand, Polysiphonioideae Hommersand y Rhodomeloideae Hommersand. Esta última incluye trece tribus entre las que se encuentra: Laurencieae Schmitz, que incluye a su vez cinco géneros: *Erythrocytis* J. Agardh, *Janczewskia* Solms-Laubach, *Chondrophycus* (Tokida et Saito) Garbary et J. Harper, *Laurencia* J.V. Lamouroux y *Rodriguezella* Schmitz (Hommersand, 1963; Womersley, 2003).

Bajo este esquema taxonómico, *Laurencia* se concebía como una única categoría taxonómica hasta que Nam *et al.*, (1994) propone la segregación de un grupo de especies en el género *Osmundea* Stackhouse. Garbary y Harper (1998) comenzaron a utilizar el término de complejo en este grupo, entendiendo por complejo a un conjunto de taxa que no pueden ser separados como unidades independientes por presentar sobreposición en los caracteres, así actualmente el

complejo *Laurencia* lo integran cuatro géneros: *Laurencia sensu stricto* J.V. Lamouroux, *Osmundea* (Nam *et al.*, 1994), *Palisada* (Yamada) Nam (2006, 2007) y *Chondrophycus* (Tokida *et Saito*) Garbary *et J. Harper* (1998). Las diferencias básicas entre los géneros *Laurencia*, *Chondrophycus* y *Osmundea* son: el número de células pericentrales por cada segmento axial vegetativo, el origen y arreglo de los tetrasporángios, el origen y tipo de ramas espermatangiales (Nam *et al.*, 1994; Nam, 1999; Furnari *et al.*, 2001). Recientemente Nam (2006, 2007) elevó a *Palisada* un grupo de especies de *Chondrophycus* basándose en el número de células pericentrales que sustenta al procarpo, ubicación de la célula pericentral con respecto al origen del tricoblasto y la posición de la célula fértil con respecto al eje tetrasporangial. El género *Laurencia* se caracteriza por la presencia de cuatro células pericentrales por cada segmento axial vegetativo, ramas espermatangiales producidas a partir de tricoblastos, los cuales se originan a partir de células periaxiales ("tipo tricoblasto") y los tetrasporangios se producen a partir de determinadas células pericentrales (Nam, 1999; Garbary y Harper, 1998). El género *Osmundea* se caracteriza por la presencia de dos células pericentrales por cada segmento axial vegetativo, ramas espermatangiales producidas a partir de filamentos ramificados, los cuales se originan a partir de células corticales y axiales ("tipo filamento") y los tetrasporangios se originan aleatoriamente a partir de células corticales (Nam *et al.*, 1994). Finalmente, los caracteres que distinguen a *Palisada* son segmento que sustenta el procarpo con cuatro o cinco células pericentrales, primera célula pericentral ubicada por debajo del tricoblasto, eje tetrasporangial con la primera célula pericentral estéril y la segunda fértil (Nam, 2007). El género *Chondrophycus* se caracteriza por la presencia de dos células pericentrales por cada segmento axial vegetativo, ramas espermatangiales producidas a partir de tricoblastos, los cuales se originan a partir de células periaxiales ("tipo tricoblasto") y los tetrasporangios se producen a partir de determinadas células pericentrales (Nam, 1999; Garbary y Harper, 1998). A diferencia, en *Chondrophycus* la primera célula pericentral se ubica en posición lateral al tricoblasto, el segmento que sustenta el procarpo tiene 5 pericentrales y el eje tetrasporangial con dos células pericentrales estériles. Como podemos

constatar, los cuatro géneros comparten caracteres morfológicos y su separación como unidades independientes sería la hipótesis a probar. Para fines de este trabajo se abordará el término complejo *Laurencia* como sinónimo de *Laurencia sensu lato*.

Laurencia sensu lato posee aproximadamente 180 especies descritas (Guiry y Guiry, 2008), distribuidas en mares tropicales, subtropicales y templados (McDermid, 1988). Es un complejo de distribución cosmopolita, caracterizado por tener la célula apical localizada dentro de la depresión apical en las ramas, un eje central o axial reconocible sólo cerca de la célula apical y una corteza extensiva a lo largo del talo (Kylin, 1956).

El manejo de los caracteres morfológicos usados para la distinción de los géneros y especies del complejo *Laurencia*, no ha brindado una estabilidad robusta al sistema de clasificación, manteniéndose algunos taxa en un nivel de indeterminación específica, por tanto se aborda la sistemática molecular, que ha contribuido con propuestas para modificar y actualizar el sistema de clasificación de las algas rojas y principalmente en el Orden Ceramiales, aunado al análisis de las relaciones de parentesco.

El espectro de aplicaciones de la sistemática molecular ha sido posible estudiando diversos marcadores en las algas rojas (Hillis y Dixon, 1991). El genoma del cloroplasto está conformado por una molécula circular que contiene 155 844 pares de bases (Palmer *et al.*, 1988). Dicho genoma incluye genes que codifican para ARN ribosomal, proteínas ribosomales, subunidades de enzimas como la ARN polimerasa y proteínas que forman parte de los fotosistemas I y II en el proceso de la fotosíntesis. Dos de las regiones objeto de interés en el cloroplasto son: *rbcL*, que codifica para la subunidad larga de la enzima ribulosa 1,5-bifosfato-carboxylasa-oxigenasa y la región espaciadora de la RUBISCO (Figura 1). De la región *rbcL* se han reportado tamaños variables en grupos de algas rojas (Valentin y Zetsche, 1989; Kostrzema *et al.*, 1990), por ejemplo 1250 pb en *Osmundea*

(Nam *et al.*, 2000) y entre 1434 y 1467 pb en especies del género *Ceramium* (Cho *et al.*, 2003). En comparación con la región 18S, los datos generados de la región *rbcL* presentan una mayor tasa de cambios mutacionales (Bailey y Freshwater, 1997; Cho *et al.*, 2003). Aunque esta tasa elevada de cambios constituye una herramienta útil para resolver relaciones interespecíficas e intergenéricas (Freshwater *et al.*, 1995; Fredericq y Ramírez, 1996), puede conducir al colapso de las ramas y formación de politomías subsecuentes cuando se realizan estudios de las relaciones a niveles taxonómicos supraespecíficos (Felsenstein, 1978, Graybeal, 1998). Al ser una región que codifica para proteínas, se caracteriza además por la ausencia de eventos de inserciones-delecciones (Bailey y Freshwater, 1997).



Figura 1. Regiones codificadoras para la subunidad larga (*rbcL*) y subunidad corta (*rbcS*) de la enzima RUBISCO. Se muestra además la región RUBISCO espaciadora.

La región espaciadora de la RUBISCO se encuentra ubicada entre los genes *rbcL* y *rbcS* (Figura 1). Se han reportado tamaños variables para esta región en diferentes grupos de algas: 118 pb en el género *Campylaeophora* (Seo *et al.*, 2003), 64 pb en *Gracilaria*, 114 pb en *Gracilariopsis*, 77 pb en *Caloglossa*, 77 pb en *Porphyra* y 100 pb en *Antithamnion* (Lee *et al.*, 2001). Lee *et al.*, (2001) señalaron que esta región es más variable que la LSU ADNr y se caracteriza por presentar eventos de inserciones-delecciones.

Tenemos además otros marcadores en la región nuclear, como los genes que codifican para moléculas de ARN ribosomal (ARNr) y están ordenados en unidades de transcripción idénticas y repetidas muchas veces. Estas unidades están separadas por una secuencia de ADN espaciadora que no transcribe, denominada IGS (espaciador intergénico). Las unidades de transcripción de los

eucariontes están compuestas por genes que codifican para el ARN 18S (SSU ADN_r), 5.8S y 28S (LSU ADN_r), y entre estos genes están los espaciadores internos transcritos, denominados ITS (Figura 2) (Alberts *et al.*, 1994). La región 18S tiene una longitud de aproximadamente 1800 pares de base y está compuesta por un mosaico de regiones conservadas (universales), semi-conservadas y variables, las cuales hacen posible trabajar en diferentes niveles de resolución filogenético (Medlin *et al.*, 1988). El gen, además es experimentalmente accesible, ya que presenta regiones extremadamente conservadas en sus extremos, permitiendo la utilización de "primers" universales para la amplificación completa del gen mediante PCR, lo cual facilita el proceso de amplificación (Sogin *et al.*, 1986). Dicha región se caracteriza además por la presencia de eventos de inserciones-deleciones (Medlin *et al.*, 1988).

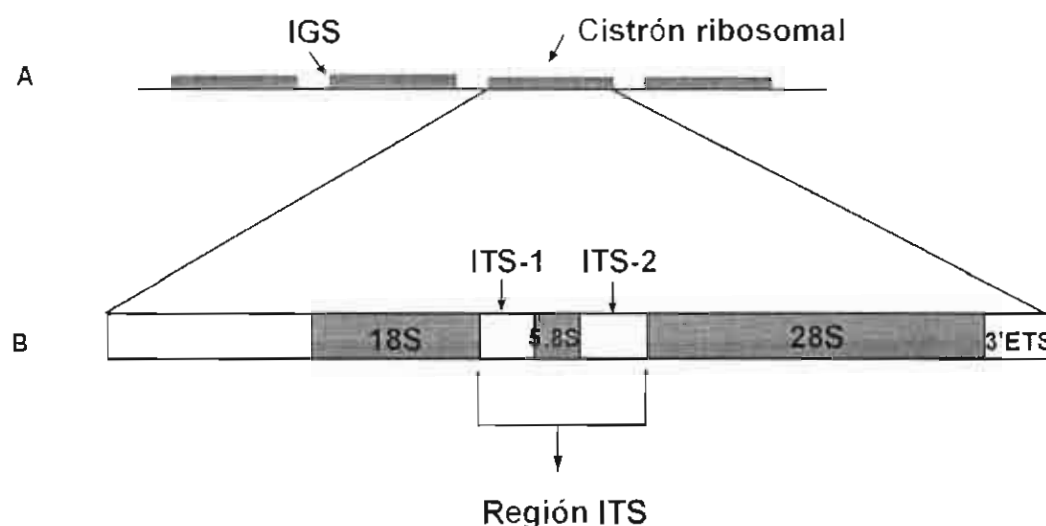


Figura 2. Diagrama que representa la organización del ADN ribosomal y de la región ITS de una célula eucariótica. A) Se muestran cuatro de los cientos de copias del cistron ribosomal separados entre sí por el espaciador intergénico (IGS). B) Se muestra un detalle del cistron ribosomal, con la localización y longitud relativa de los genes 18S, 5.8S, 28S y de los espaciadores externos (ETS) e internos (ITS) transcritos.

De los tres organelos donde se han ubicado marcadores moleculares para estudios de filogenia en la familia Rhodomelaceae: cloroplasto, núcleo y mitocondria, el que menos ha sido utilizado es la mitocondria, debido a que sus secuencias presentan una baja tasa de sustitución nucleotídica y por tanto es la

región más conservada (Palmer *et al.*, 1988). La tasa de sustitución nucleotídica en los genes del cloroplasto es de dos a tres veces menor que en los genes nucleares y de tres a cuatro veces mayor que en los genes mitocondriales de las plantas (Palmer *et al.*, 1988). Con el uso de la combinación de datos provenientes de diferentes regiones, se han obtenido hipótesis filogenéticas más robustas (Bailey y Freshwater, 1997).

La sistemática molecular agregada a estudios detallados de los caracteres morfológicos ha demostrado ser una de las herramientas imprescindibles para el análisis de las afinidades y relaciones filogenéticas entre grupos de organismos, y para resolver casos complicados de delimitación de especies, ofreciendo un amplio número de datos cuando la morfología es extremadamente simple o en aquellas donde se manifiesta una amplia variación fenotípica. Dentro de este contexto están siendo posibles grandes avances con la propuesta de nuevos géneros y especies (Nelson *et al.*, 2005, Milstein y Oliveira 2005, Mateo-Cid *et al.*, 2005).

2. ANTECEDENTES

A nivel mundial se han realizado trabajos en *Laurencia sensu lato* tanto en latitudes tropicales y subtropicales basados en caracteres morfológicos. Senties (2000), y Senties y Fujii (2002) citan alrededor de 60 publicaciones basadas en la taxonomía tradicional y que hacen alusión a modificaciones nomenclaturales, registros nuevos y la descripción de nuevas especies. En los últimos años si bien la tendencia se mantiene en los aspectos morfológicos se han generado consecuentemente trabajos encaminados a la filogenia del grupo (Garbary y Harper 1998 y Nam 2006, 2007).

En México se tiene un sólo estudio monográfico de tipo morfo-anatómico del complejo *Laurencia* para el Caribe mexicano (Senties y Fujii, 2002). En esta obra los autores refieren 20 binomios de este complejo registrados previamente para el Caribe mexicano, reconociendo 7 especies de *Laurencia* (*L. brongniartii* J. Agardh, *L. caraibica* P.C. Silva, *L. filiformis* J. Agardh, *L. intricata* J.V. Lamouroux, *L. microcladia* Kützing, *L. obtusa* (Hudson) J.V. Lamouroux y *L. venusta* Yamada) y 5 de *Chondrophycus* [*C. corallopsis* (Montagne) Nam, *C. flagelliferus* (J. Agardh) Nam, *C. gemmiferus* (Harvey) Garbary et Harper, *C. papillosus* (C. Agardh) Garbary et Harper y *C. poiteau* (Lamouroux) Nam]. De las 8 especies restantes, 3 de ellas fueron reducidas a sinónimos [*L. implicata* J. Agardh, *L. nana* M. Howe y *L. scoparia* J. Agardh] y las otras 5 se reconsideraron registros dudosos [*L. chondrioides* Børgesen, *L. corymbosa* J. Agardh, *L. flexilis* Setchell, *L. hancokii* E.Y. Dawson y *L. nidifica* J. Agardh].

A nivel mundial, los estudios de filogenia molecular han brindado, propuestas importantes de circunscripción genérica y específica, de filogeografía y de aspectos monográficos en *Laurencia sensu lato*, y han contribuido a esclarecer el sistema de clasificación (Nam *et al.*, 2000; McIlvor *et al.*, 2002b; Abe *et al.*, 2006; Fujii *et al.*, 2006). Cabe aclarar que ninguno de ellos se circunscribe a regiones tropicales estrictas.

Estudios con enfoque en filogenia molecular sobre *Laurencia sensu lato* se han realizado solamente dos en México e incluyen resultados parciales obtenidos en la presente tesis: Díaz-Larrea *et al.*, (2007) y Senties y Díaz-Larrea (2008). En el primero se propone la nueva combinación: *Chondrophyucus poiteaui* (J.V. Lamouroux) K.W. Nam var. *gemmifera* (Harvey) Senties, Fujii *et* Díaz. En el segundo trabajo, Senties y Díaz-Larrea (2008) proponen dos nuevas combinaciones a raíz de la validación del género *Palisada*: *Palisada poiteaui* (J.V. Lamouroux) K.W. Nam var. *gemmifera* (Harvey) Senties, Fujii *et* Díaz comb. *et* stat. nov. y *Palisada corallopsis* (Montagne) Senties, Fujii *et* Díaz comb. *et* stat. nov.

En este sentido, en el presente estudio se analizan las posibles especies del complejo *Laurencia* en el Caribe mexicano bajo la óptica de la sistemática molecular y, de esta forma poder confirmar las identificaciones de las especies presentadas por Senties y Fujii (2002), y contrastar el esquema de clasificación con un mayor número de caracteres, proponiendo hipótesis filogenéticas en las especies del complejo. Por tanto, se pretende alcanzar los siguientes objetivos:

Objetivo General:

Detectar, describir y explicar la diversidad biológica molecular entre las especies del complejo *Laurencia* en el Caribe mexicano.

Objetivos Específicos:

- Obtener la secuencia de la región *rbcL* del ADN del cloroplasto en este grupo.
- Obtener la secuencia de la región RUBISCO espaciadora del ADN del cloroplasto.
- Obtener la secuencia del gen 18S de ADN nuclear.
- Comparar la información obtenida en las diferentes regiones y de ser posible generar una hipótesis filogenética.

3. MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Recolecta de muestras.

Los ejemplares para este estudio se recolectaron manualmente en las zonas intermareal y/o submareal. Fragmentos libres de elementos extraños (epífitas) de estas muestras se colocaron en bolsas de plástico con sílica gel y en viales de plástico de 2 ml de capacidad inmersas en CTAB (2%). La sílica gel fue sustituida en cuanto los cristales indicadores se tornaron rosados, realizando esta operación hasta lograr la completa deshidratación de las secciones del talo.

Las muestras se recolectaron en 9 localidades del Caribe mexicano (paralelos 18° 11' - 21° 54' L.N. y meridianos 86° 15' - 87° 54' L.W.), registrados anteriormente por Senties y Fujii (2002). Se incluyó además en el estudio, material y secuencias de localidades de regiones tropicales y subtropicales del Atlántico, Pacífico e Índico: Cuba (1), Jamaica (1), Brasil (5), USA (7), España (4), Sudáfrica (1), Irlanda (2), Francia (1), Nueva Zelanda (1), Australia (1), Filipinas (1), Taiwán (1) y Corea del Sur (1). Se incluyeron especies de otras regiones para comparar a nivel molecular sus secuencias nucleotídicas con las de la zona de interés, y por ser además especies cercanas a las presentes en el Caribe mexicano. Los ejemplares utilizados en el análisis molecular se muestran en el Apéndice 1, para las regiones *rbcL*, RUBISCO espaciadora y 18S respectivamente incluyendo el número de acceso al GenBank (NCBI, 2003). En este sentido, se debe comentar que algunos ejemplares que no correspondían con las descripciones de los epítetos reconocidos fueron enumerados: en el caso de *Laurencia* de *L. sp.1* a *L. sp. 6*, para *Osmundea*: *O. sp.* y en el caso de *Palisada*: *P. sp.* (Apéndice 1). El material examinado fue depositado en la colección de algas del Herbario Metropolitano - UAMIZ y fue referido con su correspondiente número de herbario (Apéndice 1) e ilustrado en las láminas I - III.

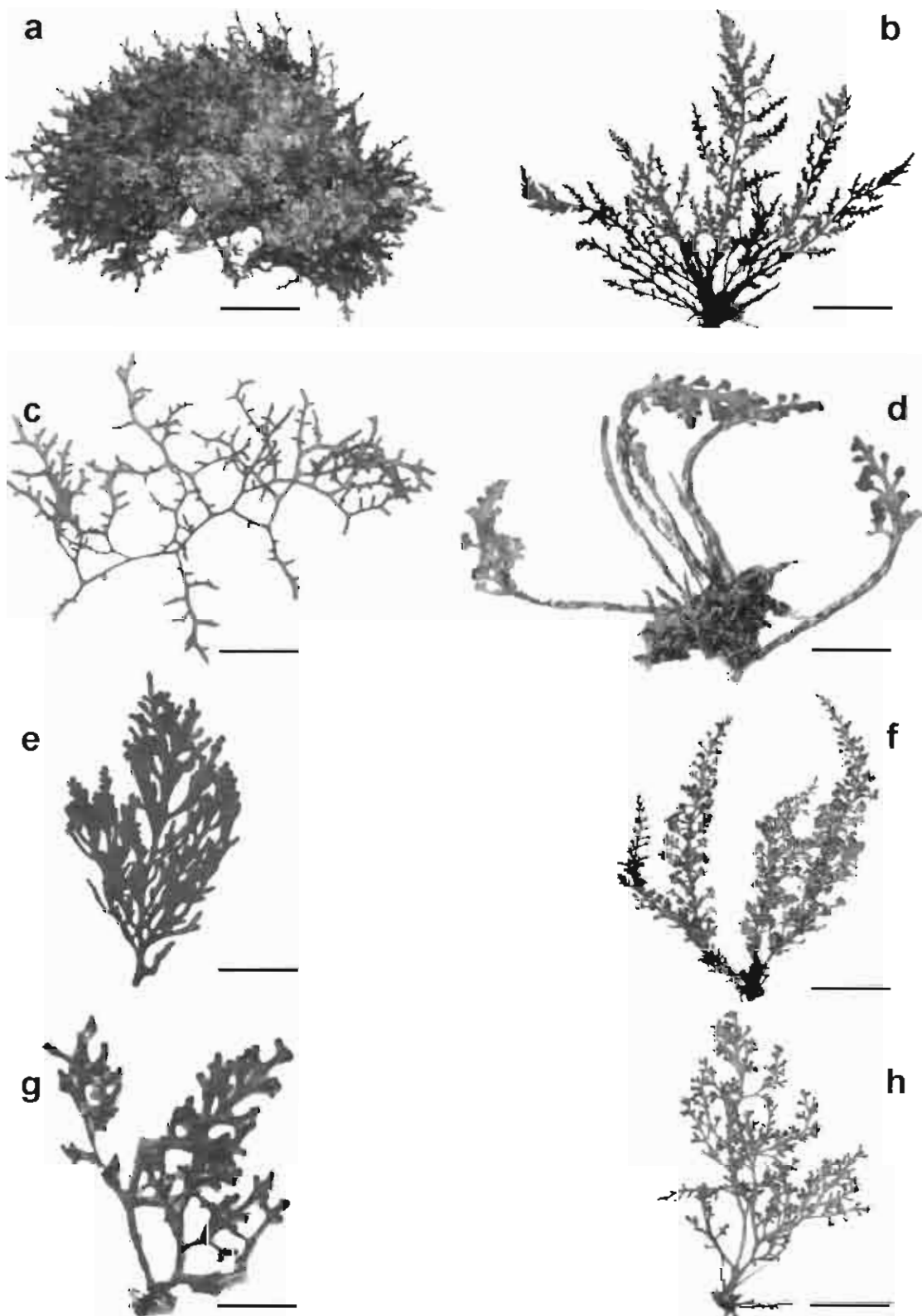


Lámina I: Hábitos de ejemplares estudiados. Barra=1cm. (a) *Laurencia caribica*, (b) *L. filiformis*, (c) *L. intricata*, (d) *L. viridis*, (e) *L. sp. 4*, (f) *L. venusta*, (g) *L. sp. 2a*, (h) *L. sp. 1*.

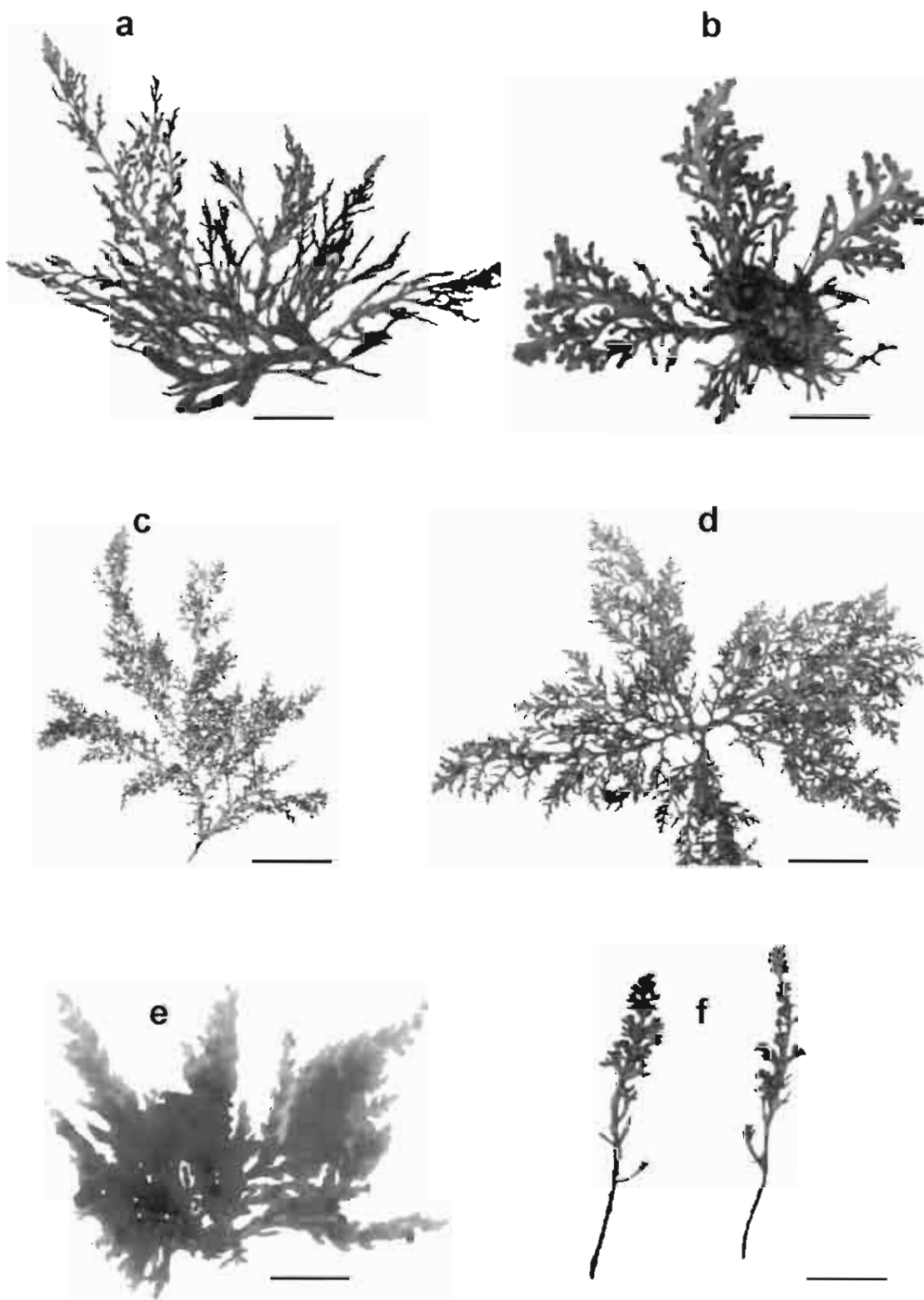


Lámina II: Hábitos de ejemplares estudiados. Barra=1cm. (a) *Laurencia* sp. 3, (b) *L. sp. 6*, (c) *L. obtusa* 1, (d) *L. obtusa* 2, (e) *L. marilzae*, (f) *L. sp. 5*.

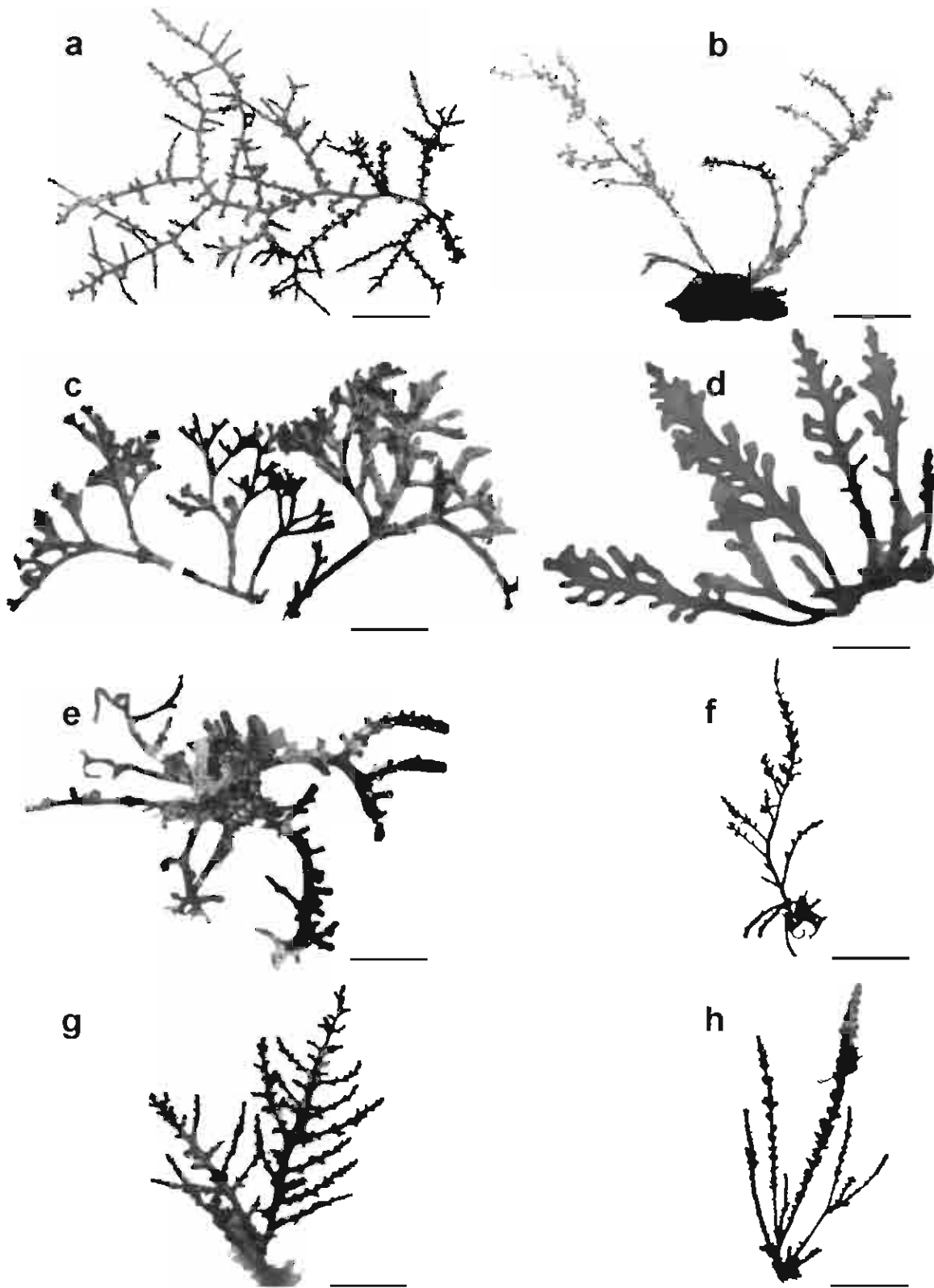


Lámina III: Hábitos de ejemplares estudiados. Barra=1cm. (a) *Palisada gemmifera*, (b) *P. poiteau*, (c) *P. corallopsis*, (d) *Osmundea pinnatifida*, (e) *P. perforata*, (f) *P. sp.* (g) *O. sp.* (h) *P. papillosa*.

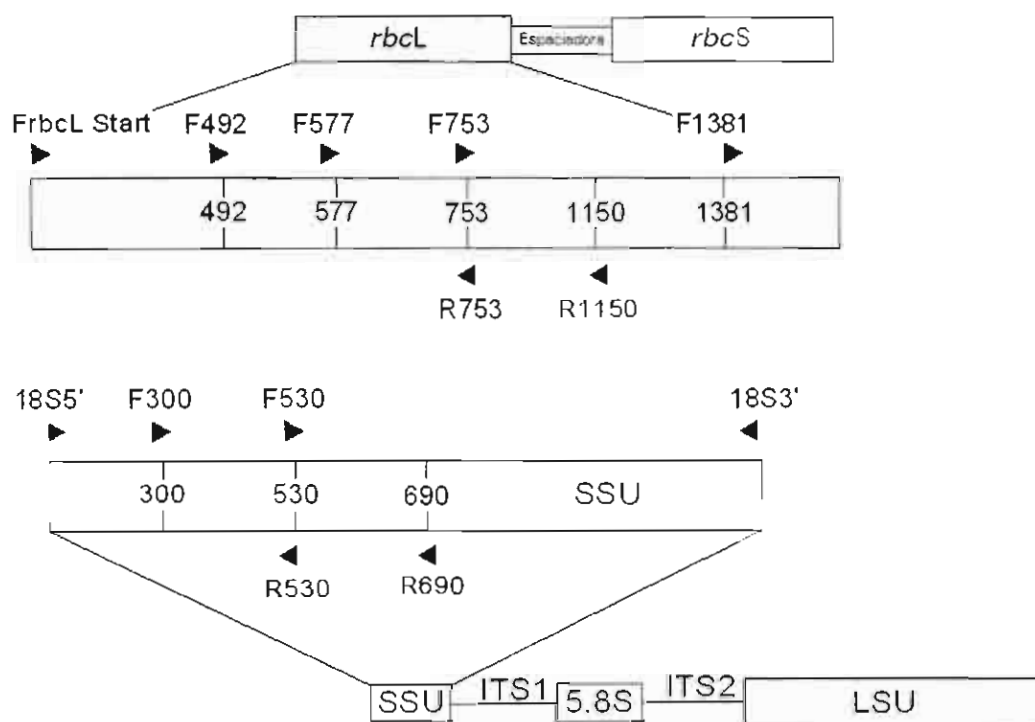
3.2 Extracción y amplificación de ADN.

El ADN genómico total de los tres genes se extrajo utilizando el Dneasy Plant Mini Kit (Quiagen, Valencia, California, USA), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Con la premezcla de Bioneer (Daedeok-Gu, Daejeon, Korea) Premix se amplificaron las regiones seleccionadas. Los productos de PCR se purificaron con el Kit de purificación QIAquick de Qiagen de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los primers utilizados para la amplificación se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1. Primers utilizados para la amplificación y secuenciación de los genes *rbcL*, RUBISCO espaciadora y 18S.

Primer	Gen	Secuencia de los Primers
Frbcl Start	<i>rbcL</i>	5'-ATG TCT AAC TCT GTA GAA G-3'
F - 492	<i>rbcL</i>	5'-CGT ATG GAT AAA TTT GGT CG-3'
F - 577	<i>rbcL</i>	5'-GTA TAT GAA GGT CTA AAA GGT GG-3'
F - 753	<i>rbcL</i>	5'-GGA AGA TAT GTA TGA AAG AGC-3'
R - 753	<i>rbcL</i>	5'-GCT CTT TCA TAC ATA TCT TCC-3'
R - 1150	<i>rbcL</i>	5'-GCA TTT GTC CGC AGT GAA TAC C-3'
F - 1381	espaciadora	5'-TCG AAA GGT AGC TAG ATT TCG-3'
R - rbcS Start	espaciadora	5'-GTT CTT TGT GTT AAT CTC AC-3'
18 - S5'	18S	5'-CAA CCT GGT TGA TCC TGC CAG T-3'
F - 300	18S	5'-CCG GAG AGG GAG CCT GAG-3'
F - 530	18S	5'-GAG GGC AAG TCT GGT G-3'
18 - S3'	18S	5'-GAT CCT TCT GCA GGT TCA CCT ACG-3'
R - 536	18S	5'-GAA TTA CCG CGG CTG CTG-3'
R - 690	18S	5'-AGA ATT TCA CCT CTG-3'

Tabla 1.-(continuación)



Las condiciones de amplificación utilizadas para las regiones *rbcL* y RUBISCO espaciadora fueron: 4 minutos a 96°C para el paso inicial de separación de cadenas del ADN, 35 ciclos consistentes de 60s a 94°C para la desnaturalización, 60s a 42°C para la alineación y 90s a 72°C para la extensión, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Para la región 18S las condiciones de amplificación fueron: 4 minutos a 94°C para el paso inicial de separación de cadenas del ADN, 35 ciclos consistentes de 30s a 94°C para la desnaturalización, 60s a 55°C para la alineación y 120s a 72°C para la extensión, con una extensión final de 7 minutos a 72°C. Las reacciones se mantuvieron a 4°C al concluir las amplificaciones. Los productos de extracción, amplificación y purificación fueron visualizados y cuantificados en un gel de agarosa al 1%. Cabe mencionar que determinadas muestras de las regiones *rbcL* y 18S requirieron el uso de gradientes de temperatura en el proceso de PCR.

3.3 Secuenciación.

La amplificación se llevó a cabo con el BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Applied BiosystemTM). Los primers usados para la secuenciación fueron los mismos que se utilizaron para la amplificación (Tabla 1). Posteriormente se purificaron los productos de amplificación con las columnas Centrisep (Applied BiosystemTM), estos productos purificados fueron desecados en una centrifuga de vacío y posteriormente resuspendidos en formamida. Finalmente las muestras fueron centrifugadas y cargadas en un Secuenciador "ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems, NJ, USA) para obtener las secuencias nucleotídicas. Finalizado este proceso, las lecturas (electroferogramas) se transfirieron a un archivo de computadora y con la ayuda del paquete de cómputo Sequencer Navigator (Applied BiosystemsTM) versión 1.0.1 se limpiaron y corrigieron las dos direcciones generadas. La alineación de las secuencias se realizó con el mismo paquete de cómputo empleando el algoritmo CLUSTAL (Thompson *et al.*, 1994) y a simple vista.

3.4 Divergencia nucleotídica.

Se calcularon los intervalos de valores de divergencia nucleotídica en los niveles interespecíficos e intergenéricos para las 3 regiones utilizando distancia no corregidas "p" con el programa PAUP (Apéndice 2, 3 y 4). Se calculó además la divergencia corregida entre las secuencias de los taxa utilizando el parámetro de distancia Kimura - 2 (Kimura, 1980).

3.5 Evolución Molecular.

Para cada gen estudiado se estimó la tasa relativa de cambio de bases incluyendo las transiciones (ti) y transversiones (tv) y la composición nucleotídica mediante el programa de PAUP versión 4.0 para MacIntosh (Swofford, 2001). Para evaluar la posibilidad de que las transversiones y/o transiciones estén saturadas, se construyeron gráficos (divergencia corregida entre las secuencias vs divergencia no corregida entre las secuencias, para estos dos tipos de sustituciones) y se estimó la tasa ti/tv para cada gen.

En el caso de la matriz de *rbcL* se calculó mediante el programa DnaSP (Rozas *et al.*, 2003) el uso del codón para los taxa que conforman el grupo externo, los géneros *Laurencia*, *Palisada*, *Osmundea* y los taxa denominados *L. sp. 2a* - *L. marilzae* Gil-Rodríguez, Sentfies *et M.T. Fujii*. Se estimaron parámetros adicionales: Sch_i^2 escalado (Shields *et al.*, 1988), número efectivo de codones (Wright, 1990), índice de tendencia del codón (Morton, 1993), uso de codones sinónimos (RSCU) (Sharp *et al.*, 1986) y la frecuencia de los codones.

Se obtuvo la estructura secundaria promedio a partir de secuencias del gen 18S, basados en cuatro matrices de alineación que incluyeron a todos los taxa de *Palisada*, del grupo externo, *L. sp. 2a* y el resto de los taxa de *Laurencia*, a través del programa GenBee (Brodsky *et al.*, 1992, 1995). Las secuencias de 18S fueron comparadas además y alineadas a simple vista con la estructura secundaria obtenida.

3.6 Análisis filogenético.

Los análisis filogenéticos se realizaron utilizando los programas de cómputo: PAUP, Modeltest v 3.06 (Posada y Crandall, 1998) y MrBayes v.3.0 beta 4 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001) utilizando tres métodos para recuperar las posibles relaciones filogenéticas: máxima parsimonia (MP), máxima verosimilitud (MV) y análisis bayesiano (AB) respectivamente.

3.6.1 Análisis máxima parsimonia.

Los árboles de máxima parsimonia (MP) fueron contruidos con la opción de búsqueda heurística, utilizando la optimización ACCTRAN (Accelerated Character Transformation), caracteres sin ordenar y con igual peso y las inserciones -deleciones fueron tratados como datos ausentes y quinta base. Se obtuvieron además bajo el criterio de Fitch con igual peso para todas las sustituciones (Fitch, 1971) y excluyendo los caracteres no informativos. Se realizó una búsqueda heurística inicial para incrementar la verosimilitud del intercambio de ramas (swapping) dentro de las "islas" de árboles, conduciendo esto a la mejor solución

parsimoniosa (Maddison, 1991), consistente de 5000 adiciones de secuencias en forma aleatoria, se retuvieron 25 árboles en cada paso, se guardaron árboles mínimos (MULPARS) y el intercambio de ramas se realizó con la opción de Tree - Bisection - Reconnection (TBR), con la opción de MULTREES (guardar múltiples árboles). Los árboles más parsimoniosos encontrados en esta primera búsqueda heurística fueron utilizados como punto de partida para otras búsquedas utilizando las opciones de MULPARS, MULTREES y STEEPEST DESCENT hasta que el análisis se completó.

3.6.2 Análisis máxima verosimilitud y bayesiano.

El programa Modeltest fue utilizado para encontrar el modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos que más se ajustó a los datos en el análisis de ML, tratando a las inserciones - deleciones como datos ausentes. El modelo fue seleccionado utilizando dos criterios: La prueba de la razón de verosimilitud (LRT) y el criterio de información de Akaike como está implementado en el programa Modeltest con un nivel de significancia de 0.01. Cuando el modelo evolutivo fue encontrado se estimaron parámetros como: distribución gamma, proporción de sitios invariables y frecuencia y proporción de bases. En el caso de la matriz de proteínas se estimó el modelo de sustitución de aminoácidos con el programa ProtTest (Abascal *et al.*, 2005) además de los siguientes parámetros: distribución gamma, proporción de sitios invariables y frecuencia de los aminoácidos. Con los modelos evolutivos estimados se corrieron posteriormente análisis bayesianos para las tres regiones tratando también a las inserciones - deleciones como datos ausentes.

Para evaluar la información filogenética contenida en la matriz de caracteres de las tres regiones se utilizó el índice $-g_1$ (Huelsenbeck, 1991; Hillis y Huelsenbeck, 1992) a través de la evaluación de la asimetría de la curva de distribución de longitudes de los 100,000 árboles generados al azar en PAUP.

Se evaluó la estabilidad de las ramas internas en los cladogramas mediante análisis de bootstrap (B), jackknife (J) e índice de decaimiento (ID) (Felsenstein, 1985; Felsenstein y Kishino, 1993; Farris *et al.*, 1996; Eriksson, 1999) implementados en PAUP. Se realizaron 1000 réplicas en los análisis de MP y ML. Los valores obtenidos en los análisis anteriores son una medida conservativa de la probabilidad de que los grupos recuperados representan clados verdaderos (Zharkikh y Li, 1992; Hillis y Bull, 1993; Li, 1997). En el software PAUP se calcularon además los índices de consistencia (CI) y homoplasia (HI) como resultado del análisis de MP. Los árboles fueron enraizados por comparación con el grupo externo con secuencias de 8 taxa en *rbcL*, 3 taxa en RUBISCO espaciadora y 9 taxa en 18S. Los grupos externos fueron seleccionados teniendo en cuenta dos criterios: relaciones filogenéticas cercanas con el grupo interno (Garbary y Gabrielson, 1990; Nam *et al.*, 2000, McIvor *et al.*, 2002b, Fujii *et al.*, 2006 y Abe *et al.*, 2006) y la disponibilidad de secuencias en la base de datos del GenBank.

3.6.3 Análisis particionados.

Se realizaron además análisis particionados con el método de máxima parsimonia y la opción de búsqueda heurística (1000 réplicas), utilizando diferentes combinaciones de las matrices de datos de las regiones estudiadas: *rbcL*, RUBISCO espaciadora y 18S. Las matrices de datos combinados fueron evaluadas utilizando la prueba ILD (incongruence length difference) (Farris *et al.*, 1994), implementado en PAUP como la prueba de partición homogénea. La prueba ILD evalúa la diferencia entre el número de pasos requeridos para el análisis individual y el combinado. Cuando el valor de $p > 0.05$ indica la pérdida de incongruencia en los datos y por tanto las matrices evaluadas pueden ser combinadas. Se utilizaron las opciones de inserciones - deleciones tratados como datos ausentes y los caracteres sin asignarle peso, ni orden. Los grupos externos variaron según las matrices analizadas.

4. RESULTADOS

4.1 Características de los genes individuales de *Laurencia sensu lato*.

4.1.1 Características del gen *rbcL*.

En esta región se amplificaron 1467 pares de bases para el 60% de las secuencias procesadas en el presente estudio. El restante 30% de las secuencias presentó datos ausentes al principio y al final de la matriz de alineación. La matriz de datos comprendió un total de 1467 caracteres, de los cuales 487 sitios fueron variables informativos para parsimonia, y del total de sitios informativos para la parsimonia: 80 (16.42%) correspondieron a la primera posición del codón, 22 (4.51%) a la segunda posición y 385 (79.05%) a la tercera posición. Una vez convertida la matriz a datos de aminoácidos, incluyó solamente 55 sitios informativos para la parsimonia (Tabla 2).

Tabla 2. Número de nucleótidos y composición de bases para el gen *rbcL*. Resultados de Análisis de Parsimonia y Test g_1 .

Gen	Pares de Bases	Composición de Bases				% ti	% tv	Proporción ti/tv
		% A	% C	% G	% T			
Todas posiciones	1467	31.986	16.149	21.102	30.762	64.49	35.51	2.14
1 ^{ra} posición codón	489	26.994	15.586	37.870	19.550	77.04	22.96	3.97
2 ^{da} posición codón	489	30.149	23.769	16.651	29.432	57.02	42.98	1.873
3 ^{ra} posición codón	489	38.813	9.093	8.796	43.298	63.05	36.95	2.07

Gen	Sitios Variables Informativos Parsimonia	Estadístico g_1	Media $\pm$ DS	IC	IH	No Árboles + Pars.	IC (Excluidos Caracteres No Inf.)	IH (Excluidos Caracteres No Inf.)
Todas posiciones	487	-1.036341	0.03364811 $\pm$ 0.00871904	0.73	0.27	1440	0.69	0.31
1 ^{ra} posición codón	80	-0.562978	-0.03361234 $\pm$ 0.00881903	0.65	0.35	27400	0.56	0.44
2 ^{da} posición codón	22	-0.406102	-0.41363813 $\pm$ 0.10625804	0.60	0.40	27300	0.38	0.62
3 ^{ra} posición codón	385	-0.780553	-0.14467713 $\pm$ 0.00772604	0.68	0.32	3456	0.66	0.34
Aminoácidos	55	-0.500978	-0.23564725 $\pm$ 0.00971514	0.63	0.37	26000	0.48	0.52
1+3 posiciones del codón	464	-0.903158	-0.33364812 $\pm$ 0.00871904	0.71	0.29	504	0.68	0.32

Se realizó además una división artificial del gen, con fines exploratorios, en una primera mitad del gen (732 pares de bases) y en una segunda parte del gen (735 pares de bases). La primera mitad del gen comprendió 150 caracteres informativos para la parsimonia y la segunda mitad del gen incluyó 270 caracteres informativos para la parsimonia.

Las transiciones (ti) representaron el 64.49% de todas las sustituciones (Tabla 2). Las transiciones CT superaron a las transiciones AG en una relación 2:1 (Figura 3) y las transversiones AC y AT superaron a CG y GT. La proporción ti/tv osciló de 0.873 a 3.97 (Tabla 2). La mayor tasa se registró en la primera posición del codón (3.97), seguido de la tercera posición con 2.07 y finalmente la segunda posición del codón con 1.873 (Figura 3).

<i>rbcL</i>	ti		tv			
	AG	CT	AC	AT	CG	GT
Todas posiciones	21	43.28	13.67	15.33	2.23	4.49
1 ^{ra} posición codón	33.9	40.86	7.4	12	1.06	4.78
2 ^{da} posición codón	7.98	49.25	4.89	27.57	6.76	3.55
3 ^{ra} posición codón	19	42	4.9	28.04	2.9	3.16

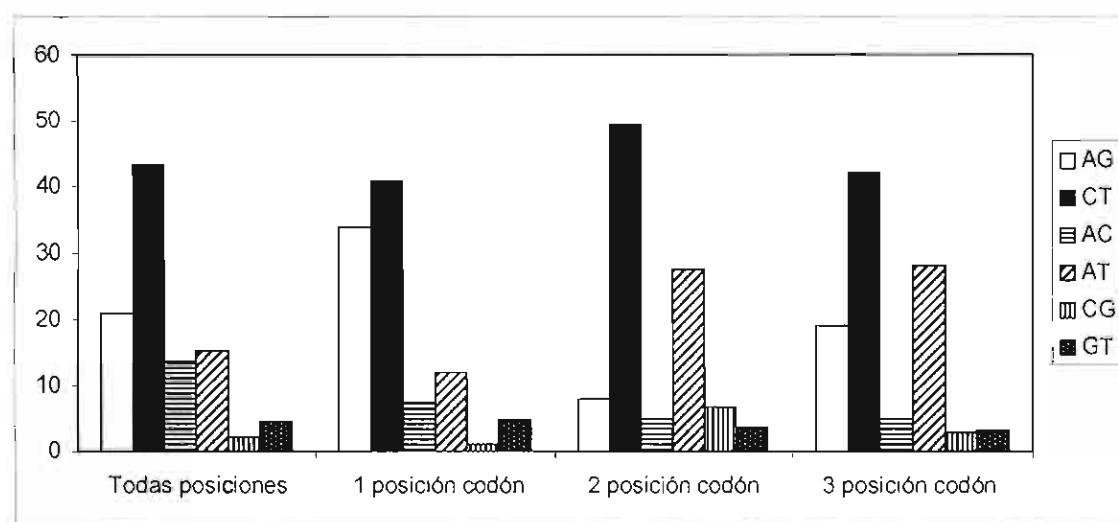


Figura 3. Tasa relativa de cambio de bases en *rbcL*. ti = Transiciones. tv = Transversiones.

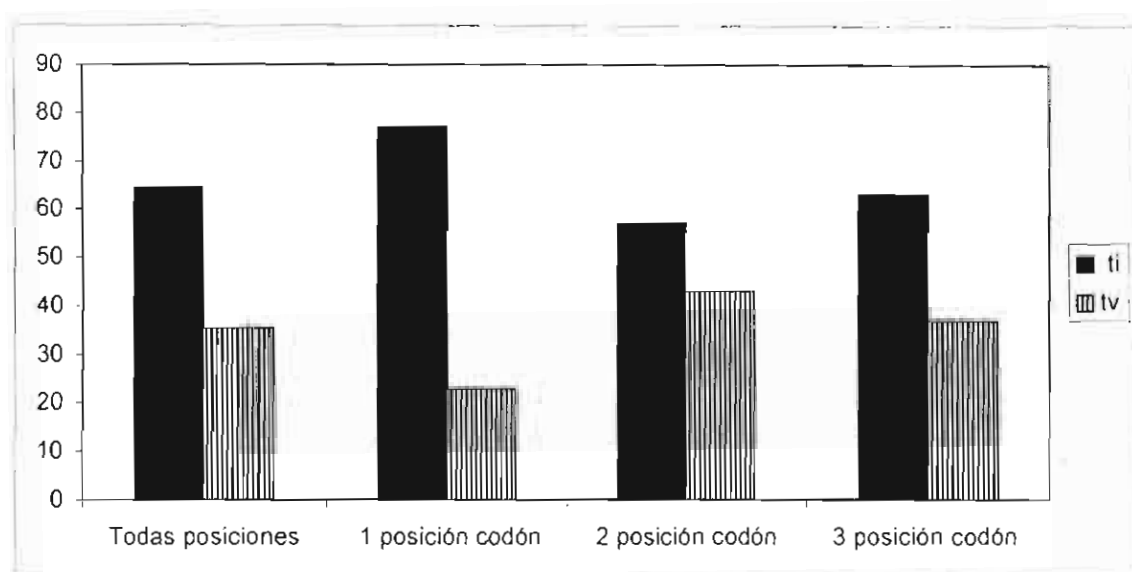


Figura 3 (continuación).

La primera posición del codón presentó valores elevados de guanina (37.87%) (Figura 4). La segunda posición reportó valores elevados de timina (29.432%) y adenina (30.14%). En la tercera posición del codón la adenina (38.81%) y la timina (43.29%) registraron valores elevados también.

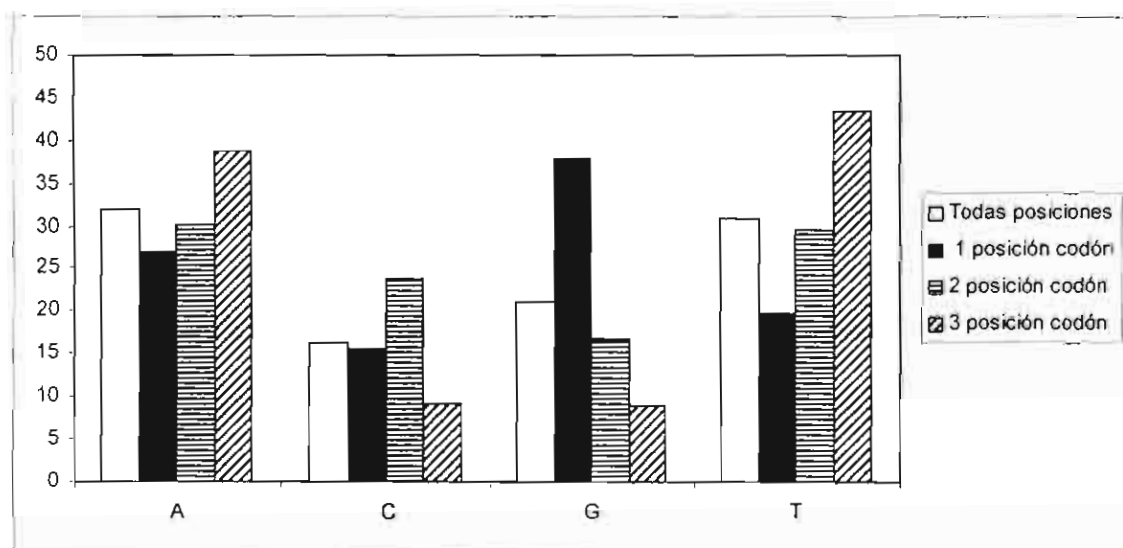


Figura 4. Composición nucleotídica del gen *rbcL*. A = Adenina. C = Citosina. G = Guanina. T = Timina.

El estadístico g_1 indicó que las matrices: a) del gen completo *rbcL* ($g_1 = -1.036341$), b) de la suma de la primera + tercera posiciones del codón ($g_1 = -0.903158$), c) de la tercera posición del codón ($g_1 = -0.780553$), d) de la primera posición del codón ($g_1 = -0.562978$) y e) de la conformada por los datos de aminoácidos ($g_1 = -0.500978$) presentaron señal filogenética significativa (Tabla 2). Por otro lado, la matriz conformada por la segunda posición del codón no presentó señal filogenética significativa: $g_1 = -0.406102$ (Tabla 2).

4.1.2 Divergencia en las secuencias de *rbcL*.

Un total de 65 secuencias fueron analizadas incluyendo los grupos externos *Bostrychia radicans* (Montagne) Montagne in Orbigny, *Bryocladia cuspidata* (J. Ag.) De Toni, *Centroceras clavulatum* (C. Agardh in Kunth) Montagne in Durieu de Maisonnneuve, *Ceramium brevizonatum* H.E. Petersen, *Chondria dasyphylla* (Woodwar) C. Agardh, *Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh, *G. mammillaris* (Montagne) M. A Howe y *Polysiphonia muelleriana* J. Agardh (Apéndice 1).

Los valores de divergencia intergenérica oscilaron de 7 a 11% entre *Palisada* (excepto *P. papillosa* (C. Agardh) K.W. Nam, *P. perforata* (Bory) K.W.Nam, *P. gemmifera* y *P. poiteau*) y *Laurencia* (excepto *L. sp. 2a*, *L. sp. 2b* y *L. marilzae*), de 10 a 13% entre *Palisada* y *Osmundea* y de 9 a 13% entre *Osmundea* y *Laurencia*. Los valores de divergencia interespecífica obtenidos para los taxa de *Laurencia* oscilaron de 5 a 9%, para *Palisada* oscilaron de 6 a 9%, mientras que para *Osmundea* oscilaron de 6 a 8%.

En el caso de los taxa: *P. gemmifera* y *P. poiteau*, los valores de divergencia nucleotídica observados entre sus secuencias fueron bajos (0.01 – 0.02%). En el caso de *P. perforata* y *P. papillosa*, los valores de divergencia nucleotídica observados entre sus secuencias oscilaron de 0 a 0.2% (excepto *P. papillosa* Todos Santos, Baja California, México). El taxón denominado como *P. sp.* difirió con valores que oscilaron entre 0.1 y 0.2% con respecto a las muestras de *P.*

papillosa y *P. perforata*. El taxón *P. papillosa* Baja California difirió en un 2% de las muestras de *P. papillosa* y *P. perforata*.

El taxón *Osmundea* sp. difirió en bajos niveles de variación genética del resto de las especies de *Osmundea* (0.02 – 0.03%), a su vez difirió en altos niveles de variación genética del resto de los taxa de *Laurencia* (18 – 20%) y *Palisada* (19 - 22%) (Apéndice 2).

Los taxa *L. sp. 2a* – *L. sp. 2b* difirieron de *L. marilzae* con valores de divergencia genética entre 1 y 2 %. A su vez, los mencionados taxa difirieron en altos niveles de variación genética del resto de los taxa de *Laurencia* (25 - 28 %), *Palisada* (26 - 28%) y *Osmundea* (34 – 38%) (Apéndice 2). Los porcentajes de divergencia obtenidos entre *L. sp. 2a* y *L. sp. 2b* oscilaron entre 0 y 0.4%, y entre las tres muestras analizadas de *L. marilzae* oscilaron entre 0 y 0.2%.

Los taxa: *L. filiformis*, *L. intricata*, *L. sp. 1* y *L. sp. 3* mostraron bajos niveles de variación genética (0 - 1%).

Los taxa denominados como: *L. arbuscula* Sonder, *L. cf. catarinensis* y *L. sp. 4* presentaron bajos niveles de variación genética, con valores que oscilaron de 0.2 a 0.9%. Lo mismo sucedió con los taxa *L. obtusa 1* y *L. obtusa 2* (0.8%) y con *Laurencia sp. 6* que difirió en 1% de *L. obtusa 1*-*L. obtusa 2*. *Laurencia arbuscula* difirió de *L. obtusa 1* - *L. obtusa 2* - *L. sp. 6* en valores que oscilaron entre 5 y 6%. *Laurencia sp. 5* difirió en un 5% de *L. viridis* y *L. obtusa* GB.

4.1.3 Características de la región RUBISCO espaciadora.

En esta región se amplificaron 132 pares de bases para el 70% de las secuencias procesadas en el presente estudio. El restante 30% de las secuencias presentó datos ausentes al principio y al final de la matriz de alineación. La matriz de datos comprendió un total de 132 caracteres, de los cuales 80 sitios fueron variables informativos para la parsimonia, tratando las inserciones - deleciones como quinta

base (Tabla 3), y con la opción de inserciones - deleciones tratados como datos ausentes, la matriz presentó 69 sitios variables informativos para la parsimonia. Las transiciones representaron el 51.90% de todas las sustituciones (Tabla 3). Las transiciones TC superaron a las transiciones AG en una relación 1.36:1 (Figura 5) y las transversiones AC y AT superaron a CG y GT. La proporción ti/tv fue de 1.25 (Tabla 3). Las secuencias presentaron elevados valores de adenina (42.97%) y timina (32.31%) (Figura 6).

Tabla 3. Número de nucleótidos y composición de bases para la región RUBISCO espaciadora. Resultados de Análisis de Parsimonia y Test g_1 .

Gen	Pares de Bases	Composición de Bases				% ti	% tv	Proporción ti/ tv
		% A	% C	% G	% T			
Todo gen	132	42.979	12.259	12.446	32.317	51.90	48.10	1.25

Gaps Datos Ausentes	Sitios Variables Informativos Parsimonia	Estadístico g_1	Media $\pm$ DS	IC	IH	No Árboles + Pars.	IC (Excluidos Caracteres No Inf.)	IH (Excluidos Caracteres No Inf.)
Todo gen	69	- 0.2387	- 0.0013273 $\pm$ 0.07863002	0.41	0.59	2378	0.36	0.64

Gaps Quinta Base	Sitios Variables Informativos Parsimonia	Estadístico g_1	Media $\pm$ DS	IC	IH	No Árboles + Pars.	IC (Excluidos Caracteres No Inf.)	IH (Excluidos Caracteres No Inf.)
Todo gen	80	- 0.1006	- 0.0244333 $\pm$ 0.00863002	0.4	0.6	1584	0.36	0.64

El estadístico g_1 calculado con la opción de inserciones - deleciones codificados como datos ausentes ($g_1 = - 0.2387$) y las inserciones - deleciones codificados como quinta base ($g_1 = - 0.1006$) indicó que los datos de RUBISCO espaciadora presentaron señal filogenética significativa: (Tabla 3).

	ti		tv			
RUBISCO espaciadora	AG	CT	AC	AT	CG	GT
Todo gen	25.51	34.81	11.86	23.9	2.7	1.22

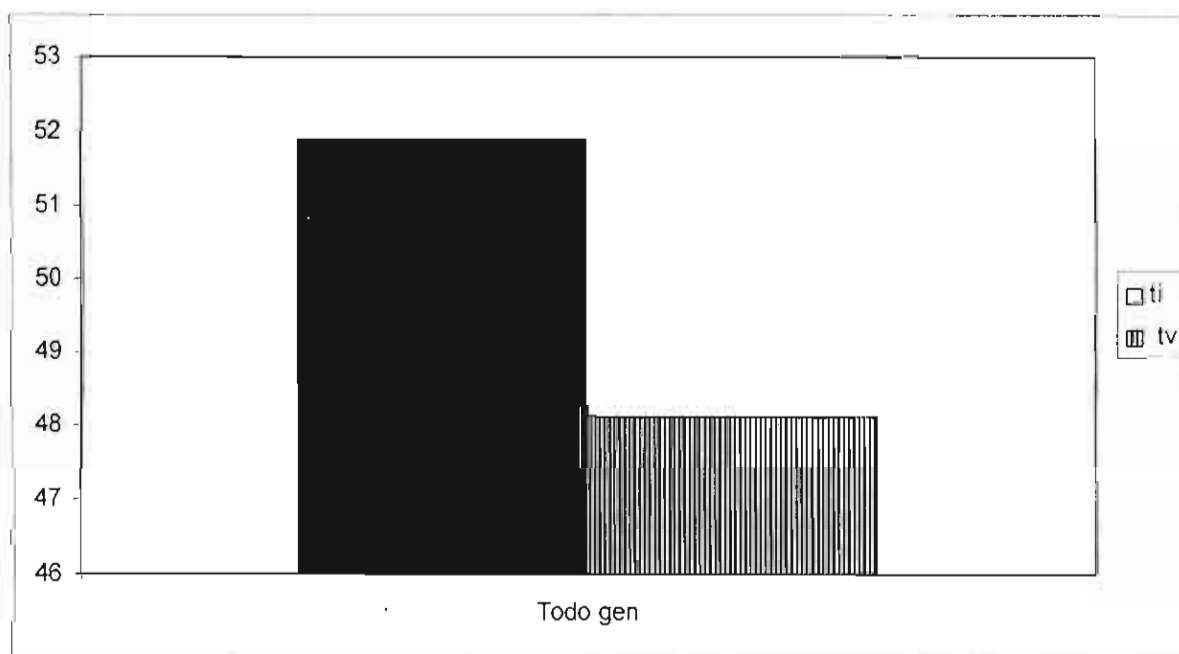
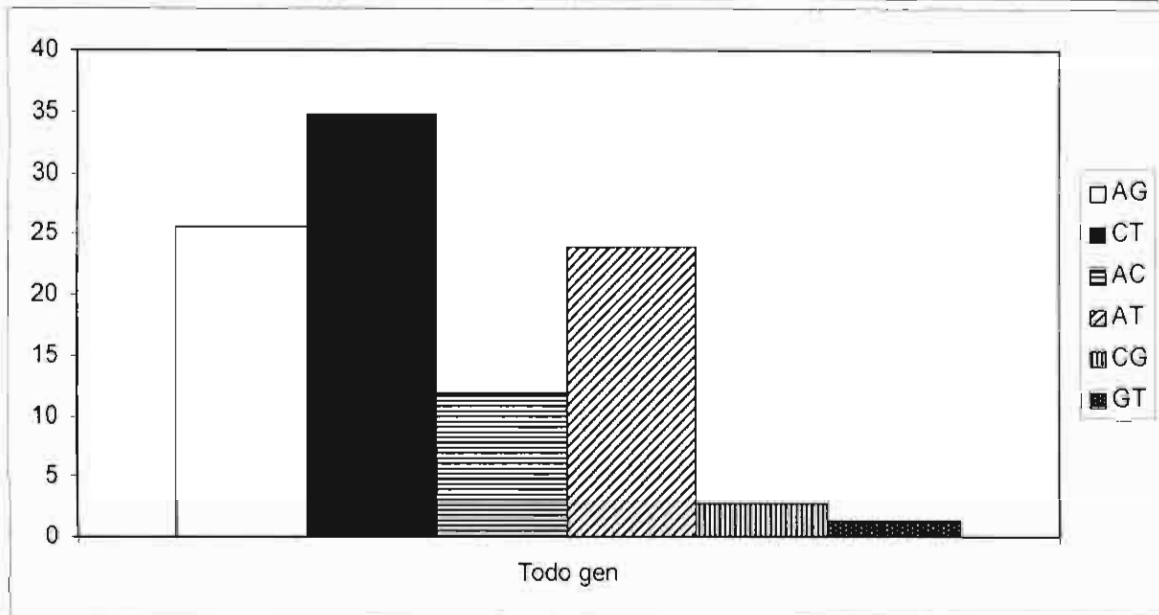


Figura 5. Tasa relativa de cambio de bases en RUBISCO espaciadora. ti = Transiciones. tv = Transversiones.

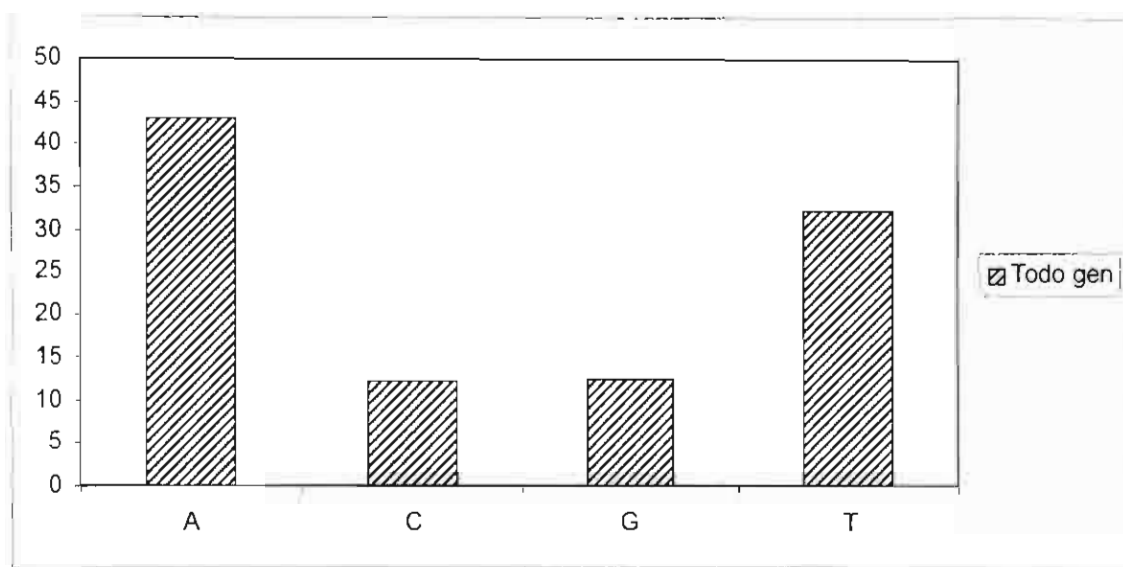


Figura 6. Composición nucleotídica del gen RUBISCO espaciadora. A = Adenina. C = Citosina. G = Guanina. T = Timina.

4.1.4 Divergencia en las secuencias de RUBISCO espaciadora.

Un total de 42 secuencias fueron analizadas incluyendo los grupos externos *Bostrychia calliptera* (Montagne) Montagne, *Gracilaria cervicornis* y *G. mammillaris* (Apéndice 1).

Los valores de divergencia intergenérica oscilaron de 12 a 28% entre *Palisada* (excepto *P. papillosa*, *P. perforata*, *P. gemmifera* y *P. poiteau*) y *Laurencia* (excepto *L. sp. 2a*, *L. sp. 2b* y *L. marilzae*), oscilaron de 16 a 19% entre *Palisada* y *Osmundea* y oscilaron de 20 a 39% entre *Osmundea* y *Laurencia*. Los valores de divergencia interespecífica obtenidos para las especies de *Laurencia* oscilaron de 2 a 16%, y para *Palisada* oscilaron de 2 a 6%.

En el caso de *P. gemmifera* y *P. poiteau*, los valores de divergencia nucleotídica observados entre sus secuencias fue de 0.01 a 0.03% y para el caso de *P. perforata* y *P. papillosa* de 0 a 17% (Apéndice 3).

Los taxa: *L. sp. 2a*, *L. sp. 2b* y *L. marilzae* mostraron niveles de variación genética que oscilaron de 3 a 5%. Los mencionados taxa difirieron en altos niveles de variación genética del resto de los taxa de *Laurencia* (12 – 27%), del resto de los taxa de *Palisada* (14 - 28%) y de la especie de *Osmundea* (19 - 21%) (Apéndice 3). Los taxa *L. sp. 2a* y *L. sp. 2b* difirieron en 1% y las tres muestras analizadas de *L. marilzae* difirieron en 0.7%.

Los taxa: *L. filiformis*, *L. intricata*, *L. sp. 1* y *L. sp. 3* presentaron niveles de variación genética que oscilaron de 0 a 11%. Los ejemplares denominados como *L. obtusa 1* y *L. obtusa 2* presentaron 0% de variación genética. *Laurencia sp. 6* difirió en un 13% de los taxa denominados como *L. obtusa 1* y *L. obtusa 2*.

El taxón *Osmundea sp.* difirió en valores del 36% con respecto a la especie de *Osmundea*, a su vez difirió en valores que oscilaron del 33 al 48% respecto a los taxa de *Laurencia* y difirió en 31 - 40% respecto a los taxa de *Palisada*.

4.1.5 Características del gen 18S.

En esta región se amplificaron 1797 pares de bases para el 80% de las secuencias procesadas en el presente estudio. El restante 20% de las secuencias presentó datos ausentes al principio y al final de la matriz de alineación. La matriz de datos utilizada comprendió un total de 1797 caracteres, de los cuales 337 sitios fueron variables informativos para la parsimonia, tratando las inserciones - deleciones como quinta base. Con la opción de inserciones - deleciones tratados como datos ausentes, se presentaron 331 sitios variables informativos para la parsimonia y del total de sitios informativos para la parsimonia 110 (32.64%) correspondieron a la zona de tallos y 231 (68.54%) a la zona de horquillas (Tabla 4). Las transiciones representaron el 55.93% de todas las sustituciones (Tabla 4). Las transiciones CT superaron a las transiciones AG en una relación 1.21:1 (Figura 7) y las transversiones AC y AT superaron a CG y GT. La proporción ti/tv osciló entre 1.68 y 1.99 (Tabla 4). La mayor tasa se registró en la zona de horquillas (1.99), seguido de la zona de tallos (1.75) (Figura 7).

Tabla 4. Número de nucleótidos y composición de bases para el gen 18S. Resultados de Análisis de Parsimonia y Test g_1 .

Gen	Pares de Bases	Composición de Bases				% ti	% tv	Proporción ti/ tv
		% A	% C	% G	% T			
Todo gen	1797	26.029	20.290	27.233	26.448	55.93	44.07	1.68
Tallos	671	22.068	27.754	28.720	21.458	56.49	43.51	1.75
Horquillas	1126	28.476	15.737	26.339	29.448	55.95	44.05	1.99

Gaps Datos Ausentes	Sitios Variables Informativos Parsimonia	Estadístico g_1	Media $\pm$ DS	IC	IH	No Árboles + Pars.	IC (Excluidos Caracteres No Inf.)	IH (Excluidos Caracteres No Inf.)
Todo gen	331	- 0.4032	- 0.1217271 $\pm$ 0.17863002	0.61	0.39	588	0.52	0.48
Tallos	108	- 0.3143	- 0.1511233 $\pm$ 0.07852033	0.55	0.45	29	0.44	0.56
Horquillas	227	- 0.3867	- 0.1712222 $\pm$ 0.08722002	0.58	0.42	48	0.49	0.51

Gaps Quinta Base	Sitios Variables Informativos Parsimonia	Estadístico g_1	Media $\pm$ DS	IC	IH	No Árboles + Pars.	IC (Excluidos Caracteres No Inf.)	IH (Excluidos Caracteres No Inf.)
Todo gen	337	- 0.3765	- 0.0217278 $\pm$ 0.14363099	0.53	0.47	271	0.44	0.56
Tallos	110	- 0.3020	- 0.0017376 $\pm$ 0.20000002	0.51	0.49	29	0.4	0.6
Horquillas	231	- 0.3861	- 0.1217253 $\pm$ 0.03863002	0.55	0.45	49	0.46	0.54

18S	ti		tv			
	AG	CT	AC	AT	CG	GT
Todo gen	25.99	31.59	15.07	21	2.33	4.02
Tallos	33.45	41.78	14.39	3.97	2.66	3.75
Horquillas	10.3	23.6	21.29	37.9	2.56	4.35

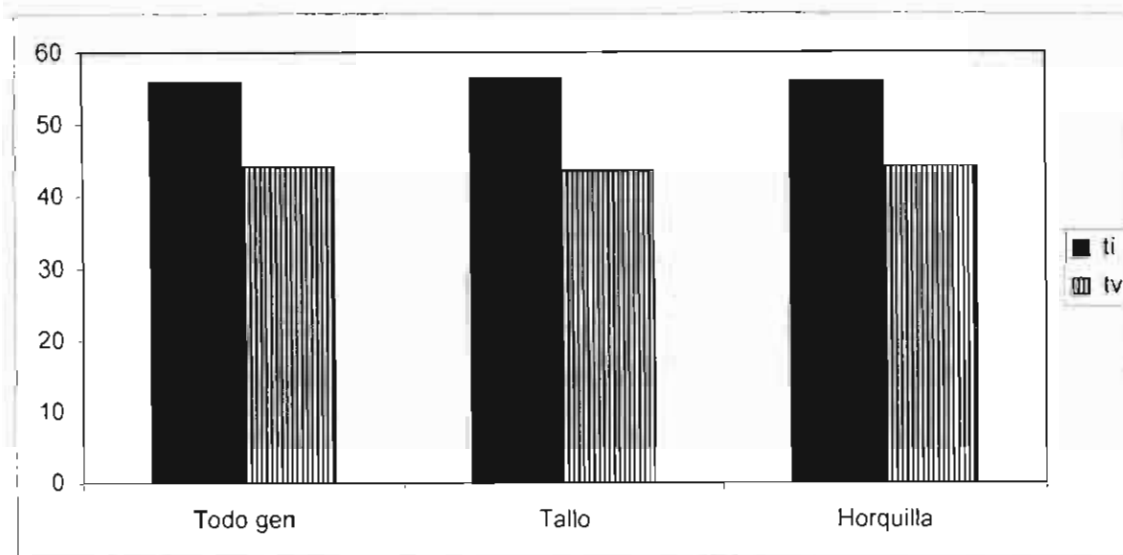
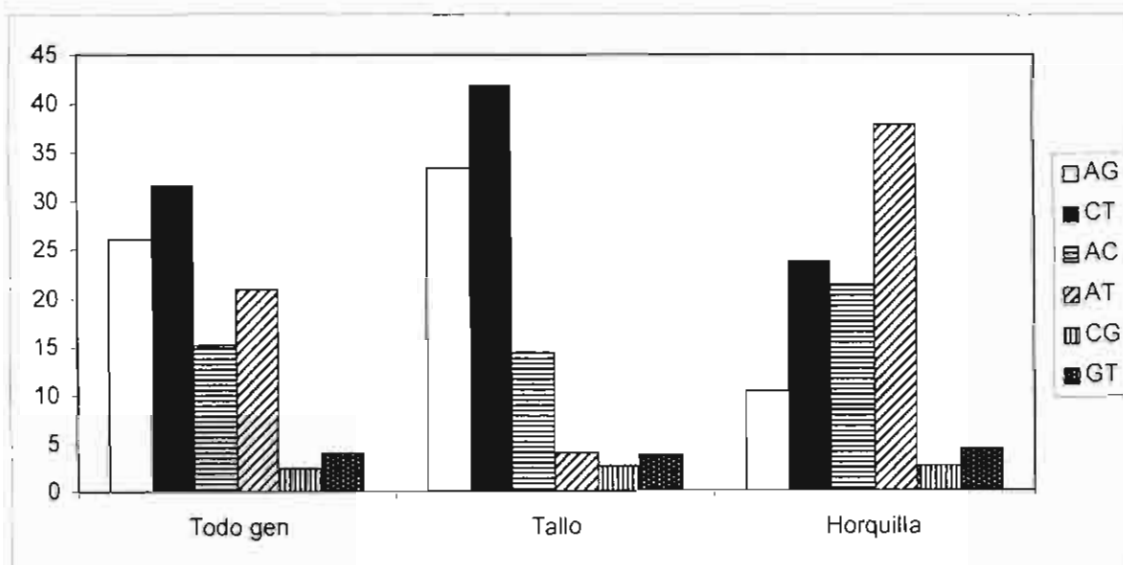


Figura 7. Tasa relativa de cambio de bases en 18S. ti = Transiciones. tv = Transversiones.

La zona de horquillas registró elevados valores de timina (29.44%), guanina (26.33%) y adenina (28.47%) (Figura 8). Para la zona de tallos la citosina (27.75%) y guanina (28.72%) registraron valores elevados. La guanina se encontró en proporciones similares en las zonas de horquillas y tallos (26.33% y 28.70 respectivamente).

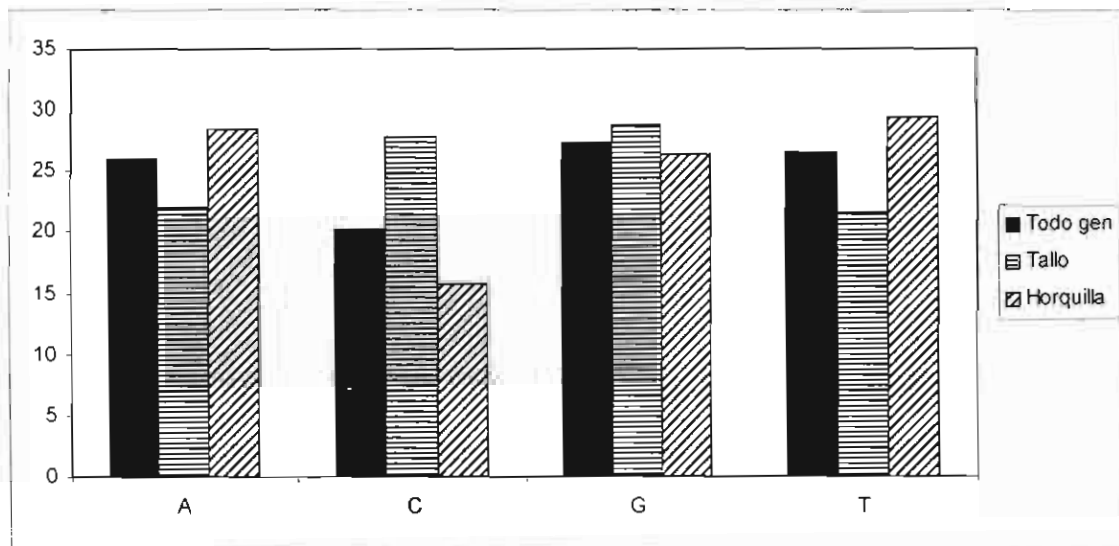


Figura 8. Composición nucleotídica del gen 18S. A = Adenina. C = Citosina. G = Guanina. T = Timina.

El estadístico g_1 calculado con la opción de inserciones - deleciones codificados como datos ausentes, indicó que las matrices: a) del gen 18S ($g_1 = -0.4032$), b) de la zona de tallos ($g_1 = -0.3143$) y c) de la zona de horquillas ($g_1 = -0.3867$) presentaron señal filogenética significativa (Tabla 4).

El estadístico g_1 calculado con la opción de inserciones - deleciones codificados como quinta base indicó que las matrices: a) del gen 18S ($g_1 = -0.3765$), b) de la zona de tallos ($g_1 = -0.3020$) y c) de la zona de horquillas ($g_1 = -0.3861$) presentaron señal filogenética significativa (Tabla 4).

4.1.6 Divergencia en las secuencias de 18S.

Un total de 30 secuencias fueron analizadas incluyendo los grupos externos *Centroceras clavulatum*, *Ceramium tenerrimum* (G. Martens) Okamura, *C. affine* Setchell et N.L. Gardner, *Gracilaria cervicornis* (Turner) J. Agardh, *Neosiphonia japónica* (Harvey) M.S. Kim et I.K. Lee, *Polysiphonia howei* Hollenberg, *P. paniculata* Montagne, *P. senticulosa* Harvey y *Rhodomela confervoides* (Hudson) P.C. Silva (Apéndice 1).

Los valores de divergencia intergenérica oscilaron de 1 a 12% entre *Palisada* y *Laurencia* (excepto *L. sp. 2b* y *L. marilzae*). Los valores de divergencia interespecífica obtenidos para los taxa de *Laurencia* oscilaron de 0 a 4%, mientras que para *Palisada* fue de 0.9%.

En el caso de *P. gemmifera* y *P. poiteau*, los valores de divergencia nucleotídica observados entre sus secuencias oscilaron de 0.2 a 0.3%. En el caso de *P. perforata* y *P. papillosa*, la divergencia nucleotídica observada fue de 1% (Apéndice 4).

El taxón denominado como *Laurencia sp. 2b* difirió del resto de los taxa de *Laurencia* en niveles de variación genética que oscilaron de 1 a 5%, y del resto de los taxa de *Palisada* difirió en valores de divergencia que oscilaron de 1 a 9% (Apéndice 4).

Los taxa: *L. filiformis*, *L. intricata*, *L. sp. 1* y *L. sp. 3* presentaron bajos niveles de variación genética entre sus secuencias, con valores que oscilaron de 0 a 0.7%. Los taxa denominados como *L. obtusa 1* y *L. obtusa 2* también presentaron bajos niveles de variación genética entre sus secuencias (0.1%).

4.2 Evolución molecular.

4.2.1 Saturación de los genes.

Los gráficos de saturación de *rbcL* se muestran en las Figuras 9 y 10. Todos los gráficos reflejaron que las sustituciones tienen una acumulación linear de cambios con respecto a la divergencia de secuencias y que por tanto ninguna de las posiciones del codón están saturadas en este gen.

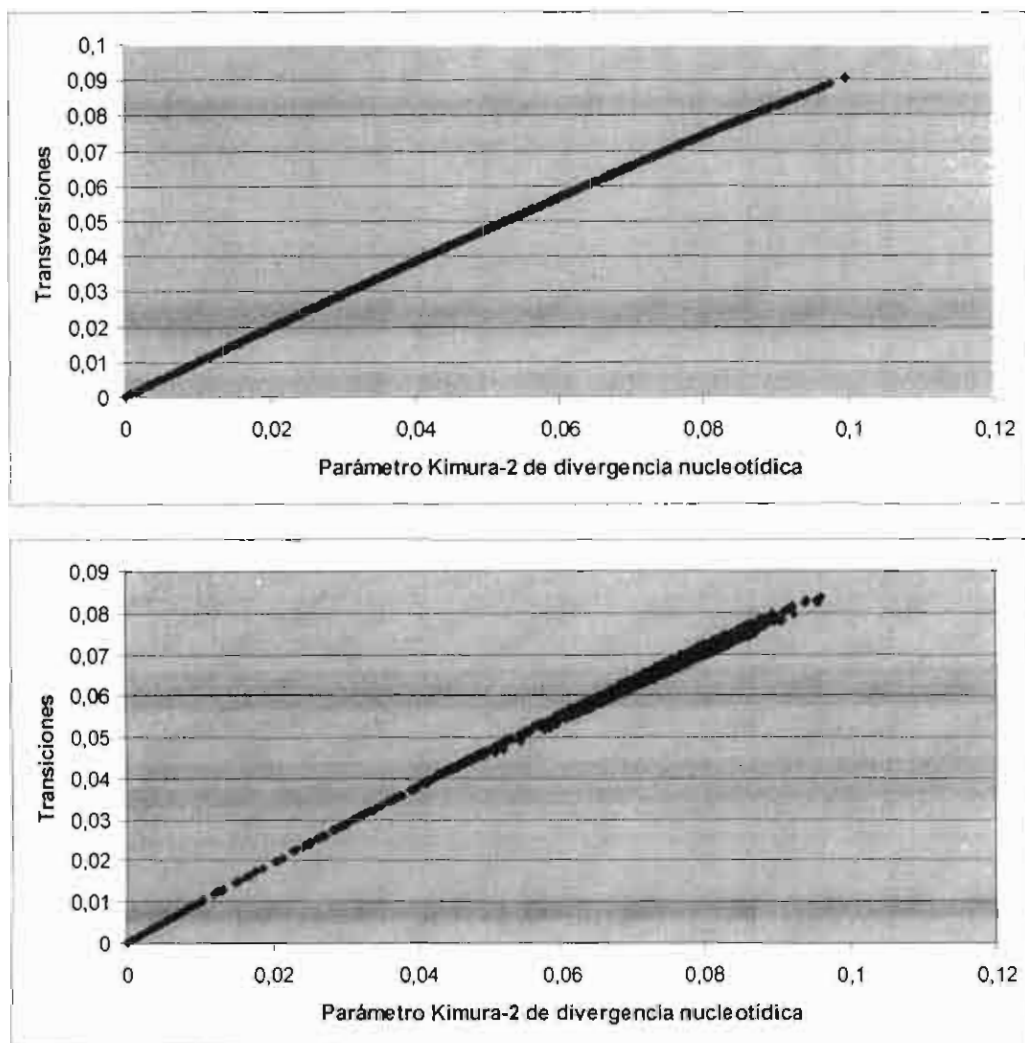


Figura 9. Saturación en el gen *rbcl*: divergencia no corregida entre secuencias versus parámetro de distancia Kimura – 2 versus tipo de cambio.

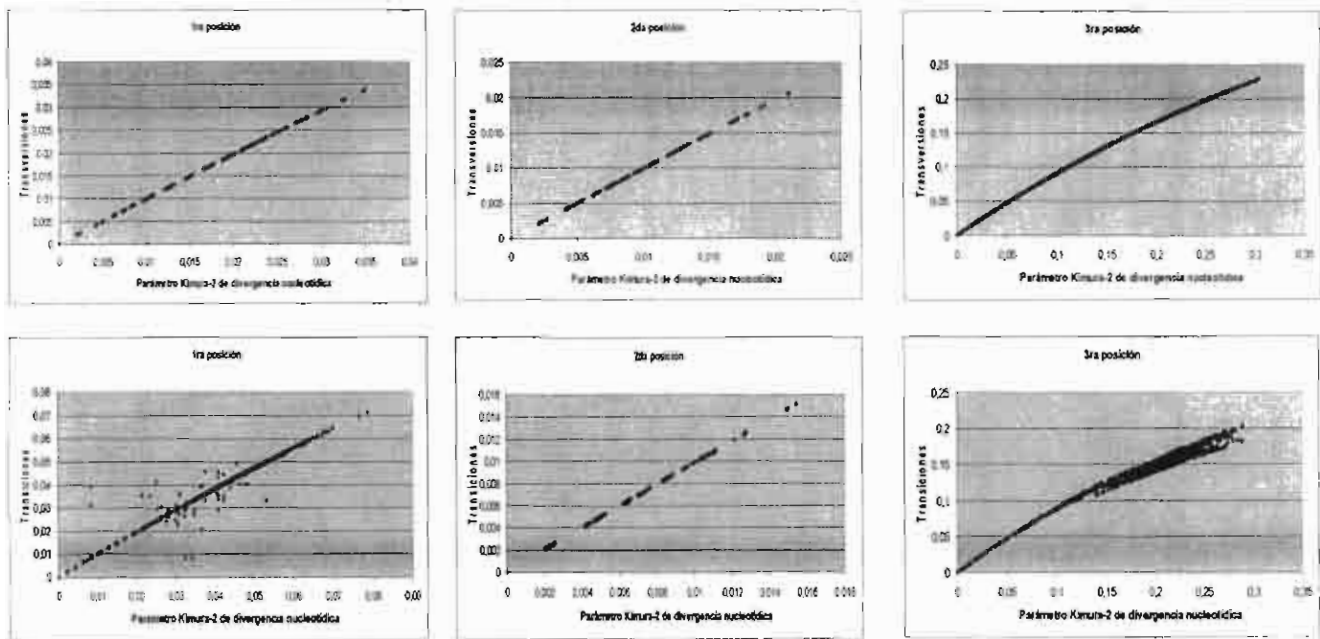


Figura 10. Saturación en el gen *rbcl*: divergencia no corregida entre secuencias versus parámetro de distancia Kimura – 2 versus posición del codón versus tipo de cambio.

Los gráficos de saturación para las transiciones y las transversiones de RUBISCO espaciadora se muestran en la Figura 11. Los dos gráficos reflejaron que las sustituciones tienen una acumulación lineal de cambios con respecto a la divergencia de secuencias, y que por tanto no existe saturación en esta región.

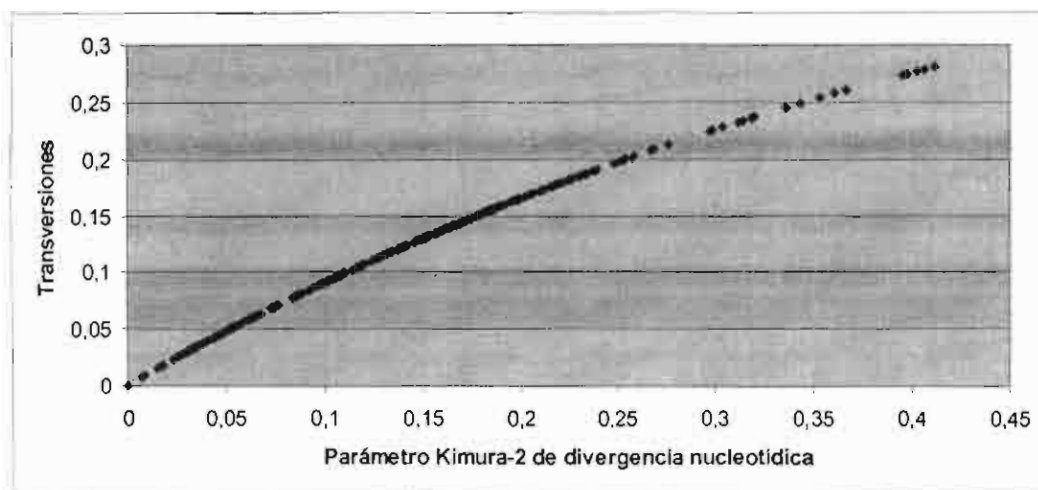


Figura 11. Saturación en la región RUBISCO espaciadora: divergencia no corregida entre secuencias versus parámetro de distancia Kimura – 2 versus tipo de cambio.

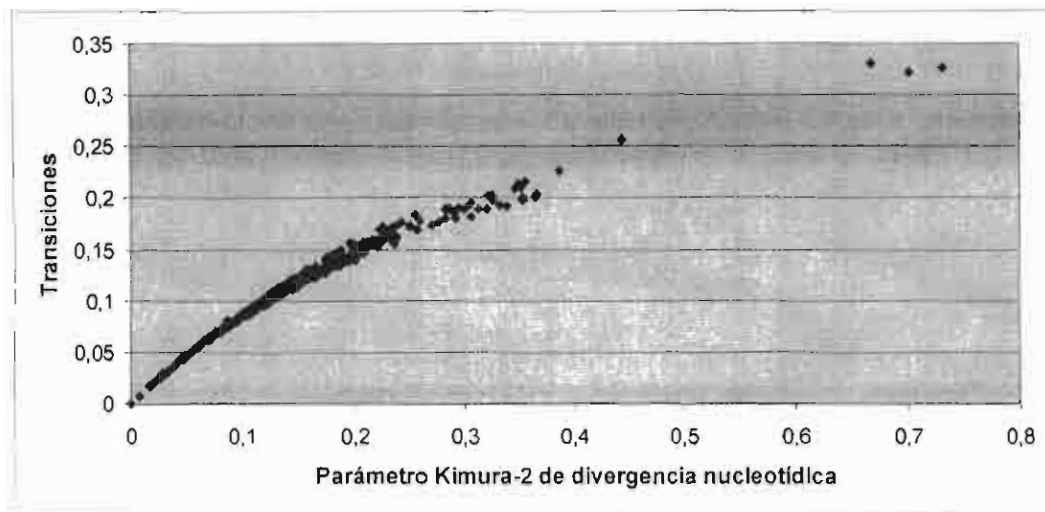


Figura 11. (continuación)

Los gráficos de saturación de 18S se muestran en la Figura 12. Todos los gráficos reflejaron que las sustituciones tienen una acumulación linear de cambios con respecto a la divergencia de secuencias, y que por tanto ni la zona de horquillas, ni la de tallos presentan saturación.

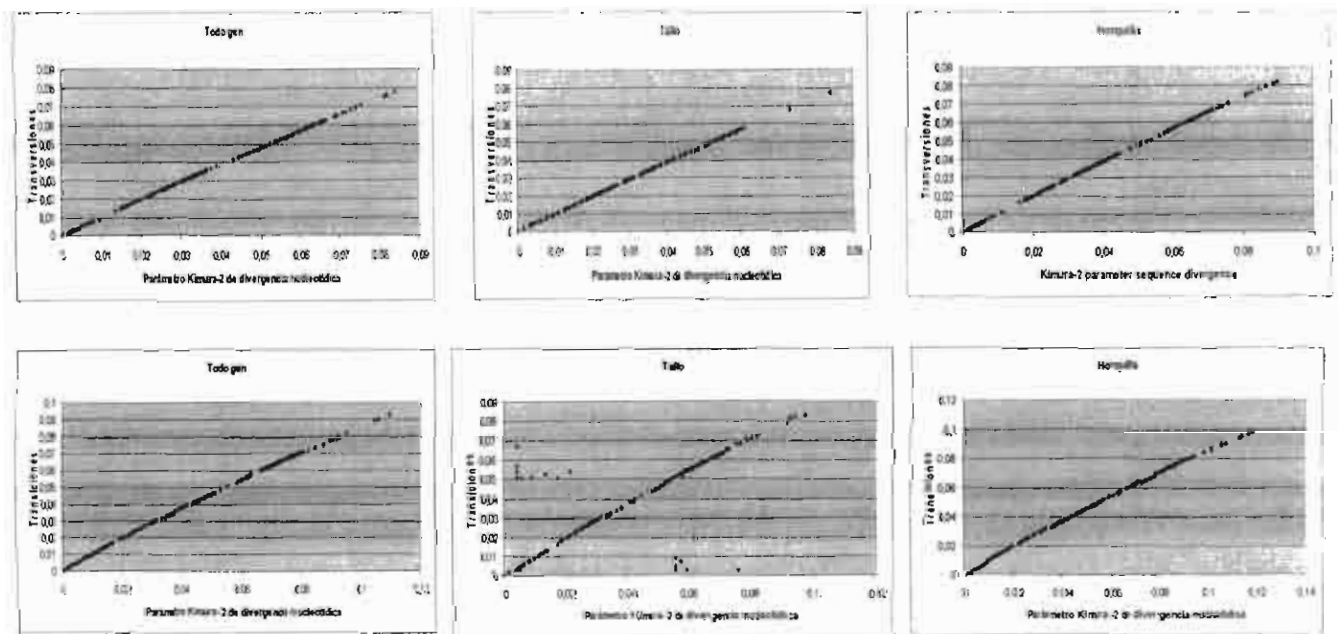


Figura 12. Saturación en el gen 18S: divergencia no corregida entre secuencias versus parámetro de distancia Kimura – 2 versus regiones versus tipo de cambio.

4.2.2 Uso del codón.

Se realizaron análisis de uso del codón de forma independiente para los taxa que conforman el grupo externo, los géneros *Laurencia*, *Palisada*, *Osmundea*, para la especie *L. marilzae* y el ejemplar denominado *L. sp. 2a*. En el caso de *L. sp. 2a* y *L. marilzae* (Tabla 5) el valor de Schi² escalado fue de 0.766, el número efectivo de codones fue de 37.651 y el índice de tendencia del codón fue de 0.597. Los codones que se presentaron con mayor frecuencia fueron: GGU-Glicina (29 veces), GAA-Glutamina (25 veces), GCA-Alanina (24 veces), UUA-Leucina (23 veces), GUA-Valina (22 veces), AAA-Lisina (22 veces), AUU-Isoleucina (20 veces) y GCU-Alanina (19 veces).

Tabla 5. Uso del codón de *L. marilzae* - *L. sp. 2a* - *L. sp. 2b*. El valor entre paréntesis es el uso relativo de codones sinónimos. * Codones terminales.

UUU-F	14 (1.40)	UCU-S	11 (3.67)	UAU-Y	14 (1.33)	UGU-C	2 (1.00)
UUC-F	6 (0.60)	UCC-S	0 (0.00)	UAC-Y	7 (0.67)	UGC-C	2 (1.00)
UUA-L	23 (3.73)	UCA-S	6 (2.00)	UAA-*	0 (0.00)	UGA-*	0 (0.00)
UUG-L	1 (0.16)	UCG-S	0 (0.00)	UAG-*	0 (0.00)	UGG-W	8 (1.00)
CUU-L	4 (0.65)	CCU-P	7 (1.40)	CAU-H	6 (1.33)	CGU-R	12 (2.77)
CUC-L	0 (0.00)	CCC-P	1 (0.20)	CAC-H	3 (0.67)	CGC-R	3 (0.69)
CUA-L	9 (1.46)	CCA-P	12 (2.40)	CAA-Q	13 (1.73)	CGA-R	2 (0.46)
CUG-L	0 (0.00)	CCG-P	0 (0.00)	CAG-Q	2 (0.27)	CGG-R	2 (0.46)
AUU-I	20 (2.00)	ACU-T	16 (1.94)	AAU-N	11 (1.16)	AGU-S	1 (0.33)
AUC-I	8 (0.80)	ACC-T	1 (0.12)	AAC-N	8 (0.84)	AGC-S	0 (0.00)
AUA-I	2 (0.20)	ACA-T	13 (1.58)	AAA-K	22 (1.83)	AGA-R	6 (1.38)
AUG-M	17 (1.00)	ACG-T	3 (0.36)	AAG-K	2 (0.17)	AGG-R	1 (0.23)
GUU-V	15 (1.58)	GCU-A	19 (1.69)	GAU-D	23 (1.59)	GGU-G	29 (2.76)
GUC-V	0 (0.00)	GCC-A	1 (0.09)	GAC-D	6 (0.41)	GGC-G	2 (0.19)
GUA-V	22 (2.32)	GCA-A	24 (2.13)	GAA-E	25 (1.79)	GGA-G	9 (0.86)
GUG-V	1 (0.11)	GCG-A	1 (0.09)	GAG-E	3 (0.21)	GGG-G	2 (0.19)

Para los taxa del grupo externo (Tabla 6) el valor de $S\chi^2$ fue de 0.871, el número efectivo de codones fue de 34.823 y el índice de tendencia del codón fue de 0.633. Los codones más abundantes fueron: GCU-Alanina (32 veces), GGU-Glicina (28 veces), UUA-Leucina (27 veces), AAA-Lisina (25 veces), GAU-Aspártico (23 veces), GAA-Glutamina (22 veces) y GUU-Valina (19 veces).

Tabla 6. Uso del codón de grupos externos. El valor entre paréntesis es el uso relativo de codones sinónimos. * Codones terminales.

UUU-F	13 (1.37)	UCU-S	10 (3.16)	UAU-Y	16 (1.60)	UGU-C	4 (2.00)
UUC-F	6 (0.63)	UCC-S	0 (0.00)	UAC-Y	4 (0.40)	UGC-C	0 (0.00)
UUA-L	27 (4.05)	UCA-S	6 (1.89)	UAA-*	0 (0.00)	UGA-*	0 (0.00)
UUG-L	2 (0.30)	UCG-S	1 (0.32)	UAG-*	0 (0.00)	UGG-W	8 (1.00)
CUU-L	6 (0.90)	CCU-P	8 (1.78)	CAU-H	10 (2.00)	CGU-R	15 (3.75)
CUC-L	0 (0.00)	CCC-P	0 (0.00)	CAC-H	0 (0.00)	CGC-R	2 (0.50)
CUA-L	4 (0.60)	CCA-P	8 (1.78)	CAA-Q	14 (1.75)	CGA-R	1 (0.25)
CUG-L	1 (0.15)	CCG-P	2 (0.44)	CAG-Q	2 (0.25)	CGG-R	0 (0.00)
AUU-I	18 (1.93)	ACU-T	14 (1.65)	AAU-N	15 (1.50)	AGU-S	1 (0.32)
AUC-I	4 (0.43)	ACC-T	1 (0.12)	AAC-N	5 (0.50)	AGC-S	1 (0.32)
AUA-I	6 (0.64)	ACA-T	18 (2.12)	AAA-K	25 (1.92)	AGA-R	6 (1.50)
AUG-M	18 (1.00)	ACG-T	1 (0.12)	AAG-K	1 (0.08)	AGG-R	0 (0.00)
GUU-V	19 (1.90)	GCU-A	32 (2.84)	GAU-D	23 (1.53)	GGU-G	28 (2.55)
GUC-V	2 (0.20)	GCC-A	2 (0.18)	GAC-D	7 (0.47)	GGC-G	3 (0.27)
GUA-V	18 (1.80)	GCA-A	10 (0.89)	GAA-E	22 (1.76)	GGA-G	13 (1.18)
GUG-V	1 (0.10)	GCG-A	1 (0.09)	GAG-E	3 (0.24)	GGG-G	0 (0.00)

Para los taxa de *Laurencia* (Tabla 7) el valor de $S\chi^2$ fue de 0.866, el número efectivo de codones fue de 35.552 y el índice de tendencia del codón fue de 0.624. Los codones que se presentaron con mayor frecuencia fueron: GGU-Glicina (29

veces), GAU-Aspártico (26 veces), UUA-Leucina (25 veces), GCA-Alanina (25 veces), AAA-Lisina (24 veces), GAA-Glutamina (23 veces), GUA-Valina (23 veces) y AUU-Isoleucina (21 veces).

Tabla 7. Uso del codón de *Laurencia*. El valor entre paréntesis es el uso relativo de codones sinónimos. * Codones terminales.

UUU-F	12 (1.14)	UCU-S	12 (4.24)	UAU-Y	12 (1.14)	UGU-C	1 (0.50)
UUC-F	9 (0.86)	UCC-S	0 (0.00)	UAC-Y	9 (0.86)	UGC-C	3 (1.50)
UUA-L	25 (4.05)	UCA-S	4 (1.41)	UAA-*	0 (0.00)	UGA-*	0 (0.00)
UUG-L	2 (0.32)	UCG-S	0 (0.00)	UAG-*	0 (0.00)	UGG-W	8 (1.00)
CUU-L	3 (0.49)	CCU-P	6 (1.26)	CAU-H	6 (1.33)	CGU-R	12 (2.88)
CUC-L	0 (0.00)	CCC-P	0 (0.00)	CAC-H	3 (0.67)	CGC-R	3 (0.72)
CUA-L	7 (1.14)	CCA-P	13 (2.74)	CAA-Q	12 (1.60)	CGA-R	1 (0.24)
CUG-L	0 (0.00)	CCG-P	0 (0.00)	CAG-Q	3 (0.40)	CGG-R	2 (0.48)
AUU-I	21 (2.25)	ACU-T	15 (1.88)	AAU-N	14 (1.47)	AGU-S	1 (0.35)
AUC-I	5 (0.54)	ACC-T	0 (0.00)	AAC-N	5 (0.53)	AGC-S	0 (0.00)
AUA-I	2 (0.21)	ACA-T	17 (2.13)	AAA-K	24 (1.92)	AGA-R	7 (1.68)
AUG-M	17 (1.00)	ACG-T	0 (0.00)	AAG-K	1 (0.08)	AGG-R	0 (0.00)
GUU-V	14 (1.40)	GCU-A	17 (1.45)	GAU-D	26 (1.68)	GGU-G	29 (2.76)
GUC-V	2 (0.20)	GCC-A	1 (0.09)	GAC-D	5 (0.32)	GGC-G	3 (0.29)
GUA-V	23 (2.30)	GCA-A	25 (2.13)	GAA-E	23 (1.84)	GGA-G	10 (0.95)
GUG-V	1 (0.10)	GCG-A	4 (0.34)	GAG-E	2 (0.16)	GGG-G	0 (0.00)

En el caso de *Osmundea* (Tabla 8) el valor de $S\chi^2$ fue de 0.916, el número efectivo de codones fue de 34.089 y el índice de tendencia del codón fue de 0.664. Los codones más abundantes fueron: UUA-Leucina (28 veces), GAU-Aspártico (25 veces), GGU-Glicina (25 veces), GCA-Alanina (24 veces), AAA-Lisina (24 veces), GUA-Valina (23 veces), GAA-Glutamina (22 veces) y AUU-Isoleucina (20 veces), UAU-Tirosina (20 veces).

Tabla 8. Uso del codón de *Osmundea*. El valor entre paréntesis es el uso relativo de codones sinónimos. * Codones terminales.

UUU-F	13 (1.37)	UCU-S	14 (4.42)	UAU-Y	20 (1.82)	UGU-C	3 (1.50)
UUC-F	6 (0.63)	UCC-S	0 (0.00)	UAC-Y	2 (0.18)	UGC-C	1 (0.50)
UUA-L	28 (4.31)	UCA-S	4 (1.26)	UAA-*	0 (0.00)	UGA-*	0 (0.00)
UUG-L	0 (0.00)	UCG-S	0 (0.00)	UAG-*	0 (0.00)	UGG-W	8 (1.00)
CUU-L	5 (0.77)	CCU-P	4 (0.84)	CAU-H	7 (1.56)	CGU-R	14 (3.36)
CUC-L	0 (0.00)	CCC-P	0 (0.00)	CAC-H	2 (0.44)	CGC-R	2 (0.48)
CUA-L	6 (0.92)	CCA-P	15 (3.16)	CAA-Q	14 (1.75)	CGA-R	0 (0.00)
CUG-L	0 (0.00)	CCG-P	0 (0.00)	CAG-Q	2 (0.25)	CGG-R	2 (0.48)
AUU-I	20 (2.14)	ACU-T	16 (2.06)	AAU-N	12 (1.26)	AGU-S	1 (0.32)
AUC-I	4 (0.43)	ACC-T	0 (0.00)	AAC-N	7 (0.74)	0 (0.00)	AGC-S
AUA-I	4 (0.43)	ACA-T	15 (1.94)	AAA-K	24 (1.85)	AGA-R	6 (1.44)
AUG-M	17 (1.00)	ACG-T	0 (0.00)	AAG-K	2 (0.15)	AGG-R	1 (0.24)
GUU-V	12 (1.30)	GCU-A	16 (1.42)	GAU-D	25 (1.67)	GGU-G	25 (2.33)
GUC-V	1 (0.11)	GCC-A	4 (0.36)	GAC-D	5 (0.33)	GGC-G	5 (0.47)
GUA-V	23 (2.49)	GCA-A	24 (2.13)	GAA-E	22 (1.63)	GGA-G	13 (1.21)
GUG-V	1 (0.11)	GCG-A	1 0.09)	GAG-E	5 (0.37)	GGG-G	0 (0.00)

Finalmente en *Palisada* (Tabla 9) se registraron valores de $S\chi^2$ de 0.794, el número efectivo de codones fue de 36.026 y el índice de tendencia del codón fue de 0.607. Los codones que se presentaron con mayor frecuencia fueron: GGU-Glicina (29 veces), GAU-Aspártico (25 veces), AUU-Isoleucina (23 veces), GCU-Alanina (23 veces), GCA-Alanina (23 veces), GAA-Glutamina (23 veces), GUA-Valina (21 veces) y AAA-Lisina (21 veces).

Tabla 9. Uso del codón de *Palisada*. El valor entre paréntesis es el uso relativo de codones sinónimos. * Codones terminales.

UUU-F	12 (1.26)	UCU-S	12 (4.24)	UAU-Y	13 (1.18)	UGU-C	3 (1.50)
UUC-F	7 (0.74)	UCC-S	0 (0.00)	UAC-Y	9 (0.82)	UGC-C	1 (0.50)
UUA-L	18 (2.92)	UCA-S	4 (1.41)	UAA-*	0 (0.00)	UGA-*	0 (0.00)
UUG-L	1 (0.16)	UCG-S	0 (0.00)	UAG-*	0 (0.00)	UGG-W	8 (1.00)
CUU-L	5 (0.81)	CCU-P	5 (1.05)	CAU-H	6 (1.33)	CGU-R	14 (3.23)
CUC-L	1 (0.16)	CCC-P	0 (0.00)	CAC-H	3 (0.67)	CGC-R	2 (0.46)
CUA-L	12 (1.95)	CCA-P	13 (2.74)	CAA-Q	12 (1.71)	CGA-R	1 (0.23)
CUG-L	0 (0.00)	CCG-P	1 (0.21)	CAG-Q	2 (0.29)	CGG-R	2 (0.46)
AUU-I	23 (2.38)	ACU-T	16 (2.00)	AAU-N	13 (1.30)	AGU-S	1 (0.35)
AUC-I	5 (0.52)	ACC-T	0 (0.00)	AAC-N	7 (0.70)	AGC-S	0 (0.00)
AUA-I	1 (0.10)	ACA-T	13 (1.63)	AAA-K	21 (1.75)	AGA-R	7 (1.62)
AUG-M	17 (1.00)	ACG-T	3 (0.38)	AAG-K	3 (0.25)	AGG-R	0 (0.00)
GUU-V	16 (1.64)	GCU-A	23 (1.92)	GAU-D	25 (1.67)	GGU-G	29 (2.76)
GUC-V	0 (0.00)	GCC-A	0 (0.00)	GAC-D	5 (0.33)	GGC-G	4 (0.38)
GUA-V	21 (2.15)	GCA-A	23 (1.92)	GAA-E	23 (1.70)	GGA-G	9 (0.86)
GUG-V	2 (0.21)	GCG-A	2 (0.17)	GAG-E	4 (0.30)	GGG-G	0 (0.00)

4.2.3 Estructura secundaria.

La estructura secundaria del gen 18S obtenida para la matriz de alineación de los taxa de *Palisada* se muestra en la Figura 13. Dicha estructura está conformada por 70 tallos y 27 horquillas y su energía libre es de -278.1 kkal/mol. La estructura secundaria obtenida para la matriz de alineación de los taxa incluidos en el grupo externo se muestra en la Figura 14 y está conformada por 70 tallos y 35 horquillas y su energía libre es de -266.4 kkal/mol. La estructura secundaria obtenida para la matriz de alineación de los taxa de *Laurencia* (excluyendo *L. sp. 2b*) se muestra en la Figura 15 y está conformada por 63 tallos y 31 horquillas y su energía libre es de -261.4 kkal/mol. La estructura secundaria obtenida para el taxón *L. sp. 2b* se

muestra en la Figura 16 y está conformada por 62 tallos y 24 horquillas y su energía libre es de -286.0 kkal/mol.

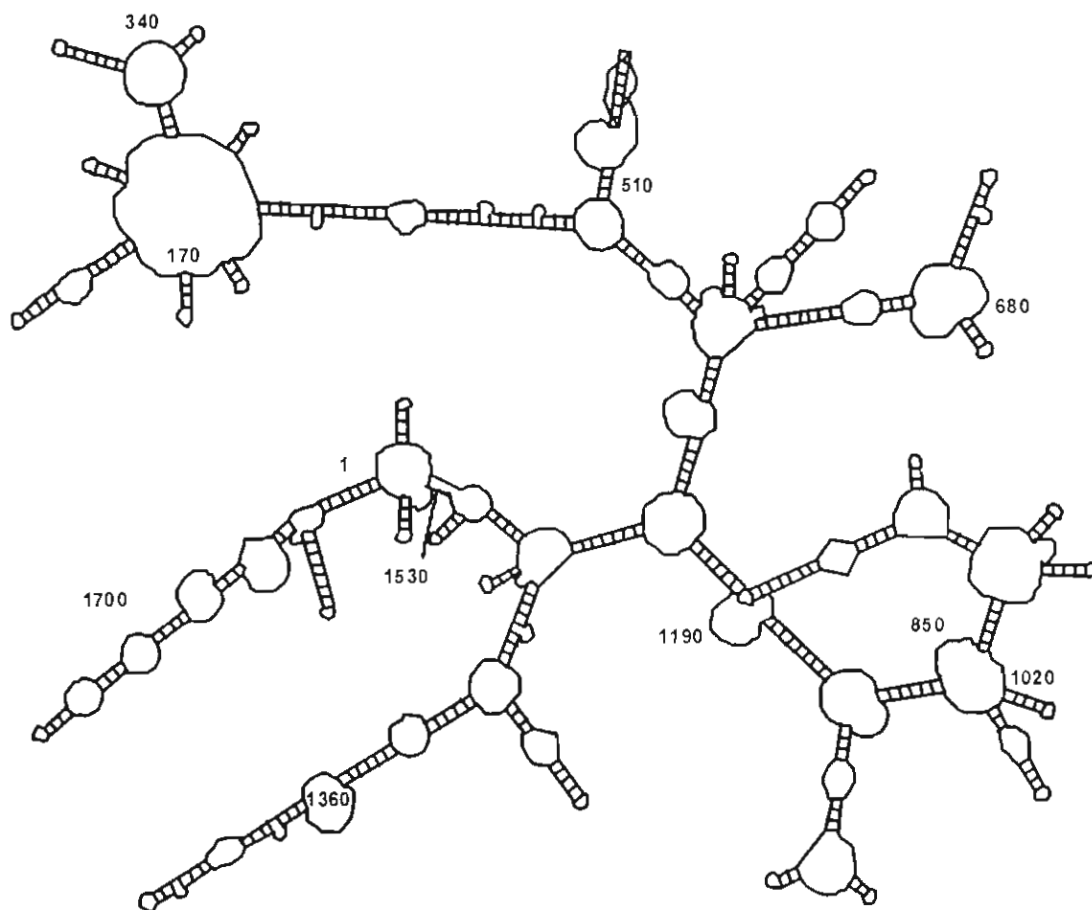


Figura 13. Estructura secundaria de la matriz de *Palisada*.

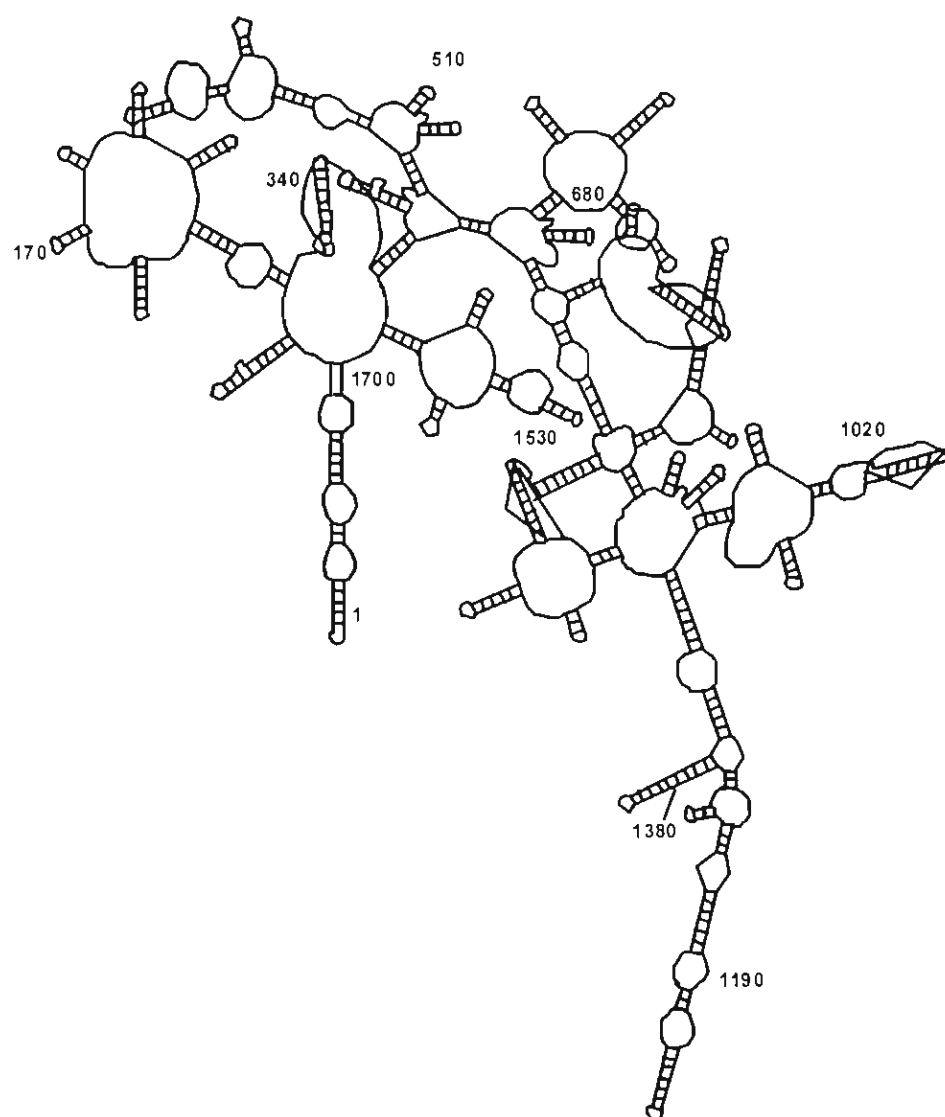


Figura 14. Estructura secundaria de la matriz de grupos externos.

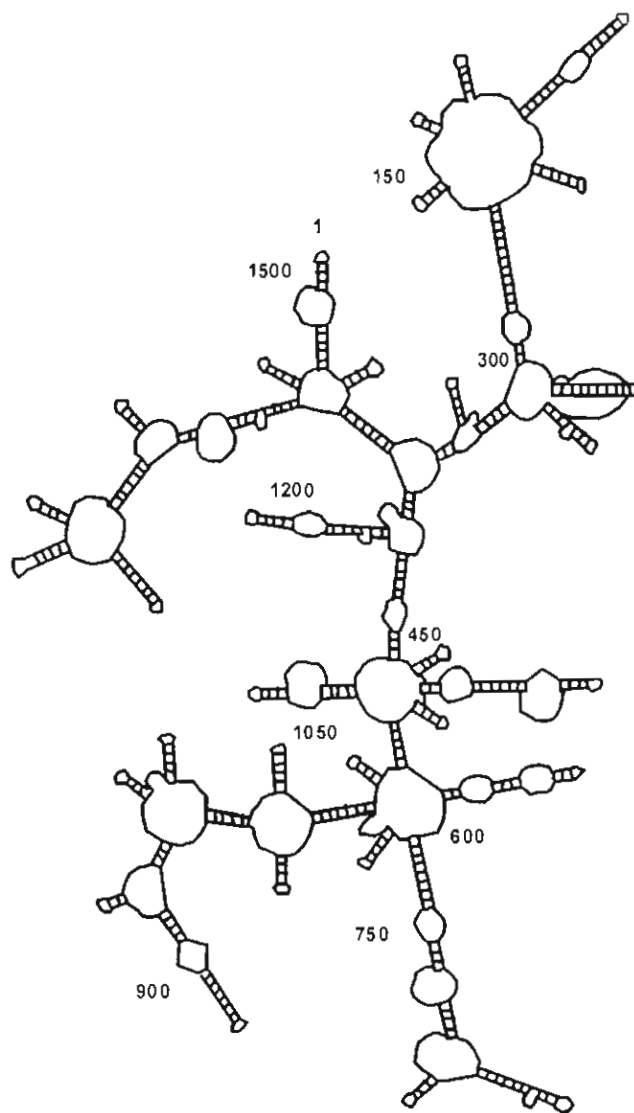


Figura 15. Estructura secundaria de la matriz de *Laurencia*.

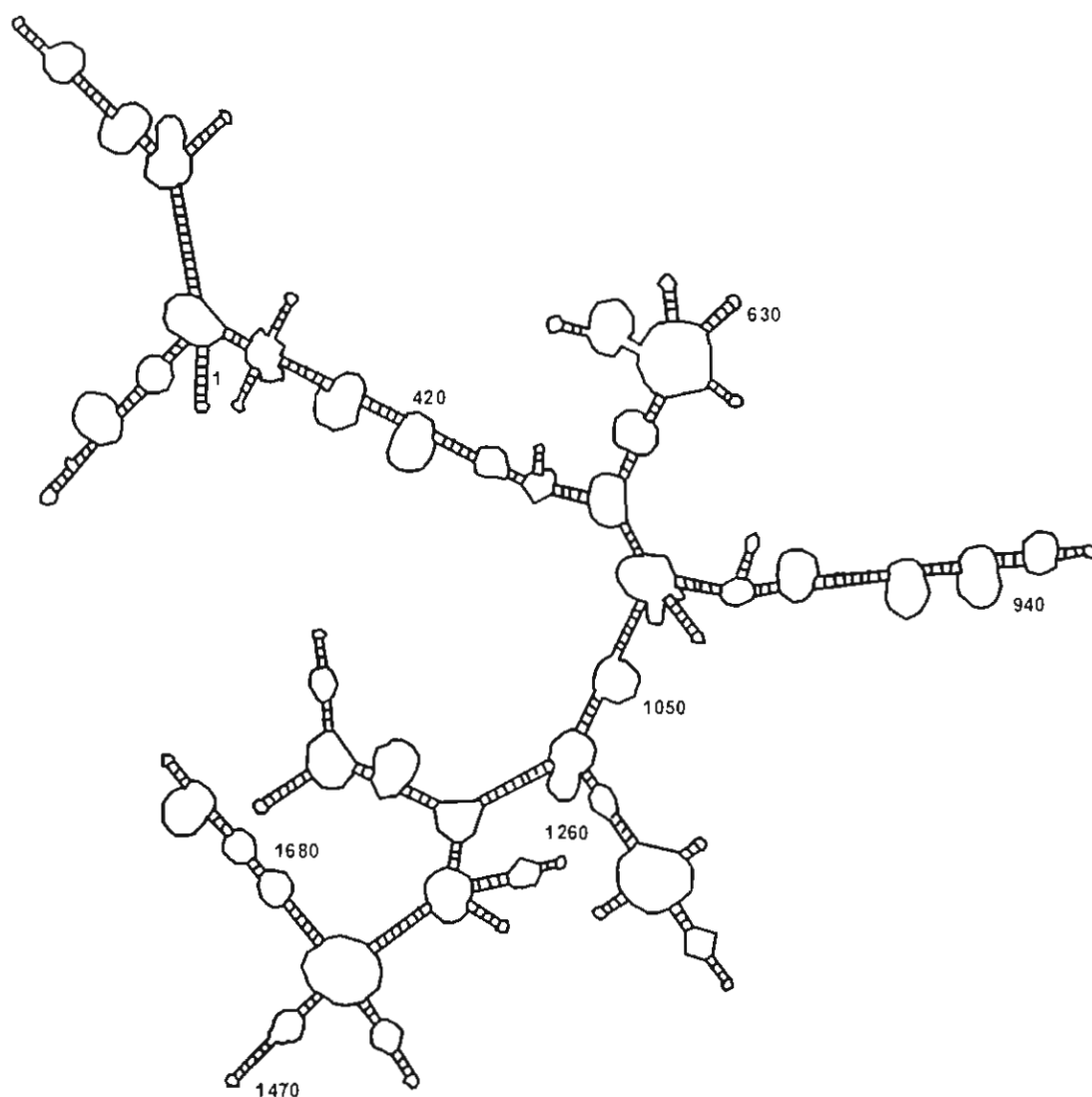


Figura 16. Estructura secundaria de la matriz de *L. sp. 2a*.

4.3 Análisis Filogenético.

4.3.1 Región *rbcL*.

4.3.1.1 Análisis máxima parsimonia.

El análisis de MP donde se incluyó la matriz de todos los caracteres de *rbcL* produjo 1440 árboles más parsimoniosos (Tabla 2). La topología del árbol de

consenso estricto obtenido, con los correspondientes valores de bootstrap, jackknife e índice de decaimiento se muestran en la Figura 17.

IC=0.73, IH=0.27

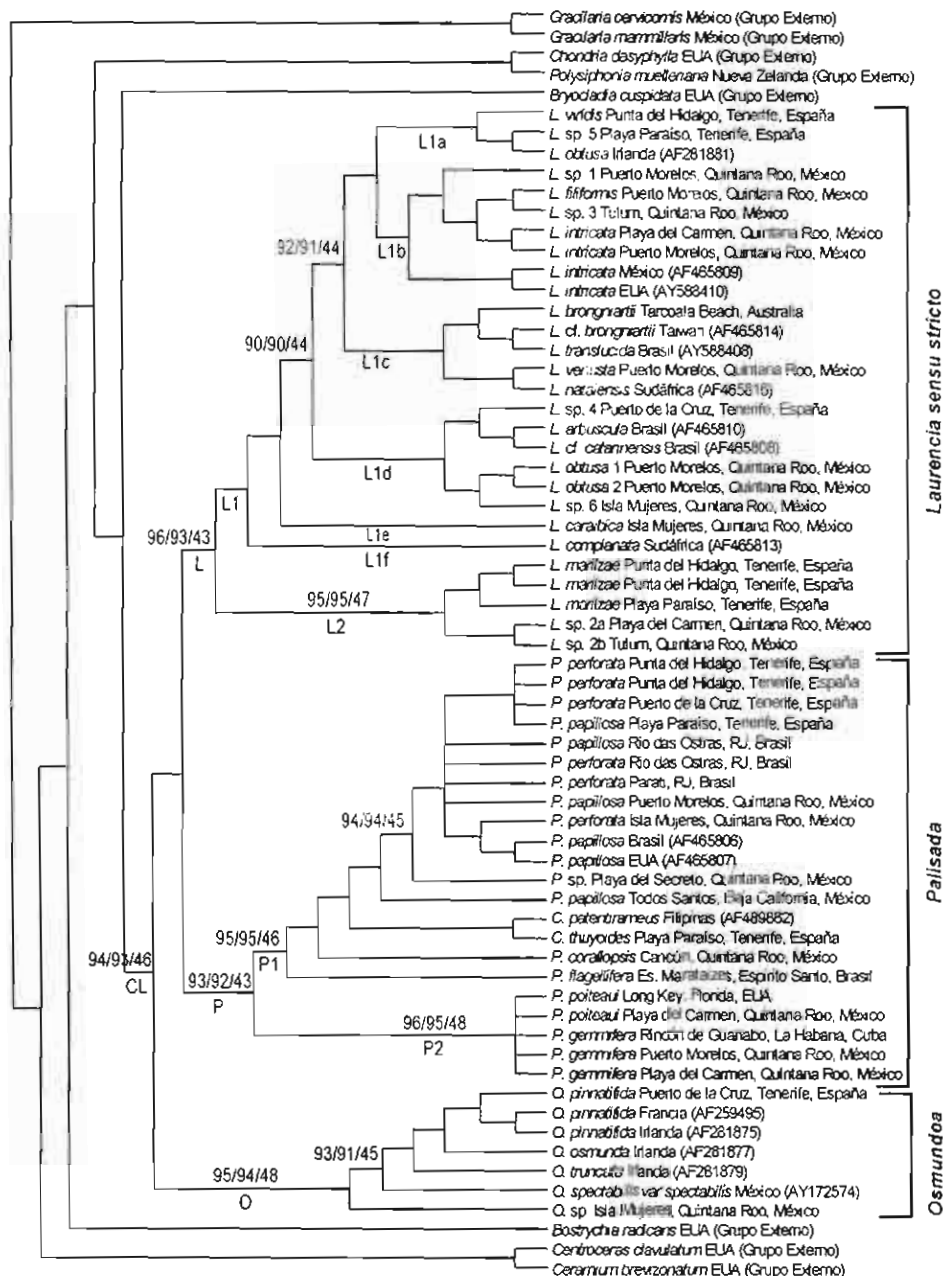


Figura 17. Consenso estricto de 1440 árboles de Máxima Parsimonia basado en secuencias de *rbcL*. Valores de Bootstrap, Jakknife (1000 réplicas) e Índice de Decaimiento se indican en los nodos.

Dicho análisis mostró que *Laurencia sensu lato* es monofilético (clado CL) sustentado por altos valores de bootstrap, jackknife e índice de decaimiento, en relación a los taxa incluidos como grupo externo. *Laurencia sensu lato* se separó en tres clados monofiléticos con altos valores de soporte correspondiente a los géneros que forman dicho complejo: el clado L que incluyó a *Laurencia*, el clado P, que incluyó a *Palisada* y finalmente el clado O que incluyó a *Osmundea*. El clado más basal de la topología agrupó a las especies del género *Osmundea* y el taxón denominado *Osmundea* sp. El género *Laurencia* y *Palisada* se incluyeron en clados hermanos con altos valores de soporte. El clado monofilético correspondiente al género *Palisada* incluyó dos subclados sustentados por altos valores de soporte. Al interior del subclado (P2) que incluyó a *P. gemmifera* y *P. poiteaui* las relaciones no fueron resueltas. El subclado hermano (P1) incluyó siete taxa: *P. perforata*, *P. papillosa*, *P. sp.*, *P. flagellifera* (J. Agardh) K.W. Nam, *C. corallopsis*, *C. patentirameus* (Montagne) K.W. Nam y *C. thuyoides* (Kützinger) G. Furnari, donde las dos primeras especies se agruparon a su vez en una politomía. El clado monofilético correspondiente al género *Laurencia* incluyó 22 taxa agrupados en dos subclados: el subclado L2 conformado por *Laurencia marilzae*, *L. sp. 2a* y *L. sp. 2b*, y el subclado L1 que incluyó a: *L. brongniartii*, *L. obtusa*, *L. intricata*, *L. filiformis*, *L. caraibica*, *L. venusta*, *L. complanata* (Suhr) Kützinger, *L. viridis* Gil-Rodríguez et Haroun, *L. natalensis* Kylin, *L. arbuscula*, *L. translucida* GB, *L. cf. catarinensis*, *L. arbuscula* Sonder y los ejemplares denominados como: *L. sp. 1*, *L. sp. 3*, *L. sp. 4*, *L. sp. 5* y *L. sp. 6*. El subclado L1 incluyó además 6 subclados: el L1a con *Laurencia viridis*, *L. obtusa* y *L. sp. 5*; el L1b con *L. filiformis*, *L. intricata*, *L. sp. 1* y *L. sp. 3*; el L1c con *L. brongniartii*, *L. translucida* GB, *L. venusta* y *L. natalensis*; el L1d con *L. arbuscula*, *L. cf. catarinensis*, *L. obtusa 1*, *L. obtusa 2*, *L. sp. 4* y *L. sp. 6*; el L1e con *Laurencia caraibica* y finalmente el L1f con *L. complanata*.

Se obtuvo además un análisis de filograma donde se incluyeron 65 taxa. La topología resultante, y por tanto la distribución de clados, fue similar a la obtenida en la figura 17(Figura 17a).

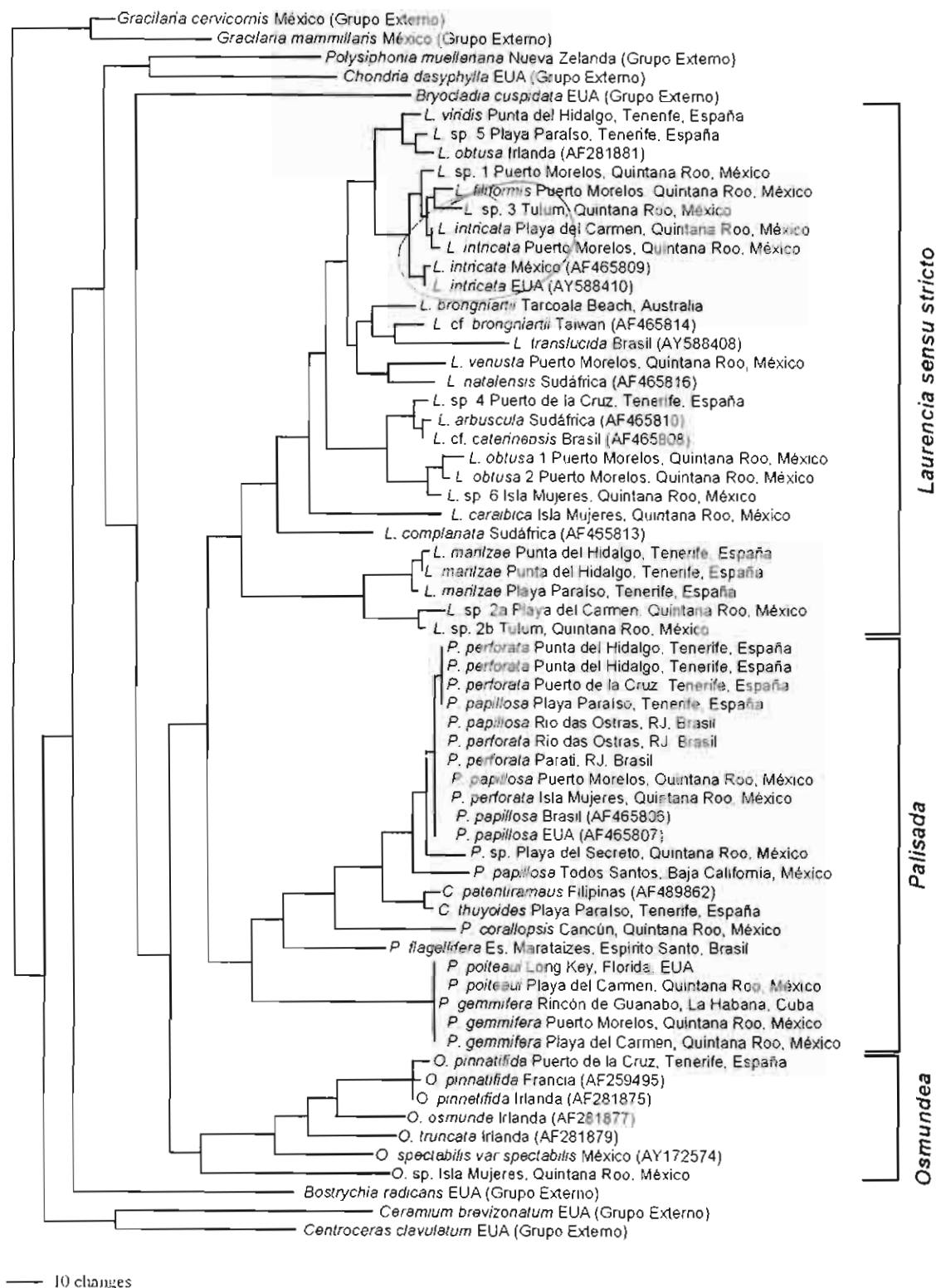


Figura 17a. Filograma basado en secuencias de *rbcL*.

Se realizaron análisis adicionales de MP teniendo en cuenta por separado las matrices: a) de la primera posición, b) de la segunda posición, c) de la tercera posición del codón, d) de la matriz de proteínas y e) de la matriz resultante de la suma de la primera y tercera posiciones del codón (Tabla 2).

El análisis de MP que incluyó la matriz de la primera + tercera posiciones del codón produjo 504 árboles más parsimoniosos (IC = 0.71, IH = 0.29). La topología del árbol de consenso estricto obtenido fue similar a la obtenida en el análisis donde se incluyó la matriz de todos los caracteres del gen, por lo cual no se muestra la topología del árbol obtenido.

En el análisis donde se incluyó la matriz de la tercera posición del codón, se obtuvieron 3456 árboles más parsimoniosos (IC = 0.68, IH = 0.32). La topología del árbol de consenso estricto obtenido fue similar a la obtenida en el análisis donde se incluyeron todos los caracteres, excepto porque el subclado (P2) que agrupó a *P. poiteau* y *P. gemmifera* no se agrupó junto al resto de los taxa de *Palisada*.

El análisis donde se incluyó la matriz de la primera posición del codón produjo 27400 árboles más parsimoniosos (IC = 0.65, IH = 0.35). En la topología obtenida se recuperaron cuatro clados. Se recuperó el clado basal (O) de *Osmundea*. Se recuperaron además dos clados hermanos: uno de ellos, poco resuelto, que agrupó en una gran politomía la mayoría de las especies de *Palisada* y una especie del grupo externo. El otro clado, mejor resuelto, incluyó todos los taxa de *Laurencia* y una especie del grupo externo. Es de señalar además que el clado que agrupó a *P. gemmifera* y *P. poiteau* incluyó a *C. corallopsis* y se ubicó además en un clado diferente al que agrupó al resto de los taxa de *Palisada*.

El análisis que incluyó la matriz de la segunda posición del codón produjo 27300 árboles más parsimoniosos (IC = 0.60, IH = 0.40). En la topología obtenida se recuperaron tres clados pobremente resueltos, y dos de ellos fueron basales. Uno

de los clados agrupó todos los representantes de *Osmundea* y el otro incluyó a once taxa de *Laurencia* y un representante del grupo externo. Se distinguió además un tercer clado que incluyó todos los taxa de *Palisada*, el resto de los taxa de *Laurencia* y cuatro grupos externos.

El análisis de MP donde se incluyó la matriz de aminoácidos produjo 26000 árboles más parsimoniosos (IC = 0.63, IH = 0.37). En la topología obtenida se recuperaron tres clados. Se recuperó un clado basal que incluyó a todos los taxa de *Osmundea* y tres representantes del grupo externo. Se recuperaron otros dos clados hermanos: uno que incluyó a *L. caraibica*, *C. corallopsis* y dos especies del grupo externo. El otro clado, pobremente resuelto, incluyó a su vez tres subclados: un primer subclado que agrupó el resto de los taxa de *Palisada*, un segundo que agrupó el resto de los taxa de *Laurencia* y un tercero que agrupó únicamente a *L. venusta* y *L. brongniartii*.

Se realizaron además, análisis de MP con las dos matrices de datos creadas artificialmente: la primera y segunda parte del gen. La primera parte del gen, que incluyó 732 caracteres, presentó 420 caracteres constantes, 162 caracteres fueron variables no informativos para la parsimonia y 150 caracteres variables informativos para la parsimonia. El análisis de MP realizado con la primera parte del gen produjo 26,000 árboles más parsimoniosos (IC = 0.59, IH = 0.41). Los valores de los Índices excluyendo los caracteres no informativos fueron de: IC = 0.49 y IH = 0.51. En la segunda mitad del gen de los 735 caracteres incluidos, 400 caracteres fueron constantes, 65 caracteres variables no informativos para la parsimonia y 270 caracteres variables informativos para la parsimonia. El análisis de MP realizado con la segunda parte del gen produjo 1300 árboles más parsimoniosos (IC = 0.69, IH = 0.31). Los valores de los Índices excluyendo los caracteres no informativos fueron de: IC = 0.54 y IH = 0.46. Las topologías obtenidas con las matrices que incluyeron la primera y segunda parte del gen no se mostraron en este documento.

4.3.1.2 Análisis máxima verosimilitud y bayesiano.

Los cinco análisis de máxima verosimilitud [realizados con las matrices: a) de todos los caracteres de la matriz, b) de la primera posición del codón, c) de la segunda posición del codón, d) de la tercera posición del codón y e) de la matriz conformada por 1 + 3 posiciones del codón] se llevaron a cabo con el modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos GTR+I+G, mediante el cual se asume un modelo general de reversión a lo largo del tiempo (GTR), una proporción de sitios invariables (I) y una distribución gamma (G) para acomodar las diferencias de tasa de variación a lo largo del alineamiento. Los parámetros del modelo son: Frecuencia de bases: A = 0.33560, C = 0.12780, G = 0.19400 y T = 0.34260; tasas de sustitución (transversiones): [A-C]= 2.8689, [A-T]= 3.9217, [C-G]= 2.6489; transiciones [A-G]= 8.3590 y [C-T]= 24.2913; Valor del parámetro de distribución gamma de heterogeneidad de tasas entre posiciones = 1.1681 y Proporción de sitios invariables = 0.4895.

Los resultados de -ln L score obtenidos en los análisis de máxima verosimilitud se muestran en la Tabla 10. En el análisis donde se incluyó la matriz de todos los caracteres del gen, se produjo una topología de -ln L score = 13042.00620, en el análisis donde se incluyó la matriz de la primera posición del codón, el -ln L score fue de 2644.25177, en el análisis donde se incluyó la matriz de la segunda posición del codón se produjo una topología de -ln L score = 1389.89496, para el análisis donde se incluyó la matriz de la tercera posición del codón se produjo una topología de -ln L score = 8564.75961, para el análisis donde se incluyó la matriz de la primera + tercera posiciones del codón se produjo una topología de 11380.24271 y para el análisis donde se incluyó la matriz de proteínas se produjo una topología de -ln L score = 3350.08.

Tabla 10. Valores de -ln L score obtenidos en el Análisis de Máxima Verosimilitud para *rbcL*, RUBISCO espaciadora y 18S.

<i>rbcL</i>	Todo gen	1 ^{ra} posición codón	2 ^{da} posición codón	3 ^{ra} posición codón	Aminoácidos	1+3 posiciones del codón
- ln L score	13042.00620	2644.25177	1389.89496	8564.75961	3350.08	11380.24271

RUBISCO espaciadora	Todo gen
- ln L score	1294.35831

18S	Todo gen	Tallos	Horquillas
- ln L score	8150.01394	2818.45511	5373.83209

El análisis de máxima verosimilitud que se realizó para la matriz de proteínas se llevó a cabo con el modelo evolutivo de sustitución de aminoácidos: JTT+I+G; con una distribución gamma = 0.562; Proporción de sitios no variables = 0.504, Frecuencia de aminoácidos: A = 0.098, C = 0.008, D = 0.062, E = 0.052, F = 0.040, G = 0.088, H = 0.019, I = 0.061, K = 0.050, L = 0.079, M = 0.036, N = 0.041, P = 0.039, Q = 0.031, R = 0.052, S = 0.038, T = 0.066, V = 0.080, W = 0.017 y Y = 0.044.

Se realizaron análisis bayesianos (las inserciones - deleciones fueron codificados como datos ausentes) teniendo en cuenta por separado las matrices: a) de la primera posición, b) de la segunda posición y c) de la tercera posición del codón, d) de los datos de proteínas y e) de la matriz de la primera + tercera posiciones del codón. El modelo utilizado en el análisis bayesiano fue el GTR+I+G. Se corrieron 4 cadenas de Markov Chain Monte Carlo (1 caliente y 3 frías), muestreando 1 árbol cada 100 generaciones para un total de 1,000,000 generaciones, iniciando con un árbol al azar. La estacionalidad se alcanzó en la generación 25,000 y los árboles salvados hasta esta generación fueron descartados ("quemados"). Las inferencias filogenéticas se basaron en los árboles muestreados después de la generación 25,000 y se calculó un árbol de consenso de mayoría como está implementado en PAUP.

El análisis bayesiano que incluyó la matriz de todos los caracteres de *rbcL* resolvió las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato* y la topología obtenida fue similar a la obtenida en el análisis de máxima parsimonia donde se incluyeron todos los caracteres, excepto porque el clado que agrupó a *P. poiteaui* y *P. gemmifera* no se agrupó junto al resto de los taxa de *Palisada*.

El análisis que incluyó la matriz de la tercera posición del codón resolvió las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato* y la topología obtenida recuperó en el grupo interno el clado más basal de *Osmundea* con el taxón *O. sp.* Se recuperaron además otros tres clados: uno que incluyó a los taxa de *Laurencia*, un segundo que agrupó a la mayoría de los taxa de *Palisada*, y el tercero que agrupó únicamente a *P. gemmifera* y *P. poiteaui*. Esta topología fue similar a la obtenida mediante el Método de MP.

El análisis que incluyó la matriz de la primera + tercera posiciones del codón resolvió las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato*. La topología obtenida fue similar a la resultante en el análisis donde se incluyó la matriz de todos los caracteres del gen.

El análisis que incluyó la matriz de la primera posición del codón recuperó 3 clados. Se recuperó el clado basal de *Osmundea* que incluyó además a *L. translucida* GB. Se recuperaron además dos clados hermanos: uno agrupó a todos los taxa de *Palisada* y un representante del grupo externo, y el segundo agrupó a la mayoría de los taxa de *Laurencia* y un representante del grupo externo. Cabe destacar que en este segundo clado los taxa: *L. marilzae*, *L. sp. 2a*, *L. sp. 2b*, *L. brongniartii*, *L. complanata* y *Ceramium brevizonatum* se ubicaron en un mismo subclado. *Osmundea sp.* se agrupó en el clado de los representantes del grupo externo. La topología obtenida fue similar a la resultante en el método de MP.

El análisis que incluyó la matriz de la segunda posición del codón no recuperó las relaciones filogenéticas al interior de *Laurencia sensu lato*. *Laurencia translucida*

GB se agrupó en el clado de las especies del grupo externo. En el grupo interno se distinguieron dos clados: uno que incluyó indistintamente taxa de *Osmundea*, *Laurencia* y un representante del grupo externo, el otro clado agrupó indistintamente taxa de *Laurencia*, *Palisada* y un representante del grupo externo. La topología obtenida fue similar a la resultante en el método de MP.

Finalmente, el análisis que incluyó la matriz de secuencias de aminoácidos no recuperó las relaciones filogenéticas al interior de *Laurencia sensu lato*. Se recuperó un clado pobremente resuelto, al interior del cual se distinguieron cuatro subclados: uno que incluyó a *P. poiteaui* y *P. gemmifera*, otro que agrupó a *L. marilzae*, *L. sp. 2a* y *L. sp. 2b*, un tercero que agrupó indistintamente especies de *Osmundea* y *Laurencia*, y un cuarto que incluyó taxa de *Palisada*, *Laurencia* y cinco representantes del grupo externo. La topología obtenida fue similar a la resultante en el método de MP.

4.3.2 Región RUBISCO espaciadora.

4.3.2.1 Análisis máxima parsimonia.

Se realizaron análisis filogenéticos tratando las inserciones - deleciones como datos ausentes y como quinta base (Tabla 3).

El análisis de MP (las inserciones - deleciones fueron codificadas como datos ausentes) produjo 2378 árboles más parsimoniosos (Tabla 3). La topología del árbol de consenso estricto obtenido, con los correspondientes valores de bootstrap, jackknife e índice de decaimiento se muestran en la Figura 18.

IC=0.41, IH=0.59

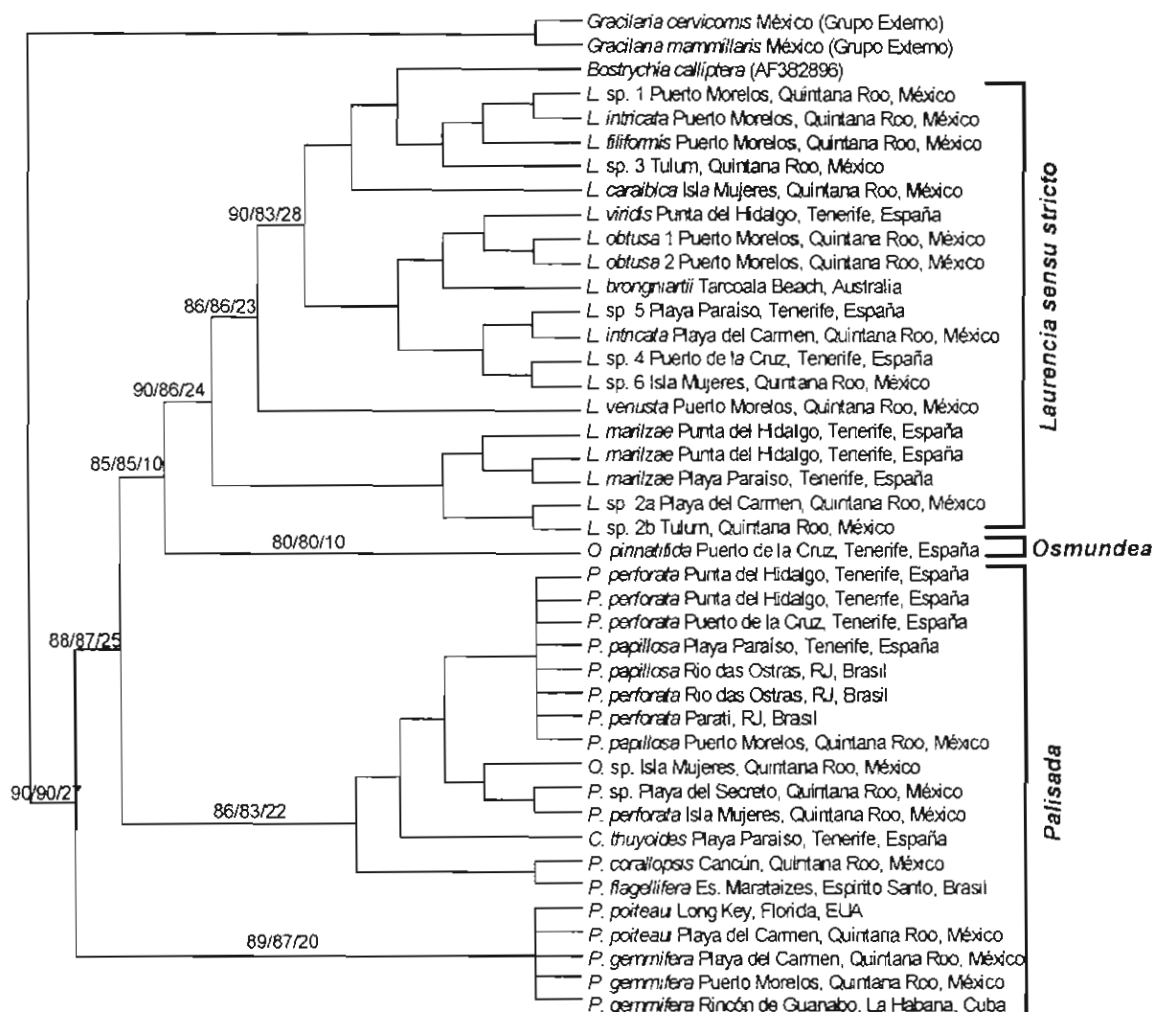


Figura 18. Consenso estricto de 2378 árboles de Máxima Parsimonia basado en secuencias de RUBISCO espaciadora. Valores de Bootstrap, Jakknife (1000 réplicas) e Índice de Decaimiento se indican en los nodos. Gaps codificados como Datos ausentes.

La topología obtenida recuperó el clado de *Laurencia sensu lato* (CL) como grupo monofilético sustentado por valores de bootstrap, jackknife e índice de decaimiento, en relación a los taxa incluidos en el grupo externo. Se recuperaron tres clados, uno de ellos basal y los otros dos hermanos. El más basal incluyó a *P. gemmifera* y *P. poiteau*. De los clados hermanos: uno agrupó a los taxa de *Laurencia*, *O. pinnatifida* y un representante del grupo externo. El otro clado incluyó los taxa de *Palisada* y *O. sp.*

El análisis de MP (inserciones - deleciones fueron codificados como quinta base) produjo 1584 árboles más parsimoniosos (Tabla 3). Dicho análisis recuperó el clado de *Laurencia* como grupo monofilético sustentado por altos valores de bootstrap, jackknife e índice de decaimiento, en relación a los taxa incluidos en el grupo externo. Se recuperaron además tres clados, uno de ellos basal, y los otros dos hermanos. La mayoría de los taxa de *Palisada* se distribuyeron en el clado basal junto a *O. sp.* De los clados hermanos: uno agrupó a *P. gemmifera* y *P. poiteaui*, y el segundo agrupó a los taxa de *Laurencia*, *O. pinnatifida* y un representante del grupo externo. Si se compara este análisis con el análisis donde se trataron las inserciones – deleciones como datos ausentes, coinciden en que los taxa de *Palisada* se distribuyeron en dos clados separados. Difirieron en la posición de varios clados: en el caso de que las inserciones – deleciones fueron tratadas como datos ausentes, *O. pinnatifida* se ubicó en un clado hermano a los taxa de *Laurencia*, *B. calliptera* se ubicó dentro del clado de los taxa de *Laurencia* y el clado de *L. marilzae* - *L. sp. 2a* - *L. sp. 2b* se ubicó en un clado hermano al resto de los taxa de *Laurencia*.

En el caso de que las inserciones - deleciones fueron tratadas como datos ausentes, *O. pinnatifida* se ubicó dentro del clado de los taxa de *Laurencia*, *Bostrychia calliptera* se ubicó en el grupo interno, en un clado hermano a los taxa de *Laurencia* y el clado de *L. marilzae* - *L. sp. 2a* - *L. sp. 2b* se ubicó en el mismo clado de los taxa de *Laurencia*.

4.3.2.2 Análisis máxima verosimilitud y bayesiano.

El análisis de máxima verosimilitud, con la opción de inserciones - deleciones tratados como datos ausentes, se llevó a cabo con el modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos: GTR+I+G. Los parámetros del modelo son: Frecuencia de bases: A = 0.40580, C = 0.12760, G = 0.12560 y T = 0.34100; matriz de tasa de cambio: [A–C]= 1.0000, [A–G]= 3.169100, [A–T]= 0.632600, [C–G]= 0.632600, [C–T]= 3.169100; distribución gamma = 2.3889 y Proporción de sitios invariables =

0.2142. El resultado de $-\ln L$ score obtenido en el análisis de máxima verosimilitud se muestra en la Tabla 10 y produjo una topología de $-\ln L$ score = 1294.35831.

En el análisis bayesiano se utilizó el modelo obtenido en el análisis de máxima verosimilitud: GTR+I+G. Se corrieron 4 cadenas de Markov Chain Monte Carlo (1 caliente y 3 frías), muestreando 1 árbol cada 100 generaciones para un total de 1,000,000 generaciones, iniciando con un árbol al azar. La estacionalidad se alcanzó en la generación 26,000 y los árboles salvados hasta esta generación fueron descartados ("quemados"). Las inferencias filogenéticas se basaron en los árboles muestreados después de la generación 26,000 y se calculó un árbol de consenso de mayoría como está implementado en PAUP.

En la topología resultante se recuperaron tres clados poco resueltos. Uno de los clados agrupó a *P. flagellifera* y *C. corallopsis*, un segundo clado agrupó al resto de los taxa de *Palisada*, a *O. sp.* y a *P. gemmifera* y *P. poiteau*. El tercer clado incluyó a su vez tres subclados: el primero incluyó a *O. pinnatifida*, el segundo a *L. marilzae* - *L. sp. 2a* - *L. sp. 2b*, y el tercero agrupó al resto de los taxa de *Laurencia* y un representante del grupo externo.

4.3.3 Región 18S.

4.3.3.1 Análisis máxima parsimonia.

Se realizaron análisis filogenéticos tratando las inserciones - deleciones como datos ausentes y como quinta base (Tabla 4).

El análisis de MP (las inserciones - deleciones codificadas como datos ausentes) que incluyó la matriz de todos los caracteres de 18S produjo 588 árboles más parsimoniosos (Tabla 4). La topología del árbol de consenso estricto obtenido, con los correspondientes valores de bootstrap, jackknife e índice de decaimiento se muestran en la Figura 19.

IC=0.61, IH=0.39

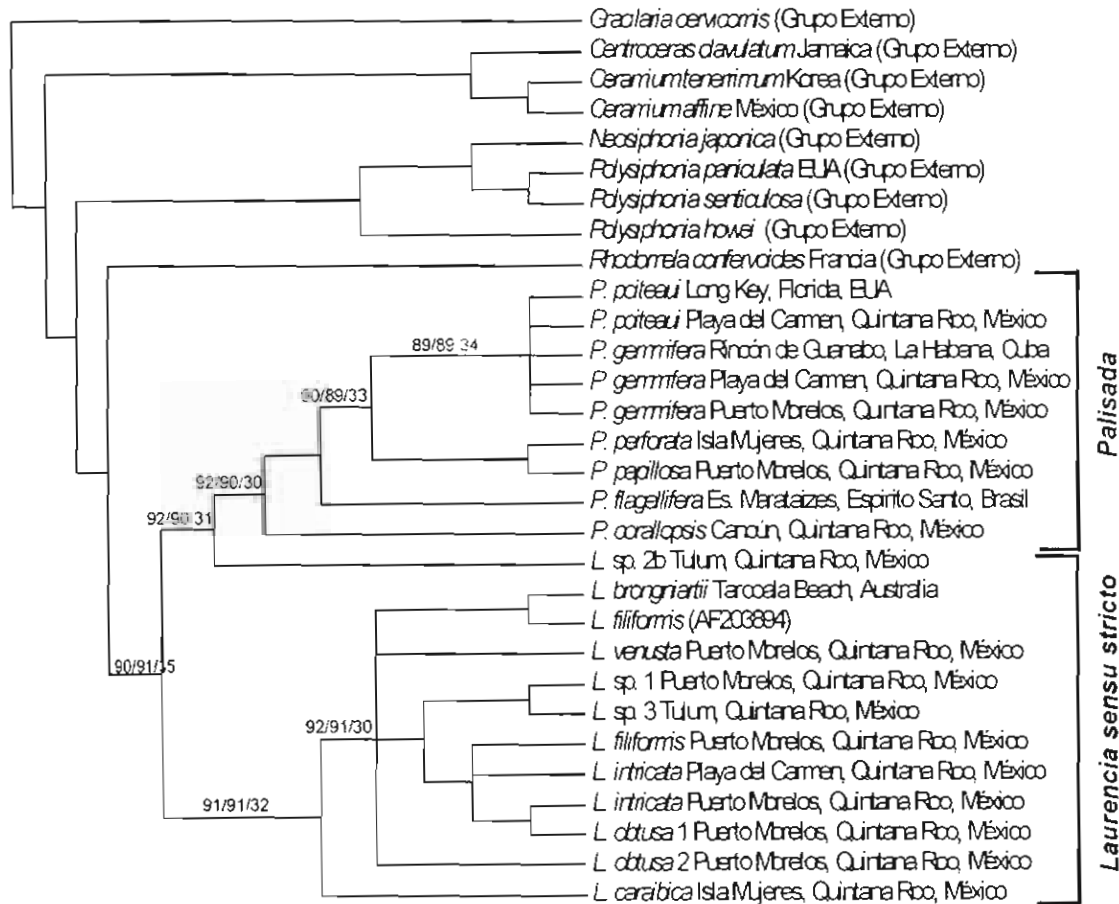


Figura 19. Consenso estricto de 588 árboles de Máxima Parsimonia basado en secuencias de 18S. Valores de Bootstrap, Jakknife (1000 réplicas) e Índice de Decaimiento se indican en los nodos. Gaps codificados como Datos ausentes.

Dicho análisis recuperó el clado de *Laurencia* y *Palisada* como grupos monofiléticos sustentados por altos valores de bootstrap, jackknife e índice de decaimiento, en relación a los taxa incluidos en el grupo externo. Los taxa correspondientes a los géneros *Laurencia* y *Palisada* se agruparon en clados hermanos. El clado de *Laurencia* incluyó a su vez dos subclados: uno que agrupó únicamente a *L. caribica*, y el segundo poco resuelto que incluyó al resto de los representantes de *Laurencia*. El clado de *Palisada* se encontró bien resuelto e incluyó a su vez a *L. sp. 2b*. Dicho taxón se ubicó en un clado hermano al clado que agrupó a los representantes de *Palisada*. Cabe destacar que no se incluyó en el análisis de este gen ningún representante de *Osmundea*, por la falta de disponibilidad de secuencias.

Se realizaron análisis adicionales de MP con matrices que incluyeron: a) la zona de horquillas y b) la zona de tallos. El análisis de MP que incluyó la matriz de la zona de horquillas produjo 48 árboles más parsimoniosos (Tabla 4). La topología resultante del análisis presentó una topología similar a la obtenida incluyendo todos los caracteres.

El análisis de MP que incluyó la matriz de la zona de tallos produjo 29 árboles más parsimoniosos (Tabla 4). Dicha topología no resolvió las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato*. Se recuperaron dos clados pobremente resueltos: uno que incluyó únicamente a *P. poiteau*. El otro clado incluyó a su vez cuatro subclados: uno que agrupó a *P. gemmifera* y *P. poiteau*, un segundo que incluyó a su vez cuatro subclados: uno que incluyó a *P. gemmifera*, otro que agrupó a *Palisada flagellifera*, *P. papillosa* y *C. corallopsis*, un tercero que agrupó únicamente a *L. brongniartii* y un cuarto que agrupó el resto de los representantes de *Laurencia*, pobremente resuelto.

El análisis de MP (las inserciones - deleciones codificados como quinta base) que incluyó todos los caracteres de 18S produjo 271 árboles más parsimoniosos (Tabla 4). Dicho análisis no resolvió las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato*; se recuperaron dos clados: uno que incluyó a *P. poiteau* y otro que agrupó al resto de los taxa de *Palisada* y todos los taxa de *Laurencia*.

El análisis de MP que incluyó la matriz de la zona de horquillas produjo 49 árboles más parsimoniosos (Tabla 4). La topología del árbol de consenso estricto fue similar a las topologías obtenidas con el análisis de las matrices donde se incluyeron: a) todos los caracteres del gen y b) la zona de horquillas (las inserciones - deleciones se codificaron como datos ausentes). En la topología resultante se recuperaron los clados correspondientes a los géneros *Palisada* y *Laurencia*. El taxón *L. sp. 2b* se ubicó en un grupo hermano a los representantes de *Palisada*. El clado de *Laurencia* incluyó dos subclados: uno que incluyó

solamente a *L. caraibica* y otro que agrupó al resto de los representantes de *Laurencia* pobremente resuelto.

El análisis de MP que incluyó la matriz de la zona de tallos produjo 29 árboles más parsimoniosos (Tabla 4). La topología del árbol de consenso estricto obtenido fue similar a la topología obtenida con el análisis de la matriz de la zona de tallos (inserciones - deleciones codificados como datos ausentes). Este análisis no resolvió las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato*. Se recuperó el clado de *Laurencia* como grupo monofilético e incluyó dos subclados: uno que agrupó únicamente a *L. brongniartii* y otro subclado que agrupó el resto de los representantes de *Laurencia*, pobremente resuelto. Los taxa de *Palisada* no se agruparon en un clado monofilético: *Palisada flagellifera*, *P. papillosa* y *C. corallopsis* se agruparon en un clado hermano a *Laurencia*. *Palisada gemmifera* se agrupó en un clado único, al igual que pasó con *P. poiteaui*.

4.3.3.2 Análisis máxima verosimilitud y bayesiano.

Los tres análisis de máxima verosimilitud [realizados con las matrices: a) de todos los caracteres de la matriz, b) de la zona de tallos y c) de la zona de horquillas] se llevaron a cabo con el modelo evolutivo de sustitución de nucleótidos: GTR+I+G. Los parámetros del modelo son: Frecuencia de bases: A = 0.33560, C = 0.12780, G = 0.19400 y T = 0.34260; matriz de tasa de cambio: [A-C]= 2.869000, [A-G]= 8.359100, [A-T]= 3.921900, [C-G]= 2.648800, [C-T]= 24.291200; distribución gamma = 1.1681 y Proporción de sitios invariables = 0.4895.

Los resultados de -ln L score obtenidos en los análisis de máxima verosimilitud se muestran en la Tabla 10. En el análisis donde se incluyó la matriz de todos los caracteres, el -ln L score fue de 8150.01394, en el análisis donde se incluyó la matriz de la zona de tallos se produjo una topología de -ln L score = 2818.45511 y en el análisis donde se incluyó la matriz de la zona de horquillas se produjo una topología de -ln L score = 5373.83209.

Se realizaron análisis bayesianos (las inserciones - deleciones codificadas como datos ausentes) donde se incluyeron las matrices: a) de todos los caracteres del gen, b) de la zona de horquillas y c) de la zona de tallos. El modelo utilizado en el análisis bayesiano fue el obtenido en el análisis de máxima verosimilitud: GTR+I+G. Se corrieron 4 cadenas de Markov Chain Monte Carlo (1 caliente y 3 frías), muestreando 1 árbol cada 100 generaciones para un total de 1,000,000 generaciones iniciando con un árbol al azar. La estacionalidad se alcanzó en la generación 26,500 y los árboles salvados hasta esta generación fueron descartados ("quemados"). Las inferencias filogenéticas se basaron en los árboles muestreados después de la generación 26,500 y se calculó un árbol de consenso de mayoría como está implementado en PAUP.

En el análisis bayesiano, donde se incluyó la matriz de todos los caracteres de 18S, se recuperaron los clados de *Laurencia* y *Palisada* como grupos hermanos. El clado de *Laurencia* incluyó dos subclados: uno conformado únicamente por *L. obtusa* 2 y otro que incluyó al resto de los representantes de *Laurencia*. El clado de *Palisada* incluyó a su vez dos subclados: uno conformado únicamente por *Laurencia* sp. 2b y otro que agrupó a los representantes de *Palisada*. Dicho clado de *Palisada* incluyó además a *P. gemmifera* y *P. poiteau*.

El análisis bayesiano que incluyó la matriz de la zona de horquillas resultó en una topología similar a la obtenida en el análisis donde se incluyó la matriz de todos los caracteres de 18S.

El análisis bayesiano realizado con la matriz de la zona de tallos dio una topología similar a la obtenida con el análisis de máxima parsimonia donde se incluyó la matriz de zona de tallos. Este análisis no resolvió las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato*, y se recuperaron dos clados pobremente resueltos. Uno de ellos incluyó a *P. gemmifera* y *P. poiteau*. El otro clado incluyó a su vez dos subclados: uno que agrupó a *P. flagellifera*, *P. papillosa* y *C. corallopsis*, y otro que agrupó todos los taxa de *Laurencia*, pobremente resuelto.

4.4 Análisis particionados.

La prueba de partición homogénea indicó que las matrices a) de la primera posición del codón b) de la tercera posición del codón y c) de la región espaciadora no fueron significativamente diferentes ($p = 0.089000$), y pueden ser combinadas. Lo mismo sucedió con las matrices combinadas: d) de la zona de horquillas + la región espaciadora ($p = 0.075433$), e) de la zona de horquillas + primera + tercera posiciones del codón ($p = 0.070100$) y f) de la zona de horquillas + la primera + tercera posiciones del codón + la región espaciadora ($p = 0.082667$) (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados de Análisis de Parsimonia y Test g_i para los análisis particionados.

Gaps Quinta Base	Valor p	Sitios Variables Informativos Parsimonia	No. Sitios Constantes	Estadístico g_i	Media $\pm$ DS	IC	IH	No Árboles + Pars.	IC (Excluidos Caracteres No Inf.)	IH (Excluidos Caracteres No Inf.)
Horquillas + 13 posiciones	0.070100	190	1150	- 1.04059	- 0.1217279 $\pm$ 0.07333002	0.74	0.25	32	0.57	0.42
Horquillas + 13 posiciones + espaciadora	0.082667	400	1184	- 1.333197	0.03564711 $\pm$ 0.00971514	0.78	0.21	3	0.64	0.35
13 posiciones + espaciadora	0.089000	446	439	- 1.496292	0.03467412 $\pm$ 0.00772604	0.80	0.19	2	0.75	0.24
Horquillas + espaciadora	0.075433	145	779	- 1.069970	0.03361234 $\pm$ 0.00881903	0.70	0.29	6	0.53	0.46

El análisis particionado que incluyó la matriz de la primera + tercera posiciones del codón + la región espaciadora incluyó 1110 caracteres y 41 taxa. El análisis de máxima parsimonia produjo 2 árboles mas parsimoniosos (Figura 20). Se utilizaron como grupos externos *Gracilaria cervicornis* y *Gracilaria mammillaris*. La topología obtenida resolvió las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato* y fue similar a la producida con el análisis de máxima parsimonia que incluyó todo el gen *rbcL*. Sólo se diferenciaron en que *Osmundea* sp. se ubicó en un clado único, más basal que *O. pinnatifida*.

IC=0.80, IH=0.19

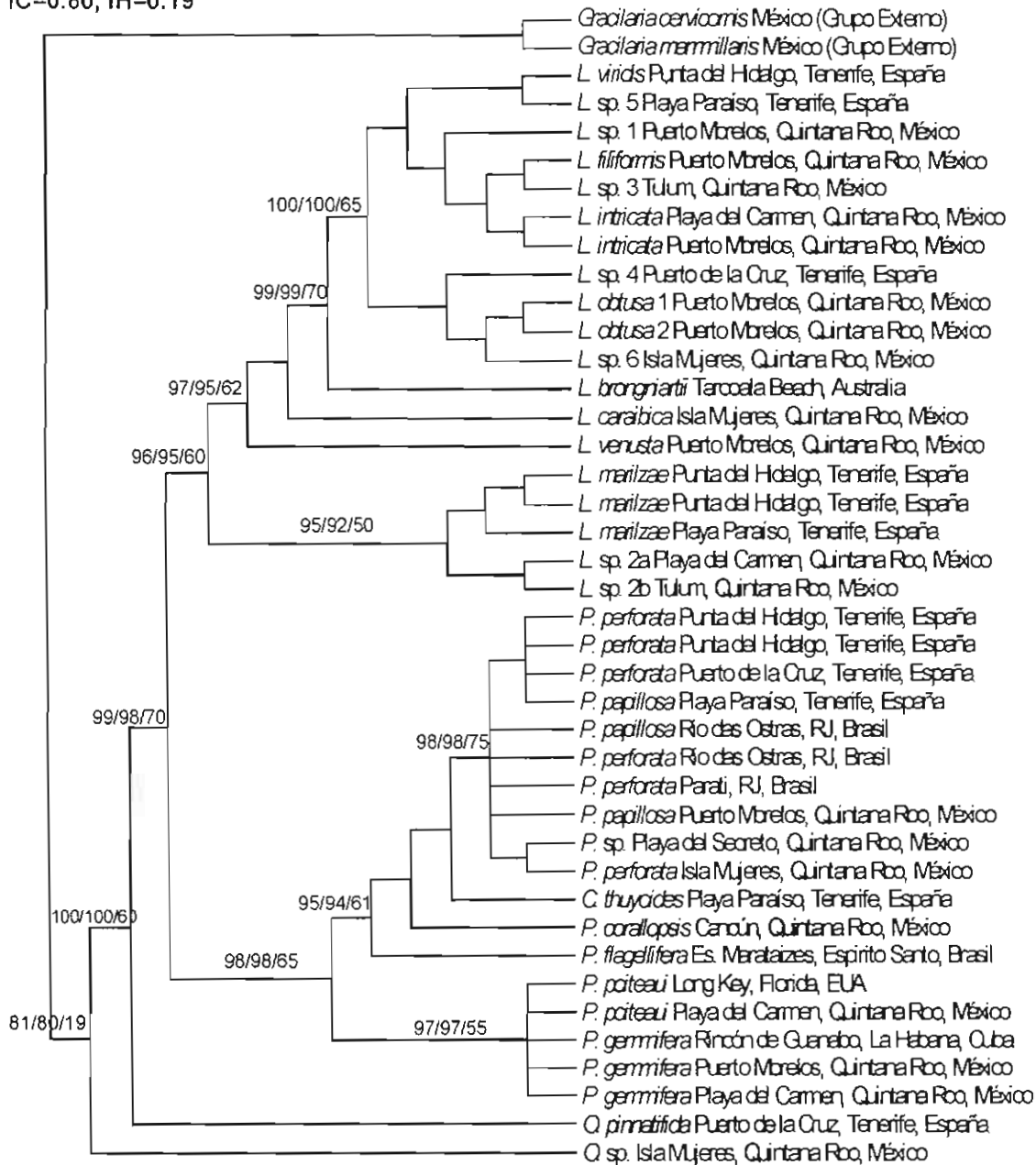


Figura 20. Consenso estricto de Máxima Parsimonia basado en datos combinados que incluyen la primera y tercera posiciones del codón y la región espaciadora. Valores de Bootstrap, Jakkknife (1000 réplicas) e Índice de Decaimiento se indican en los nodos.

El análisis particionado que incluyó la matriz de la zona de horquillas + la región espaciadora incluyó 1226 caracteres y 20 taxa. El análisis de máxima parsimonia produjo 6 árboles mas parsimoniosos y resolvió en parte las relaciones al interior

de *Laurencia sensu lato* (Figura 21). Se utilizó como grupo externo *Gracilaria cervicornis* y se recuperaron tres clados en este análisis. El clado más basal agrupó a *P. poiteaui* y *P. gemmifera*. Un segundo clado hermano a *Laurencia* incluyó a *P. flagellifera*, *C. corallopsis* y *P. papillosa*. El taxón *L. sp. 2b* se ubicó en un clado hermano al resto de los taxa de *Laurencia*.

IC=0.70, IH=0.29

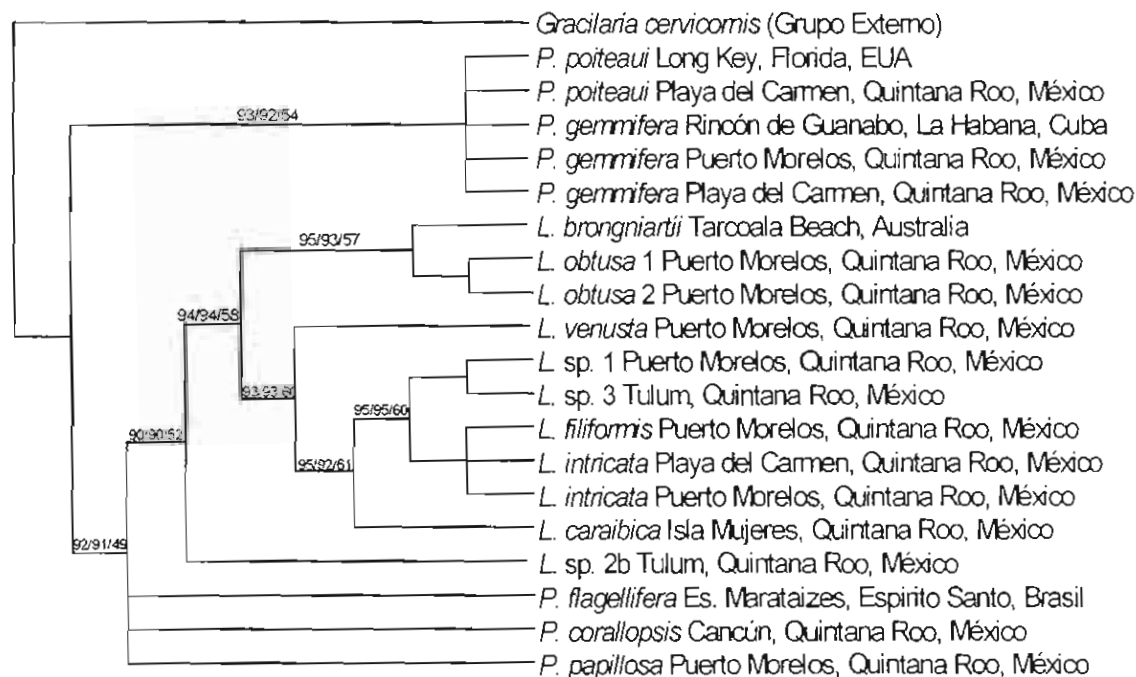


Figura 21. Consenso estricto de Máxima Parsimonia basado en datos combinados que incluyen la zona de horquillas y la región espaciadora. Valores de Bootstrap, Jakknife (1000 réplicas) e Índice de Decaimiento se indican en los nodos.

El análisis particionado que incluyó la matriz de la zona de horquillas + la primera + tercera posiciones del codón incluyó 2072 caracteres y 21 taxa. El análisis de máxima parsimonia produjo 32 árboles mas parsimoniosos y resolvió en parte las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato* (Figura 22). Se utilizaron como grupos externos *Gracilaria cervicornis* y *Centroceras clavulatum*. Se recuperaron cuatro clados: el mas basal agrupó únicamente a *P. poiteaui*, otro clado agrupó muestras de *P. gemmifera*, un tercero incluyó a *P. flagellifera*, *C. corallopsis* y *P. papillosa* y un cuarto que agrupó todos los taxa de *Laurencia* en dos subclados. El taxón *L. sp. 2b* se ubicó en un subclado hermano al resto de los taxa de *Laurencia*.

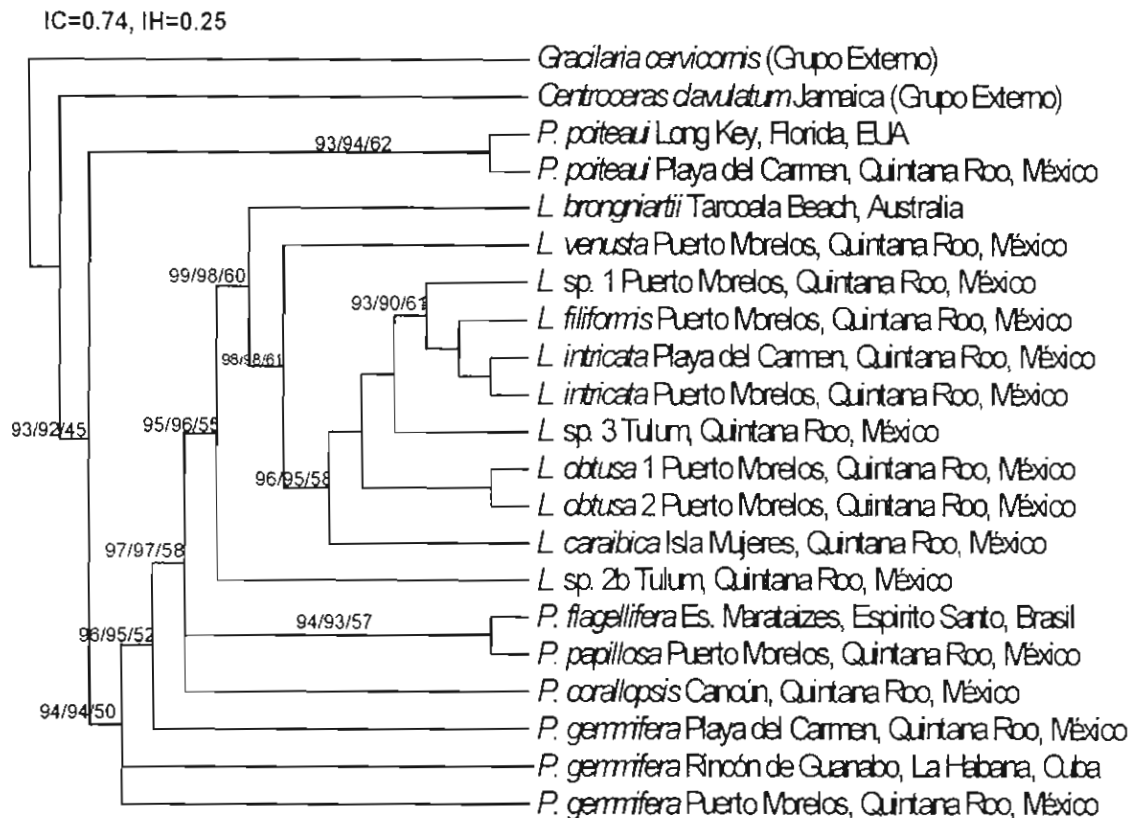


Figura 22. Consenso estricto de Máxima Parsimonia basado en datos combinados que incluyen la zona de horquillas y la primera y tercera posiciones del codón. Valores de Bootstrap, Jakkknife (1000 réplicas) e Índice de Decaimiento se indican en los nodos.

El análisis particionado que incluyó la matriz de la zona de horquillas + la primera + tercera posiciones del codón + la región espaciadora incluyó 2204 caracteres y 20 taxa. El análisis de máxima parsimonia produjo 3 árboles mas parsimoniosos y resolvió en parte las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato* (Figura 23). Se utilizó como grupo externo a *Gracilaria cervicornis* y se recuperaron tres clados en el análisis. El clado mas basal incluyó a *P. poiteau* y *P. gemmifera*. Un segundo clado hermano a *Laurencia*, incluyó a *P. flagellifera*, *C. corallopsis* y *P. papillosa*. El taxón *L. sp. 2b* se ubicó en un subclado hermano al resto de los taxa de *Laurencia*.

IC=0.78, IH=0.21

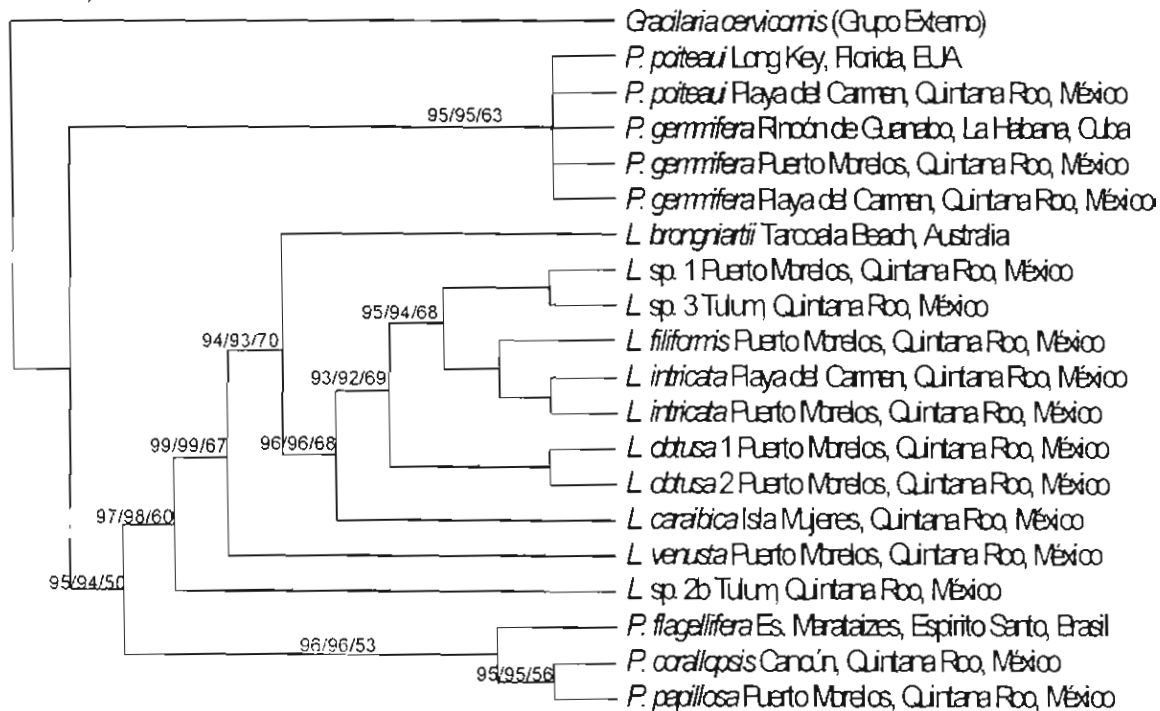


Figura 23. Consenso estricto de Máxima Parsimonia basado en datos combinados que incluyen la zona de horquillas, la primera y tercera posiciones del codón y la región espaciadora. Valores de Bootstrap, Jakkknife (1000 réplicas) e Índice de Decaimiento se indican en los nodos.

La prueba de partición homogénea indicó que la matriz resultante de la suma de los datos de proteínas + RUBISCO espaciadora fueron significativamente diferentes ($p = 0.005000$), y por tanto no pudieron ser combinados estos datos para realizar análisis filogenéticos. Lo mismo sucedió con las matrices resultantes de la suma: a) de los datos de proteínas + la zona de horquillas ($p = 0.009000$) y b) de los datos de proteínas + RUBISCO espaciadora + primera posición del codón + segunda posiciones del codón ($p = 0.004030$).

El estadístico g_1 (las inserciones - deleciones codificados como datos ausentes) indicó que las matrices; a) de la primera + tercera posiciones del codón + RUBISCO espaciadora ($g_1 = -1.496292$), b) de la zona de horquillas + primera + tercera posiciones del codón + RUBISCO espaciadora ($g_1 = -1.333197$), c) de la zona de horquillas + primera + tercera posiciones del codón ($g_1 = -1.04059$) y d)

de la zona de horquillas + RUBISCO espaciadora ($g_1 = -1.069970$) presentaron señal filogenética significativa (Tabla 11).

4.5 Análisis filogenético adicional.

Los análisis de MP y bayesiano que se realizaron hasta el momento, fueron con matrices heterogéneas, es decir con matrices que incluyeron diferente número de taxa (en el grupo interno) en cada gen. En el análisis de *rbcL* un total de 65 secuencias fueron analizadas incluyendo los ocho grupos externos. En la región RUBISCO espaciadora un total de 42 secuencias fueron analizadas incluyendo los tres grupos externos y finalmente en el gen 18S un total de 30 secuencias fueron analizadas incluyendo los nueve grupos externos.

Teniendo en cuenta lo anteriormente señalado se realizaron análisis filogenéticos adicionales de MP (las inserciones - deleciones fueron codificados como datos ausentes) para cada gen con matrices homogéneas, es decir con matrices que comprenden 21 taxa en el grupo interno, y que fueron secuenciados en los tres genes.

En el análisis del gen *rbcL* (Figura 24) la posición de los clados que incluyó a los grupos externos se mantuvo estable con respecto al análisis de MP de *rbcL* donde se incluyeron mayor número de taxa (65). Se recuperó el clado monofilético de *Laurencia* y se mantuvieron estables los clados que incluyeron los siguientes taxa: *L. brongniartii*, *L. venusta*, *L. caraibica*, *L. sp. 2b*, *L. obtusa 1* y *L. obtusa 2*. El clado que incluyó a *L. filiformis*, *L. intricata*, *L. sp. 1* y *L. sp. 3* también se mantuvo estable, pero a diferencia del análisis de *rbcL* con 65 taxa las relaciones al interior de este clado no fueron resueltas. No se recuperó a *Palisada* como clado monofilético. El clado que incluyó a *P. gemmifera* y *P. poiteau* es inestable pero las relaciones a su interior se resolvieron igual que en el análisis de *rbcL* con mayor número de taxa. Lo mismo sucedió con el clado que agrupó a *C. corallopsis*, *P. papillosa* y *P. perforata*. El clado de *P. flagellifera* también se mantuvo inestable.

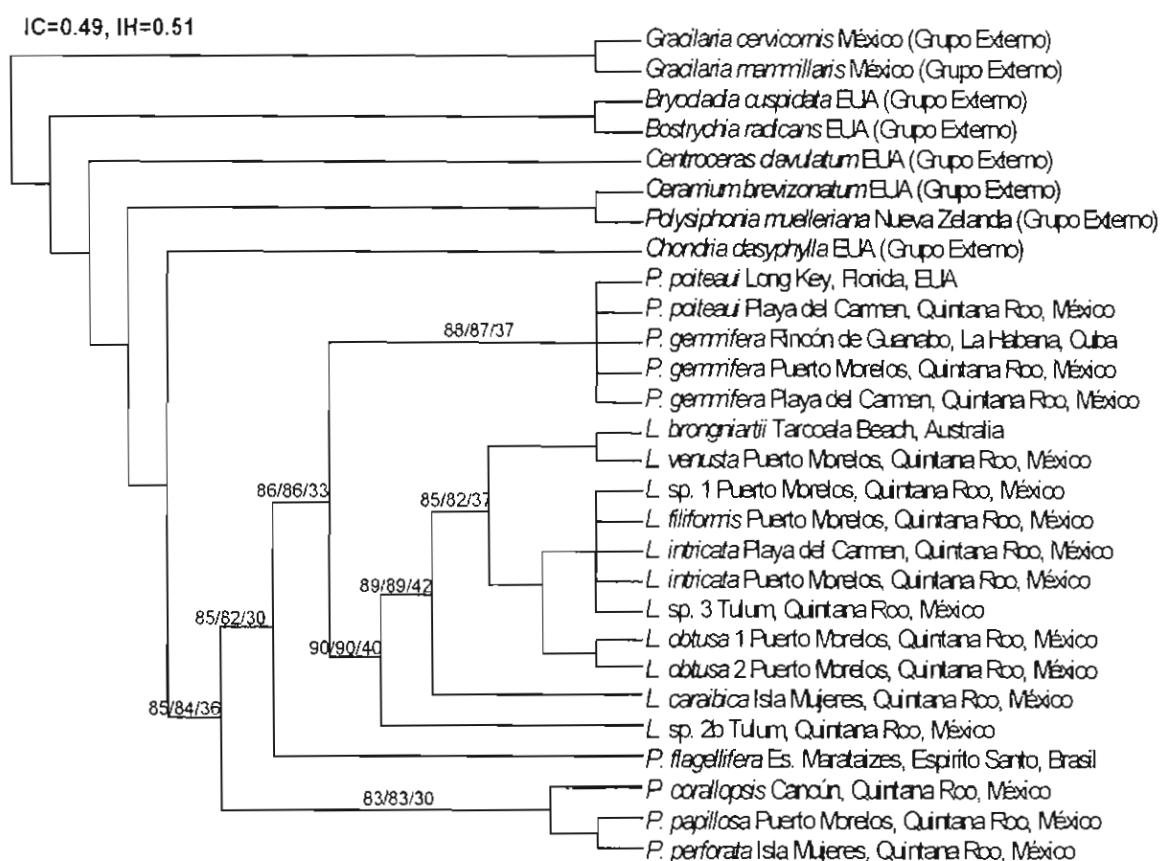


Figura 24. Consenso estricto de Máxima Parsimonia basado en 21 secuencias de *rbcL*. Valores de Bootstrap, Jakkknife (1000 réplicas) e Índice de Decaimiento se indican en los nodos.

En el análisis de la región RUBISCO espaciadora (Figura 25) la posición de los clados que incluyó a los grupos externos se mantuvo estable con respecto al análisis de MP de RUBISCO espaciadora donde se incluyeron mayor número de taxa (42). Se recuperó el clado monofilético de *Laurencia* y se mantuvieron estables los clados que incluyeron los siguientes taxa: *L. brongniartii*, *L. venusta*, *L. caraibica*, *L. sp. 2b*, *L. obtusa 1* y *L. obtusa 2*. El clado que incluyó a *L. filiformis*, *L. intricata*, *L. sp. 1* y *L. sp. 3* también se mantuvo estable, pero a diferencia del análisis de RUBISCO espaciadora, incluyendo 42 taxa, las relaciones al interior de este clado no se resolvieron. No se recuperó a *Palisada* como clado monofilético. El clado que incluyó a *P. gemmifera* y *P. poiteau* es estable, al igual que los clados que incluyeron los siguientes taxa: *P. corallopsis*, *P. papillosa* y *P. perforata*. El clado de *P. flagellifera* sin embargo se mantuvo inestable.

IC=0.41, IH=0.59

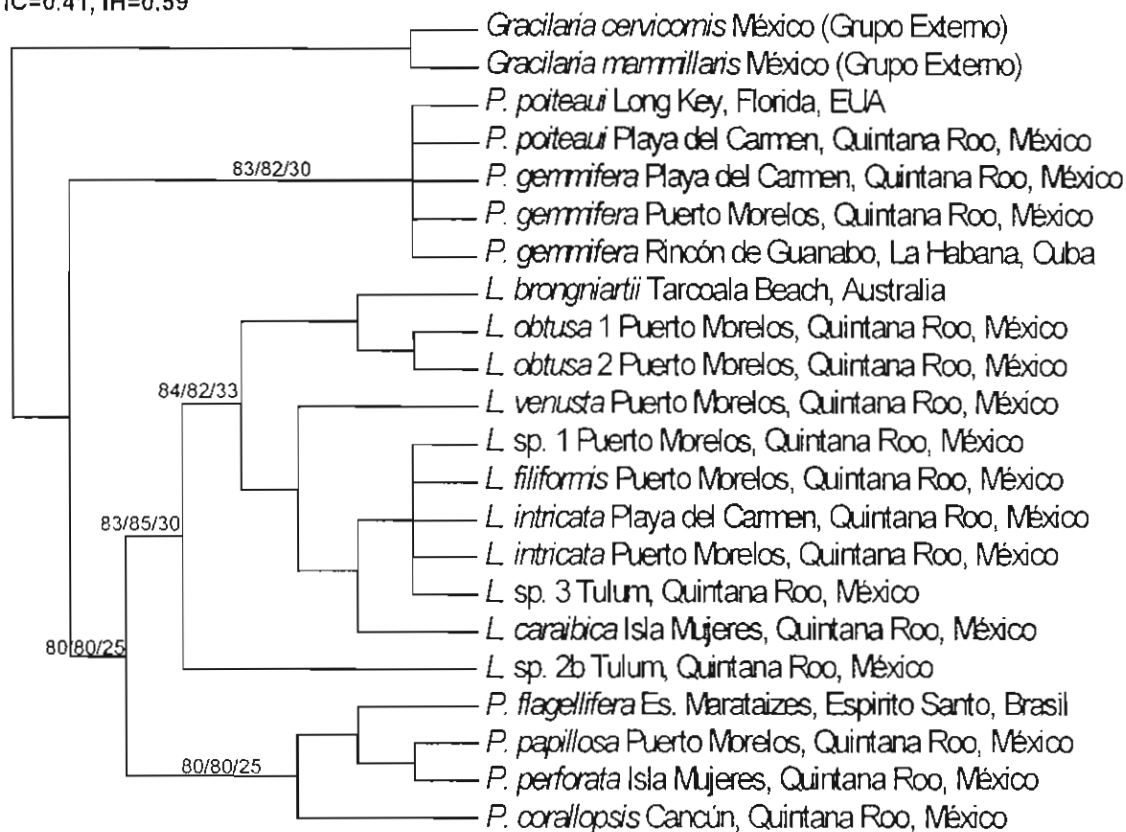


Figura 25. Consenso estricto de Máxima Parsimonia basado en 21 secuencias de RUBISCO espaciadora. Valores de Bootstrap, Jakkknife (1000 réplicas) e Índice de Decaimiento se indican en los nodos.

En el análisis del gen 18S (Figura 26) la posición de los clados que agruparon a los grupos externos se mantuvo estable con respecto al análisis de 18S donde se incluyeron mayor número de taxa (30). Se recuperó el clado monofilético de *Laurencia* y se mantuvieron estables los clados que incluyeron todos los taxa. Se recuperó a *Palisada* como clado monofilético y se mantuvieron estables los clados que incluyeron todos los taxa.

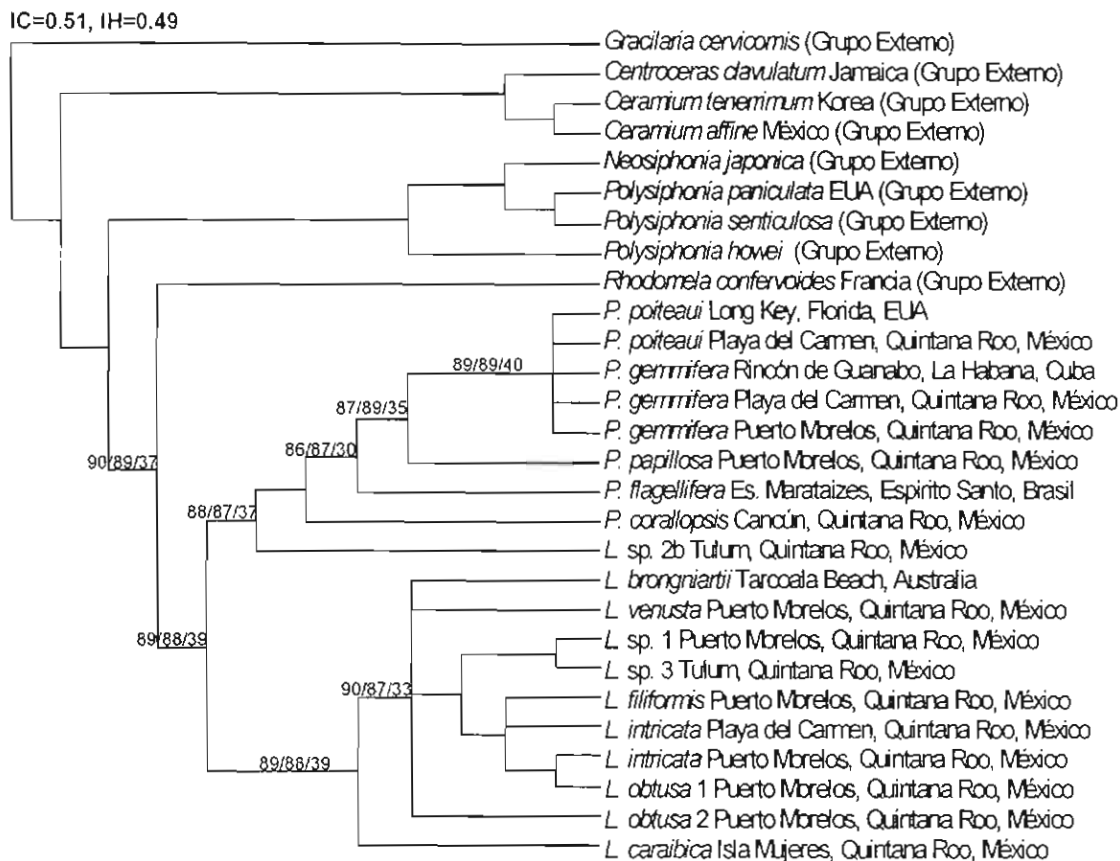


Figura 26. Consenso estricto de Máxima Parsimonia basado en 21 secuencias de 18S. Valores de Bootstrap, Jakkknife (1000 réplicas) e Índice de Decaimiento se indican en los nodos.

El estadístico g_1 (las inserciones - delecciones fueron codificados como datos ausentes) indicó que las matrices: a) del gen *rbcL* ($g_1 = -0.337143$; $-0.1256658 \pm 0.00881903$), b) del gen 18S ($g_1 = -0.445979$; $-0.03467714 \pm 0.00772604$) y c) de la Región espaciadora ($g_1 = -0.281213$; $-0.03564714 \pm 0.00971514$) presentaron señal filogenética significativa.

5. DISCUSIÓN

5.1 Divergencia en las secuencias de *rbcL*.

Los valores de divergencia intergenérica obtenidos en este estudio fueron comparables a los reportados por otros autores para el complejo *Laurencia*. Nam *et al.*, (2000) y McIvor *et al.*, (2002b) reportaron valores de divergencia intergenérica que oscilaron de 11% entre *L. obtusa* vs. *Osmundea pinnatifida* (Hudson) Stackhouse a 13% entre *L. obtusa* vs. *O. hybrida* (Nam *et al.*, 2000) y McIvor *et al.*, (2002b) registraron valores que oscilaron de 11% entre *O. pinnatifida* vs. *L. obtusa* a 13% entre *O. blinksii* (Hollenberg *et al.* A. Abbott) K.W. Nam vs. *Palisada papillosa*. Díaz *et al.*, (2007) obtuvieron valores de divergencia intergenérica que oscilaron de 10 a 12% para *Chondrophycus* y *Laurencia*, y de 10 a 13% para *Chondrophycus* y *Osmundea* y de 11 a 13% para *Osmundea* y *Laurencia*. Freshwater *et al.*, (1999) registraron para cuatro géneros de algas rojas: *Gelidiella*, *Pterocladia*, *Gelidium* y *Pterocladella* valores de divergencia intergenérica que oscilaron de 10.2 a 15.7%.

Los valores de divergencia interespecífica obtenidos en este estudio fueron comparables con los reportados por otros autores para el género *Osmundea*. Nam *et al.*, (2000) estimaron porcentajes de divergencia que oscilaron de 5% (*O. osmunda* (S.G. Gmelin) K.W. Nam & Maggs vs. *O. pinnatifida*) a 9% (*O. hybrida* vs. *O. truncata* (Kützinger) K.W. Nam *et al.* Maggs), y McIvor *et al.*, (2002b) registraron valores que oscilaron de 2% (*O. blinksii* vs. *O. splendens* (Hollenberg) K.W. Nam) a 9% (*O. blinksii* vs. *O. truncata*). Díaz *et al.*, (2007) obtuvieron valores de divergencia interespecífica para las especies de *Laurencia* que oscilaron de 6 a 8%, para *Chondrophycus* oscilaron de 6 a 9%, mientras que para *Osmundea* oscilaron de 7 a 8%. Freshwater *et al.*, (1995) señalaron que los niveles de divergencia interespecífica en las algas rojas pueden presentar valores máximos de 11% en un mismo género. Freshwater *et al.*, (1999) registraron para cuatro géneros de algas rojas: *Gelidiella*, *Pterocladia*, *Gelidium* y *Pterocladella* valores de divergencia interespecífica que oscilaron de 3.1 a 11.5%.

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO TECNOLÓGICO

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA INFORMACIÓN

1999a,b; McIvor *et al.*, 2001; 2002a,b]. Fujii *et al.*, (2006); Nam *et al.*, (2000); McIvor *et al.*, (2002a,b) y Díaz *et al.*, (2007) también indicaron que el gen *rbcL* provee suficiente señal filogenética para resolver las relaciones intergenéricas e interespecíficas dentro de *Laurencia sensu lato*. Esto coincide además con lo señalado por Díaz-Larrea (2006, datos no publicados) acerca de que las regiones más utilizadas para estudios moleculares en la familia Rhodomelaceae a nivel interespecífico son *rbcL* del cloroplasto y la ITS (Espaciador Interno Transcrito) y LSU (Subunidad Larga) del núcleo, por presentar sus genes una alta tasa de sustitución nucleotídica (Williams *et al.* 1988).

De acuerdo a Bremer *et al.*, (1999), el porcentaje de nodos apoyados con altos valores de soporte en una topología es directamente proporcional al número de caracteres e inversamente proporcional al número de taxa. Dicho porcentaje también depende del tipo de datos incluidos en el análisis. Los autores encontraron un incremento del soporte y la resolución cuando la proporción de caracteres / taxa osciló entre el 5% a 11%. La matriz de *rbcL* consistió de 1467 caracteres, de los cuales 487 fueron informativos para la parsimonia. La proporción caracteres / taxa ($487 / 65 = 7.49$) fue alta si se compara con el trabajo de Bremer, y por tanto el soporte y resolución de los árboles obtenidos a partir de *rbcL* son suficientes para resolver las relaciones dentro de *Laurencia sensu lato*.

Al igual que los resultados obtenidos por Nam (2006, 2007) utilizando caracteres morfológicos, en este estudio basado en secuencias de *rbcL* se confirmó la existencia de *Laurencia sensu lato* como un clado monofilético que incluyó tres clados correspondientes a los géneros *Palisada*, *Laurencia* y *Osmundea*. *Laurencia* y *Palisada* se presentaron como grupos hermanos, con la separación de los dos géneros confirmada en este análisis por la presencia de cuatro y dos células pericentrales por segmento axial, respectivamente (Senties y Fujii, 2002). Las especies incluidas en *Osmundea* se caracterizan por presentar espermatangios producidos a partir de filamentos ramificados esparcidamente y originados de las células corticales y axiales, denominados "tipo filamento". Los

tetrasporangios se producen, además, a partir de las células corticales (Senties y Fujii, 2002).

En el clado de *Laurencia*: *L. marilzae* Gil-Rodríguez, Senties & M.T. Fujii - *L. sp.* 2a – *L. sp.* 2b se ubicaron en un clado monofilético sustentado y separado del resto de los taxa de *Laurencia*. Los altos niveles de divergencia genética existentes entre *L. marilzae* - *L. sp.* 2a – *L. sp.* 2b y el resto de los taxa de *Laurencia* (25 - 28 %) sugirió que deben ser asignados a un nuevo status taxonómico incluido en el género *Laurencia*.

En el caso de *L. marilzae* existe una propuesta de artículo sometido para publicación (Gil-Rodríguez *et al.*, datos sin publicar). En dicho trabajo, los autores señalaron que *L. marilzae* se caracteriza por presentar un color distintivo amarillo - naranja en su ambiente natural, cuatro células pericentrales por segmento axial vegetativo, “pit connections” secundarias entre células adyacentes corticales, paredes de las células corticales proyectadas y la presencia de un “corps en cerise” en todas las células del talo: corticales, medulares, células pericentrales y axiales, y en los tricoblastos. Además, se aislaron e identificaron por primera vez para esta especie, dactylomelano, un diterpeno hasta entonces no encontrado en otras especies del complejo *Laurencia* (Fernández *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta que *L. marilzae* es morfológicamente, genéticamente y químicamente distinta del resto de las especies de *Laurencia sensu stricto* se describió esta como nueva especie (para más detalles ver subrubro 5.10).

Los taxa denominados como *L. sp.* 2a y *L. sp.* 2b divergieron con valores entre 1 y 2% de las muestras de *L. marilzae*, de lo que se infiere que son taxa independientes. Se debe comentar además que se cuenta con poco material vegetativo de *L. sp.* 2, sin estructuras reproductoras, que permita realizar una descripción morfológica. Por lo que se tiene que obtener suficiente material con estructuras reproductoras para proponer finalmente su nuevo status taxonómico, basados en las evidencias de filogenia molecular y morfología.

El clado que incluyó a *L. filiformis*, *L. intricata*, *L. sp. 1* y *L. sp. 3* mostró bajos niveles de variación genética (0-1%). De esto se infiere que todos los taxa incluidos en dicho clado constituyen la misma entidad taxonómica: *L. intricata*, y se infiere además que el taxón denominado *L. filiformis* para el Caribe mexicano está mal determinado. De acuerdo a Senties y Fujii (2002), *L. intricata* se caracteriza por presentar pie de fijación discoide con ramas estoloníferas, células corticales elípticas en vista superficial y ordenes de ramificación de 1 a 2.

El clado que comprendió a *L. arbuscula*, *L. cf. catarinensis* y *L. sp. 4* también mostró bajos niveles de variación genética (0.2-0.9%), lo que nos sugiere que estos taxa constituyen la misma entidad taxonómica: *L. filiformis*. Cabe aclarar que el taxón denominado como *L. cf. catarinensis* debe ser reexaminado para confirmar su status taxonómico, debido a que la caracterización morfológica de *L. catarinensis* difiere de *L. arbuscula*.

El clado que incluyó a *L. obtusa 1* y *L. obtusa 2* también presentó bajos niveles de variación genética (0.8%) por lo que se sugiere que *L. obtusa 1* y *L. obtusa 2* constituyen la misma entidad taxonómica. Senties y Pedroche (datos no publicados) llegaron a las mismas conclusiones en un análisis poblacional que realizaron de *L. obtusa* en la misma zona de estudio. Los autores señalaron que las dos poblaciones, sometidas a condiciones ambientales diferentes, presentaron atributos morfológicos cualitativos en común, aunque presentaron además variación significativa en varios caracteres continuos. Finalmente concluyeron que una respuesta ecológica de las poblaciones, manifiesta en caracteres merísticos, se vinculó a condiciones estacionales particulares y que las variaciones presentes no permitieron considerar a dichas poblaciones como entidades taxonómicas diferentes. Por otra parte, los mencionados taxa distaron del clado donde se ubicó *L. obtusa* de Irlanda (localidad cercana a la tipo) y se ubicaron además en un clado hermano que incluyó a *L. arbuscula*, por lo que se sugiere denominar a dichos taxa como: *Laurencia cf. filiformis*.

L. sp. 6 se agrupó junto a los taxa denominados como *L. obtusa 1* y *L. obtusa 2*. Estos tres taxa presentaron bajos valores de porcentaje de divergencia (1%), lo que sugiere que *L. sp. 6* puede ser denominado como: *L. cf. filiformis*. Se debe comentar además que el clado de *L. obtusa 1* - *L. obtusa 2* - *L. sp. 6* está cercanamente relacionado al clado que contiene a *L. arbuscula*, pero difieren en valores que oscilan entre 5 y 6%, cuestión que apoya lo anteriormente señalado.

Laurencia venusta, *L. natalensis*, *L. brongniartii* y *L. translucida* se agruparon en un mismo clado lo que sugiere que dichos taxa están cercanamente relacionados. De los mencionados taxa, *L. venusta* es la única en *Laurencia sensu lato* que presenta ramificación verticilada y *L. brongniartii* es la única que presenta un talo comprimido. *Laurencia translucida* se ubicó en el clado de *Laurencia*, lo que se corresponde con lo obtenido por Fujii *et al.*, (2006), donde los autores sugirieron que *C. translucidus* debe ser reubicada al género *Laurencia*, donde originalmente fue descrita, ya que si bien presenta 2 células pericentrales por segmento axial, ausencia de uniones intercelulares secundarias entre las células corticales y presencia de 2 células pericentrales adicionales en los talos tetrasporangiales (caracteres de *Chondrophycus*), se comprueba molecularmente la afinidad con *Laurencia*, confirmando la aseveración morfológica hecha por Fujii y Senties (2005).

El taxon *L. sp. 5* se ubicó en el mismo clado de *L. viridis* y *L. obtusa* GB, pero difirió en altos niveles de divergencia con respecto a estos taxa (5%).

En el clado de *Osmundea*: El taxón identificado como *Osmundea sp.* se agrupó en el clado de las especies de *Osmundea*. En el material revisado no se encontraron estructuras reproductoras para dar un veredicto final basado en caracteres morfológicos. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los análisis filogenéticos, aunado a los bajos niveles de variación genética entre dicho taxón y el resto de las especies del género *Osmundea* (0.02 – 0.03%) se sugiere que podría ser el primer registro de *Osmundea* para la zona de estudio.

En el clado de *Palisada*: El taxón identificado como *P. perforata* para el Caribe mexicano se agrupó en el mismo clado que las muestras de *P. perforata* de otras regiones del mundo, por lo que se reporta en este trabajo un nuevo registro de este taxón para la zona de estudio (A. Senties y J. Díaz-Larrea, datos sin publicar). *Palisada perforata* se caracteriza por presentar un crecimiento cespitoso con ejes decumbentes y arqueados y ramificación unilateral. El clado que incluyó las cinco poblaciones de *P. perforata* (Isla Mujeres, México; Puerto de la Cruz - Tenerife, España; Punta Hidalgo, Tenerife, España; Parati, RJ, Brasil y Areias Negras, Brasil) y las cuatro de *P. papillosa* (Puerto Morelos, México; Playa Paraíso, Tenerife, España; Areias Negras, Brasil y Florida, USA) está poco resuelto como resultado del bajo nivel de variación genética entre las secuencias (0 – 0.2%). Los mismos resultados fueron obtenidos por Cassano *et al.*, (2008, sometido), donde los autores basados en secuencias de *rbcL* propusieron la conespecificidad de *P. papillosa* con *P. perforata* (teniendo *P. perforata* prioridad sobre el primero) (para más detalles ver subrubro 5.10).

El taxón *P. papillosa* de Baja California (Pacífico mexicano) se ubicó en un clado basal al clado monofilético que agrupó los taxa de *P. papillosa* - *P. perforata* distribuidos en el Atlántico y difirió en un 2% del resto de los taxa de *P. papillosa* - *P. perforata*. Estos resultados sugieren que el taxón denominado *P. papillosa* de Baja California constituye un taxón independiente a los taxa del Atlántico y por lo tanto debe ser reexaminado críticamente, como fue sugerido anteriormente por Fujii *et al.*, (2006).

El taxón *P. sp.* difirió en bajos valores de porcentaje de divergencia (0.1-0.2%), con respecto a los taxa incluidos en el clado de *P. papillosa*-*P. perforata*, lo que sugiere que no son taxa independientes.

Palisada flagellifera, *P. papillosa* y *C. corallopsis* se ubicaron en clados cercanos. Estos resultados corresponden con lo propuesto por Fujii *et al.*, (2006), donde los autores basados en análisis de filogenia molecular de *rbcL*, observaron que *C.*

flagelliferus está cercanamente relacionado a *C. papillosus*. Estas especies son fácilmente diferenciables tomando en cuenta características morfológicas como la presencia de células epidérmicas en arreglo empalizada en corte transversal de las ramas en *P. flagellifera*, la presencia de ramitas de forma papiliforme en cada rama de *P. papillosa*, y la presencia de cistocarpos prominentes y ramificación de tipo corimbosa en *C. corallopsis* (Senties y Fujii, 2002).

La filogenia molecular mostró que el clado que incluyó a las tres poblaciones (Puerto Morelos, México; Playa del Carmen, México y La Habana, Cuba) de *Palisada gemmifera* y dos de *P. poiteaui* (Playa del Carmen, México y Florida, USA) está poco resuelto como resultado del bajo nivel de variación genética entre las secuencias (0.01–0.02%). Los mismos resultados fueron obtenidos por Nam (2006) basándose en caracteres morfológicos. En este trabajo el clado nombrado como *C. gemmiferus* + *C. poiteaui* fue también pobremente resuelto. Ambas comparten características como la presencia de “pit connections” secundarias entre las células epidérmicas, la presencia de una célula periaxial estéril en segmentos axiales tetrasporangiales y la disposición en ángulo recto de los tetrasporangios. La única diferencia entre los mencionados taxa es la presencia de proyecciones en las células epidérmicas de los ápices de las ramas en *P. gemmifera* y la ausencia de estas en *P. poiteaui* (Fujii *et al.*, 1996, Senties y Fujii, 2002).

Considerando la similitud de las secuencias de *rbcL* de *Palisada gemmifera* y *P. poiteaui*, la similitud de los caracteres morfológicos y la distribución en regiones y hábitats semejantes, concordando a su vez con el tratamiento taxonómico de Yamada (1931) de los taxa anteriormente mencionados y a la luz de las evidencias aportadas por Nam (2006, 2007) para el reconocimiento de *Palisada* como un género distinto de *Laurencia* y *Chondrophycus* y los datos aportados por Díaz-Larrea *et al.*, (2007), Senties y Díaz-Larrea (2008) propusieron las siguientes combinaciones: *Palisada poiteaui* (J.V. Lamouroux) K.W. Nam var. *gemmifera*

(Harvey) Senties, Fujii et Díaz-Larrea y *Palisada corallopsis* (Montagne) Senties, Fujii et Díaz (para más detalles ver subrubro 5.10).

Por otra parte, como se había mencionado anteriormente, el género *Chondrophycus* está incluido dentro del complejo Laurencia. En este sentido, en el presente estudio fueron incluidas las secuencias de los taxa *Chondrophycus thuyoides* (España) y *C. patentirameus* (Filipinas). Como resultado de los análisis filogenéticos realizados, dichos taxa se ubicaron en el clado de *Palisada*, lo que permitió proponer las siguientes combinaciones (Cassano *et al.*, 2008, sometido): *Palisada thuyoides* (Kützinger) Cassano, Senties, Gil-Rodríguez & M.T. Fujii y *Palisada patentiramea* (Montagne) Cassano, Senties, Gil-Rodríguez & M.T. Fujii (para más detalles ver subrubro 5.10). De esta forma se hace evidente la ausencia de especies de *Chondrophycus* en el Caribe mexicano.

En el análisis de filograma realizado se recuperaron los mismos clados que en los análisis obtenidos de cladogramas rectangulares. Se rescata en este tipo de procedimiento, a diferencia de los cladogramas rectangulares, las longitudes de las ramas, que nos explican el número de cambios de bases que ocurren en cada linaje. Cabe destacar que en el clado de *Laurencia*, los clados que incluyeron a *L. marilzae* y *L. sp2*, y los linajes de *L. caraibica* y *L. translucida* presentaron el mayor número de cambios. En el clado de *Palisada*: el clado que incluyó a *P. poiteaui* y *P. gemmifera* presentó el mayor número de cambios, y en *Osmundea*, la rama de *O. sp* presentó la mayor longitud.

En los análisis de máxima verosimilitud las matrices que presentaron mayor valor de ln L score fueron las que incluyeron: a) todos los caracteres del gen, seguido de b) la primera + tercera posiciones del codón y finalmente c) la tercera posición del codón. Los menores valores de ln L score se reportaron para las matrices: d) de datos de proteínas, e) de la primera posición del codón y finalmente e) de la segunda posición del codón.

Referente a los resultados obtenidos en el análisis bayesiano, las topologías obtenidas con las matrices que incluyeron: a) todos los caracteres de *rbcL*, b) la primera + tercera posiciones del codón y finalmente c) la tercera posición del codón, brindaron la mejor resolución de las relaciones filogenéticas al interior de *Laurencia sensu lato*. Los tres análisis que comprendieron las matrices d) de la primera posición del codón, e) de los aminoácidos y f) de la segunda posición del codón brindaron menor resolución.

5.3 Divergencia en las secuencias de RUBISCO espaciadora.

Los valores de divergencia intergenérica obtenidos en este estudio fueron comparables a los reportados por otros autores. Lee *et al.*, (2001) registraron valores que oscilaron de 22.6 a 31% entre géneros de algas rojas *Antithamnion* vs *Platythamnion*.

Los valores de divergencia interespecífica obtenidos en este estudio fueron comparables con los reportados por otros autores para diferentes especies de rodofíceas. Kamiya *et al.*, (1999) registraron una divergencia de *Spyridia hypnoides* (Bory de Saint-Vincent) Papenfuss vs *S. filamentosa* (Wulfen) Harvey de 10.6%. Kamiya *et al.*, (2000) registraron también para *Caloglossa* valores de divergencia interespecífica que oscilaron de 0.8 a 1.6% (*C. lepriurii* vs *C. apomeiotica* J.A. West & Zuccarello). Skage *et al.*, (2005) reportaron valores de divergencia interespecífica entre *Ceramium secundatum* Lyngbye y *C. botryocarpum* A.W. Griffiths ex Harvey que oscilaron de 0.3 a 0.7%. Para *Ceramium virgatum* Roth y *C. elegans* (Roth) Ducluzeau se reportaron valores de divergencia interespecífica de 5.3%. *Ceramium cimbricum* H.E. Petersen divergió del resto de las especies del género incluidas en el estudio con valores que oscilaron de 13.3 a 25.1%. Seo *et al.*, (2003) registraron para el género *Campylaeophora* valores que oscilaron de 0.7 (*C. crassa* vs *C. hypnaeoides*) a 2% (*C. borealis* vs *C. crassa*).

Los valores de divergencia intraespecífica obtenidos en este estudio también fueron comparables con los reportados por otros autores. Kamiya *et al.*, (1999) reportaron para varias poblaciones de *Caloglossa continua* (Okamura) R.J. King & Puttock niveles de divergencia que oscilaron de 0 a 0.4%. Zuccarello *et al.*, (2002) registraron para *Murrayella pericladus* (C. Agardh) F. Schmitz valores de divergencia intraespecíficos que oscilaron de 0.3 a 1% y para *Spyridia filamentosa* registraron valores de divergencia intraespecífica que oscilaron de 0.3 a 7.8%. Seo *et al.*, (2003) registraron para especies del género *Campylaeophora* valores que oscilaron de 0 (entre muestras de *C. borealis*) a 0.1% (*C. crassa* vs *C. hypnaeoides*).

Skage *et al.*, (2005) señalaron para el género *Ceramium* Roth que la región RUBISCO espaciadora resultó más variable que la LSU, con intervalos de divergencia nucleotídica que oscilaron de 0.3 a 25.1%.

Si se comparan los intervalos de valores de divergencia genética encontrados en la región espaciadora y la *rbcL*, se obtuvieron valores más elevados en la región espaciadora, tanto a nivel intergenérico como a nivel interespecífico.

5.4 Análisis filogenético en RUBISCO espaciadora.

La información que brindó el gen RUBISCO espaciadora con respecto a la resolución de las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato* a nivel genérico es menor a *rbcL*, pero a nivel específico es robusta. La región espaciadora ha mostrado diferentes niveles de información filogenética en dependencia de los taxa examinados. Dicho gen ha sido utilizado por varios autores para estudios filogenéticos a niveles interespecíficos e intergenéricos (Valentin y Zetsche, 1989; Kostrzema *et al.*, 1990; Destombe y Douglas, 1991; Zuccarello y West, 1997, 2002), con buenos resultados a nivel interespecífico y poblacional (Goff *et al.*, 1994; Brodie *et al.*, 1998). La distribución de grupos obtenida en las topologías con inserciones - deleciones codificados como datos ausentes y quinta base es similar. Las relaciones al interior del clado de *Palisada* no fueron resueltas completamente

y no se recuperó este género como grupo monofilético. En todas las topologías obtenidas uno de los grupos externos (*B. calliptera*) siempre fue incluido en el grupo interno y el único representante de *Osmundea* siempre fue incluido en el clado de *Laurencia* ó como clado hermano. Mediante el método de MP los mayores valores de g_1 , sitios informativos y el menor número de árboles más parsimoniosos se obtuvieron con la opción de inserciones - deleciones como quinta base. Los índices de consistencia y homoplasia presentaron valores similares con las dos opciones de inserciones - deleciones.

La matriz de la región espaciadora consistió de 132 caracteres, de los cuales 80 fueron informativos para la parsimonia (inserciones - deleciones fueron codificados como quinta base) y 69 con la opción de inserciones - deleciones codificados como datos ausentes. Teniendo en cuenta el trabajo de Bremer *et al.*, (1999) las proporciones caracteres / taxa ($80 / 42 = 1.90$; $69 / 42 = 1.64$) fueron bajas (tanto para las inserciones - deleciones codificados como quinta base o datos ausentes) si se comparan con el trabajo de Bremer, y por tanto el soporte y resolución de los árboles obtenidos a partir de la espaciadora no son suficientes para resolver las relaciones en *Laurencia sensu lato*.

En el análisis de máxima verosimilitud la topología obtenida presentó un valor de $\ln L$ score = 1294.35831, valor este menor a los obtenidos en los análisis de máxima verosimilitud con el gen *rbcL*.

Referente al análisis bayesiano, la topología obtenida resolvió en parte las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato* y brindaron una resolución intermedia de las relaciones filogenéticas al interior de *Laurencia sensu lato*.

El hecho de que la resolución de las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato* a nivel genérico sea menor que con el gen *rbcL* puede deberse a la corta longitud del gen. Goff *et al.*, (1994); Brodie *et al.*, (1998); Kamiya *et al.*, (1998) y Muller *et al.*, (1998) señalaron en sus estudios que el hecho de ser una región muy pequeña

conlleva a que aporte información filogenética limitada, lo que pudo influir en que no obtuvieran la suficiente resolución filogenética a nivel genérico y específico. Este problema en la resolución de las topologías puede deberse también a la presencia del efecto de “atracción de ramas largas” (Felsenstein, 1978; Graybeal, 1998). Bremer *et al.*, (1999) señalaron causas probables debido a las cuales se pueden obtener topologías con nodos no resueltos ó con bajo soporte: la ausencia de identificación de los mejores caracteres o marcadores, número insuficiente de caracteres en el análisis ó que los nodos con bajo soporte o no resueltos reflejan una rápida especiación o una lenta evolución de caracteres (o ambas) durante ciertos períodos de tiempo.

Debido al tamaño pequeño de la región RUBISCO espaciadora, varios autores han combinado sus datos con los provenientes de otras regiones para realizar estudios filogenéticos a nivel genérico y específico, como las regiones que flanquean a *rbcL* y *rbcS* (Brodie *et al.*, 1998; Kamiya *et al.*, 1998, Yoon y Boo, 1999).

5.5 Divergencia en las secuencias de 18S.

Los valores de divergencia intergenéricos obtenidos en este estudio fueron más elevados que los reportados por otros autores. Freshwater *et al.*, (1999) registraron para representantes de cuatro géneros de algas rojas: *Gelidiella*, *Gelidium*, *Pterocladia* y *Pterocladella*, valores de divergencia intergenéricos que oscilaron de 0.3 a 2.9%.

Los valores de divergencia interespecífica obtenidos en este estudio fueron más elevados que los reportados por otros autores. Freshwater *et al.*, (1999) registraron para representantes de cuatro géneros de algas rojas: *Gelidiella*, *Gelidium*, *Pterocladia* y *Pterocladella*, valores de divergencia interespecífica que oscilaron de 0 a 0.4%.

En cuanto a los valores de divergencia genética encontrados en las tres regiones estudiadas, los mayores valores se obtuvieron para la región espaciadora,

seguidos de *rbcL*. Los valores menores se registraron para la región 18S, tanto a nivel intergenérico como a nivel interespecífico. Freshwater *et al.*, (1999), también en su estudio realizado con representantes de cuatro géneros de algas rojas: *Gelidiella*, *Pterocladia*, *Gelidium* y *Pterocladella*, obtuvieron valores de divergencia genética de la región *rbcL* más elevados que los de 18S.

5.6 Análisis filogenético en 18S.

La información que brindó el gen 18S con respecto a la resolución de las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato* a nivel genérico y específico es robusta. Estos resultados no concuerdan con los obtenidos por varios autores para diversos grupos de algas rojas. De acuerdo a Díaz-Larrea (2006, datos no publicados) la región SSU (Subunidad corta) aunque constituye uno de los marcadores moleculares más utilizados como criterio para proponer escenarios filogenéticos en diversos grupos de organismos (Woese, 1987; Bhattacharya, 1997), en trabajos realizados en grupos de algas rojas (Ragan *et al.*, 1994; Bailey y Freshwater, 1997; Saunders y Bailey, 1997; Saunders y Kraft, 1997; Saunders *et al.*, 1995; Vis *et al.*, 1998; Harper y Saunders, 1998), no presentó la suficiente variación, ni la adecuada señal filogenética para estudiar relaciones filogenéticas a nivel específico, sin embargo se recomienda su uso para estudios a nivel supraespecífico (Freshwater y Rueness, 1994; Hommersand *et al.*, 1994; Ragan *et al.*, 1994; Saunders y Kraft, 1997).

La distribución de grupos obtenida en las topologías donde fueron tratados las inserciones - deleciones como datos ausentes tienen mejor resolución que las obtenidas con las inserciones - deleciones tratados como quinta base. Las mejores topologías se obtuvieron con las matrices que incluyeron: a) todos los caracteres del gen y b) la zona de horquillas. Con la matriz donde se incluyó sólo la zona de tallos se obtuvo una topología de menor resolución, y esto concuerda con los valores obtenidos de g_1 y sitios informativos para la parsimonia, en este orden. Los valores de los índices de consistencia y homoplasia obtenidos fueron similares en las dos opciones de inserciones - deleciones tratados como quinta

base y datos ausentes. De las topologías obtenidas con la opción de inserciones - deleciones tratados como quinta base la que mejor resolución presentó fue la obtenida con la matriz que incluyó la zona de horquillas. Las topologías de menor resolución se obtuvieron con las matrices que incluyeron: a) todos los caracteres del gen y b) la que incluyó la zona de tallos.

La matriz de 18S consistió de 1776 caracteres, de los cuales 337 fueron informativos para la parsimonia (inserciones - deleciones codificados como quinta base) y 331 con la opción de inserciones - deleciones codificados como datos ausentes. Teniendo en cuenta el trabajo de Bremer *et al.*, (1999) la proporción caracteres / taxa ($337 / 30 = 11.23$; $331 / 30 = 11.03$) fueron altas (tanto para las inserciones - deleciones codificados como quinta base o datos ausentes) si se comparan con el trabajo de Bremer, y por tanto el soporte y resolución son suficientes para resolver las relaciones al interior de *Laurencia sensu lato*.

En los análisis de máxima verosimilitud las topologías que presentaron mayor valor de ln L score fueron las obtenidas en los análisis de las matrices que incluyeron: a) todos los caracteres y b) la zona de horquillas. El menor valor de ln L score se reportó para la zona de tallos. Estos valores de ln L score fueron más elevados que los obtenidos para las topologías de RUBISCO espaciadora.

Referente a los resultados obtenidos en el análisis bayesiano, las topologías obtenidas con las matrices que incluyeron: a) todos los caracteres de 18S y b) la zona de horquillas, brindaron buena resolución de las relaciones filogenéticas al interior de *Laurencia sensu lato*. El análisis que incluyó la zona de tallos brindó menor resolución.

5.7 Evolución molecular.

El proceso de la saturación en los genes no es más que la presencia de sustituciones múltiples por sitio, resultando en una subestimación de divergencia (Coleman y Mai, 1997). Debido a esto, la ausencia de saturación en *rbcL*,

RUBISCO espaciadora y 18S nos indica que pueden ser incluidas en los análisis filogenéticos.

Referente al análisis del uso del codón, dado que las secuencias del gen *rbcL* son ricas en adenina y timina, la tendencia observada al bajo uso de la citosina y guanina restringe el uso del codón en este gen. Dos factores determinan la tendencia del uso no uniforme del codón sinónimo: la concentración de nucleótidos en el genoma y la selección (Morton y Levin, 1997; Morton, 1998; Morton y So, 2000; Odabachian, 2004). En el cloroplasto la concentración de nucleótidos en el genoma parece ser el factor predominante que influye en el aumento de la frecuencia de codones específicos, aunque las secuencias génicas en dicho gen muestran patrones consistentes con la acción de la selección natural, actuando sobre la elección de codones presumiblemente relacionadas con la eficiencia de la síntesis de proteínas. Morton (1994, 1998, 1999) finalmente planteó que la selección puede actuar en diferentes intensidades en diferentes linajes en dependencia del nivel de expresión del gen: es mayor en algas que en plantas superiores, y dentro de las algas la selección es fuerte en algas verdes. Específicamente en su trabajo fue mayor en *Cyanophora paradoxa* Korshikov, de intensidad intermedia en *Odontella sinensis* (Greville) Grunow y de menor intensidad en *Porphyra purpurea* (Roth) C. Agardh y *Euglena gracilis* Klebs. Kanaya *et al.*, (1999) plantearon que el sesgo en la utilización de bases en los sitios sinónimos se correlaciona con los niveles de actividad génica, probablemente en respuesta a sesgos en la concentración de RNAs de transferencia que median la traducción a proteína.

Los elevados valores de guanina en la primera posición del codón reflejaron la preferencia de uso de codones que codifican para el grupo de aminoácidos V, A, D, E y G. En la segunda y tercera posiciones del codón se observaron elevados valores de adenina y timina que reflejaron la preferencia de uso de codones que codifican para el grupo de aminoácidos F, L, I, M, V, Y, H, Q, N, K, D y E. Campbell y Gowri (1990); Morton (1994); Kellogg y Juliano (1997) y Wall y

Herbeck (2003) señalaron que las secuencias de *rbcL* en algas verdes son ricas en adenina y timina, por lo que los genes en estas regiones muestran una mayor preferencia hacia los codones que terminan en A o T. El patrón de preferencia de codones observado en el presente trabajo es similar al encontrado por Campbell y Gowri (1990) en grupos de algas verdes para el mismo gen. Por otra parte, Morton (2001) y Wall y Herbeck (2003) afirmaron que ciertos aminoácidos restringen el uso del codón en *rbcL*, especialmente Lisina, Cistina, Fenilalanina y Ácido Glutámico debido a que tienen un significado particular en la función fotosintética de la enzima RUBISCO. Este efecto de “functional constrain” en los aminoácidos y la tendencia del uso del codón incrementa severamente la Homoplasia y reduce el número de sitios “libres” para variar (Kellogg y Juliano, 1997).

Los valores obtenidos de Sch_i^2 , que nos da la medida de la diferencia entre el número observado y el número esperado de codones (con la condición de un igual uso del codón), oscilaron entre 0.916 y 0.766, lo que demostró que no existe igual uso del codón en los diferentes grupos analizados: grupo externo, *Laurencia*, *Palisada*, *Osmundea* y *L. sp. 2a - L. sp. 2b - L. marilzae*. Los valores más elevados de Sch_i^2 se obtuvieron para *Osmundea* (0.916), seguido de los grupos externos (0.871) y *Laurencia* (0.866). Los menores valores se obtuvieron para *Palisada* (0.794) y *L. sp. 2a - L. sp. 2b - L. marilzae* (0.766).

Los valores del número efectivo de codones, que nos da la medida del número efectivo de codones que son utilizados en el gen, oscilaron entre 34.089 y 37.651. Estos resultados reflejaron que más de un codón es utilizado por cada aminoácido, es decir que los codones sinónimos por cada aminoácido no están igualmente utilizados en los diferentes grupos de secuencias analizados. Los valores más elevados se obtuvieron para *L. sp. 2a - L. sp. 2b - L. marilzae* (37.651), seguido de *Palisada* (36.026) y *Laurencia* (35.552). Los menores valores se registraron para los grupos externos (34.823) y *Osmundea* (34.089).

Los valores del índice de tendencia del codón, que nos da la medida de la desviación con respecto al uso uniforme de los codones sinónimos, oscilaron entre 0.664 y 0.597. Valores similares de índice de Tendencia del codón fueron reportados por Morton (1998) para algas rojas (*Porphyra*) y verdes (*Euglena*). Dichos resultados demostraron que no existe un uso uniforme de los codones sinónimos en los diferentes grupos de secuencias analizados. Los mayores valores se registraron para *Osmundea* (0.664), seguido de grupos externos (0.633) y *Laurencia* (0.624). Los menores valores se reportaron para *Palisada* (0.607) y *L. sp. 2a - L. sp. 2b - L. marilzae* (0.597).

El estadístico RSCU representa la frecuencia observada de un codón en un gen, dividido por la frecuencia esperada (bajo la condición del uso uniforme de los codones para cada aminoácido). Sus valores oscilaron entre 0 y 4.31 para *Osmundea*, entre 0 y 4 para los grupos externos, entre 0 y 4.24 para *Laurencia* y *Palisada* y finalmente entre 0 y 3.73 para *L. sp. 2a - L. sp. 2b - L. marilzae*. Los resultados reflejaron que se presentaron casos en los cuales la frecuencia observada de los codones fue mayor (> 1), igual (1) o menor (< 1) que lo esperado bajo la condición de un igual uso de los codones en los diferentes grupos de secuencias analizados.

Al comparar las estructuras secundarias obtenidas para *Palisada*, *Laurencia*, Grupo externo y *L. sp. 2a* se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) (Spiegel, 1977) en el número de horquillas, tallos y energía de las estructuras. Este método de comparación puede constituir un criterio para fortalecer la filogenia y corroborar (o no) la separación de grupos a diferentes niveles taxonómicos como el genérico y específico (Irene Barriga, comunicación personal). En el presente estudio dicho método corroboró la separación de los clados pertenecientes a: género *Palisada*, género *Laurencia*, grupos externos y el taxón denominado como *L. sp. 2a*. Neefs y Wachter (1990), De Rijk *et al.* (1992), Ueda-Nishimura y Mikata (2000) señalaron que la estructura 18S ARN ribosomal para la mayoría de los eucariontes adopta una estructura similar, de 48 hélices universales.

5.8 Análisis particionados.

Los análisis particionados que incluyeron los datos de proteínas arrojaron probabilidades menores a 0.05, por lo que no se pudieron combinar con otras matrices de datos. La incongruencia entre las matrices de datos puede deberse (fundamentalmente entre regiones nucleares y de organelos) a diferencias en historias filogenéticas (Doyle, 1992), puede deberse también a diferencias en el poder de resolución filogenética entre los genes analizados, ó a diferencias en la tasa o modos de evolución de las regiones genéticas (Bull *et al.* 1993).

Los otros cuatro análisis realizados presentaron probabilidades mayores a 0.05, por lo que las matrices se pudieron combinar para realizar análisis filogenéticos. La topología obtenida con la matriz resultante de la primera + tercera posiciones del codón + la región espaciadora brindó la mejor resolución de las relaciones filogenéticas al interior de *Laurencia sensu lato*. Dicha matriz presentó además el mayor número de sitios informativos para la parsimonia y en el análisis de máxima parsimonia se obtuvo el menor número de árboles más parsimoniosos. Las topologías obtenidas con las matrices resultantes: a) de la zona de horquillas + la región espaciadora, b) la zona de horquillas + primera posición + tercera posiciones del codón y c) la zona de horquillas + primera + tercera posiciones del codón + la región espaciadora brindaron menor resolución de las relaciones filogenéticas al interior de *Laurencia sensu lato*.

Los análisis de datos combinados resultaron en filogenias con mayores valores de Índices de soporte: bootstrap, jackknife e índice de decaimiento, índice de consistencia y señal filogenética (g_1), si se comparan con los análisis realizados a cada gen por separado. Estos resultados concuerdan con lo señalado por otros autores (Skage *et al.*, 2005; Brown y Lemmon, 2007), que señalaron además que la combinación de datos incrementa el número de caracteres a incluir en el análisis, y resultan en una solución más parsimoniosa que si se analizaran los datos por separado y posteriormente se combinaran en árboles de consenso.

5.9 Análisis filogenético adicional.

Al comparar los análisis filogenéticos adicionales (que incluyeron 21 taxa comunes a los tres genes) con los análisis de MP (que incluyeron mayor número de taxa), en el caso del gen *rbcL* la mayoría de los clados se mantuvieron estables. Se recuperó el clado monofilético de *Laurencia*. El clado que incluyó a *L. intricata*, *L. filiformis*, *L. sp. 1* y *L. sp. 3* también se mantuvo estable, pero al incorporar mayor número de taxa al análisis las relaciones al interior de este clado fueron resueltas. Autores como Bremer *et al.*, (1999) y Graybeal (1998) señalaron en sus estudios que la precisión de los análisis filogenéticos aumenta dramáticamente con la adición de taxa al análisis, aunque con la adición de caracteres dicha precisión aumenta también pero a menor escala. Se recuperó además a *Palisada* como clado monofilético al aumentar el número de caracteres en nuestro estudio y los valores de g_1 e IC aumentaron.

En el caso de la región RUBISCO espaciadora, al igual que con el análisis de *rbcL*, la mayoría de los clados se mantuvieron estables y se recuperó el clado monofilético de *Laurencia*. Al incorporar mayor número de taxa al análisis, las relaciones al interior del clado que incluyó a *L. filiformis*, *L. intricata*, *L. sp. 1* y *L. sp. 3* fueron resueltas. Se recuperó además a *Palisada* como clado monofilético al aumentar el número de caracteres en nuestro estudio y los valores de g_1 e IC aumentaron.

En el caso del gen 18S todos los clados se mantuvieron estables en los dos análisis y se recuperaron *Palisada* y *Laurencia* como clados monofiléticos. Al aumentar el número de caracteres en nuestro estudio, los valores de g_1 e IC aumentaron.

Felsenstein (1978) y Graybeal (1998) señalaron en sus estudios que la resolución de las hipótesis filogenéticas se incrementa, fundamentalmente cuando se adicionan taxa al análisis, aunque también incrementa, pero en menor medida, cuando se adicionan caracteres al análisis. Los autores recomendaron además

que para evitar ó disminuir el efecto de “atracción de ramas largas” en un análisis, es preferible adicionar taxa, mas que caracteres. Aunque no siempre el problema de “atracción de ramas largas” puede eliminarse al aumentar el número de taxa en los análisis, debido a causas estocásticas (Freshwater *et al.*, 1999). En el presente estudio no todos los representantes de *Laurencia sensu lato* registrados para el Caribe Mexicano están incluidos en el análisis y por tanto cabe la posibilidad de que esté presente el efecto de “atracción de ramas largas” en los análisis realizados para los tres genes. Los tres taxa que no se incluyeron en los análisis (*L. microcladia*, *L. brongniartii* y *P. flagellifera*) no se encontraron en los muestreos realizados para esta investigación.

En los análisis realizados con taxa comunes a los tres genes, las topologías mejores resueltas se obtuvieron con las secuencias de 18S, seguido de la topología obtenida con secuencias de *rbcL* y finalmente la región RUBISCO espaciadora. Lo anterior se apoya en el hecho de que los mayores valores de g_1 e IC se reportaron en este orden para las tres matrices.

5.10 Implicaciones taxonómicas de la sistemática molecular.

Evidentemente, con los análisis filogenéticos realizados se generaron topologías que nos permitieron generar una serie de cambios nomenclaturales, circunscripciones específicas y propuestas de nuevas especies. A continuación se expresa el nombre válido con su respectivo protocolo nomenclatural:

Palisada poiteaui (J.V. Lamouroux) K.W. Nam var. ***gemmifera*** (Harvey) Senties, M.T. Fujii *et* Díaz-Larrea (2007:69).

Basónimo: *Laurencia gemmifera* (Harvey 1853, Nereis Boreali-Americana, vol. 2, pp. 73-74, lámina. XVIII, B).

Localidad Tipo: Key West, Florida, USA

Sinónimos: *Chondrophycus poiteaui* (J.V. Lamouroux) M. Howe var. *gemmiferus* (Harvey) Senties, Fujii *et* Díaz-Larrea (Díaz *et al.*, 2007: 255).

Chondrophycus gemmiferus (Harvey) Garbary *et* J. Harper (1998:194).

Laurencia poiteau (J.V. Lamouroux) M. Howe var. *gemmifera* (Harvey) Yamada (1931:220).

Palisada poiteau (J.V. Lamouroux) K.W. Nam var. ***poiteau***.

Basiónimo: *Fucus poitei* Lamouroux (1805, Agen. xxiv + 83 pp., XXXVI pls.)

Localidad Tipo: Santo Domingo, Republica Dominicana

Sinónimos: *Chondrophycus poiteau* (Lamouroux) K.W.Nam (1999:463).

Laurencia poiteau (J.V. Lamouroux) M. Howe (1918:518).

Palisada corallopsis (Montagne) Senties, M.T. Fujii et Díaz-Larrea (2007:69).

Basiónimo: *Sphaerococcus corallopsis* Montagne (1842, Histoire, physique, politique et naturelle de l'ile de Cuba 2, p. 9, lámina.3, fig. 1).

Localidad Tipo: La Habana, Cuba

Sinónimos: *Chondrophycus corallopsis* (Montagne) K.W. Nam (1999:463).

Laurencia corallopsis (Montagne) M.A. Howe (1918:519).

Palisada perforata (Bory) K.W. Nam (2007:54)

Basiónimo: *Fucus perforatus* Bory (1803, Germinal an XI. 505, pl. 5 fig. 1).

Localidad Tipo: Tenerife, Islas Canarias, España.

Sinónimos: *Palisada papillosa* (C. Agardh) K.W. Nam (2007, 54).

Chondrophycus perforatus (Bory) K.W. Nam (1999:463).

Laurencia perforata (Bory) Montagne (1840:155).

Laurencia marilzae Gil-Rodríguez, Senties et M.T. Fujii sp. nov. (2008:en prensa)

Localidad Tipo: Tenerife, Islas Canarias, España.

Holotipo: Punta del Hidalgo, Norte de Tenerife, Islas Canarias, España, colectada el 12.vii.2006 por M.C.Gil-Rodríguez, A. Senties & M.T. Fujii, tetrasporofito. Depositada en TFC Phyc 13129. Isotipos: UAMIZ, SP, HRJ, BM, P, L, BCM, MA.

Palisada thuyoides (Kützinger) Cassano, Senties, Gil-Rodríguez & M.T. Fujii (2008:sometido).

Basiónimo: *Laurencia thuyoides* Kützinger (1865, Tabulae phycologicae... vol. 15, 26).

Localidad Tipo: Nueva Caledonia.

Sinónimos: *Chondrophycus thuyoides* (Kützinger) G. Furnari *et al.* (2001:341).

Chondrophycus paniculatus (C. Agardh) G. Furnari *in* Boisset *et al.*, (2000:392).

Laurencia obtusa var. *paniculata* (C. Agardh) Zanardini (1847:20).

Chondria obtusa var. *paniculata* C. Agardh (1822:343).

Palisada patentiramea (Montagne) Cassano, Senties, Gil-Rodríguez & M.T. Fujii (2008:sometido).

Basiónimo: *Chondria obtusa* (Hudson) C. Agardh var. *patentiramea* Montagne (1836, Annales des Sciences Naturelles, Botanique, vol 6, 322, lámina. 18, fig. 3).

Localidad Tipo: Mèze, Francia.

Sinónimos: *Chondrophycus patentirameus* (Montagne) K.W. Nam (1999:463).

Laurencia patentiramea (Montagne) Kützinger (1849:854).

Laurencia obtusa var. *patentiramea* (Montagne) Rabenhorst (1847:155).

Las taxa que se reconocen, después del presente estudio, para *Laurencia sensu lato* en el Caribe mexicano son:

Laurencia

L. caraibica Silva

L. cf. filiformis

L. intricata Lamouroux

L. venusta Yamada

L. sp.

Osmundea

Osmundea sp.

Palisada

Palisada corallopsis (Montagne) Senties, Fujii et Díaz

Palisada poiteau (J.V. Lamouroux) K.W. Nam var.

gemmifera (Harvey) Senties, Fujii et Díaz

P. poiteau (J.V. Lamour.) K.W. Nam var. *poiteau*

P. perforata (Bory) K.W.Nam

6. CONCLUSIONES

- Los valores de divergencia genética en los tres genes permitieron segregar categorías taxonómicas a nivel específico. Los mayores valores de divergencia genética se obtuvieron para la región espaciadora y *rbcL*.
- El uso del codón en los taxa que conforman el grupo externo, *Laurencia*, *Palisada*, *Osmundea* y *L. sp. 2* - *L. marilzae* fue similar, por tanto no permitió la segregación de dichos grupos. Las secuencias del gen *rbcL* son ricas en adenina y timina, lo que indica la existencia de la restricción en el uso del codón en este gen.
- La comparación de las estructuras secundarias permitió la distinción de los clados pertenecientes a los géneros *Palisada*, *Laurencia*, grupo externo y *L. sp. 2*.
- Las hipótesis generadas a partir de datos moleculares resultaron útiles para resolver las relaciones filogenéticas al interior de *Laurencia sensu lato* tanto a nivel genérico como específico. *Laurencia sensu lato* es monofilético e incluye a su vez tres clados monofiléticos sustentados por altos valores de soporte correspondientes a los géneros: *Laurencia sensu stricto*, *Palisada* y *Osmundea*, lo que nos lleva a concluir que estas unidades son

independientes y en términos taxonómicos no pueden corresponder a una agrupación de complejo.

- De las regiones utilizadas en los análisis filogenéticos con matrices heterogéneas, los genes *rbcL* y 18S ofrecieron la mayor señal filogenética para resolver las relaciones a nivel genérico y específico en *Laurencia sensu lato*.
- La combinación de dos ó más genes en los análisis filogenéticos aumentaron el soporte de las relaciones postuladas. La topología obtenida con la matriz resultante de la primera + tercera posiciones del codón + la región espaciadora brindó la mejor resolución de las relaciones filogenéticas al interior de *Laurencia sensu lato*.
- En los análisis realizados con 21 taxa comunes a los tres genes estudiados, las topologías más estables y mejores resueltas se obtuvieron con las secuencias de 18S, seguido de la topología obtenida con secuencias de *rbcL* y finalmente la región RUBISCO espaciadora. Los valores de g_1 e IC se reportaron en este orden para las tres matrices.
- Los caracteres moleculares permitieron hacer modificaciones al esquema de clasificación de *Laurencia sensu lato* a nivel intragenérico. *Laurencia* sp. 2 y *L. marilzae* deben ser asignados a un nuevo status taxonómico incluidos en el género *Laurencia*. *Laurencia filiformis*, *L. intricata*, *L. sp. 1* y *L. sp. 3* constituyen la misma entidad taxonómica: *L. intricata*. *Laurencia obtusa 1*, *L. obtusa 2* y *L. sp. 6* constituyen la misma entidad taxonómica: *L. cf. filiformis*. *Osmundea* sp. podría ser el primer registro del género para la zona de estudio. *Palisada perforata* se reporta como un nuevo registro para la zona de estudio. Se propone la conespecificidad de *P. papillosa* y *P. perforata* y las nuevas combinaciones: *Palisada poiteaui* (J.V. Lamouroux)

K.W. Nam var. *gemmifera* (Harvey) Senties, Fujii et Díaz-Larrea; *Palisada corallopsis* (Montagne) Senties, Fujii et Díaz.

- Las taxa que se reconocen, después del presente estudio, para *Laurencia* *sensu lato* en el Caribe mexicano son: cinco taxa de *Laurencia* (*L. caraibica*, *L. intricata*, *L. venusta*, *L. cf. filiformis* y *L. sp.*), uno de *Osmundea* y cuatro de *Palisada* (*P. corallopsis*, *P. poiteaui* var. *gemmifera*, *P. poiteaui* var. *poiteaui* y *P. perforata*).

Con lo anteriormente señalado se vislumbran las siguientes perspectivas:

- Con lo obtenido en la presente tesis, desde el contexto metodológico hasta la interpretación de los cladogramas y la filogenia del grupo, es factible abordar otros complejos de algas rojas dentro de la familia Rhodomelaceae, como: *Polysiphonia*, *Neosiphonia*, *Chondria* y *Herposiphonia*. Ahora bien, se requiere trabajo fino en varias de las especies que aún no fueron determinadas: *L. sp. 2* y *Osmundea sp.*
- Ampliar las áreas de recolecta con poblaciones presentes en el Golfo de México y Pacífico mexicano, y de esta forma tener una visión más general de la filogenia del grupo en el país.

8. REFERENCIAS

Abascal, F., R. Zardoya y D. Posada. 2005. ProtTest: Selection of bestfit models of protein evolution. *Bioinformatics* 21: 2104-2105.

Abe, T., A. Kurihara, S. Kawaguchi, R. Terada y M. Masuda. 2006. Preliminary report on the molecular phylogeny of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae). *Coastal Marine Science* 30(1): 209-213.

Agardh, C.A. 1822. *Species algarum*, vol. 1, part 2a. Berling, Lund, Sweden. p. 169– 398.

Agardh, J.G. 1852. *Species genera et ordines algarum. Volumen secundum: algas florideas complectens*, part 3, Gleerup, Lund, Sweden. p. 701–786.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J.D. Watson. 1994. *Molecular Biology of the cell*, third edition. Garland publishing Inc: London, 1294 pp.

Bailey, J.C. y D.W. Freshwater. 1997. Molecular systematics of the Gelidiales: inferences from separate and combined analyses of plastid *rbcL* and nuclear SSU gene sequences. *European Journal of Phycology* 32: 343-352.

Bhattacharya, D. 1997. An introduction to algal phylogeny and phylogenetic methods. *In: Origins of algae and their plastids* (D. Bhattacharya ed), p. 1-11. Springer: New York.

Bold, H.C. y M.J. Wynne. 1985. *Introduction to the algae*, 2nd edn.- Englewood Cliffs: Prentice-Hall. 720 pp.

Bory de Saint-Vincent, J.B.G.M. 1803. *Essai sur les îles fortunées et l'antique atlantide ou précis de l'histoire general de l'archipel des Canaries*. Germinal an XI.

- Boisset, F., G. Furnari, M. Comarci y D. Serio. 2000. The distinction between *Chondrophycus patentirameus* and *C. paniculatus* (Ceramiales, Rhodophyta). *European Journal of Phycology* 35: 387-395.
- Brodie, J., P.K. Hayes, G.L. Barker., L.M. Irvine y I. Bartsch. 1998. A reappraisal of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiophycidae, Rhodophyta) in the Northeast Atlantic based on the *rbcL* - *rbcS* intergenic spacer. *Journal of Phycology* 34: 1069-1074.
- Bremer, B., R.K. Jansen, B. Oxelman, M. Backlund, H. Lantz y K-J. Kim. 1999. More characters or more taxa for a robust phylogenetic case study from the coffee family (Rubiaceae). *Systematic Biology* 48: 413-435.
- Brodsky L.I., V.V. Ivanov, Y.L. Kalaidzidis, A.M. Leontovich, V.K. Nikolaev, S.I. Feranchuk y V.A. Drachev. 1995. GeneBee-NET:Internet-based server for analyzing biopolymers structure. *Biochemistry* 60(8): 923-928.
- Brodsky L.I., A.V. Vasiliev, Y.L. Kalaidzidis, Y.S. Osipov, R.L. Tatuzov y S.I. Feranchuk. 1992. GeneBee: the program package for biopolymer structure análisis. *Dimacs* (8): 127-139.
- Brown, J.M. y A.R. Lemmon. 2007. The importance of data partitioning and the utility of bayes factors in bayesian phylogenetics. *Systematic Biology* 56(4): 643-655.
- Bull, J.J., J.P. Huelsenbeck, C.W. Cunningham., D.L. Swofford y P.J. Waddell. 1993. Partitioning and combining data in phylogenetics analysis. *Systematic Biology* 42: 384-397.
- Campbell, W.H. y G. Gowri. 1990. Codon usage in higher plants, green algae, and Cyanobacteria. *Plant Physiology* 92: 1-11.

Cho, T.O., S. Fredericq, y S.M. Boo. 2003. *Ceramium inkyuui* sp. nov. (Ceramiaceae, Rhodophyta) from Korea: A new species based on morphological and molecular evidence. *Journal of Phycology* 39: 236-247.

Coleman, A.W. y J.C. Mai. 1997. Ribosomal DNA ITS-1 and ITS-2 Sequence Comparisons as a Tool for Predicting Genetic Relatedness. *Journal Molecular and Evolution* 45: 168-177.

De Rijk, P., J.M. Neefs, Y. Van de Peer y R. De Wachter. 1992. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research* 20: 2075-2089.

Destombe, C. y S.E. Douglas. 1991. Rubisco spacer sequence divergence in the Rhodophyte alga *Gracilaria verrucosa* and closely related species. *Current Genetics* 19: 395-398.

Díaz-Larrea J., A. Senties., M.T. Fujii., F.F. Pedroche y M.C. Oliveira. 2007. Molecular evidence for *Chondrophycus poiteau* var. *gemmiferus* comb. et stat. nov. (Ceramiaceae, Rhodophyta) from the Mexican Caribbean Sea: implications for the taxonomy of the *Laurencia* complex. *Botanica Marina* 50: 250-256.

Doyle, J.J. 1992. Gene trees and species trees molecular systematics as one-character taxonomy. *Systematic Biology* 17: 144-163.

Eriksson, T. 1999. AutoDecay ver. 4.0 (computer program distributed by the author). Bergius Foundation, Royal Swedish Academy of Sciences. Stockholm.

Farris, J.S., M. Kallersjo, A.G. Kluge y C. Bult. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-319.

Farris, J.S., V.A. Albert, M. Kallersjo., D. Lipscomb y A.G. Kluge. 1996. Parsimony jackknifing outperforms neighbor-joining. *Cladistics* 12: 99-124.

Felsenstein, J. 1978. Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology* 27: 401-410.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-91.

Felsenstein, J. y H. Kishino. 1993. Is there something wrong with the bootstrap on phylogenies ? A reply to Hillis and Bull. *Systematic Biology* 42:193-200.

Fernández, J.J., M.L. Souto, L.V. Gil y M. Norte. 2005. Isolation of naturally occurring dactylomelane metabolites as *Laurencia* constituents. *Tetrahedron* 61: 8910-8915.

Fitch, W.M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimal change for a specific tree topology. *Systematic Zoology* 20: 406-416.

Forsskål, P. 1775. *Flora Aegyptiaco-Arabica*. Copenhagen 32 + CXXVI + 219p.

Fredericq, S. y M.E. Ramirez. 1996. Systematic studies of the Antarctic species of the Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on *rbcL* sequence analysis. *Hydrobiologia* 326/327: 137-143.

Freshwater, D.W. y J. Rueness. 1994. Phylogenetic relationships of some european *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, based on *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33: 187-194.

Freshwater, D.W., S. Fredericq y M.H. Hommersand. 1995. A molecular phylogeny of the Gelidiales (Rhodophyta) based on analysis of plastid *rbcL* nucleotide sequences. *Journal of Phycology* 31: 616-632.

Freshwater, D.W., S. Fredericq y J.C. Bailey. 1999. Characteristics and utility of nuclear-encoded large-subunit ribosomal gene sequences in phylogenetic studies of red algae. *Phycological Research* 47: 33-38.

Freshwater, D.W., S. Fredericq, B.S. Butler., M.H. Hommersand y M.W. Chase. 1994. A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proceedings of National Academy of Sciences* 91: 7281-5.

Fredericq, S., M.H. Hommersand y D.W. Freshwater. 1996. The molecular systematics of some agar-and carageenan-containing marine red algae based on *rbcL* sequence analysis. In: Lindstrom, S.C. y D.J. Chapman (Eds.). *Proceedings of the Fifteenth International Seaweed Symposium*. Kluwer Academic Publishers: Boston, pp. 125-135.

Fujii, T.M. y A. Senties. 2005. Taxonomia do complexo *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) do Brasil, com ênfase nas espécies dos estados de São Paulo e do Espírito Santo. In: Senties G.A. y K.M. Dreckmann (Eds.). *Monografias Ficológicas* Vol. II. UAMI y Red Latinoamericana de Botânica. México, D.F., pp. 69-135.

Fujii, T.M., L. Collado-Vides y M. Cordeiro-Marino. 1996. Morphological studies of *Laurencia gemmifera* and *Laurencia poiteau* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from the Nichupté Lagoon System, Quintana Roo, México. *Botanica Marina* 39: 317-326.

Fujii, T.M., S.M.P.B. Guimarães, C.F.D. Gurgel y S. Fredericq. 2006. Characterization and phylogenetic affinities of the red alga *Chondrophycus flagelliferus* (Rhodomelaceae, Ceramiales) from Brazil on the basis of morphological and molecular evidence. *Phycologia* 45: 432-441.

Furnari, G., M. Cormaci y D. Serio. 2001. The *Laurencia* complex (Rhodophyta, Rhodomelaceae) in the Mediterranean Sea: an overview. *Cryptogamie Algologie* 22: 331-373.

Gabrielson, P.W. y D. Garbary. 1987. A cladistic analysis of Rhodophyta: Florideophycidean orders. *British Phycological Journal* 22: 125-138.

Garbary, D.J. y J.T. Harper. 1998. A phylogenetic analysis of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae) of the red algae. *Cryptogamie Algologie* 19: 185-200.

Garbary, D.J. y P.W. Gabrielson. 1990. Taxonomy and evolution. In: Cole, K.M. y R.G. Sheath (Eds.). *Biology of the red algae*. Cambridge University Press, New York, pp. 477- 498.

Gmelin, S.G. 1768. *Historia fucorum*. Academia Scientiarum Petropoli [St Petersburg]. 239 pp., 6 tables, 35 pls.

Greville, R.K. 1830. *Algae Britannicae*. MacLachlan & Stewart, Edinburgh. 218 pp., 19 pls.

Goff, L.J., D.A. Moon y 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.

Graybeal, A. 1998. Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? *Systematic Biology* 47:9-17.

Guiry, M.D. y G.M. Guiry. 2008. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>.

Harper, J.T y G.W. Saunders. 1998. A molecular systematic investigation of the Acrochaetiales (Florideophycidae, Rhodophyta) and related taxa based on nuclear small-subunit ribosomal ADN sequences data. *European Journal of Phycology* 33: 221-229.

Harvey, W.H. 1853. *Nereis boreali-americana*. Part II. Rhodospermae. *Smithsonian Contributions to Knowledge* 5(2). 258 pp., pls. 13-36.

Hillis, D.M. y M.T. Dixon. 1991. Ribosomal ADN molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66: 411-453.

Hillis, D.M. y J.P. Huelsenbeck. 1992. Signal, noise, and reliability in molecular phylogentic analysis. *Journal of Heredity* 83: 189-195.

Hillis, D.M. y J.J. Bull. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42:182-192.

Hommersand, M.H. 1963. The morphology and classification of some Ceramiaceae and Rhodomelaceae. *University California Publications of Botany* 35: 165-366.

Hommersand, M.H., S. Fredericq y D.W. Freshwater. 1994. Phylogenetic systematics and biogeography of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on nucleotide sequence analysis of *rbcL*. *Botanica Marina* 37: 193-203.

Howe, M.A. 1918. Class 3, Algae. In: Britton, N.L. (Ed.). *Flora of Bermuda (Illustrated)*. New York, pp. 489-540.

Huelsenbeck, J.P. 1991. Tree-length distribution skewness: an indicator of phylogentic information. *Systematic Zoology* 40: 257-270.

Huelsenbeck, J.P. y F.R. Ronquist. 2001. MrBayes. Bayesian inference of phylogeny. *Biometrics* 17: 754–755.

Jong, Y.S.D.M., A.W.G. Van Der Wurff, W.T. Stam y J.L. Olsen. 1998. Studies on Dasyaceae. 3. Towards a phylogeny of the Dasyaceae (Ceramiales, Rhodophyta), based on comparative *rbcL* sequences and morphology. *European Journal of Phycology* 33: 187-201.

Kamiya, M., J.A. West, G.C. Zuccarello y H. Kawai. 2000. *Caloglossa intermedia*, sp. nov. (Rhodophyta) from the western atlantic coast: Molecular and morphological analyses with special reference to *C. lepriurii* and *C. monosticha*. *Journal of Phycology* 36: 411-420.

Kamiya, M., J.A. West, R.J. King, G.C. Zuccarello, J. Tanaka y Y. Hara. 1998. Evolutionary divergence in the red algae *Caloglossa lepriurii* and *C. apomeiotica*. *Journal of Phycology* 34: 361-370.

Kamiya, M., J. Tanaka, R.J. King, J.A. West, G.C. Zuccarello y H. Kawai. 1999. Reproductive and genetic distinction between broad and narrow entities of *Caloglossa continua* (Delesseriaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 38 (5): 356-367.

Kanaya, S., Y. Yamada, Y. Kudo, y T. Ikemura. 1999. Studies of codon usage and tRNA genes of 18 unicellular organisms and quantification of *Bacillus subtilis* tRNAs: gene expression level and species-specific diversity of codon usage based on multivariate analysis. *Gene* 238: 143-155.

Kellogg, E.A. y N.D. Juliano. 1997. The structure and function of RUBISCO and their implications for systematic studies. *American Journal of Botany* 84(3): 413-428.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal Molecular and Evolution* 2: 87-90.

Kostrzema, M., K. Valentin, U. Maid., R. Radetzky y K. Zetsche. 1990. Structure of the rubisco operon from the multicellular red alga *Antithamnion* sp. *Current Genetics* 18: 465-469.

Kraft, G.T. 1981. Rhodophyta: morphology and classification. In: Lobban, C.S. y M.J. Wynne (Eds). *The Biology of seaweeds*. Oxford: Blackwell, pp. 6-51.

Kraft, G.T. y W.J. Woelkerling. 1990. Rhodophyta. In: Clayton, M.N. y R.J. King (Eds). *Biology of marine plants*. Melbourne: Longman Cheshire, pp. 41-85.

Kützing, F.T. 1849. *Species algarum*, vi, Lipsiae, 922 pp.

Kützing, F.T. 1865. *Tabulae Phycologicae*, vol. XV, Nordhausen. 36 pp., 100 pls.

Kylin, H. 1956. Die Gattungen der Rhodophyceen. CWK Gleerups Forlag: Lund. 673 pp.

Lamouroux, J.V.F. 1805. *Dissertations sur plusieurs espèces de Fucus*...Agen. xxiv + 83 [85 = Errata] pp., XXXVI pls.

Li, W-H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachussetts. 370 pp.

Lee, S.R., H.O. Jung, Y. Suh y I.K. Lee. 2001. Phylogenetic utility of *rbcS* sequences: An example from *Antithamnion* and related genera (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Journal of Phycology* 37: 1083-1090.

Maddison, D.R. 1991. The discovery and importance of multiple islands of most-parsimonious trees. *Systematic Zoology* 40: 315-328.

Mateo-Cid, L.E., A.C. Mendoza-González, B. Gavio y S. Fredericq. 2005. *Grateloupia huertana* sp. nov. (Halymeniaceae, Rhodophyta), a peculiar new prostate species from tropical Pacific Mexico. *Phycologia* 44(1): 4-16.

McDermid, K. 1988. Section V. *Laurencia* (Rhodophyta, Rhodomelaceae) Introduction. pp. 221-229. En: I.A. Abbott (ed.) *Taxonomy of Economic Seaweeds with Reference to some Pacific and Caribbean Species*. Vol. II. California Sea Grant College Program, La Jolla. California.

McIvor, L., C.A. Maggs y M.J. Stanhope. 2002b. *rbcL* sequences indicates a single evolutionary origin of multinucleate cells in the red algal tribe Callithamnieceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 433-446.

McIvor, L., C.A. Maggs, J. Provan y M.J. Stanhope. 2001. *RbcL* sequences reveal multiple cryptic introductions of the Japanese red alga *Polysiphonia harveyi*. *Molecular Ecology* 10: 911-919.

McIvor, L., C.A. Maggs, M.D. Guiry y M.H. Hommersand. 2002a. Phylogenetic analysis of the geographically disjunct genus *Osmundea* Stakhouse (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Constancea* 83.9 [online publication of the Jepson Herbarium, UC, Berkeley]: <http://ucjeps.berkeley.edu/constancea/83/>.

Medlin, L., H.J. Elwood, S. Stickel, y M.L. Sogin. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 18S rADN-coding regions. *Gene* 71: 491-499.

Milstein, D. y M.C. de Oliveira. 2005. Molecular phylogeny of Bangiales (Rhodophyta) based on small subunit rDNA sequencing: emphasis on Brazilian *Porphyra* species. *Phycologia* 44(2): 212-221.

Montagne, C. 1836. Notice sur les plantes cryptogames récemment découvertes en France, contenant aussi l'indication précise des localités de quelques espèces les plus rares de la flore française. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique* ser. 2, 6: 28-36, 321-339, pl. 18.

Montagne, C. 1840. Seconde centurie de plantes cellulaires exotiques nouvelles. Décades I et II. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique*, ser. 2, 13 : 193-207, pl. 5; pl. 6: figs. 1, 3.

Montagne, C. 1842. Botanique. Plantes cellulaires. In: R. de la Sagra. (Ed.) *Histoire physique, politique et naturelle de l'île de Cuba* 2 (11). 549 pp., pls. 1-20.

Morton, B.R. 1993. Chloroplast DNA codon use: Evidence for selection at the *psbA* locus based on tRNA availability. *Journal Molecular of Evolution* 37: 273-280.

Morton, B. R. 1994. Codon use and the rate of divergence of land plant chloroplast genes. *Molecular Biology and Evolution* 11(2): 231-238.

Morton, B. R. 1998. Selection on the codon bias of chloroplast and cyanelle genes in different plant and algal lineages. *Journal Molecular and Evolution* 46: 449–459.

Morton, B.R. 1999. Strand asymmetry and codon usage bias in the chloroplast genome of *Euglena gracilis*. *Proceedings of National Academy of Sciences* 96: 5123-5128.

Morton, B. R. 2001. Selection at the amino acid level can influence synonymous codon usage: Implications for the study of codon adaptation in plastid genes. *Genetics* 159: 347–358.

Morton, B.R. y J.A. Levin. 1997. The atypical codon usage of the plant *psbA* gene may be the remnant of an ancestral bias. *Proceedings of National Academy of Sciences* 94: 11434-11438.

Morton, B. R. y B. G. So. 2000. Codon usage in plastid genes is correlated with context, position within the gene, and amino acid content. *Journal Molecular and Evolution* 50: 184-193.

Muller, K.M., R.G. Sheath, M.L. Vis., T.J. Crease y K.M. Cole. 1998. Biogeography and systematics of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) based on the Rubisco spacer, *rbcL* gene and 18S rARN gene sequences and morphometric analyses. 1. North America. *Phycologia* 37: 195-207.

Nam, K.W. 1999. Morphology of *Chondrophycus undulata* and *C. parvipapillata* and its implications for the taxonomy of the *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) complex. *European Journal of Phycology* 34: 455-468.

Nam, K.W. 2006. Phylogenetic re-evaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. succulenta* sp. nov. from Korea. *Journal Applied Phycology* 18: 679-697.

Nam, K.W. 2007. Validation of the generic name *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Algae* 22: 53-55.

Nam, K.W., C.A. Maggs y D.J. Garbary. 1994. Resurrection of the genus *Osmundea* with an emendation of the generic delineation of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia* 33: 384-395.

Nam, K.W., C.A. Maggs, L. McIlvor y M.J. Stanhope. 2000. Taxonomy and phylogeny of *Osmundea* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in Atlantic European *Journal of Phycology*. 36: 759-772.

NCBI (GenBank). 2003. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.

Neefs, J-C. y R. De Wachter. 1990. A proposal for the secondary structure of a variable area of eukaryotic small ribosomal subunit RNA involving the existence of a pseudoknot. *Nucleic Acids Research* 18(19): 5695-5704.

Nelson, W.A., T.J. Farr y J.E.S Broom. 2005. *Dione* and *Minerva*, two genera from New Zealand circumscribed for basal taxa in the Bangiales (Rhodophyta). *Phycologia* 75(2): 139-145.

Odabachian, A. U. 2004. Optimización de Costos en la Producción de Proteínas en el Genoma Humano [en línea]. Revista Digital Universitaria.

Palmer, J.D., R.K. Janen, J.M. Helen., M.W. Chase y J.R. Manhart. 1988. Chloroplast ADN variation and plant phylogeny. *Annual Missouri Botanical Garden* 75: 1180-1206.

Papenfuss, G.F. 1966. A review of the present system of classification of the Florideophycidae. *Phycologia* 5: 247-55.

Posada, D. y K.A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-18.

Rabenhorst, L. 1847. *Deutschlands Kryptogamen Flora. Zweiter Band. Zweiter Abteilung: Algen*. Leipzig, XIX, 216 pp.

Ragan, M.A., C.J. Bird, E.L. Rice, R.R. Gutell, C.A. Murphy y R.K. Singh, 1994. A molecular phylogeny of the marine red algae (Rhodophyta) based on the nuclear small-subunit rARN gene. *Proceedings of National Academy of Sciences* 91: 7276-7280.

Rozas, J., J.C. Sánchez-Del Barrio, X. Messeguer y R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

Saunders, G.W y J.C. Bailey. 1997. Phylogenesis of pit-plug associated features in the Rhodophyta: inferences from molecular systematic data. *Canadian Journal of Botany* 75: 1436-1447.

Saunders, G.W y G.T. Kraft. 1997. A molecular perspective on red algal evolution: focus on the Florideophycidae. *Plant Systematic Evolution* 11: 115-138.

Saunders, G.W., C.J. Bird, M.A. Ragan y E.L. Rice. 1995. Phylogenetic relationships of species of uncertain taxonomic position within the Acrochaetiales-Palmariales complex (Rhodophyta): inferences from phenotypic and 18S rADN sequence data. *Journal of Phycology* 31: 601-611.

Sentíes, G.A. 2000. El género *Laurencia* Lamouroux (Ceramiales, Rhodophyta) en el Caribe mexicano: estudios morfo-anatómicos y poblacionales. Tesis doctoral. UNAM. México. 128 pp.

Sentíes G.A. y M.T. Fujii. 2002. El complejo *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) en el Caribe mexicano. In: Sentíes, A. y K. Dreckmann (Eds.) Monografías Ficológicas. UAMI y Red Latinoamericana de Botánica. México, D.F. pp. 119-192.

Sentíes G.A. y J. Díaz-Larrea. 2008. Proposals for *Palisada poiteau* var. *gemmifera* comb. nov. and *Palisada corallopsis* comb. nov. (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Botanica Marina* 51: 69–70.

Seo, K.S., T.O. Cho, J.S. Park, E.C. Yong, H.S. Yoon. y S.M. Boo. 2003. Morphology, basiphyte range, and plastid ADN phylogeny of *Campylaeophora borealis* stat. nov. (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Taxon* 52: 9-19.

Sharp, P.M., T.M.F. Tuohy y K.R. Mosursky. 1986. Codon usage in yeast: Cluster analysis clearly differentiates highly and lowly expressed genes. *Nucleic Acid Research* 14: 5125-5143.

Sheath, R.G. y K.M. Muller. 1999. Systematic status and phylogenetic relationships of the freshwater genus *Balbiania* (Rhodophyta), *Journal of Phycology* 35: 855-864.

Shields, D.C., P.M. Sharp, D.G. Higgins y F. Wright. 1988. "Silent" sites in *Drosophila* genes are not neutral: Evidence of selection among synonymous codon. *Molecular Journal and Evolution*. 5: 704-716.

Skage, M., T.M. Gabrielsen y J. Rueness. 2005. A molecular approach to investigate the phylogenetic basis of three widely used species groups in the red algal genus *Ceramium* (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 44(4): 353-360.

Sogin, M.L., H.J. Elwood, y J.H. Gunderson. 1986. Evolutionary diversity of eukaryotic small-subunit rARN genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83: 1383-1387.

Spiegel, M.R. 1977. Teoría y problemas de estadística. Editorial Pueblo y Educación. Cuarta edición. 358 pp.

Swofford, D.L. 2001. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Thompson, J.D., D.G. Higgins y 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.

Ueda-Mishimura, K. y K. Mikata. 2000. Two distinct 18S rRNA secondary structures in *Dipodascus* (Hemiascomycetes). *Microbiology* 146: 1045-1051.

Valentin, K. y K. Zetsche. 1989. The genes of both subunits of ribulose-1.5 carboxylase constitute an operon on the plastome of a red alga. *Current Genetics* 16: 203-209.

Vis, M.L., G.W. Saunders, R.G. Sheath., K. Dunse y T. Entwisle. 1998. Phylogeny of the Batrachospermales (Rhodophyta) inferred from *rbcL* and 18S ribosomal ADN gene sequences. *Journal of Phycology* 34: 341-350.

Wall, D.P. y J.T. Herbeck. 2003. Evolutionary patterns of codon usage in the chloroplast gene *rbcL*. *Journal Molecular and Evolution* 56: 673-688.

Williams, S.M., R.W. Debry y J.L. Feder. 1988. A commentary on the use of ribosomal ADN in systematic studies. *Systematic Zoology* 37 (1): 60-62.

Woelkerling, W.J. 1990. An introduction. In: Cole, K.M. y R.G. Sheath (Eds.). *Biology of the Red Algae*. Cambridge University Press, New York, pp 1-6.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Review* 51: 221-271.

Womersley, H.B.S. 2003. The marine benthic flora of southern Australia. Rhodophyta – Part IIID. *Ceramiales – Delesseriaceae, Sarcomeniaceae, Rhodomelaceae*. Australian Biological Resources Study and the State Herbarium of South Australia, Canberra. 533 pp.

Wright, F. 1990. The "effective number of codons" used in a gene. *Gene* 87: 23-29.

Yamada, Y. 1931. Notes on *Laurencia* with special reference to the Japanese species. *University of California Publication in Botany*. 16: 185-310.

Yoon, H.S. y S.M. Boo. 1999. Phylogeny of Alariaceae (Phaeophyta) with special reference to *Undaria* based on sequences of the RUBISCO spacer region. *Hydrobiologia* 398/399: 47-55.

Zanardini, G. 1847. Notizie intorno alle cellulari marine delle lagune e de' litorali di Venezia. *Atti del Reale Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti* 6: 185-262.

Zharkikh, A. y W-H, Li. 1992. Phylogenetic performance of mitochondrial protein coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Molecular Biology Evolution* 13: 933-942.

Zuccarello, G.C y J.A. West. 1997. Hibridization studies in *Bostrychia*: 2. Correlation of crossing data and plastid ADN sequence data within *B. radicans* and *B. moritziana* (Ceramiaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 36 (4): 293-304.

Zuccarello, G.C y J.A. West. 2002. Phylogeography of the *Bostrychia calliptera*-*B. pinnata* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and divergence rates based on nuclear, mitochondrial and plastid ADN markers. *Phycologia* 41: 49-60.

Zuccarello, G.C., J.A. West y R.J. King. 1999a. Evolutionary divergence in the *Bostrychia montiziana*/*B. radicans* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta): molecular and hybridization data. *Phycologia* 38: 234-244.

Zuccarello, G.C., B. Sandercock y J.A. West. 2002. Diversity within red algal species: variation in world-wide samples of *Spiridia filamentosa* (Ceramiaceae) and *Murrayella pericladus* (Rhodomelaceae) using DNA markers and breeding studies. *European Journal of Phycology* 37: 403-417.

Zuccarello, G.C., G. Burger, J.A. West y R.J. King. 1999b. A mitochondrial marker for red algae intraspecific relationships. *Molecular Ecology* 8: 1443-1447.

APÉNDICES

Apéndice 1. Especies de *Laurencia sensu lato* incluidas en el estudio para los genes: *rbcL*, RUBISCO espaciadora y 18S.

Muestra	Localidad y Año de Recolecta <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	No. Acceso GenBank <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	No. Herbario <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	Porcentaje del gen secuenciado <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S
<i>Bostrychia calliptera</i> (Montagne) Montagne ^{a,c}	- / - /	- / AF382896 /	- / - /	- / 87.1 /
<i>B. radicans</i> (Montagne) Montagne in Orbigny ^{a,c}	St. Louis Bay, Mississippi, EUA / - /	AF259497 / - / -	- / - / -	90 / - / -
<i>Bryocladia cuspidata</i> (J. Ag.) De Toni ^{a,c}	Port Aransas, Texas, EUA / - / -	AF259498 / - / -	- / - / -	97.8 / - / -
<i>Centroceras clavulatum</i> (C. Agardh in Kunth) Montagne in Durieu de Maisonneuve ^{a,c}	EUA / - / Falmouth, Trelawny Province, Jamaica. 1999/	AF259490 / - / DQ022759/	- / - / -	97 / - / 94.5
<i>Ceramium affine</i> Setchell et N.L. Gardner ^{a,c}	- / - / Pichilingue, Baja California, México. 2000	- / - / AF460859	- / - / -	- / - / 96.4
<i>C. brevizonatum</i> H.E. Petersen ^{a,c}	EUA / - / -	AF259491 / - / -	- / - / -	97.2 / - / -
<i>C. tenerimum</i> (G. Martens) Okamura ^{a,c}	- / - / Namhae, Gachun, South Coast, South Korea. 1999	- / - / AF460867	- / - / -	- / - / 96.8
<i>Chondria dasyphylla</i> (Woodwar) C. Agardh ^{a,c}	Morehead City, North Carolina, EUA / - / -	U04021 / - / -	- / - / -	97.8 / - / -
<i>Chondrophycus thuyoides</i> (Kützinger) G. Furnari ^b	Playa Paraíso, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006. / Paraíso, Tenerife, Islas Canarias. 2006 / -	EF685998 / EF685998 / -	TFCPhyc 13127	98.3 / 88.6 / -
<i>C. patentirameus</i> (Montagne) K.W. Nam ^c	Filipinas / - / -	AF489862 / - / -	- / - / -	89 / - / -
<i>Gracilaria cervicornis</i> (Turner) J. Agardh ^{a,b}	Playa del Carmen, Quintana Roo, México. 2004 / Playa del Carmen. México. 2004 / -	NS / NS / AF468897	UAMIZ-1015	100 / 87.1 / 98.9
<i>G. mammillaris</i> (Montagne) M.A Howe ^{a,b}	Playa del Carmen, Quintana Roo, México. 2004 / Playa del Carmen. México. 2004 / -	NS / NS / -	UAMIZ-1016	100 / 88.6 / -
<i>L. sp. 1</i> ^b	Puerto Morelos, Quintana Roo, México. 2004.	NS / NS / NS	- / - / -	100 / 87.8 / 98.1

Apéndice 1. (continuación)

Muestra	Localidad y Año de Recolecta <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	No. Acceso GenBank <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	No. Herbario <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	Porcentaje del gen secuenciado <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S
<i>L. arbuscula</i> Sonder ^c	Ilha das Couves, Ubatuba, São Paulo, Brasil. 2001/ - / -	AF465810 / - / -	- / - / -	95.6 / - / -
<i>L. brongniartii</i> J. Agardh ^b	Tarcoala Beach, Australia. 1995.	EF061654 / EF061654 / NS	-	98.6 / 88.6 / 84.7
<i>L. cf. brongniartii</i> ^c	Makang Harbour, Taiwan. 1993/ - / -	AF465814 / - / -	- / - / -	95.6 / - / -
<i>L. caraibica</i> P.C. Silva ^b	Isla Mujeres, Quintana Roo, México. 2006.	EF658642 / EF658642 / NS	UAMIZ-1005	98.2 / 87.1 / 99.9
<i>L. sp. 2a</i> ^b	Playa del Carmen, Quintana Roo, México. 2004 / Playa del Carmen, Quintana Roo, México. 2004 / -	NS / NS / -	-	100 / 87.1 / -
<i>L. sp. 2b</i> ^b	Tulum, Quintana Roo, México. 2007.	NS / NS / NS	-	100 / 100 / 99.9
<i>L. cf. catarinensis</i> ^c	Ilhabela, São Paulo, Brasil. 2001/ - / -	AF465808 / - / -	- / - / -	97.7 / - / -
<i>L. complanata</i> (Suhr) Kützing ^c	Port Eddward, Kwa- Zulu-Natal, Sudáfrica, África. 2001/ - / -	AF465813 / - / -	- / - / -	97.7 / - / -
<i>L. filiformis</i> J. Agardh ^b	Ojo de agua, Puerto Morelos, Quintana Roo, México. 2004.	EF658643 / EF658643 / NS	UAMIZ-1006	100 / 33.3 / 99.9
<i>L. filiformis</i> J. Agardh ^c	- / - / -	- / - / AF203894	- / - / -	- / - / 99.7
<i>L. cf. translucida</i> ^c	Marataizes, Espírito Santo, Brasil. 2001/ - / -	AY588408 / - / -	LAF 377; SP 356242/ - / -	98.9 / - / -
<i>L. sp. 3</i> ^b	Tulum, Quintana Roo, México. 2004.	NS / NS / NS	-	100 / 23.4 / 99.9
<i>L. intricata</i> J.V. Lamouroux ^b	Playa del Carmen, Quintana Roo, México. 2002.	NS / NS / NS	UAMIZ-1004	100 / 100 / 99.9
<i>L. intricata</i> J.V. Lamouroux ^b	Ojo de agua, Puerto Morelos, Quintana Roo, México. 2006.	EF658644 / EF658644 / NS	UAMIZ-1008	99.8 / 34.8 / 98.1
<i>L. intricata</i> J.V. Lamouroux ^c	Bahía de Campeche, Champoton, México. 1999/	AF465809 / - / -	- / - / -	96.9 / - / -
<i>L. intricata</i> J.V. Lamouroux ^c	Channel 5, Long Key, Florida, EUA/ - / -	AY588410 / - / -	LAF L55 / - / -	100 / - / -
<i>L. sp. 4</i> ^b	Puerto de la Cruz, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006/ Puerto de la Cruz, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006/ -	EF686000 / EF686000 / -	-	99.1 / 100 / -

Apéndice 1. (continuación)

Muestra	Localidad y Año de Recolecta <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	No. Acceso GenBank <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	No. Herbario <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	Porcentaje del gen secuenciado <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S
<i>L. marilzae</i> (12) ^b	Bahía Izquierda, Faro, Punta del Hidalgo, Tenerife, Islas Canarias, España. 2005 / Bahía Izquierda, Faro, Punta del Hidalgo, Tenerife, Islas Canarias. 2005 / -	EF686003 / EF686003 / -	TFCPhyc 13071	98.9 / 100 / -
<i>L. marilzae</i> (24) ^b	Playa Paraíso, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006/ Playa Paraíso, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006 / -	EF686001 / EF686001 / -	TFCPhyc 13128	98.9 / 100 / -
<i>L. marilzae</i> (4A) ^b	Punta del Hidalgo, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006/ Punta del Hidalgo, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006/ -	EF686002 / EF686002 / -	TFCPhyc 13129	99.4 / 100 / -
<i>L. natalensis</i> Kylin ^c	Port Eddward, Kwa – Zulú - Natal, Sudáfrica. 2001 / - / -	AF465816 / - / -	- / - / -	100 / - / -
<i>L. obtusa</i> (Hudson) J.V. Lamouroux ^c	Fanad Head, County Donegal, Irlanda 1998/ - / -	AF281881 / - / -	- / - / -	84.7 / - / -
<i>L. obtusa</i> 1 ^b	Puerto Morelos, Quintana Roo, México. 2005.	NS / NS / NS	-	100 / 88.6 / 99.9
<i>L. obtusa</i> 2 ^b	CRIP, Puerto Morelos, Quintana Roo, México. 2004.	NS / NS / NS	-	100 / 88.6 / 99.9
<i>L. sp.</i> 5 ^b	Playa Paraíso, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006/ Playa Paraíso, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006 / -	EF686004 / EF686004 / -	-	99.2 / 100 / -
<i>L. venusta</i> Yamada ^b	Punta Brava, Puerto Morelos, Quintana Roo, México. 2004.	EF061655 / EF061655 / NS	UAMIZ-1007	98.6 / 96.2 / 99.9
<i>L. sp.</i> 6 ^b	Isla Mujeres, Quintana Roo, México. 2006/ Isla Mujeres, Quintana Roo, México. 2006 / -	NS / NS / -	-	100 / 100 / -
<i>L. viridis</i> Gil- Rodríguez et Haroun (6) ^b	Roca Negra, Punta del Hidalgo, Tenerife, Islas Canarias, España. 2005/ Roca Negra, Punta del Hidalgo, Tenerife, Islas Canarias, España. 2005 / -	EF685999 / EF685999 / -	TFC Phyc 13065	98.8 / 88.6 / -

Apéndice 1. (continuación)

Muestra	Localidad y Año de Recolecta <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	No. Acceso GenBank <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	No. Herbario <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	Porcentaje del gen secuenciado <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S
<i>Neosiphonia japonica</i> (Harvey) M.S. Kim et I.K. Lee ^{a,c}	- / - / -	- / - / AB219908	- / - / -	- / - / 99.2
<i>Osmundea osmunda</i> (S. G. Gmelin) K.W. Nam ^c	Irlanda / - / -	AF281877 / - / -	- / - / -	84.8 / - / -
<i>O. pinnatifida</i> (Hudson) Stackhouse (18) ^b	Puerto de la Cruz, Tenerife, Islas Canarias, España. 2005/ Puerto de la Cruz, Tenerife, Islas Canarias, España. 2005/ -	EF686005 / EF686005 / -	TFC Phyc 13077	98.9 / 99.24 / -
<i>O. pinnatifida</i> (Hudson) Stackhouse ^c	St. John's Point, County Donegal, Irlanda. 1999/ - / -	AF281875 / - / -	- / - / -	84.8 / - / -
<i>O. pinnatifida</i> (Hudson) Stackhouse ^c	Penmarch, Brittany, Francia. 1993 / - / -	AF259495 / - / -	- / - / -	97 / - / -
<i>O. spectabilis</i> (Postels et Ruprecht) K.W. Nam var <i>spectabilis</i> ^c	Punta Santo Thomas, Baja California, México. 1996 / - / -	AY172574 / - / -	- / - / -	82.9 / - / -
<i>O. truncata</i> (Kützinger) K.W. Nam et Maggs ^c	Irlanda / - / -	AF281879 / - / -	- / - / -	84.8 / - / -
<i>O. sp.</i> ^b	Isla Mujeres, Quintana Roo, México. 2007 / Isla Mujeres, Quintana Roo, México. 2007 / -	NS / NS / -	-	100 / 90.9 / -
<i>Palisada corallopsis</i> (Montagne) Senties, M.T. Fujii et Díaz- Larrea ^b	Playa Chaac-Mol, Cancún, Quintana Roo, México. 2005.	EF061646 / EF061646 / NS	UAMIZ-1014	98.6 / 87.8 / 99.9
<i>P. flagellifera</i> (J. Agardh) K.W. Nam ^b	Es. Marataizes, Espírito Santo, Brasil. 2001.	EF061647 / EF061647 / NS	-	98.6 / 88.6 / 99.9
<i>P. gemmifera</i> (Harvey) Nam ^b	Playa del Carmen, Quintana Roo, México. 2004.	EF061649 / EF061649 / NS	UAMIZ-1010	100 / 88.6 / 98.1
<i>P. gemmifera</i> (Harvey) Nam ^b	Ojo Agua, Puerto Morelos, Quintana Roo, México. 2004.	EF061648 / EF061648 / NS	UAMIZ-1009	96.5 / 88.6 / 84.7
<i>P. gemmifera</i> (Harvey) Nam ^b	Rincón de Guanabo, La Habana, Cuba. 2004.	EF061650 / EF061650 / NS	- / - / -	98.6 / 94.7 / 84.7
<i>P. papillosa</i> (C. Agardh) K.W. Nam ^a	CRIP, Puerto Morelos, Quintana Roo, México. 2004.	EF061651 / EF061651 / NS	UAMIZ-1011	100 / 88.6 / 99.9
<i>P. papillosa</i> (C. Agardh) K.W. Nam (263) ^b	Playa Paraíso, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006 / Playa Paraíso, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006 / -	EU256325 / NS / -	TFC Phyc 13134	100 / 88.6 / -

Apéndice 1. (continuación)

Muestra	Localidad y Año de Recolecta <i>rbcL</i>/ Espaciadora/18S	No. Acceso GenBank <i>rbcL</i>/ Espaciadora/18S	No. Herbario <i>rbcL</i>/ espaciadora/18S	Porcentaje del gen secuenciado <i>rbcL</i>/ Espaciadora/18S
<i>P. papillosa</i> (C.Agardh) K.W. Nam ^c	Rio das Ostras, Areias Negras, Brasil. 2005/ Rio das Ostras, Areias Negras, Brasil. 2005 / -	EU256326 / NS / -	HRJ 10838	100 / 88.6 / -
<i>P. papillosa</i> (C.Agardh) K.W. Nam ^c	Brasil. 1997 / - / -	AF465806 / - / -	- / - / -	99.1 / - / -
<i>P. papillosa</i> (C.Agardh) K.W. Nam ^c	Old Dan's Reef, Keys Marine Lab. Florida, EUA. 1998 / - / -	AF465807 / - / -	- / - / -	96.7 / - / -
<i>P. papillosa</i> (C.Agardh) K.W. Nam ^c	Todos Santos, Baja California, México. 1999 / - / -	AY588409 / - / -	- / - / -	99.1 / - / -
<i>P. sp.</i> ^b	Playa del Secreto, Quintana Roo, México. 2007 / Playa del Secreto, México. 2007 / -	NS / NS / -	-	100 / 88.6 / -
<i>P. perforata</i> (Bory) K.W.Nam ^b	Isla Mujeres, Quintana Roo, México. 2007.	EF658641 / EF658641 / NS	UAMIZ-1012	100 / 87.8 / 99.9
<i>P. perforata</i> (Bory) K.W.Nam (261) ^b	Puerto de la Cruz, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006/ Puerto de la Cruz, Tenerife, Islas Canarias, España. 2006 / -	EU256329 / NS / -	TFC Phyc 13132	100 / 88.6 / -
<i>P. perforata</i> (Bory) K.W.Nam (Bory) (9) ^b	Bahía Izquierda, Faro, Punta del Hidalgo, Tenerife, Islas Canarias, España. 2005 / Bahía Izquierda, Faro, Punta del Hidalgo, Tenerife, Islas Canarias, España. 2005 / -	EU256327 / NS / -	TFC Phyc 13068	100 / 88.6 / -
<i>P. perforata</i> (Bory) K.W.Nam ^c	Praia Vermelha, Parati, Brasil. 2005 / Praia Vermelha, Parati, Brasil. 2005 / -	EU256331 / NS / -	HRJ 10840	100 / 88.6 / -
<i>P. perforata</i> (Bory) K.W.Nam ^c	Rio das Ostras, Areias Negras, Brasil. 2005 / Rio das Ostras, Areias Negras, Brasil. 2005 / -	EU256330 / NS / -	HRJ 10839	100 / 88.6 / -

Apéndice 1. (continuación)

Muestra	Localidad y Año de Recolecta <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	No. Acceso GenBank <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S	No. Herbario <i>rbcL</i> / espaciadora/18S	Porcentaje del gen secuenciado <i>rbcL</i> / Espaciadora/18S
<i>P. perforata</i> (Bory) K.W.Nam (Bory) (13) ^b	Bahía Izquierda, Faro, Punta del Hidalgo, Tenerife, Islas Canarias, España. 2005 / Bahía Izquierda, Faro, Punta del Hidalgo, Tenerife, Islas Canarias, España. 2005 / -	EU256328 / NS / -	TFC Phyc 13072	100 / 88.6 / -
<i>P. poiteaui</i> (J.V. Lamour.) K.M. Nam ^b	Playa del Carmen, Quintana Roo, México. 2005.	EF061653 / EF061653 / NS	UAMIZ-1013	100 / 88.6 / 99.9
<i>P. poiteaui</i> (J.V. Lamour.) K.M. Nam ^b	Ocean Side, Long Key, Florida, EUA. 1998.	EF061652 / EF061652 / NS	-	100 / 88.6 / 98.19
<i>Polysiphonia howei</i> Hollenberg ^{a,c}	- / - / -	- / - / AY237282	- / - / JAW 2922	- / - / 97.3
<i>P. muelleriana</i> J. Agardh ^{a,c}	Deas Cove, Thompson Sound, Fiordland, Nueva Zelanda. 2000 / - /-	AY588412 / - / -	LAF 223; WELT ASA356 / - / -	96.7 / - / -
<i>P. paniculata</i> Montagne ^{a,c}	- / - / 4-mile Beach, Santa Cruz, California, EUA.	- / - / AY617144	- / - / -	- / - / 99.8
<i>P. senticulosa</i> Harvey ^{a,c}	- / - / -	- / - / AB219907	- / - / -	- / - / 97.3
<i>Rhodomela</i> <i>confervoides</i> (Hudson) P.C. Silva ^{a,c}	- / - / Brittany, Francia.	- / - / AY617145	- / - / -	- / - / 99.9

^a Grupos externos. ^b Secuencias obtenidas en el estudio. ^c Secuencias tomadas del GenBank. NS = Secuencia no sometida a Genbank. – Datos ausentes.

Apéndice 2. Distancia no corregida ("p") para *rbcL* entre los taxa estudiados.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>G. cervicornis</i> MEX	-							
2 <i>G. mammillaris</i> MEX	0.04772	-						
3 <i>B. cuspidata</i> GB	0.04130	0.04061	-					
4 <i>B. radicans</i> GB	0.04623	0.04484	0.04881	-				
5 <i>P. muelleriana</i> GB	0.04076	0.04287	0.04543	0.04828	-			
6 <i>C. clavulatum</i> GB	0.04934	0.04073	0.04037	0.04469	0.04096	-		
7 <i>C. brevizonatum</i> GB	0.04034	0.04825	0.04938	0.04101	0.04591	0.04939	-	
8 <i>C. dasyphylla</i> GB	0.04353	0.04009	0.04374	0.04313	0.04356	0.04001	0.04591	-
9 <i>L. viridis</i> 6E	0.28351	0.28350	0.28155	0.28005	0.28151	0.28467	0.28074	0.28338
10 <i>P. perforata</i> 9E	0.28096	0.28751	0.28075	0.28946	0.28368	0.28740	0.28766	0.28265
11 <i>L. marilzae</i> 12E	0.28027	0.28302	0.28005	0.28990	0.28204	0.28572	0.28765	0.28123
12 <i>P. perforata</i> 13E	0.28996	0.28653	0.28081	0.28950	0.28374	0.28747	0.28772	0.28271
13 <i>O. pinnatifida</i> 18E	0.28578	0.28716	0.28559	0.28000	0.28229	0.28675	0.28773	0.28836
14 <i>C. thuyoides</i> E	0.28836	0.28351	0.28816	0.28895	0.28245	0.28031	0.28857	0.28987
15 <i>L. marilzae</i> PTPE	0.28958	0.28233	0.28936	0.28920	0.28203	0.28502	0.28765	0.28122
16 <i>L. marilzae</i> PTHE	0.28878	0.28152	0.28942	0.28932	0.28145	0.28512	0.28705	0.28059
17 <i>L. sp. 5</i>	0.28572	0.28500	0.28869	0.28416	0.28072	0.28597	0.28065	0.28413
18 <i>L. sp. 4</i>	0.28311	0.28032	0.28804	0.28862	0.28566	0.28881	0.28307	0.28415
19 <i>P. perforata</i> 261E	0.28928	0.28588	0.28087	0.28957	0.28379	0.28751	0.28779	0.28275
20 <i>P. papillosa</i> 263E	0.28928	0.28588	0.28087	0.28957	0.28379	0.28751	0.28779	0.28275
21 <i>P. poiteau</i> USA	0.28792	0.28247	0.28579	0.28280	0.28510	0.28584	0.28777	0.28185
22 <i>L. brongniartii</i> AUS	0.28340	0.28271	0.28019	0.28157	0.28790	0.28033	0.28526	0.28860
23 <i>P. gemmifera</i> CUBA	0.28512	0.28236	0.28440	0.28007	0.28163	0.28521	0.28364	0.28903
24 <i>P. papillosa</i> Ostras	0.28792	0.28451	0.28087	0.28097	0.28379	0.28751	0.28780	0.28276
25 <i>P. perforata</i> Ostras	0.28792	0.28451	0.28087	0.28097	0.28379	0.28751	0.28780	0.28276
26 <i>P. perforata</i> Parati	0.28724	0.28383	0.28018	0.28027	0.28309	0.28681	0.28710	0.28205
27 <i>P. flagellifera</i> BRA	0.28720	0.28306	0.28108	0.28725	0.28585	0.28090	0.28865	0.28617
28 <i>P. corallopsis</i> MEX	0.28305	0.28029	0.28594	0.28091	0.28165	0.28579	0.28142	0.28121
29 <i>P. gemmifera</i> OAMEX	0.28020	0.28093	0.28337	0.28406	0.28250	0.28188	0.28981	0.28777
30 <i>P. gemmifera</i> PCMEX	0.28269	0.28383	0.28719	0.28503	0.28571	0.28154	0.28136	0.28274
31 <i>P. papillosa</i> MEX	0.28724	0.28383	0.28088	0.28092	0.28373	0.28746	0.28775	0.28273
32 <i>P. poiteau</i> PCMEX	0.28792	0.28247	0.28579	0.28280	0.28510	0.28584	0.28777	0.28185
33 <i>L. venusta</i> MEX	0.28373	0.28443	0.28465	0.28733	0.28873	0.28541	0.28452	0.28566
34 <i>L. sp. 1</i>	0.28322	0.28530	0.28382	0.28026	0.28517	0.28041	0.28679	0.28799
35 <i>L. caraibica</i> MEX	0.28970	0.28179	0.28519	0.28077	0.28921	0.28532	0.28097	0.28516
36 <i>L. sp. 2a</i>	0.28678	0.28746	0.28717	0.28132	0.28702	0.28013	0.28696	0.28661
37 <i>L. filiformis</i> MEX	0.28801	0.28869	0.28859	0.28512	0.28862	0.28455	0.28226	0.28146
38 <i>L. intricata</i> PCMEX	0.28282	0.28350	0.28152	0.28798	0.28290	0.28817	0.28515	0.28493
39 <i>L. intricata</i> OAMEX	0.28132	0.28337	0.28225	0.28733	0.28365	0.28752	0.28450	0.28495
40 <i>L. obtusa</i> 1	0.28927	0.28450	0.28023	0.28529	0.28375	0.28340	0.28387	0.28146
41 <i>L. obtusa</i> 2	0.28064	0.28587	0.28885	0.28598	0.28516	0.28200	0.28527	0.28218
42 <i>L. sp. 3</i>	0.28839	0.28909	0.28671	0.28395	0.28959	0.28415	0.28823	0.28178
43 <i>O. sp.</i>	0.28065	0.28724	0.28207	0.28734	0.28930	0.28593	0.28560	0.28653
44 <i>P. sp.</i>	0.28201	0.28133	0.28787	0.28801	0.28087	0.28455	0.28623	0.28072
45 <i>P. perforata</i> MEX	0.28860	0.28519	0.28018	0.28167	0.28450	0.28821	0.28850	0.28348
46 <i>L. sp. 2b</i>	0.28542	0.28678	0.28157	0.28647	0.28075	0.28737	0.28279	0.28159
47 <i>L. sp. 6</i>	0.28770	0.28292	0.28257	0.28817	0.28083	0.28983	0.28171	0.28704
48 <i>L. obtusa</i> GB	0.28240	0.28994	0.28030	0.28431	0.28433	0.28487	0.28160	0.28922
49 <i>L. arbuscula</i> GB	0.28883	0.28885	0.28899	0.28815	0.28398	0.28970	0.28612	0.28287
50 <i>L. cfbrongniartii</i> GB	0.28360	0.28574	0.28315	0.28598	0.28526	0.28604	0.28104	0.28273
51 <i>L. complanata</i> GB	0.28290	0.28942	0.28552	0.28899	0.28597	0.28829	0.28603	0.28003
52 <i>L. intricata</i> MEXGB	0.28177	0.28389	0.28933	0.28711	0.28309	0.28935	0.28447	0.28370

Apéndice 2. (continuación)

	1	2	3	4	5	6	7	8
53 <i>L. natalensis</i> SAGB	0.28179	0.28974	0.28182	0.28445	0.28079	0.28681	0.28959	0.28057
54 <i>L. intricata</i> USAGB	0.28110	0.28179	0.28879	0.28593	0.28226	0.28892	0.28312	0.28285
55 <i>L. cf. catarinensis</i> GB	0.28011	0.28080	0.28832	0.28742	0.28445	0.28829	0.28535	0.28366
56 <i>L. translucida</i> BR	0.28618	0.28825	0.28107	0.28504	0.28938	0.28669	0.28725	0.28192
57 <i>P. papillosa</i> BRAGB	0.28840	0.28631	0.28030	0.28097	0.28394	0.28812	0.28869	0.28361
58 <i>C. patentirameus</i> E	0.28763	0.28879	0.28753	0.28321	0.28179	0.28001	0.28350	0.28663
59 <i>P. papillosa</i> USAGB	0.28912	0.28703	0.28241	0.28167	0.28465	0.28882	0.28080	0.28433
60 <i>P. papillosa</i> BCGB	0.28621	0.28415	0.28999	0.28878	0.28224	0.28599	0.28560	0.28263
61 <i>O. pinnatifida</i> FRANC	0.28516	0.28939	0.28392	0.28825	0.28182	0.28627	0.28611	0.28720
62 <i>O. pinnatifida</i> GB	0.28254	0.28493	0.28175	0.28094	0.28767	0.28385	0.28386	0.28064
63 <i>O. osmunda</i> GB	0.28996	0.28158	0.28436	0.28919	0.28029	0.28609	0.28367	0.28564
64 <i>O. spectabilis</i> GB	0.28596	0.28425	0.28910	0.28655	0.28515	0.28392	0.28779	0.28711
65 <i>O. truncata</i> GB	0.28643	0.28155	0.28349	0.28742	0.28857	0.28163	0.28545	0.28137
	9	10	11	12	13	14	15	16
9 <i>L. viridis</i> 6E	-							
10 <i>P. perforata</i> 9E	0.09306	-						
11 <i>L. marilzae</i> 12E	0.26444	0.27124	-					
12 <i>P. perforata</i> 13E	0.09310	0.00000	0.27129	-				
13 <i>O. pinnatifida</i> 18E	0.09926	0.10813	0.34124	0.10818	-			
14 <i>C. thuyoides</i> E	0.09770	0.03048	0.26972	0.03049	0.10668	-		
15 <i>L. marilzae</i> PTPE	0.26375	0.27055	0.00207	0.27060	0.34193	0.26903	-	
16 <i>L. marilzae</i> PTHE	0.26384	0.27064	0.00069	0.27001	0.34065	0.26910	0.00137	-
17 <i>L. sp. 5</i>	0.05310	0.09502	0.26297	0.09484	0.09639	0.09831	0.26228	0.26215
18 <i>L. sp. 4</i>	0.07963	0.09639	0.26571	0.09628	0.09845	0.09765	0.26502	0.26494
19 <i>P. perforata</i> 261E	0.09314	0.00000	0.27135	0.00000	0.10822	0.03050	0.27065	0.27007
20 <i>P. papillosa</i> 263E	0.09314	0.00000	0.27135	0.00000	0.10822	0.03050	0.27065	0.27007
21 <i>P. poiteau</i> USA	0.09867	0.10753	0.27409	0.10681	0.11373	0.10744	0.27409	0.27281
22 <i>L. brongniartii</i> AUS	0.06316	0.09526	0.26252	0.09529	0.10494	0.09566	0.26252	0.26190
23 <i>P. gemmifera</i> CUBA	0.08978	0.10009	0.26526	0.10013	0.10910	0.10121	0.26526	0.26466
24 <i>P. papillosa</i> Ostras	0.09314	0.00138	0.27135	0.00137	0.10684	0.02912	0.27066	0.27007
25 <i>P. perforata</i> Ostras	0.09314	0.00138	0.27135	0.00137	0.10684	0.02912	0.27066	0.27007
26 <i>P. perforata</i> Parati	0.09383	0.00207	0.26204	0.00206	0.10615	0.02981	0.27135	0.27076
27 <i>P. flagellifera</i> BRA	0.07324	0.06216	0.26907	0.06218	0.10291	0.06921	0.26907	0.26845
28 <i>P. corallopsis</i> MEX	0.10293	0.06421	0.27806	0.06424	0.10360	0.07892	0.27806	0.27743
29 <i>P. gemmifera</i> OAMEX	0.07960	0.10064	0.26504	0.10069	0.10636	0.09945	0.26503	0.26442
30 <i>P. gemmifera</i> PCMEX	0.09246	0.10062	0.28234	0.09996	0.11856	0.10329	0.28233	0.28172
31 <i>P. papillosa</i> MEX	0.09383	0.00207	0.27203	0.00205	0.10753	0.02981	0.27134	0.27076
32 <i>P. poiteau</i> PCMEX	0.09867	0.10753	0.27409	0.10681	0.11373	0.10744	0.27409	0.27281
33 <i>L. venusta</i> MEX	0.07490	0.09525	0.25767	0.09529	0.09527	0.09706	0.25698	0.25705
34 <i>L. sp. 1</i>	0.06549	0.09936	0.26658	0.09941	0.10282	0.10162	0.26588	0.26597
35 <i>L. caraibica</i> MEX	0.07723	0.11006	0.27247	0.11011	0.11150	0.10818	0.27178	0.27186
36 <i>L. sp. 2</i>	0.27209	0.27753	0.02341	0.27681	0.35649	0.28882	0.02271	0.02247
37 <i>L. filiformis</i> MEX	0.07279	0.10481	0.27206	0.10411	0.10691	0.10675	0.27137	0.27082
38 <i>L. intricata</i> PCMEX	0.06586	0.09650	0.26444	0.09655	0.09857	0.09908	0.26375	0.26384
39 <i>L. intricata</i> OAMEX	0.06588	0.09650	0.26443	0.09584	0.09859	0.09911	0.26374	0.26323
40 <i>L. obtusa</i> 1	0.08589	0.10063	0.27199	0.09996	0.10408	0.09985	0.27130	0.27076
41 <i>L. obtusa</i> 2	0.08451	0.09994	0.27061	0.09927	0.10340	0.09916	0.26992	0.26939
42 <i>L. sp. 3</i>	0.07423	0.10562	0.27286	0.10492	0.10773	0.10698	0.27217	0.27163
43 <i>O. sp.</i>	0.19176	0.19956	0.20544	0.19885	0.00027	0.19675	0.20474	0.20407
44 <i>P. sp.</i>	0.10279	0.00224	0.27753	0.00274	0.11165	0.03952	0.27684	0.27623
45 <i>P. perforata</i> MEX	0.09314	0.00207	0.27204	0.00205	0.10753	0.02981	0.27135	0.27076
46 <i>L. sp. 2b</i>	0.26658	0.27339	0.01858	0.27270	0.38442	0.28467	0.01789	0.01768

Apéndice 2. (continuación)

	9	10	11	12	13	14	15	16
47 <i>L. sp. 6</i>	0.08588	0.09718	0.26648	0.09654	0.10064	0.09639	0.26579	0.26528
48 <i>L. obtusa</i> GB	0.05013	0.10422	0.27549	0.10427	0.10765	0.10605	0.27539	0.27551
49 <i>L. arbuscula</i> GB	0.08267	0.09814	0.26459	0.09818	0.09953	0.09548	0.26388	0.26394
50 <i>L. cfbrongniartii</i> GB	0.07055	0.09234	0.26165	0.09238	0.10512	0.09113	0.26165	0.26102
51 <i>L. complanata</i> GB	0.08578	0.07242	0.26539	0.07247	0.10099	0.07675	0.26469	0.26479
52 <i>L. intricata</i> MEXGB	0.06440	0.09609	0.26258	0.09613	0.09890	0.09695	0.26188	0.26197
53 <i>L. natalensis</i> GB	0.06862	0.09787	0.25614	0.09860	0.09373	0.09632	0.25614	0.25637
54 <i>L. intricata</i> USAGB	0.06312	0.09374	0.26168	0.09311	0.09721	0.09635	0.26099	0.26049
55 <i>L. cfcatarinensis</i> GB	0.07881	0.09887	0.26331	0.09892	0.09817	0.09765	0.26262	0.26269
56 <i>L. translucida</i> GB	0.09171	0.09715	0.27610	0.09719	0.11229	0.09909	0.27610	0.27550
57 <i>P. papillosa</i> BRAGB	0.09640	0.00249	0.27391	0.00250	0.10898	0.02956	0.27321	0.27330
58 <i>C. patentirrameus</i> E	0.09700	0.03088	0.26222	0.03099	0.10672	0.01007	0.26403	0.26111
59 <i>P. papillosa</i> USAGB	0.09571	0.00220	0.27322	0.00221	0.10969	0.02886	0.27252	0.27261
60 <i>P. papillosa</i> BCGB	0.10202	0.02034	0.28019	0.02071	0.11707	0.03324	0.27950	0.28082
61 <i>O. pinnatifida</i> FRANC	0.10152	0.11057	0.34286	0.11062	0.00490	0.10585	0.34356	0.34227
62 <i>O. pinnatifida</i> GB	0.10591	0.11602	0.34692	0.11607	0.00320	0.11230	0.34842	0.34695
63 <i>O. osmunda</i> GB	0.11578	0.12426	0.35187	0.12431	0.06663	0.11810	0.35258	0.35189
64 <i>O. spectabilis</i> GB	0.11443	0.11992	0.35776	0.11998	0.07989	0.11348	0.35932	0.35778
65 <i>O. truncata</i> GB	0.10982	0.12151	0.35391	0.12156	0.07374	0.11934	0.35543	0.35394
	17	18	19	20	21	22	23	24
17 <i>L. sp. 5</i>	-							
18 <i>L. sp. 4</i>	0.07950	-						
19 <i>P. perforata</i> 261E	0.09488	0.09634	-					
20 <i>P. papillosa</i> 263E	0.09488	0.09634	0.00000	-				
21 <i>P. poiteau</i> USA	0.09901	0.10872	0.10634	0.10634	-			
22 <i>L. brongniartii</i> AUS	0.06729	0.08180	0.09534	0.09534	0.09949	-		
23 <i>P. gemmifera</i> CUBA	0.09179	0.10078	0.10018	0.10018	0.00019	0.09122	-	
24 <i>P. papillosa</i> Ostras	0.09350	0.09634	0.00136	0.00136	0.10498	0.09534	0.10018	-
25 <i>P. perforata</i> Ostras	0.09350	0.09634	0.00136	0.00136	0.10498	0.09534	0.10018	0.00000
26 <i>P. perforata</i> Parati	0.09419	0.09703	0.00204	0.00204	0.10429	0.09603	0.09949	0.00068
27 <i>P. flagellifera</i> BRA	0.07387	0.08216	0.06219	0.06219	0.08430	0.05598	0.08017	0.06080
28 <i>P. corallopsis</i> MEX	0.10146	0.09942	0.06425	0.06425	0.10019	0.09952	0.09606	0.06287
29 <i>P. gemmifera</i> OAMEX	0.08235	0.08943	0.10074	0.10074	0.00025	0.08110	0.00011	0.10075
30 <i>P. gemmifera</i> PCMEX	0.09556	0.08396	0.09952	0.09952	0.00023	0.09465	0.00024	0.09816
31 <i>P. papillosa</i> MEX	0.09419	0.09702	0.00204	0.00204	0.10566	0.09603	0.10088	0.00068
32 <i>P. poiteau</i> PCMEX	0.09901	0.10872	0.10634	0.10634	0.00010	0.09949	0.00029	0.10498
33 <i>L. venusta</i> MEX	0.07832	0.08731	0.09534	0.09534	0.09811	0.07423	0.09053	0.09534
34 <i>L. sp. 1</i>	0.06471	0.08216	0.09946	0.09946	0.10227	0.07595	0.09325	0.09946
35 <i>L. caraibica</i> MEX	0.07649	0.09348	0.11017	0.11017	0.10602	0.07586	0.09980	0.10879
36 <i>L. sp. 2</i>	0.26968	0.27389	0.27634	0.27634	0.28111	0.26672	0.27570	0.27634
37 <i>L. fillformis</i> MEX	0.07127	0.08920	0.10366	0.10366	0.10775	0.08323	0.10024	0.10366
38 <i>L. intricata</i> PCMEX	0.06445	0.08168	0.09660	0.09660	0.10143	0.07628	0.09255	0.09660
39 <i>L. intricata</i> OAMEX	0.06440	0.08162	0.09555	0.09555	0.10033	0.07630	0.09259	0.09555
40 <i>L. obtusa</i> 1	0.08845	0.06371	0.09965	0.09965	0.11057	0.07358	0.10434	0.09965
41 <i>L. obtusa</i> 2	0.08570	0.05823	0.09897	0.09897	0.11126	0.07220	0.10503	0.09897
42 <i>L. sp. 3</i>	0.07201	0.08994	0.10461	0.10461	0.10598	0.08470	0.09830	0.10461
43 <i>O. sp.</i>	0.18723	0.18801	0.19838	0.19838	0.22202	0.19885	0.22886	0.19702
44 <i>P. sp.</i>	0.10175	0.10458	0.00168	0.00168	0.11384	0.10294	0.10916	0.00131
45 <i>P. perforata</i> MEX	0.09281	0.09703	0.00204	0.00204	0.10566	0.09603	0.10087	0.00068
46 <i>L. sp. 2b</i>	0.26487	0.27044	0.27225	0.27225	0.27634	0.26120	0.27087	0.27225
47 <i>L. sp. 6</i>	0.08774	0.05615	0.09611	0.09611	0.10770	0.07080	0.10365	0.09611
48 <i>L. obtusa</i> GB	0.05201	0.08553	0.10432	0.10432	0.10461	0.07036	0.09897	0.10274

Apéndice 2. (continuación)

	17	18	19	20	21	22	23	24
49 <i>L. arbuscula</i> GB	0.08258	0.00925	0.09822	0.09822	0.10748	0.08342	0.10040	0.09823
50 <i>L. cfbrongniartii</i> GB	0.07407	0.08688	0.09243	0.09243	0.09885	0.05563	0.09250	0.09101
51 <i>L. complanata</i> GB	0.08780	0.07410	0.07250	0.07250	0.09897	0.07883	0.09206	0.07250
52 <i>L. intricata</i> MEXGB	0.06291	0.07843	0.09618	0.09618	0.10108	0.07220	0.09341	0.09618
53 <i>L. natalensis</i> SAGB	0.07056	0.08089	0.09816	0.09816	0.09748	0.07005	0.08842	0.09816
54 <i>L. intricata</i> USAGB	0.06164	0.07817	0.09271	0.09271	0.09884	0.07215	0.09121	0.09271
55 <i>L. cfcatarlensis</i> GB	0.07873	0.00767	0.09897	0.09897	0.10594	0.08092	0.09832	0.09897
56 <i>L. translucida</i> GB	0.09509	0.09197	0.09725	0.09725	0.10207	0.07559	0.09806	0.09725
57 <i>P. papillosa</i> BRAGB	0.09631	0.09912	0.00250	0.00250	0.10760	0.09782	0.10272	0.00210
58 <i>C. patentirameus</i> E	0.09333	0.09265	0.03150	0.03340	0.10714	0.09511	0.10122	0.02922
59 <i>P. papillosa</i> USAGB	0.09562	0.09983	0.00221	0.00221	0.10831	0.09712	0.10343	0.00281
60 <i>P. papillosa</i> BCGB	0.10520	0.10589	0.02070	0.02070	0.11907	0.10217	0.10906	0.02032
61 <i>O. pinnatifida</i> FRANC	0.09932	0.10074	0.11067	0.11067	0.11490	0.10586	0.11144	0.10927
62 <i>O. pinnatifida</i> GB	0.10434	0.10348	0.11613	0.11613	0.11816	0.11020	0.11574	0.11455
63 <i>O. osmunda</i> GB	0.11333	0.12213	0.12437	0.12437	0.12318	0.12005	0.11994	0.12279
64 <i>O. spectabilis</i> GB	0.11768	0.12439	0.12001	0.12001	0.11780	0.11790	0.11700	0.11839
65 <i>O. truncata</i> GB	0.10824	0.11216	0.12162	0.12162	0.11804	0.11250	0.11640	0.12003
	25	26	27	28	29	30	31	32
25 <i>P. perforata</i> Ostras	-							
26 <i>P. perforata</i> Parati	0.00068	-						
27 <i>P. flagellifera</i> BRA	0.06080	0.06150	-					
28 <i>P. corallopsis</i> MEX	0.06287	0.06218	0.09602	-				
29 <i>P. gemmifera</i> OAMEX	0.10075	0.10004	0.08173	0.09298	-			
30 <i>P. gemmifera</i> PCMEX	0.09816	0.09884	0.08016	0.10158	0.00024	-		
31 <i>P. papillosa</i> MEX	0.00068	0.00136	0.06150	0.06356	0.10067	0.09884	-	
32 <i>P. poiteau</i> PCMEX	0.10498	0.10429	0.08430	0.10019	0.00025	0.00023	0.10566	-
33 <i>L. venusta</i> MEX	0.09534	0.09603	0.07533	0.09744	0.08178	0.09396	0.09604	0.09811
34 <i>L. sp. 1</i>	0.09946	0.10015	0.07721	0.10086	0.07827	0.09533	0.10016	0.10227
35 <i>L. caraibica</i> MEX	0.10879	0.10948	0.08731	0.11295	0.09169	0.10534	0.10948	0.10602
36 <i>L. sp. 2a</i>	0.27634	0.27702	0.26672	0.28261	0.27857	0.28725	0.27702	0.28111
37 <i>L. filiformis</i> MEX	0.10366	0.10434	0.08296	0.10647	0.08533	0.10093	0.10434	0.10775
38 <i>L. Intricata</i> PCMEX	0.09660	0.09729	0.07462	0.09810	0.07823	0.09452	0.09729	0.10143
39 <i>L. Intricata</i> OAMEX	0.09555	0.09624	0.07464	0.09813	0.07826	0.09350	0.09624	0.10033
40 <i>L. obtusa</i> 1	0.09965	0.09965	0.08776	0.10435	0.09313	0.09146	0.10034	0.11057
41 <i>L. obtusa</i> 2	0.09897	0.09966	0.08638	0.10435	0.09383	0.08805	0.09966	0.11126
42 <i>L. sp. 3</i>	0.10461	0.10530	0.08448	0.10663	0.08270	0.09914	0.10530	0.10598
43 <i>O. sp.</i>	0.19702	0.19770	0.22264	0.21195	0.22559	0.22134	0.19770	0.22202
44 <i>P. sp.</i>	0.00231	0.00200	0.06840	0.07323	0.10992	0.10702	0.00200	0.11384
45 <i>P. perforata</i> MEX	0.00068	0.00136	0.06149	0.06356	0.10145	0.09884	0.00136	0.10566
46 <i>L. sp. 2b</i>	0.27225	0.27293	0.26396	0.27847	0.27229	0.28247	0.27293	0.27634
47 <i>L. sp. 6</i>	0.09611	0.09680	0.08499	0.10158	0.09024	0.08589	0.09680	0.10770
48 <i>L. obtusa</i> GB	0.10274	0.10354	0.07808	0.10675	0.09180	0.09975	0.10265	0.10461
49 <i>L. arbuscula</i> GB	0.09823	0.09894	0.07618	0.09680	0.09052	0.08321	0.09817	0.10748
50 <i>L. cfbrongniartii</i> GB	0.09101	0.09172	0.06332	0.09169	0.08408	0.09526	0.09095	0.09885
51 <i>L. complanata</i> GB	0.07250	0.07181	0.06345	0.08854	0.08106	0.09832	0.07320	0.09897
52 <i>L. intricata</i> MEXGB	0.09618	0.09688	0.07094	0.09688	0.07760	0.09551	0.09611	0.10108
53 <i>L. natalensis</i> GB	0.09816	0.09884	0.07256	0.09604	0.07963	0.09407	0.09884	0.09748
54 <i>L. Intricata</i> USAGB	0.09271	0.09339	0.07187	0.09675	0.07685	0.09202	0.09339	0.09884
55 <i>L. cfcatarlensis</i> GB	0.09897	0.09967	0.07806	0.09966	0.08743	0.08156	0.09967	0.10594

Apéndice 2. (continuación)

	25	26	27	28	29	30	31	32
56 <i>L. translucida</i> GB	0.09725	0.09794	0.08291	0.10015	0.09787	0.10414	0.09794	0.10207
57 <i>P. papillosa</i> BRAGB	0.00210	0.00139	0.06115	0.06256	0.10162	0.10345	0.00210	0.10760
58 <i>C. patentirrameus</i> E	0.02112	0.02971	0.04911	0.05899	0.09445	0.10322	0.02921	0.10244
59 <i>P. papillosa</i> USAGB	0.00281	0.00251	0.06045	0.06327	0.10233	0.10276	0.00281	0.10831
60 <i>P. papillosa</i> BCGB	0.02032	0.02001	0.06698	0.07111	0.10063	0.11217	0.02063	0.11907
61 <i>O. pinnatifida</i> FRANC	0.10927	0.10857	0.10162	0.10438	0.10725	0.12119	0.10919	0.11490
62 <i>O. pinnatifida</i> GB	0.11455	0.11375	0.10528	0.10904	0.11342	0.12371	0.11446	0.11816
63 <i>O. osmunda</i> GB	0.12279	0.12199	0.11267	0.11722	0.11921	0.13516	0.12270	0.12318
64 <i>O. spectabilis</i> GB	0.11839	0.11756	0.10772	0.11266	0.11620	0.12596	0.11833	0.11780
65 <i>O. truncata</i> GB	0.12003	0.11922	0.10821	0.10798	0.11164	0.11960	0.11996	0.11804
	33	34	35	36	37	38	39	40
33 <i>L. venusta</i> MEX	-							
34 <i>L. sp. 1</i>	0.08503	-						
35 <i>L. caraibica</i> MEX	0.07863	0.07898	-					
36 <i>L. sp. 2</i>	0.26810	0.27438	0.27535	-				
37 <i>L. filiformis</i> MEX	0.07221	0.01322	0.09349	0.27298	-			
38 <i>L. intricata</i> PCMEX	0.08526	0.00625	0.07721	0.27072	0.01035	-		
39 <i>L. intricata</i> OAMEX	0.08528	0.00765	0.07584	0.26964	0.01161	0.00138	-	
40 <i>L. obtusa</i> 1	0.07358	0.08783	0.09696	0.27579	0.08941	0.08452	0.08392	-
41 <i>L. obtusa</i> 2	0.07358	0.08574	0.09696	0.27442	0.08736	0.08245	0.08188	0.00819
42 <i>L. sp. 3</i>	0.07231	0.01066	0.09299	0.27605	0.00580	0.00844	0.00868	0.07022
43 <i>O. sp.</i>	0.19540	0.19061	0.19924	0.20156	0.19253	0.18831	0.18716	0.18853
44 <i>P. sp.</i>	0.10018	0.10923	0.11365	0.27907	0.11116	0.10487	0.10374	0.10579
45 <i>P. perforata</i> MEX	0.09603	0.10016	0.10948	0.27566	0.10434	0.09729	0.09624	0.10034
46 <i>L. sp. 2b</i>	0.26258	0.27229	0.27744	0.00463	0.27843	0.27280	0.27169	0.27784
47 <i>L. sp. 6</i>	0.07081	0.08850	0.09973	0.27634	0.07342	0.08796	0.08733	0.01979
48 <i>L. obtusa</i> GB	0.08394	0.07175	0.09668	0.28269	0.07516	0.06941	0.06947	0.07223
49 <i>L. arbuscula</i> GB	0.08554	0.08550	0.09619	0.27394	0.07193	0.08478	0.08480	0.06421
50 <i>L. cfbrongniarti</i> GB	0.08122	0.08047	0.07758	0.26959	0.08764	0.08119	0.08121	0.07833
51 <i>L. complanata</i> GB	0.07838	0.07484	0.09095	0.27110	0.09115	0.07413	0.07417	0.09050
52 <i>L. intricata</i> MEXGB	0.08204	0.00982	0.07685	0.27327	0.01336	0.00634	0.00775	0.08839
53 <i>L. natalensis</i> GB	0.06177	0.07939	0.07791	0.26611	0.08728	0.07966	0.08050	0.08733
54 <i>L. intricata</i> USAGB	0.08114	0.00904	0.07585	0.27020	0.01296	0.00552	0.00683	0.08802
55 <i>L. cfcatarinensis</i> GB	0.08372	0.08160	0.09188	0.27249	0.08789	0.08088	0.08090	0.06071
56 <i>L. translucida</i> GB	0.09009	0.09227	0.09562	0.27825	0.09003	0.09378	0.09378	0.09827
57 <i>P. papillosa</i> BRAGB	0.09851	0.10281	0.11194	0.27973	0.10838	0.10060	0.10063	0.10210
58 <i>C. patentirrameus</i> E	0.09606	0.10166	0.10811	0.27822	0.10665	0.09900	0.09901	0.09905
59 <i>P. papillosa</i> USAGB	0.09781	0.10211	0.11265	0.27904	0.10769	0.09991	0.09994	0.10211
60 <i>P. papillosa</i> BCGB	0.10353	0.10145	0.11076	0.28838	0.11430	0.10477	0.10736	0.10875
61 <i>O. pinnatifida</i> FRANC	0.09670	0.10514	0.11363	0.35911	0.10797	0.10016	0.10022	0.10311
62 <i>O. pinnatifida</i> GB	0.10032	0.11169	0.12072	0.37615	0.11280	0.10605	0.10612	0.10553
63 <i>O. osmunda</i> GB	0.11495	0.12070	0.12888	0.37795	0.12340	0.11828	0.11996	0.12179
64 <i>O. spectabilis</i> GB	0.11539	0.12187	0.12712	0.38360	0.12542	0.11856	0.11859	0.12470
65 <i>O. truncata</i> GB	0.10416	0.11801	0.13037	0.38008	0.11908	0.11234	0.11324	0.10845

Apéndice 2. (continuación)

	41	42	43	44	45	46	47	48
41 <i>L. obtusa</i> 2	-							
42 <i>L. sp. 3</i>	0.08749	-						
43 <i>O. sp.</i>	0.18580	0.19351	-					
44 <i>P. sp.</i>	0.10511	0.11349	0.22043	-				
45 <i>P. perforata</i> MEX	0.09966	0.10529	0.19770	0.02063	-			
46 <i>L. sp. 2b</i>	0.27647	0.27870	0.20883	0.27770	0.27157	-		
47 <i>L. sp. 6</i>	0.01297	0.07290	0.18293	0.10293	0.09680	0.27157	-	
48 <i>L. obtusa</i> GB	0.08895	0.07675	0.19266	0.11166	0.10194	0.27633	0.08647	-
49 <i>L. arbuscula</i> GB	0.05848	0.07211	0.18895	0.10536	0.09894	0.26831	0.05419	0.08963
50 <i>L. cfbrongniarti</i> GB	0.07690	0.08851	0.19175	0.10028	0.09172	0.26184	0.07049	0.07921
51 <i>L. complanata</i> GB	0.07981	0.09132	0.18248	0.08158	0.07320	0.26622	0.07767	0.07515
52 <i>L. intricata</i> MEXGB	0.08556	0.01552	0.18398	0.10395	0.09689	0.26912	0.08341	0.06865
53 <i>L. natalensis</i> GB	0.08597	0.08674	0.19179	0.10566	0.09884	0.26066	0.08453	0.07823
54 <i>L. intricata</i> USAGB	0.08529	0.01573	0.18361	0.10020	0.09339	0.26816	0.08521	0.06782
55 <i>L. cfcatarinensis</i> GB	0.05513	0.08802	0.18735	0.10596	0.09967	0.26831	0.05370	0.08711
56 <i>L. translucida</i> GB	0.09828	0.09150	0.20066	0.10620	0.09794	0.27412	0.09482	0.09121
57 <i>P. papillosa</i> BRAGB	0.10210	0.10862	0.19911	0.02051	0.00140	0.27345	0.09708	0.10370
58 <i>C. patentirameus</i> E	0.09910	0.10688	0.19665	0.03992	0.02881	0.27460	0.09699	0.10600
59 <i>P. papillosa</i> USAGB	0.10141	0.10792	0.19982	0.02022	0.00211	0.27275	0.09639	0.10289
60 <i>P. papillosa</i> BCGB	0.10806	0.11375	0.22421	0.00239	0.02001	0.27219	0.10392	0.10107
61 <i>O. pinnatifida</i> FRANC	0.10241	0.10822	0.00022	0.11422	0.10997	0.35500	0.09882	0.10800
62 <i>O. pinnatifida</i> GB	0.10475	0.11435	0.00024	0.11866	0.11535	0.36221	0.10057	0.10774
63 <i>O. osmunda</i> GB	0.12101	0.12420	0.00035	0.12449	0.12199	0.36480	0.11846	0.11600
64 <i>O. spectabilis</i> GB	0.12390	0.12616	0.00039	0.12752	0.11921	0.36703	0.11875	0.11832
65 <i>O. truncata</i> GB	0.10766	0.11902	0.00026	0.12498	0.12083	0.36531	0.10839	0.10911

	49	50	51	52	53	54	55	56
49 <i>L. arbuscula</i> GB	-							
50 <i>L. cfbrongniarti</i> GB	0.08773	-						
51 <i>L. complanata</i> GB	0.09551	0.08408	-					
52 <i>L. intricata</i> MEXGB	0.08341	0.07767	0.07252	-				
53 <i>L. natalensis</i> GB	0.08125	0.07546	0.08926	0.07703	-			
54 <i>L. intricata</i> USAGB	0.08267	0.07694	0.07137	0.00071	0.07635	-		
55 <i>L. cfcatarinensis</i> GB	0.00285	0.08618	0.07206	0.07988	0.07741	0.07881	-	
56 <i>L. translucida</i> GB	0.09040	0.08114	0.09634	0.09017	0.09377	0.07965	0.09010	-
57 <i>P. papillosa</i> BRAGB	0.10052	0.09330	0.07392	0.09860	0.10198	0.09783	0.10207	0.09983
58 <i>C. patentirameus</i> E	0.09544	0.09123	0.07677	0.09645	0.09622	0.09621	0.09798	0.09901
59 <i>P. papillosa</i> USAGB	0.09980	0.09259	0.07463	0.09931	0.10129	0.09854	0.10138	0.09915
60 <i>P. papillosa</i> BCGB	0.09600	0.09022	0.07238	0.09258	0.10736	0.10323	0.09813	0.10680
61 <i>O. pinnatifida</i> FRANC	0.09977	0.10539	0.10302	0.09987	0.09666	0.09880	0.09951	0.11264
62 <i>O. pinnatifida</i> GB	0.10297	0.11044	0.10609	0.10540	0.10047	0.10447	0.10199	0.11556
63 <i>O. osmunda</i> GB	0.12001	0.11945	0.11594	0.11761	0.11428	0.11670	0.12063	0.12619
64 <i>O. spectabilis</i> GB	0.12131	0.11396	0.11038	0.11698	0.11302	0.11612	0.12201	0.12108
65 <i>O. truncata</i> GB	0.10837	0.11756	0.11402	0.11166	0.10756	0.11077	0.10742	0.12285

Apéndice 2. (continuación)

	57	58	59	60	61	62	63	64	65
57 <i>P. papillosa</i> BRAGB	-								
58 <i>C. patentirrameus</i> E	0.02966	-							
59 <i>P. papillosa</i> USAGB	0.00211	0.02786	-						
60 <i>P. papillosa</i> BCGB	0.02055	0.03334	0.02026	-					
61 <i>O. pinnatifida</i> FRANC	0.10988	0.10534	0.11058	0.10776	-				
62 <i>O. pinnatifida</i> GB	0.11556	0.11200	0.11635	0.11287	0.00000	-			
63 <i>O. osmunda</i> GB	0.12217	0.11870	0.12296	0.12268	0.06431	0.06423	-		
64 <i>O. spectabilis</i> GB	0.11928	0.11308	0.12010	0.11823	0.07753	0.07738	0.08408	-	
65 <i>O. truncata</i> GB	0.12102	0.11931	0.12182	0.11995	0.07072	0.07056	0.08029	0.08675	-

Apéndice 3. Distancia no corregida ("p") para la región RUBISCO espaciadora entre los taxa estudiados.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>G. cervicornis</i> GB	-							
2 <i>G. mammillaris</i> GB	0.07397	-						
3 <i>B. calliptera</i> GB	0.48219	0.48174	-					
4 <i>L. viridis</i> 6E	0.48700	0.48724	0.25421	-				
5 <i>P. perforata</i> 9E	0.48537	0.48552	0.30090	0.23276	-			
6 <i>L. marilzae</i> 12E	0.48106	0.48034	0.25147	0.20001	0.19211	-		
7 <i>P. perforata</i> 13E	0.48537	0.48552	0.30090	0.23276	0.00000	0.19211	-	
8 <i>O. pinnatifida</i> 18E	0.48615	0.48438	0.38643	0.27789	0.17364	0.19774	0.17364	-
9 <i>C. thuyoides</i> E	0.48862	0.48828	0.30036	0.23276	0.02586	0.19211	0.02586	0.16474
10 <i>L. marilzae</i> PTPE	0.48243	0.48187	0.25040	0.20835	0.20066	0.00758	0.20066	0.20533
11 <i>L. marilzae</i> PTHE	0.48243	0.48187	0.25040	0.20835	0.20066	0.00758	0.20066	0.20533
12 <i>L. sp. 5</i>	0.48544	0.48494	0.25731	0.15301	0.19541	0.16667	0.19541	0.23583
13 <i>L. sp. 4</i>	0.48826	0.48759	0.25655	0.14756	0.17110	0.12121	0.17110	0.20561
14 <i>P. perforata</i> 261E	0.48537	0.48552	0.30090	0.23276	0.00000	0.19211	0.00000	0.17364
15 <i>P. papillosa</i> 263E	0.48537	0.48552	0.30090	0.23276	0.00000	0.19211	0.00000	0.17364
16 <i>P. poiteau</i> USA	0.48640	0.48586	0.30520	0.31897	0.19828	0.27214	0.19828	0.25258
17 <i>L. brongniartii</i> AUS	0.48471	0.48414	0.25046	0.12069	0.16379	0.12328	0.16379	0.20152
18 <i>P. gemmifera</i> CUBA	0.48185	0.48446	0.30673	0.30983	0.15954	0.19428	0.15954	0.23526
19 <i>P. papillosa</i> Ostras	0.48537	0.48552	0.30090	0.23276	0.00000	0.19211	0.00000	0.17364
20 <i>P. perforata</i> Ostras	0.48537	0.48552	0.30090	0.23276	0.00000	0.19211	0.00000	0.17364
21 <i>P. perforata</i> Parati	0.48537	0.48552	0.30090	0.23276	0.00000	0.19211	0.00000	0.17364
22 <i>P. flagellifera</i> BRA	0.48334	0.48379	0.30314	0.19828	0.06034	0.15844	0.06034	0.16519
23 <i>P. corallopsis</i> MEX	0.48458	0.48723	0.30880	0.21126	0.08761	0.15600	0.08761	0.19941
24 <i>P. gemmifera</i> OAMEX	0.48010	0.48000	0.30824	0.31897	0.15517	0.25401	0.15517	0.24926
25 <i>P. gemmifera</i> PCMEX	0.48267	0.48138	0.30124	0.32759	0.17241	0.22727	0.17241	0.24177
26 <i>P. papillosa</i> MEX	0.48537	0.48552	0.30090	0.23276	0.00000	0.19211	0.00000	0.17364
27 <i>P. poiteau</i> PCMEX	0.48640	0.48586	0.30520	0.31897	0.19828	0.27214	0.19828	0.25258
28 <i>L. venusta</i> MEX	0.48317	0.48312	0.25643	0.17981	0.16323	0.14405	0.16323	0.18478
29 <i>L. sp. 1</i>	0.48057	0.48923	0.25064	0.16484	0.19963	0.18119	0.19963	0.23948
30 <i>L. caraibica</i> MEX	0.48448	0.48343	0.25064	0.16756	0.17428	0.13661	0.17428	0.20369
31 <i>L. sp. 2a</i>	0.48084	0.48015	0.25822	0.19708	0.19890	0.04545	0.19890	0.21302
32 <i>L. filiformis</i> MEX	0.48931	0.48506	0.25599	0.02155	0.28722	0.24479	0.28722	0.32730
33 <i>L. Intricata</i> PCMEX	0.48598	0.48463	0.25520	0.16473	0.18868	0.17424	0.18868	0.22825
34 <i>L. intricata</i> OAMEX	0.48416	0.48129	0.25755	0.02137	0.28361	0.25514	0.28361	0.39269
35 <i>L. obtusa 1</i>	0.48795	0.48862	0.25168	0.13793	0.25862	0.19820	0.25862	0.31315
36 <i>L. obtusa 2</i>	0.48795	0.48862	0.25168	0.13793	0.25862	0.19820	0.25862	0.31315
37 <i>L. sp. 3</i>	0.48972	0.48459	0.35973	0.06164	0.18999	0.26894	0.18999	0.26264
38 <i>O. sp.</i>	0.48747	0.48359	0.39197	0.37842	0.32012	0.37917	0.32012	0.36996
39 <i>P. sp.</i>	0.48346	0.48310	0.30099	0.31034	0.17241	0.26787	0.17241	0.31146
40 <i>P. perforata</i> IMMEX	0.48760	0.48305	0.30857	0.31147	0.14201	0.26218	0.14201	0.28841
41 <i>L. sp. 2b</i>	0.48766	0.48682	0.25815	0.19693	0.19887	0.04545	0.19887	0.21301
42 <i>L. sp. 6</i>	0.48016	0.48991	0.25529	0.15616	0.16322	0.14394	0.16322	0.21307

Apéndice 3. (continuación)

	9	10	11	12	13	14	15	16
9 <i>C. thuyoides</i>	-							
10 <i>L. marilzae</i> PTPE	0.18359	-						
11 <i>L. marilzae</i> PTHE	0.18359	0.00000	-					
12 <i>L. sp. 5</i>	0.17780	0.15909	0.15909	-				
13 <i>L. sp. 4</i>	0.17067	0.12879	0.12879	0.07576	-			
14 <i>P. perforata</i> 261E	0.02586	0.20066	0.20066	0.19541	0.17110	-		
15 <i>P. papillosa</i> 263E	0.02586	0.20066	0.20066	0.19541	0.17110	0.00000	-	
16 <i>P. poiteau</i> USA	0.22414	0.28041	0.28041	0.31437	0.28401	0.19828	0.19828	-
17 <i>L. brongniartii</i> AUS	0.16379	0.13177	0.13177	0.10148	0.07729	0.16379	0.16379	0.29310
18 <i>P. gemmifera</i> CUBA	0.18745	0.20228	0.20228	0.26226	0.21118	0.15954	0.15954	0.00037
19 <i>P. papillosa</i> Ostras	0.02586	0.20066	0.20066	0.19541	0.17110	0.00000	0.00000	0.19828
20 <i>P. perforata</i> Ostras	0.02586	0.20066	0.20066	0.19541	0.17110	0.00000	0.00000	0.19828
21 <i>P. perforata</i> Parati	0.02586	0.20066	0.20066	0.19541	0.17110	0.00000	0.00000	0.19828
22 <i>P. flagellifera</i> BRA	0.03448	0.14990	0.14990	0.15905	0.15256	0.06034	0.06034	0.24138
23 <i>P. corallopsis</i> MEX	0.06118	0.14756	0.14756	0.16509	0.15880	0.08761	0.08761	0.23909
24 <i>P. gemmifera</i> OAMEX	0.18103	0.26265	0.26265	0.29729	0.24646	0.15517	0.15517	0.00023
25 <i>P. gemmifera</i> PCMEX	0.19828	0.23587	0.23587	0.28937	0.23844	0.17241	0.17241	0.00014
26 <i>P. papillosa</i> MEX	0.02586	0.20066	0.20066	0.19541	0.17110	0.00000	0.00000	0.19828
27 <i>P. poiteau</i> PCMEX	0.22414	0.28041	0.28041	0.31437	0.28401	0.19828	0.19828	0.00000
28 <i>L. venusta</i> MEX	0.14602	0.13611	0.13611	0.10171	0.06328	0.16323	0.16323	0.27425
29 <i>L. sp. 1</i>	0.19963	0.18967	0.18967	0.14119	0.10145	0.19963	0.19963	0.28571
30 <i>L. caraibica</i> MEX	0.17443	0.14574	0.14574	0.12109	0.07968	0.17428	0.17428	0.26240
31 <i>L. sp. 2a</i>	0.18236	0.03788	0.03788	0.15909	0.12879	0.19890	0.19890	0.27599
32 <i>L. filiformis</i> MEX	0.28166	0.24658	0.24658	0.06131	0.04461	0.28722	0.28722	0.44224
33 <i>L. intricata</i> PCMEX	0.17999	0.17424	0.17424	0.09091	0.08333	0.18868	0.18868	0.31969
34 <i>L. intricata</i> OAMEX	0.27740	0.25820	0.25820	0.05535	0.04044	0.28361	0.28361	0.43462
35 <i>L. obtusa</i> 1	0.24138	0.18954	0.18954	0.15381	0.15569	0.25862	0.25862	0.34483
36 <i>L. obtusa</i> 2	0.24138	0.18954	0.18954	0.15381	0.15569	0.25862	0.25862	0.34483
37 <i>L. sp. 3</i>	0.20999	0.27500	0.27500	0.09759	0.09783	0.18999	0.18999	0.35709
38 <i>O. sp.</i>	0.31179	0.37087	0.37087	0.38415	0.40204	0.32012	0.32012	0.40514
39 <i>P. sp.</i>	0.18103	0.25941	0.25941	0.30801	0.29116	0.17241	0.17241	0.30172
40 <i>P. perforata</i> MMEX	0.16950	0.27070	0.27070	0.31277	0.28506	0.14201	0.14201	0.25600
41 <i>L. sp. 2b</i>	0.19914	0.05303	0.05303	0.17424	0.12879	0.19887	0.19887	0.26745
42 <i>L. sp. 6</i>	0.16281	0.15152	0.15152	0.08333	0.03788	0.16322	0.16322	0.26642

	17	18	19	20	21	22	23	24
17 <i>L. brongniartii</i> AUS	-							
18 <i>P. gemmifera</i> CUBA	0.23332	-						
19 <i>P. papillosa</i> Ostras	0.16379	0.15954	-					
20 <i>P. perforata</i> Ostras	0.16379	0.15954	0.00000	-				
21 <i>P. perforata</i> Parati	0.16379	0.15954	0.00000	0.00000	-			
22 <i>P. flagellifera</i> BRA	0.12931	0.19560	0.06034	0.06034	0.06034	-		
23 <i>P. corallopsis</i> MEX	0.14983	0.20011	0.08761	0.08761	0.08761	0.02615	-	
24 <i>P. gemmifera</i> OAMEX	0.27586	0.00010	0.15517	0.15517	0.15517	0.21552	0.21129	-
25 <i>P. gemmifera</i> PCMEX	0.26724	0.00012	0.17241	0.17241	0.17241	0.21552	0.21109	0.00012
26 <i>P. papillosa</i> MEX	0.16379	0.15954	0.00000	0.00000	0.00000	0.06034	0.08761	0.15517
27 <i>P. poiteau</i> PCMEX	0.29310	0.00037	0.19828	0.19828	0.19828	0.24138	0.23909	0.00023
28 <i>L. venusta</i> MEX	0.07715	0.20731	0.16323	0.16323	0.16323	0.12835	0.14362	0.23207
29 <i>L. sp. 1</i>	0.13065	0.24712	0.19963	0.19963	0.19963	0.18315	0.17902	0.27717
30 <i>L. caraibica</i> MEX	0.10675	0.20892	0.17428	0.17428	0.17428	0.15700	0.16890	0.22691
31 <i>L. sp. 2a</i>	0.12028	0.21010	0.19890	0.19890	0.19890	0.14837	0.14603	0.26100
32 <i>L. filiformis</i> MEX	0.07586	0.46684	0.28722	0.28722	0.28722	0.23060	0.23841	0.47860
33 <i>L. intricata</i> PCMEX	0.11235	0.28730	0.18868	0.18868	0.18868	0.18012	0.18683	0.30033

Apéndice 3. (continuación)

	17	18	19	20	21	22	23	24
34 <i>L. intricata</i> OAMEX	0.07422	0.44219	0.28361	0.28361	0.28361	0.22853	0.24189	0.47079
35 <i>L. obtusa</i> 1	0.12931	0.31204	0.25862	0.25862	0.25862	0.22414	0.22921	0.33621
36 <i>L. obtusa</i> 2	0.12931	0.31204	0.25862	0.25862	0.25862	0.22414	0.22921	0.33621
37 <i>L. sp.</i> 3	0.06490	0.36452	0.18999	0.18999	0.18999	0.20463	0.20370	0.39713
38 <i>O. sp.</i>	0.33648	0.41428	0.32012	0.32012	0.32012	0.31088	0.32894	0.39771
39 <i>P. sp.</i>	0.25000	0.25757	0.17241	0.17241	0.17241	0.18966	0.21008	0.28448
40 <i>P. perforata</i> MMEX	0.25043	0.24182	0.14201	0.14201	0.14201	0.17813	0.19869	0.25641
41 <i>L. sp.</i> 2b	0.12027	0.21017	0.19887	0.19887	0.19887	0.16510	0.16320	0.26086
42 <i>L. sp.</i> 6	0.10389	0.24293	0.16322	0.16322	0.16322	0.16218	0.16765	0.24765

	25	26	27	28	29	30	31	32
25 <i>P. gemmifera</i> PCMEX	-							
26 <i>P. papillosa</i> MEX	0.17241	-						
27 <i>P. poiteau</i> PCMEX	0.00014	0.19828	-					
28 <i>L. venusta</i> MEX	0.23224	0.16323	0.27425	-				
29 <i>L. sp.</i> 1	0.27717	0.19963	0.28571	0.11849	-			
30 <i>L. caraibica</i> MEX	0.23577	0.17428	0.26240	0.07875	0.09699	-		
31 <i>L. sp.</i> 2a	0.23432	0.19890	0.27599	0.13291	0.17885	0.14472	-	
32 <i>L. filiformis</i> MEX	0.46092	0.28722	0.44224	0.09540	0.00000	0.08638	0.21759	-
33 <i>L. intricata</i> PCMEX	0.29201	0.18868	0.31969	0.12070	0.11854	0.13327	0.18939	0.00000
34 <i>L. intricata</i> OAMEX	0.45356	0.28361	0.43462	0.08806	0.00000	0.08704	0.23040	0.00000
35 <i>L. obtusa</i> 1	0.31897	0.25862	0.34483	0.18048	0.18132	0.19382	0.18007	0.04646
36 <i>L. obtusa</i> 2	0.31897	0.25862	0.34483	0.18048	0.18132	0.19382	0.18007	0.04646
37 <i>L. sp.</i> 3	0.39368	0.18999	0.35709	0.06585	0.02906	0.16739	0.23009	0.02576
38 <i>O. sp.</i>	0.37940	0.32012	0.40514	0.37248	0.37936	0.38525	0.37088	0.48247
39 <i>P. sp.</i>	0.25862	0.17241	0.30172	0.25851	0.29487	0.28007	0.25942	0.36169
40 <i>P. perforata</i> MMEX	0.22924	0.14201	0.25600	0.27771	0.29037	0.29055	0.26931	0.28818
41 <i>L. sp.</i> 2b	0.22578	0.19887	0.26745	0.14887	0.17873	0.14468	0.01515	0.21886
42 <i>L. sp.</i> 6	0.23931	0.16322	0.26642	0.09655	0.12022	0.09749	0.15152	0.04293

	33	34	35	36	37	38	39	40
33 <i>L. intricata</i> PCMEX	-							
34 <i>L. intricata</i> OAMEX	0.00000	-						
35 <i>L. obtusa</i> 1	0.18144	0.04483	-					
36 <i>L. obtusa</i> 2	0.18144	0.04483	0.00000	-				
37 <i>L. sp.</i> 3	0.02778	0.02609	0.09926	0.09926	-			
38 <i>O. sp.</i>	0.37825	0.47345	0.34435	0.34435	0.43595	-		
39 <i>P. sp.</i>	0.28378	0.35732	0.29310	0.29310	0.22005	0.31021	-	
40 <i>P. perforata</i> MMEX	0.28873	0.27027	0.32043	0.32043	0.19465	0.28408	0.12246	-
41 <i>L. sp.</i> 2b	0.19697	0.23166	0.19678	0.19678	0.23117	0.37914	0.26779	0.26070
42 <i>L. sp.</i> 6	0.09091	0.03896	0.13005	0.13005	0.09624	0.38522	0.29186	0.28548

	41	42
41 <i>L. sp.</i> 2b	-	
42 <i>L. sp.</i> 6	0.13636	-

Apéndice 4. Distancia no corregida ("p") para 18S entre los taxa estudiados.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1 <i>G. cervicornis</i> GB	-							
2 <i>C. clavulatum</i> GB	0.05292	-						
3 <i>N. japonicum</i> GB	0.05811	0.05105	-					
4 <i>P. senticulatum</i> GB	0.05495	0.05933	0.05457	-				
5 <i>R. confervoides</i> GB	0.05847	0.05281	0.05419	0.05350	-			
6 <i>P. paniculatum</i> GB	0.05585	0.05812	0.05246	0.05284	0.05698	-		
7 <i>P. howei</i> GB	0.05216	0.05624	0.05867	0.05549	0.05068	0.05230	-	
8 <i>C. tenerrimum</i> GB	0.05232	0.05234	0.05864	0.05866	0.05769	0.05923	0.05659	-
9 <i>C. affine</i> GB	0.05297	0.05236	0.05809	0.05996	0.05127	0.05868	0.05666	0.05809
10 <i>P. poiteaui</i> USA	0.12612	0.12715	0.12900	0.12726	0.12818	0.12981	0.12063	0.12316
11 <i>L. brongniartii</i> AUS	0.12116	0.12234	0.12135	0.12418	0.12820	0.12543	0.12310	0.12197
12 <i>P. gemmifera</i> CUBA	0.12974	0.12593	0.12996	0.12217	0.12688	0.12542	0.12246	0.12714
13 <i>P. flagellifera</i> BRA	0.12527	0.12574	0.12719	0.12200	0.12416	0.12384	0.12617	0.12982
14 <i>P. corallopsis</i> MEX	0.12188	0.12277	0.12491	0.12967	0.12019	0.12102	0.12325	0.12747
15 <i>P. gemmifera</i> OAMEX	0.12841	0.12596	0.12861	0.12879	0.12284	0.12409	0.12243	0.12713
16 <i>P. gemmifera</i> PCMEX	0.12372	0.12212	0.12550	0.12025	0.12207	0.12036	0.12403	0.12396
17 <i>P. papillosa</i> MEX	0.12413	0.12509	0.12835	0.12201	0.12473	0.12667	0.12676	0.12983
18 <i>P. poiteaui</i> PCMEX	0.12797	0.12912	0.12476	0.12242	0.12592	0.12491	0.12727	0.12611
19 <i>L. venusta</i> MEX	0.12359	0.12634	0.12150	0.12967	0.12133	0.12989	0.12384	0.12749
20 <i>L. sp. 1</i>	0.12317	0.12517	0.12434	0.12734	0.12861	0.12748	0.12936	0.12806
21 <i>L. caraibica</i> MEX	0.12036	0.12862	0.12800	0.12106	0.12480	0.12268	0.12763	0.12917
22 <i>L. sp. 2a</i>	0.12817	0.12695	0.12777	0.12316	0.12415	0.12214	0.12499	0.12983
23 <i>L. filiformis</i> MEX	0.12304	0.12641	0.12493	0.12737	0.12851	0.12933	0.12094	0.12987
24 <i>L. intricata</i> PCMEX	0.12361	0.12701	0.12550	0.12795	0.12907	0.12989	0.12035	0.12046
25 <i>L. intricata</i> OAMEX	0.12663	0.12819	0.12494	0.12026	0.12324	0.12151	0.12348	0.12871
26 <i>L. obtusa 1</i>	0.12247	0.12640	0.12379	0.12736	0.12850	0.12933	0.12093	0.12870
27 <i>L. obtusa 2</i>	0.12134	0.12520	0.12265	0.12677	0.12737	0.12820	0.12977	0.12753
28 <i>L. sp. 3</i>	0.12247	0.12642	0.12436	0.12736	0.12794	0.12876	0.12035	0.12929
29 <i>L. filiformis</i> GB	0.12188	0.12691	0.12316	0.12845	0.12907	0.12874	0.12147	0.12802
30 <i>P. perforata</i> MEX	0.12433	0.12519	0.12805	0.12001	0.12423	0.12637	0.12626	0.12923

	9	10	11	12	13	14	15	16
9 <i>C. affine</i> GB	-							
10 <i>P. poiteaui</i> USA	0.12917	-						
11 <i>L. brongniartii</i> AUS	0.12420	0.06513	-					
12 <i>P. gemmifera</i> CUBA	0.12801	0.00279	0.01661	-				
13 <i>P. flagellifera</i> BRA	0.12050	0.06767	0.01667	0.01728	-			
14 <i>P. corallopsis</i> MEX	0.12875	0.06882	0.01467	0.01797	0.00958	-		
15 <i>P. gemmifera</i> OAMEX	0.12667	0.00248	0.01794	0.00364	0.01463	0.01397	-	
16 <i>P. gemmifera</i> PCMEX	0.12286	0.00263	0.01794	0.00329	0.01262	0.01319	0.00264	-
17 <i>P. papillosa</i> MEX	0.12934	0.06710	0.02003	0.01665	0.01296	0.01014	0.01266	0.01319
18 <i>P. poiteaui</i> PCMEX	0.12501	0.00381	0.09556	0.00312	0.08789	0.08901	0.00385	0.00289
19 <i>L. venusta</i> MEX	0.12757	0.07054	0.01462	0.02193	0.01577	0.01183	0.01859	0.01835
20 <i>L. sp. 1</i>	0.12875	0.06709	0.00995	0.01724	0.01319	0.00918	0.01526	0.01433
21 <i>L. caraibica</i> MEX	0.12985	0.10322	0.04598	0.05192	0.05239	0.04958	0.04994	0.05448
22 <i>L. sp. 2a</i>	0.12053	0.06996	0.02330	0.02657	0.01803	0.01634	0.02258	0.02064
23 <i>L. filiformis</i> MEX	0.12997	0.06882	0.01065	0.01926	0.01465	0.01070	0.01593	0.01606
24 <i>L. intricata</i> PCMEX	0.12055	0.06939	0.01131	0.01992	0.01521	0.01127	0.01659	0.01663
25 <i>L. intricata</i> OAMEX	0.12995	0.06938	0.01197	0.01793	0.01606	0.01434	0.01460	0.01606

Apéndice 4. (continuación)

	9	10	11	12	13	14	15	16
26 <i>L. obtusa</i> 1	0.12879	0.06767	0.01066	0.01792	0.01352	0.01070	0.01459	0.01491
27 <i>L. obtusa</i> 2	0.12762	0.06652	0.00931	0.01658	0.01239	0.00958	0.01325	0.01376
28 <i>L. sp.</i> 3	0.12997	0.06882	0.01065	0.01926	0.01465	0.00958	0.01593	0.01606
29 <i>L. filiformis</i> GB	0.12866	0.06782	0.00867	0.01797	0.01355	0.01073	0.01463	0.01379
30 <i>P. perforata</i> MEX	0.12944	0.06700	0.02013	0.01655	0.01236	0.01024	0.01296	0.01329
	17	18	19	20	21	22	23	24
17 <i>P. papillosa</i> MEX	-							
18 <i>P. poiteau</i> iPCMEX	0.08845	-						
19 <i>L. venusta</i> MEX	0.01746	0.09014	-					
20 <i>L. sp.</i> 1	0.01721	0.09061	0.00631	-				
21 <i>L. caraibica</i> MEX	0.05239	0.12169	0.04563	0.04359	-			
22 <i>L. sp.</i> 2a	0.02197	0.09014	0.01915	0.01778	0.05352	-		
23 <i>L. filiformis</i> MEX	0.01746	0.08958	0.00676	0.00287	0.04225	0.01690	-	
24 <i>L. intricata</i> PCMEX	0.01803	0.09014	0.00732	0.00344	0.04282	0.01746	0.00056	-
25 <i>L. intricata</i> OAMEX	0.01892	0.09176	0.01032	0.00745	0.04645	0.01950	0.00459	0.00516
26 <i>L. obtusa</i> 1	0.01634	0.08845	0.00676	0.00402	0.04225	0.01577	0.00113	0.00169
27 <i>L. obtusa</i> 2	0.01521	0.08845	0.00563	0.00287	0.04113	0.01465	0.00225	0.00282
28 <i>L. sp.</i> 3	0.01634	0.08958	0.00676	0.00172	0.04225	0.01690	0.00225	0.00282
29 <i>L. filiformis</i> GB	0.01638	0.08866	0.00565	0.00287	0.04181	0.01637	0.00283	0.00339
30 <i>P. perforata</i> MEX	0.01459	0.08815	0.01776	0.01771	0.05229	0.02117	0.01786	0.01813
	25	26	27	28	29	30		
25 <i>L. intricata</i> OAMEX	-							
26 <i>L. obtusa</i> 1	0.00459	-						
27 <i>L. obtusa</i> 2	0.00573	0.00113	-					
28 <i>L. sp.</i> 3	0.00688	0.00338	0.00225	-				
29 <i>L. filiformis</i> GB	0.00633	0.00282	0.00169	0.00283	-			
30 <i>P. perforata</i> MEX	0.01812	0.01664	0.01551	0.01664	0.01628	-		

9. PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

Molecular evidence for *Chondrophycus poiteau* var. *gemmiferus* comb. et stat. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from the Mexican Caribbean Sea: implications for the taxonomy of the *Laurencia* complex

Jhoana Díaz-Larrea^{1,*}, Abel Senties¹,
Mutue T. Fujii², Francisco F. Pedroche^{1,3} and
Mariana C. Oliveira⁴

¹ Departamento de Hidrobiología, Universidad
Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, Apdo. Postal
55-535, México DF, 09340, Mexico,
e-mail: jhoanadiazl@yahoo.com

² Instituto de Botânica, Secção Ficologia, Caixa Postal
4005, 01061-970 São Paulo, Brazil

³ University Herbarium, University of California 1001
VLSB # 2465, Berkeley, CA 94720-2465, USA

⁴ Departamento de Botânica, Instituto de Biociências,
Universidade de São Paulo, Caixa Postal 11461,
cep 05422-970, São Paulo, Brazil

* Corresponding author

Introduction

Significant changes in the classification of *Laurencia* J.V. Lamouroux (1813) have taken place during the last two decades. At present, there is a consensus that the *Laurencia* complex is formed by three genera: *Laurencia sensu stricto*, *Chondrophycus* (Tokida et Saito) Garbary et J. Harper (1998) and *Osmundea* Stackhouse (Nam et al. 1994). The basic differences among these genera are the number of periaxial cells per vegetative axial segment, the origin and arrangement of the tetrasporangia, the origin and type of the spermatangial branches and pre-sporangial cells on the fertile branches (Nam et al. 1994, Garbary and Harper 1998, Nam 1999, Furnari et al. 2001).

The present taxonomic status of *Chondrophycus gemmiferus* (Harvey) Garbary et J. Harper and *C. poiteau* (J.V. Lamour.) K.W. Nam was established by Nam (1999), who placed these species within *Chondrophycus*, based on the presence of two periaxial cells per vegetative axial segment, a trichoblast-type spermatangial branch, spermatangial branches produced from one of two laterals on suprabasal cell of trichoblasts, procarp-bearing segments with four or five pericentral cells, tetrasporangial production from particular pericentral cells, tetrasporangial axis with one sterile pericentral cell, the second pericentral cell being fertile. The two species were placed in the subgenus *Yuzurua* K.W. Nam, because of the presence of secondary pit connections between epidermal cells, one sterile periaxial cell in tetrasporangial axial segments and a 90° arrangement of the tetrasporangia. Finally, *C. gemmiferus* was included in the section *Parvipapillatae* K.W. Nam, because of the presence of projections from epidermal cells at the apices of the branchlets, while *C. poiteau* was included in the section *Yuzurua*, as projections from epidermal cells at the apices of the branchlets are absent.

Chondrophycus gemmiferus and *C. poiteau* are typical members of tropical western Atlantic Ocean flora, and are common and abundant in the Mexican Caribbean Sea (Senties and Fujii 2002, Wynne 2005). Fujii et al. (1996) found them growing sympatrically in the Mexican Nichupté Lagoon system, Quintana Roo State. Both species are morphologically similar and characterized by the presence of a clearly discernible main axis with small ultimate branchlets. The species were originally described from Key West, FL, USA and Santo Domingo, Dominican Republic, Greater Antilles, respectively.

Yamada (1931) made an important contribution to the understanding of the genus *Laurencia* through detailed examinations of several type materials. In his account,

Abstract

Molecular studies were carried out on *Chondrophycus gemmiferus* and *C. poiteau* (Rhodomelaceae) from the Mexican Caribbean Sea. These species are morphologically related, but differ mainly in the presence of the apiculate projection of epidermal cells near the apices of branches. Both species belong to *Chondrophycus*, as indicated by the presence of two periaxial cells per axial segment and a 90° arrangement of tetrasporangia, but share characteristics with *Laurencia* species (e.g., presence of secondary pit connections between adjacent epidermal cells). The phylogenetic position of these species was inferred by an analysis of chloroplast-encoded *rbcl* gene sequences of 21 taxa, using two members of the Rhodomelaceae and two of the Ceramiales as outgroups. The results corroborate the taxonomy of the *Laurencia* complex, which comprises the genera *Laurencia*, *Chondrophycus* and *Osmundea*, and indicate that *rbcl* provides an adequate phylogenetic signal to study the intergeneric and interspecific relationships within the complex. In spite of this, relationships within the clade formed by *C. gemmiferus* and *C. poiteau* were not resolved by any analysis because of the low level of genetic variation between their *rbcl* sequences (0.01–0.02%). On the basis of both molecular data and morphological similarities, we concluded that *C. gemmiferus* should be considered as a variety of *C. poiteau* and the following new combination is proposed: *Chondrophycus poiteau* var. *gemmiferus* (Harvey) comb. et stat. nov.

Keywords: Ceramiales; *Chondrophycus poiteau*;
Mexican Caribbean Sea; phylogeny; *rbcl*.

he treated *Laurencia gemmifera* Harvey as a variety of *Laurencia poiteaui* (J.V. Lamouroux) Howe ("poitei"), proposing the combination, *L. poiteaui* ("poitei") var. *gemmifera* (Harvey) Yamada. Fujii et al. (1996) recognized that *L. gemmifera* and *L. poiteaui* have strong similarities in overall appearance, sharing several characteristics, such as presence of secondary pit connections between adjacent cortical cells and 90° arrangement of tetrasporangia. Nevertheless, *L. gemmifera* was differentiated from *L. poiteaui* by the presence of apiculate cortical cells near the apices of branches, and in having smaller ultimate branchlets, so that the species were maintained as independent entities, ignoring Yamada's (1931) taxonomic treatment.

Wynne (1998, 2005) accepted Fujii and collaborators' argument (Fujii et al. 2006) in his checklists of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic Ocean. In contrast, Silva et al. (1996) recognized the trinomial epithet, *Laurencia poiteaui* var. *gemmifera*. Nam (1999) transferred *L. gemmifera* and *L. poiteaui* from *Laurencia* to *Chondrophycus* on the basis of the presence of two pericentral cells per vegetative axial segment.

Important proposals on the classification system of the *Laurencia* complex have been made on the basis of phylogeny, taking into account mainly morphological attributes (Garbary and Harper 1998, Nam 1999, 2006). Currently, only four papers have been based on molecular phylogeny (Nam et al. 2000, McIvor et al. 2002, Abe et al. 2006, Fujii et al. 2006). The study by Nam et al. (2000) assessed the phylogenetic significance of several morphological characters in *Osmundea* by comparative morphological and molecular analyses, but was confined to the European species. The authors found that the European species of *Osmundea* separated into two groups, based on the presence or absence of secondary pit connections.

Fujii et al. (2006) studied the phylogenetic affinities of the red alga, *Chondrophycus flagelliferus*, from Brazil using morphological and molecular evidence. The molecular data indicated that *C. flagelliferus* is closely related to the *C. papillosus* complex, and that, as originally described, *C. translucidus* belongs to the genus *Laurencia*. The relationships among the *L. scoparia*, *L. arbuscula* and *L. filiformis* have not been resolved because of the absence or lower levels of genetic variation observed among the sequences of these species. All species currently placed in the genus *Osmundea* form a monophyletic clade. However, two clades representing different geographical areas were observed (North Pacific and Atlantic Europe), corroborating the distinct biogeographic pattern within the genus, as observed by McIvor et al. (2002). Abe et al. (2006) carried out a molecular phylogenetic analysis of three closely related red algal genera, *Laurencia*, *Chondrophycus* and *Osmundea* (mainly on the north-western Pacific species). The results showed that *Osmundea* and *Laurencia sensu stricto* were monophyletic and *Chondrophycus* was polyphyletic within the *Laurencia* complex. *L. flexilis* (an intermediate species between typical *Laurencia* and *Chondrophycus*) constituted an independent monophyletic clade with high bootstrap values. Nam's (2006) cladistic analysis using

morphological characters also demonstrated that *Chondrophycus*, as currently defined, is not monophyletic. Consequently, he proposed recognition of the segregate genus *Palisada*, but that generic name was not validated (P. Silva and M. Wynne, personal communication).

This is the first paper of its type using Mexican material; we assessed the taxonomic status of *Chondrophycus gemmiferus* and *C. poiteaui* by analyzing the nucleotide sequences of the *rbcL* gene of both species. That led us to formulate taxonomic proposals and to determine the phylogenetic positions of these two species within the *Laurencia* complex. Fujii et al. (1996), Nam et al. (2000) and McIvor et al. (2002) indicated that the *rbcL* gene provides sufficient phylogenetic signal to determine the intergeneric and interspecific relationships within the complex.

Materials and methods

Sample collection

Two individuals of each species were collected from several localities in the Mexican Caribbean Sea (from 18°11' to 21°54' N and from 86°15' to 87°54' W), as reported previously by Sentles and Fujii (2002), and dried in silica gel. The specimens used for molecular analysis are shown in Table 1, including their GenBank accession numbers (NCBI GenBank 2003).

Extraction and amplification of DNA

Total DNA was extracted, after grinding in liquid nitrogen, using the Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) following the manufacturer's instructions. A total of 1467 base pairs of the *rbcL* gene was amplified in three parts with the primer pairs: *Frbcl*start×R753, F577×R1150 and F753×RrbcS (Freshwater and Ruess 1994) using the master mix of the Bioneer (Daejeon-Gu, Daejeon, Korea) Premix. The conditions for amplification were 4 min at 96°C for a hot start, 35 cycles of 60 s at 94°C, 60 s at 42°C and 90 s at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C. The reactions were kept at 4°C after amplification. All PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose to check product size. The PCR products were purified with the Qiagen QIAquick purification kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's instructions.

Sequencing

Sequencing was performed using the BigDye terminator cycle sequencing reaction kit on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Princeton, NJ, USA). The primers used for sequencing were those used for amplification. The full sequence was obtained from both DNA strands. Analysis of the sequences was performed using the computer program Sequencer Navigator (Applied Biosystems), and was aligned with the CLUSTAL algorithm (Thompson et al. 1994).

Table 1 Species used in this study for phylogenetic analysis.

Sample	Location	Collectors
<i>Bryocladia cuspidata</i> (J. Agardh) De Toni ^a	Port Aransas, TX, USA	S. Fredericq and C.F.D. Gurgel
<i>Centroceras clavulatum</i> (C. Agardh) Montagne ^a	USA	S. Fredericq and C.F.D. Gurgel
<i>Ceramium brevizonatum</i> Petersen ^a	USA	-
<i>Chondria dasyphylla</i> (Woodward) C. Agardh ^a	Morehead City, NC, USA	D.W. Freshwater
<i>Chondrophycus corallopsis</i> (Montagne) Nam ^a	Chaac-Mol Beach, Cancun, Quintana Roo, Mexico	J. Diaz and A. Senties
<i>C. flagelliferus</i> (J. Agardh) Nam ^a	Es. Marataizes, Espírito Santo, Brazil	M.T. Fujii
<i>C. flagelliferus</i> (J. Agardh) Nam	Ubatuba, Praia Brava, Sao Paulo, Brazil	S.M.P.B. Guimarães and J. Domingos
<i>C. gemmiferus</i> (Harvey) Garbary et Harper ^a	Ojo Agua, Puerto Morelos, Quintana Roo, Mexico	J. Diaz and A. Senties
<i>C. gemmiferus</i> (Harvey) Garbary et Harper ^a	Playa del Carmen, Cancun, Quintana Roo, Mexico	J. Diaz and A. Senties
<i>C. gemmiferus</i> (Harvey) Garbary et Harper ^a	Rincon de Guanabo, La Havana, Cuba	J. Diaz and A. Areces
<i>C. papillosus</i> (C. Agardh) Garbary et Harper ^a	CRIP, Puerto Morelos, Quintana Roo, Mexico	J. Diaz and A. Senties
<i>C. papillosus</i> (C. Agardh) Garbary et Harper	Old Dan's Reef, Keys Marine Lab., FL, USA	C.F.D. Gurgel
<i>C. poiteaui</i> (Lamouroux) Nam ^a	Ocean Side, Long Key, FL, USA	S. Fredericq
<i>C. poiteaui</i> (Lamouroux) Nam ^a	Playa del Carmen, Quintana Roo, Mexico	J. Diaz and A. Senties
<i>Laurencia brongniartii</i> J. Agardh	Makang Harbor, Taiwan	S. Fredericq
<i>L. obtusa</i> (Hudson) Lamouroux	Pointe de la Verdure, Guadeloupe	A. Renoux
<i>L. obtusa</i> (Hudson) Lamouroux	Fanad Head, County Donegal, Ireland	-
<i>L. venusta</i> Yamada ^a	Punta Brava, Puerto Morelos, Quintana Roo, Mexico	J. Diaz and A. Senties
<i>Osmundea osmunda</i> (S.G. Gmelin) Nam et Maggs	Ireland	-
<i>O. pinnatifida</i> (Hudson) Stackhouse	St. John's Point, County Donegal, Ireland	-
<i>O. truncate</i> (Kützinger) Nam et Maggs	Ireland	-

^aSequences obtained in this work. ^aOutgroups.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic relationships were inferred with PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002). Maximum parsimony (MP) trees were constructed using the heuristic search option, tree-bisection-reconnection branch swapping, unordered and unweighted characters, and gaps treated as missing data. The ModelTest version 3.7 program (Posada and Crandall 1998) was used to find the model of sequence evolution least rejected for each data set by a hierarchical likelihood ratio test. When the evolution model had been determined, maximum likelihood searches were performed using the estimated parameters (substitution model, gamma distribution, proportion of invariant sites, frequencies of the bases). Maximum likelihood (ML) was used to construct the most likely tree from the data set.

Support for individual internal branches was determined by bootstrap analysis (Felsenstein 1985), as implemented in PAUP*. For bootstrap analysis, 1000 bootstrap data sets were generated from re-sampled data for the MP analysis and 100 replicates for the ML analysis.

The consistency (CI), homoplasy (HI) and retention (RI) indices resulting from the MP analysis were calculated. Outgroup species were selected on the basis of close phylogenetic relationship with the ingroup. The range of *rbcL* divergence values within and among species was calculated using uncorrected "p" distances using PAUP*.

Results

Variation in the *rbcL* sequences

A total of 21 sequences was analyzed including the outgroups *Ceramium brevizonatum*, *Centroceras clavulatum*, *Chondria dasyphylla* and *Bryocladia cuspidata* (Table 1). We fully sequenced the *rbcL* gene from 9 taxa of the *Laurencia* complex. The first 60 nucleotides of all *rbcL* sequences were removed, producing a data set of 1407

base pairs, and the rest of the sequences were aligned without ambiguity.

Intergeneric divergence varied from 10 to 12% for *Chondrophycus* and *Laurencia* and from 10 to 13% for *Chondrophycus* and *Osmundea*. Interspecific divergence obtained for the species of *Laurencia* varied from 6 to 8%, whereas for those of *Chondrophycus* it varied from 6 to 9%. In the case of *C. gemmiferus* and *C. poiteaui*, the observed nucleotide divergence within *rbcL* gene sequence was very low (0.01–0.02%).

Phylogeny

The data set consisted of 927 constant characters, 179 parsimony informative sites and 344 parsimony non-informative sites. MP produced 4 trees of 1663 steps (CI=0.574, RI=0.597, HI=0.426). The topology of strict consensus of these trees with corresponding bootstrap values is shown in Figure 1.

Maximum likelihood (estimated evolution model: substitution model=GTR+I+G; gamma distribution=1.1024; proportion of invariant sites=0.4739; frequency of the bases was: A=0.3270, C=0.1439, G=0.2009 and T=0.3282; the rate matrix was: [A-C]=4.7158, [A-G]=6.1517, [A-T]=4.8734, [C-G]=1.075, [C-T]=33.1711) produced a topology of -ln L score of 3243.1849. The topology of maximum likelihood phylogram derived from *rbcL* sequences with corresponding bootstrap values is shown in Figure 2.

MP and ML topologies were not significantly different. The analyses show a monophyletic *Laurencia* complex with high bootstrap support in relation to the members of the outgroups. The *Laurencia* complex separated into three clades with high bootstrap support, corresponding to the genera that form the complex: *Laurencia*, *Chondrophycus* and *Osmundea*. In all the analyses, the earliest diverging clade was the genus *Osmundea* (with its species *O. pinnatifida*, *O. osmunda* and *O. truncata*), and

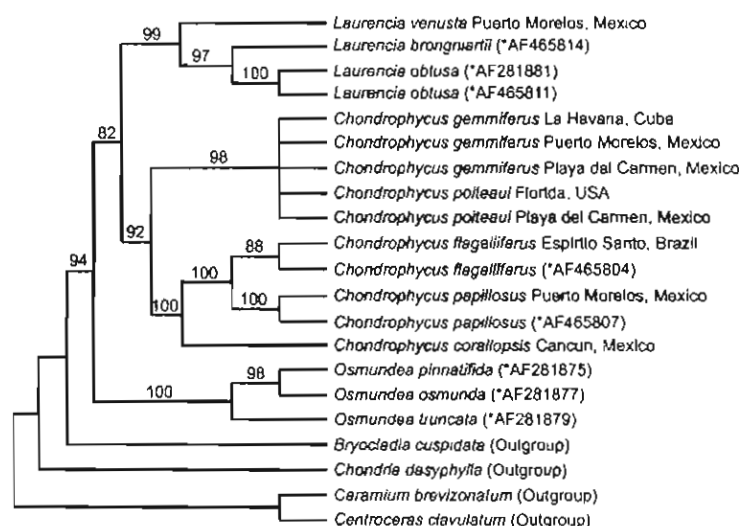


Figure 1 Strict consensus of four maximum parsimony trees for *rbcL* sequences of the *Laurencia* complex species rooted with *Centroceras clavulatum*, *Ceramium brevizonatum*, *Chondria dasyphylla* and *Bryocladia cuspidata*. Bootstrap values (1000 replicates) are indicated at the nodes. (*) GenBank sequences.

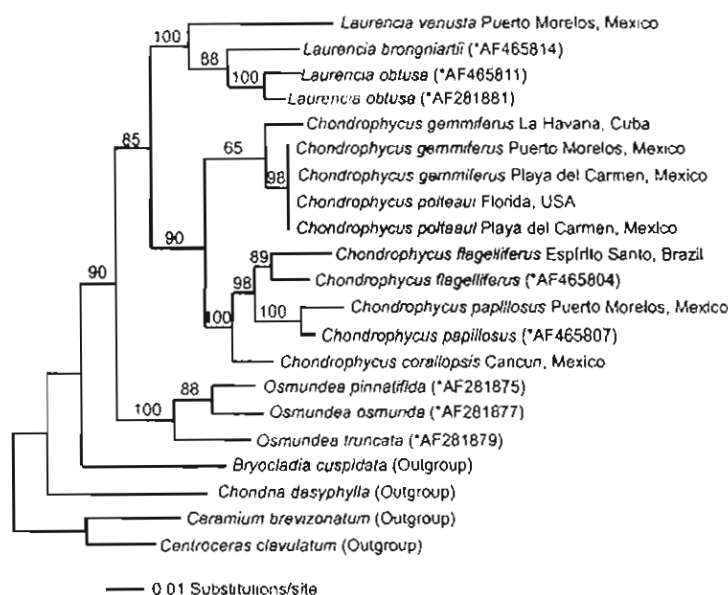


Figure 2 Maximum likelihood phylogram derived from *rbcL* sequences of the *Laurencia* complex species rooted with *Centroceras clavulatum*, *Ceramium brevizonatum*, *Chondria dasyphylla* and *Bryocladia cuspidata*. Bootstrap values (100 replicates) are indicated at the nodes. (*) GenBank sequences.

the genera *Laurencia* and *Chondrophycus* were sister groups forming a clade with high bootstrap support.

The monophyletic clade that corresponded to the genus *Chondrophycus* included five species. Within the *Chondrophycus* assemblage, *C. gemmiferus* and *C. poiteaui*, were segregated from others forming a distinct clade. The species *C. flagelliferus*, *C. papillosus* and *C. corallopsis* formed another well-supported clade.

The monophyletic clade for the genus *Laurencia* included three species. *L. venusta* was a sister species to the other two and is the only species with verticillate ramification. *L. brongniartii* and *L. obtusa* formed one group in which *L. brongniartii* is the only species with a compressed thallus.

Discussion

Chondrophycus gemmiferus and *C. poiteaui* share some characteristics, i.e., the presence of secondary pit connections between epidermal cells, one sterile periaxial cell in tetrasporangial axial segments, and a 90° arrangement of the tetrasporangia. The only difference between them is the presence of projections from epidermal cells at the apices of the branchlets in *C. gemmiferus* and the absence of these in *C. poiteaui* (Fujii et al. 1996, Senties and Fujii 2002).

This last characteristic, together with a detailed morphological description of populations of these species from the Mexican Caribbean Sea by Fujii et al. (1996), made it possible to conclude that *Chondrophycus gemmiferus* and *C. poiteaui* should remain as independent entities, notwithstanding the fact that there are more morphological similarities than differences. *C. gemmife-*

rus has smaller ultimate branchlets than *C. poiteaui* (Senties and Fujii 2002). However, between the species there are minimum variations in ramification throughout the thallus, which does not support segregation at the species level. Also, anatomical and reproductive characteristics differ little with respect to the meristic nature of medullary and epidermal cells, and in male, female and tetrasporangial structures (Senties and Fujii 2002). Fujii et al. (1996) also emphasized that these species show a mix of characters between the genera *Chondrophycus* and *Laurencia*, such as the presence of two periaxial cells per vegetative axial segment (corresponding to *Chondrophycus*), and the presence of secondary pit connections between epidermal cells (more characteristic of *Laurencia*).

Other species that share characteristics with *Chondrophycus gemmiferus* and are placed in the section *Parvipapillatae* are *C. parvipapillatus* (C.K. Tseng) Garbary et J.T. Harper from China and *C. iridescens* (M.J. Wynne et D.L. Ballantine) K.W. Nam from Guadeloupe and Puerto Rico in the Caribbean Sea. Differences between them are the presence of a diminutive compressed thallus in *C. parvipapillatus* (2 cm), an iridescent thallus in *C. iridescens*, and a cylindrical thallus, reaching ≤ 15 cm and no iridescence in *C. gemmiferus* (Wynne and Ballantine 1991, Nam 1999).

The intergeneric divergence values obtained are comparable to those reported by other authors for the *Laurencia* complex. Nam et al. (2000) recorded intergeneric divergence values between 11% (*L. obtusa* vs. *Osmundea pinnatifida*) and 13% [*L. obtusa* vs. *O. hybrida* (A.P. de Candolle) W.K. Nam], and McIvor et al. (2002) recorded values of 11% (*O. pinnatifida* vs. *L. obtusa*) to 13% [*O. blinksii* (Hollenberg et I.A. Abbott) K.W. Nam vs. *Chondrophycus papillosus*].

The interspecific divergence values are comparable to those reported by other authors for the genus *Osmundea*. Nam et al. (2000) estimated divergence percentages that varied from 5% (*O. osmunda* vs. *O. pinnatifida*) to 9% (*O. hybrida* vs. *O. truncata*), and McIvor et al. (2002) recorded values of 2% (*O. blinksii* vs. *O. splendens*) to 9% (*O. blinksii* vs. *O. truncata*).

The molecular phylogeny shows that the clade formed by the three populations (Puerto Morelos, Mexico; Playa del Carmen, Mexico; and La Havana, Cuba) of *Chondrophycus gemmiferus* and two of *C. poiteaui* (Playa del Carmen, Mexico and Florida, USA) are poorly resolved as a result of the low level of genetic variation between their sequences (0.01–0.02%). In contrast, the sister clade comprising the species *C. flagelliferus*, *C. papillosus* and *C. corallopsis* is well resolved based on molecular data from *rbcL*. This conforms to the proposal of Fujii et al. (2006), who suggest that *C. flagelliferus* is sister to the *C. papillosus* complex. These species are also easily distinguishable on morphological characteristics, such as the presence of a palisade-like arrangement of the epidermal cells in transverse section of the branch in *C. flagelliferus*, the presence of short papilliform branchlets on each branch in *C. papillosus*, and the presence of prominent cystocarps and a corymbose-like ramification in *C. corallopsis* (Senties and Fujii 2002).

Similar to Garbary and Harper (1998) and Fujii et al. (2006), our results obtained through the analysis of *rbcL* confirm the existence of the *Laurencia* complex as a monophyletic clade that includes the genera *Chondrophycus*, *Laurencia* and *Osmundea* separated into clearly defined monophyletic clades. *Laurencia* and *Chondrophycus* appear as sister groups, with the separation of the two genera confirmed in our analysis by the presence of four and two periaxial cells per axial segment, respectively.

Records from the type localities of *Chondrophycus gemmiferus* (Key West, FL, USA) and of *C. poiteaui* (Santo Domingo, Greater Antilles, Caribbean Sea) and other nearby areas (Wynne 2005) make it possible to establish that these species co-exist in tropical and subtropical regions of the western Atlantic Ocean, with the Mexican Caribbean Sea as the area with the greatest abundance of these sympatric species (Fujii et al. 1996, Senties and Fujii 2002). In consequence, their geographical distribution does not support a formal separation of the species, and local aspects of habitats and environments are identical or similar among the species.

In conclusion, considering the almost identical *rbcL* sequences of *Chondrophycus gemmiferus* and *C. poiteaui*, the very similar morphological characters and the sympatric distribution, we agree with the taxonomic treatment of Yamada (1931) of the above taxa proposing the following new combination:

- *Chondrophycus poiteaui* (J.V. Lamouroux) K.W. Nam var. *gemmiferus* (Harvey) Senties, Fujii et Díaz comb. et stat. nov.
- Basionym: *Laurencia gemmifera* (Harvey 1853, Nereis Boreali-Americana, vol. 2, p. 73, Tab. XVIII, B).
- Homotypic synonyms: *Laurencia poiteaui* (J.V. Lamouroux) M. Howe var. *gemmifera* (Harvey) Yama-

da. *Chondrophycus gemmiferus* (Harvey) Garbary et J. Harper.

Acknowledgements

This study includes part of the results obtained by the first author in the PhD program of Ciencias Biológicas of the Universidad Autónoma Metropolitana, directed by Dr. Abel Senties. The authors thank Dr. Kurt M. Dreckmann, Dr. Giuseppe C. Zuccarello, Dr. Sung Min Boo and Dr. Michael Wynne for critical revisions of the manuscript, and the projects "Macroalgas Marinas Tropicales" of the CBS-UAMI Division and MEC-Spain (CGL 2007-60635/BOS) for financial support. J.D.L. thanks Laura Márquez for helping with sequencing and Eréndira Cohen for helping with translations. M.C.O. and M.T.F. thank CNPq for financial support and Silvia R. Blanco for helping with sequencing.

References

- Abe, T., A. Kurihara, S. Kawaguchi, R. Terada and M. Masuda. 2006. Preliminary report on the molecular phylogeny of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae). *Coast. Mar. Sci.* 30: 209–213.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Freshwater, D.W. and J. Rueness. 1994. Phylogenetic relationships of some European *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) species, on the basis of *rbcL* nucleotide sequence analysis. *Phycologia* 33: 187–194.
- Fujii, T.M., L. Collado-Vides and M. Cordeiro-Marino. 1996. Morphological studies of *Laurencia gemmifera* and *Laurencia poiteaui* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from the Nichupté Lagoon System, Quintana Roo, México. *Bot. Mar.* 39: 317–326.
- Fujii, T.M., S.M.P.B. Guimarães, C.F.D. Gurgel and S. Fredericq. 2006. Characterization and phylogenetic affinities of the red alga *Chondrophycus flagelliferus* (Rhodomelaceae, Ceramiales) from Brazil based on morphological and molecular evidence. *Phycologia* 45: 432–441.
- Furnari, G., M. Comaró and D. Serio. 2001. The *Laurencia* complex (Rhodophyta, Rhodomelaceae) in the Mediterranean Sea: an overview. *Cryptogam. Algal.* 22: 331–373.
- Garbary, D.J. and J.T. Harper. 1998. A phylogenetic analysis of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae) of the red algae. *Cryptogam. Algal.* 19: 185–200.
- Harvey, W.H. 1853. Nereis Boreali-Americana. Part II. Rhodosperrae. *Smithsonian Contributions to Knowledge* 5(2): 1–258, pls. 13–36.
- Lamouroux, J.V.F. 1813. Essai sur les genres de la famille des Thallasiophytes non articulées. *Ann. Mus. d'Hist. Nat. Paris*, 20: 21–47, 115–139, 267–293, pls. 7–13.
- McIvor, L., C.A. Maggs, M.D. Guiry and M.H. Hommersand. 2002. Phylogenetic analysis of the geographically disjunct genus *Osmundea* Stakhouse (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Constancea* 83: 1–11.
- Nam, K.W. 1999. Morphology of *Chondrophycus undulata* and *C. parvipapillata* and its implications for the taxonomy of the *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) complex. *Eur. J. Phycol.* 34: 455–468.
- Nam, K.W. 2006. Phylogenetic re-evaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. succulenta* sp. nov. from Korea. *J. Appl. Phycol.* 18: 679–697.
- Nam, K.W., C.A. Maggs and D.J. Garbary. 1994. Resurrection of the genus *Osmundea* with an emendation of the generic delineation of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia* 33: 384–395.

- Nam, K.W., C.A. Maggs, L. McIvor and M.J. Stanhope. 2000. Taxonomy and phylogeny of *Osmundea* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) in Atlantic Europe. *J. Phycol.* 36: 759–772.
- NCBI Genbank. 2003. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Accessed 1 October, 2005.
- Posada, D. and K.A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
- Senties, A. and M.T. Fujii. 2002. El complejo *Laurencia* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) en el Caribe mexicano. In: (A.G. Senties and K.M. Dreckmann, eds.) *Monografías fitológicas*. UAMI y Red Latinoamericana de Botánica. Distrito Federal, Mexico. pp. 121–192.
- Silva, P.C., P.W. Basson and R.L. Moe. 1996. Catalogue of the benthic marine algae of the Indian Ocean. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 79: 1–1259.
- Swofford, D.L. 2002. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4, Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Wynne, M.J. 1998. A checklist of the benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: first revision. *Nova Hedwigia* 116: 1–155.
- Wynne, M.J. 2005. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision. *Nova Hedwigia* 129: 1–152.
- Wynne, M.J. and D.L. Ballantine. 1991. *Laurencia indescens* sp. nov. (Rhodomelaceae, Ceramiales) from the Caribbean Sea. *Phycologia* 30: 394–401.
- Yamada, Y. 1931. Notes on *Laurencia* with special reference to the Japanese species. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 16: 185–310.

Received 17 October, 2006; accepted 31 July, 2007

Research note

Proposals for *Palisada poiteau* var. *gemmifera* comb. nov. and *Palisada corallopsis* comb. nov. (Rhodomelaceae, Rhodophyta)

Abel Senties* and Jhoana Díaz-Larrea

Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apdo. Postal 55-535, México DF, 09340, Mexico, e-mail: asg@xanum.uam.mx

* Corresponding author

Abstract

Since *Chondrophycus poiteau* var. *gemmiferus* and *C. corallopsis* fall within the new recently validated segregate genus *Palisada* K.W. Nam, two new nomenclatural combinations are proposed: *Palisada poiteau* var. *gemmifera* and *P. corallopsis*.

Keywords: Ceramiales; *Laurencia* complex; nomenclatural proposals; *Palisada*.

In an initial treatment, Nam (2006) proposed recognition of the segregate genus *Palisada*, based on Yamada's (1931) section *Palisadae* within the genus *Laurencia* J.V. Lamouroux. But the lack of a Latin diagnosis or a reference to a previously published Latin diagnosis makes Nam's proposal invalid. Nineteen intended proposed transfers to *Palisada* were also invalid. In a subsequent paper, Nam (2007) validated the genus *Palisada* (type species *Palisada robusta* K.W. Nam *nom. nov.*) and the 19 new combinations. Following Nam's (2007) work, the *Laurencia* complex comprised the following four genera: *Laurencia sensu stricto*, *Osmundea* Stackhouse, *Chondrophycus* (Tokida et Saito) Garbary et J.T. Harper, and *Palisada* K.W. Nam.

Díaz et al. (2007) provided both molecular and morphological evidence to propose treatment of *Chondrophycus gemmiferus* (Harvey) Garbary et J.T. Harper as a variety within *C. poiteau* (J.V. Lamouroux) K.W. Nam, viz. *Chondrophycus poiteau* (J.V. Lamouroux) K.W. Nam var. *gemmiferus* (Harvey) Senties, Fujii et Díaz. This is concordant with Yamada's (1931) treatment of *Laurencia gemmifera* Harvey as a variety of *Laurencia poiteau* ["poitei"] (J.V. Lamouroux) M. Howe: *L. poiteau* var. *gemmifera* (Harvey) Yamada. On the other hand, Nam (2007) treated *Palisada gemmifera* (Harvey) K.W. Nam as a species separate from *P. poiteau* (J.V. Lamouroux) K.W. Nam. Finally, molecular analysis of *C. corallopsis* (Montagne) K.W. Nam indicates that this species is taxonomically close to congeners that have been transferred to *Palisada* (Díaz-Larrea et al. 2007). Accordingly, *C. corallopsis* should be transferred to *Palisada*.

In light of evidence from Nam (2006, 2007) for the recognition of *Palisada* as distinct from both *Laurencia* and *Chondrophycus* and the data of Díaz-Larrea et al. (2007), we propose the following new combinations:

- *Palisada poiteau* (J.V. Lamouroux) K.W. Nam var. *gemmifera* (Harvey) Senties, Fujii et Díaz comb. et stat. nov.
Basionym: *Laurencia gemmifera* (Harvey 1853, Nereis Boreali-Americana, vol. 2, p. 73–74, pl. XVIII, B)
Synonyms: *Laurencia poiteau* (J.V. Lamouroux) M. Howe var. *gemmifera* (Harvey) Yamada (1931: 220); *Chondrophycus gemmiferus* (Harvey) Garbary et J. Harper (1998: 194); *Chondrophycus poiteau* (J.V. Lamouroux) M. Howe var. *gemmiferus* (Harvey) Senties, Fujii et Díaz (Díaz et al. 2007: 255)
- *Palisada corallopsis* (Montagne) Senties, Fujii et Díaz comb. et stat. nov.
Basionym: *Sphaerococcus corallopsis* Montagne (1842, Histoire, physique, politique et naturelle de l'île de Cuba 2, p. 9, pl. 3, figure 1)
Synonyms: *Laurencia corallopsis* (Montagne) M. Howe (1918: 519); *Chondrophycus corallopsis* (Montagne) K.W. Nam (1999: 463).

Acknowledgements

The authors thank Dr. Michael Wynne and Dr. Kurt M. Dreckmann for critical revisions of the manuscript, and the projects "Promep-SEP (P/CA-117 2006-35-52)" and MEC-Spain (CGL 2007-60635/BOS) for financial support.

References

- Díaz-Larrea J., A. Senties, M.T. Fujii, F.F. Pedroche and M.C. Oliveira. 2007. Molecular evidence for *Chondrophycus poiteau* var. *gemmiferus* comb. et stat. nov. (Ceramiales, Rhodophyta) from the Mexican Caribbean Sea: implications for the taxonomy of the *Laurencia* complex. *Bot. Mar.* 50: 250–256.
- Garbary, D.J. and J.T. Harper. 1998. A phylogenetic analysis of the *Laurencia* complex (Rhodomelaceae) of the red algae *Cryptogam. Algal.* 19: 185–200.
- Harvey, W.H. 1853. Nereis boreali-americana. Part II. Rhodospemae. *Smithsonian Contributions to Knowledge* 5(2). 258 pp., pls. 13–36.
- Howe, M.A. 1918. Class 3, Algae. in: (N.L. Britton, ed.) *Flora of Bermuda (Illustrated)*. New York. pp. 489–540.
- Montagne, C. 1842. Botanique. Plantes cellulaires. in: (R. de la Sagra, ed.) *Histoire physique, politique et naturelle de l'île de Cuba* 2 (11) Paris. 549 pp., pls. 1–20.

- Nam, K.W. 1999. Morphology of *Chondrophycus undulata* and *C. parvipapillata* and its implications for the taxonomy of the *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta) complex. *Eur. J. Phycol.* 34: 455–468.
- Nam, K.W. 2006. Phylogenetic re-evaluation of the *Laurencia* complex (Rhodophyta) with a description of *L. succulenta* sp. nov. from Korea. *J. Appl. Phycol.* 18: 679–697.
- Nam, K.W. 2007. Validation of the generic name *Palisada* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Algae* 22: 53–55.
- Yamada, Y. 1931. Notes on *Laurencia* with special reference to the Japanese species. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 16: 185–310.

Received 19 September, 2007; accepted 4 October, 2007