



Posgrado de Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México



***Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) del Pacífico Tropical Mexicano: variación genética inter e intra específica.**

T E S I S

que para obtener el grado académico de

**Doctora en Ciencias
(*Biología Marina*)**

PRESENTA:

M. EN C. MARÍA EDITH PONCE MÁRQUEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. DENÍ CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS

COMITÉ TUTORAL

**Dra. Ligia Collado Vides
Dra. María Esther De la Rosa Duque
Dr. Luis Felipe Jiménez García
Dr. Manuel Uribe Alcocer
Dr. Luis Medrano González
Dr. Alberto Abreu Grobois**

México D. F. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi extraordinario y encantador esposo Alberto quien hizo posible uno de mis sueños más anhelado, lograr un doctorado en Biología Marina, quien siempre estuvo dispuesto en todo momento a ayudarme y apoyarme, quien trabajó fuertemente y arriesgó hasta la vida por coleccionar el material que necesitaba en las zonas más peligrosas. Quien me motivo a continuar cuando yo casi desistía, quien siempre me ha llenado de Amor, Alegría y Felicidad, por darme mi más preciado tesoro, mis hijas, por eso y por muchas cosas más, esta tesis se la dedico a él con todo mi
AMOR.

A mis hermosas hijas July, Jessy y Joanny, quienes son mi vida entera, por el cariño y amor que siempre me han demostrado, por ser tan bellas por fuera y por dentro, por ser tan buenas hijas, quienes me han motivado a seguir adelante. Para mí, siempre seguirán siendo mis pequeñas, las ADOB.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y muy especialmente al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, por la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

Al Programa de Becas del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología por la beca otorgada para el desarrollo de mis estudios de doctorado.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Dení Rodríguez, mi directora de tesis, por aceptar ser mi guía académica, en los estudios de maestría y doctorado, por seguir confiando en mi trabajo, por sus valiosas aportaciones, por sus sabios consejos, por su apoyo en todo momento y por la gran amistad que me ha brindado.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Ligia Collado Vides, Dra. María Esther De la Rosa Duque, Dr. Luis Felipe Jiménez García, Dr. Luis Medrano González, Dr. Manuel Uribe Alcocer y Dr. Alberto Abreu Grobois, un infinito agradecimiento, por sus valiosos comentarios y sugerencias, realizados a lo largo del proyecto de investigación de doctorado, por enriquecer el trabajo y hacer posible la culminación de la tesis.

Quiero agradecer muy especialmente a mi esposo Alberto, por su valiosa ayuda en la colecta del material de campo, sin su ayuda no lo hubiera logrado, por su apoyo y motivación durante todo el trabajo realizado a lo largo del doctorado.

A la Dra Luisa Alba (Lichi) por permitirme trabajar en su laboratorio. A (Betty) Beatriz Rodarte por su invaluable ayuda en el montaje y enseñanza de las técnicas moleculares y a Claudia Segal por estar siempre cuando necesitaba ayuda. A las tres por su gran apoyo y confianza durante mi estancia en el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias.

Al laboratorio de Ficología de la Facultad de Ciencias por las facilidades otorgadas. A mis compañeros y buenos amigos ficólogos, tanto Marinos como de Agua Dulce, por su amable y cordial trato durante mi estancia en el laboratorio.

Al personal del PCMyL, Dra. Gloria Vilaclara Fatjó, Diana Juárez Bustos, Gaby Almaraz Mejía, Lupita Godoy Medina, Chantal Ruiz Guerrero, por el apoyo brindado en los trámites escolares.

Al M. en C. Alejandro Martínez Mena por la toma de fotografías de los cromosomas en el microscopio y al Biol. José Antonio Hernández Gómez por las fotografías de los ejemplares y el procesamiento de las imágenes, excelente trabajo, gracias.

Quisiera dar un especial agradecimiento a Javier por la excelente ayuda en la revisión del resumen en Inglés y a July por sus grandes aportaciones en el diseño de la tesis e imágenes.

A Jessy y a Joanny por su gran ayuda, apoyo y paciencia durante todo el tiempo que me llevo realizar el doctorado.

Quisiera agradecer infinitamente a mi mami y a las hermanas de la Congregación Terciaria Capuchinas de la Sagrada Familia por sus oraciones y bendiciones durante mis estudios.

Y finalmente quisiera agradecerle a Dios, por darme fortaleza y confianza para culminar mi trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPITULO 1. GENERALIDADES	3

INTRODUCCIÓN GENERAL	4
MARCO TEORICO	6
ANTECEDENTES	11
OBJETIVOS	32
ÁREA DE ESTUDIO	33
CAPITULO 2. CITOGENÉTICA	41

INTRODUCCIÓN	42
OBJETIVOS	45
MÉTODO	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
CAPITULO 3. RAPD's (Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfico)	55

INTRODUCCIÓN	56
OBJETIVOS	58
MÉTODO	58
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
CAPITULO 4. Región Espaciadora RuBisCo (<i>rbcl-rbcS</i>)	72

INTRODUCCIÓN	73
OBJETIVOS	76
MÉTODO	76
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
CONCLUSIONES	105

LITERATURA CITADA	107
--------------------------	-----

ANEXOS	118
---------------	-----

ANEXO 1 APÉNDICE	119
ANEXO 2 CITOGENÉTICA	129
ANEXO 3 MARCADORES MOLECULARES	133
ANEXO 4 RuBisCo	139

RESUMEN

La gran similitud en la expresión morfológica que presentan las especies del género *Gelidium*, ha sido considerada un problema taxonómico que prácticamente hace imposible la delimitación entre las especies basándose solamente en datos morfológicos. La problemática genérica infiere que hay que realizar análisis a nivel genético y molecular como parte complementaria, para solucionar dichos problemas. En las costas del Pacífico Oriental han sido registradas 22 especies de *Gelidium*, incluyendo las siguientes seis que se encuentran en el Pacífico Tropical Mexicano (PTM): *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux, *Gelidium galapagense* Taylor, *Gelidium microdentatum* Dawson, *Gelidium musciforme* (Taylor) Santelices, *Gelidium pusillum* (Stackhouse) Le Jolis y *Gelidium sclerophyllum* Taylor, todas ellas con tallas que no exceden los 2 - 4 cm y con ciclos de vida isomórficos lo que las hace prácticamente indistinguibles, por lo menos en alguna etapa de su desarrollo ontogénético. Es por tal motivo que en el presente trabajo de tesis se realizó el análisis citogenético y molecular de cinco especies del PTM. El material ficológico fue colectado en la región norte "Nayarit-Jalisco", central "Guerrero" y sur "Oaxaca" del PTM.

Se determinaron los números cromosómicos de *Gelidium crinale*, *G. galapagense*, *G. microdentatum*, *G. pusillum* y *G. sclerophyllum*, siendo el número diploide $2n=4$, para todas ellas, encontrándose poca variación en la morfología de los cromosomas. Se caracterizó la variación genética a través de la amplificación al azar de fragmentos de DNA polimórficos (RAPDs) en 4 especies de *Gelidium* y en 4 morfos de *Gelidium pusillum* observándose variación interespecífica en los patrones de bandedo. No se presentó variación intraespecífica en las poblaciones de *G. galapagense* y *G. sclerophyllum* a diferencia de los morfos de *G. pusillum* los cuales presentaron una variación marcada entre cada uno de ellas. Asimismo, se utilizó la región espaciadora *rbcl-rbcS* (RuBisCo) para confirmar dicha variabilidad genética, cabe mencionar que se incluyó una especie más. Los resultados fueron similares a los obtenidos con los RAPD's y nos permitieron realizar un análisis filogenético indicándonos que cada una de las 5 especies corresponde a un taxa diferente y que ocurre lo mismo con tres de los morfos de *G. pusillum*. Lo que nos permite proponer la existencia de más de 6 especies de *Gelidium* para el Pacífico Tropical Mexicano.

ABSTRACT

The remarkable similarity between species of the genus *Gelidium* has been considered a taxonomic problem that practically makes impossible the differentiation between species based only on morphological data. This situation requires genera identification through genetic and molecular analysis as a supplement in order to resolve these issues. Twenty two species of *Gelidium* have been reported for the Pacific East coast, including the following six found in the Mexican Tropical Pacific (MTP): *Gelidium crinale* (Turner) Lamouroux, *Gelidium galapagense* Taylor, *Gelidium microdentatum* Dawson, *Gelidium musciformis* (Taylor) Santelices, *Gelidium pusillum* (Stackhouse) Le Jolis and *Gelidium sclerophyllum* Taylor; all of them with sizes that do not exceed 2–4 cm and with isomorphic life cycles which makes them practically indistinguishable, at least at some stage in their ontogenetic development. It is for such reason that the present thesis work encompasses the cytogenetic and molecular analysis of five species from the MTP. The algae material was collected in the north region “Nayarit- Jalisco”, central “Guerrero” and south “Oaxaca” from MTP. The chromosome number of *Gelidium pusillum*, *G. galapagense*, *G. microdentatum*, *G. pusillum* and *G. sclerophyllum* were determined, all of them with the diploid number $2n = 4$, finding little variation in the morphology of the chromosomes. The genetic variation, through the use of patterns of random fragmentation of DNA (RAPDs) in 4 species of *Gelidium* and 4 morphs of *Gelidium pusillum*, indicate interspecific variation in banding patterns, did not indicate intraspecific variation in populations of *G. galapagense* and *G. sclerophyllum* unlike morphs of *G. pusillum*, which display a marked variation between each of them. We also used a “*rbcL-rbcS* spacer or intergen RuBisCo” to confirm this genetic variability; it is worth mentioning that an additional species was used for this analysis. The results were similar to those obtained with the RAPD's and allowed us to perform a phylogenetic, which indicates that each one of the 5 species represents a different taxon; similar results were obtained for the three of the morphs of *G. pusillum*. The results of this study suggest the existence of more than 6 species of *Gelidium* in the Mexican Tropical Pacific.

CAPITULO 1

GENERALIDADES

INTRODUCCION

Para muchos ficólogos la problemática existente en las determinaciones taxonómicas de diversas especies algales, resulta incierta. En algunos casos, las descripciones a nivel específico son tan parecidas o presentan mínimas diferencias que resulta difícil discernir entre una y otra especie haciendo la identificación de los ejemplares complicada, sobre todo cuando el parecido morfológico es muy grande. En muchas ocasiones las diferencias se encuentran en las estructuras reproductoras, siendo aun más difícil en especies cuya presencia de individuos fértiles es escasa en el campo, como es el caso de las especies de *Gelidium*, cuya fase vegetativa es dominante a lo largo de todo el año.

En el Pacífico Tropical Mexicano (PTM), se han registrado a lo largo de la historia seis especies de *Gelidium*, *G. crinale* (Turner) Lamouroux, *G. galapagense* Taylor, *G. microdentatum* Dawson, *G. pusillum* (Stackhouse) Le Jolis, *G. sclerophyllum* Taylor y *G. musciforme* (Taylor) Santelices, todas ellas cespitosas y morfológicamente muy similares, algunas de ellas descritas en ausencia de cistocarpos y en otros casos con cistocarpos muy raros. Además, se desconoce si estas entidades presentan un ciclo de vida típico descrito para las especies del orden, conocido como tipo *Polysiphonia* con alternancia de generaciones isomórficas; incluyendo cistocarpos biloculares desarrollándose en los gametofitos femeninos después de la fertilización (Dixon, 1958). Cabe mencionar que la sexta especie *G. musciforme* (*Pterocladia musciformis*), fue registrada por Dawson, (1961) para Nayarit y no ha vuelto a ser encontrada, ni en el presente trabajo, por lo que se trabajó con sólo 5 especies.

Los antecedentes para el PTM indican en general, que la morfología de todas estas especies es convergente a lo largo de toda la región por lo menos en alguna o algunas de las etapas del desarrollo ontogenético y confirman caracteres distintivos claros en etapas adultas sólo para *Gelidium microdentatum* y *G. sclerophyllum* (Rodríguez, 1989, Plata y Rodríguez, 1996, Plata *et al.*, 1995; Rivas-Lechuga *et al.*, 1996).

Distinguir las especies morfológicamente resulta por ahora difícil, sin embargo establecer sus límites como entidades biológicas es hoy posible a partir de la incorporación de procedimientos nuevos relacionados con la evaluación de la variación genética a diferentes niveles.

Las herramientas de la citogenética, permiten establecer la composición cromosómica de los individuos y en el caso particular de las especies de *Gelidium* permitieron reconocer a los talos gametofíticos de los tetrasporofíticos y probablemente, establecer el momento de la meiosis y así

confirmar qué tipo de ciclo de vida presentan estas especies. El marcador molecular RAPDs y el uso de la región espaciadora *rbcL-rbcS* (RuBisCo), consintieron la valoración de la variación genética inter e intraespecífica, para obtener el principal objetivo de este trabajo que es determinar cuántas y cuáles son las especies de *Gelidium* presentes en el PTM.

En el contexto anterior, el presente trabajo está organizado en cuatro capítulos: el capítulo 1 nombrado “Generalidades” incluye esta primera parte introductoria la cual es seguida de un marco teórico en el que se manejan conceptos básicos importantes para comprender, el porqué de esta similitud morfológica y la variación intra e interespecífica a nivel molecular, continúa con los antecedentes que incluye toda la parte histórica de la problemática y las descripciones taxonómicas de las 5 especies de *Gelidium* del PTM. La siguiente sección aborda los objetivos generales de la tesis, seguida de la descripción del área de estudio en donde se colectó el material ficológico.

Los capítulos 2, 3 y 4, están organizados de la siguiente manera: presentan cada uno, una parte introductoria en la que se hace referencia del tema a tratar, seguida de la descripción de los objetivos particulares, la metodología utilizada durante su desarrollo y finalmente la parte de los resultados obtenidos y la discusión de los mismos.

En el capítulo 2 “Citogenética” se trataron aspectos como el número, forma y tamaño de los cromosomas de cada especie, buscando diferencias o semejanzas dentro de las especies estudiadas y asimismo aportar valiosa información, para la biología de las especies.

En el capítulo 3 “RAPD’s” se trata de la utilidad del marcador molecular conocido como DNA polimórfico amplificado al azar, un marcador poco utilizado por los ficólogos, sin embargo se considera muy útil y de fácil empleo. Actualmente se sigue utilizando como herramienta molecular en estudios de plantas superiores sobre todo para aquellas plantas que no cuentan con marcadores moleculares específicos. Es por ello que consideramos importante incluir los resultados obtenidos en el presente trabajo.

En el capítulo 4 “Región Espaciadora *rbcL-rbcS* (RuBisCo)” se utilizó como herramienta para la delimitación de las especies. Los datos obtenidos son interesantes y nos permitieron corroborar y confirmar los resultados obtenidos.

La última parte se refiere a las conclusiones y a la literatura citada, seguida de un apartado de anexos en el que se incluyen tablas e información relevante sobre los temas estudiados.

MARCO TEORICO

Variabilidad genética

“Los seres vivos son manifestaciones de una forma compleja de organización de la materia y de la energía, que posee la capacidad de expresarse de maneras distintas en su acontecer espacio-temporal a través de su cualidad de cambio, es decir, las cualidades de alterarse, alterar y ser alterados. Cada individuo tiene unidad y continuidad en sí mismo a través de la información de su propio genoma cuya propiedad principal es la de mantener la misma información a través del curso de todo el desarrollo ontogenético, dando unidad y continuidad al individuo, pero al mismo tiempo tiene la posibilidad de expresarse diferencialmente a lo largo del tiempo, permitiendo el cambio y la diversidad” (González - González, 1992).

El estudio particular de la fuente de la información, el genoma, objetivo de la Genética, constituye una disciplina fundamental en la explicación de las cualidades intrínsecas y capacidades manifiestas de los seres vivos, en este caso las especies algales.

Cada especie presenta una dotación genética compuesta por un conjunto de unidades separadas llamadas genes, todos ellos formados por la misma sustancia química básica (ácido desoxiribonucleico). Es esta unidad de estructura de los genes la que proporciona la homogeneidad del genotipo de una población o de la especie. Son los mismos genes los que actúan en todos los individuos de una especie, sin embargo, dichos genes se pueden presentar en diferentes formas, los alelos, que a su vez son resultado o consecuencia de las mutaciones y pueden expresarse o no hacerlo, en diferentes momentos (Fontdevila y Moya, 1999, 2000).

La genética, junto con la citología, bioquímica y biofísica han hecho evidente que existe relación entre la gran diversidad de los seres vivos; las características de unidad entre todos ellos y en las que basan su estructura y funcionamiento, son las bases nitrogenadas: adenina, guanina, citosina, y timina, que junto con el fosfato y la desoxiribosa, forman la molécula biológica DNA (Tavlitzki, 1987). Los genes están constituidos por segmentos de DNA los cuales se definen por el orden en que se encuentran las bases nitrogenadas. Por lo que se conoce, en todos los seres vivos, los sistemas que aseguran la transcripción y traducción de los mensajes genéticos que conducen a la síntesis de proteínas, son los mismos para todo ser vivo del planeta (Jiménez *et al.*, 2006). La genética molecular ha proporcionado las evidencias de que en todos los seres vivos se presentan los mismos mecanismos moleculares que se requieren para vivir, reproducirse y expresar los

caracteres biológicos que se reciben de la generación anterior y que se traspasan a la siguiente (Puertas, 1992).

A lo largo de la historia de la tierra, todos los seres del planeta han estado sujetos a una selección, eliminación y modificación en la composición de la secuencia de las bases de DNA como consecuencia de las mutaciones y recombinaciones, con incorporación o pérdida de segmentos de esta molécula, dando como resultado que los organismos se encuentren adaptados al medio en que viven, siendo a su vez capaces de utilizar la reserva de genes si las condiciones del ambiente cambiaran (Tavlitzki, 1987).

Los individuos de una población natural nunca son o serán genéticamente idénticos; en el acervo genético de las poblaciones existe variabilidad genética entre los individuos, conduciendo a los cambios en la estructura genética de la población (Roughgarden, 1996). Existe un patrón espacial que interviene en la estructura genética de una población y en la expresión del acervo genético, causado por la influencia del ambiente sobre la fisiología y el desarrollo de un organismo, aspectos de los que trata la genética de poblaciones.

La cantidad de variación genética que hay en una población depende de la información genética disponible, la cual esta en función de los tipos de alelos de todos los loci. Los factores que afectan potencialmente la cantidad y clase de variación genética son la mutación, el flujo genético (migración), deriva génica, recombinación y la selección natural. Estos pueden presentar efectos particulares, como por ejemplo, la deriva génica reduce la variación y las mutaciones la aumentan. La selección natural, el flujo genético y la recombinación pueden incrementar o reducir la variación genética dependiendo de la situación que enfrente la población en un momento dado (Hartl y Clark, 1997).

La variación genética se considera la base de la evolución ya que se requiere de una fuerza impulsora para que se de un cambio evolutivo, como lo sería la selección natural que se ha definido como el mecanismo por el cual las poblaciones se modifican en respuesta al ambiente. Esta fuerza puede actuar a través de la reproducción diferencial de ciertos genotipos y los genotipos favorecidos son aquellos que tienen éxito reproductivo y dejarán una alta proporción de descendientes en las siguientes generaciones (Fontdevila y Moya, 1999, 2000).

La producción de cambios evolutivos al azar en una población de cruzamiento pequeña, se denomina deriva genética. Esta deriva provoca cambios en el acervo génico de una población, sin embargo, afecta las frecuencias génicas al azar. La dirección de la desviación puede tener o no el

mismo sentido que los demás factores que alteran las frecuencias génicas, como la migración, mutación y selección natural. En consecuencia, la deriva génica puede reforzar dichas fuerzas u oponerse a ellas (Crow *et al.*, 1986).

Debido a las fluctuaciones en el ambiente, por ejemplo, el desabasto de alimento o el brote de una enfermedad, una población puede experimentar por periodos una rápida y marcada disminución en el número de individuos. La población pasa por un cuello de botella, y la deriva génica puede modificar la variabilidad en los pocos supervivientes. Conforme la población aumenta de nuevo su tamaño, la frecuencia de los alelos puede ser un tanto diferente de la frecuencia de esos mismos alelos en la población anterior al cuello de botella.

La deriva génica también es importante cuando uno o unos pocos individuos se extienden por debajo del límite normal para dichas especies y forman una colonia, como en la colonización de las islas oceánicas. Los colonizadores son portadores de una pequeña muestra, tomada al azar, de los alelos del acervo génico de la que provienen, y su número es lo suficientemente pequeño como para activar la deriva génica. En consecuencia, las poblaciones aisladas pueden tener una frecuencia génica muy diferente de la frecuencia génica característica de dichas especies, y esta diferencia puede ocurrir por azar y no por adaptación (Hedrick, 2000).

La hibridación y la introgresión en los organismos son resultado de la recombinación genética. La hibridación natural proviene del flujo de genes entre individuos de poblaciones divergentes a nivel intraespecífico (Fontdevila y Moya, 1999).

Sin embargo, la recombinación y el flujo genético son estimados como las fuentes principales e inmediatas de la variación genética. La recombinación produce nuevos arreglos de los genes a través de la fecundación cruzada y del intercambio de segmentos de los cromosomas homólogos (entrecruzamiento), así como la distribución independiente de los cromosomas durante la meiosis (Juárez, 2001).

El flujo genético se refiere a añadir nuevos alelos al caudal génico por medio de la mutación, o por gametos nuevos de inmigrantes de otras poblaciones. Al segundo procedimiento se le llama intercambio génico y si es recurrente, flujo de genes. La mutación y el flujo de genes son procesos similares porque ambos proporcionan alelos nuevos a una población; es decir, cada uno es una fuente de variación (Hartl y Clark, 1997).

Debido a que el flujo de genes reduce la cantidad de variación entre dos poblaciones, tiende a contraponerse a los efectos de la selección natural o de la deriva génica.

La mutación ha sido considerada como la última fuente de variación genética, la mutación es el acontecimiento de cambios heredables en el genotipo de un organismo que no ha sido heredado de su ancestro. Estas pueden ser pequeñas como la sustitución de un simple par de nucleótidos en la molécula de DNA (nuevos arreglos en los genes) o mayores como cambios en la estructura o número de cromosomas poliploidía = multiplicación de los juegos cromosómicos, aneuploidía = pérdida o ganancia de cromosomas en el juego cromosómico, cambios en la estructura general por delección, fusión y/o translocación (Roughgarden, 1996; Jiménez *et al.*, 2006).

Las mutaciones pueden originarse espontáneamente durante la replicación del DNA o ser inducida por factores ambientales como la radiación, altas temperaturas o por exposición a compuestos químicos (Juárez, 2001).

Entonces, la variabilidad genética es producto de factores como la mutación, el flujo genético (migración), la deriva génica, la recombinación y la selección natural, que de alguna manera alteran potencialmente la cantidad y clase de variación genética de las especies.

Plasticidad fenotípica

La plasticidad fenotípica es la capacidad de un organismo de producir fenotipos diferentes en respuesta a cambios en el ambiente. Este concepto se visualiza como el intervalo de respuestas fenotípicas de un genotipo expresado en un gradiente ambiental (Gianoli, 2004).

Uno de los primeros en mencionar el término plasticidad fue Darwin (1859) en su libro El origen de las especies. Señala que en variedades y subvariedades de papa y dalia se presentan diferencias mínimas en estructura y desarrollo, lo cual hace que toda su organización presente cambios en su forma.

Bradshaw (1965) definió formalmente la plasticidad como una medida de la cantidad o proporción en que la expresión de las características de la forma cambian por efecto de la variación ambiental. Esta definición excluye la variación ocasionada por factores internos que influyen en el desarrollo del individuo, como su estado de desarrollo interno, el desarrollo de los órganos y la relación entre dos o más variables. Las variables ambientales pueden estar representadas por factores bióticos (enfermedades, depredación, competencia, etc.) y abióticos (agua, luz,

temperatura, humedad, sustrato, etc.), que influyen en mayor o menor grado en el patrón de desarrollo, forma o funcionamiento de los organismos (Reyes y Martínez, 2001).

Los organismos poseen la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales, ajustando su morfología y fisiología a través de la variación genética y la plasticidad en su forma. Schmitt *et al.*, (1999) menciona que la variación de forma en las plantas puede estar o no relacionada con la variación genotípica y podría afectar caracteres ecológicos, morfológicos, fisiológicos, anatómicos, cariológicos y bioquímicos. Los cambios en caracteres morfológicos, fisiológicos y reproductivos han sido reportados para muchas especies de plantas. La plasticidad de la forma constituye una parte importante de la habilidad de las plantas para sobrevivir en condiciones ambientales heterogéneas.

Por lo tanto, la plasticidad de la forma se refiere al hecho de que el mismo genotipo puede producir diferentes formas en ambientes heterogéneos, jugando un papel importante en la adaptación de las plantas a su ambiente natural, esto representa una gran oportunidad para que las especies se dispersen (Sultan, 1995).

Plasticidad fenotípica vs. Variabilidad genética

La plasticidad y la variabilidad genética son fenómenos distintos, que coinciden en el “cambio” pero a escalas diferentes, una a nivel ecológico (plasticidad) y otra a nivel evolutiva (variabilidad genética).

En las especies algales, la manifestación de la forma es altamente variable y por lo tanto ha sido uno de los principales problemas a resolver en el momento de la determinación taxonómica de las mismas. Establecer los límites entre los intervalos de plasticidad fenotípica constituye un desafío, quedando generalmente, un margen de duda respecto de si las diferencias morfológicas son resultado de dicha plasticidad o si por el contrario se trata de variación genética y divergencia específica.

En el trabajo que aquí se presenta, la base de la problemática es justamente la dificultad que representa distinguir las especies de *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta), registradas en el Pacífico tropical mexicano a partir de la morfología (externa e interna), la que por un lado es altamente variable a lo largo del desarrollo ontogenético en cada una de éstas y por otro, altamente convergente entre ellas. Decidir si efectivamente los epítetos registrados para la región representan entidades biológicas independientes, es el principal objetivo de esta tesis.

ANTECEDENTES

El orden Gelidiales, Rhodophyta esta formado por 176 especies, distribuidas alrededor del mundo (Guiry, 2007; Rodríguez *et al.*, 2008), cuenta con 15 géneros ubicados históricamente en dos familias y mas recientemente en tres, Gelidiaceae Kützing, Pterocladaceae Felicini *et* Perrone y Gelidiellaceae Fan. Desde el establecimiento del orden por Kylin en 1923 hasta nuestros días, la taxonomía ha sido cuestionada y ha sufrido diversas modificaciones en todas sus categorías taxonómicas. Incluso el propio orden fue profundamente criticado y aunque, actualmente está absolutamente aceptado, no obstante hubo quienes jamás lo aceptaron como Dixon (1961), quien siempre sostuvo la calidad de la familia Gelidiaceae dentro del orden Nemaliales. Hommersand y Fredericq (1988) describen el orden Gelidiales y lo consideran un grupo monofilético y reconocen caracteres únicos, como tener un ciclo de vida con alternancia de generaciones trifásico, con gametofitos y tetrasporofitos isomórficos, con crecimiento uniaxial, sin formación de rama carpogonial, carpogonios intercalares, espermatangios transversalmente divididos, entre otros (Freshwater, 1993). Este conjunto de características aunque poco convencional se compara con los otros órdenes de Florideophyceae y hace de las Gelidiales un orden distinguible y separable del resto con un estatus que sólo está justificado por diferencias con el resto de familias de Nemaliales (Santelices, 1990; Rodríguez *et al.*, 2008).

El número de familias también ha sido modificado, en un principio se consideraba una sola familia Gelidiaceae, sin embargo, para 1961, Fan propuso que las diferencias presentadas por las especies del género *Gelidiella* (Feldman y Hamel, 1934) perteneciente en ese momento a Gelidiaceae, eran suficiente razón para formar una nueva familia dentro del orden y erige Gelidiellaceae por la ausencia de filamentos rizoidales o hifas dentro del talo. Dos décadas después Maggs y Guiry (1987) proponen acotar la ausencia de hifas al talo con excepción de los puntos de adhesión al sustrato que también es un carácter distintivo e incorporar como carácter diagnóstico la presencia de estiquidios portando tetrasporangios. Poco tiempo después esta propuesta fue cuestionada por Santelices (1990) cuando argumentó que los estiquidios también se presentan en especies de *Gelidium* y *Pterocladia* (ahora *Pterocladella*) y afirma que se ha demostrado con numerosos estudios que la presencia o ausencia total de filamentos rizoidales es un carácter fuertemente constante y que es junto con la presencia de estructuras de fijación al sustrato, lo único que hoy permite la segregación de las familias. La familia de más reciente creación Pterocladaceae, fue propuesta por Perrone *et al.*,(2006) a partir de las diferencias presentes en las estructuras de fijación al sustrato (Rodríguez *et al.*, 2008).

Con respecto a los géneros que conforman las familias Gelidiaceae éstos han sufrido numerosas modificaciones relacionadas con la identidad y cantidad, desde los cuatro originales propuestos por Kützing, *Acrocarpus*, *Echinocaulon*, *Ctenodus* y *Gelidium* (Santelices, 1974) hasta los actualmente reconocidos, *Gelidium* Lamouroux, *Suhria* J. Agardh, *Porphyroglossum* Kützing, *Ptilophora* Kützing, *Acanthopeltis* Okamura, *Yatabella* Okamura, *Beckerella* Kylin, *Capreolia* Guiry et Womersley y *Pterocladia* Santelices et Hommersand. La familia Gelidiellaceae cuenta con dos géneros *Gelidiella* Feldman et Hamel y *Parviphycus* Santelices. La familia Pterocladaceae esta constituida por un solo género *Pterocladia* J. Agardh (Rodríguez *et al.*, 2008).

La problemática taxonómica de Gelidiaceae continuó, pero esta vez, a nivel genérico (Rodríguez y Santelices, 1987, 1988, 1996; Santelices, 1991) y específico, por la ausencia de criterios adecuados de delimitación interespecífica (Norris, 1992).

Las especies de los géneros *Gelidium*, *Pterocladia* y *Gelidiella* presentan una morfología externa muy parecida que a simple vista es casi imposible reconocer. Las especies de *Gelidiella* se pueden separar haciendo un corte en el talo, ya que como se había mencionado con anterioridad, carecen de filamentos rizoidales.

Los géneros, *Gelidium* y *Pterocladia* han constituido el mayor problema taxonómico de la familia. La distinción entre las especies de ambos géneros ha resultado extremadamente difícil de realizarse debido a que los límites intergenéricos, se han basado exclusivamente en las diferencias de la estructura cistocárpica:

- a) Cistocarpos con un lóculo y filamentos rizoidales corresponde a *Pterocladia*
- b) Cistocarpos con dos lóculos y filamentos rizoidales corresponden a *Gelidium*
- c) Cistocarpos con dos lóculos originales y atrofia de uno en la madurez y filamentos rizoidales corresponden a *Pterocladia*
- d) Cistocarpos con un lóculo (infrecuente) y sin filamentos rizoidales corresponden a *Gelidiella*

Sin embargo, esta estructura es poco frecuente y en muchos casos se desconoce, y aunado a ello, la semejanza tan fuerte que existe en su morfología externa, trae como consecuencia un alto riesgo de error, provocando serios problemas de determinación entre los géneros.

Por ejemplo las especies *Pterocladia mcNabbiana* Dawson y *P. musciformis* Taylor fueron descritas originalmente con base en ejemplares sin cistocarpos, y fueron ubicadas dentro de

Pterocladia, posteriormente se encontraron plantas con estructuras reproductoras y estas resultaron ser cistocarpos biloculares, lo que puso de manifiesto el cuestionamiento sobre su permanencia genérica, actualmente han sido reubicadas dentro *Gelidium*, quedando como *G. mcnabbianum* y *G. musciforme* (Santelices, 1991).

Los caracteres vegetativos que han sido propuestos como elementos con valor segregativo son: características de las células medulares; ubicación y abundancia de filamentos rizoidales; encorvadura basal de las ramas laterales de crecimiento limitado; forma y disposición de células corticales superficiales. Todos estos caracteres han sido evaluados en diferentes etapas y rechazados, en mayor o menor medida, como instrumentos que permitan una segregación entre los géneros.

También al interior de los géneros se presentan problemas de delimitación específica como ocurre en las especies de *Gelidium*, debido a la gran similitud morfológica entre los talos, por lo menos en algún momento de su desarrollo ontogenético.

En diversas regiones del mundo existen dos grupos de especies de *Gelidium*, uno el de las especies de gran tamaño con talos de 5 cm a 1.5 m y el otro el de las especies de tamaño pequeño, con talos de menos de 1 cm y hasta 2 (5) cm de talla (Norris, 1992). Estas especies generalmente forman pequeños tufos (tapetes algales) sobre rocas o conchas en la región intermareal, poseen una coloración similar, un tipo de ramificación parecido, entre otras semejanzas. Esto se debe muy probablemente a las condiciones ambientales a las que están sometidas, como oleaje, mareas, desecación, entre otros (Fredriksen, *et al.*, 1994). Ello produce una alta variabilidad en su morfología y un significativo grado de convergencia entre morfos de las diferentes especies (Rodríguez, 1989; Rodríguez *et al.*, 1993, Serviere-Zaragoza *et al.*, 1993b).

Los criterios utilizados para su ubicación taxonómica, han sido también caracteres morfológicos como: tipo de ejes, altura de las frondas, patrón de ramificación, abundancia de las ramas, forma de las ramas tetraspóricas y cistocárpicas, agregación de tetrasporangios, entre otros (Rodríguez, 1989).

En especies grandes de *Gelidium*, la ubicación de los filamentos rizoidales ha funcionado bien como carácter distintivo para la ubicación taxonómica de especies, ya que estos filamentos presentan un patrón específico, sin embargo, esto no ha tenido los mismos resultados en especies de talla pequeña debido a que los filamentos rizoidales tienen un acomodo arbitrario (Dixon, 1958).

Norris (1992), menciona que la descripción de las especies pequeñas, es muy confusa en la literatura y que para su delimitación utilizan pocas diferencias, el problema que encontró fue en la descripción de especies pequeñas de *Gelidium* en Sudáfrica, *G. pusillum* y *G. micropterum*. Este taxón registrado como *G. pusillum* no se parece al ejemplar tipo que proviene de Gran Bretaña, quien presenta un tamaño mayor y ramas muy altas a diferencia de los ejemplares de las zonas subtropical y tropical, que generalmente forman tapetes algales. Dixon e Irvine (1977) revelan que *G. pusillum* es una especie con todas las variedades de formas tanto en los ejes principales como en las ramas, que se pueden presentar en cualquier época del año y a cualquier nivel de marea.

Otra característica distintiva se observa en estructuras reproductoras de organismos fértiles como son los cistocarpos, desafortunadamente en las especies pequeñas de *G. pusillum* es poco frecuente la presencia de especímenes fértiles, principalmente el talo gametofito (Fredriksen *et al.*, 1994).

Ubicación Taxonómica de las especies registradas para el PTM^{1,2}

Reino Plantae Haeckel

Subreino Rhodoplantae Saunders & Hommersand

Phylum Rhodophyta Wettstein

Subphylum Eurhodophytina Saunders & Hommersand

Clase Florideophyceae Cronquist

Subclase Rhodymeniophycidae Saunders & Hommersand

Orden Gelidiales Kylin

Familia Gelidiaceae Kützing

Género *Gelidium* Lamouroux

Gelidium crinale Turner

Gelidium galapagense Taylor

Gelidium microdentatum Dawson

Gelidium musciforme (Taylor) Santelices

Gelidium pusillum (Stackhouse) Le Jolis

Gelidium sclerophyllum Taylor

¹ Tomado de Rodríguez, 1989.

² Tomado de Saunders & Hommersand, 2004.

La familia Gelidiaceae (Rhodophyta), está representada en las costas del Pacífico Americano por los géneros *Gelidium* (Rodríguez *et al.*, 1993) y *Pterocliadiella* (Santelices y Hommersand, 1997). Seis especies de *Gelidium* se encuentran en las costas del Pacífico Tropical Mexicano (PTM). Todas ellas son consideradas como parte del grupo de las especies “pequeñas”.

A continuación se presentan las descripciones taxonómicas obtenidas de Rodríguez, 1989 (Tesis) y Rodríguez *et al.*, 2008 (Monografías Ficológicas)

***Gelidium* J.V. Lamouroux**

Annales du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris, 1813, 20: 21-47, 115-139, 267-293, Plates 7-13 (Guiry, 2007).

Especie tipo: *Gelidium corneum* (Hudson) J.V. Lamouroux 1813: 129²

Basónimo: *Fucus corneus* Hudson

Talos conformados por ejes rastreros, estoloníferos generalmente cilíndricos o por sistemas basales discretos, portando ejes rectos de cilíndricos a aplanados con ramificación variada y generalmente dística. Internamente presentan una corteza de varias capas de células de las cuales las más externas están pigmentadas, las células son redondeadas y pequeñas (2-12 µm de diámetro) y una médula de células globosas más grandes. Entremezclados en la médula o en posición subcortical se encuentran filamentos rizoidales o hifas con paredes muy gruesas que varían en cantidad y en la forma de su distribución a lo largo del talo. Estructuras reproductivas tetrasporangiales en ramas especiales o en los ápices, en ramas o ejes ordinarios formando soros con o sin márgenes de células estériles. Estructuras cistocárpicas en los extremos distales de las ramas, cistocarpos biloculares con uno o varios ostiolos en cada superficie (Santelices, 1974; Abbott y Hollenberg, 1976).

² Original publication: Lamouroux, J.V.F. (1813). *Essai sur les genres de la famille des thalassiphytes non articulées*. Annales du Muséum d'Histoire Naturelle, Paris 20: 21-47, 115-139, 267-293, Plates 7-13.



Las especies del género *Gelidium* presentan un ciclo de vida tipo-*Polysiphonia* con gametofitos y tetrasporofitos isomórficos de manera natural (West y Hommersand, 1981) el cual se ha demostrado en cultivos de *Gelidium culteri* Harvey (Macler y West, 1987). El gametofito, el tetrasporofito y el carposporofito diploide se desarrolla sobre el gametofito femenino (Dixon, 1982; Masuda, *et al.*, 1996)

Gelidium crinale (Turner) Lamouroux



In Bory 1825. Dictionnaire classique d'histoire naturelle, Vol. 7, p. 191. Paris (Santelices, 1974).

Basónimo: *Fucus crinalis* Turner, 1819, p. 4, pl. 198

Localidad tipo: Rocas en Kilmouth, Cornwall, Inglaterra

Tipo: No fue designado por Turner Isotipo HAHF 55234

Sinónimo: *Gelidiella mexicana* (sólo los especímenes de Guaymas en Dawson, 1944, p. 262.)

Hábito: Plantas modulares creciendo en céspedes, de color morado verdoso, de textura cartilaginosa suave.

Estructuras vegetativas: Ejes postrados cilíndricos formando estolones, con ejes erectos cilíndricos en la base y subcilíndricos arriba, casi rectos o un poco más anchos en las partes altas, con atenuación apical media o marcada o atenuación subapical media o marcada, márgenes irregulares, liso-irregulares o lisos. Las dimensiones van de 0.4-1.20 cm de altura, 0.30-1.40 mm de ancho y de 0.09-0.20 mm de grueso, con un plano transversal medio ovoide o romboidal. La forma de los ápices vegetativos es de tipo C, E, F (el cambio de forma se produce durante el crecimiento del eje). Los ejes son simples o con ramificación de diversos tipos pero siempre escasa o muy escasa, múltiple irregular en partes medias y altas y de opuesta o subopuesta en todo el eje. En la corteza se presentan 2-3 o 3 capas de células, en vista superficial no se observa agrupación de las células corticales y están dispuestas irregularmente (tipo *Gelidium*). La médula puede presentar de 4-5 a 7-8 hileras de células de forma circular o subcircular de 10-20 μm de diámetro o de 7-8 μm de ancho y 10-24 μm de largo; las paredes celulares pueden ser delgadas, medias o gruesas con espacios intercelulares medios o grandes. Los filamentos rizoidales están solo en la subcorteza, periféricos a la médula y son de frecuentes a abundantes.

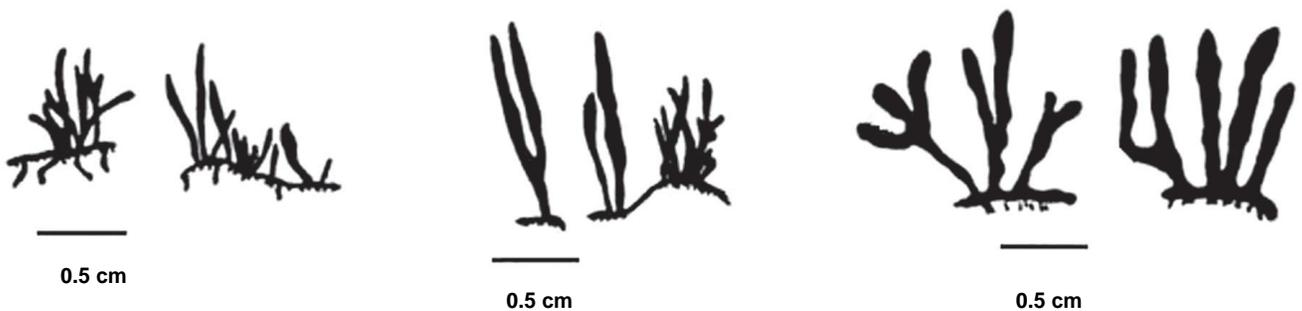
Estructuras reproductivas: Las ramas tetrasporangiales se ubican en las partes altas de las ramas ordinarias y a veces se ramifican, en ocasiones son ensanchadas en sus partes medias, más arriba se adelgazan y los ápices son puntiagudos o redondeados; los soros tetrasporangiales son ovoides, irregulares de 175-550 μm de ancho y 350-1250 μm de largo, pueden o no tener márgenes estériles, cuando presentes son angostos o medianos y a veces están circunscritos a los ápices. Los tetrasporangios están dispuestos irregularmente en el soro, son esféricos u ovoides y miden 18-27 μm de diámetro o 22-27 μm de ancho y 30-40 μm de largo; las tetrasporas se forman por divisiones en cruz. Los gametofitos no fueron observados.

Hábitat: Las plantas se encuentran adheridas a sustratos rocosos, o a conchas, ubicadas en la mesomareal alta y media

Distribución

Pacífico Tropical: Santa Elena, Oaxaca; Playa Careyes, Jalisco; Lázaro Cárdenas, Michoacán. Pacífico Baja California: Isla Guadalupe y Bahía Magdalena (Dec. y Aug. Respectivamente Osorio-Tafall 8/21/46, Dawson, 1953) Golfo de California: Mazatlán, Sinaloa (D.3612); Isla Turner, Bahía Gonzaga (D692-40, D.322-40 respectivamente, Dawson, 1953).

Morfologías de la especie



Gelidium galapagense Taylor



Taylor, W.R. (1945). Pacific marine algae of the Allan Hancock Expeditions to the Galapagos Islands. Allan Hancock Pacific Expeditions 12: iv + 528, 3 figs, 100 plates.

Localidad tipo: Isla Isabela, Islas Galápagos, Ecuador.

Hábito: Plantas creciendo en forma de céspedes de color rojo guinda.

Estructuras vegetativas: Talos de 1 cm de altura, rastreros o como tufo, saxícolas. Rizomas rastreros, cortos, terete, formando hapteros. Ejes erectos terete en la base, aplanados arriba, ejes simples o con ramificación irregular, las ramitas a veces redivididas. Filamentos rizoidales visibles en las partes exteriores de la región medular.

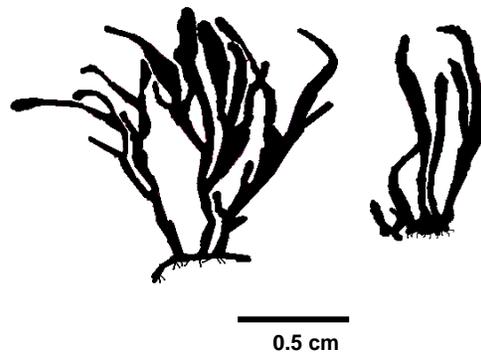
Estructuras reproductivas: Soros tetrasporangiales en las puntas de las ramitas; esporangios sin orden regular. Las ramitas fértiles presentan una constricción en la base, tienen formas irregulares a veces palmeadas, o se encuentran divididas longitudinalmente, plantas encontradas en el intermareal. Esta especie es distinguible principalmente por las ramitas tetrasporangiales altamente irregulares, con apariencia que va desde un abanico hasta irregularmente digitadas.

Hábitat: Las plantas se encuentran adheridas a sustratos rocosos, ubicadas en la mesomareal alta y media.

Distribución

Se encuentra restringida a las costas del continente americano, se le encuentra en El Salvador y en Galápagos, Ecuador y ha sido registrada en el PTM únicamente en Zihuatanejo, Guerrero por Huerta (1978) y Salcedo *et al.*, (1988)

Morfologías de la especie



Gelidium microdentatum (Dawson)



Pacific Naturalist, 1960a 2(1): 36-38 figs: 2 c-d

Localidad tipo: San Blás, Nayarit

Hábito: Plantas modulares creciendo en céspedes, de color rojo guinda o verde oscuro en las partes basales y violeta o verde claro en las partes altas, de textura suave cartilaginosa.

Estructuras vegetativas: Ejes postrados cilíndricos formando estolones, con ejes erectos cilíndricos en la base y aplanados en las partes medias y altas, anchos arriba con los ápices más ensanchados, márgenes con dientes dispuestos regularmente. Las dimensiones van de 0.6-1.70 cm de altura, 0.50-1.20 mm de ancho y 0.08- 0.30 mm de grueso, con un plano transversal medio elíptico o elíptico en media luna. La forma de los ápices vegetativos es de tipo J. Los ejes simples o con ramificación muy variada desde alterna en 2-3 órdenes en las partes altas y medias, abundante, múltiple irregular en las partes altas, abundante o escasa u opuesta o irregular en las partes altas, siempre muy abundante. En la corteza 2-3 capas de células, en vista superficial no se observa agregación de las células corticales y están dispuestas irregularmente (tipo Gelidium). La médula presenta de 5-10 hileras de células de forma circular o subcircular de 16-20 μm de diámetro, 7-24 μm de ancho y 10-37 μm de largo; las paredes celulares pueden ser delgadas o medias con espacios intercelulares medios, grandes o muy grandes. Los filamentos rizoidales se encuentran en médula de escasos a frecuentes y en subcorteza de escasos a frecuentes o sólo en médula de frecuentes a abundantes.

Estructuras reproductivas: Las ramas tetrasporangiales se ubican en las partes altas o laterales de las ramas ordinarias, son ramificadas y ensanchadas como paletas, con márgenes muy dentados o solo son irregulares y con los ápices a veces ensanchados; los soros tetrasporangiales son ovoides irregulares o circulares de 185-450 μm de ancho y 385-550 μm de largo con o sin márgenes estériles

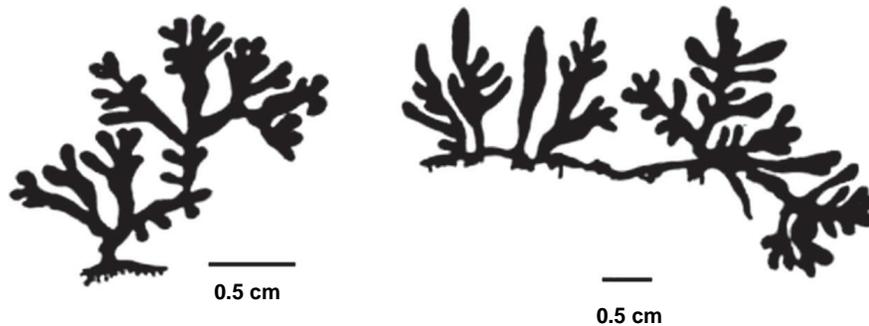
amplios. Los tetrasporangios están dispuestos irregularmente en el soro, son ovoides y miden de 15-35 μm de ancho y 16-45 μm de largo; las tetrasporas se forman por divisiones en cruz. Los gametofitos no fueron observados.

Hábitat: Las plantas se encuentran adheridas a sustratos rocosos, ubicadas en la mesomareal alta y media.

Distribución

Pacífico tropical: Isla Larga, Nay.; Cabo Corrientes, Jal.; Chalacatepec, Jal. Otros registros.- Nayarit: Los Muertos, Sayulita, Isla Larga, 1987/1988; Jalisco: Playitas, Corrales, Colemilla, Manzanillas, Las Cuevas, 1987/1988 (Serviere-Zaragoza *et al.*, 1993a , 1993b).

Morfologías de la especie



Gelidium sclerophyllum Taylor



Allan Hancock Pacific Expeditions, 1945: 156, pl. 5, fig. 13, pl. 33, fig. 2

Localidad tipo: Bahía San Francisco, Esmeraldas, Ecuador (Dawson 1953: 63).

Holotipo: Taylor, 34-489; Feb. 11, 1934; HAHF Sheet 160 (Dawson 1953: 63).

Hábito: Plantas modulares creciendo en céspedes a veces altos, de color morado verdoso en las partes basales, rojo guinda y verde de oscuro a claro en las partes altas, de textura suave cartilaginosa.

Estructuras vegetativas: Ejes postrados cilíndricos formando estolones, con ejes erectos cilíndricos en la base y aplanados arriba, rectos, casi rectos o anchos en las partes altas, con atenuación apical ligera o marcada o atenuación subapical media, con márgenes irregulares, liso-irregulares o lisos. Las dimensiones van de 0.7-2.0 cm de altura, 0.50-1.50 mm de ancho y 0.10-0.30 mm de grueso, con un plano transversal medio ovoide, elíptico, elíptico agudo o elíptico en media luna. La forma de los ápices vegetativos es de tipo F o G. Los ejes son simples o con ramificación múltiple irregular en las partes medias y altas o irregular en todo el eje. En la corteza se presentan 2-3 o 2-4 capas de células, en vista superficial no se observa agregación de las células corticales y están dispuestas irregularmente (tipo Gelidium). La médula presenta de 5-8 hileras de células de forma circular o subcircular de 8-27 μm de diámetro o de 7-16 μm de ancho y 10-24 μm de largo; las paredes celulares pueden ser delgadas o medias con espacios intercelulares grandes o muy grandes. Los filamentos rizoidales se encuentran en subcorteza de frecuentes a escasos y en médula de abundantes a frecuentes.

Estructuras reproductivas: Las ramas tetrasporangiales se ubican en las partes altas de las ramas ordinarias, a veces están ramificadas y ensanchadas en forma de paleta, con ápices no modificados o acorazonados y ensanchados; los soros tetrasporangiales son ovoides irregulares a veces estrangulados de 130-340 μm de ancho y 285-1975 μm de largo con márgenes estériles de angostos

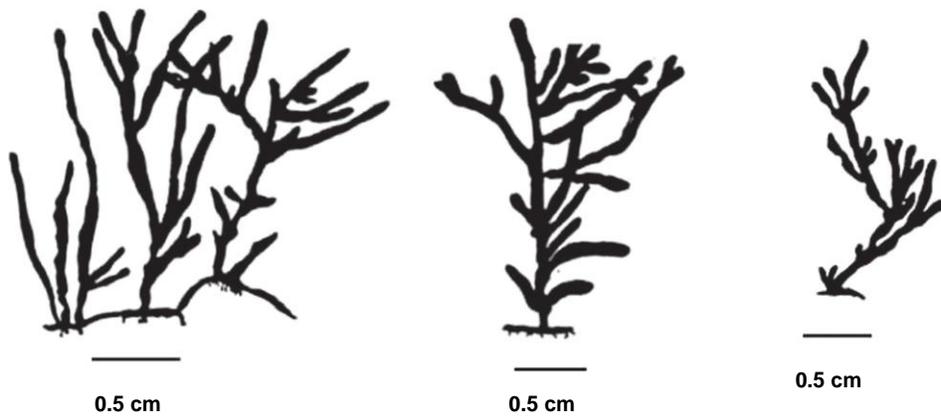
a medianos, en ocasiones se perforan al liberar las tetrasporas. Los tetrasporangios están dispuestos irregularmente en el soro, son ovoides o esféricos y miden de 20-30 μm de ancho, 30-35 μm de largo o 22-38 μm de diámetro; las tetrasporas se forman por divisiones en cruz. Los gametofitos no fueron observados.

Hábitat: Las plantas se encuentran adheridas a sustratos rocosos, y/o a granos de arena, ubicadas en la mesomareal alta, media y baja.

Distribución

Pacífico Tropical: Punta Mita, Nay; Cabo Corrientes, Jal.; Chalacatepec, Jal.; La Ropa, Gro; Santa Elena, Oax. Otros registros.- Nayarit: Sayulita; Jalisco: Las Cuevas, Careyeros, 1987-1988 (Serviere-Zaragoza *et al.*, 1993b), Guerrero: Las Cuatas, 1995 (Rodríguez y Rivas-Lechuga, 1996).

Morfologías de la especie



Gelidium pusillum (Stackhouse) Le Jolis



Le Jolis, A. (1863). Liste des algues marines de Cherbourg. Mémoires de la Société Impériale des Sciences Naturelles de Cherbourg 10: 5-168, pls I-IV.

Basionimo: *Fucus pusillus* Stackhouse

Sinónimo: *Fucus pusillus* Stackhouse, *Gelidium repens* Okamura, *Acrocarpus pusillum* (Stackhouse) Kützting

Localidad tipo: Sidmouth & Brighton, Inglaterra

Hábito: Plantas modulares creciendo en céspedes de color rojizo, rojo vino, morado verdoso, de textura cartilaginosa suave.

Estructuras vegetativas: Ejes postrados cilíndricos formando estolones, con ejes erectos cilíndricos en la base y subcilíndricos o aplanados arriba, o aplanados todos. Los ejes son rectos, casi rectos o anchos en las partes altas, con atenuación apical de marcada a ligera, con márgenes de lisos a irregulares. Las dimensiones van de 0.10-1.70 cm de altura, 0.10-0.90 mm de ancho y 0.06-0.20 mm de grueso, con un plano transversal en partes medias ovoide o elíptico simple, con extremos agudos o en media luna o romboidal. La forma de los ápices vegetativos es tipo: C, E, F* (* intermedios). Los ejes son simples acintillados, laminares o ramificados; la ramificación es múltiple irregular en las partes medias y altas o irregular en las partes altas, pudiendo presentar ramificaciones dicotómicas irregulares en las partes bajas; en cualquiera de los casos puede ser abundante, frecuente o escasa. En la corteza se presentan 1-2, 2, 2-3 capas de células, en vista superficial no se observa agrupación de las células corticales y están dispuestas irregularmente (tipo *Gelidium*). La médula es muy variable y puede presentar 3-4, 6, 7-8 hileras de células de forma circular o subcircular de 6-21 μm de diámetro o de 2.5-15 μm de ancho y 2.5-25 μm de largo; las paredes celulares varían de gruesas a delgadas con espacios intercelulares desde medios hasta muy grandes. Los filamentos rizoidales son abundantes o frecuentes en la médula y de escasos a abundantes en la subcorteza.

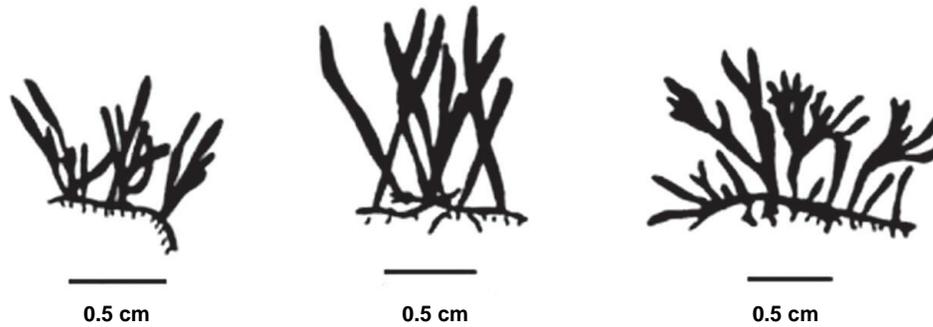
Estructuras reproductivas: Las ramas tetrasporangiales se ubican en las partes altas de las ramas ordinarias, que pueden estar ramificadas. Los ápices están modificados y son más puntiagudos o ensanchados, redondeados y/o acorazonados; los soros son circulares, ovoides, elípticos o irregulares de 160-600 μm diámetro, 75-500 μm de ancho y 125-1125 μm de largo, pueden o no tener márgenes estériles, cuando presentes estos van de amplios a angostos y a veces solo se encuentran restringidos a los ápices. Los tetrasporangios están dispuestos irregularmente, o a veces en líneas horizontales o dispuestos en forma de Vs muy abiertas dentro del soro, son esféricos u ovoides y miden 11-36 μm de diámetro, o 11-47 μm de ancho y 20-40 μm de largo; las tetrasporas se forman por división en forma de cruz. En el gametofito femenino la rama cistocárpica se encuentra en las partes terminales de las ramas ordinarias o en ramas terminales multiramificadas, con el ápice alargado y puntiagudo, las ramas están ensanchadas en la porción fértil, los cistocarpos son biloculares y con un ostiolo en cada superficie de la rama, son ovoides o esféricos de 85-185 μm de ancho, 123-250 μm de largo y 130-336 μm de grueso o 125-390 μm de diámetro. Las carposporas son elípticas, piramidales o en forma de gota alcanzando 8-25 μm de ancho y 35-55 μm de largo. Los gametofitos masculinos no fueron observados.

Hábitat: Las plantas se encuentran adheridas a sustratos rocosos, o a conchas y/o a granos de arena, ubicadas en la mesomareal alta y media.

Distribución

Pacífico Tropical: Lázaro Cárdenas, Mich.; Roqueta, Gro.; Papanoa, Gro; Fuerte San Diego, Gro; Ensenada de los Presos, Gro; La Ropa, Gro; El Yunque, Gro; Santa Elena, Oax; Salina Cruz, Oax; Punta Mita, Nay; Chalacatepec, Jal.; Mezcala, Jal.; Mazatlán, Sin.. Otros registros como *Gelidium pusillum*.- Nayarit: Los Muertos, Sayulita, Isla Larga, 1987, 1988; Jalisco: Playitas, Colemilla, Las Cuevas, 1987, 1988 (Serviere-Zaragoza *et al.*, 1993b). Nayarit (Mateo-Cid y Mendoza-González, 1992); Jalisco (Mendoza-González y Mato-Cid, 1992), Colima (Huerta y Garza Barrientos, 1975), Michoacán (Dreckmann, 1987; Dreckmann *et al.*, 1990), Guerrero (Chávez, 1972), Oaxaca (Galindo-Villegas *et al.*, 1997; Huerta y Tirado, 1970; León Tejera y González-González, 1993). Golfo de California: Dawson (1944).

Morfologías de la especie



Gelidium pusillum es la especie de más amplia distribución en el mundo (aunque recientemente ha sido cuestionada dicha distribución por Freshwater y Ruennes, 1994) y en el continente ha sido reportada desde Oregon, EUA, hasta Panamá; en Hawai, EUA; y desde Iquique hasta Ancud en Chile. Consecuentemente, en el PTM ha sido registrada en Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca.

Esta especie es altamente variable y se distingue de *Gelidium sclerophyllum* y *G. galapagense* por no tener ápices mellados (Dawson, 1961). *Gelidium microphysa* fue incluida en esta especie por carecer de caracteres distintivos, ambas especies presentan rizoides longitudinales e intercalares.

Problemática de las especies del Pacífico Tropical Mexicano (PTM)

Las especies de *Gelidium* presentes en el Pacífico tropical mexicano (PTM), no se ven exentas de la problemática de delimitación taxonómica. Dentro de estas, *Gelidium microdentatum*, *G. pusillum* y *G. sclerophyllum* revelaron similitud de morfos entre las tres especies en fases tempranas, aunque en talos maduros de *G. microdentatum* y *G. sclerophyllum* se reconocen claramente los caracteres segregativos incluidos en las descripciones originales, mientras que en *G. pusillum* hay una extrema variación morfológica (Rodríguez, 1989, Plata y Rodríguez, 1996, Plata *et al.*, 1995; Rivas-Lechuga *et al.*, 1996).

Como se puede apreciar en la Fig. 1, todas presentan una morfología externa semejante, mismo tamaño, mismo color, ramificación muy parecida, ápices semejantes, su crecimiento es en forma de céspedes, entre otras.

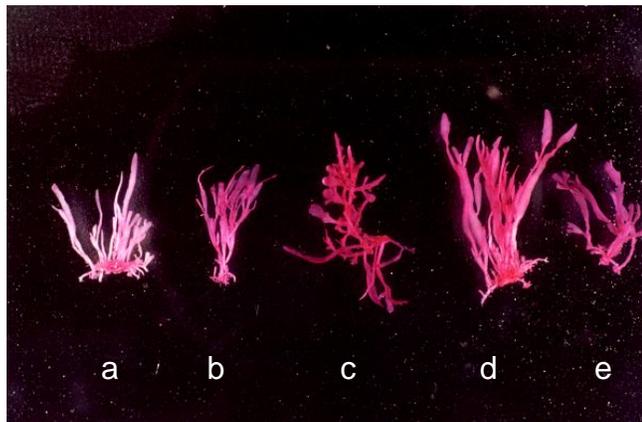
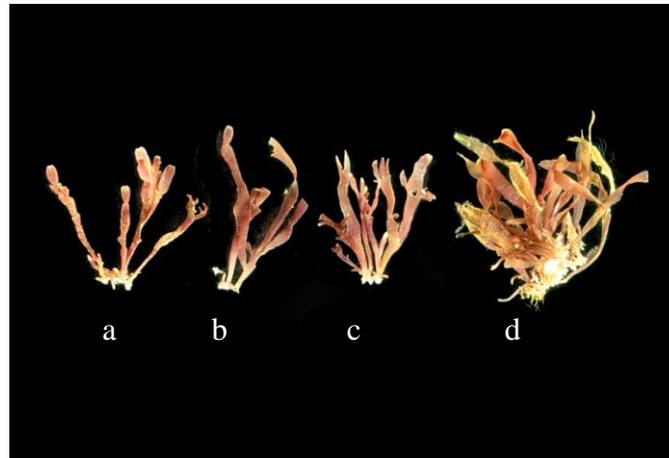


Figura 1.- Ejemplares de: a) *Gelidium crinale* b) *G. galapagense* c) *G. microdentatum* d) *G. pusillum* y e) *G. sclerophyllum*

Se han realizado estudios morfológicos en *Gelidium pusillum* que confirman hasta ahora la diferenciación morfológica de por lo menos 6 entidades dentro de dicha especie que requieren de una más profunda revisión para la confirmación de su estatus taxonómico (Rodríguez y López, en preparación).

Aquí se presentan 4 de los morfos de *Gelidium pusillum* que se han registrado en este estudio (Fig. 2).



G. pusillum: a) Morfo 1



G. pusillum: a) Morfo 2



G. pusillum: a) Morfo 3



G. pusillum: a) Morfo 4

Figura 2.- *Gelidium pusillum*: a) Morfo 1 b) Morfo 2 c) Morfo 3 y d) Morfo 4

La variación morfológica entre los morfos de *G. pusillum* se puede apreciar en la tabla 1, en donde se describe algunos caracteres distintivos.

Tabla 1. Tomada de López, (2001). Descripción de las 4 morfologías de *Gelidium pusillum* en el Pacífico Tropical Mexicano.

Características	Grupo 1 (morfo1)	Grupo 2 (morfo2)	Grupo 3 (morfo3)	Grupo 4 (morfo4)
Forma del Eje principal				
-Porción inferior	cilíndrico	Cilíndrico (corto)	Cilíndrico (largo)	Cilíndrico (largo y corto)
-Porción media	Cilíndrico o subcilíndrico	Complanado	Cilíndrico o subcilíndrico	Complanado
-Porción superior	Cilíndrico o subcilíndrico	Complanado	Complanada	Complanado
-Porción general	Ensanchamiento gradual y a no mas del doble (longilíneo)	Ensanchamiento gradual o abrupto (Mas de 5 veces)	Ensanchamiento gradual (2-3)	Ensanchamiento abrupto (-) o gradual (+) (3-5)
-Margen	Liso	Irregular	Irregular	Liso
-Ápice	Agudo ligero	Redondeado o agudo con o sin atenuación	Agudo ligero a agudo	Redondeado, agudo o lligero
Ramificación				
-Ejes simples	Subcilíndricos acintillados	Acintillados amplios	----	Acintillados-estrechos
-Porción inferior	Irregular	Irregular (opuesta-alterna)-cilíndrica+múltiple	Irregular (alterna)-cilíndrica	Sin
-Porción media	Irregular	Irregular (opuesta-alterna)-complanada	Múltiple-complanada	Irregular o múltiple
-Porción superior	Múltiple	Múltiple-complanada	Múltiple-complanada	Múltiple
Numero PTM	1093,114,2699,3022,3001,3312,3313	106,171,177,442,488,511,561,2732,3048,6362	1068,1093,1503,1510	651,676,1497,1997,2074,2207,3021

Lo antes descrito nos confirma que las especies de *Gelidium* del PTM presentan variabilidad en su morfología externa y un significativo grado de convergencia de morfos entre especies (Santelices, 1978; Stewart, 1984; Rodríguez, 1989; Rodríguez *et al.*, 1993, Serviere-Zaragoza *et al.*, 1993a, 1993b; López, 2001), aunado a esto, la carencia de ejemplares cistocarpicos en las especies de *G. crinale*, *G. pusillum* y *G. galapagense* en las colecciones de herbario y el material recolectado para este estudio.

Por otro lado para estas especies en el PTM se desconoce si presentan el tipo de ciclo de vida "*Polysiphonia*" propuesto para las especies *Gelidium*. En realidad, existen relativamente pocos estudios sobre la historia de vida de las Gelidiales (Macler y West, 1987), hasta hoy sólo existe un reporte de la demostración de la meiosis tetraspórica en *Gelidium latifolium* (Greville) Bornet realizada por Maggs y Rico (1991). Las fases alternantes son isomórficas y en muchas ocasiones coexisten ecológicamente y son indistinguibles a simple vista. En muchas especies hay una predominancia de la fase tetrasporofítica y escasa presencia de la fase gametofítica y en consecuencia del carposporofito, por lo que ha sido difícil confirmar la historia de vida de dichas especies.

Finalmente, podemos resumir que el problema de la descripción taxonómica de las especies de *Gelidium* del PTM, es que todas son de tipo cespitosas y por lo tanto, con morfologías muy semejantes; que todas se presentan en el intermareal rocoso, bajo las mismas condiciones ambientales; que para algunas especies se desconocen los cistocarpos y/o su estructura interna, por lo tanto, no se sabe si las especies registradas tienen un ciclo de vida como el que se ha reportado para las especies del género.

OBJETIVOS

Objetivo General

Establecer si las diferencias y similitudes genéticas tanto a nivel citogenético como molecular, de las especies de *Gelidium* registradas en las costas del Pacífico Tropical Mexicano, corroboran su estado taxonómico.

Objetivos específicos

- a) Verificar si las fases alternantes (gametofito y tetrasporofito) del ciclo de vida reportado para las especies de *Gelidium*, se expresan en las especies registradas en el PTM.
- b) Descartar que las morfologías coincidentes de las especies de *Gelidium* registradas en el PTM, correspondan a las fases alternantes (gametofito y tetrasporofito).
- c) Establecer el grado de divergencia del patrón de bandeo del DNA (amplificación aleatoria) y su consistencia inter e intra especies de *Gelidium* del PTM.
- d) Certificar que la delimitación de taxones producidos a partir del patrón de bandeo del DNA por amplificación aleatoria (RAPD's), sea consistente con la delimitación producida a partir de las secuencias de nucleótidos de la región espaciadora *rbcL-rbcS* (RuBisCo).

ÁREA DE ESTUDIO

El litoral del Pacífico Tropical Mexicano (Fig.3), se encuentra ubicado en los 20°46' N y 105°33' W y los 14°32' N y los 92°30' W y comprende los estados de Nayarit hasta el sur de Chiapas (*sensu stricto*, es decir, sin considerar la zona de transición que abarca el triángulo formado por Cabo Corrientes, Jalisco; Los Cabos, Baja California Sur y Mazatlán, Sinaloa). La costa pacífica está bordeada por varios sistemas montañosos, paralelos al litoral, dando lugar a una planicie costera relativamente angosta, con un declive pronunciado y un relieve de alto a medio. La morfotectónica del PTM, es del tipo denominado "costas de colisión", la litología está constituida principalmente por rocas metamórficas del Paleozoico (pizarras, gneis y esquistos) y en menor grado por rocas volcánicas del cenozoico (basaltos) y rocas intrusivas del Mesozoico (granito) (García y Falcón, 1980). El tipo de sustrato es muy variable, desde roca sólida en los acantilados y puntas rocosas, grava y cantos rodados, hasta arena de grano medio y fino que se encuentran presentes en las playas, bahías y caletas. El relieve es alto e intermedio, en donde se intercalan costas de acantilados, puntas rocosas y cantos rodados con costas de depositación: playas arenosas, estuarios y lagunas costeras (Tamayo, 1980).

El presente estudio se realizó considerando a los estados de Nayarit-Jalisco, Guerrero y Oaxaca, que corresponden a las secciones norte, central y sur del PTM. Se incluye Nayarit, principalmente Bahía de Banderas, porque se encuentran localidades con una buena representación de las especies tropicales de *Gelidium*; y se excluye Chiapas porque presenta un litoral principalmente arenoso con una muy baja incidencia de especies algales en general y sin registro de Gelidiales.

Nayarit se encuentra localizado al sur de la Sierra Madre Occidental y en la llanura costera del Pacífico, el litoral es bajo en el norte, en donde se encuentran las lagunas Teacapan, Agua Brava y Mezcatitlán y el estero de Camichín, así como las bahías de San Blas y Jaltemba ubicadas al sur del río Santiago. Punta Mita es la parte que limita el extremo norte de Bahía Banderas. El clima en la llanura costera es cálido subhúmedo (García, 1988).

Jalisco se ubica al suroeste de la altiplanicie mexicana, con vertientes australes de las sierras de Zacatecas u occidentales del eje neovolcánico, su litoral es acantilado y rocoso, con la presencia de pequeñas playas arenosas en la desembocadura de los ríos. A Jalisco le pertenece la parte sur de bahía Banderas, en donde se encuentra Puerto Vallarta. El clima en la llanura costera es cálido subhúmedo (García, 1988).

En estos estados se trabajó la región denominada Bahía de Banderas (Fig. 4) se encuentra ubicada entre punta Mita, Nayarit ($20^{\circ} 46' N$ y $105^{\circ} 33' W$) al norte y Cabo Corrientes, Jalisco ($20^{\circ} 24' N$ y $105^{\circ} 43' W$) al sur. Tiene una longitud de 48 Km de Este a W y una amplitud de 30 Km de N a S. Las estribaciones norte de la Sierra del Cuale, constituyen su borde sur el cual es elevado y abrupto, interrumpido por algunos valles y playas, en donde desembocan algunos arroyos, el río Ameca desemboca en la porción noreste, la cual es baja, plana y arenosa. La porción norte es de tipo rocosa, debido a que las estribaciones de la Sierra de Vallejo, se aproximan a la costa, en su parte este se encuentra Puerto Vallarta. La bahía alcanza profundidades de 80 m, esta región se encuentra influenciada por dos sistemas de corrientes; la corriente de California de aguas frías y baja salinidad y la corriente Norecuatorial de agua caliente y salinidad intermedia, por lo que se le considera una zona de transición (INEGI, 1997)

La sección central del PTM, corresponde al estado de Guerrero. Su litoral se encuentra al SW de la República Mexicana, ubicado entre los $16^{\circ} 18'$ y $18^{\circ} 48'$ de latitud N y $98^{\circ} 03'$ y $102^{\circ} 12'$ de longitud W, la línea de costa tiene una extensión de 485 Km y cuenta con una superficie de 63 794 Km². Siguiendo el borde litoral del Estado se desarrolla un sistema montañoso abrupto, la Sierra Madre del Sur, que cruza al estado de Guerrero en dirección NW a ESE, dando lugar a una planicie costera relativamente estrecha. Presenta pocos accidentes litorales de importancia relativa como las bahías de Acapulco, Zihuatanejo y Puerto Marques, así como las Islas de Ixtapa, en Zihuatanejo y La Roqueta en Acapulco. Su clima es cálido subhúmedo (Fig. 5) (García, 1988).

La sección sur del PTM, corresponde al estado de Oaxaca. Su costa se localiza entre los $15^{\circ} 58'$ y los $16^{\circ} 2' N$ y los $97^{\circ} 47'$ y los $94^{\circ} 3' W$. Se encuentra en la parte sur de la Sierra Madre del Sur. Gran parte de su litoral es bajo y arenoso, con numerosas formaciones rocosas y lagunas costeras como la de Chacahua en el oeste y el complejo lagunar formado por laguna Superior, laguna Inferior, laguna Oriental y mar Muerto en el este. Presenta zonas de acantilados de escasa elevación que alternan con bahías pequeñas como la de Puerto Ángel y las de bahías de Huatulco (Fig. 6), así como varias desembocaduras de ríos y arroyos como el Cocolotepec, el Copalita y el Tehuantepec. Presenta un clima cálido subhúmedo. Dentro del litoral destaca el istmo de Tehuantepec, por la interrupción de la Sierra Madre del Sur y el estrechamiento que sufre el continente en esta zona permite el paso de vientos provenientes del Golfo de México (García, 1988)



Fig. 3 Área de estudio (Google Earth)

En la Tabla 2 se muestra la ubicación geográfica, nombre de las playas y los mantos poblacionales de *Gelidium*, colectados en la zona intermareal del PTM.

Tabla 2. Ubicación geográfica de las localidades de colecta, Nayarit –Jalisco, Guerrero y Oaxaca.

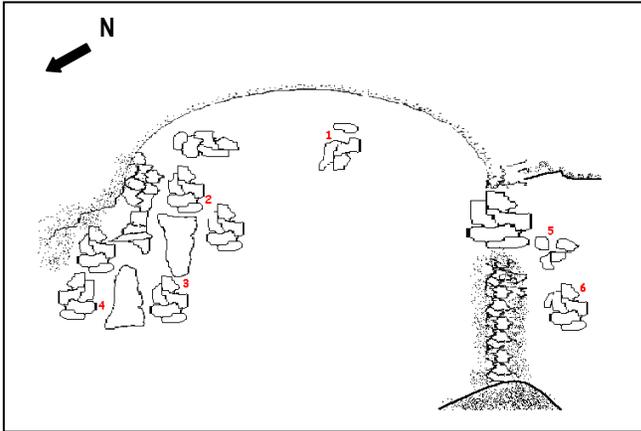
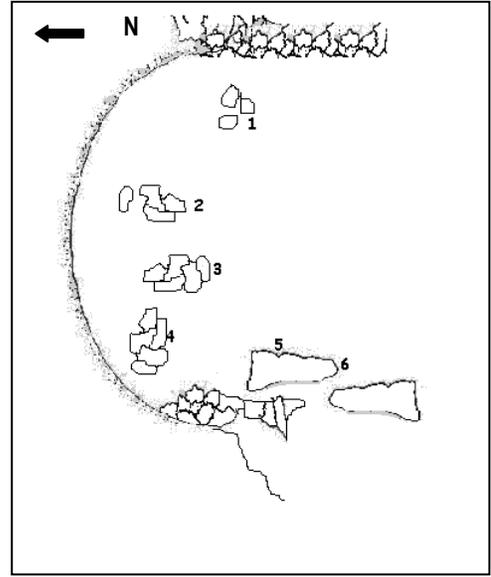
LOCALIDAD (PLAYAS)	UBICACIÓN GEOGRÁFICA	MANTOS POBLACIONALES	ESPECIE
NAYARIT-JALISCO			
"La Manzanilla" (Cruz de Huanacastle)	20°44'41"N-105°23'52"W	1	<i>Gelidium pusillum</i>
		2	<i>Gelidium microdentatum</i>
"Punta Mita"	20°46'26.58"N-105°32'11.58"W	1	<i>Gelidium microdentatum</i>
		2	<i>Gelidium microdentatum</i>
		3	<i>Gelidium microdentatum</i>
		4	<i>Gelidium microdentatum</i>
		5	<i>Gelidium microdentatum</i>
		6	<i>Gelidium microdentatum</i>
"Sayulita"	20 52'29"N-105 26'72"W	1	<i>Gelidium pusillum</i>
		2	<i>Gelidium pusillum</i>
		3	<i>Gelidium pusillum</i>
		4	<i>Gelidium pusillum</i>
"Los Muertos"	20 52'29"N-105 26'72"W	1	<i>Gelidium microdentatum</i>
		2	<i>Gelidium microdentatum</i>
		3	<i>Gelidium pusillum</i>
GUERRERO (Zihuatanejo)			
"Playa Quieta"	17°40'21.3"N 101°38'33.9"W	1	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
		2	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
		3	<i>Gelidium galapagense</i>
		4	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
"Extremo Norte de Playa Las Cuatas"	17°40'01"N 101°37'52"W	1	<i>Gelidium galapagense</i>
		2	<i>Gelidium galapagense</i>
		3	<i>Gelidium galapagense</i>
		4	<i>Gelidium galapagense</i>
Cuatas1 Entrecuatas Cuatas 2	17°40'01"N 101°37'52"W	1	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
		2	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
		3	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
		4	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
		5	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
		6	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
Troncones	17°46'48"N & 101°43'31"W	1	<i>Gelidium crinale</i>
OAXACA			
"Bahía La Entrega"	15° 45' 35" N y 96° 07' 38" W	1	<i>Gelidium pusillum</i> (morfo 1)
		2	<i>Gelidium pusillum</i> (morfo 2)
		3	<i>Gelidium pusillum</i> (morfo 3)
		4	<i>Gelidium crinale</i>
"Bahía Maguey"	15° 43' 59" N y 96° 08' 04" W	1	<i>Gelidium pusillum</i> (morfo 1)
"Playa El Panteon "	15° 39' 56" N y 96° 29' 42" W	1	<i>Gelidium pusillum</i> (morfo 1)
		2	<i>Gelidium pusillum</i> (morfo 1)
"Playa Los Muertos "	15° 39' 56" N y 96° 29' 42" W	1	<i>Gelidium pusillum</i> (morfo 1)
"Zipolite"	15° 39' 46" N y 96° 31' 20" W	1	<i>Gelidium pusillum</i> (morfo 4)
		2	<i>Gelidium pusillum</i> (morfo 4)
		3	<i>Gelidium pusillum</i> (morfo 4)
		4	<i>Gelidium pusillum</i> (morfo 4)
"Puerto Escondido" (región media)	15° 51' 00" N y 97° 03' 00" W	1	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
		2	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
		3	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
		4	<i>Gelidium sclerophyllum</i>
"Puerto Escondido" (muelle)	15° 51' 00" N y 97° 03' 00" W	1	<i>Gelidium pusillum</i> (morfo 2 y 4)

NAYARIT-JALISCO



Punta Mita, Nay.

La Manzanilla, Nay.



Sayulita y Playa "Los Muertos", Nay.

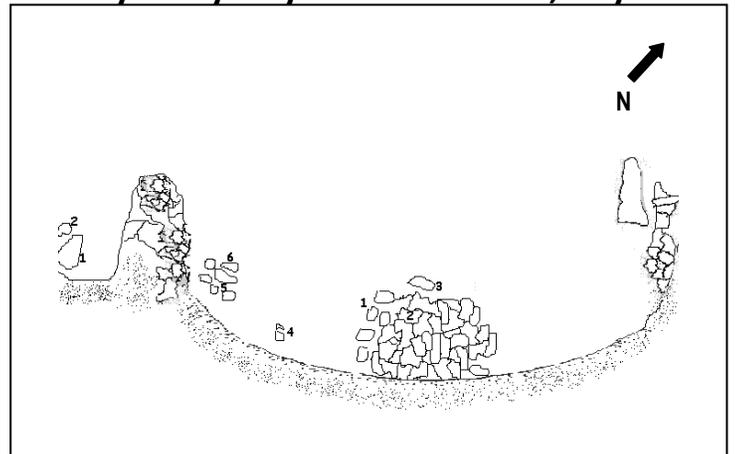


Fig. 4 Playas de colecta en Nayarit-Jalisco, indicando la ubicación de las diferentes poblaciones.

GUERRERO

Playa "La Cuatas"



Cuatas I



Entre Cuatas



Cuatas II



Cuatas II

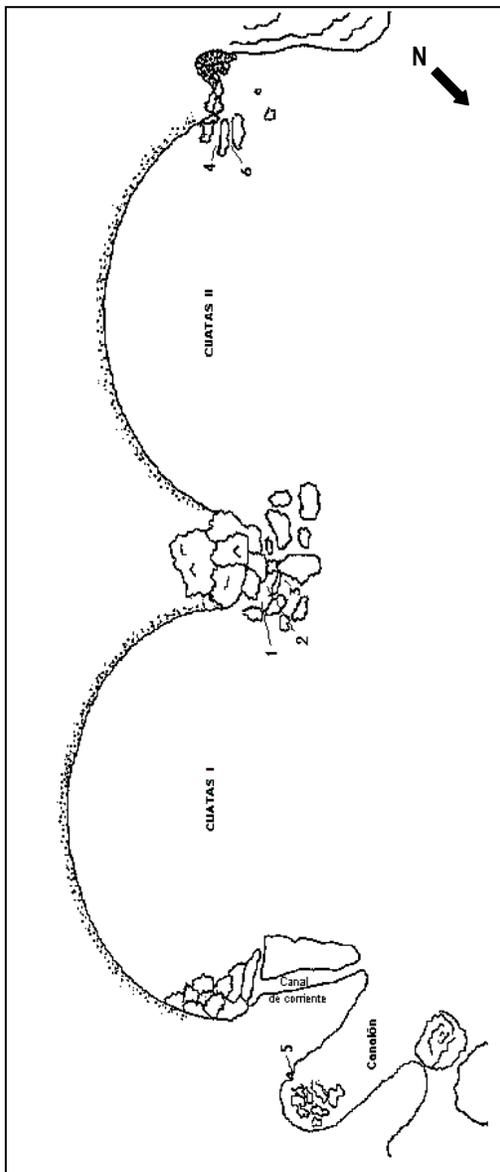
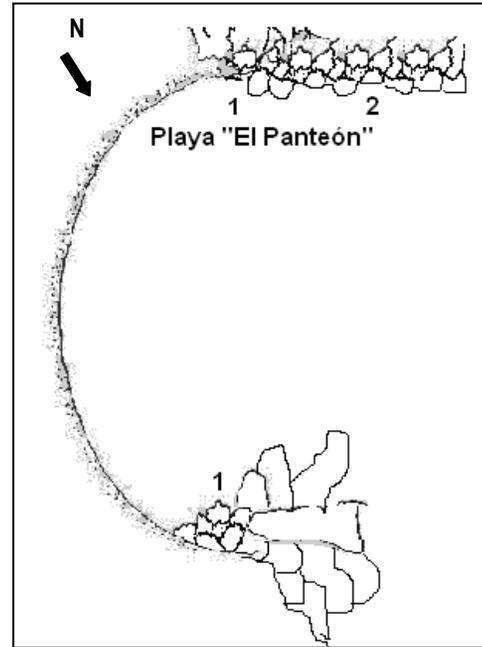


Fig. 5 Playas de colecta en Guerrero, indicando la ubicación de las diferentes poblaciones.



Bahía "Maguey", Huatulco



Bahía "La Entrega", Huatulco

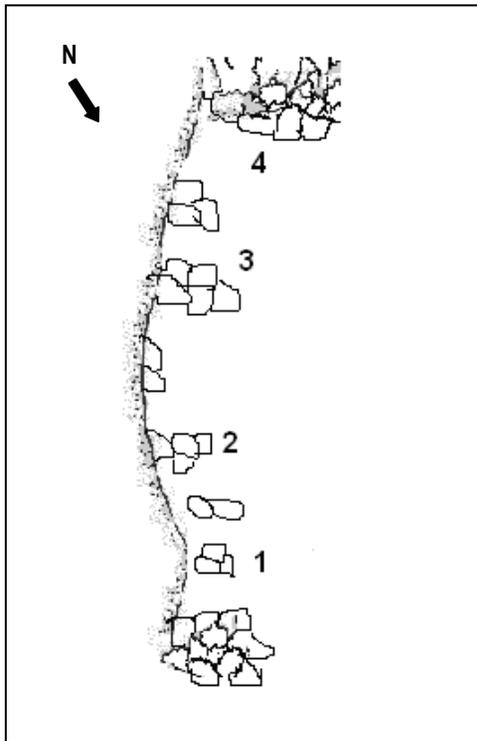
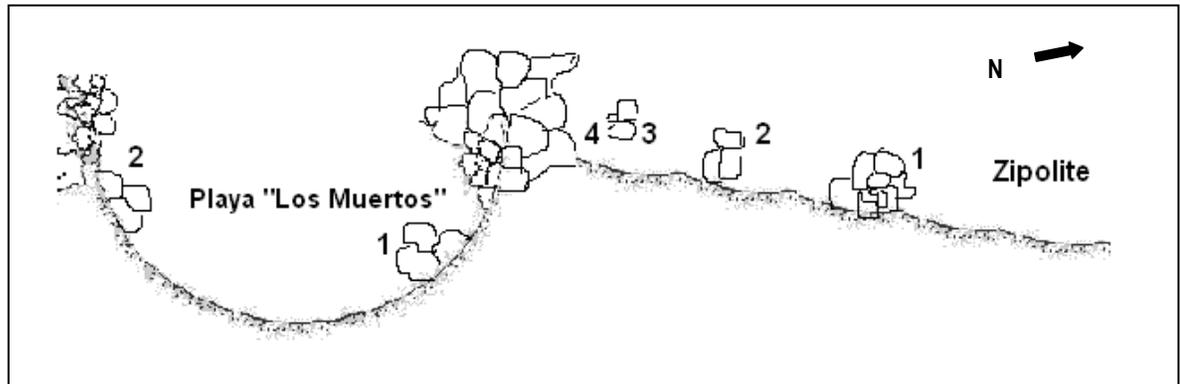


Fig. 6. Playas de colecta en Oaxaca, indicando la ubicación de las diferentes poblaciones.



Zipolite, Puerto Ángel



Puerto Escondido

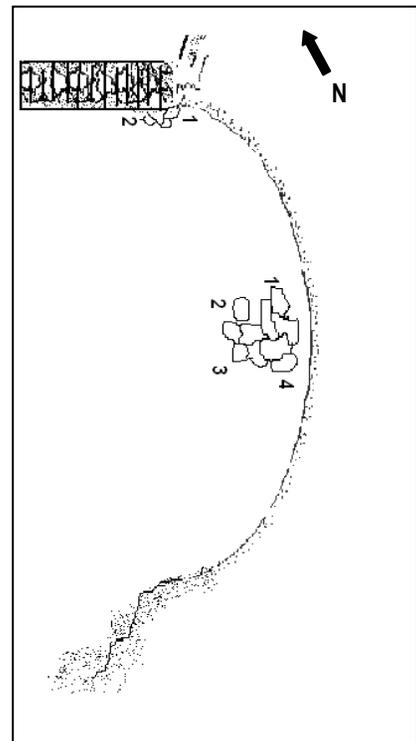


Fig. 7. Playas de colecta en Oaxaca, indicando la ubicación de las diferentes poblaciones.

CAPITULO 2
CITOGENÉTICA

INTRODUCCIÓN

La citogenética se define como una disciplina biológica que estudia los fenómenos de la herencia en relación con la dotación cromosómica de la célula; estudia el número y morfología de los cromosomas con respecto de su transmisión genética, así como todas las partes de la célula que directa o indirectamente intervienen en la genética a nivel celular (Robles, 1982). Cada especie posee un número de cromosomas propio que caracteriza a la especie, de ahí que la importancia de los estudios sobre cromosomas pueda ser en dos aspectos: sus características morfológicas pueden ser empleadas en la clasificación de especies y segundo, aclarar estudios genéticos y evolutivos en la formación de especies (García, 1977).

Los estudios citogenéticos dentro de las algas bentónicas marinas han sido considerados importantes y necesarios para la comprensión de historias de vida y han aportado valiosos datos corroborativos en los estudios taxonómicos y sistemáticos de varias especies, han contribuido al entendimiento de la biología reproductiva de las algas y se han utilizado para representar historias de vida, determinar apomeiosis, apomixis (partenogénesis y apogamia) e incrementos espontáneos en el número cromosómico (autopoliploidías) (Lewis, 1996).

Los estudios cariotípicos proveen información sobre variaciones en el número y la morfología de los cromosomas y gracias a ellos se han detectado translocaciones, inversiones, fusiones, deleciones y no disyunciones que con frecuencia proveen de valiosos indicios sobre los procesos y tendencias evolutivas en organismos superiores. Dentro de las Rhodophyta, resulta difícil describir estos fenómenos pero no imposibles, se ha propuesto la presencia de fenómenos tales como: deleción en *Porphyra rosengurtii* Coll et Cox (Kapraun y Freshwater, 1987) y fusión seguida de una no-disyunción en *Bangia vermicularis* Harvey (Cole et al., 1983).

En las especies de algas rojas estudiadas en diversas regiones del mundo, se conocen muy pocos cariotipos que incluyan las diferentes medidas de los cromosomas y la posición del centrómero el cual se observa durante la mitad de la profase porque los cromosomas de las algas rojas son muy pequeños, alcanzando dimensiones que van de 0.25 μm a 3.5 μm (Rao, 1971; Del Grosso, 1981; Cole, et al., 1983; Kapraun y Freshwater, 1987), en comparación por ejemplo, con los cromosomas mitóticos de las plantas superiores y de especies de Chlorophyta, que miden de 6 a 10 μm (Stebbins, 1976).

El primer reporte que se tiene sobre estudios citogenéticos en Rhodophyta data del año de 1904 con los estudios de Wolfe sobre la especie *Nemalion helminthoides* (Vellay) Batters

(como *N. multifidum*) quien encontró que presentaba un número cromosómico de $n=8$ y $2n=16$; posteriormente Yamanouchi (1906) determinó el número cromosómico de la especie *Polysiphonia flexicaulis* (Harvey) Collins (como *P. violacea*) de $n=20$ y $2n=40$; Lewis en 1909 dio a conocer los números cromosómicos de *Griffithsia globulifera* Harvey et Kützing (como *G. bornetiana*), $n=7$ y $2n=14$.

Las primeras listas de números cromosómicos publicadas en especies de Rhodophyta las realizaron Magne (1964) y Dixon (1966); 25 años después Cole (1990), duplicó el número de especies de la lista, lo que indica un incremento en el interés por los estudios citogenéticos de estos organismos. En síntesis, se puede establecer que el número cromosómico haploide de las especies de Rhodophyta, varía desde $n=2$ en Porphyridiaceae (Porphyridiales) y Bangiaceae (Bangiales) hasta $n=68-72$ en Polyideaceae (Gigartinales) y eran prácticamente desconocidos datos para especies de Acrochaetales, Bangiales, Batrachospermales, Compsopogonales, Gelidiales, Nemaliales, Porphyridiales y Rhodochaetales. No fue sino hasta 1999, que se realizó un estudio bibliográfico actualizando la información propuesta por Cole (1990), en 9 años hubo un incremento en estudios cariológicos de 76 especies (Ponce-Márquez, 1999).

Dentro de la clase Bangiophyceae, (Rhodophyta), las investigaciones genéticas sobre *Porphyra* han sido numerosas (Mumford y Cole, 1977; Coll y Oliveira, 1977; Kapraun y Freshwater, 1987; Tseng y Sun, 1989; Kapraun *et al.*, 1991; Lindstrom y Cole, 1992).

Krishnamurthy (1984), enfatizó la importancia de considerar el número cromosómico como un carácter taxonómico, que en varias ocasiones, ha ayudado a deslindar similitudes muy estrechas entre especies de *Porphyra*, como ocurrió en el caso de las especies que habitan en el Pacífico Noreste, que son muy semejantes morfológicamente, pero difieren en el número cromosómico: *Porphyra abbotiae* Krishnamurthy tiene $n=3$, *Porphyra perforata* Agardh $n=2$, *Porphyra lanceolata* Miura $n=3$ y *Porphyra pseudolanceolata* Krishnamurthy $n=5$ (Mumford y Cole, 1977). Asimismo, en el género *Bangia* se han reconocido asociaciones estrechas a través de los estudios citogenéticos entre algunas de las especies (Kapraun *et al.*, 1991).

De la clase Florideophyceae, se pueden mencionar, también, algunos estudios citogenéticos, en géneros de los siguientes órdenes: Ceramiales (Cole, 1990), Gigartinales, (McLachlan *et al.*, 1977; van der Meer y Todd, 1977; van der Meer, 1981; Patwary y van der Meer, 1983; Yabu y Yamamoto, 1988 y Godin, *et al.*, 1993); así como, en Gelidiales.

Dentro del orden Gelidiales, el género *Gelidium* es el que cuenta con un mayor número de estudios, por ejemplo los realizados por Kapraun y Bailey (1989) quienes cuantificaron en *Gelidium pusillum* (Stackhouse) Le Jolis, el contenido del DNA, encontrando fluctuaciones relacionadas con la alternancia de fases del ciclo de vida de la especie y también determinaron el número cromosómico con un valor de $n=10$ y $2n=20$. Kapraun *et al.*, (1993) realizaron estudios sobre el número cromosómico de las especies *Gelidium americanum* (W. Taylor) Santelices, *Gelidium serrulatum* J. Agardh y *Gelidium floridanum* W. Taylor, siendo éstos $n=12$, $n=10$ y $n=6$ respectivamente.

Carter (1993) realizó el estudio cromosómico de *Gelidium pristoides* (Turner) Kützinger, el número haploide varió de 13 a 17 y el diploide de 28 a 33; otras de las especies que han sido objeto de estudios cariológicos son *Gelidiella acerosa* (Forsskål) J. Feldman *et Hamel* y *Acanthopeltis japonica* Okamura, cuyo número cromosómico es de $n=6$, $2n=12$ y $n=15$, $2n=30$ respectivamente (Kaneko, 1968; Kapraun *et al.*, 1994). Maggs y Rico (1991) determinaron que el número cromosómico de *Gelidium latifolium* (Greville) Bornet *et Thuret* en cultivo de ápices vegetativos del tetrasporofito, es de $2n=58 \pm 4$ y detectaron en el mismo tetrasporofito células con 29 ± 2 cromosomas; los autores determinaron que se trataba de cromosomas meióticos presentes durante el proceso de formación de las tetrasporas.

En México se determinó el número cromosómico de algunas especies de Rhodophyta, *Hypnea johnstonii* Setchell *et Gardner* e *Hypnea pannosa* Agardh cuyo valor diploide fue $2n=10$, *Hypnea spinella* (C. Agardh) Kützinger $2n=8$, en *Ahnfeltiopsis gigartinooides* (J. Agardh) P.C. Silva *et DeCew*, se obtuvo el valor de $n=4$ y el $2n=8$ (Ponce-Márquez *et al.*, 1997), en *Gymnogongrus johnstonii* (Setchell *et N.L. Gardner*) E.Y. Dawson fue de 8 cromosomas, este valor fue considerado indeterminado debido a que el ciclo de vida de esta especie se supone isomórfico y los especímenes trabajados estaban en estado vegetativo, por tal razón careciendo de elementos morfológicos que permitan la definición de la fase cromosómica en la que se encontraba, tetrasporofito o gametofito. Para *Gelidium sclerophyllum* se hizo un estudio estacional de 6 manchones poblacionales y se determinaron 4 cromosomas como el número más frecuente en la especie, sin embargo, se presentaron variaciones entre 3 y 10 cromosomas (Ponce-Márquez, 1999; Ponce-Márquez *et al.*, 2009).

Los datos cromosómicos ofrecen a la sistemática un conjunto de caracteres que le permiten analizar y sentar bases importantes para la delimitación de especies y para la confirmación de historias de vida, en especial, de aquellas especies algales para las que se tienen dudas sobre el ciclo de vida y éste no se ha podido reproducir en cultivo.

OBJETIVOS

- a) Determinación de los números cromosómicos n y $2n$ de *Gelidium crinale*, *G. galapagense*, *G. microdentatum*, *G. pusillum* y *G. sclerophyllum*.
- b) Descripción morfológica de los cromosomas, elaboración de cariogramas y cariotipos de las especies antes mencionadas.

MÉTODO

La colecta se llevó a cabo de manera manual (Knudsen, 1966; Ortega *et al.*, 1993), en la región intermareal media y baja de las zonas rocosas (Tabla 2), desprendiendo las plantas desde la parte basal con una espátula o cuchillo, para incluir las zonas de crecimiento que se requieren para los estudios citogenéticos, como son, los ápices, las estructuras reproductoras y los propágulos. Se tomaron muestras equivalentes a una cobertura de 5 cm².

Los ejemplares se colocaron en bolsas de plástico e inmediatamente se sumergieron en una solución fijadora de etanol-ácido acético glacial 3:1 (Austin, 1959; Kapraun y Freshwater, 1987) durante un período de 12 a 24 hrs; posteriormente fueron colocados en recipientes conteniendo etanol al 70% que sirve como conservador del material hasta su procesamiento en el laboratorio.

El material se identificó en el laboratorio a través de observaciones al microscopio estereoscópico y óptico cuando fue necesario. Para la ubicación taxonómica de las especies se aplicaron los criterios nomenclaturales usados para los registros en México (González-González *et al.*, 1996) y los utilizados por Silva *et al.*, (1996), así como los de la bibliografía disponible, utilizando claves y descripciones taxonómicas (Taylor, 1945; Abbott y Hollenberg, 1976; Candelaria, 1985; Dawes, 1986; Rodríguez, 1989; Silva y DeCew, 1992).

Determinación cromosómica

Los talos utilizados para la obtención de tejido vegetativo presentaron ramas tetrasporangiales a excepción de *G. Sclerophyllum* que presentó talos infértiles y talos con ramas cistocárpicas.

El estudio cariológico se realizó utilizando la técnica de prensado "squash" con orceína aceto-clorhídrica al 2%, descrita por Giménez-Martín *et al.*, (1982) y Kapraun y Freshwater (1987) y para confirmar el número cromosómico se utilizó también la tinción con aceto-hierro haematoxylina-clohidratada (Tseng y Sun, 1989) y con fluorescencia DAPI (4'-6 diamidino-2-fenilindole) (Novaczek *et al.*, 1986).

El material primero se hidrolizó con HCl 1N, por un periodo de 5 a 10 minutos, para ablandar los especímenes, ya que el conservador (alcohol al 70%) endurece los tejidos.

Para el análisis cromosómico se obtuvieron fragmentos de 1 a 2 mm del tejido de las zonas de crecimiento, generalmente procedente de ápices vegetativos y sólo ocasionalmente fueron utilizados fragmentos de ápices en ramas tetrasporangiales y gametangiales. Los fragmentos se colocaron en un vidrio de reloj con orceína acetoclorhídrica, se calentaron sobre la llama de un mechero, hasta antes de que iniciara la salida de vapores; se dejaron enfriar y se repitió ésta operación tres veces más, para una mejor fijación del colorante.

Posteriormente, el tejido se trasladó a un portaobjetos con una o dos gotas de acetorceína sobre su superficie y se le colocó un cubreobjetos. Con la goma de un lápiz se presionó para aplastar el material ("squash") y obtener una sola capa de células que permita la observación de los cromosomas que se teñirán de color rojo-vino.

Se hicieron observaciones al microscopio óptico revisando toda la preparación con el objetivo de 100x aumentos, para detectar células en división y observar los cromosomas. Las preparaciones de buena calidad se montaron con Bálsamo de Canadá.

Una vez seleccionadas las preparaciones se preservaron en forma permanente de la siguiente forma. El portaobjetos se colocó sobre hielo seco hasta que se formó una capa de escarcha sobre su superficie; con una navaja delgada se procedió a desprender el cubreobjetos. La capa de tejido adherida al portaobjetos, se pasó enseguida por un tren de deshidratación, sumergiéndolas en etanol al 50%, al 70%, al 90%, absoluto (100%) y finalmente en xilol. Una vez

que el tejido estuvo perfectamente deshidratado, se le colocó un cubreobjetos al que previamente se le había colocado 1 o 2 gotas de Bálsamo de Canadá (García, 1977).

Determinación del número cromosómico

Se procedió a revisar las preparaciones al microscopio y se seleccionaron las mejores 20 mitosis, por talo, en un total de 10 individuos de cada especie en cada población, se tuvo así, un total de 200 mitosis examinadas de cada población de cada especie y con ellas se determinaron el número modal, lo que proporcionó el número cromosómico de cada especie.

De *Gelidium galapagense* se trabajaron 5 manchones poblacionales, de *Gelidium microdentatum* 11 manchones poblacionales, de *Gelidium pusillum* 18 manchones poblacionales y de *Gelidium sclerophyllum* 13 manchones poblacionales, de los cuales 6 fueron trabajadas estacionalmente, es decir se trabajaron en cuatro épocas del año, obteniéndose dentro de una de estas épocas, ejemplares gametofíticos, cabe mencionar que en todas las especies colectadas se obtuvieron solo ejemplares tetrasporofíticos, confirmando lo que en la literatura mencionan, que es una fase dominante en todo el año.

Determinación del tamaño cromosómico

El tamaño de los cromosomas fue determinado con la ayuda de un objetivo micrométrico. Se obtuvo la longitud del cromosoma de mayor tamaño y el del menor tamaño, en cada una de las 20 mitosis. Se calculó el promedio de los valores obtenidos y de esta manera se obtuvo la longitud del cromosoma más grande y el más pequeño en cada una de las 5 especies estudiadas.

Se seleccionaron las mitosis de mejor calidad encontradas en cada especie, para fotografiarlas en un microscopio Axioskop Mc80 Zeiss. Posteriormente las fotos fueron digitalizadas con un "Scanner" (Macintosh software Adobe photoshop) para realizar un esquema de los cromosomas y elaborar el cariograma y cariotipos de cada especie estudiada.

Asimismo, se tomaron microfotografías con una cámara Nikon y se examinaron usando Adobe PhotoShop 5.5. Se realizó una prueba con el fluorocromo DAPI (4'-6 diamidino-2-phenylindole) (Novaczek *et al.*, 1986), para observar los cromosomas con un epi-iluminador de UV con un microscopio de BX51 equipado con una cámara digital Olimpo DP12.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El número cromosómico que presentaron las especies de *Gelidium* del PTM y el tamaño promedio de los cromosomas se presentan en la tabla 3.

El número cromosómico que presentó *G. crinale* fue de $2n=4$ con un tamaño promedio de $0.5 \mu\text{m}$ (Fig. 8) siendo este el menor tamaño de los cromosomas de las cinco especies, en esta especie no se presentaron ejemplares gametófitos (fase haploide).

En la especie *G. galapagense* se presentaron de 3 a 4 cromosomas siendo 4 el número más común, correspondiendo este valor a la fase diploide (tetrasporofito), el tamaño de los cromosomas es de $0.65 \mu\text{m}$ (Fig. 9) considerado también muy pequeño. De igual manera no se presentó en campo la fase haploide es decir el gametofito.

En la especie *G. microdentatum* el número cromosómico fue de $2n=4$ con un tamaño promedio de $0.7 \mu\text{m}$ (Fig. 10), tampoco se encontraron ejemplares gametofíticos.

El número cromosómico que mostró la especie *G. pusillum* fue de $2n=4$ con cromosomas que presentaron un tamaño promedio de $0.7 \mu\text{m}$ (Fig.11) al igual que *G. microdentatum*, de igual manera careció de ejemplares en fase gametofítica.

Gelidium sclerophyllum fue la única especie en la que se encontraron ejemplares en fases gametofítica y tetrasporofítica, en ambas fases se presentaron variaciones en el número cromosómico de ± 1 , los talos tetrasporofíticos (diploides) mostraron un número modal que fue de $2n= 4 \pm 1$ (Fig. 13a y 13b) esto es, se encontraron células con 3, 4 y 5 cromosomas en el mismo ápice y los talos gametofíticos (haploides) presentaron una variación de $n=2 \pm 1$ (Fig. 12), es decir se presentaron células con 1, 2 y 3 cromosomas, en todos los casos el tamaño promedio de los cromosomas fue de $0.8 \mu\text{m}$ de longitud máxima, siendo estos los cromosomas de mayor tamaño en comparación con el resto de las 5 especies.

La variación de ± 1 cromosoma en células de los talos de *Gelidium sclerophyllum*, se ha registrado ampliamente en estudios previos de algas marinas (Knaggs, 1964; Athanasiadis, 1983; Goff y Coleman, 1986; Maggs y Rico, 1991) y en algas de agua dulce (Ramírez, 2006), incluso con una variación de más de 10 cromosomas (Yabu, 1979; Maggs, 1988), por lo que tampoco resulta excepcional dicha variación. Hay que considerar que la variación mencionada es extrema y significa aproximadamente un 50% del total del genoma, sugiriendo fallas en la división mitótica, lo

que parece poco razonable; por lo que los datos de la variación en el número cromosómico, podría ser sólo aparente y debida a limitaciones técnicas.

Sin embargo, Maggs y Rico (1991) reportan una variación de ± 2 cromosomas en ejemplares de *Gelidium latifolium* con un número haploide de 29 cromosomas, explicando que esto sucede como una alternancia de eventos aneuploides y poliploides, como los propuestos para otros grupos algales (Ulvales en Kapraun y Bailey, 1992). Guerra, (2000) afirma que este tipo de variaciones en el número cromosómico no tiene implicaciones evolutivas claras más allá del nivel de especie. Como resulta evidente, el significado biológico de la variación de los números cromosómicos constituye un objeto de estudio actual y en desarrollo que requiere no sólo de mayor cantidad de datos de diferentes especies sino de un replanteamiento del contexto teórico de interpretación de dicha variación numérica de los cromosomas.

Tabla 3.- Número cromosómico haploide (n) y diploide (2n), de las especies *Gelidium crinale*, *Gelidium galapagense*, *Gelidium microdentatum*, *Gelidium pusillum* y *Gelidium sclerophyllum*. Tipo de Tejido y Talo: T= Tetrasporifito, G= Gametofito MA= Meristemo apical y TV= Talo Vegetativo

ESPECIE	TIPO DE TEJIDO	NÚMERO n	CROMOSÓMICO 2n	Tamaño Promedio μm
<i>Gelidium crinale</i>	T.V., MA, T	-	4	0.5
<i>Gelidium galapagense</i>	T.V., MA, T	-	4 y 3	0.65
<i>Gelidium microdentatum</i>	T.V., MA, T	-	4	0.7
<i>Gelidium pusillum</i>	T.V., MA, T	-	4	0.7
<i>Gelidium sclerophyllum</i> (Talo erecto)	T.V., T, MA, G.	2±1 1, 2,3	4±1 (3,4,5)	0.8
<i>Gelidium sclerophyllum</i> (Talo postrado)	T, MA	-	4 y 3	0.8

Los cariotipos y cariogramas de cada especie se presentan en las figuras 8-13 (la posición de los cromosomas homólogos es vertical).

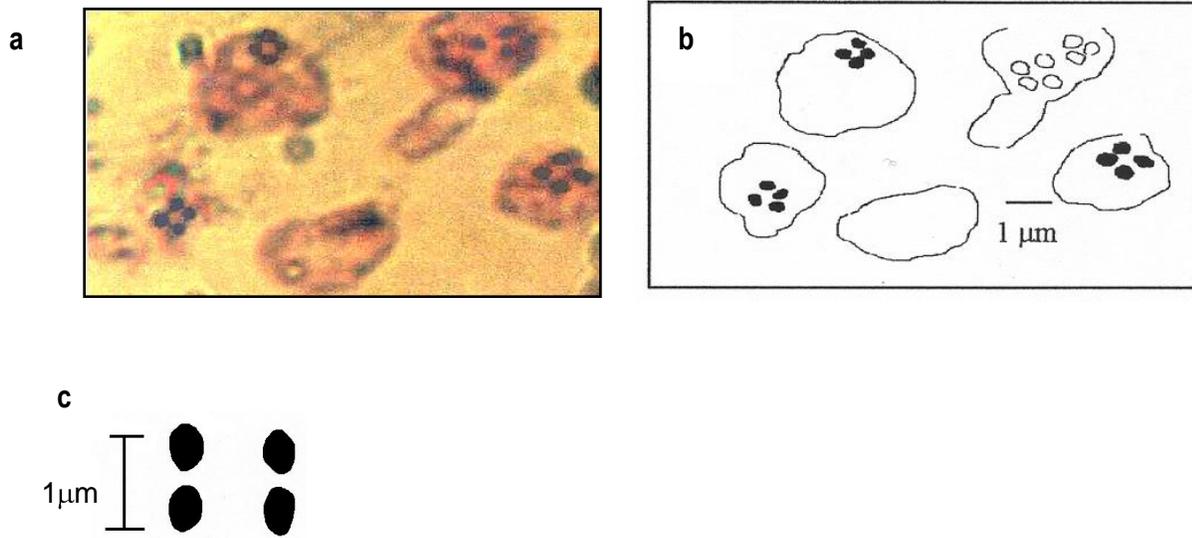


Fig. 8 *Gelidium crinale* a) Fotografía de células mitóticas del tetrasporofito (fase diploide $2n=4$); b) Cariograma mostrando los cromosomas delimitados; c) Cariotipo de la especie.

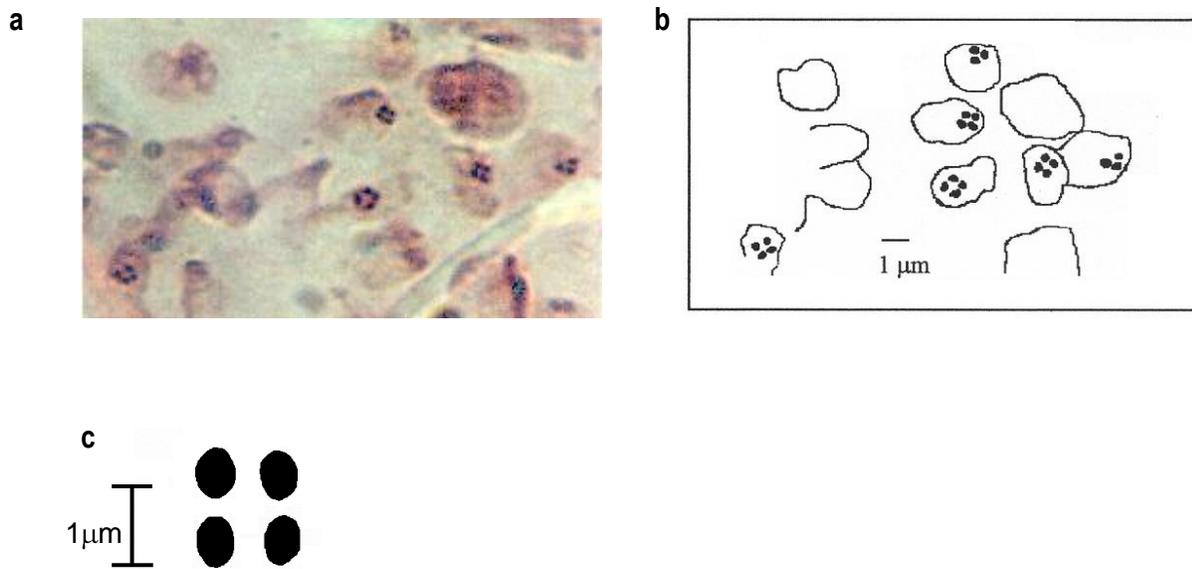


Fig. 9 *Gelidium galapagense* a) Fotografía de células mitóticas del tetrasporofito (fase diploide $2n=4$); b) Cariograma mostrando los cromosomas delimitados; c) Cariotipo de la especie.

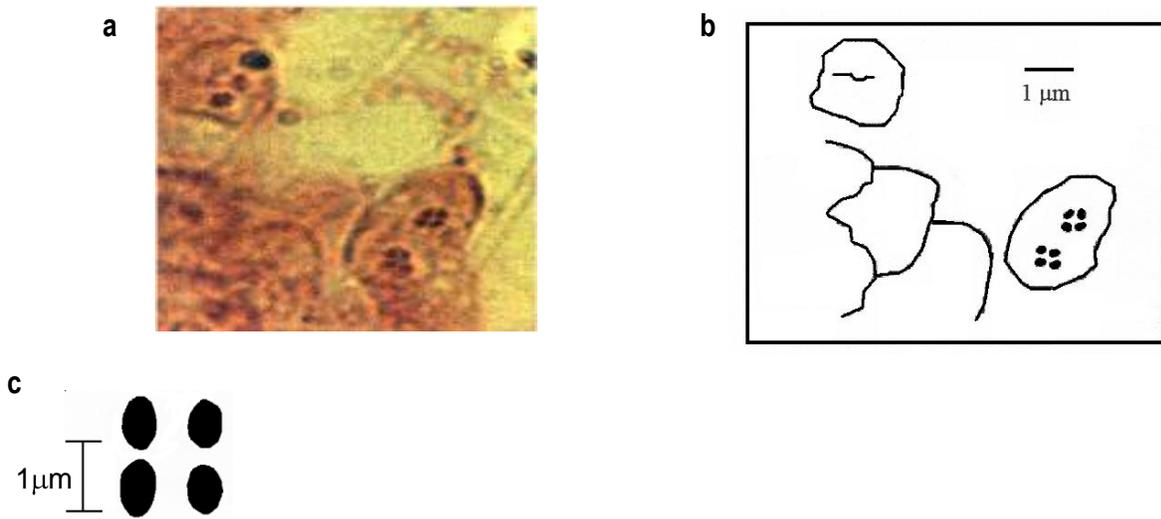


Fig. 10 *Gelidium microdentatum* a) Fotografía de células mitóticas del tetrasporofito (fase diploide $2n=4$); b) Cariograma mostrando los cromosomas delimitados; c) Cariotipo de la especie.

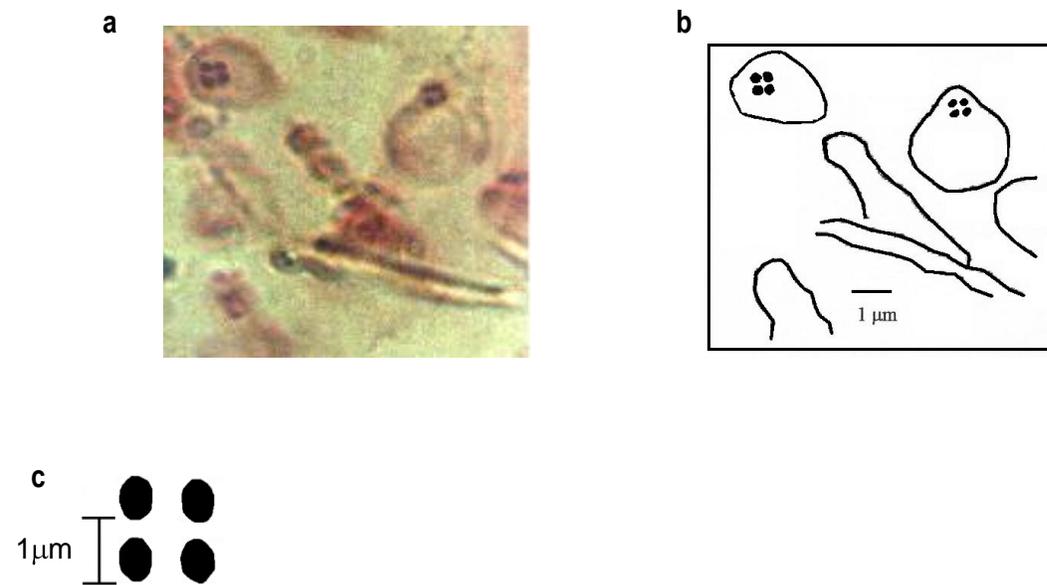


Fig. 11 *Gelidium pusillum* a) Fotografía de células mitóticas del tetrasporofito (fase diploide $2n=4$); b) Cariograma mostrando los cromosomas delimitados; c) Cariotipo de la especie.

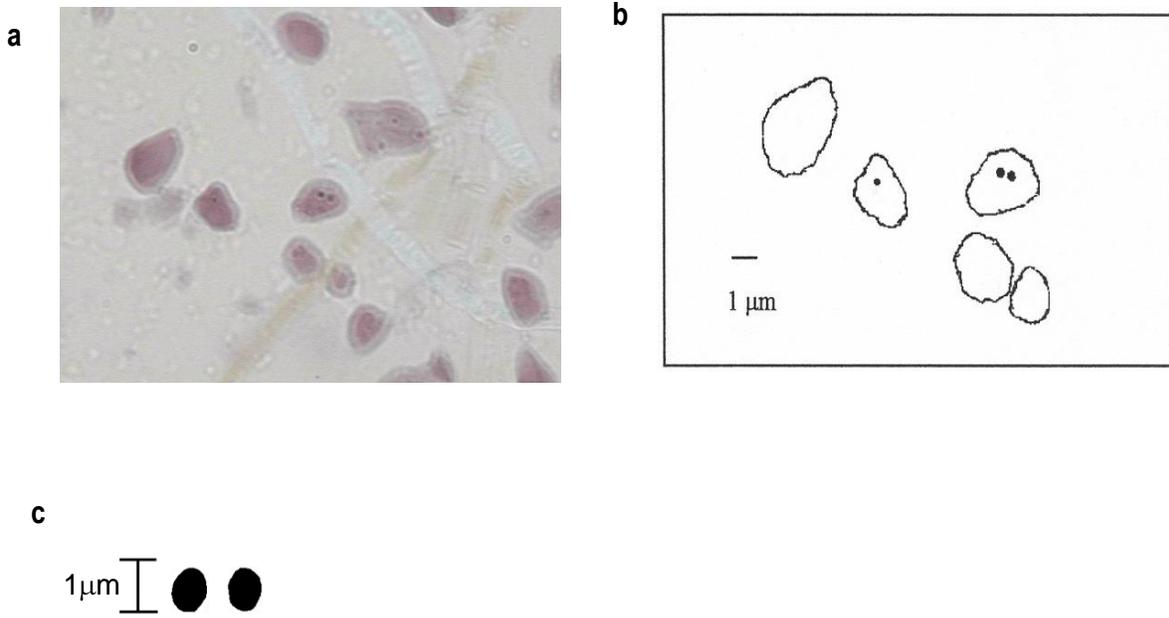


Fig. 12 *Gelidium sclerophyllum* a) Fotografía de células mitóticas del gametofito (fase haploide $n=2$); b) Cariograma mostrando los cromosomas delimitados; c) Cariotipo de la especie.

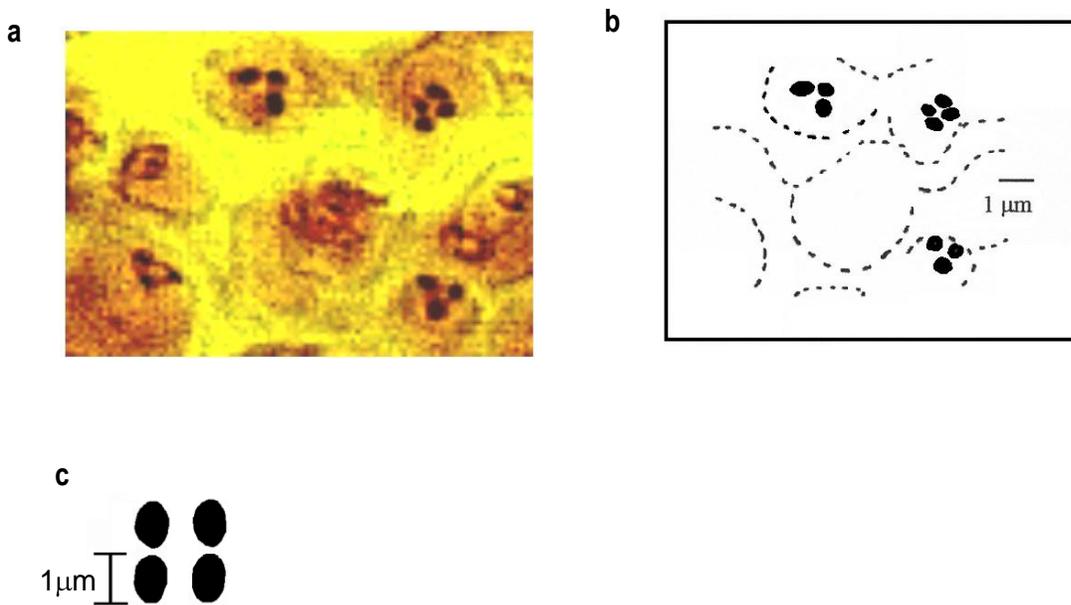


Fig. 13a *Gelidium sclerophyllum* a) Fotografía de células mitóticas del tetrasporofito (fase diploide $2n=4$); b) Cariograma mostrando los cromosomas delimitados; c) Cariotipo de la especie.

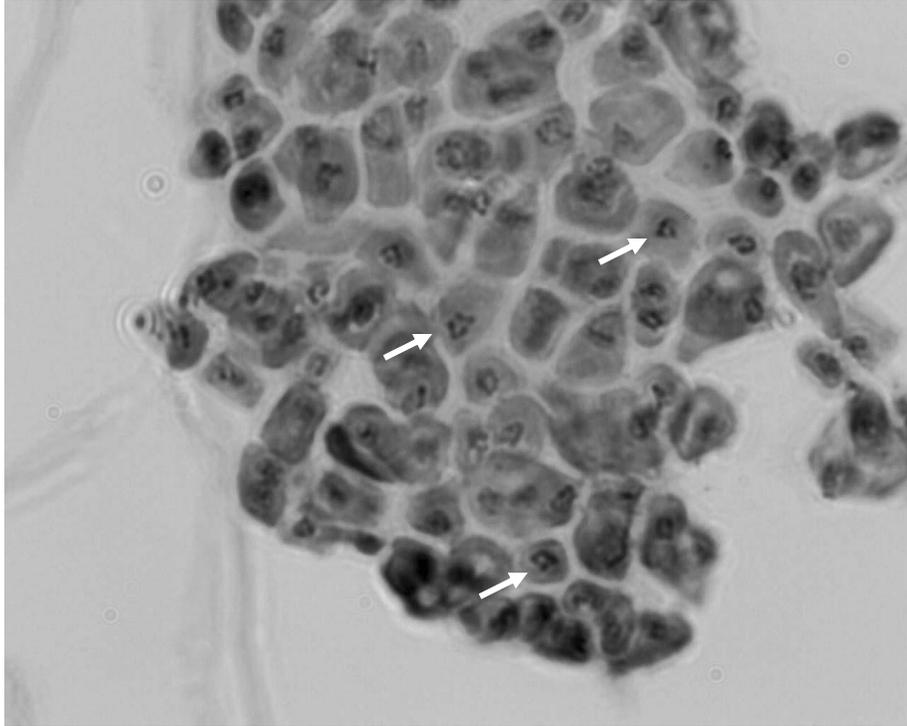


Fig. 13b *Gelidium sclerophyllum* a) Fotografía del tetrasporofito; células mitóticas con 3, 4 y 5 cromosomas.

Con el análisis citogenético se confirmó la alternancia de generaciones "tipo *Polysiphonia*" en *G. Sclerophyllum* donde los talos vegetativos eran los tetrasporofíticos con $2n= 4\pm 1$ y los talos cistocápicos eran los gametofíticos femeninos con $n= 2\pm 1$.

Para el resto de las especies sólo se encontraron talos tetrasporofíticos con el mismo valor de $2n= 4$, que se confirmó con la presencia de tetrasporas. Lo anterior hace suponer que los gametófitos son escasos y que el ciclo de alternancia de generaciones es infrecuente también.

CAPITULO 3

RAPD's
(DNA Polimórfico Amplificado al azar)

INTRODUCCIÓN

La técnica de Amplificación Aleatoria del DNA Polimórfico (RAPD) ha sido ampliamente utilizada en plantas superiores, para establecer diferencias y semejanzas inter e intraespecífica principalmente en especies que se emplean para cultivo. Como por ejemplo los estudios realizados por Baird *et al.*, (1992) quienes utilizando los RAPD's como marcador molecular determinaron la variabilidad genética inter e intraespecífica en especies de papa y algunos híbridos; Yu y Pauls (1993) realizaron una estimación de las relaciones genéticas entre poblaciones de alfalfa, utilizando a los RAPD's como marcador genético; Briand, *et al.*, (1998) con la técnica de amplificación aleatoria de DNA polimórfico, determinaron la variabilidad en poblaciones de frijol *Phaseolus vulgaris* L.; asimismo, se determinó la diversidad genética de la mandarina (*Citrus sp*), a través de análisis moleculares usando RAPD's (Coletta-Filho *et al.*, 1998); Juárez (2001) realizó un estudio para determinar variabilidad genética de dos poblaciones silvestres de *Prosopis laevigata* de gran potencial ecológico y económico en regiones áridas y semiáridas. Mas recientemente, Ramanayake *et al.*, (2007) utilizó los RAPD's en especies de bambú de los géneros *Dendrocalamus*, *Bambusa*, *Gigantochloa* y *Arundianaria* en Sri Lanka, para determinar su diversidad genética.

En el caso particular de las algas existen muy pocos estudios relacionados con los RAPD's, sin embargo, los reportes nos indican que les han sido de gran utilidad en la delimitación intra e inter-específica a través de la determinación de variabilidad genética en las algas. Esta técnica se ha utilizado en varias especies de algas marinas como es el caso de las algas rojas (Rhodophyta) y las algas pardas (Phaeophyta) (Dutcher y Kapraun, 1994; Chai-Ling *et al.*, 1995 a,b; Filipe y Leitão, 1997; Bouza *et al.*, 2006)

De estas últimas se han trabajado con especies del género *Sargassum* (Phaeophyta) cuya expresión fenotípica ha sido muy compleja, lo que ha dificultado la delimitación de las especies. Los investigadores utilizaron los RAPD's para caracterizar las especies *S. polycystum* Grunow y *S. siliquosum* J. Agardh en Malasia, de 31 oligos probados 5 tuvieron los mejores resultados y pudieron con estos determinar la relación específica que resultó en un índice de similitud bajo (Chai-Ling *et al.*, 1995a). Estudio similar fue realizado por los mismos autores (Chai-Ling *et al.*, 1995b) con *S. baccularia* (Mertens) C. Agardh, *S. glaucescens* J. Agardh y *S. oligocystum* Montagne, incluyendo las dos especies anteriores, detectando una extensa variación entre las especies y con un índice de similitud bajo.

En Rhodophyta, Dutcher y Kapraun, (1994) utilizaron tres especies de *Porphyra* (Bangiales); de 10 primer probados, 9 tuvieron resultados positivos, las especies fueron *P. carolinensis* Coll et J. Cox, *P. leucosticta* Thuret y *P. rosengurtii* J. Coll et J. Cox las cuales fueron comparadas genéticamente con *Bangia atropurpurea*, siendo *P. rosengurtii* la que presentó un mayor índice de similitud y la más alejada fue *P. carolinensis*. Asimismo se determinó la variación genética en poblaciones del Báltico, de *Phycodryis rubens* (Linnaeus) Batters (van Oppen et al., 1995). Con respecto a especies de *Gelidium* se cuenta con los estudios de Patwary et al., (1993) y Patwary y van der Meer (1994) quienes utilizan la técnica de RAPD's en *Gelidium vagum* Okamura tratando de identificar híbridos y hacer la caracterización de la especie, en las costas de Canadá, los autores probaron con 165 oligos, compararon los resultados con los obtenidos en *G. latifolium* Bornet et Hauck los cuales mostraron poca similitud en los patrones de bandedo entre ambas especies, por lo que determinaron que el uso de los RAPD's era un buen método, rápido y sencillo para hacer una discriminación entre especies algales y que además permitía conocer relaciones entre especies cercanas; Filipe y Leitão (1997) utilizaron exitosamente la técnica de los RAPD's para investigar el grado de similitud genética de 3 poblaciones naturales de *Gelidium sesquipedale* (Clemente) Thuret al sur de Portugal, probaron 62 oligos de los cuales 41 produjeron bandas y 22 revelaron polimorfismo, encontrando un alto índice de similitud entre las poblaciones más cercanas y muy bajo entre las más lejanas geográficamente y concluyeron que el uso de este método era apropiado para caracterizar la variabilidad genética en especies de importancia comercial. Recientemente Bouza et al., (2006) analizaron 190 gametófitos femeninos en poblaciones naturales de *Gelidium canariense* (Grunow) Seoane-Camba et Haroun, utilizando los RAPD's, para determinar el grado y distribución de la variabilidad genética entre poblaciones de las Islas Canarias, encontrando mayor variabilidad genética en poblaciones presentes en la isla Gran Canaria.

Con los antecedentes podemos observar que realmente han sido pocos los estudios que han utilizado RAPD's como parámetro para medir variabilidad genética en poblaciones naturales en especies de algas marinas (van Oppen et al., 1995), lo que más comúnmente se ha empleado ha sido la técnica de polimorfismo de isoenzimas (Sosa y García-Reina, 1992, 1993), sin embargo, a diferencia de los RAPD's las isoenzimas están limitadas por el pequeño número de loci, muchos de los cuales pueden ser invariables. Es por este motivo que el estudio con los RAPD's sigue siendo una mejor opción, versátil, fácil, rápida y económica para una primera aproximación en la determinación de la variabilidad genética en las algas.

OBJETIVOS

- a) Determinación del DNA polimórfico amplificado al azar (RAPDs) en 4 especies de *Gelidium* y en diferentes morfos de *Gelidium pusillum*.
- b) Evaluación de las similitudes y diferencias de los RAPDs inter e intra especies de *Gelidium* presentes en el PTM.

MÉTODO

Las especies *G. galapagense*, *G. microdentatum*, *G. pusillum* y *G. sclerophyllum* tienen un desarrollo y crecimiento en forma de talos erectos (frondas) desde un sistema basal de ejes postrados que son sujetos al sustrato por rizoides. La colecta se llevó a cabo de manera manual (Knudsen, 1966; Ortega *et al.*, 1993), en la región intermareal media y baja de las zonas rocosas (Tabla 2), desprendiendo las algas desde la parte basal con una espátula o cuchillo. Se tomaron muestras equivalentes a una cobertura de 5 cm² de cada población (Filipe y Leitão, 1997).

El material colectado fue cuidadosamente liberado de arena y de microorganismos de origen animal, se secó con papel secante y colocó en silica gel para mantenerlo lo más seco posible y evitar cualquier contaminación por humedad, los envases fueron etiquetado perfectamente, una vez en laboratorio se colocaron en el ultracongelador Revco a – 80 °C. Se realizaron tres replicas por cada población.

Extracción de DNA

La extracción se llevo a cabo de la siguiente manera (Saunders, 1993 modificada):

1.- El material algal fue colocado por 10 min en HCl 1N y luego se enjuagó con agua bidestilada.

2.- Aproximadamente 500 mg (peso húmedo) de tejido algal fue colocado en un tubo Eppendorf estéril de 2 ml y se le agregó 1.2 ml de amortiguador de extracción [0.1 M Tris-base, pH=8, 0.05 M EDTA (disodium ethylenediaminetetraacetic acid), 0.2 M NaCl, 1% w/v SDS (sodium dodecyl sulphate)] mas 7 µL de proteinaza K (20 mg.mL⁻² solución stock) y se incubó a 40 °C por 3 hrs.

3.-Posteriormente se extrajo la solución y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf estéril, se le agregó un volumen igual (aprox. 600 μ L) de Acetato de Potasio 2.5 M ($KC_2H_3O_2$) y se incubó en hielo durante 20 minutos.

4.-Una vez pasado el tiempo, el tubo es centrifugado a 13 000 rpm por 10 minutos.

5.- Se extrajo el sobrenadante y colocó en un nuevo tubo Eppendorf estéril, a este se le agregó un volumen igual de 25:24:1 fenol (equilibrada con 0.1 M Tris.HCl buffer pH=7.5): cloroformo: alcohol isoamílico. La fase orgánica y la acuosa se mezclan por inversión del tubo en repetidas ocasiones.

6.- El tubo se colocó en la microcentrifuga a 13 000 rpm durante 3 minutos. Se forman 3 fases de las cuales se extrajo la fase acuosa que se ubica en la parte superior del tubo y colocó en un tubo nuevo Eppendorf estéril.

7.- A esta fase acuosa se le añade un volumen igual de 24:1 cloroformo: alcohol isoamílico, se mezcló de nuevo la solución y centrifugó por 3 minutos.

8.- De nuevo se extrajo la fase acuosa y colocó en un tubo nuevo, a esta solución se le agregó un volumen igual de etanol al 95% frío (-20 °C) y se incubó a -20 °C por 24 hrs.

9.- Se tomó el tubo y centrifugó por 20 minutos a 13 000 rpm, se formo un botón blanco (pellet), el alcohol se retira del tubo y se le agrega 300 μ L de etanol al 70% frío (4 °C).

10.-Se centrifugó por 5 minutos después se retiró cuidadosamente el alcohol y se dejo el botón blanco a secar, cuando los vapores del alcohol se han retirado completamente se le agregó 30 μ L de agua libre de nucleasas (PROMEGA). El DNA genómico crudo se guarda a - 20 °C.

Purificación del DNA

Las algas con alto contenido de polisacáridos, tienden a inhibir la reacción de PCR, es por tal motivo que se recomienda hacer una purificación del DNA extraído (Höss y Päävo, 1993). Se preparó un gel de agarosa al 0.8% con el buffer TAE 1X mas 4 μ L de Bromuro de Etidio ($0.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). El DNA se mezcló con el colorante Gene Amp, se colocó en los pozos del gel

aproximadamente 10 μ L y el gel cargado se colocó en la cámara electroforética y se corrió a 100 Amperes durante 40 minutos aproximadamente. El gel se revisó en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) (>300nm). El DNA de alto peso molecular aparece como una banda compacta y el DNA degradado y RNA se presentó como un barrido de banda al final del carril.

Se cortó la banda en donde se encuentra el DNA de alto peso molecular y se colocó en un tubo Eppendorf estéril, luego se purificó con el Kit de Gene clean (purificación con un polímero de sales de sílice, con mínima pérdida de DNA). El uso del "Gene Clean" se basa en la unión del DNA a una matriz de sílice, la matriz es lavada dos veces para eliminar contaminaciones y restos celulares que podrían inhibir reacciones de amplificación PCR, finalmente se recupera el DNA con un buffer de baja concentración salina o con agua libre de sales.

El producto final de la purificación se pasa de nuevo a través de un gel de agarosa y se observa la misma banda de DNA de alto peso molecular pero libre de la señales de RNA's y DNA degradado.

Amplificación RAPD-PCR

(Patwary *et al.*, 1993; Filipe y Leitão, 1997, 1999) técnica modificada

El DNA de alto peso molecular purificado de cada una de las 4 especies trabajadas (excepto *G. crinale*) es utilizado para la amplificación con RAPD. Los oligos que fueron utilizados son OPA 02 **TGCGGAGCTG** (G+C 70 %) y OPA 04 **AATCGGGCTG** (G+C 60%).

La amplificación se llevó a cabo en 25 μ L de volumen que contuvo 2.5 μ L 10X *Taq* DNA polimerasa buffer (100 mM Tris-HCl pH=9.0, 500 mM KCl), 150 μ M de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 5 pmol de los oligos (OPA02 y OPA04), 1.2 mM de MgCl₂, 1.0 unit de *Taq* DNA polimerasa y 7 μ L de DNA genómico.

Se utilizaron tubos para PCR, los cuales fueron colocados en el amplificador Gene Amp PCR System 2400 Perkin Elmer. Programado de la siguiente manera: 1 ciclo de desnaturalización 95 °C por 1.5 minutos, 35 ciclos de amplificación 94 °C por 30 segundos, 36 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y por ultimo un ciclo a 72 °C por 10 minutos.

Los productos de PCR fueron revelados por electroforesis en un gel de poliacrilamida (2.4 ml poliacrilamida, 2.35 ml de H₂O bidestilada, 1.2 ml TBE 5X, 120 μ L de Persulfato de Amonio al 10%, 2.1 Temed) 7 μ L del producto de PCR mas 3.5 μ L de azul de bromofenol se corrió a 113

volt por 40 minutos. Se utilizo el marcador ϕ x174RF DNA/HaeIII. Las corridas se hicieron por triplicado.

Análisis de datos

Con los datos obtenidos se hizo una matriz de los datos de presencia y ausencia de bandas claras definidas generadas para cada uno de los oligos. Los datos fueron computarizados usando el programa de Coeficiente de Similitud Nei y Li (1979)

$$F=2n_{xy}/(n_x+n_y)$$

En donde n_x es el numero total de fragmentos de DNA (bandas) de la especie o población **X**, n_y es el numero total de fragmentos de DNA (bandas) de la especie o población **Y** y n_{xy} es el numero de fragmentos de DNA que son idénticos en las dos especies o poblaciones **X** y **Y**. Un valor de $F= 1.00$ indica que las dos poblaciones son idénticas (Chai-Ling, *et al.*, 1995b).

Con los datos de los RAPDs, obtenidos con OPA02 y OPA04, se construyeron los dendogramas usando el análisis de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair-group Method using arithmetic Averages) método de ligamiento promedio en el cual define la proximidad entre dos agrupamientos como el promedio entre todos los pares de las OTU "unidad taxonómica operacional" en este caso las bandas bien definidas, conforman los agrupamientos (Romesburg, 1984). Se utilizó el programa MEGA 4.0.2 para el análisis de UPGMA con Bootstrap de 1000 replicas, uno para OPA02, otro para OPA04 y en el tercero se utilizaron los datos obtenidos de ambos oligos (dendograma concenso).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 10 oligos de la serie OPA fueron probados utilizando DNA de 15 muestras de cada especie de *Gelidium*, los oligos fueron:

OPA 01 (CAGGCCCTTC), OPA 02 (TGCCGAGCTG), OPA 03 (AGTCAGCCAC), OPA 04 (AATCGGGCTG), OPA 07 (GAAACGGGTG), OPA 09 (GGGTAACGCC), OPA 10 (GTGATCGCAG), OPA 13 (CAGCACCCAC), OPA 16 (AGCCAGCGAA), OPA 18 (AGGTGACCGT).

De los cuales solo 2 oligos OPA 02 (G+C 70%) y OPA 04 (G+C 60%) generaron productos amplificados reproducibles. Los fragmentos de DNA amplificados en el presente estudio se encuentran con un valor entre 872-194 bp (Fig.14 y 15) el número de productos generados por los RAPD's va de 50 a 45 bandas.

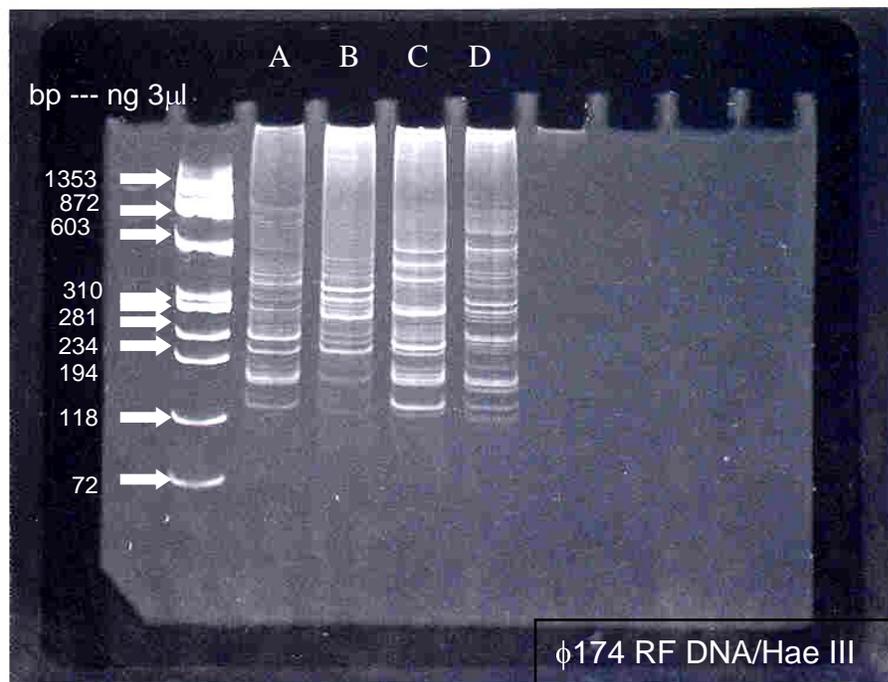


Fig. 14 Patrón de bandas de las 4 especies A)-*Gelidium sclerophyllum* B)-*G. microdentatum* C)-*G. galapagense* y D)-*G. pusillum* con OPA 02

Las 4 especies presentaron polimorfismo, es decir, ninguna presentó el mismo patrón de bandedo, se observan bandas que coinciden entre las especies indicando la cercanía de estos,

pero existen otras bandas que sólo se presentan en cada una de las especie y las hace diferentes entre sí.

Como se puede observar en las figuras 14 y 15 la presencia de polimorfismo de RAPD, nos puede confirmar la variabilidad genética inter- específica tanto para OPA 02 como para OPA 04.

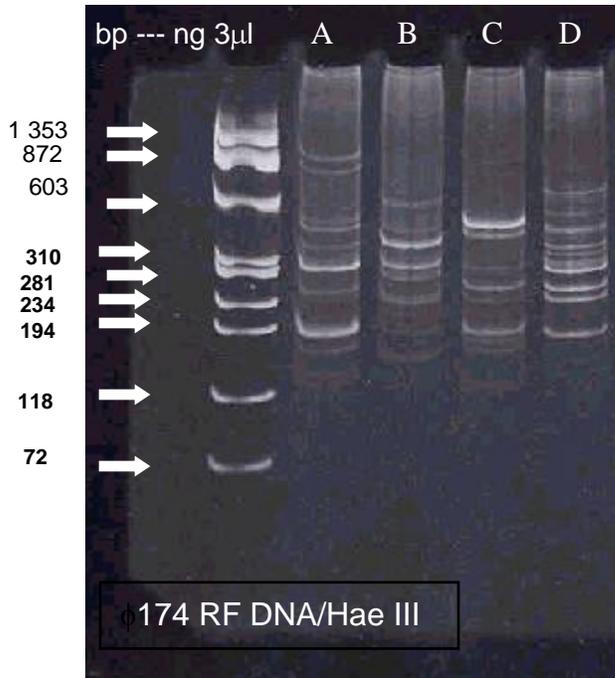


Fig. 15 Patrón de bandas de las 4 especies A)-*Gelidium sclerophyllum* B)-*G. microdentatum* C)-*G. galapagense* y D)-*G. pusillum* con OPA 04

El coeficiente de similitud entre las 4 especies resultó bajo, se ha establecido que el coeficiente de similitud va de 1 a 0, siendo 1 el valor más alto y 0 el índice más bajo.

	<i>G. sclerophyllum</i>	<i>G. microdentatum</i>	<i>G. galapagense</i>	<i>G. pusillum</i>
<i>G. sclerophyllum</i>	1.000	----	----	----
<i>G. microdentatum</i>	0.200	1.000	----	----
<i>G. galapagense</i>	0.333	0.166	1.000	----
<i>G. pusillum</i>	0.571	0.296	0.400	1.000

Tabla 4. Representa los valores obtenidos con el Coeficiente de Similitud Nei y Li (1979) con el oligo OPA 02.

Se puede observar que las especies más cercanas o que presentaron el valor más alto fueron *G. sclerophyllum* vs. *G. pusillum* y el más lejano fue entre *G. galapagense* vs. *G. microdentatum*.

	<i>G. sclerophyllum</i>	<i>G. microdentatum</i>	<i>G. galapagense</i>	<i>G. pusillum</i>
<i>G. sclerophyllum</i>	1.000	----	----	----
<i>G. microdentatum</i>	0.470	1.000	----	----
<i>G. galapagense</i>	0.500	0.266	1.000	----
<i>G. pusillum</i>	0.421	0.444	0.470	1.000

Tabla 5. Representa los valores obtenidos con el Coeficiente de Similitud Nei y Li (1979) con el oligo OPA 04.

Los valores obtenidos con OPA 04, coincidieron en que el coeficiente de similitud más bajo fue entre *G. galapagense* vs. *G. microdentatum*, sin embargo, en el que no coincidió fue en las especies que resultaron más cercanas con OPA 04 fueron *G. sclerophyllum* vs. *G. galapagense*.

Se realizó este mismo análisis con los cuatro morfos de *G. pusillum* recordemos que es una especie que se presenta en el PTM con 6 morfos (López, 2001). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16 y 17 y en las tablas 6 y 7, se utilizaron los mismos oligos OPA 02 y OPA 04.

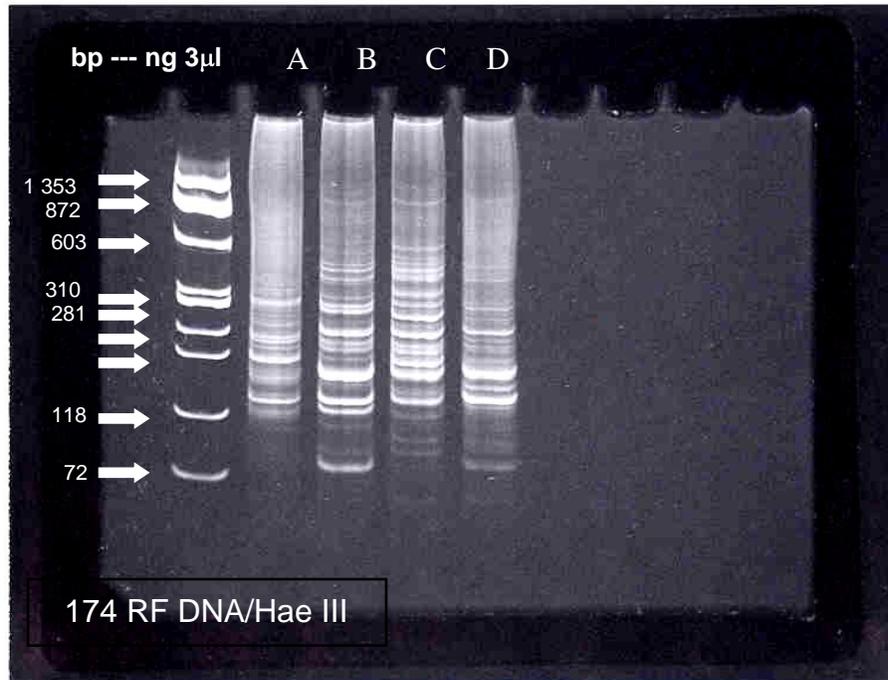


Fig. 16 Patrón de bandas de los 4 morfos de *Gelidium pusillum* con OPA 02: A)-Morfo 1, B)-Morfo 2, C)-Morfo 3 y D)-Morfo 4

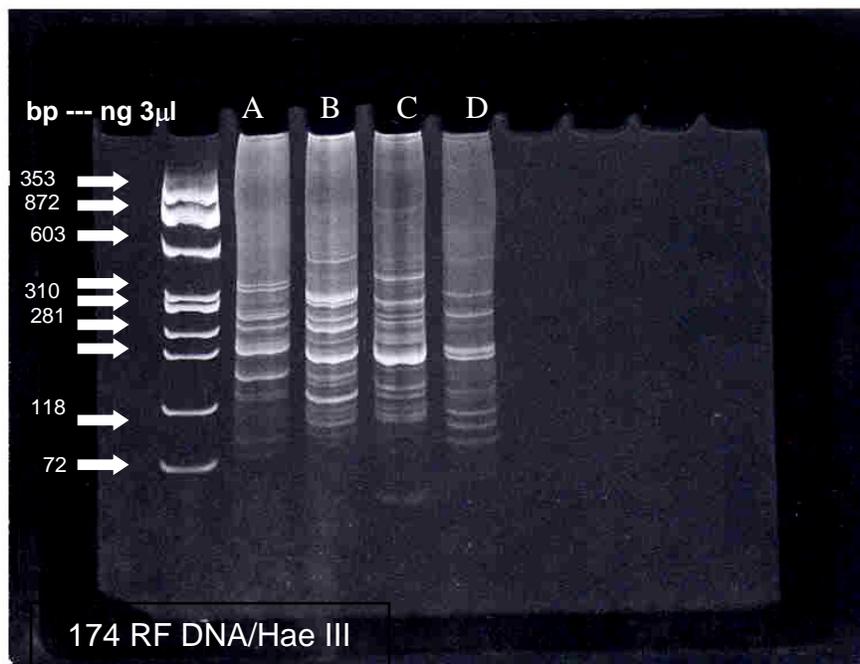


Fig. 17 Patrón de bandas de los 4 morfos de *Gelidium pusillum* con OPA 04: A)-Morfo 1, B)-Morfo 2, C)-Morfo 3 y D)-Morfo 4

Los fragmentos de DNA amplificados de los morfos mencionados se encuentran con un valor entre 603-72 bp el número de productos generados por los RAPD's va de 59 a 45 bandas.

Los valores obtenidos nos indican una baja similitud entre los morfos tanto para OPA 02 como para OPA 04 siendo para OPA 04 los valores más inferiores. Los morfos que presentaron el índice de similitud más bajo fue entre el morfo 1 y 3 para ambos oligos, y los morfos con mayor similitud fueron los morfos 2 y 4 de igual manera para ambos oligos (tablas 6 y 7).

	<i>G. pusillum</i> M1	<i>G. pusillum</i> M2	<i>G. pusillum</i> M3	<i>G. pusillum</i> M4
<i>G. pusillum</i> M1	1.000	----	----	----
<i>G. pusillum</i> M 2	0.428	1.000	----	----
<i>G. pusillum</i> M 3	0.344	0.457	1.000	----
<i>G. pusillum</i> M 4	0.500	0.533	0.451	1.000

Tabla 6. Representa los valores obtenidos con el Coeficiente de Similitud Nei y Li (1979) con el oligo OPA 02

	<i>G. pusillum</i> M1	<i>G. pusillum</i> M2	<i>G. pusillum</i> M3	<i>G. pusillum</i> M4
<i>G. pusillum</i> M1	1.000	----	----	----
<i>G. pusillum</i> M 2	0.300	1.000	----	----
<i>G. pusillum</i> M 3	0.095	0.222	1.000	----
<i>G. pusillum</i> M 4	0.111	0.333	0.240	1.000

Tabla 7. Representa los valores obtenidos con el Coeficiente de Similitud Nei y Li (1979) con el oligo OPA 04

Posteriormente se hizo el análisis para las 4 especies y los 4 morfos obteniéndose los siguientes resultados tabla 8 y 9.

	<i>G. sclero</i>	<i>G. micro</i>	<i>G. galapa</i>	<i>G. pusi</i> M1	<i>G. pusi</i> M2	<i>G. pusi</i> M3	<i>G. pusi</i> M4
<i>G. sclerophyllum</i>	1.000	---	---	---	---	---	---
<i>G. microdentatum</i>	0.200	1.000	---	---	---	---	---
<i>G. galapagense</i>	0.333	0.166	1.000	---	---	---	---
<i>G. pusillum</i> (morfo1)	0.571	0.296	0.400	1.000	---	---	---
<i>G. pusillum</i> (morfo2)	0.333	0.466	0.357	0.428	1.000	---	---
<i>G. pusillum</i> (morfo3)	0.400	0.387	0.275	0.344	0.457	1.000	---
<i>G. pusillum</i> (morfo4)	0.500	0.230	0.416	0.500	0.533	0.451	1.000

Tabla 8. Representa los valores obtenidos con el Coeficiente de Similitud Nei y Li (1979) con el oligo OPA 02, comparando las 4 especies con los morfos de *G. pusillum*.

	<i>G. sclero</i>	<i>G. micro</i>	<i>G. galapa</i>	<i>G. pusi</i> M1	<i>G. pusi</i> M2	<i>G. pusi</i> M3	<i>G. pusi</i> M4
<i>G. sclerophyllum</i>	1.000	---	---	---	---	---	---
<i>G. microdentatum</i>	0.470	1.000	---	---	---	---	---
<i>G. galapagense</i>	0.500	0.266	1.000	---	---	---	---
<i>G. pusillum</i> (morfo1)	0.421	0.444	0.470	1.000	---	---	---
<i>G. pusillum</i> (morfo2)	0.272	0.476	0.600	0.300	1.000	---	---
<i>G. pusillum</i> (morfo3)	0.260	0.363	0.380	0.095	0.222	1.000	---
<i>G. pusillum</i> (morfo4)	0.300	0.210	0.333	0.111	0.333	0.240	1.000

Tabla 9. Representa los valores obtenidos con el Coeficiente de Similitud Nei y Li (1979) con el oligo OPA 04, comparando las 4 especies con los morfos de *G. pusillum*.

En los resultados para OPA 02 el valor de mayor similitud fue de 0.500 entre las especies *G. pusillum* y *G. sclerophyllum* y el valor más bajo se presentó entre *G. galapagense* y *G. microdentatum*. Siendo diferentes a los resultados con OPA 04.

Para OPA 04 el coeficiente de similitud más alto fue de 0.600 que fue entre *G. galapagense* y *G. pusillum* morfo 2 y el valor más bajo fue de 0.095 entre *G. pusillum* morfo 3 y *G. pusillum* morfo 1.

Se realizó el mismo análisis de Coeficiente de Similitud Nei y Li (1979), a 5 poblaciones de *G. sclerophyllum* y 3 poblaciones de *G. galapagense* las cuales mostraron valores superiores a 0.888 indicando poca variación genética intraespecífica.

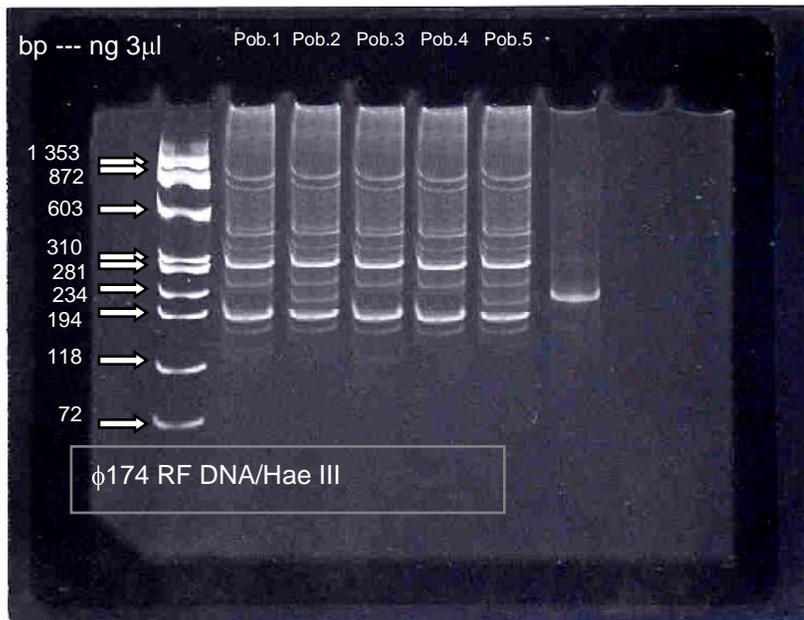


Fig. 18 Patrón de bandas de 5 poblaciones de *Gelidium sclerophyllum* con OPA 04

<i>G sclerophyllum</i>	Pob. 1	Pob.2	Pob.3	Pob.4	Pob.5
Pob. 1	1.000	----	----	----	----
Pob. 2	0.947	1.000	----	----	----
Pob. 3	0.941	0.888	1.000	----	----
Pob. 4	0.991	0.947	0.941	1.000	----
Pob. 5	0.947	0.999	0.888	0.947	1.000

Tabla 10. Representa los valores obtenidos con el Coeficiente de Similitud Nei y Li (1979) con el oligo OPA 04, comparando las 5 poblaciones *G. sclerophyllum*.

Las 5 poblaciones de *G. sclerophyllum* presentaron valores superiores a 0.888 del grado de similitud, el gel presento bandas casi idénticas como se puede apreciar en la figura 18.

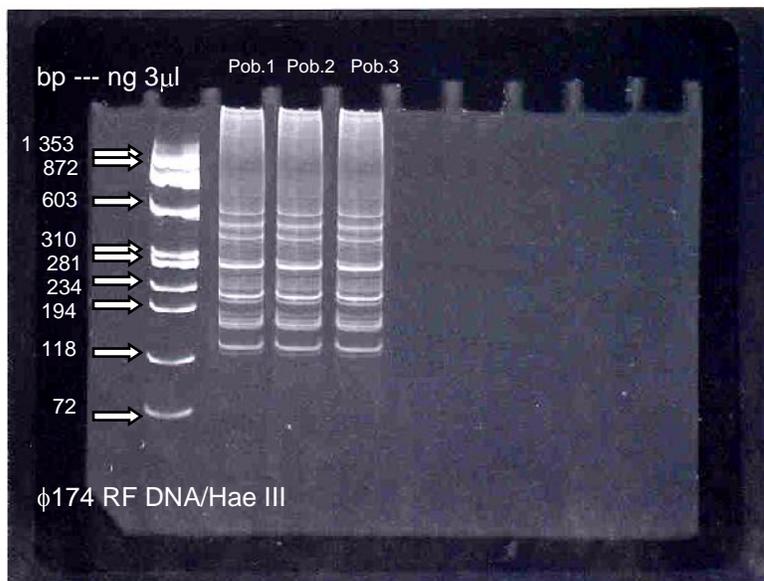


Fig. 19 Patrón de bandas de 3 poblaciones de *Gelidium galapagense* OPA 02.

<i>G. microdentatum</i>	Pob. 1	Pob.2	Pob.3
Pob. 1	1.000	----	----
Pob. 2	0.992	1.000	----
Pob. 3	0.941	0.992	1.000

Tabla 11. Representa los valores obtenidos con el Coeficiente de Similitud Nei y Li (1979) con el oligo OPA 02, comparando 3 poblaciones de *G. galapagense*.

De igual manera las poblaciones de *G. galapagense* presentaron una gran similitud, es decir no hubo variación intraespecífica en estas poblaciones (Fig. 19 y Tabla 11).

Los datos moleculares generados con los patrones de los RAPD's de las 4 especies y los 4 morfos fueron utilizados para realizar el análisis del genoma y para hacer inferencias taxonómicas y filogenéticas. Los patrones de bandeo observados después de la electroforesis

fueron comparadas entre los diferentes taxa. Las bandas son tratadas como características individuales (variables) y se registran como presentes (asignando valor 1) o ausentes (asignando valor 0) en los taxa analizados. Se hizo una matriz de presencia-ausencia (Tabla 12 y 13 Anexo 1) con las 45-50 bandas bien definidas que fueron detectadas para OPA 02 y OPA 04, con las que se construyeron los dendogramas.

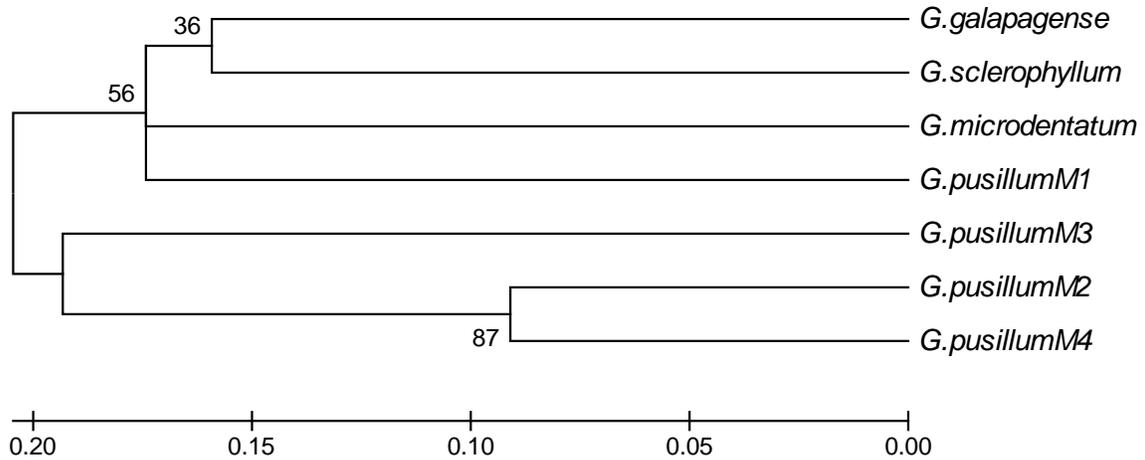


Fig. 20 Dendrograma de las 4 especies de *Gelidium* y los 4 morfos de *Gelidium pusillum* del PTM (RAPD's OPA 02), análisis de UPGMA con Bootstrap de 1000 replicas con MEGA 4.0.2.

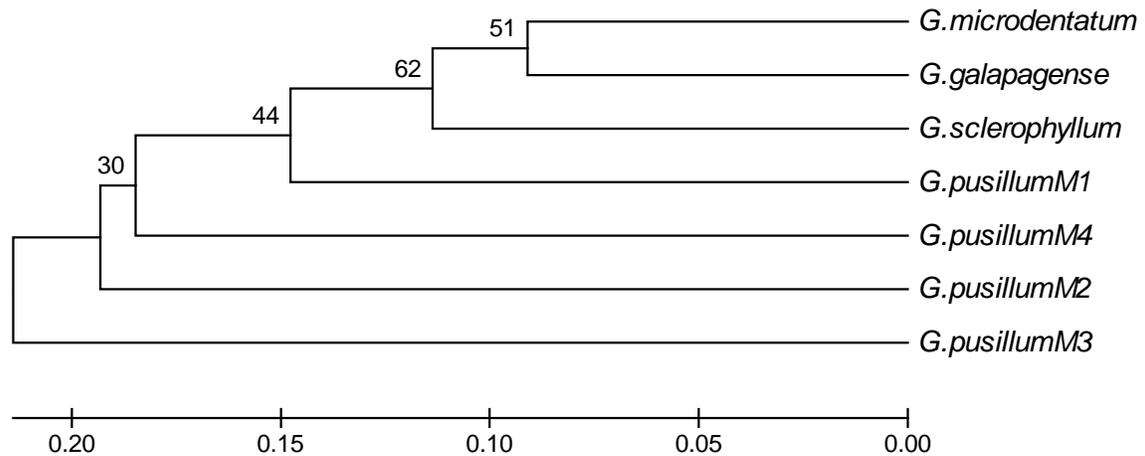
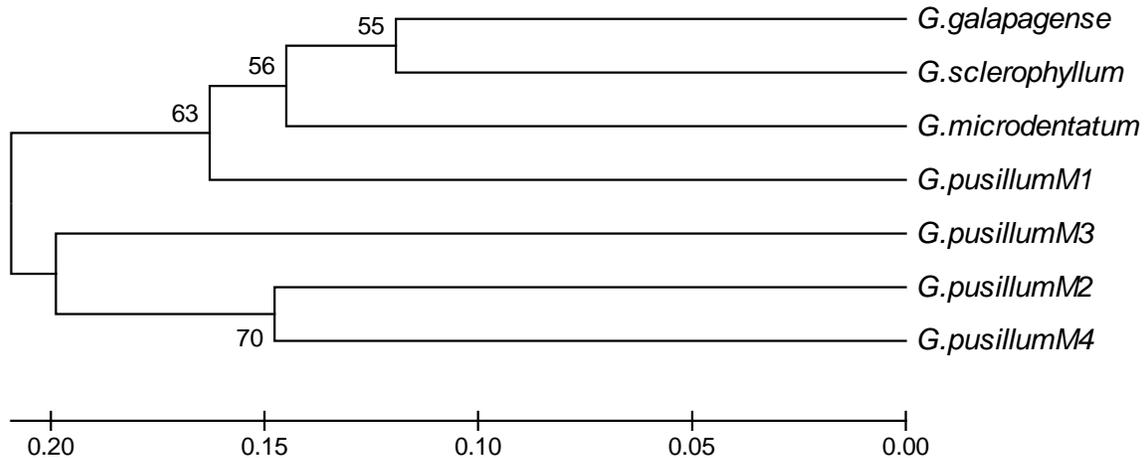


Fig. 21 Dendrograma de las 4 especies de *Gelidium* y los 4 morfos de *Gelidium pusillum* del PTM (RAPD's OPA 04), análisis de UPGMA con Bootstrap de 1000 replicas con MEGA 4.0.2.

En el dendrograma (Fig. 20 y 21) se pudo observar la presencia de dos grupos, uno formado por las especies *G. microdentatum*, *G. galapagense*, *G. sclerophyllum* y *G. pusillum* M1 y

el otro grupo conformado con los morfos M2, M3, y M4 de *G. pusillum*, grupo que se separa de las especies de *Gelidium* del PTM, asimismo se observa que dentro de los morfos se forman subgrupos, 3 con OPA 02 y 2 con OPA 04, esto se puede apreciar en ambos dendogramas y considerando los valores de similitud obtenidos entre los morfos, se podría pensar que se tratan de especies diferentes. Apoyando con estos resultados lo descrito en la problemática de *Gelidium pusillum*, la cual ha sido considerada una especie "basurero".

En el dendrograma consenso podemos apreciar que las especies mas cercanas son *G. galapagense* y *G. sclerophyllum*, seguida de *G. microdentatum* y *G. pusillum* M1, estas especies forman un grupo separado del grupo formado por los morfos 2, 3 y 4 de *G. pusillum*.



Dendrograma consenso de OPA02 y OPA 04, análisis de UPGMA con Bootstrap de 1000 replicas con MEGA 4.0.2.

En un estudio realizado con material del Pacífico americano por Rodríguez (1989) reconoció una alto grado de variación morfológica en todo el material designado con el nombre de *G. pusillum* incluso para el PTM. En el estudio morfométrico realizado por López (2001) estableció seis morfologías distintivas en los ejemplares de *G. pusillum* que se encuentra desde Nayarit a Oaxaca. Con el presente estudio (RAPD's), por lo menos en 4 de los morfos de *G. pusillum* se ha observado un alto grado de variabilidad genética, lo que nos permite sugerir que se trata de especies diferentes y no de morfos o variaciones morfológicas de la misma especie. Se sugiere una revisión extensa de la especie utilizando todas las herramientas necesarias para delimitar los morfos de *G. pusillum*. Asimismo, podemos confirmar que las especies *G. galapagense*, *G. microdentatum* y *G. sclerophyllum*, a pesar de su gran parecido morfológico por lo menos en alguna época de su desarrollo ontogenético, corresponden a especies diferentes.

CAPITULO 4

Región Espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*)

INTRODUCCIÓN

La RuBisCo (ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa) es la enzima que facilita la fijación del CO₂ primario en uno de los pasos del Ciclo de Calvin durante la fotosíntesis. La estructura cuaternaria de la enzima consiste en ocho subunidades largas (*rbcL*) y ocho subunidades cortas (*rbcS*) (Anexo 4) cuyos genes que las codifican se pueden encontrar en el núcleo o en el genoma del cloroplasto.

En las algas verdes, Chlorophyta, la subunidad *rbcL* se codifica en el plastidio mientras que la subunidad *rbcS* es codificada por un multigen en el genoma nuclear como ocurre en las plantas superiores (Palmer, 1985). En Chromophyta (Valentine y Zetsche, 1990a), Crysophyta (Duglas y Durnford, 1989), Phaeophyceae (Destombe y Douglas, 1991) y en Rhodophyta (Valentine y Zetsche, 1989, 1990b), ambas subunidades se codifican en el genoma del cloroplasto, se encuentran separadas por un intergen llamado Región Espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*).

La secuencia de la subunidad larga (*rbcL*) se ha usado ampliamente para dilucidar problemas taxonómicos y sistemáticos y también para establecer relaciones filogenéticas a nivel superior como en las angiospermas (Qui *et al.*, 1993; Zurawski y Clegg, 1993). Las algas no han sido la excepción, dentro de las Rhodophyta se cuenta con los siguientes antecedentes: Hommersand, *et al.*, (1994) realizaron un estudio de la familia Gigartinaceae, utilizando las secuencias de *rbcL*, para conocer la sistemática y biogeografía de la familia. Freshwater y Rueness (1994) determinaron la relación filogenética en algunas especies europeas de *Gelidium* basándose en el análisis de las secuencias de *rbcL*. Freshwater, *et al.*, (1995) llevaron a cabo un análisis de parsimonia con las secuencias de la *rbcL* para desarrollar una hipótesis sobre las relaciones entre taxas en el orden Gelidiales, orden con problemas taxonómicos en el que incluyeron especies de 7 géneros *Capreolia*, *Gelidiella*, *Gelidium*, *Onikusa*, *Pterocladia*, *Ptilophora* y *Suhría*. Fredericq, *et al.*, (1996) realizaron un estudio en algas marinas rojas cuya pared celular contiene agar y/o carrageninas como en algunas familias de Hypneaceae, Furcellariaceae, Ahnfeltiales, Gigartinales, Phyllophoracea y Cryptonemiales, las cuales se sometieron a un estudio de sistemática molecular, utilizando como marcador molecular la *rbcL*. Fredericq y Ramírez (1996) efectuaron un estudio sistemático en especies de *Gymnogongrus*, *Ahnfeltiopsis* y *Phyllophora* del Antártico. Bailey y Freshwater (1997) hicieron un estudio de inferencia separando y combinando los análisis de las secuencias de *rbcL* y SSU nuclear, determinando con los resultados que el género *Gelidium* no es un grupo monofilético. Thomas y Freshwater (1999) utilizaron las secuencias de *rbcL* para determinar la relación filogenética en especies de Gelidiales en Costa Rica. Shimada *et al.*, (2000) sometieron a análisis filogenético con *rbcL* a dos nuevas especies descritas para Japón *Gelidium tenuifolium* Shimada, Horiguchi *et Masuda* y *G. koshikianum* Shimada, Horiguchi *et Masuda*. Otro estudio sistemático y biogeográfico

fue realizado en especies de *Hildenbrandia* de Europa y Norteamérica utilizando las secuencias de *rbcL* como marcador molecular (Sherwood y Sheath, 1999, 2000).

La Región Espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*), se encuentra presente en los genomas de las algas Phaeophyceae y Rhodophyta (Destombe y Douglas, 1991). La región del espaciador se ha utilizado para examinar divergencias específicas y genéricas (Goff *et al.*, 1994; van Oppen *et al.*, 1995; Stache-Crain *et al.*, 1997), en diferentes grupos algales. Estos estudios han mostrado que esta región, es más conservada que los ITS 1 y 2 (espaciador ribosomal de transcripción interna), pero menos conservada que el 18S rDNA (Yoon *et al.*, 1999, 2001).

El espaciador se ha usado como indicador para determinar relaciones filogenéticas en las Phaeophyceae en los ordenes Ectocarpales, Chordariales, Dictyosiphonales y Tilopteridales (Siemer, *et al.*, 1998). En el género *Undaria* de la familia Alariaceae (Yoon y Min Boo, 1999) y en los géneros *Pelvetia* y *Pelvetiopsis* (Yoon, *et al.*, 1999) así como en los géneros *Egregia*, *Laminaria*, *Hedophyllum*, *Macrocystis*, *Alaria*, *Agarum*, *Ecklonia* y *Lessonia* (Yoon *et al.*, 2001).

Dentro de las Rhodophyta tenemos el primer estudio realizado por Destombe y Douglas (1991) quienes usaron las secuencias de la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*), para determinar divergencia en poblaciones de *Gracilaria verrucosa*, las poblaciones de Europa y Argentina presentaron un intergen de 115 pb, mientras que la población de Carolina del Norte, Estados Unidos, fue de mayor tamaño 131 pb y las de menor tamaño fueron las poblaciones presentes en Brasil y Hawaii, 106 y 65 pb respectivamente. Maggs *et al.*, (1992) realizaron un análisis morfológico y molecular con el espaciador en diferentes poblaciones de *Gymnogongrus devoniensis* (Greville) Schotter en el Atlántico Norte, encontrando mayor variabilidad morfológica entre poblaciones de Irlanda, Inglaterra, norte de Francia, norte de España y sur de Portugal y muy poca diferencia entre las secuencias del espaciador. Goff *et al.*, (1994) trabajaron sobre la delimitación entre las especies de *Gracilariopsis* y *Gracilaria* utilizaron los ITS's, 5.8 rDNA y la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*), para determinar la relación filogenética de ambos géneros: Los resultados revelaron que existía una mayor variabilidad entre individuos de la misma población que entre poblaciones geográficamente separadas. Brodie *et al.*, (1996) usaron la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*) para distinguir entre especies de *Porphyra purpurea* (Roth) C. Agardh C, *P. purpurea-violacea* (Roth) V. Krishnamurthy, *P. umbilicalis* Kützing y *P. laciniata* C. Agardh para resolver problemas de confusión taxonómica que han repercutido en los estudios ecológicos de estas especies, con la combinación de resultados morfológicos y moleculares se reconocieron dos grupos uno monoico y el otro dioico separados por tan solo un nucleótido en la secuencia del espaciador. Muller *et al.*, (1998) hicieron un análisis morfométrico con las secuencias del espaciador, la subunidad *rbcL* y con el gen 18S rRNA, en un estudio biogeográfico y sistemático de diferentes

poblaciones de *Bangia atropurpurea* (Roth) C. Agardh. Brodie *et al.*,(1998) con los datos de las secuencias del intergen rubisco de 47 especímenes de *Porphyra* y *Bangia* del Atlántico Noreste, determinaron 11 distintas secuencias confirmando a su vez que algunas especies son congénéricas. Zuccarello *et al.*,(1999) determinaron evolución divergente entre *Bostrychia moritziana* (Sonder *et* Kützing) J. Agardh y *B. radicans* (Montagne) Montagne. Hughey *et al.*,(2001) con el espaciador rubisco, solucionaron problemas nomenclaturales y taxonómicos en especies de Gigartinaceae como *Chondracanthus squarulosus* (Setchell *et* N.L. Gardner) J.R. Hughey, P.C. Silva *et* Hommersand, *Mazzaella splendens* (Setchell *et* N.L. Gardner) Fredericq, *Iridaea micans* Bory de Saint-Vincent y *I. cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent. West *et al.*,(2001) determinaron las secuencias de la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*), en las especies *Caloglossa ogasawaraensis* Okamura, *C. postiae* M. Kamiya *et* R.J. King, *C. monosticha* M. Kamiya y *C. lepreurii* (Montagne) G. Martens. Zuccarello y West (2002) realizaron un estudio filogeográfico en *Bostrychia calliptera*-*B. pinnata* con las secuencias del espaciador. Oh-Cho *et al.*,(2003) utilizaron el espaciador en 11 muestras de 8 poblaciones para determinar las relaciones filogenéticas entre *Ceramium sinicola*, *C. interruptum* y *C. codicola*, encontrando que *C. sinicola* es más cercana a *C. codicola* y que ambas derivan de *C. interruptum*. Niwa *et al.*,(2006) utilizaron las secuencias del espaciador como un indicador de identidad en cultivos de *Porphyra tenera* en Japón y determinaron que esta región corrobora la especie de forma rápida y eficaz. Más recientemente, Lewis *et al.*,(2008) emplearon las secuencias de la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*), para determinar la relación filogenética entre especies de *Laurencia*, *Osmundea* y *Palisada*, rodofitas de las islas Canarias, encontrando una identidad molecular del 72-83% entre ellas y con los métodos de parsimonia y máxima similitud detectaron que el taxón más distante entre las especies de *Laurencia* y *Palisada* era *Osmundea pinnatifida*.

Cabe mencionar que los genes, o marcadores moleculares que se han empleado en especies del género *Gelidium* han sido los genes *rbcL*, 5.8S rRNA, 18S rRNA, 28S rRNA, los RAPD's y las isoenzimas. El presente trabajo es el primer reporte de *Gelidium* en el que se utiliza la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*) y se dan a conocer las secuencias del espaciador de *Gelidium crinale*, *G. galapagense*, *G. microdentatum*, *G. sclerophyllum* y tres poblaciones de *G. pusillum*.

OBJETIVOS

- a) Determinación de las secuencias de la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*) en las especies *Gelidium crinale*, *G. galapagense*, *G. microdentatum*, *G. pusillum* y *G. sclerophyllum* del PTM.
- b) Evaluación de las semejanzas y diferencias entre las secuencias de la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*), intra e inter especies de *Gelidium* del PTM.

MÉTODO

La colecta se llevó a cabo de manera manual (Knudsen, 1966; Ortega *et al.*, 1993), en la región intermareal media y baja de las zonas rocosas (Tabla 2), desprendiendo las algas desde la parte basal con una espátula o cuchillo. Se tomaron muestras equivalentes a una cobertura de 5 cm² de cada población (Filipe y Leitão, 1997). El material colectado se libero de arena y de microorganismos de origen animal, se secó con papel secante y colocó en silica gel para mantenerlo lo más seco posible, los envases fueron etiquetados perfectamente y una vez en el laboratorio fueron colocados en el congelador Revco a – 80 °C. Se realizaron tres replicas por cada población.

Extracción de DNA

Las muestras se limpiaron y revisaron en el microscopio estereoscópico asegurándose de que estén libre de epifitas y otros pequeños organismos, la extracción se llevo a cabo de la siguiente manera (Saunders, 1993 modificada):

- 1.- El material algal fue colocado por 10 min. en HCl 1N y luego se enjuagó con agua bidestilada.
- 2.- Aproximadamente 500 mg (peso húmedo) de tejido algal fue colocado en un tubo Eppendorf estéril de 2 mL y se le agregó 1.2 mL de amortiguador de extracción [0.1 M Tris-base, pH=8, 0.05 M EDTA (ácido etilendiaminotetra disodio), 0.2 M NaCl, 1% w/v SDS (dodecil sulfato de sodio)] más 7 µL de proteinasa K (20 mg.mL⁻¹ solución stock) y se incubó a 40 °C por 3 hrs.

- 3.- Posteriormente se extrajo la solución y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf estéril, se le agregó un volumen igual (aprox. 600 μ L) de Acetato de Potasio 2.5 M ($KC_2H_3O_2$) y se incubó en hielo durante 20 minutos.
- 4.- Una vez pasado el tiempo, el tubo se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos.
- 5.- Se extrajo el sobrenadante y colocó en un nuevo tubo Eppendorf estéril, a este se le agregó un volumen igual de 25:24:1 fenol (equilibrada con 0.1 M Tris.HCl buffer pH=7.5): cloroformo: alcohol isoamílico. La fase orgánica y la acuosa se mezclan por inversión del tubo en repetidas ocasiones.
- 6.- El tubo se colocó en la microcentrifuga a 13 000 rpm durante 3 minutos. Se formaron 3 fases de las cuales se extrajo la fase acuosa que se ubica en la parte superior del tubo y colocó en un tubo nuevo Eppendorf estéril.
- 7.- A esta fase acuosa se le añade un volumen igual de 24:1 cloroformo: alcohol isoamílico, se mezcló de nuevo la solución y centrifugó por 3 minutos.
- 8.- De nuevo se extrajo la fase acuosa y colocó en un tubo nuevo, a esta solución se le agregó un volumen igual de etanol al 95% frío (-20 °C) y se incubó a -20 °C por 24 hrs.
- 9.- Se tomó el tubo y centrifugó por 20 minutos a 13 000 rpm, se formó un botón blanco (pellet), el alcohol se retiró del tubo y se le agregó 300 μ L de etanol al 70% frío (4 °C).
- 10.-Se centrifugó por 5 minutos después se retiró cuidadosamente el alcohol y se dejó el botón blanco a secar, cuando los vapores del alcohol se retiraron completamente se le agregó 30 μ L de agua libre de nucleasas (PROMEGA). El DNA genómico crudo se guardó a - 20 °C.

Purificación del DNA

Se preparó un gel de agarosa al 0.8% con el buffer TAE 1X más 4 μ L de Bromuro de Etidio ($0.5\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), el DNA se mezcló con el colorante Gene Amp, se colocó en los pozos del gel aproximadamente 10 μ L, el gel cargado se colocó en la cámara electroforética y se corrió a 100 Amperes durante 40 minutos aprox. El gel se revisó en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) (>300nm).

Se cortó la banda en donde se encuentra el DNA de alto peso molecular y se colocó en un tubo Eppendorf estéril, luego se purificó con el Kit de Gene clean (purificación con un polímero de sales de sílice, con mínima pérdida de DNA).

El producto final de la purificación se pasó de nuevo a través de un gel de agarosa y se observó la misma banda de DNA de alto peso molecular pero libre de las señales de RNA's y DNA degradado.

La extracción y purificación del DNA se realizó de la misma manera que para los RAPD's, la amplificación (PCR) del espaciador se llevó a cabo de la siguiente manera.

Los oligonucleótidos que se utilizaron son secciones altamente conservadas de la 3' región final del gen *rbcl* (TGTGGACCTCTACAAACAGC) y la región inicial conservada 5' del gen *rbcS* (CCCCATAGTTCCCAAT) (Maggs *et al.*, 1992). Estos oligonucleótidos han sido los más comúnmente utilizados en especies de Rhodophyta.

Amplificación de la región espaciadora RuBisCo (*rbcl-rbcS*).

El DNA de alto peso molecular purificado de cada una de las 5 especies trabajadas es utilizado para la amplificación del espaciador. Los oligos que fueron utilizados son los arriba mencionados (Destombe y Douglas, 1991; Maggs *et al.*, 1992; Goff *et al.*, 1994; Brodie *et al.*, 1996, 1998).

Se tuvieron que hacer diferentes pruebas para poder amplificar el espaciador, principalmente con la variación de la concentración de MgCl₂ desde 0.3 a 1.5 µL siendo el mejor 0.6 µL de MgCl₂.

La amplificación se llevó a cabo en 30 µL de volumen que contuvo 2.5 µL 10X *Taq* DNA polimerasa buffer (100 mM Tris-HCl pH=9.0, 500 mM KCl), 150 µM de cada dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 100 pmol de los oligos (forward y revers), 1.0 mM de MgCl₂, 1.0 unit de *Taq* DNA polimerasa 9 µL de DNA genómico.

Se utilizaron tubos para PCR, los cuales fueron colocados en un termociclador Gene Amp PCR System 2400 Perkin Elmer. Programado de la siguiente manera: 1 ciclo de desnaturalización 94 °C por 3 minutos, 30 ciclos de amplificación 94 °C por 30 segundos, 42 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto y por último un ciclo a 72 °C por 5 minutos.

Los productos de PCR fueron purificados con la ayuda del QIA quick Gel Extracción kit para posteriormente enviarlos a secuenciar al Instituto de Fisiología Celular con la Dra. Laura Ongay.

Análisis de datos

Se calcularon los valores de similitud (Destombe y Douglas, 1991) para cada par de secuencias con la fórmula: $S = [2M / (L_1 + L_2)] \times 100$

Las secuencias se alinearon utilizando dos programas, el programa "Bioedit" (Bio Edit Sequence Alignment Editor versión 5.0) y el programa CLUSTAL W (1.81), con una penalización de 5 inserciones / deleciones (indels) y de 0 al tamaño de los indels.

Los análisis filogenéticos, se realizaron con dos programas, en el primero se utilizó el análisis de máxima parsimonia con el programa Paup versión 4.0 y el segundo análisis filogenético se realizó con el programa MrBayes, (Bernardo y Smith, 1994).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La longitud de la región amplificada se muestra en la figura 22, que incluye la región espaciadora junto con la porción final de la *rbcL* y la porción inicial de la *rbcS* de las especies de *Gelidium* del PTM la cual varió desde 259 a 303 pares de bases (pb). Esta región se caracteriza por presentar polimorfismo lo que nos permite determinar si existe variabilidad genética inter e intra específica en las algas. La longitud de la región amplificada en cada uno de las especies fue; *G. galapagense* 298 pb, *G. sclerophyllum* de 303 pb, *G. microdentatum* 301 pb, *G. crinale* 259 pb y en los morfos de *G. pusillum* fue de 292 pb en el morfo 1, 226 pb en el morfo 2 y 343 pb en el morfo 4 (pb). El tamaño del espaciador resulto pequeño, *G. galapagense* 39 pb, *G. sclerophyllum* de 39 pb, *G. microdentatum* 38 pb, *G. crinale* 53 pb y en los morfos de *G. pusillum* fueron 66 pb en el morfo 1, 57 pb en el morfo 2 y 81 pb en el morfo 4. De lo reportado en la literatura y en el Genbank el tamaño de los espaciadores para Rhodophyta van desde 77pb hasta 658pb, el tamaño del espaciador podemos considerarlo de longitud pequeño, en la mayoría de las especies de *Gelidium* del PTM, esto se puede apreciar en la tabla 14

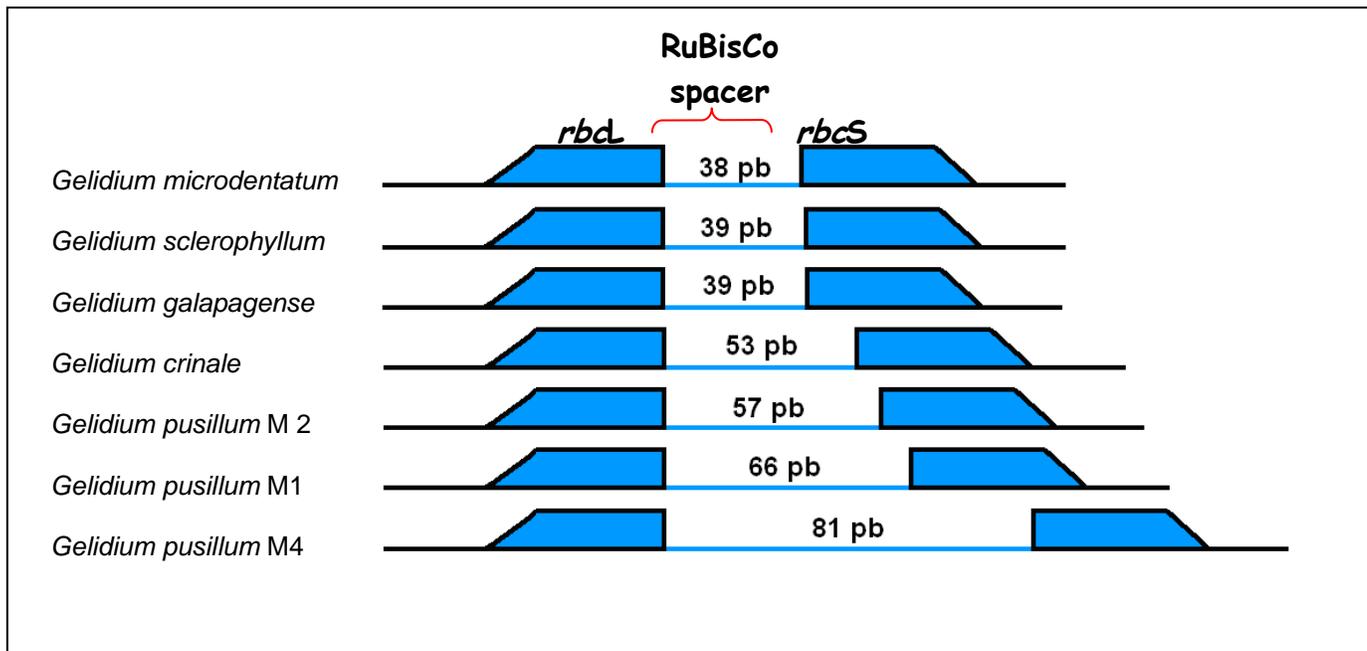


Fig. 22 Representación grafica del tamaño de la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*).

Tabla 14. Longitud en (pb) de la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*) en Rhodophyta.

Taxon	Longitud (pb)	Referencia
Bangiales		
BANGIACEAE		
<i>Bangia atropurpurea</i>	77	Muller <i>et al.</i> ,(1998)*
<i>Porphyra lanciniata</i>	77	Brodie <i>et al.</i> ,(1996)
<i>Porphyra purpurea</i>	77	Brodie <i>et al.</i> , (1996)
<i>Porphyra yezoensis</i>	77	Kito, <i>et al.</i> , (2003)*
<i>Porphyra haitanensis</i>	77	Kito, <i>et al.</i> , (2003)*
<i>Porphyra katadae</i>	77	Kito, <i>et al.</i> , (2003)*
<i>Porphyra pseudolinearis</i>	77	Kito, <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Porphyra suborbiculata</i>	417	Kito, <i>et al.</i> , (2003)*
<i>Porphyra dentata</i>	77	Kito, <i>et al.</i> , (2003)*
<i>Porphyra tenera</i>	77	Kito, <i>et al.</i> , (2003)*
<i>Porphyra umbilicales</i>	77	Brodie y Nielsen (2004)*
<i>Porphyra rediviva</i>	44	Bray <i>et al.</i> ,(2006)*
<i>Porphyra spiralis</i>	77	Milstein <i>et al.</i> ,(2008)*
<i>Porphyra rakiura</i>	80	Broom <i>et al.</i> ,(2002)*
Porphyridiales		
PHRAGMONEMATACEAE		
<i>Goniotrichiopsis reniformis</i>	58	Zuccarello <i>et al.</i> , (2007)*
Ceramiales		
CERAMIACEAE		
<i>Bostrychia calliptera</i>	92	Zucarello y West (2002)
<i>Bostrychia moritziana</i>	110	Zucarello <i>et al.</i> ,(1999)*
<i>Bostrychia radicans</i>	115	Zucarello <i>et al.</i> ,(1999)*
<i>Bostrychia bispora</i>	97	Zucarello <i>et al.</i> ,(1999)*
<i>Bostrychia radicata</i>	120	West <i>et al.</i> ,(2006)*
<i>Reinboldiella schmitziana</i>	104	Seo, <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Centroceras clavalatum</i>	102	Seo, <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Ceramium tenerimum</i>	103	Seo, <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Ceramium kondoii</i>	103	Seo, <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Ceramium japonicum</i>	103	Seo, <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Ceramium boydenii</i>	100	Seo, <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Ceramium paniculatum</i>	103	Cho <i>et al.</i> ,(2004)*
<i>Ceramium inkyuui</i>	103	Cho <i>et al.</i> ,(2004)*
<i>Ceramium affine</i>	103	Cho <i>et al.</i> ,(2004)*
<i>Campylaephora hypnaeoides</i>	103	Seo, <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Campylaephora crassa</i>	103	Seo, <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Campylaephora borealis</i>	103	Seo, <i>et al.</i> ,(2003)*

<i>Caloglossa ogasawaraensis</i>	77	West <i>et al.</i> ,(2001)
<i>Caloglossa postiae</i>	85	West <i>et al.</i> ,(2001)
<i>Caloglossa monosticha</i>	88	West <i>et al.</i> ,(2001)
<i>Caloglossa lepriurii</i>	86	West <i>et al.</i> ,(2001)
<i>Caloglossa continua</i>	80	Kamiya <i>et al.</i> ,(2000)*
<i>Caloglossaapomeiotica</i>	86	Kamiya <i>et al.</i> ,(2000)*
<i>Antithamnion sparsum</i>	108	Lee <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Antithamnion pensum</i>	103	Lee <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Antithamnion defectum</i>	108	Lee <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Antithamnion nipponicum</i>	108	Lee <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Antithamnion callocladum</i>	107	Lee <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Antithamnion aglandum</i>	108	Lee <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Spyridia filamentosa</i>	108	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Spyridia griffithsiana</i>	106	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Spyridia cupressina</i>	106	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Spyridia horridula</i>	107	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Spyridia hypnoides</i>	108	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2005)*
RHODOMELACEAE		
<i>Bostrychia calliptera</i>	127	Zucarello y West (2002)*
<i>Bostrychia moritziana</i>	106	Zucarello y West (2003)*
<i>Bostrychia radicans</i>	96	Zucarello y West (2003)*
<i>Laurencia viridis</i>	110	Lewis <i>et al.</i> ,(1999)*
<i>Laurencia thyrsoifera</i>	110	Lewis <i>et al.</i> ,(1999)*
<i>Laurencia perforata</i>	104	Lewis <i>et al.</i> ,(1999)*
<i>Laurencia brongniartii</i>	94	Gil-Rodríguez <i>et al.</i> ,(2006)*
<i>Osmundea pinnatifida</i>	113	Lewis <i>et al.</i> ,(1999)*
Palmariales		
PALMAREACEAE		
<i>Palmaria palmata</i>	89	Kraan y Guiry (2003)*
Plocamiales		
PLOCAMIACEAE		
<i>Plocamium telfairiae</i>	88	Yano <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Plocamium serratum</i>	92	Yano <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Plocamium recurvatum</i>	88	Yano <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Plocamium ovicornis</i>	90	Yano <i>et al.</i> ,(2003)*
<i>Plocamiumcartilagineum</i>	88	Yano <i>et al.</i> ,(2003)*
Gelidiales		
GELIDIACEAE		
<i>Gelidium galapagense</i>	39	Presente estudio
<i>Gelidium sclerophyllum</i>	39	Presente estudio
<i>Gelidium microdentatum</i>	38	Presente estudio
<i>Gelidium crinale</i>	53	Presente estudio
<i>Gelidium pusillum</i> (Morfo 2)	57	Presente estudio

<i>Gelidium pusillum</i> (Morfo 1)	66	Presente estudio
<i>Gelidium pusillum</i> (Morfo 4)	81	Presente estudio
<i>Gelidium arbuscula</i>	88	Presente estudio
<i>Gelidium canariensis</i>	88	Presente estudio
Gigartinales		
GIGARTINACEAE		
<i>Chondracanthus squarulosus</i>	91	Hughey <i>et al.</i> ,(2001)
<i>Mazzaella splendens</i>	91	Hughey <i>et al.</i> ,(2001)
<i>Iridaea micans</i>	92	Hughey <i>et al.</i> ,(2001)
<i>Iridaea cordata</i>	92	Hughey <i>et al.</i> ,(2001)
PETROCELIDACEAE		
<i>Mastocarpus stellatus</i>	92	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2005)*
SOLIERIACEAE		
<i>Kappaphycus striatum</i>	93	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2004)*
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	93	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2004)*
<i>Eucheuma denticulatum</i>	94	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Eucheuma platycladum</i>	95	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Eucheuma isiforme</i>	88	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2005)*
<i>Betaphycus philippinensis</i>	93	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2005)*
GRACILARIACEAE		
<i>Gracilaria verrucosa</i>	131	Destombe y Douglas (1991)
<i>Gracilaria pacifica</i>	352	Goff <i>et al.</i> ,(1996)
<i>Gracilaria robusta</i>	352	Goff <i>et al.</i> ,(1996)
<i>Gracilaria blodgettii</i>	114	Hommersand y Freshwater (2009)*
<i>Gracilaria cylindrica</i>	65	Hommersand y Freshwater (2009)*
<i>Gracilaria tikvahiae</i>	204	Goff <i>et al.</i> ,(1995)*
<i>Gracilaria chilensis</i>	245	Goff <i>et al.</i> ,(1995)*
<i>Gracilaria pacifica</i>	253	Goff <i>et al.</i> ,(1995)*
<i>Gracilaria bursa-pastoris</i>	65	Guilleminet <i>al.</i> ,(2008)*
<i>Gracilaria tenuistipitata</i>	242	Goff <i>et al.</i> ,(1995)*
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	106	Guilleminet <i>al.</i> ,(2008)*
<i>Gracilaria multipartita</i>	65	Guilleminet <i>al.</i> ,(2008)*
<i>Gracilaria conferta</i>	116	Guilleminet <i>al.</i> ,(2008)*
<i>Gracilaria gracilis</i>	115	Guilleminet <i>al.</i> ,(2008)*
<i>Gracilaria dura</i>	115	Guilleminet <i>al.</i> ,(2008)*
<i>Gracilaria textorii</i>	65	Pareek <i>et al.</i> ,(2008)*
<i>Gracilaria debilis</i>	105	Pareek <i>et al.</i> ,(2008)*
<i>Gracilaria salicornia</i>	122	Pareek <i>et al.</i> ,(2008)*
<i>Gracilaria foliifera</i>	111	Pareek <i>et al.</i> ,(2008)*
<i>Gracilaria fergusonii</i>	117	Pareek <i>et al.</i> ,(2008)*
<i>Gracilaria corticata</i>	111	Pareek <i>et al.</i> ,(2008)*

<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	106	Freshwater <i>et al.</i> ,(2006)*
<i>Gracilaria gigas</i>	65	Terada y Shimada (2005)*
<i>Gracilaria blodgettii</i>	115	Terada y Shimada (2005)*
<i>Gracilaria arcuata</i>	123	Terada y Shimada (2005)*
<i>Gracilaria articulata</i>	115	Terada y Shimada (2005)*
<i>Gracilariopsis tenuifrons</i>	247	Goff <i>et al.</i> ,(1995)*
<i>Gracilariopsis lemaneiformis</i>	245	Goff <i>et al.</i> ,(1995)*
<i>Gracilariopsis longissima</i>	108	Guilleminet <i>al.</i> ,(2008)*
HYPNEACEAE		
<i>Hypnea japonica</i>	92	Yano <i>et al.</i> ,(2003)*
SOLIERIACEAE		
<i>Kappaphycus cottonii</i>	94	Lluisma (2002)*
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	93	Lluisma (2002)*
Bonnemaisoniales		
BONNEMAISONIACEAE		
<i>Asparagopsis armata</i>	79	Andreakis <i>et al.</i> ,(2004)*
<i>Asparagopsis taxiformis</i>	83	Andreakis <i>et al.</i> ,(2004)*
Halymeniales		
HALYMENIACEAE		
<i>Carpopeltis crispata</i>	80	Lee y Bae (2002)*
<i>Carpopeltis cornea</i>	80	Lee y Bae (2002)*
<i>Carpopeltis affinis</i>	80	Lee y Bae (2002)*
<i>Pachymeniopsis elliptica</i>	80	Lee y Bae (2002)*
<i>Grateloupia lanceolata</i>	80	Lee y Bae (2002)*
<i>Grateloupia porcea</i>	76	Lee y Bae (2002)*
<i>Grateloupia turuturu</i>	80	Lee y Bae (2002)*
<i>Grateloupia divaricata</i>	80	Lee y Bae (2002)*
<i>Polyopes lancifolius</i>	80	Lee y Bae (2002)*
<i>Halymenia acuminata</i>	80	Lee y Bae (2002)*
Stylonematales		
STYLONEMATOPHYCEAE		
<i>Stylonema comu-cervi</i>	61	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2007)*
<i>Stylonema alsidii</i>	63	Zuccarello <i>et al.</i> ,(2007)*

* Obtenidos del GenBank

Cabe mencionar que también se hizo el estudio de dos especies europeas de *Gelidium* *G. arbuscula* Bory de Saint-Vincent ex Børgesen y *G. canariensis* (Grunow) Seoane Camba et Haroun, y que se encuentran incluidas en la tabla anterior como parte de los resultados, lo que nos permite contar con una mejor referencia de las especies de *Gelidium* para comparar con las especies del PTM, ya que hasta el momento, no existe ningún reporte previo utilizando la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*) en *Gelidium*.

Las secuencias obtenidas son las siguientes:

Gelidium microdentatum

TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACCTATGGAAAGATATCAGCTTCAACTACACATCTACAG
 ATACAGCTGATTTTGTAGAAACACCTACAGCAAACGTTTAATAAATTACTTTTAAAAAACTTAAAG
 GAGTATTTGAATAGTGAGACTTACACAAGGTTGCTTCTCGTTCTTACCAGATTTAACTGATCAACA
 AATTGAAAAACAAATCGCTTATTGCATCAACAAAGGTTGGGCATTAACGTTGAATGGACTGATG
 ATCCACATCCTCGTAATAGCTATTGGGACCTTATTGGGG

Gelidium sclerophyllum

AGTTGTGGACCTCTGCAAACAGCTCTAGACTTATGGAAAGATATCAGCTTCAACTACACATCTAC
 AGATACAGCTGATTTTCGTAGAAACACCTACAGCAAACGTTTAATAAATATACTTTTAAAAAACTTA
 AAGGAGTATTTGAATAGTGAGACTTACACAAGGTTGCTTCTCGTTCTTACCAGATTTAACTGATCA
 ACAAATTGAAAAACAAATCGCTTATTGCATCAACAAAGGTTGGGCATTAACGTTGAATGGACTG
 ATGATCCACATCCTCGTAATAGCTATTGGGACCTTATGGGG

Gelidium galapagense

TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACTTATGGAAAGATATCAGCTTCAACTACACATCTACAG
 ATACAGCTGATTTTGTAGAAACACCTACAGCAAACGTTTAATAAATTACTTTTAAAAAACTTAAAG
 GAGTATATTGAATAGTGAGACTTACACAAGGTTGCTTCTCGTTCTTACCAGATTTAACTGATCAAC
 AAATTGAAAAACAAATCGCTTATTGCATCAACAAAGGTTGGGCATTAACGCTGAATGGACTGATGAT
 CCACATCCTCGTAATAGCTATTGGGACCTTATGGGG

Gelidium crinale

GGGACATTAGCTTGAACATACGTCGACCGACACTGCTGATTTTCGTAGAGACTCCAACGGCCAA
 CGTTTGAATTACTCTTTATTTTACTGATTACGTTGCATAAGCAGGCTATGCTTTTCGTGCGG
 CTAACCAAGGATGTTTCTCTTTTCTACCGACCTAACTGACCAACAGATAGAGAAGCAAATAGC
 TTAGTGCATAAATAAGGGATGGGCTCCTAATGTGGAGTCCGACTTGGGATTGGGAACTATGGGG

Gelidium pusillum morfo1

GTGGACCTCTACAAACAGCAAAGACATCTCTTTTAATTACACGAGTACTGACACAGCAGATTTTG
 TGAAACCCCAACTGCGAACGTCTAAACAGCACCGAAAGGCCGATTAATAATGGCAGGGTGTTG
 TAGCGCCGCCTGATATTTCAAGCCGGCAGTGC GACTGACCCAGGGCTGCTTATTCTTTTTGCCA
 GACCCTACAGATCAACAGATAGAGAAACAAATAGCGTACTGTATTAATTTTGGCTGGGCTTTGCC
 CGTTAGAATTGGGTACATTGGGACCTTATTGGGG

Gelidium pusillum morfo2

TACGGCGAACGTTTAGCCGCGCCTGAACATGTCAGCCGGCGAGTCTACGCCAGCGACCACTT
 GTGAGAGGTGATGCGACCTACACAAGGTTGTTTTAGCTTCCTCCAGATCTTACTGACCAGGAA
 ATTGAAAAACAAATTGCGTATTGCATAGCATACTGCATCAATGGATGGGCCCTCAACGTAGAATG
 GACTGATGATCCTCATATTGGGACCTTATTGGGG

Gelidium pusillum morfo4

TTGTGGACCTCTACAAACAGCATTAGATTTATGGAAAGATATTAGTTTTAACTATACTTCTACAGA
 TACAGCTGATTTTCGTAGAAACTCCAACAGCAAATGTTTAAAGTGGACCTTTAGACCTTTATGTGGA
 CCTATACAAACAGCACAGAAAGGCCGATTAATAATGGCAGGGTGTTGTTAGCGCCGCATGAGACT
 TACACAGGGATGCTTCAGCTTCCTCCCTGATCTGACGGATCAACAGATCGAAAAGCAAATCGCA
 TACTGTATAACAAGGGTTGGGCATTGAATGTCGAGTGGACGGACGATCCACATATGGTGAGAA
 CTATTGGGACCTTATTGGGG

Gelidium arbuscula

TGTGGACCTCTGCAAACAGCTTTAGAATGTATGGAAAGATATCTCGTTCAACTATACTTCTACAG
 ATACAGCTGACTTCGTGGAAACTCCAACAGCGAACGTATAATTTTTATACTACGTTGAATTAATAAT
 ATTAAGAACTTCTCTTTAAGGTTTCTAACATCTGTTTAAATATAAATAAGGAGTATATAAAAGTGA
 GACTAACACAAGGATGTTTTTCGTTTCTACCAGATTTAACTGACCAACAAATTGAAAAACAGATCA
 ATTATTGCATAAATAAGGGTTGGGCACCTAATGTAGAACATACAGATGATCCTCATCCACGTAATA
 ACTATTGGGAACTATGGGG

Gelidium canariensis

TGTGGACCTCTACAAACAGCTTTAGATCTATGGAAAGATATCTCATTCAACTTTACGTCTACAGAC
 ACAGCTGACTTGGTAGAAACTCCAACAGCGAACGTATAATTTTTATAACACGTTGAATTAATAAT
 TAAAGACCCTCTCTGTAAGGTTTCTAACATCTGCTTAAATATAAATAAGGAGTATATAAAAGTGAG
 ACTAACACAAGGAACTTTTTTCGTTTCTACCAGATTTAACTGACGAACAAATTAATAAACAGATCAA
 TTATGCAATATATAAATATTGGACAATGGGGTAGAACATACAGAAGATCCTCATCCACGTAATAAC
 TATTGGGAACTATGGGG

Cuatro de las secuencias fueron sometidas al banco de datos internacional Genbank, los números de acceso son

<i>Gelidium crinale</i>	clave genbank (bankit698180) número de acceso (AY935940)
<i>Gelidium galapagense</i>	clave genbank (bankit685015) número de acceso (AY935941)
<i>Gelidium microdentatum</i>	clave genbank (bankit685019) número de acceso (AY935942)
<i>Gelidium sclerophyllum</i>	clave genbank (bankit698204) número de acceso (AY935943)

Las secuencias se alinearon utilizando el programa "Bioedit" (Bio Edit Sequence Alignment Editor versión 5.0) con una penalización de 5 inserciones / deleciones (indels) y de 0 al tamaño de los indels. Esto minimiza el número de inserciones / deleciones. *Gracilaria verrucosa* fue utilizado como grupo externo. Las secuencias alineadas se presentan en la tabla 15a. Se realizó otra alineación con el programa CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment en la que se incluyeron dos especies europeas *Gelidium arbuscula* Bory de Saint-Vincent et Børgesen y *Gelidium canariensis* (Grunow) Seoane Camba et Haroun, utilizando como grupo externo a *Gracilaria gracilis* (Stackhouse) M. Steentoft, L.M. Irvine et W.F. Farnham, el fragmento secuenciado tuvo una longitud de 349 pb para *G. arbuscula* con un intergen de 88 pb y para *G. canariensis* el fragmento secuenciado fue de 347 pb y un intergen de 88 pb (tablas 14 y 15b).

Tabla. 15 Alineación de las secuencias incluyendo dos especies europeas de *Gelidium* utilizando el programa CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

```

Gelidium microdentatum      --TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGA-CCTATGGAAAGATATCAGCT
Gelidium sclerophyllum     AGTTGTGGACCTCTGCAAACAGCTCTAGA-CTTATGGAAAGATATCAGCT
Gelidium galapagense      --TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGA-CTTATGGAAAGATATCAGCT
Gelidium arbuscula        ---TGTGGACCTCTGCAAACAGCTTTAGAATGTATGGAAAGATATCTCGT
Gelidium canariensis      ---TGTGGACCTCTACAAACAGCTTTAGA-TCTATGGAAAGATATCTCAT
Gelidium pusillummorfo4    --TTGTGGACCTCTACAAACAGCATTAGA-TTTATGGAAAGATATTAGTT
Gelidium pusillummorfo1    ----GTGGACCTCTACAAACAGC-----AAAGACATCTCTT
Gelidium crinale          -----GGGACATTAGCT
Gelidium pusillummorfo2    -----
Gracilaria gracilis       -----
    
```

```

Gelidium microdentatum      TCAACTACACATCTACAGATACAGCTGATTTTGTAGAAACACCTACAGCA
Gelidium sclerophyllum     TCAACTACACATCTACAGATACAGCTGATTTTGTAGAAACACCTACAGCA
Gelidium galapagense      TCAACTACACATCTACAGATACAGCTGATTTTGTAGAAACACCTACAGCA
Gelidium arbuscula        TCAACTATACTTCTACAGATACAGCTGACTTCGTGGAAACTCCAACAGCG
Gelidium canariensis      TCAACTTTACGCTACAGACACAGCTGACTTGGTAGAAACTCCAACAGCG
Gelidium pusillummorfo4    TTAACTATACTTCTACAGATACAGCTGATTTTGTAGAAACTCCAACAGCA
Gelidium pusillummorfo1    TTAATTACACGAGTACTGACACAGCAGATTTTGTGGAAACCCCAACTGCG
Gelidium crinale          TGAACTATACGTCGACCGACACTGCTGATTTTGTAGAGACTCCAACGGCC
Gelidium pusillummorfo2    -----TACGGCG
Gracilaria gracilis       -----AACTCCAACAGCG
    
```

** **

***rbcL* final** ↓

```

Gelidium microdentatum      AACGTTTAAT-----AAAT-TACTTTTAAA-AACTTA--
Gelidium sclerophyllum     AACGTTTAAT-----AAATATACTTTTAAA-AACTTA--
Gelidium galapagense      AACGTTTAAT-----AAAT-TACTTTTAAA-AACTTA--
Gelidium arbuscula        AACGTATAATTTTTTATACTACGTTGAATTAATAATTTAAA-GAACTTCTC
Gelidium canariensis      AACGTATAATTTTTTATAACACGTTGAATTAATAATTTAAA-GACCTCTC
Gelidium pusillummorfo4    AATGTTTAAAGT-----GGACCTTTAGACCTTTATGTGGACCTATA
Gelidium pusillummorfo1    AACGCTTAAAA-----CAGCACCGAAAGGCCGATTAAAATGGCAGGGT
Gelidium crinale          AACGTTTGA-----AATTACTCTTTATTTTGACTGATT
Gelidium pusillummorfo2    AACGTTTAGCC-----GCGCCTGAACATGTGAGCCGGCGAGTCTACG
Gracilaria gracilis       AATGTATAGTA-----TATATCTATTCTTTTA--TTCTTTAT
    
```

** * *

```

Gelidium microdentatum      ---AAGG-----AGTAT---TTGAA-TA-----
Gelidium sclerophyllum     ---AAGG-----AGTAT---TTGAA-TA-----
Gelidium galapagense      ---AAGG-----AGTATA---TTGAA-TA-----
Gelidium arbuscula        TTTAAGGTTTCTAACATCTGTTTAAA-TATAAATAAGGAGTATATAAAA-
Gelidium canariensis      TGTAAGGTTTCTAACATCTGTTTAAA-TATAAATAAGGAGTATATAAAA-
Gelidium pusillummorfo4    CAAACAGCACAGAAAGGCCGATTAAAATGGCAGGGTGTGTTAGCGCCGC
Gelidium pusillummorfo1    GTTGTAGCGCCGCTGATATTTCAAGCCGGCA-----
Gelidium crinale          CACGTGTTGC--ATAAGCAGGCTATGCTTTC-----
Gelidium pusillummorfo2    CCCAGCG-----ACCACTTGTGAGAGGTG-----
Gracilaria gracilis       CTTGTGATTAGATTATTTTCATAATATTTA-----
    
```

↓ ***rbcS* inicio**

```

Gelidium microdentatum      GTGAGACTTACACAAGGTTGCTTCTCGTTCTTACCAGATTTAACTGATCA
Gelidium sclerophyllum     GTGAGACTTACACAAGGTTGCTTCTCGTTCTTACCAGATTTAACTGATCA
Gelidium galapagense      GTGAGACTTACACAAGGTTGCTTCTCGTTCTTACCAGATTTAACTGATCA
Gelidium arbuscula        GTGAGACTAACACAAGGATGTTTTCTCGTTTCTACCAGATTTAACTGACCA
Gelidium canariensis      GTGAGACTAACACAAGGAACTTTTCTCGTTTCTACCAGATTTAACTGACCA
Gelidium pusillummorfo4    ATGAGACTTACACAGGGATGCTTCTAGCTTCTCCCTGACTGCTGACGATCA
Gelidium pusillummorfo1    GTGCGACTGACCCAGGGCTGCTTATTTCTTTTGGCCAGACCCTACAGATCA
Gelidium crinale          GTGCGGCTAACCCAAGGATGTTTTCTTTTCTACCGACCTAACTGACCA
Gelidium pusillummorfo2    ATGCGACCTACACAAGGTTGTTTTAGCTTCTCCAGATCTTACTGACCA
Gracilaria gracilis       ATTTAATTAATTT--GAATGAAAATAAATGTTAATTTTTTAAACAGACAT
    
```

* * * * *

```

Gelidium microdentatum      ACAAATTGAAAAACAAATCGCTTATTGCATC-----AACAAAGGTT
Gelidium sclerophyllum      ACAAATTGAAAAACAAATCGCTTATTGCATC-----AACAAAGGTT
Gelidium galapagense        ACAAATTGAAAAACAAATCGCTTATTGCATC-----A---AAGGTT
Gelidium arbuscula          ACAAATTGAAAAACAGATCAATTATTGCATA-----AATAAGGGTT
Gelidium canariensis        ACAAATTAATAAACAGATCAATTATGCAATA-----TATAAATATT
Gelidium pusillummorfo4     ACAGATCGAAAAGCAAATCGCATACTGTATA-----AACAAAGGGTT
Gelidium pusillummorfo1     ACAGATAGAGAAAACAAATAGCGTACTGTATT-----AATTTTGGCT
Gelidium crinale            ACAGATAGAGAAGCAAATAGCTTACTGCATA-----AATAAGGGAT
Gelidium pusillummorfo2     GGAAATTGAAAAACAAATGCGTATTGCATAGCATACTGCATCAATGGAT
Gracilaria gracilis         AAAAATATTATAAGGAGTGTTTAACAGTGAG-----ATTAACACA

```

* * * * *

```

Gelidium microdentatum      GGGCATTAAACGTTGAATGGACTGATGATCCACATCCTCGTAATAGCTAT
Gelidium sclerophyllum      GGGCATTAAACGTTGAATGGACTGATGATCCACATCCTCGTAATAGCTAT
Gelidium galapagense        GGGCATTAAACGCTGAATGGACTGATGATCCACATCCTCGTAATAGCTAT
Gelidium arbuscula          GGGCACTTAATGTAGAACATACAGATGATCCTCATCCACGTAATAACTAT
Gelidium canariensis        GGACAAT-GGGGTAGAACATACAGAAGATCCTCATCCACGTAATAACTAT
Gelidium pusillummorfo4     GGGCATTGAATGTCGAGTGGACGGACGATCCACATATG-GTGAGAACTAT
Gelidium pusillummorfo1     GGGCTTTGCCCGTTAGA---ATTGG-----GTA----CAT
Gelidium crinale            GGGCTCCTAATGTGGAGT---CCGA-----CTTGGG-----AT
Gelidium pusillummorfo2     GGGCCCTCAACGTAGAATGGACTGATGATCCTCA-----TAT
Gracilaria gracilis         AGGAACTTT-----

```

*

```

Gelidium microdentatum      TGGGACCTTATTGGGG
Gelidium sclerophyllum      TGGGACCTTATGGGG-
Gelidium galapagense        TGGGACCTTATGGGG-
Gelidium arbuscula          TGGGAACT-ATGGGG-
Gelidium canariensis        TGGGAACT-ATGGGG-
Gelidium pusillummorfo4     TGGGACCTTATTGGGG
Gelidium pusillummorfo1     TGGGACCTTATTGGGG
Gelidium crinale            TGGGAACT-ATGGGG-
Gelidium pusillummorfo2     TGGGACCTTATTGGGG
Gracilaria gracilis         -----

```

Se calcularon los valores de similitud (Destombe y Douglas, 1991) para cada par de secuencias por la fórmula:

$$S = [2M / (L_1 + L_2)] \times 100$$

en donde M es el número de nucleótidos iguales, L₁ es el tamaño de la secuencia 1 y L₂ es el tamaño de la secuencia 2 y se expresa en porcentaje.

Los resultados se muestran en la tabla 16

Tabla 16. Similitud de secuencias (en %) entre las secuencias de la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*) de las 5 especies de *Gelidium* y 3 morfos de *G. pusillum*.

	<i>G. sclero</i>	<i>G. micro</i>	<i>G. galapa</i>	<i>G. crinale</i>	<i>G. pusil</i> M1	<i>G. pusil</i> M2	<i>G. pusil</i> M4
<i>G. sclerophyllum</i>	100	---	---	---	---	---	---
<i>G. microdentatum</i>	89.8	100	---	---	---	---	---
<i>G. galapagense</i>	92.2	91.4	100	---	---	---	---
<i>G. crinale</i>	64.1	62.3	62.9	100	---	---	---
<i>G. pusillum</i> (morfo 1)	28.6	28.9	28.6	21.8	100	---	---
<i>G. pusillum</i> (morfo 2)	21.9	22.2	26.3	21.6	43.2	100	---
<i>G. pusillum</i> (morfo 4)	36.5	34.7	35.4	29.6	60.9	44.9	100

El análisis muestran la cercanía entre las especies *G. galapagense* con *G. sclerophyllum* y *G. microdentatum* mostrando los valores más altos así como la baja similitud que se presenta entre los morfos de *G. pusillum*.

Se realizaron dos análisis filogenéticos, en el primero se utilizó el análisis de máxima parsimonia con el programa Paup versión 4.0, el árbol más parsimonioso se puede apreciar en la figura 23, en donde se puede notar la presencia de dos grupos, uno formado por las especies *G. microdentatum*, *G. galapagense* y *G. sclerophyllum* y el otro grupo conformado por *G. crinale* junto con los morfos de *G. pusillum*.

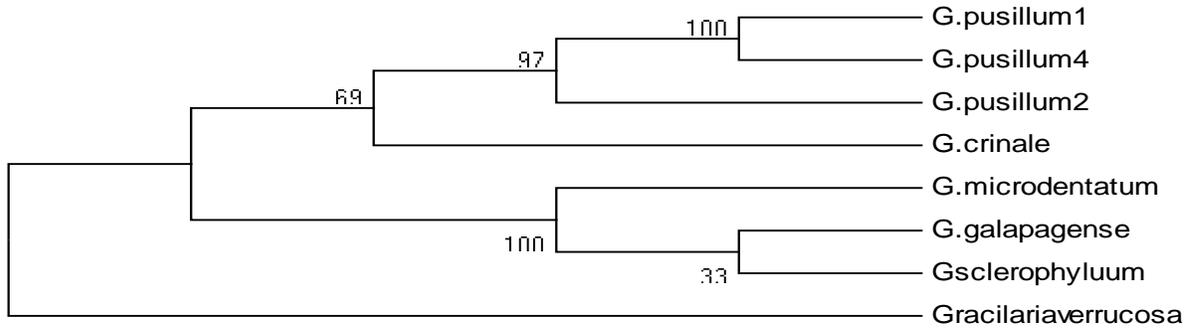


Fig. 23 Árbol más parsimonioso obtenido de la alineación de las secuencias del espaciador RuBisCo con el programa PAUP 4.0, Parsimonia 1-10 000 replicas.

Se hizo un análisis de consenso estricto “bootstrap” de 1000 árboles resultantes en cual se muestra en la topología de la figura 24.

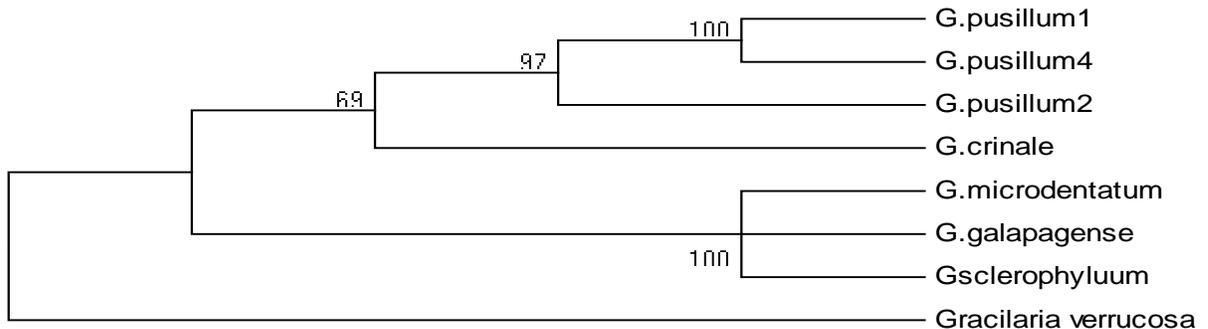


Fig. 24 Árbol más parsimoniosos obtenido de la alineación de las secuencias del espaciador RuBisCo, los valores fueron sometidos a Bootstrap con 1000 replicas.

Al igual que el anterior se realizo otro análisis pero incluyendo las especies europeas y se obtuvo el siguiente árbol en donde podemos observar que mantiene el mismo acomodo las especies del PTM forman los dos grupos y aparece un tercer grupo que es el grupo de las especies europeas y se utilizo como grupo externo a *Gracilaria gracilis*, Fig. 25

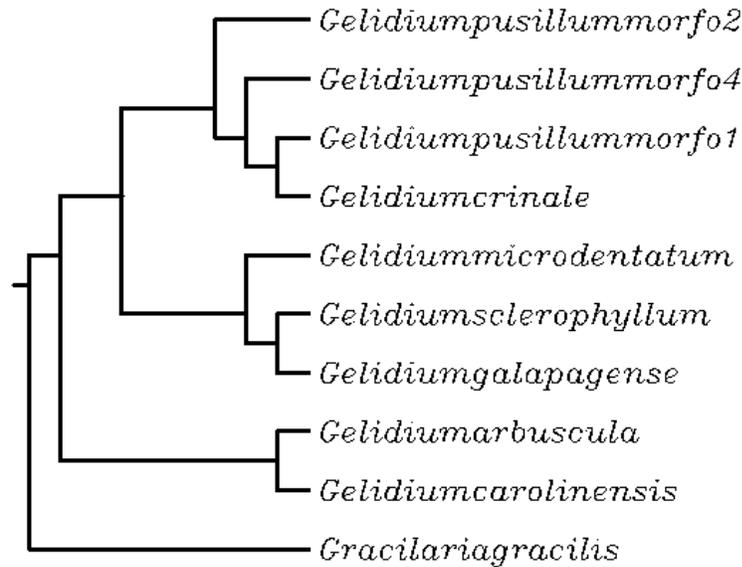


Fig. 25 Árbol más parsimonioso obtenido de la alineación de las secuencias de la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*) con el programa PAUP 4.0, Parsimonia 1-10 000 replicas, incluyendo las especies europeas.

Un segundo análisis filogenético se realizó con el programa MrBayes, (Bernardo y Smith, 1994). La representación grafica del análisis filogenético de las secuencias alineadas y analizadas con MrBayes, se muestra en la figura 26, en donde, se puede apreciar la presencia de dos grupos, uno formado por las especies *G. microdentatum*, *G. galapagense* y *G. sclerophyllum* y el otro grupo conformado por *G. crinale* junto con los morfos de *G. pusillum*.

Los resultados mostraron que las especies más cercanas son *G. galapagense* y *G. sclerophyllum* seguida por la *G. microdentatum* y más lejana se encuentra la especie *G. crinale*, y los morfos de *G. pusillum* se ubican como otro grupo

Para obtener el árbol consenso, con un valor del mejor árbol de 0.439, de utilizó el modelo de Evolución GTR que nos indica la tasa evolutiva rápida, intermedia y lenta (Takezaki *et al.*, 1995). Lo que se puede observar en el árbol consenso es que en los morfos de *G. pusillum* y en *G. crinale*, se presenta una tasa evolutiva considerada rápida a diferencia de *G. galapagense*, *G. microdentatum* y *G. sclerophyllum* las cuales presentan una tasa evolutiva lenta esto es, han tenido pocos cambios a lo largo de su existencia a diferencia de *G. crinales* junto con los morfos de *G. pusillum* quienes han presentado un gran numero de cambios durante su evolución.

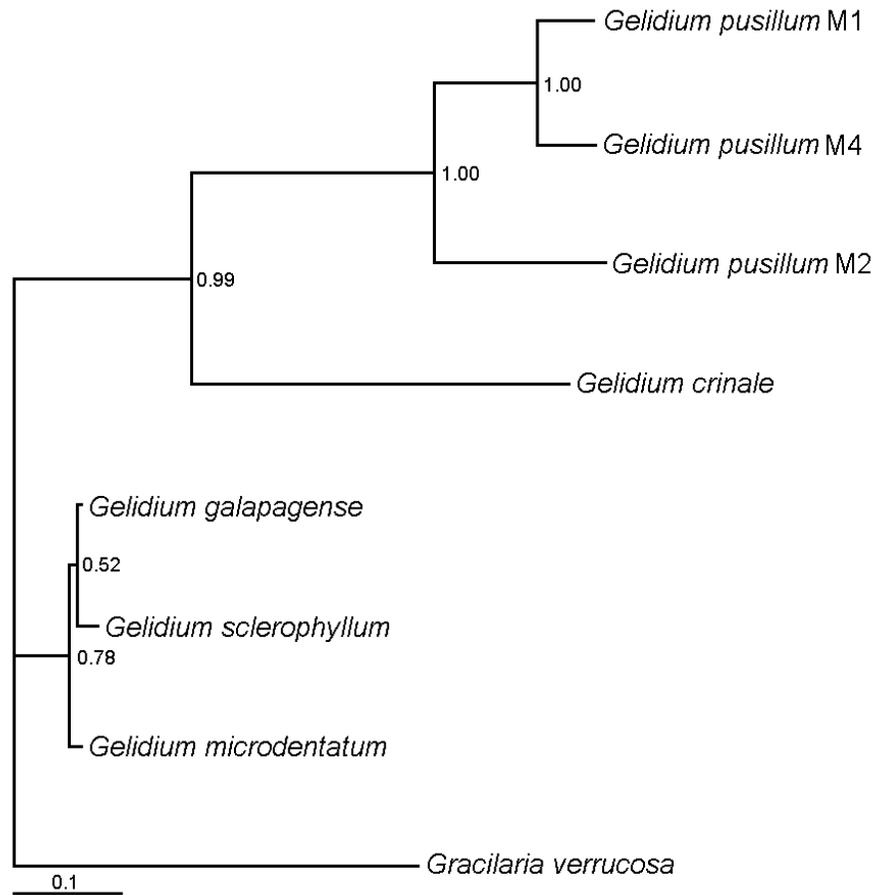


Fig. 26 Árbol consenso análisis MrBayes (Escala 0.1 corresponde al número de cambio por residuo.)

Las secuencias de la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*) en las especies de *Gelidium* resultaron ser ricas en A+T nucleótidos (60 %). La alta proporción de nucleótidos A+T ha sido descrita para la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*) de varias Rhodophyta (Freshwater, *et al.*, 1995), en Chromophyta *Ectocarpus siliculosus* (Valentine y Zetsche, 1990a) y también en Cryptophyta (Douglas y Durnford, 1989).

El análisis de las secuencias de los productos de amplificación-PCR de la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*) ha demostrado ser un método factible para la diferenciación entre miembros de algunas especies Rhodophyta, como por ejemplo en Gracilariaceae que presentan fenotipos similares, en contraste con los análisis RFLP's los cuales requieren de grandes cantidades de DNA, lo que no ocurre con el espaciador en el que se utilizan pequeñas cantidades de DNA purificado, la información de la secuencia puede ser generada rápidamente y la existencia de suficiente variabilidad en la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*), nos permite delimitar diferentes

taxa en las algas hasta nivel específico, como ocurrió con secuencias divergentes entre *Gracilaria verrucosa* y especies cercanas, el porcentaje de variabilidad que fue considerado para determinar diferenciación entre estas especies fue de 3 y 7 % (Destombe y Douglas, 1991). Linda Goff *et al.*, (1994) utilizó el espaciador de la rubisco y los ITS para delimitar entre las especies de dos géneros *Gracilariopsis* y *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta), las especies de éstos géneros presentan grandes similitudes morfológicas y con el uso de la regiones moleculares se pudo confirmar la existencia de dos géneros en lugar de uno solo, utilizando un porcentaje de diferencia del 3 a 6 %. Brodie *et al.*, (1996) pudieron delimitar dos especies morfológicamente similares de *Porphyra* (Bangiophyceae, Rhodophyta) con la ayuda del espaciador utilizando un porcentaje de hasta 1.3% de variabilidad genética. También se ha realizado el uso de este espaciador en otras divisiones como en Phaeophyta (Siemer, *et al.* 1998, Yoon y Min Boo, 1999, Yoon, *et al.*, 2001).

Los oligonucleótidos que se utilizan son secciones altamente conservadas de la 3' región final del gen *rbcl* (TGTGGACCTCTACAAACAGC) y la región inicial conservada 5' del gen *rbcS* (CCCCATAGTTCCCAAT) (Maggs *et al.*, 1992; Goff *et al.*, 1994; Brodie *et al.*, 1996). El tamaño de la región espaciadora entre los genes en las Rhodophyta va desde 77 pb en especies de *Porphyra* (Bangiales) hasta 352 pb en *Gracilaria pacifica* (Gigartinales). Esta región presenta polimorfismo lo que nos permitirá determinar variabilidad genética inter e intra específica, en las algas.

El porcentaje de diferenciación que presentaron las 5 especies fue desde 7.6% entre *G. galapagense* y *G. microdentatum* hasta un 78.4% de diferenciación entre *G. crinale* y *G. pusillum* morfo 2. Estas últimas fueron las especies más separadas.

Por otra parte, se realizó el mismo análisis filogenético (MrBayes), pero esta vez, utilizando las secuencias de la región espaciadora RuBisCo (*rbcl-rbcS*) reportadas para especies de Rhodophyta, incluyendo las 7 secuencias de *Gelidium* obtenidas en el presente trabajo.

Se alinearon las secuencias de la región espaciadora RuBisCo (*rbcl-rbcS*) de las Rhodophyta utilizando el programa "Bioedit" (Bio Edit Sequence Alignment Editor versión 5.0) con un castigo de 2 gaps y se le dio el valor 5 al tamaño de los gaps. Como grupos externos se utilizaron a *Fucus vesiculosus* Linnaeus C, *Alaria crassifolia* Kjellman y a *Scytosiphon lomentaria* (Lyngbye) Link todas ellas pertenecientes a la división Phaeophyta.

El árbol de máxima parsimonia, se obtuvo con el análisis bayesiano (Fig. 27), en el se puede apreciar que existen diferentes tasas de evolución en las especies de Rhodophyta (rápida, intermedia y lenta). Para poder ver cual es la tendencia de estas tasas evolutivas se hizo un análisis estadístico en donde se analiza la longitud de las ramas y se comparan con los tamaños del

espaciador (pb=pares de bases). Los valores se presentan en la tabla 17 (Anexo 4) y los resultados del análisis se puede observar en la grafica que se realizó con el graficador Sigma Plot (Scientific Graph System, Versión 1.02) (Fig. 28).

En dicha grafica se puede ver una tendencia general al incremento del tamaño del intergen. Los grupos con una mayor tasa de cambio corresponden a los que presentan un intergen de mayor tamaño y una variación de tamaño también mayor.

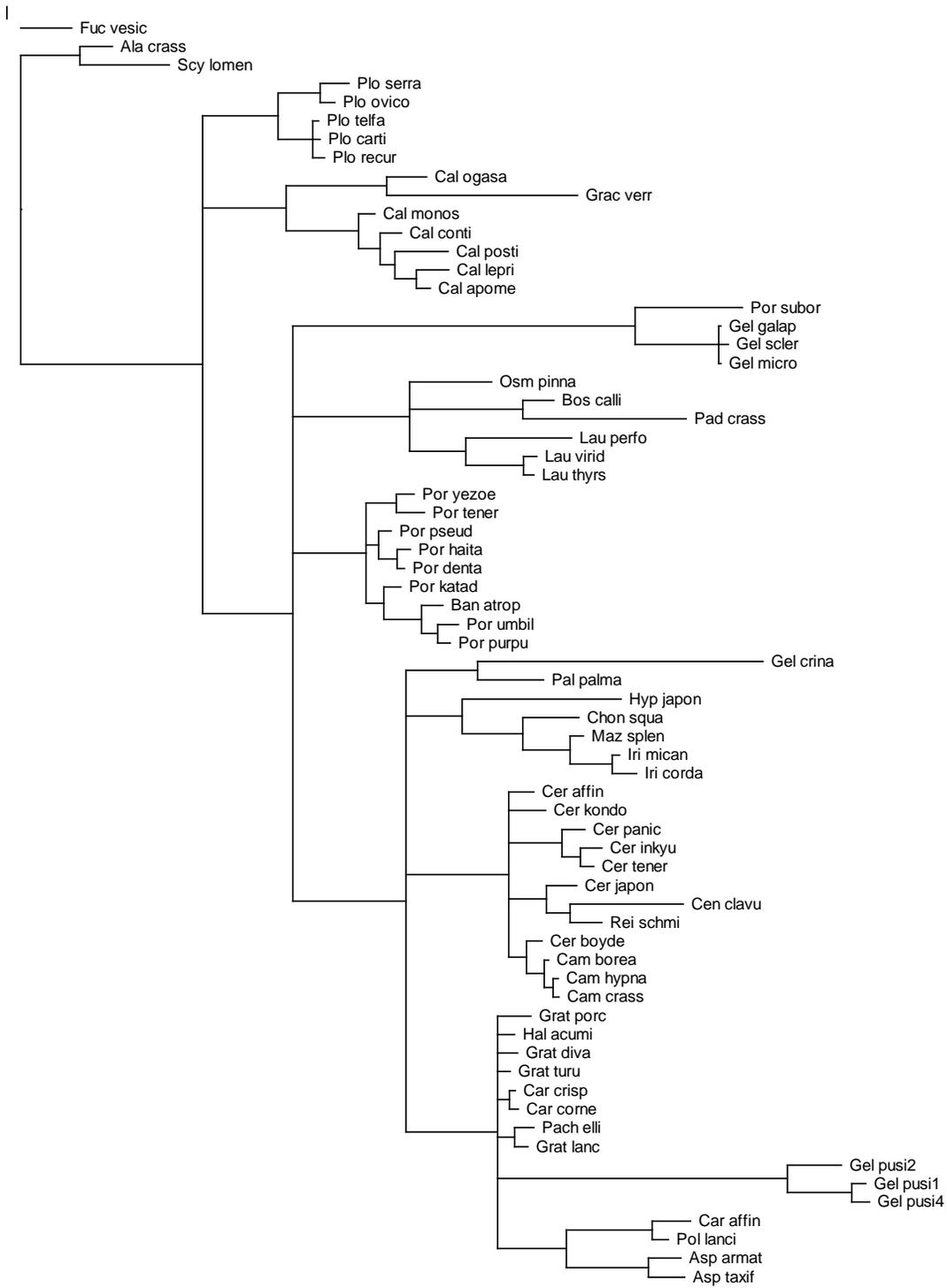


Fig. 27 Árbol filogenético utilizando la región espaciadora RuBisCo (*rbcL-rbcS*) con el análisis MrBayes (Escala 0.1 corresponde al número de cambio por residuo).

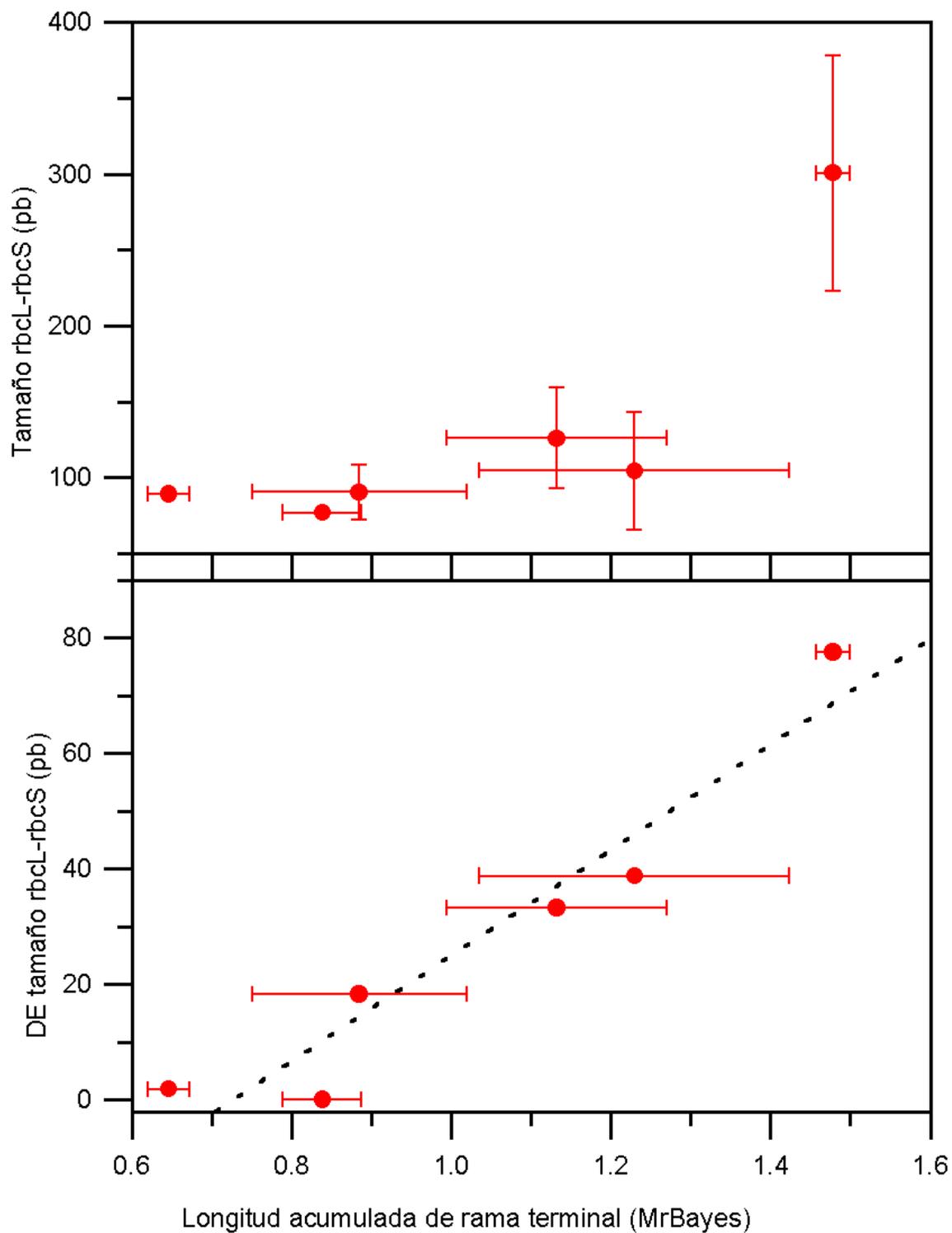


Fig. 28 Gráfica en donde se compara el tamaño de la región espaciadora RuBisCo (*rbcl-rbcS*) con la longitud acumulada de la rama terminal (MrBayes). Regresión lineal $b=66.4$ $m=91.43$ $r^2= 0.92$

Para poder determinar si alcanzan el estado de especie se hizo un análisis en el que se correlaciona las fracciones de los tamaños promedios de las ramas terminales entre especies cercanas con la longitud total promedio del intergen.

$$f \text{ interspp} = \frac{L \text{ interspp}}{L_t \text{ prom}} \quad / \quad L_t \text{ prom}$$

L inter spp corresponde a la longitud de la rama entre especies, L_t prom es la longitud promedio y f inter spp se refiere a la fracción entre especies.

Los resultados del análisis realizado nos indican que las especies de *Gelidium* del PTM, entran dentro del estado de especies con un 95% de correlación. *G. galapagense*, *G. microdentatum* y *G. sclerophyllum* son especies muy cercanas con una longitud de rama terminal muy corta, esto nos podría indicar que recientemente ha ocurrido el fenómeno de especiación, son especies de origen muy reciente, *G. crinale* presentan una longitud mayor que nos indica que es una especie que se separo antes.

Los morfos de *G. pusillum* presentan diferencias equivalentes a las diferencias que presentan otras especies dentro de su género, por lo que se podría decir que los morfos de *G. pusillum* alcanzan la categoría de especie y esta posición se puede apreciar en la gráfica de la figura 29, en donde los valores de *Gelidium* se encuentran dentro del área correspondiente.

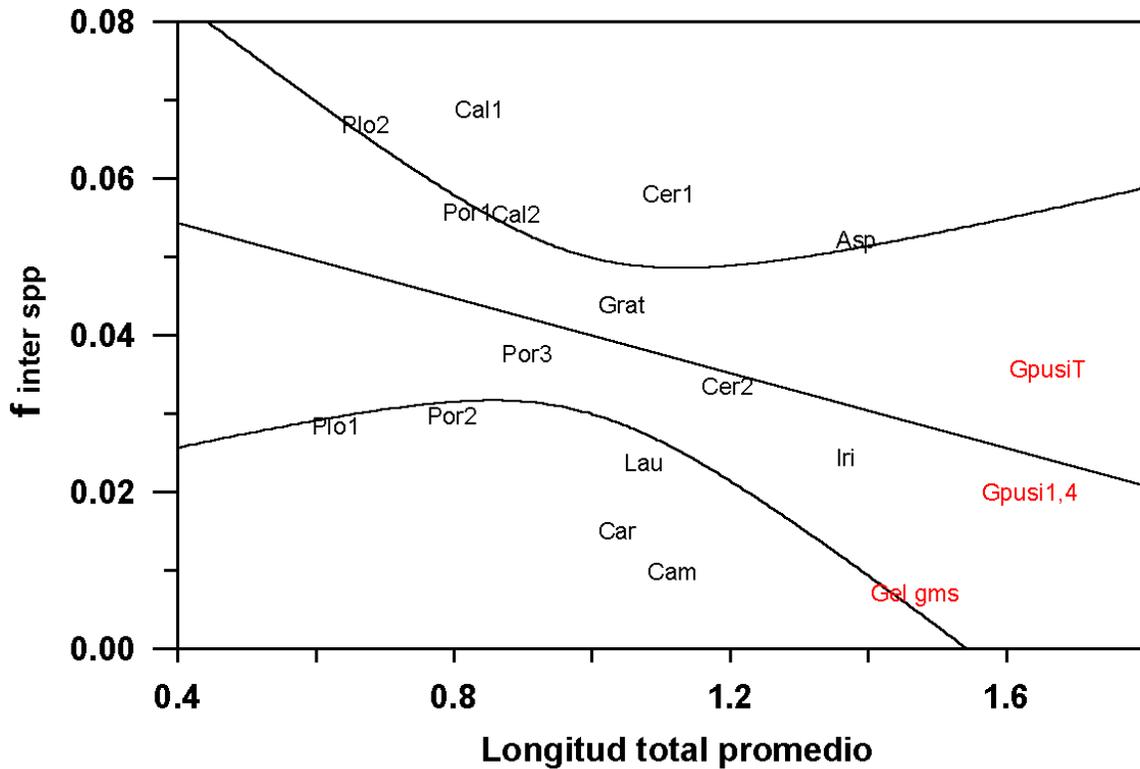


Fig. 29 Gráfica que nos indica si las especies de *Gelidium* alcanzan la categoría de especie, las siglas corresponden a los nombres de las especies de la tabla 14.

Con los resultados obtenidos se puede apreciar que a pesar de la gran similitud morfológica que presentan las especies de *Gelidium* del PTM, se trata de especies bien definidas, con estrategias similares y morfologías similares y con su propio genoma (Figuras 30-35). Los análisis realizados nos ubican a las especies de *G. galapagense*, *G. microdentatum*, *G. sclerophyllum* y *G. crinale* como especies definidas, asimismo los análisis nos indicaron que la especie conocida como *G. pusillum* con morfos diferentes, corresponden a especies distintas. Sin embargo, consideramos importante el uso de otras herramientas moleculares como los ITS, 18s RNA entre otros, para tener un mayor número de fundamentos para poder proponer a los morfos de *G. pusillum* como especies nuevas, dentro del Pacífico Tropical Mexicano.

Gelidium crinale

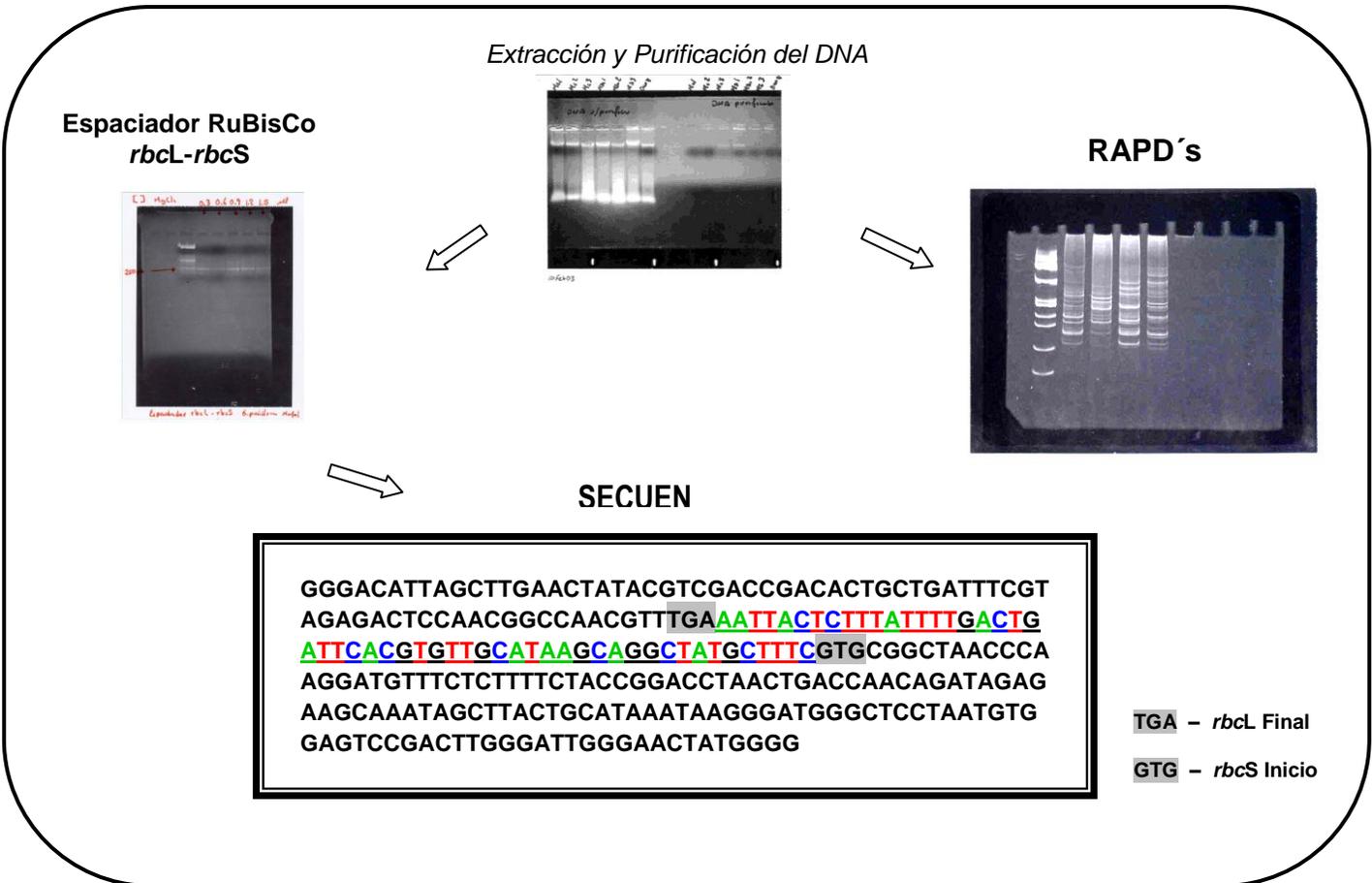
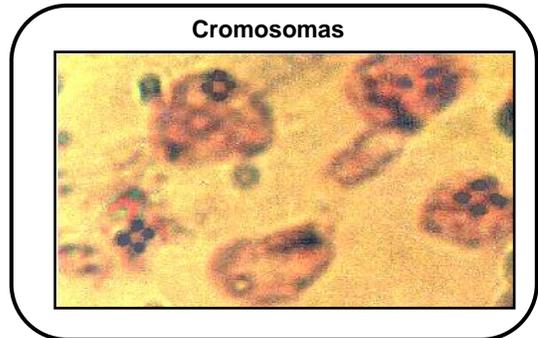
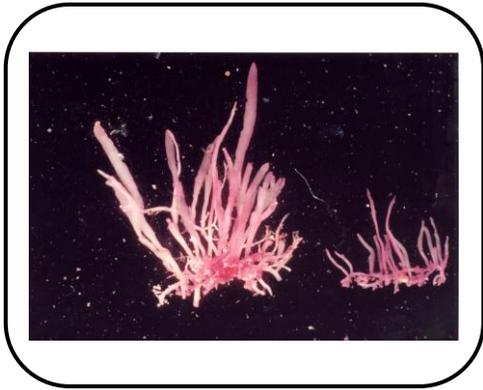
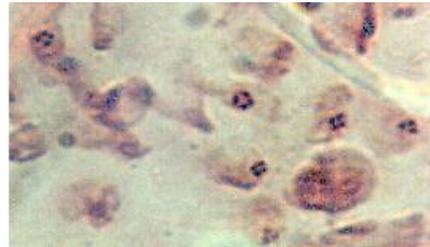


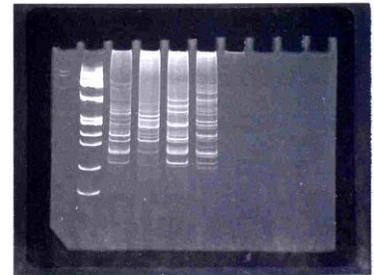
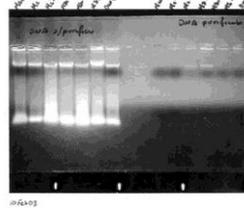
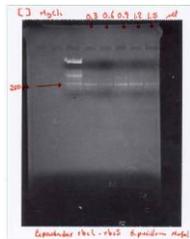
Fig. 30 *Gelidium crinale*

Gelidium galapagense



Extracción y Purificación del DNA

Espaciador RuBisCo
rbcL-rbcS



SECUEN

```

TTGTGGACCTCTACAAACAGCTCTAGACTTATGGAAAGATATCAGC
TTCAACTACACATCTACAGATACAGCTGATTTTGTAGAAACACCTA
CAGCAAACGTTTAATAAATTACTTTTAAAAAACTTAAAGGAGTATA
TTGAATAGTGAGACTTACACAAGGTTGCTTCTCGTTCTTACCAGAT
TTAACTGATCAACAAATTGAAAAACAAATCGCTTATTGCATCAAAG
GTTGGGCATTAACGCTGAATGGACTGATGATCCACATCCTCGTA
ATAGCTATTGGGACCTTATGGGG
    
```

TGA - *rbcL* Final
GTG - *rbcS* Inicio

Fig. 31 *Gelidium galapagense*

Gelidium microdentatum

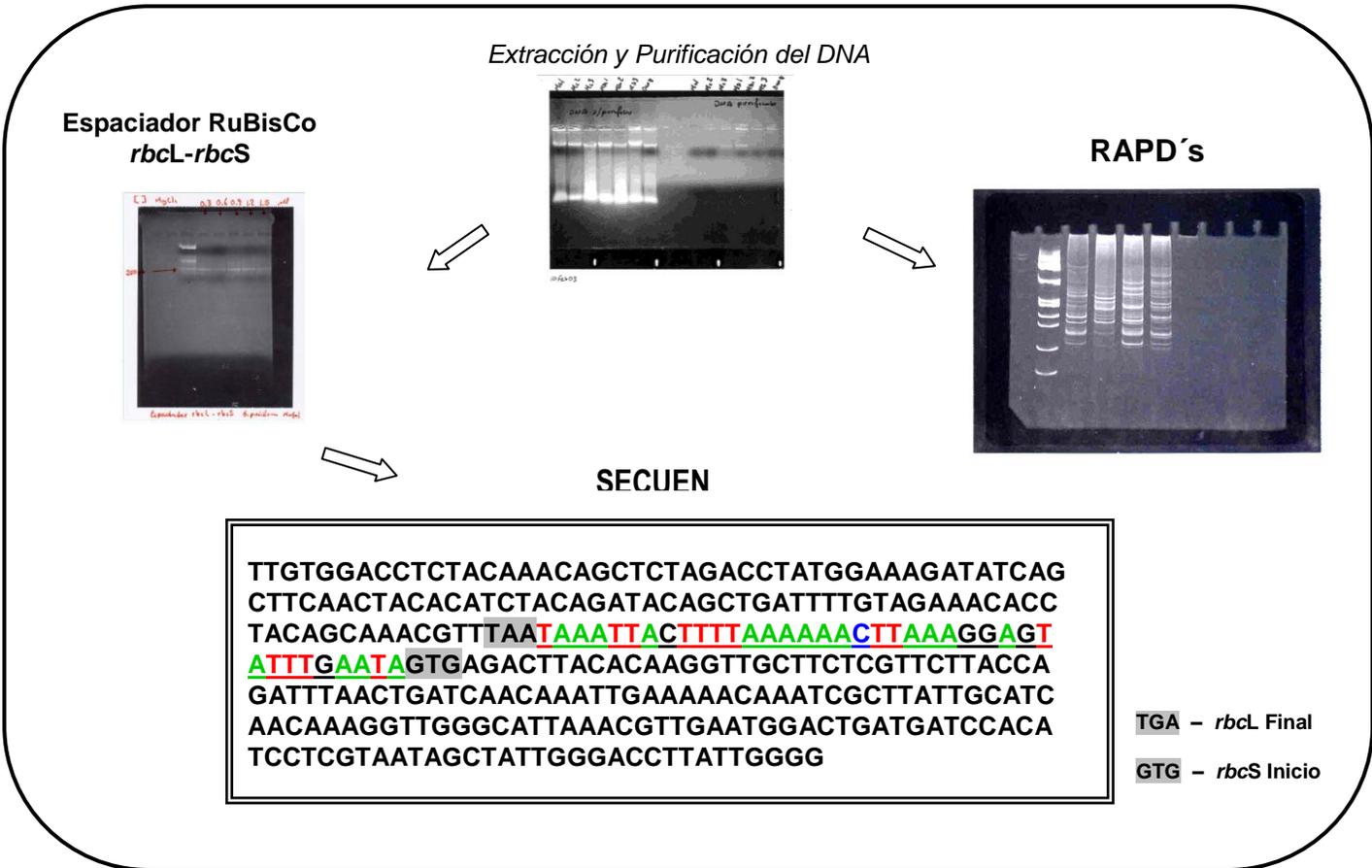
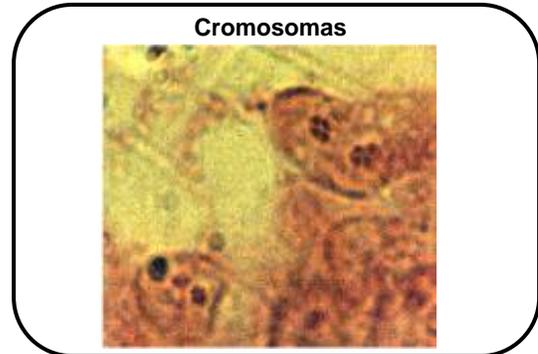
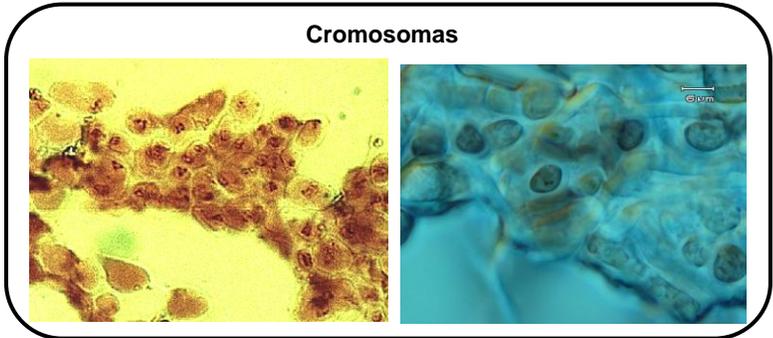
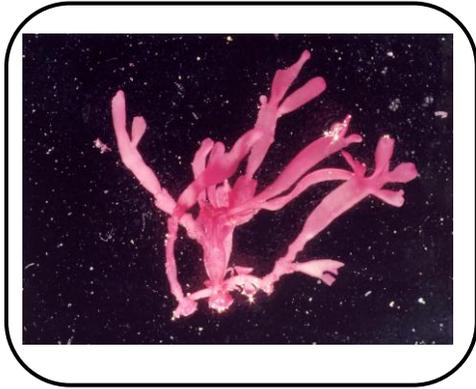
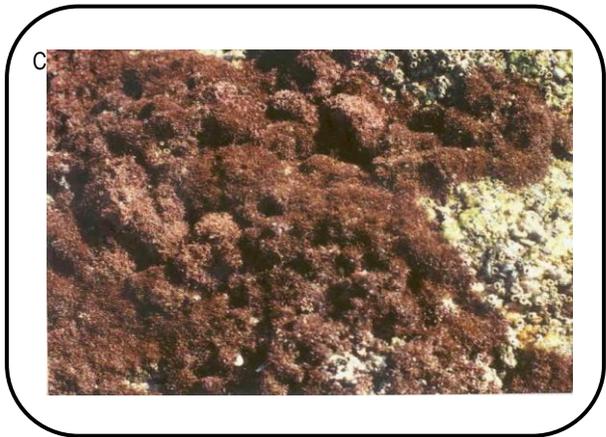


Fig. 32 *Gelidium microdentatum*

Gelidium sclerophyllum



Extracción y Purificación del DNA

Espaciador RuBisCo
rbcL-rbcS

SECUEN

```

AGTTGTGGACCTCTGCAAACAGCTCTAGACTTATGGAAAGATATCAGCTT
CAACTACACATCTACAGATACAGCTGATTCGTAGAAACACCTACAGCAA
ACGTTTAATAAATATACTTTTAAAAACTTAAAGGAGTATTTGAATAGTGA
GACTTACACAAGGTTGCTTCTCGTTCTTACCAGATTAACTGATCAACAAA
TTGAAAAACAATCGCTTATTGCATCAACAAAGGTTGGGCATTAAACGTT
GAATGGACTGATGATCCACATCCTCGTAATAGCTATTGGGACCTTATGGG
    
```

RAPD's

TGA - *rbcL* Final
GTG - *rbcS* Inicio

Fig. 33 *Gelidium sclerophyllum*

Gelidium pusillum

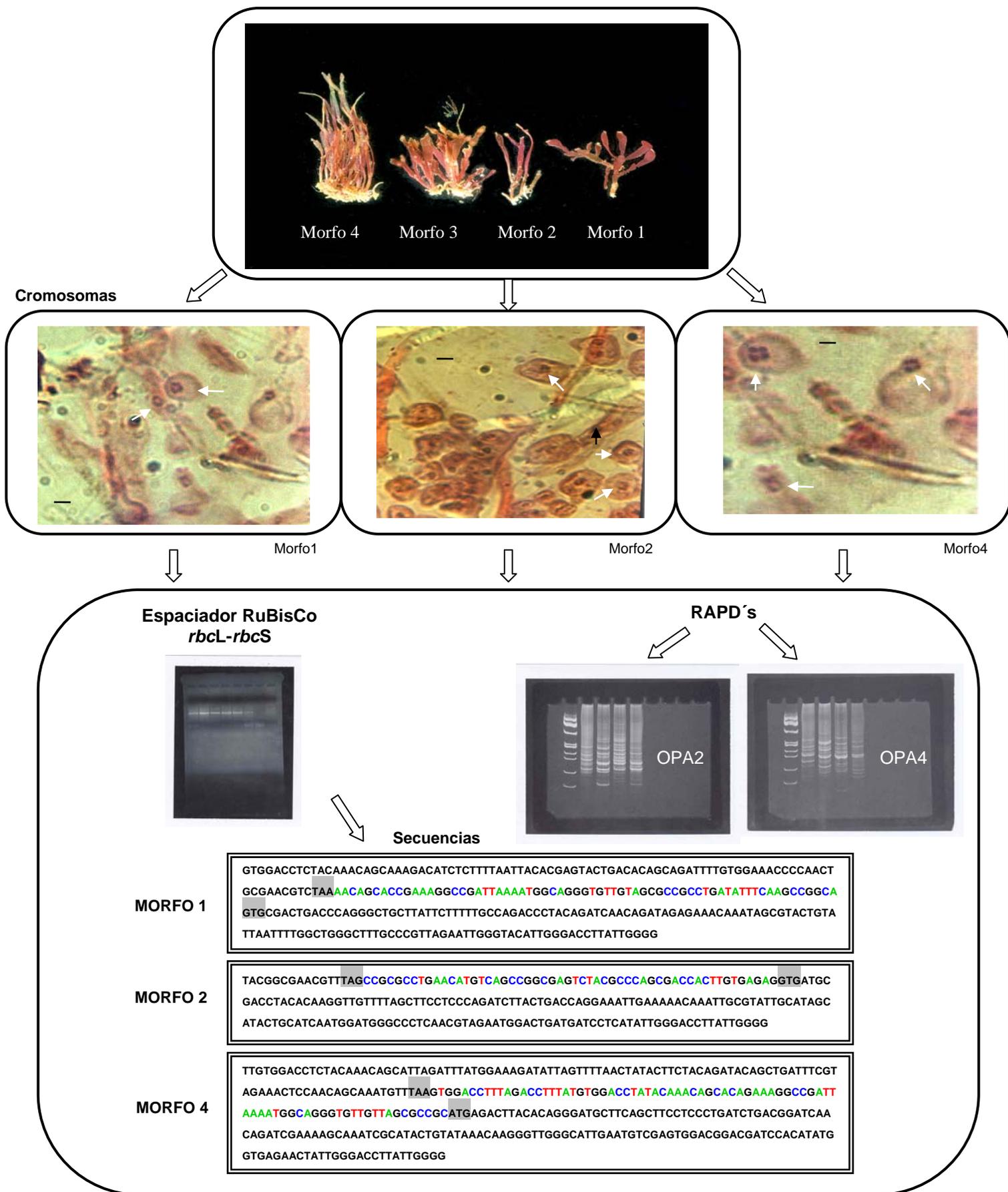


Fig. 34. *Gelidium pusillum* morfos 1-2-4

CONCLUSIONES

1. El análisis citogenético confirma que el ciclo de vida de las especies de *Gelidium* (Gelidiales, Rhodophyta) presenta fases alternantes con diferente número de ploidía, una haploide y otra diploide; que son isomórficas, dónde la mayor frecuencia de aparición la presenta el talo diploide o tetrasporofítico.
2. La presencia de estas fases alternantes en el ciclo de vida de estas especies, así como la presencia de estructuras reproductivas correspondientes a las fases mencionadas para el resto de las especies del orden Gelidiales: soros tetrasporangiales en el talo diploide y cistocarpos en el talo haploide, permiten presumir que el ciclo de vida es del Tipo *Polysiphonia* a pesar de no haber observado la meiosis espórica.
3. Asimismo, el trabajo citogenético realizado sobre 200 mitosis en cada una de las poblaciones analizadas de cada una de las especies incluidas en este proyecto de investigación, permitió reconocer ligeras variaciones a nivel cromosómico.
 - El tamaño máximo presentado en cada una de las especies varió entre 0.5 – 0.8 μm y los valores específicos fueron: *G. crinale* con un tamaño promedio de 0.5 μm , *G. galapagense* de 0.65 μm , *G. microdentatum* y *G. pusillum* presentaron un tamaño de 0.7 μm y el de mayor tamaño fue *G. sclerophyllum* con 0.8 μm .
 - Sobre la forma de los cromosomas, muy semejante entre todas las especies y generalmente de forma esférica, solo fue posible reconocer algunas variaciones por un ligero alargamiento en los polos.
4. Todas las especies presentan un valor de ploidía de $2n = 4$, de lo que se desprende que el valor haploide es $n = 2$. Sólo en *G. sclerophyllum* se encontraron células haploides con $n = 2$.
5. *Gelidium sclerophyllum* fue la única especie que presentó variaciones en el número cromosómico de ± 1 :
 - Los talos tetrasporofíticos (diploides) mostraron un número modal de $2n = 4 \pm 1$
 - Los talos gametofíticos (haploides) presentaron una variación de $n = 2 \pm 1$.

6. Los números de ploidía de todas las especies estudiadas son notablemente más pequeños que los registrados para otras especies de *Gelidium* cuyos valores haploides son de $n = 5 - 29$. Aun no se cuenta con una explicación conclusiva sobre tales diferencias.
7. Los análisis moleculares (RAPDs y la Región Espaciadora RuBisCo) permitieron precisar la magnitud de la variación entre las especies de *Gelidium* del PTM. Los resultados de ambos tipos de análisis concuerdan en la segregación interespecífica, incluso entre los diferentes morfos de *Gelidium pusillum*, permitiendo concluir que en el PTM se encuentran 7 especies de *Gelidium*.
8. El análisis de la Región Espaciadora RuBisCo de las diferentes especies, evidenció una variación mínima entre las secuencias y en dos especies fueron iguales. Las diferencias que permitieron la resolución de las relaciones interespecíficas correspondieron a los fragmentos de DNA de la región final de la *rbcL* y la región inicial de la *rbcS*.
9. *Gelidium galapagense* hasta el momento constituía un registro dudoso para el Pacífico Tropical Mexicano. Sin embargo, con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye y confirma que es una especie presente en la región.
10. Finalmente, es necesario resaltar la importancia de la aplicación de herramientas complementarias, como la citogenética y la biología molecular, en la solución de problemas de índole taxonómico.

LITERATURA CITADA

- Abbott I.A. and G.L. Hollenberg 1976. *Marine algae of California*. Stanford University Press. Stanford, California. 827p.
- Athanasiadis A. 1983. The life history of *Antithamnion heteroclajum* (Rhodophyta, Ceramiales) in culture. *Botánica Marina* 26: 153-7.
- Austin A.P. 1959. Iron-alum aceto-carmin staining for chromosomes and other anatomical features of Rhodophyceae. *Stain. Technol.* 34: 69-75.
- Bailey J.C. and D.W. Freshwater 1997. Molecular systematics of Gelidiales: inferences from separate and combined analyses of plastid rbcL and nuclear SSU gen sequences. *Eur. J. Phycol.* 32: 343-352.
- Baird E., Cooper-Bland S., Waugh R., de Maine M, and W. Powell 1992. Molecular characterization of inter- and intra-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Mol. Gen. Genet.* 233:469-475
- Bernardo J. M. and A. F. M. Smith 1994. *Bayesian Theory*. Wiley, Chichester.
- Bouza N., J. Caujapé-Castells, M.A. González-Pérez and P.A. Sosa 2006. Genetic structure of natural populations in the red algae *Gelidium canariense* (Gelidiales, Rhodophyta) investigated by Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) Markers. *J. Phycol.* 42:304-311
- Bradshaw A.D. 1965. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. *Advances in Genetics* 13:115-155.
- Briand L., Brown, A.E. Lenne, J.M. and D.M. Teverson 1998. Random amplified polymorphic DNA variation with and among bean landrace mixture (*Phaseolus vulgaris* L.) from Tanzania. *Euphytica* 102:371-377
- Brodie J. , P.K. Hayes, G.L. Baker, and L.M. Irvine 1996. Molecular and morphological characters distinguishing two *Porphyra* species (Rhodophyta: Bangiophycidae). *Eur. J. Phycol.* 31:303-308
- Brodie J. , P.K. Hayes, G.L. Baker, L.M. Irvine and I. Bartsch 1998. A reappraisal of *Porphyra* and *Bangia* (Bangiophycidae, Rhodophyta) in the Northeast Atlantic based on the rbcL-rbcS intergen spacer. *J. Phycol* 34:1069-1074
- Candelaria S.C.F. 1985. *Caracterización de la ficoflora de la localidad de Puerto Escondido, Gro.* Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México. pp.101,102,104,107.
- Carter A.R. 1993. Chromosome observations relating to bispore production in *Gelidium pristoides* (Gelidiales, Rhodophyta). *Bot. Mar.* 36:253-256.
- Chai-Ling H., P.Siew. Moi and P. Tikki 1995a. Molecular characterisation of *Sargassum polycystum* and *S. siliquosum* (Phaeophyta) by polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers. *J. Appl. Phycol.* 7:33-41
- Chai- Ling H., P. Siew-Moi and P. Tikki 1995b. Application of polymerase chain reaction (PCR) using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers in the molecular identification of selected *Sargassum* species (Phaeophyta, Fucales). *Eur. J. Phycol.* 30: 273-280
- Chávez M.L. 1972. *Estudio de la flora marina de la Bahía de Zihuatanejo y lugares adyacentes*. Memorias IV Congreso Nacional de Oceanografía (México), 265-271 p.

- Cole K.M. 1990. Chromosomes. In: Cole K.M. and R.G. Sheath (eds.). *Biology of the Red Algae*. Cambridge Univ. Press. pp. 73-102.
- Cole K.M., B.J. Hymes, and R.G. Sheath 1983. Karyotypes and reproductive seasonality of the genus *Bangia* (Rhodophyta) in British Columbia, Canada. *J. Phycol.* 19: 136-145.
- Coletta-Filho H.D., Machado, M.A., Targo, M.L.P.N., Moreira, M.C.P.Q.D.G. and Pompeu Jr. J. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus spp.*) using RAPD markers. *Euphytica* 102:133-139.
- Coll J. and E.C. Oliveira 1977. Chromosome counting on 79-year-old dried seaweed, *Porphyra leucosticta*. (Rhodophyta). *Experimentia* 33:102.
- Crow J. F., W.H. Freeman and Co. 1986. *Basic Concepts in Population, Quantitative, and Evolutionary Genetics.*, New York, NY.
- Dawes C.J. 1986. *Botánica Marina*. Ed. Limusa, México. 673p.
- Dawson E.Y. 1944. *The marine algae of the Gulf of California*. Allan Hancock Pacific Expedition 3 (10): 189-464.
- Dawson E.Y. 1953. *Marine red algae of Pacific Mexico* Part 1: Bangiales to Corallinoideae. Allan Hancock Pacific Expeditions 17(1):1-239.
- Dawson E.Y. 1961. *Marine red algae of Pacific Mexico*. Part. 4. Gelidiales. *Pac. Nat.* 2: 191-343.
- Del Grosso F. 1981. Studio cariologico in *Sirodotia huillensis* (Welw.) Skuja (Rhodophyta). *Inform. Bot. Ital.* 13: 126-127.
- Destombe C. and S.E. Douglas 1991. Rubisco spacer sequence divergence in the rhodophyte alga *Gracilaria verrucosa* and closely related species. *Curr. Genet.* 19:395-398
- Dixon P. S. 1958. The structure and the development of the thallus in the British species of *Gelidium* and *Pterocladia*. *Ann Bot. N.S.* 22:353-368
- Dixon P. S. 1961. On the classification of the Florideae with particular reference to the position of the Gelidiaceae. *Bot. Mar.* 3:1-6
- Dixon P. S. 1966. The Rhodophyceae. En: (Godward M.B.E. Ed.) *The Chromosomes of the Algae*. New York. pp. 168-204.
- Dixon P.S. 1982. Life histories in the Florideophyceae with particular reference to the Nemaliales *sensu lato*. *Bot. Mar.* 25: 611-621
- Dixon P.S. and Irvine L.M. 1977. *Seaweeds of the British Isles. Rhodophyta*, Part 1 Introduction Nemaliales, Gigartinales. British Museum (Natural History) London 25pp
- Douglas S.E. and Durnford D.G. 1989. The small subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase is plastid – encoded in the chlorophyll *c* – containing algae *Cryptomonas*. *Plant Mol. Biol.* 13:13-20
- Dreckmann E.K. 1987. *Algas marinas bénticas de Playa San Telmo, Michoacán, México*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 170 p.
- Dreckmann E.K., Pedroche F.F. y Senties G.A. 1990. Lista florística de las algas marinas bentónicas de la costa norte de Michoacán, México, *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 50:19-42.
- Dutcher J.A. and D.F. Kapraun 1994. Random polynorphyc DNA (RAPD) identification of genetic variation in three species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta). *J. Appl. Phycol* 6: 267-273.

- Feldmann J. and Halmel G. 1934. Observations sur quelques Gelidiacees. *Rev. Gen. Bot.* 46:528-549
- Filipe A., R. S. and J.M. Leitaó 1997, DNA extraction and RAPD markers to assess the genetic similarity among *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) populations. *J. Phycol.* 33: 706-710.
- Filipe A., R. S. and J.M. Leitaó 1999. Assessing Patterns of geographic dispersal of *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) Through RAPD differentiation of populations. *Mar. Ecol.* 191:101-108
- Fontdevila A. y A. Moya 1999. *Introducción a la Genética de Poblaciones*. Editorial Síntesis. Madrid. 267p
- Fontdevila, A. y A. Moya 2000. *Introducción a la Genética de Poblaciones*. Ed. Gea librería España 349 p.
- Fredericq S. and M.E. Ramírez 1996. Systematic studies of the Antarctic species of the Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on *rbcl* sequence analysis. *Hydrobiologia* 326/327:137-143.
- Fredericq S., M.H. Hommersand and D.W. Freshwater 1996. The molecular systematic of some agar-and carrageenan-containing marine red algae based on *rbcl* sequence analysis. *Hydrobiologia* 326/327:125-135.
- Fredriksen S., M.D. Guiry and J. Rueness 1994. Morphological and biosystematic studies of *Gelidium pusillum* and *G. pulchellum* (Gelidiaceae, Rhodophyta) from Europe. *Phycologia* 33(6):462-470.
- Freshwater D.W. 1993. *Molecular systematics of the gelidiales based upon rbcl sequence analysis*. Ph. D. (Univ. of North Carolina, Chapel Hill). 56 pp.
- Freshwater D.W. and 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 and M.H. Hommersand 1995. A molecular phylogeny of the Gelidiales (Rhodophyta) based on analysis of plastid *rbcl* nucleotide sequences. *J. Phycol.* 31:616-632.
- Galindo-Villegas J., Gamboa, J.A. y Dreckmann, K.M. 1997. Estudio de las macroalgas marinas del puerto de Salina Cruz en el Golfo de Tehuantepec, Pacífico tropical mexicano. *Polibotánica* 4: 1-9.
- García V. A. 1977. *Manual de técnicas de citogenética*. Colegio de Posgraduados. México. 118 p.
- García E. 1988. *Modificaciones al sistema de clasificaciones climáticas de Köppen*. 5ta Edición. FOCET Larios. México.
- García E. y Falcón, Z. 1980 *Nuevo Atlas Porrúa de la República Mexicana*. Ed. Porrúa. México. 197 pp.
- Giménez-Martín G., A. González-Fernández, A. Del Campo and C. De la Torre 1982. The role of protein synthesis in cell progression through G2 and mitosis in plant multinucleate cells. *Biol. Cell.* 46:161-174.
- Gianoli E. 2004. Plasticidad fenotípica adaptativa en plantas. (En) *FISIOLOGÍA ECOLÓGICA EN PLANTAS Mecanismos y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas*. Marino C.H. (ed.) EUV Valparaíso (Chile) pp. 13 - 25
- Godin J., C. Destombe and C.A. Maggs 1993. Unusual chromosome number of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta) in the Cape Griz-Nez area, northern France. *Phycologia* 32:291-294.
- Goff L. J. and A. W. Coleman 1986. A novel pattern of apical cell polyploidy, sequential polyploidy reduction and intercellular transfer in the red alga *Polysiphonia*. *American Journal of Botany* 73: 1109-1130.
- Goff L.J., D.A. Moon and A. W. Coleman 1994. Molecular delineation of species relationships in red algal agarophytes *Gracilariopsis* and *Gracilaria* (Gracilariales). *J. Phycol.* 30:521-537

- González-González J. 1992. *Estudio florístico ecológico de ambientes y comunidades algales del litoral rocoso del Pacífico tropical mexicano*. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM. México. 167p.
- González-González J. 1993. Comunidades algales del Pacífico Tropical Mexicano 423p. In: Biodiversidad *Marina y Costera de México*. S.I. Salazar-Vallejo y N.E. González (eds.) *Com. Nal. Biodiversidad y CIQRO, México* 869 pp.
- González-González J., M. Gold-Morgan, H. León-Tejera, C. Candelaria-Silva, D. León-Alvarez, E. Serviere y D. Fragoso 1996. *Catálogo onomástico (nomenclátor) y bibliografía indexada de las algas bentónicas marinas de México*. Cuadernos del Instituto de Biología 29. UNAM. México. 492 p.
- Guerra M. 2000. Chromosome number variation and evolution in monocots. En (Wilson, K. L. and Morrison, D. A. Eds.) *Monocots: Systematics and Evolution*. CSIRO, Melbourne. pp. 127-136.
- Guiry M.D. 2007. *AlgaeBase*. <http://www.algaebase.org>.
- Hartl D. L. and A. G. Clark 1997. *Principles of Population Genetics*. 3ª edición. Sinauer, Sunderland, Mass., USA.
- Hedrick P. W. 2000. *Genetics of Populations*. 2ª edición. Jones and Bartlett, Boston, USA.
- Hommersand M.H. and S. Fredericq 1988. An investigation of cystocarp development in *Gelidium pteridifolium* with a revised description of the Gelidiales (Rhodophyta). *Phycologia* 27:254-272.
- Hommersand M.H., S. Fredericq and D.W. Freshwater 1994. Observations on the systematics and biogeography of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on *rbcl* sequence analysis. *Bot. Mar.* 37:193-203
- Höss M. and S. Pääbo 1993. DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 21(16):3913-3914
- Huerta M.L. 1978. Vegetación marina litoral. In: Rzedowski J. (Ed.), *Vegetación de México*. Limusa, México, pp. 328-340.
- Huerta M.L. y Garza Barrientos, M.A. 1975. Contribución al conocimiento de la flora marina de las islas Socorro y San Benedicto del archipiélago Revillagigedo, Colima, México. *Bol. Informativo del Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México*. 2(4): 4-16.
- Huerta M.L. y Tirado L.J. 1970. Estudio florístico ecológico de las algas marinas de la costa del Golfo de Tehuantepec, México, *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 31: 115-137
- Hughey J.R., P.C. Silva and M.H. Hommersand 2001. Solving taxonomic and nomenclatural problems in Pacific Gigartinaceae (Rhodophyta) using DNA from type material. *J. Phycol* 37(6):1091-1109
- INEGI 1997. Información por entidad federativa (en línea) <http://www.INEGI.gob.mx>.
- Jiménez L.F., Ruiz G.R., Argueta V.A., Núñez F.J., Quiroz A.I., Deldadillo C.E.A., Chacón L.J., Saldaña G.M.R. y Hernández R.M.C. 2006. *Conocimientos fundamentales de Biología* Vol. 1 . 1er Edición PEARSON EDUCACIÓN México 135-153.
- Juárez M.J. 2001. MARCADORES MOLECULARES EN EL GENERO *Prosopis*. Tesis para obtener el grado de Doctor . Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. 91pp.
- Kaneko T. 1968. Morphological and developmental studiés of Gelidiales. II. On *Acanthopeltis japonica* Okamura. *Bull. Fac. Fish. Hokluido Univ.* 19:165-172.

- Kapraun D. F. and J.C. Bailey 1989. Karyology and nuclear DNA content of *Gelidium pusillum* (Gelidiales, Rhodophyta) from North Carolina, USA. *Jpn. J. Phycol.* 37 (3): 201-207.
- Kapraun D. F. and J. C. Bailey 1992. Karyology and cytophotometric estimation of nuclear DNA variation in seven species of Ulvales (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology* 40: 13-24.
- Kapraun D.F. and D.W. Freshwater 1987. Kariological studies of five species of *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from the North Atlantic and Mediterranean. *Phycologia* 26:82-87.
- Kapraun D.F., T.K. Hindson and A.J. Lemus 1991. Karyology and cytophotometric estimation of inter and intraspecific nuclear DNA variation in four species of *Porphyra* (Rhodophyta). *Phycologia* 30:458-466.
- Kapraun D. F., J.A. Dutcher and W. Freshwater 1993. Quantification and characterization of nuclear genome in commercial red seaweeds: Gracilariales and Gelidiales. *Hydrobiologia* 260/261: 679-688.
- Kapraun D. F., E. Ganzon-Fortes, K.T. Bird, G. Trono and C. Breden 1994. Karyology and agar analysis of the agarophyte *Gelidiella acerosa* (Forssål) Feldmann et Hamel from the Philippines. *J. Appl. Phycol.* 6: 545-550.
- Knaggs F. W. 1964. Cytological and life-history studies in the genus *Rhodochorton*. *British Phycological Bulletin.* 2: 393.
- Knudsen J.W. 1966. *Biological techniques*. Harper and Row Publishers. New York. pp. 26-37.
- Krishnamurthy V. 1984. Chromosome numbers in *Porphyra C. Agardh*. *Phykos* 23:185-90.
- León-Tejera H. y González-González J. 1993. Macroalgas de Oaxaca, In: *Biodiversidad marina y costera de México*, Salazar-Vallejo S.I. y González N.E. (Eds.), Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) y Centro de Investigaciones de Quintana Roo (CIQRO), pp. 486-498.
- Lewis R.J. 1996. Chromosomes of the brown algae. *Phycologia* 35:19-40.
- Lewis Sh., P. Gacesa, M.C. Gil-Rodríguez, F. Valdés and I. Frías 2008. Molecular systematics of the genera *Laurencia*, *Osmundea* and *Palisada* (Rhodophyta) from the Canary Islands Analysis of rDNA and RuBisCo spacer sequences. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 65(1):97-109
- Lindstrom S.C. and K.M. Cole 1992. The *Porphyra lanceolata* *P. pseudolanceolata* (Bangiales, Rhodophyta) complex unmasked: recognition of new species based on isozymes, morphology, chromosomes and distributions. *Phycologia* 31:431-448.
- López N.A. 2001. *Variabilidad fenológica e implicaciones taxonómicas en especies de algas submareales de playa La Ropa, Zihuatanejo, Gro.* Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 169p.
- Macler B.A. and J.A. West 1987. Life history and physiology of the red alga, *Gelidium coulteri*, in unialgal culture. *Aquaculture* 61:281-293.
- Maggs C. A. 1988. Intraspecific life history variability in the Florideophycidae (Rhodophyta). *Botanica Marina* 31: 465-490.
- Maggs C.A. and Guiry, M.D. 1987. *Gelidiella calcicola* sp. nov. (Rhodophyta) from the British Isles and Northern France. *Br. phycol. J.* 22:417-434.
- Maggs C.A. and J.M. Rico 1991. A karyological demonstration of meiosis in *Gelidium latifolium* (Gelidiaceae, Rhodophyta) from Ireland. *Phycologia* 30: 487-494.

- Maggs C.A., S.E. Douglas, J. Fenety and C. J. Bird 1992. A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *J. Phycol.* 28:214-232.
- Magne F. 1964. Recherches caryologiques chez les Floridées (Rhodophycées). *Cuh. Biol. Mar.* 5:461-671.
- Masuda M., K. Kogame and M.D. Guiry 1996. Life history of *Gymnogongrus griffithsiae* (Phylloporaceae, Gigartinales) from Ireland: implications for life history interpretation in Rhodophyta. *Phycologia* 35:421-434
- Mateo-Cid L.E. y Mendoza González C. 1992. Algas marinas bénticas de la costa sur de Nayarit, México. *Acta Botánica Mexicana* 20: 13-28.
- Mendoza-González C. y Mateo-Cid L.E. 1992. Estudio preliminar de las algas marinas bentónicas de la costa de Jalisco, México. *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, México* 37: 9-25.
- McLachlan J., J.P. van der Meer and N.L. Bird 1977. Chromosome numbers of *Gracilaria foliifera* and *Gracilaria* sp. (Rhodophyta) and attempted hybridization. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 57:1137-1141
- Muller K.M., R.G. Sheath, M. L. Vis, T.J. Crease and K.M. Cole 1998. Biogeography and systematic of *Bangia* (Bangiales, Rhodophyta) based on the rubisco spacer, *rbcl* gene and 18S rRNA gene sequences and morphometric analyses. I. North America. *Phycologia* 37:195-207
- Mumford Jr. T.F. and K. Cole 1977. Chromosome numbers for fifteen species in the genus *Porphyra* (Bangiales, Rhodophyta) from the west coast of North America. *Phycologia* 16:373-377.
- Nei M. and W.H. Li. 1979. Mathematical model for study genetic variations in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74:5267-5273
- Niwa K. A. Kobiyama and Y. Aruga 2006. Confirmation of cultivated *Porphyra tenera* (Bangiales, Rhodophyta) by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism analyses of the plastid and nuclear DNA. *Phycological Research* 53(4):296-302
- Norris R. E. 1992. *The marine red algae of Natal, South Africa: Order Gelidiales (Rhodophyta)* Soft cover: ISBN 1-874907-01-3.
- Novaczek I., Bird C.J. and McLachlan J.L. 1986. Culture and field study of *Stilophora rhizodes* (Phaeophyceae, Chordariales) from Nova Scotia, Canada. *British Phycological Journal* 21: 407-416
- Oh-Cho T., S. Fredericq, S.N. Murray and S. Ming Boo 2003. New insights in the taxonomy of the *Ceramium sincicola* complex: resurrection of *Ceramium interruptum* (Ceramiaceae, Rhodophyta). *J. Phycol.* 39(4):775-788
- Ortega M.M., J.L. Godínez y M.M. Ruvalcaba 1993. *Una clave de campo de las algas pardas de las costas mexicanas del Golfo de México y Mar Caribe*. AGT Editores. México. 42 p.
- Palmer J.D. 1985. Comparative organization of chloroplast genome. *Ann. Rev. Genet.* 19:325-354.
- Patwary M.U. and J.P. van der Meer 1983. Genetic modification of *Gracilaria tikvahiae* (Rhodophyceae). The production and evaluation of polyploids. *Aquaculture*, 33:311-316.
- Patwary M.U., Makay, R.M. and J.P. van der Meer 1993. Revealing genetic markers in *Gelidium Vagum* (Rhodophyta) Through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique. *J. Phycol.* 29:216-222
- Patwary M.U. and J.P. van der Meer 1994. Application of RAPD markers in a examination of heterosis in *Gelidium vagum* (Rhodophyta). *J. Phycol.* 29:216-222

- Perrone C., Felicini, G.P. and Bottalico, A. 2006. The prostrate system of the Gelidiales: diagnostic and taxonomic importance. *Botanica Marina* 49: 23–33. 06/54
- Plata A. y D. Rodríguez 1996. *Efecto de la temperatura sobre el recimiento de fragmentos vegetativos de Gelidium microdentatum bajo condiciones de laboratorio*. II Congreso Mexicano de Ficología, Ensenada, Baja California, México.
- Plata Alvarez M., D. Rodríguez y G. Rivas Lechuga 1995. *Efecto de nitratos y fosfatos en el crecimiento vegetativo de Gelidium sclerophyllum (Gelidiales, Rhodophyta)*. XIII Congreso Mexicano de Botánica, Cuernavaca, Morelos, México.
- Ponce-Márquez M.E. 1999. *Estudio Citogenético en Macroalgas Marinas: Contribución a la biología de algunas especies y a la resolución de problemas taxonómicos, México*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 125 pp.
- Ponce-Márquez M.E., A. Aguilar-Santamaria, D. Rodríguez y A. Sarmiento-Montiel 1997. Citogenética de macroalgas marinas con posibilidades de explotación. *Oceanología* 1(13):155-166
- Ponce-Márquez M.E., D. Rodríguez, N. López, L. Alba-Lois y M. A. Aguilar 2009. Estudio citogenético de poblaciones mexicanas de *Gelidium sclerophyllum* (Gelidiales, Rhodophyta). *Hydrobiológica* 19(2):85-93
- Puertas M.J. 1992. *Genética, Fundamentos y Perspectivas*. Ed. Interamericana Mc Graw-Hill. México. 741p.
- Qui Y.L., M.W. Chase., D.H. Les and C.R. Parks 1993. Molecular phylogenetic of Magnoliidae: cladistic analyses of nucleotide sequences of the plastid gene rbcL. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80:587-606.
- Ramanayake S.M.S.D., V.N. Meemaduma and T.E. Weerawardene 2007. Genetic diversity and relationships between nine species of bamboo in Sri Lanka, using Random Amplified Polymorphic DNA. *Pl. Syst. Evol.* 269:55-61
- Ramírez R. R. 2006. *Caracterización del microhábitat, variación morfológica y reproductiva en poblaciones de Prasiola (Prasiolales, Chlorophyta) en ríos de la región central de México*. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias, UNAM, México. 103 p.
- Rao C. S. P. 1971. Sex chromosomes of *Wrangelia argus* Mont. *Bot. Mar.* 14:113-115.
- Reyes M.J.M. y M.D. Martínez 2001. Plasticidad de las plantas. *Elementos* 8(41):1-11
- Rivas-Lechuga G., D. Rodríguez, L. Collado-Vides y G. Gómez-Alcaraz 1996. *Simulación de la arquitectura apical en Gelidium L. (Gelidiales, Rhodophyta) en sistemas Lindenmayer bidimensionales*. IV Congreso Latino-Americano de Ficología, Caxambu, MG., Brasil.
- Robles S.R. 1982. *Terminología genética y fitogenética*. Ed. Trillas. México. p.163
- Rodríguez D. 1989. *Gelidiales- Rhodophyta: Una Contribución a la Flora Tónica del Pacífico Tropical Mexicano*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM. México. pp. 195-196.
- Rodríguez D. y Rivas-Lechuga, G. 1996. *Gelidium sclerophyllum* (Gelidiales-Gelidiaceae) Evaluación de caracteres para la segregación intergenérica. *Revista de Biología Tropical*. 44(3)/45(1): 305-310.
- Rodríguez D. and B. Santelices 1987. Patterns of apical structure in the genera *Gelidium* and *Pterocladia* (Gelidiaceae, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 151/152: 199-203.

- Rodríguez D. and B. Santelices 1988. Separation of *Gelidium* and *Pterocladia* on vegetative characters. *Tax. Econ. Seaweeds* 2: 115-125.
- Rodríguez D. and B. Santelices 1996. Medullary structure differences in *Gelidium* and *Pterocladia* (Gelidiales, Rhodophyta): taxonomic meaning. *Phycol. Res.* 44: 223-232.
- Rodríguez D., E. Serviere-Zaragoza y J. González-González 1993. Gelidiaceae (Rhodophyta) en el Pacífico Tropical. pp. 444-455. In: *Biodiversidad Marina y Costera de México*. S.I. Salazar-Vallejo y N.E. González (eds.) *Com. Nal. Biodiversidad y CIQRO, México* 869 pp.
- Rodríguez V.D., N. López y J. González-González 2008. Gelidiales (Rhodophyta) en las costas del Pacífico mexicano con énfasis en las especies tropicales. En: *Monografías Ficológicas Vol.3* (Eds.) Senties, A. y Dreckmann K. Universidad Autónoma Metropolitana 27-74
- Romesburg H.C. 1984. *Cluster Analysis for researchers*. Lifetime Learning Publications. USA. 334 pp.
- Roughgarden J. 1996. *Theory of population genetic and evolutionary ecology: an introduction*. Prentice Hall. New York. 612 p.
- Salcedo M.S., Green, G., Gamboa, C.A. y Gómez, G. 1988. Inventario de microalgas y macroinvertebrados presentes en áreas rocosas de la región de Zihuatanejo, Guerrero, México. *An. Inst. Cienc. Del Mar y Limnol. Universidad Nacional Autónoma de México* 15(1): 73-96.
- Santelices B. 1974. *Gelidioid Algae*. A brief resume of the pertinent literature Technical report No. 1. Marine Agronomy Prog. of the University of Hawaii, pp. 111.
- Santelices B. 1978. The morphological variation of *Pterocladia capillacea* (Gelidiales, Rhodophyta) in Hawaii. *Phycologia* 17(1):53-59.
- Santelices B. 1990. New and old problems in the taxonomy of the Gelidiales (Rhodophyta). *Hydrobiologia* 204/205: 125-135
- Santelices B. 1991. Intergeneric differences in cystocarp structure in *Gelidium Pterocladia*. *Hydrobiologia* 221: 1-17.
- Santelices B. and M. Hommersand 1997. *Pterocladia*, a new genus in the Gelidiaceae (Gelidiales, Rhodophyta). *Phycologia* 36: 114-119.
- Saunders G.W. 1993. Gel purification of red algal genomic DNA: an inexpensive and rapid method for the isolation of polymerase chain reaction-friendly DNA. *J. Phycol* 29:251-254.
- Saunders G.W. and M.H. Hommersand 2004. Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomic in the context of contemporary systematic data. *American Journal of Botanic* 91(10):1494-1507.
- Schmitt J, Dudley S.A. and M. Pigliucci 1999. Manipulative approaches to testing adaptive plasticity: phytochrome-mediated shade-avoidance responses in plants. *American Naturalist* 154:S43-S54.
- Serviere-Zaragoza E., J. González-González y D. Rodríguez-Vargas 1993a. Ficología de la región de Bahía de Banderas, Nayarit-Jalisco pp. 474-485 In: *Biodiversidad Marina y Costera de México*. S.I. Salazar-Vallejo y N.E. González (eds.) *Com. Nal. Biodiversidad y CIQRO, México* 869 pp.
- Serviere-Zaragoza E., D. Rodríguez-Vargas y J. González-González 1993b. Gelidiaceae (Rhodophyta) in Bahía de Banderas, Western Pacific, México. *Hidrobiologia* 260/261:45-50

- Sherwood A.R. and R. G. Sheath 1999. Biogeography and systematics of *Hildenbrandia* (Rhodophyta, Hildenbrandiales) in North America: inferences from morphometrics and *rbcl* and 18S rRNA gene sequence analysis. *Eur. J. Phycol.* 34:523-532
- Sherwood A.R. and R. G. Sheath 2000. Biogeography and systematics of *Hildenbrandia* (Rhodophyta, Hildenbrandiales) in Europe: inferences from morphometrics and *rbcl* and 18S rRNA gene sequence analysis. *Eur. J. Phycol.* 35:143-152
- Shimada-S. Horiguchin-T and M. Masuda 2000. Two new species of *Gelidium* (Rhodophyta, Gelidiales), *Gelidium tenuifolium* and *Gelidium koshikianum* from Japan. *Phycol. Research* 48 (1): 37-46
- Siemer B. L., W.T. Stam and J.L. Olsen 1998. Phylogenetic relationships of the brown algal orders Ectocarpales, Chordariales, Dictyosiphonales and Tilopteridales (Phaeophyceae) based on Rubisco large subunit and spacer sequences. *J. Phycol.* 34:1038-1048
- Silva P.C. and T.C. De Cew. 1992. *Ahnfeltiopsis*, a new genus in the Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyceae). *Phycologia* 31:576-580.
- Silva P.C., P.W. Basson and R.L. Moe 1996. Catalogue of the Benthic Marine Algae of the Indian Ocean. *Univ. Calif. Pub. Bot.* 79:1259 p.
- Sosa P.A and Garcia-Reina G. 1992. Genetic variability and differentiation of sporophytes and gametophytes in populations of *Gelidium arbuscula* (Gelidiaceae, Rhodophyta) determined by isozyme electrophoresis. *Mar. Biol.* 113 : 679-688
- Sosa P. and Garcia- Reina G. 1993. Genetic variability of *Gelidium canariensis* (Rhodophyta) determined by isozime electrophoresis. *J. Phycol.* 29:118-124
- Spreitzer, R.J. 2003. Role of the small subunit in ribulose-1,5-biphosphate carboxilase/oxygenase. *Arch. Biochem. Biophy* 414:141-149
- Stache-Crain B., D.G. Muller and L.J. Goff 1997. Molecular systematics of *Ectocarpus* and Kuckuckiak (Ectocarpales, Phaeophyceae) inferred from phylogenetic analysis of nuclear and plastid encoded DNA sequences. *J. Phycol.* 33:152-168
- Stebbins G.L. 1976. Chromosome, DNA and plant evolution. *Evol. Biol.* 9:1-34
- Stewart J.G. 1984. Vegetative growth rates of *Pterocladia capillacea* (Gelidiales, Rhodophyta). *Bot. Mar. Bol.* 27(2): 273-284.
- Sultan S.E. 1995. Phenotypic plasticity and plant adaptation. *Acta Botanica Neerlandica* 44:363-383.
- Tamayo, J.L. 1980. *Geografía moderna de México*. 9na. Ed. Editorial Trillas, México.
- Takezaki N, A. Rzhetsky and M. Nei 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Mol. Biol.. Evol.* 12(5):823-833.
- Tavlitzki J. 1987. De los guisantes de Mendel a la genética molecular. *Mundo Científico* 4:703-716.
- Taylor W.R. 1945. Pacific Marine algae of the Allan Hancock Expeditions to the Galapagos Islands. *Allan Hancock Pacific Expeditions* 12:1-528.

- Thomas D.T. and D.W. Freshwater 1999. Phylogenetic relationships of Gelidiales species in Costa Rica. *J. Phycol.* 14:66-71
- Tseng C.K. and Sun A. 1989. Studies on the alternation of the nuclear phases and chromosome numbers in the life history of some species of *Porphyra* from China. *Bot. Mar.* 32:1-8.
- Valentine K. and K. Zetsche 1989. The genes of both subunits of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase constitute an operon on the plastome of a red alga. *Curr. Genet.* 16:203-209.
- Valentine K. and K. Zetsche 1990a. Rubisco genes indicate a close phylogenetic relation between the plastids of Chromophyta and Rhodophyta. *Plant Mol. Biol.* 15:575-584.
- Valentine K. and K. Zetsche 1990b. Structure of the Rubisco operon from the unicellular red alga *Cyanidium caldarium*: evidence for a polyphyletic origin of the plastids. *Mol. Gen. Genet.* 222:425-430.
- van der Meer J.P. 1981. Genetics of *Gracilaria tikvahiae*. (Rhodophyceae, Gigartinales). VII. Further observation on mitotic recombination and the construction of polyploids. *Can. J. Bot.* 59:787-792.
- van der Meer J.P. and Todd E.R. 1977. Genetic of *Gracilaria* sp. (Rhodophyceae, Gigartinales) VI. Mitotic recombination and its relationships to mixed phases in the life history. *Can. J. Bot.* 55:2810-2817
- van Oppen M.J.H., S.G.A. Draisma and J.L. Olsen 1995. Multiple trans-Arctic passages in the red alga *Phycodrys rubens*: evidence from nuclear rDNA ITS sequences. *Mar. Biol.* 123:179-188
- West J.A., G.C. Zuccarello and M. Kamiya 2001. Reproductive patterns of *Caloglossa* species (Delesseriaceae, Rhodophyta) from Australia and New Zealand: multiple origins of asexuality in *C. lepriuriis*. Literature review on apomixis mixed-phase, bisexuality and sexual compatibility. *Phycologia Res* 49(3):183-200
- Yabu H. 1979. Cytological observations on *Ptilota pectinata* (Gunn) Kjellm. and *Pt. pectinata* f. *litoralis* Kjellm (Ceramiales, Rhodophyta). *Japan Journal of Phycology* 27: 17-24.
- Yabu H. and H. Yamamoto 1988. Chromosome number of *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenfuss in the vicinity of Hakodate, Hokkaido. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Uni.* 39:4-5.
- Yoon L.Y.K., H.S. Motomura, T.Kim and S.M.Boo 1999. Phylogenetic relationships between *Pelvetia* and *Pelvetiopsis* (Fucaceae, Phaeophyta) inferred from sequences of the rubisco spacer region. *Eur. J. Phycol* 34:205-211
- Yoon H.S. J.Y. Lee, S.M.Boo and D. Bhattacharya 2001. Phylogeny of Alariaceae, Laminariaceae and Lessoniaceae (Phaeophyta) based on plastid encoded rubisco spacer and nuclear encoded ITS sequence comparisons. *Mol. Phylo. And Evol* 21(2): 231-243.
- Yoon H.S. and Min Boo, B. 1999. Phylogeny of Alariaceae (Phaeophyta) with special reference to *Undaria* based on sequences of the RuBisCo spacer region. *Hydrobiologia* 398/399:47-55.
- Yu K. and Pauls, K.P. 1993. Rapid estimation of genetic relatedness among populations of alfalfa by random amplification of bulked genomic DNA samples. *Theor. Appl. Genet.* 86:788-794.
- Zuccarello G.C. and J.A. West 2002. Phylogeography of the *Bostrychia calliptera*-*B. pinnata* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and divergence rates based on nuclear, mitochondrial and plastid DNA markers. *Phycologia* 41(1):49-60

- Zuccarello G.C., J.A. West and R. J. King 1999. Evolutionary divergence in the *Bostrychia moritziana* / *B. radicans* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta): molecular and hybridization data. *Phycologia* 38(3):234-244
- Zurawski G. and M.T. Clegg 1993. *rbcL* sequence data and phylogenetic reconstruction in seed plants: foreword. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 80 (3):523-525.

ANEXOS

ANEXO 1. Tablas de análisis moleculares RAPD's (presencia-ausencia)

Tabla. A Matriz de las 4 especies de *Gelidium* y 4 morfos de *G. pusillum* generada con los fragmentos obtenidos con el oligonucleotido OPA 2.

Tamaño del Fragmento (pb)	<i>Gelidium microdentatum</i>	<i>Gelidium galapagense</i>	<i>Gelidium sclerophyllum</i>	<i>Gelidium pusillum</i> Morfo 1	<i>Gelidium pusillum</i> Morfo 2	<i>Gelidium pusillum</i> Morfo 3	<i>Gelidium pusillum</i> Morfo 4
872	0	0	0	0	1	1	1
603	0	1	0	0	0	1	0
570	1	0	0	0	0	0	0
529	1	0	0	0	0	1	0
470	0	1	0	0	1	1	1
460	1	0	0	0	0	0	0
456	1	0	1	0	0	0	0
420	0	0	0	0	1	1	0
390	0	0	0	0	1	1	1
383	0	1	1	0	0	0	0
310	1	0	0	1	0	0	0
305	0	0	0	0	0	1	0
300	0	0	0	1	0	0	0
295	0	0	0	0	1	0	0
290	1	0	0	0	0	0	0
281	0	0	1	1	1	1	1
275	1	1	0	0	0	0	0
268	1	0	0	0	0	0	0
257	0	0	0	0	1	1	1
246	0	0	0	1	0	0	0
240	1	0	0	0	0	0	0
234	0	0	1	0	1	1	1
224	1	0	0	1	0	0	0
220	0	1	0	0	0	0	0
216	0	0	0	0	0	0	1
214	1	0	1	1	1	1	0
204	0	1	0	1	1	0	1
194	0	0	0	0	0	1	0
190	0	1	0	0	0	0	0
180	0	1	0	0	1	0	1
179	0	0	0	1	0	0	0
175	0	0	0	0	0	1	0
170	1	1	1	0	0	0	0
165	0	0	0	1	1	1	1
154	0	0	0	0	0	0	1
137	0	1	1	1	1	1	1
120	0	1	0	0	0	0	0
118	0	0	0	1	1	0	0
116	0	0	0	0	0	1	0
109	0	0	0	0	1	0	0
100	0	0	0	0	0	1	0
89	0	0	0	0	1	0	0
88	0	0	0	0	0	1	0
77	0	0	0	0	1	0	1

Tabla. B Matriz de las 4 especies de *Gelidium* y 4 morfos de *G. pusillum* generada con los fragmentos obtenidos con el oligonucleotido OPA 4.

Tamaño del Fragmento (pb)	<i>Gelidium microdentatum</i>	<i>Gelidium galapagense</i>	<i>Gelidium sclerophyllum</i>	<i>Gelidium pusillum</i> Morfo 1	<i>Gelidium pusillum</i> Morfo 2	<i>Gelidium pusillum</i> Morfo 3	<i>Gelidium pusillum</i> Morfo 4
872	0	0	1	0	0	1	0
804	0	0	1	0	0	0	0
737	0	0	0	0	0	0	1
600	1	0	0	0	0	0	1
550	0	0	0	0	1	0	0
500	0	0	1	0	0	0	0
460	1	0	1	0	0	0	0
456	0	0	0	0	1	1	0
420	0	1	0	0	0	0	0
390	1	0	0	0	0	0	0
383	0	0	1	1	0	0	0
340	0	0	0	1	0	0	0
310	0	0	0	0	0	0	1
305	0	0	0	0	1	1	0
295	1	1	1	0	1	0	0
281	1	0	0	0	0	0	0
268	0	0	0	1	1	1	1
260	0	1	0	0	0	1	1
257	0	0	1	0	0	0	0
250	0	0	0	1	1	0	0
246	1	1	0	0	0	0	0
234	0	0	0	0	0	1	0
224	0	0	0	0	1	0	0
220	0	0	0	0	0	1	0
214	0	0	0	0	0	1	0
210	0	0	0	0	0	0	1
204	0	0	0	1	0	0	0
194	1	1	1	0	1	1	1
175	0	1	1	0	0	0	0
168	0	0	0	0	1	0	0
165	1	0	0	0	0	0	0
160	0	0	0	0	1	0	0
156	0	0	0	0	1	0	0
150	0	0	0	0	0	1	0
145	0	0	0	0	0	0	1
140	0	0	0	0	0	1	0
137	0	0	0	1	1	0	0
128	0	0	0	0	0	1	0
120	0	0	0	0	1	0	1
118	0	0	0	0	0	0	1
115	0	0	0	0	0	1	0
110	0	0	0	0	0	1	0
106	0	0	0	0	1	0	1
92	0	0	0	0	0	0	1

Tabla B. Distancias del árbol bayesiano, obtenido de la alineación del intergen RuBisCo en las diferentes especies de Rhodophyta

(Distancia MB (MrBayer) = Longitud rama terminal; Longitud (pb) = tamaño del intergen; Prom.Dist. = Distancia promedio; DE Dist = Desviación Estandar de la distancia promedio; Prom. Long = Promedio de la longitud del intergen; DE Long = Desviación Estandar de la longitud)

Distancias del árbol bayesiano Rhodo2-5.

Rama	Spp	Distancia MB	Distancia Total	Longitud (pb)		Prom Dist	DE Dist	Prom Long	DE Long					
54	Fuc_vesic	0.107717	0.107717	200	Feofitas	0.203829	0.101939088	219.3333333	44.28694315					
55	Ala_crass	0.694	0.193034	270										
56	Scy_lomen	0.187102	0.310736	188										
69	55,56	0.123634												
57	Plo_telfa	0.012837	0.624208	88	Plocamiales	0.6464296	0.026163728	89.2	1.788854382					
58	Plo_recur	0.024579	0.63595	88										
59	Plo_carti	0.015954	0.627325	88										
70	57,58,59	0.072385												
60	Plo_serra	0.059545	0.686955	92										
61	Plo_ovico	0.0303	0.65771	90										
71	60,61	0.088424												
72	70,71	0.158163												
62	Cal_ogasa	0.082611	0.848551	77						Ceramiales-Gigartinales	0.884888286	0.134331703	90.42857143	18.30170432
63	Grac_verr	0.397081	1.163021	131										
73	62,63	0.211286												
64	Cal_monos	0.03435	0.740921	88										
65	Cal_conti	0.045152	0.79607	80										
66	Cal_posti	0.110911	0.893798	85										
67	Cal_lepri	0.067577	0.89512	86										
68	Cal_apome	0.029494	0.856737	86										
74	67,68	0.044356												
75	66,74	0.031969												
76	65,75	0.044347												
77	64,76	0.151917												
78	73,77	0.174331												
5	Por_yezoe	0.036777	0.822161	77	Bangiales	0.838802867	0.049414981	77	0					
6	Por_tener	0.0558684	0.844074	77										
79	5,6	0.063621												
7	Por_pseud	0.025886	0.774826	77										
8	Por_haita	0.02895	0.815312	77										
9	Por_denta	0.015997	0.802359	77										
80	8,9	0.037422												
81	7,80	0.027177												

10	Por_katad	0.34633	0.794222	77					
11	Ban_atrop	0.045762	0.8832138	77					
12	Por_umbil	0.041867	0.914388	77					
13	Por_purpu	0.026149	0.89867	77					
82	12,13	0.034971							
83	11,82	0.077961							
84	10,83	0.037826							
85	79,81,84	0.152442							
14	Cer_affin	0.052419	1.072855	103	Ceramiales- Gigartinales- Gelidiales- Aliminales- Bonnemaisoniales- Palmariales	1.229701756	0.193965805	104.5588235	38.7620489
15	Cer_kondo	0.077199	1.097635	103					
16	Cer_japon	0.063664	1.161919	103					
17	Cen_clavu	0.236054	1.384244	102					
18	Rei_schmi	0.066333	1.214523	104					
86	17,18	0.049935							
87	16,86	0.077819							
19	Cer_panic	0.047013	1.178645	103					
20	Cer_inkyu	0.045013	1.214449	103					
21	Cer_tener	0.027915	1.197351	103					
88	20,21	0.037804							
89	19,88	0.111196							
22	Cer_boyde	0.032638	1.0898	100					
23	Cam_borea	0.009687	1.103678	103					
24	Cam_hypna	0.01101	1.123615	103					
25	Cam_crass	0.011988	1.124593	103					
90	24,25	0.018614							
91	23,90	0.036829							
92	22,91	0.036726							
93	14,15,89,87,92	0.214871							
26	Grat_pore	0.069169	1.06666	76					
27	Grat_turu	0.026196	1.023687	80					
28	Grat_diva	0.041763	1.039254	80					
29	Hal_acumi	0.034312	1.031803	80					
30	Gel_pusi2	0.112601	1.714585	211					
31	Gel_pusi1	0.028847	1.630831	190					
32	Gel_pusi4	0.036188	1.638172	185					
94	31,32	0.134806							

95		30,94	0.604493							
33		Pach_elli	0.039446	1.072451	80					
34		Grat_lanc	0.026628	1.059633	80					
96		33,34	0.035514							
35		Car_affin	0.080305	1.400206	80					
36		Pol_lanci	0.034166	1.354067	80					
97		35,36	0.179974							
37		Asp_armat	0.06809	1.379626	79					
38		Asp_taxif	0.076253	1.387789	83					
98		37,38	0.171609							
99		97,98	0.142436							
39		Car_crisp	0.012926	1.034373	80					
40		Car_corne	0.018006	1.039453	80					
100		39,40	0.023956							
101		26,27,28,29,95,96,99,100	0.191926							
41		Hyp_japon	0.3319	1.253487	92					
42		Chon_squa	0.116341	1.165444	91					
43		Maz_splen	0.028093	1.174869	91					
44		Iri_mican	0.015824	1.4506597	92					
45		Iri_corda	0.050794	1.285629	92					
102		44,45	0.088059							
103	43,102		0.097677							
104	42,103		0.127512							
105	41,104		0.116022							
46	Gel_crina		0.595616	1.551241	231					
47	Pal_palma		0.137008	1.092633	89					
106	46,47		0.15006							
107	93,101,105,106		0.236244							
48	Osm_pinna		0.171537	0.984496	113	Ceramiales	1.1322655	0.138466632	126	33.2325142
49	Bos_calli		0.064587	1.114744	127					
50	Pad_crass		0.341058	1.391215	192					
108	49,50		0.237198							
51	Lau_perfo		0.220057	1.150875	104					
52	Lau_virid		0.028474	1.079214	110					
53	Lau_thyrs		0.022309	1.073049	110					
109	52,53		0.119918							
110	51,109		0.117863							
111	48,108,110		0.243638							

1		Por_subor	0.22365	1.507563	417	Bangiales- Gelidiales	1.47828475	0.02075144	300.75	77.50430096
2		Gel_galap	0.005267	1.463532	263					
3		Gel_micro	0.00529	1.463555	261					
4		Gel_scler	0.020224	1.478489	262					
112		2,3,4	0.174352							
113		1,112	0.714592							
114	85,107,111,113		0.188998							
115	72,78,114		0.380323							

		Prom Dist	DE Dist	Prom Long	DE Long
Feofitas	Feo	0.203829	0.101939	219.3333	44.28694
Plocamiales	Plo	0.646429	0.026163	89.2	1.788854
Ceramiales-Gigartinales	CG	0.884888	0.134331	90.42857	18.30170
Bangiales	Ban	0.838802	0.049414	77	0
Ceramiales-Gigartinales-Gelidiales-Alimeniales-Bonnemaisoniales-Palmariales	C GGABP	1.229701	0.193965	104.5588	38.76204
Ceramiales	Cer	1.132265	0.138466	126	33.23251
Bangiales-Gelidiales	BG	1.478284	0.020751	300.75	77.50430

Distancias del árbol bayesiano Rhodo25.

Rama	Spp	Distancia MB	Distancia Total	Longitud (pb)	L prom total	f inter spp
54	Fuc_vesic	0.107717	0.107717	200	Feofitas	
55	Ala_crass	0.694	0.193034	270		
56	Scy_lomen	0.187102	0.310736	188		
69	55,56	0.123634				
57	Plo_telfa	0.012837	0.624208	88	Plo1	0.629161
58	Plo_recur	0.024579	0.63595	88		0.028275
59	Plo_carti	0.015954	0.627325	88		
70	57,58,59	0.072385				
60	Plo_serra	0.059545	0.686955	92	Plo2	0.6723325
61	Plo_ovico	0.0303	0.65771	90		0.066815
71	60,61	0.088424				
72	70,71	0.158163				
62	Cal_ogasa	0.082611	0.848551	77		
63	Grac_verr	0.397081	1.163021	131		
73	62,63	0.211286				

64	Cal_monos	0.03435	0.740921	88	Cal1	0.8365292	0.068732
65	Cal_conti	0.045152	0.79607	80			
66	Cal_posti	0.110911	0.893798	85			
67	Cal_lepri	0.067577	0.89512	86	Cal2	0.8759285	0.055410
68	Cal_apome	0.029494	0.856737	86			
74	67,68	0.044356					
75	66,74	0.031969					
76	65,75	0.044347					
77	64,76	0.151917					
78	73,77	0.174331					
5	Por_yezoe	0.036777	0.822161	77	Por1	0.8331175	0.055601
6	Por_tener	0.0558684	0.844074	77			
79	5,6	0.063621					
7	Por_pseud	0.025886	0.774826	77	Por2	0.797499	0.029606
8	Por_haita	0.02895	0.815312	77			
9	Por_denta	0.015997	0.802359	77			
80	8,9	0.037422					
81	7,80	0.027177					
10	Por_katad	0.34633	0.794222	77			
11	Ban_atrop	0.045762	0.8832138	77			
12	Por_umbil	0.041867	0.914388	77	Por3	0.906529	0.037514
13	Por_purpu	0.026149	0.89867	77			
82	12,13	0.034971					
83	11,82	0.077961					
84	10,83	0.037826					
85	79,81,84	0.152442					
14	Cer_affin	0.052419	1.072855	103	Cer1	1.110803	0.058000
15	Cer_kondo	0.077199	1.097635	103			
16	Cer_japon	0.063664	1.161919	103			
17	Cen_clavu	0.236054	1.384244	102			
18	Rei_schmi	0.066333	1.214523	104			
86	17,18	0.049935					
87	16,86	0.077819					
19	Cer_panic	0.047013	1.178645	103	Cer2	1.196815	0.033405
20	Cer_inkyu	0.045013	1.214449	103			
21	Cer_tener	0.027915	1.197351	103			
88	20,21	0.037804					
89	19,88	0.111196					

22	Cer_boyde	0.032638	1.0898	100			
23	Cam_borea	0.009687	1.103678	103	Cam	1.117295333	0.009751
24	Cam_hypna	0.01101	1.123615	103			
25	Cam_crass	0.011988	1.124593	103			
90	24,25	0.018614					
91	23,90	0.036829					
92	22,91	0.036726					
93	14,15,89,87,9 2	0.214871					
26	Grat_pore	0.069169	1.06666	76	Grat	1.043200333	0.043816
27	Grat_turu	0.026196	1.023687	80			
28	Grat_diva	0.041763	1.039254	80			
29	Hal_acumi	0.034312	1.031803	80			
30	Gel_pusi2	0.112601	1.714585	211	GpusiT	1.661196	0.035644
31	Gel_pusi1	0.028847	1.630831	190	Gpusi1,4	1.6345015	0.019894
32	Gel_pusi4	0.036188	1.638172	185			
94	31,32	0.134806					
95	30,94	0.604493					
33	Pach_elli	0.039446	1.072451	80			
34	Grat_lanc	0.026628	1.059633	80			
96	33,34	0.035514					
35	Car_affin	0.080305	1.400206	80			
36	Pol_lanci	0.034166	1.354067	80			
97	35,36	0.179974					
37	Asp_armat	0.06809	1.379626	79	Asp	1.3837075	0.052158
38	Asp_taxif	0.076253	1.387789	83			
98	37,38	0.171609					
99	97,98	0.142436					
39	Car_crisp	0.012926	1.034373	80	Car	1.036913	0.014915
40	Car_corne	0.018006	1.039453	80			
100	39,40	0.023956					
101	26,27,28,29,9 5,96,99,100	0.191926					
41	Hyp_japon	0.3319	1.253487	92			
42	Chon_squa	0.116341	1.165444	91			
43	Maz_splen	0.028093	1.174869	91			
44	Iri_mican	0.015824	1.4506597	92	Iri	1.36814435	0.024346
45	Iri_corda	0.050794	1.285629	92			
102	44,45	0.088059					
103	43,102	0.097677					

104	42,103	0.127512					
105	41,104	0.116022					
46	Gel_crina	0.595616	1.551241	231			
47	Pal_palma	0.137008	1.092633	89			
106	46,47	0.15006					
107	93,101,105,106	0.236244					
48	Osm_pinna	0.171537	0.984496	113			
49	Bos_calli	0.064587	1.114744	127			
50	Pad_crass	0.341058	1.391215	192			
108	49,50	0.237198					
51	Lau_perfo	0.220057	1.150875	104			
52	Lau_virid	0.028474	1.079214	110	Lau	1.0761315	0.023595
53	Lau_thyrs	0.022309	1.073049	110			
109	52,53	0.119918					
110	51,109	0.117863					
111	48,108,110	0.243638					
1	Por_subor	0.22365	1.507563	417			
2	Gel_galap	0.005267	1.463532	263	Gel gms	1.468525333	0.006986
3	Gel_micro	0.00529	1.463555	261			
4	Gel_scler	0.020224	1.478489	262			
112	2,3,4	0.174352					
113	1,112	0.714592					
114	85,107,111,113	0.188998					
115	72,78,114	0.380323					

	L prom total	f inter spp
Plo1	0.629161	0.028275
Plo2	0.672332	0.066815
Cal1	0.836529	0.068732
Cal2	0.875928	0.055410
Por1	0.833117	0.055601
Por2	0.797499	0.029606
Por3	0.906529	0.037514
Cer1	1.110803	0.058000
Cer2	1.196815	0.033405
Cam	1.117295	0.009751
Grat	1.043200	0.043816
Asp	1.383707	0.052158
Car	1.036913	0.014915
Iri	1.368144	0.024346
Lau	1.076131	0.023595
GpusiT	1.661196	0.035644
Gpusi1,4	1.634501	0.019894
Gel gms	1.468525	0.006986

ANEXO 2. CITOGENÉTICA

La Genética ha construido sus cimientos a través de la observación y experimentación con diversas plantas y animales, permitiendo con ello la interpretación de los fenómenos de la herencia. Así se han establecido las leyes de transmisión de los caracteres hereditarios y los efectos que tiene el medio sobre los genes y se siguen realizando análisis de mutación y selección que se manifiestan como variaciones cualitativas y cuantitativas de la población, para proponer explicaciones sobre los mecanismos de la evolución de los seres vivos, así como para aproximarse a un manejo experimental, cada vez más preciso de especies de plantas y animales para mejorar su calidad y resaltar algunos caracteres de importancia comercial y ecológica, entre otras cosas (Stansfield, 1992) .

Una de las ramas de la genética es la citogenética considerada una disciplina biológica que estudia los fenómenos de la herencia en relación con la dotación cromosómica de la célula; estudia el número y morfología de los cromosomas con respecto de su transmisión genética, así como todas las partes de la célula que directa o indirectamente intervienen en la genética a nivel celular (Robles, 1982). Los cromosomas son los portadores de los factores hereditarios (los genes), que consisten en largas moléculas de DNA y aproximadamente una masa igual de proteínas y sólo en forma condensada, se pueden observar durante la división celular. Cada especie posee un número de cromosomas específico que caracteriza a la especie, de ahí que la importancia de los estudios sobre cromosomas pueda ser en dos aspectos: sus características morfológicas y de comportamiento pueden ser empleados en la clasificación de especies y segundo, aclarar estudios genéticos y evolutivos en la formación de especies (García, 1977). Swanson *et al.*, (1981 en Cole, 1990), menciona que los cromosomas de una especie son el producto de las presiones evolutivas, por lo que debieron haber tenido un alto valor selectivo desde el tiempo de su aparición.

Los individuos poseen un número y morfología cromosómica específicos; cada célula somática, en organismos superiores, contiene un juego de cromosomas (homólogos) del progenitor paterno, el número cromosómico de este juego doble es llamado diploide ($2n$); en organismos como las algas, este número se presenta en la fase tetrasporofítica. Las células sexuales o gametos contienen la mitad del número de cromosomas presentes en células somáticas llamado número haploide (n); en las algas los talos gametofitos poseen este número cromosómico, tanto el gameto femenino como el masculino (Stansfield, 1992). Todos los individuos de una especie, poseen el mismo número cromosómico y las especies de un género pueden o no presentar diferencia en el número cromosómico o en su morfología y estos caracteres aportan información para resolver

problemas de distinción entre especies y reconocer sendas evolutivas a través de la comparación de la relación numérica y estructural de sus cromosomas.

La morfología de los cromosomas se puede observarse durante ciertas fases de la división nuclear (profase, metafase y anafase) lo que permite distinguir los cromosomas de un genoma contra los de otro genoma, a través de la descripción de los mismos, siguiendo criterios como la longitud relativa del cromosoma, posición del centrómero que dividen al cromosoma en dos brazos de longitud variable: metacéntrico, submetacéntrico, acrocéntrico y telocéntrico. Los cromosomas son numerados consecutivamente según la longitud, comenzando por los más largos. En algunas especies de algas se han utilizado estos criterios para la clasificación de sus cromosomas, sin embargo, en la mayoría de las especies no es posible, por la forma redonda u ovalada y el tamaño tan pequeño que presentan; en estos casos se elaboran cariogramas que son dibujos o diagramas del acomodo de los cromosomas durante su observación, en ocasiones se pueden elaborar cariotipos utilizando el criterio de longitud acomodando a los cromosomas de mayor a menor longitud.

Los cromosomas también sufren cambios estructurales, lo que presupone el rompimiento de éstos y los fragmentos pueden reunirse para formar nuevos arreglos de ligamiento; durante este proceso pueden ocurrir pérdidas o adiciones de un segmento cromosómico, a esto se le llama aberración cromosómica. Estos arreglos pueden ser de varios tipos como, inversión (desprendimiento y reunión en el orden inverso de secciones cromosómicas), duplicación (parte cromosómica añadida), deleción (parte cromosómica perdida) y translocación (partes cromosómicas desprendidas y reunidas, en cromosomas no homólogos).

Estos rearrreglos son comunes en la naturaleza y muy probablemente desempeñan un papel importante en la evolución de las especies y pueden ser inducidos, mediante radiación, ionización y agentes químicos (Gardner, 1974).

Los datos cromosómicos ofrecen a la sistemática un conjunto de caracteres que le permiten analizar y sentar bases importantes para la delimitación de especies, el proceso de especiación y el análisis filogenético para grupos en los que la similitud morfológica que se estudia de forma clásica, es muy difícil o imposible de analizar. Los datos cromosómicos y moleculares se han convertido en una parte básica que deben ser mencionados en los trabajos sistemático, ecológicos y biogeográficos (Nieto y Llorente, 1989).

CICLO DE VIDA

Los ciclos de vida se refieren al círculo imaginario o ciclo de desarrollo que sigue un vegetal durante el curso de su evolución completa. Los ciclos de vida se clasifican de acuerdo a las fases (individuo de vida libre) que presentan: monofásicos, difásicos y trifásicos. El ciclo de vida trifásico es exclusivo de las Rhodophyta comprende dos fases o generaciones diploides una de vida libre “tetrasporofito” y una parásita “carposporofito” y una sola fase haploide el “gametofito”.

Los tipos de ciclos de vida en las Rhodophyta son diversos por ejemplo, el género *Ahnfeltiopsis* muestra un ciclo de vida de tipo *Bonnemaisonia hamifera* (heteromórfico), presenta un gametofito de tipo erecto, que alterna con un tetrasporofito libre de tipo costroso; el carposporofito diploide, que se desarrolla sobre el gametofito femenino, formará las carposporas, quienes da lugar a un tetrasporofito costroso (Masuda *et al.*, 1996)

Se sabe que el género *Gymnogongrus* presenta dos tipos de ciclos de vida, la primera es de tipo tetrasporoblástica, en la que el tetrasporofito se reduce y forma un nematecio sobre las ramas del gametofito monóico, la especie tipo es *Gymnogongrus griffithsiae* (Turner) Martius, *Gymnogongrus chiton* (Howe) P.C. Silva *et DeCew*, *Gymnogongrus crenulata* (Turner) J. Agardh. La segunda es de tipo isomórfica, con gametofito y tetrasporofito erectos, el carposporofito diploide se desarrolla sobre el gametofito femenino, a este tipo de historia de vida se le llama tipo *Polysiphonia* (Anderson y Bolton, 1990; Masuda *et al.*, 1996)

Las especies del género *Gelidium* presentan un ciclo de vida tipo-*Polysiphonia* (Fig. 1) (Dixon, 1982; Masuda, *et al.* 1996) con gametofitos y tetrasporofitos isomórficos de manera natural (West y Hommersand, 1981) el cual se ha demostrado en cultivos de *Gelidium culteri* Harvey (Macler y West, 1987). El gametofito, el tetrasporofito y el carposporofito diploide se desarrolla sobre el gametofito femenino

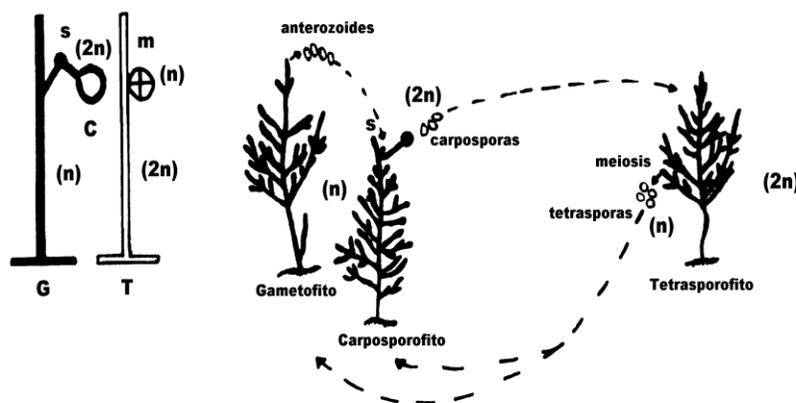


Fig. 1. Alternancia de tres fases secuenciales (*Gelidium*) : Gametofito (G), Carposporofito (C) y Tetrasporofito (T); singamia (s), meiosis (m), fase haploide (n) y fase diploide (2n) (los tres individuos son isomórficos) (Tomado de Rodríguez, 1989).

El ciclo se explica de la siguiente manera: existe un gametofito masculino y un gametofito femenino quienes producen gametangios, los gametos masculinos se llaman “anterozoides”, los cuales penetran en el “cistocarpo” y ocurre la fecundación dentro del gametofito femenino, en este momento pasa a formar al carposporofito (organismos diplohaplonte n y $2n$) en donde se producen las carposporas que darán origen al tetrasporofitos (individuo diploide $2n$), quien a su vez producirá las tetrasporas que darán origen a plantas gametofíticas femeninas y gametofíticas masculinas (individuos haploides n) y así continua el ciclo.

Referencias

- Anderson, R.J. y J.J. Bolton. 1990. Reproductive morphology and life histories of Southern African *Gymnogongrus* species (Rhodophyta, Phylloporaceae). *Br. Phycol. J.* 25: 381-390.
- Cole K.M. 1990. Chromosomes. In: Cole K.M. y R.G. Sheath (eds.). *Biology of the Red Algae*. Cambridge Univ. Press. pp. 73-102.
- Dixon, P.S. 1982. Life histories in the Florideophyceae with particular reference to the Nemaliales *sensu lato*. *Bot. Mar.* 25: 611-621
- García, V. A. 1977. *Manual de técnicas de citogenética*. Colegio de Posgraduados. México. 118 p.
- Gardner, E.J. 1974. *Principios de genética*. Ed. Limusa, México. 551p.
- Macler, B.A. y J.A. West. 1987. Life history and physiology of the red alga, *Gelidium coulteri*, in unialgal culture. *Aquaculture* 61:281-293.
- Masuda, M., K. Kogame y M.D. Guiry. 1996. Life history of *Gymnogongrus griffithsiae* (Phylloporaceae, Gigartinales) from Ireland: implications for life history interpretation in Rhodophyta. *Phycologia* 35:421-434
- Nieto A. y J. Llorente. 1989. Caracteres bioquímicos y nucleares en los métodos de la sistemática moderna. *Ciencias* 3:56-77.
- Robles, S.R. 1982. *Terminología genética y fitogenética*. Ed. Trillas. México. p.163
- Rodríguez-Vargas, D. 1989. *Gelidiales- Rhodophyta: Una Contribución a la Flora Tónica del Pacífico Tropical Mexicano*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, UNAM. México. pp. 195-196.
- Stansfield, W.D. 1992. *Genética*. 3er. Ed. McGraw Hill. México. 574 p.
- West, J. A. and M.H. Hommersand. 1981. Rhodophyta: life histories. En: (Lobban, C.S. y M. J. Wynne, Eds.) *The Biology of the Seaweeds*. University of California Press. Berkeley. pp. 276.

ANEXO 3. MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares han resultado muy útiles en la determinación y delimitación de especies (en estudios taxonómicos) debido a que no se ven influenciados por el ambiente y proporcionan un gran número de caracteres moleculares que pueden ser de gran importancia en la diferenciación de especies y establecimiento de relaciones filogenéticas. Un marcador se describe como la secuencia de DNA o de proteína que puede ser fácilmente detectado y cuya herencia puede ser monitoreada. Esta definición hace referencia al polimorfismo de bandas obtenidas por medio de técnicas moleculares como la de isoenzimas o bandas en el análisis del DNA (Juárez, 2001).

El primer marcador molecular utilizado para determinar variación genética a nivel de ácidos nucleicos fue la hibridación del DNA (Britten, *et al.*, 1978), esta técnica involucra el corte de la molécula de DNA con la ayuda de enzimas de restricción, la separación electroforética de los fragmentos de DNA de acuerdo a su tamaño y la detección de patrones polimórficos por hibridación con una secuencia específica de DNA marcada con algún elemento radiactivo. Una de estas técnicas son los RFLP's (Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica), los cuales se generan por rearrreglos en el genoma que provocan alteraciones en los sitios de reconocimiento para la endonucleasa que se usa en la digestión, esta técnica permite detectar alelos que expresan herencia codominante, son altamente reproducibles y detectan polimorfismo intermedio, se han utilizado para detectar genes específicos y para discriminar especies muy relacionadas así como la elaboración de mapas génicos (Demeke, *et al.* 1997) Los RFLP's han sido utilizados en la determinación de relaciones a nivel interespecífico (Goff y Coleman, 1988) e intraespecífico (Parsons *et al.*, 1990; Maggs *et al.*, 1992).

Con la introducción de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se ha producido una explosión en la diversidad de marcadores moleculares que se aplican en diversas áreas de la biología (González, 1998). Existen marcadores específicos que se han utilizado para diagnóstico clínico o mutagénesis y otros se han usado para detectar variación molecular, así como variación a nivel de poblaciones o especies (González, 1998).

El procedimiento no es complicado, inicia con la toma de tejido, para romper las paredes celulares con enzimas y/o detergentes. Posteriormente se separan los ácidos nucleicos con otras biomoléculas y resto de tejido, y finalmente se concentra y/o seca el DNA, (el aislamiento del DNA, que en caso particular de las algas se utiliza fenol/cloroformo para la extracción de DNA y con etanol se precipitan los ácidos nucleicos (Coleman y Goff, 1991; Saunder, 1993; y Filipe, 1997).

Una vez aislado, se purifica para eliminar impurezas de extracción, en un principio se hacía a través del uso de la ultracentrífuga en gradientes de cloruro de cesio/bromuro de etidio (Goff y Coleman, 1988), actualmente se cuenta con Kits comerciales para purificación de DNA, de muy fácil uso, como el Gen Clean. Se eliminan las impurezas por métodos electroforéticos geles de agarosa (Saunders, 1993) o cromatografía (Parsons *et al.*, 1990) (fig.a).

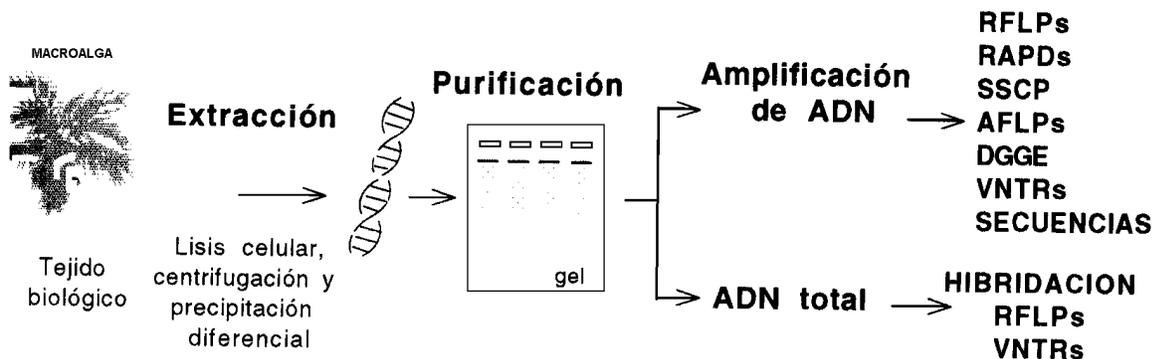


Fig. a. Extracción de DNA y dos vías alternativas para la búsqueda de marcadores moleculares. El DNA extraído se purifica por varios métodos (ultracentrifugación, columnas o geles). Este DNA purificado se recupera para examinar la variación a nivel de todo el genoma o para amplificar una región específica (Modificado de González, 1998).

Técnica del PCR

En 1983, Kary Mullis, de Cetus Corporation, desarrolló una nueva técnica que es ampliamente utilizada en la actualidad para amplificar un fragmento de DNA específico, sin la necesidad de células bacterianas. Mullis y colaboradores aprovecharon las características de las enzimas polimerasas de DNA de especies de bacterias que viven en fuentes termales que es estable a 90 °C, temperatura que destruye la actividad enzimática de la mayoría de las polimerasas del DNA y utilizando esta enzima resistente desarrollaron la técnica del PCR "Reacción en cadena de la polimerasa", en la cual una sola región de DNA, que a veces se presenta fugazmente en mínimas cantidades, se puede amplificar con rapidez y poco costo.

Una muestra de DNA se mezcla con los cuatro desoxiribonucleótidos y una polimerasa de DNA resistente a temperaturas altas, junto con los fragmentos de DNA sintéticos cortos

(oligonucleótidos) complementarios de las secuencias de DNA en los extremos 3' de la región de DNA que se desea amplificar. Los oligonucleótidos "primers" sirven como iniciadores a los cuales se añaden los nucleótidos durante los pasos de duplicación descritos a continuación.

La mezcla se calienta a 92-94 °C, lo bastante caliente para separar las moléculas de DNA de la muestra en sus cadenas componentes. Posteriormente se enfría la mezcla para permitir que los iniciadores se enlacen a los extremos 3' de ambas cadenas del DNA específico y la polimerasa añadida nucleótidos a los extremos 3' de los iniciadores. A medida que la polimerasa alarga los iniciadores, copiando selectivamente el DNA específico, forma nuevas cadenas de DNA complementarias. Elevando una vez más la temperatura, la cadenas de DNA originales y las recién formadas se separan. En seguida se enfría la muestra para permitir que los iniciadores sintéticos en la mezcla se unan una vez más a los extremos 3' del DNA específico, que ahora está presente en cantidad doble de la original. Este ciclo se repite una y otra vez, y en cada ocasión se duplica la cantidad de la región de DNA específica flanqueada por los iniciadores enlazados.

En unas cuantas horas se pueden generar miles de millones de copias de esta región específica. Además de emplearse para amplificar fragmentos de DNA específicos, el PCR puede generar grandes cantidades de DNA a partir de muestras mínimas. (Karp, 1998).

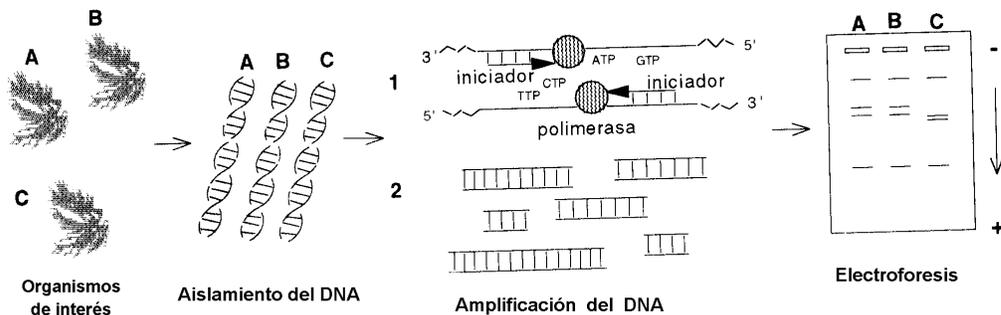


Fig. b. El DNA genómico de las macroalgas de interés (A, B, C) se someten a una amplificación (PCR) al azar (1). Si el iniciador se hibrida en dirección opuesta y a una distancia conveniente el uno de la otra, el fragmento entre ellos se amplificará (2). Los productos de amplificación se separan por medio de electroforesis de agarosa y se visualiza el gel con bromuro de etidio. (Modificado de González, 1998)

Surge con esto una técnica basada en la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) (Erlich, *et al.*, 1991) la cual fue reportada simultáneamente por 3 grupos de investigación el de Williams, *et al* (1990) quienes la nombraron Amplificación Aleatoria del DNA Polimorfico (RAPD) del grupo DuPont Co. (Wilmington, USA); el grupo de Welsh y McClelland (1990) del Instituto de Investigaciones de California USA, nombrándola AP-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa con oligos arbitrarios); y el grupo de Caetano-Anollés *et al.*, (1991) estos últimos le llamaron Huellas del DNA amplificado (DNA Amplification fingerprinting)

Este tipo de marcadores se basa en la amplificación del DNA genómico con primers o iniciadores simples de secuencias aleatorias de nucleótidos. Este procedimiento detecta secuencias nucleotídicas polimórficas. En dicha reacción, una secuencia simple de iniciador (primer de tan solo 10 nucleótidos) se liga al DNA genómico en 2 diferentes sitios y en extremos opuestos al DNA de prueba. Si estos sitios afectados están dentro de la distancia amplificable, se produce un producto discreto por medio de la amplificación mediada por el termociclador (Azpiros *et al.*, 1999).

La presencia de cada producto de amplificación identifica la secuencia homóloga de nucleótidos completa o parcial entre el DNA genómico y los oligonucleótidos del iniciador (primer). En promedio, cada primer amplificará directamente a varios *loci* en el genoma, haciendo una eficiente selección del polimorfismo de secuencias de nucleótidos entre individuos.

Una reacción típica se realiza con un amortiguador simple. Los cuatro nucleótidos trifosfatados (D'ATP, D'CTP, D'GTP y D'TTP), la secuencia primaria (primer), Taq polimerasa y unos pocos nanogramos de DNA genómicos del material en estudio. Después de cuatro horas de amplificación en el termociclador, donde se realizan los procesos de desnaturalización, anillamiento y replicación del DNA mediante cambios bruscos de temperatura (92, 35 y 72 °C respectivamente) los productos se separan en un gel de agarosa mediante corriente eléctrica, donde directamente se tiñe y visualiza el DNA amplificado, (Azpiros *et al.*, 1999). El sitio del iniciador más la secuencia de nucleótidos se le llama "locus RAPD" y al producto de amplificación derivado de este locus particular se le denomina "marcador RAPD", (Grosberg *et al.* 1996)(Fig. c y d).

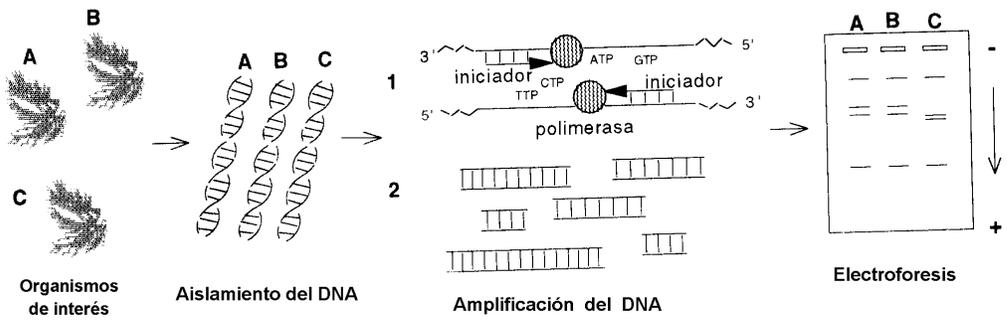


Fig. c. Estrategia general para la obtención de RAPD's. El DNA genómico de las macroalgas de interés (A, B, C) se someten a una amplificación (PCR) al azar (1). Si el iniciador se hibrida en dirección opuesta y a una distancia conveniente el uno de la otra, el fragmento entre ellos se amplificará (2). Los productos de amplificación se separan por medio de electroforesis de agarosa y se visualiza el gel con bromuro de etidio. (Modificado de González, 1998)

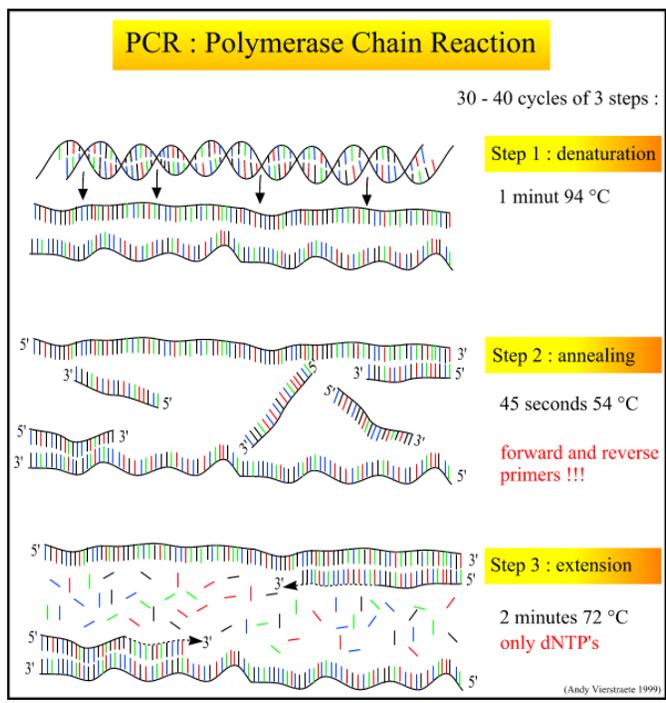


Fig. d. Diagrama del PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

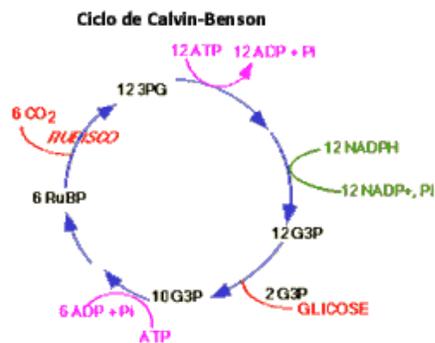
Referencias

- Azpíroz, H.S., Montero V. y Rodríguez, J.L. 1999. *Manual para la interpretación de marcadores genéticos moleculares usados en la descripción varietal*. Solleiro, J.L. y Morales V. (eds.) 79 pp.
- Britten, R.J., Cetta, A. y Davidson, E.H., 1998. The single-copy sequence polymorphism of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Cell* 15:1175-1186
- Caetano-Anollés, G.B.J. Bassam, P.M. Gresshoff. 1991. DNA amplification fingerprinting using short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9:553-557.
- Coleman, A.W. and L.J. Goff. 1991. DNA analysis of eukaryotic algal species. *J. Phycol.* 27:463-473.
- Demeke, T., B. Sasikumar, P. Hucl, and R.N. Chibbar. 1997. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) in cereal improvement. *Maydica* 42:133-142.
- Erllich, H.A., D. Gelfand and J.J. Sninsky. 1991. Recent advance in the polymerase chain reaction. *Science* 252:1643-1651
- Filipe A., R. Santos and Leitao J.M. 1997, DNA extraction and RAPD markers to assess the genetic similarity among *Gelidium sesquipedale* (Rhodophyta) populations. *J. Phycol.* 33: 706-710.
- Goff, L.J. y Coleman, A.W. 1988. The use of plastid DNA restriction endonuclease patterns in delineating red algal species and populations. *J. Phycol.* 24:357-368
- González., D . 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. *Rev. Mex de micología* 14:1- 21
- Grosberg, R K., Levitan, D.R. y Cameron, B.B., 1996. Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers: a random primer for the novice and nervous. In: J.D. Ferraris y S. R. Palumbi (eds.) *Molecular Zoology*. Wiley-Liss New York pp.67-100
- Juarez M.J. 2001. MARCADORES MOLECULARES EN EL GENERO *Prosopis*. Tesis para obtener el grado de Doctor . Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. 91pp.
- Karp, G. 1998. *Biología celular y molecular*. McGraw Hill Interamericana. 746 pp.
- Maggs, C.A., Douglas S.E., Fenety J. y Bird C.J. 1992. A molecular and morphological analysis of the *Gymnogongrus devoniensis* (Rhodophyta) complex in the North Atlantic. *J. Phycol.* 28: 214- 232
- Parsons, T.J., Maggs, C.A. y Douglas, S.E. 1990. Plastid DNA restriction analysis links The heteromorphic phases of an apomictic red algal life history. *J. Phycol.* 26:495-500
- Saunders G.W. 1993. Gel purification of red algal genomic DNA: an inexpensive and rapid method for the isolation of polymerase chain reaction-friendly DNA. *J. Phycol* 29:251-254.
- Welsh, J. And M. McClelland. 1990. Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7219
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535

ANEXO 4 . RuBisCo

El cloroplasto ha sido el plástido más estudiado hasta el momento, cuya función es la realización de fotosíntesis. El proceso fotosintético comprende la conversión de energía luminosa en energía química, así como la fijación de CO₂ atmosférico en moléculas carbonadas. El proceso se divide en dos fases la fase luminosa y la fase oscura. Insertados en la membrana tilacoidea se encuentra el aparato fotoquímico, formado por las proteínas involucradas en la captación de la energía luminosa y su conversión a energía química, así como los pigmentos asociados a estos complejos carotenos, clorofila, ficoeritrinas, entre otros, dependiendo de la especie. Estos complejos forman lo que se conoce como los fotosistemas y es en donde se lleva a cabo la fase luminosa del proceso luminoso. El fotosistema I se encuentra en las regiones no apiladas de los tilacoides, mientras que el fotosistema II se localiza en el grana (membrana tilacoidea plegada formando sacos en forma de disco que se apilan unos con otros). Otros de los elementos insertados en la membrana tilacoidea son el complejo proteico involucrado en la síntesis de ATP, la ATPasa y el complejo de citocromos (León, 2003).

La fase oscura se lleva a cabo en el estroma o fase soluble del cloroplasto, en donde se realiza la fijación del carbono en donde se promueven la formación de triosa fosfato. En el estroma se encuentran las enzimas involucradas en las reacciones químicas, de las cuales la mas abundante es la enzima RuBisCo (Ribulosa 1-5 Bi-fosfato carboxilasa/oxigenasa) Esta enzima esta encargada de carboxilar a la ribulosa bifosfato (Woodrow y Berry 1988).



La enzima RUBISCO esta formada por dos subunidades una larga llamada *rbcl* y otra corta o pequeña nombrada *rbcs*, en plantas superiores los genes que codifican esta subunidades se localizan en diferentes genomas. Los genes nucleares que codifican proteínas cloroplásticas, como la *rbcs* subunidad pequeña se encuentra en el genoma nuclear de la planta y esta formada por una familia multigenética cuyo numero de integrantes varia entre las diferentes plantas, como

en el tomate y la papa que contienen 5 genes, estos pueden presentar intrones pero estos intrones no siempre están conservados entre los diferentes miembros. (León, 2003). Una de las señales más importantes en el proceso de fotosíntesis es la luz, ya que desempeña un papel fundamental en el desarrollo del cloroplasto y promueve la expresión de los genes fotosintéticos nucleares, como el *rbcS*, posteriormente la proteína es transportada al cloroplasto para encontrarse con la subunidad larga *rbcL* cuyos genes promotores se encuentran en el genoma del cloroplasto. El DNA plastídico se localiza en la matriz

Los cloroplastos son organelos característicos de las células vegetales como un remanente endosimbiótico de vida libre como progenitor una cianobacteria. La actividad fotosintética del cloroplasto está caracterizada por un alto índice de transcripción y traducción, seguida de una síntesis larga de la enzima ribulosa bifosfato carboxilasa (rubisco) y una rápida renovación de compuestos que transfieren electrones, característica necesaria para la fijación fotosintética eficiente de CO₂ (Leister, 2003).

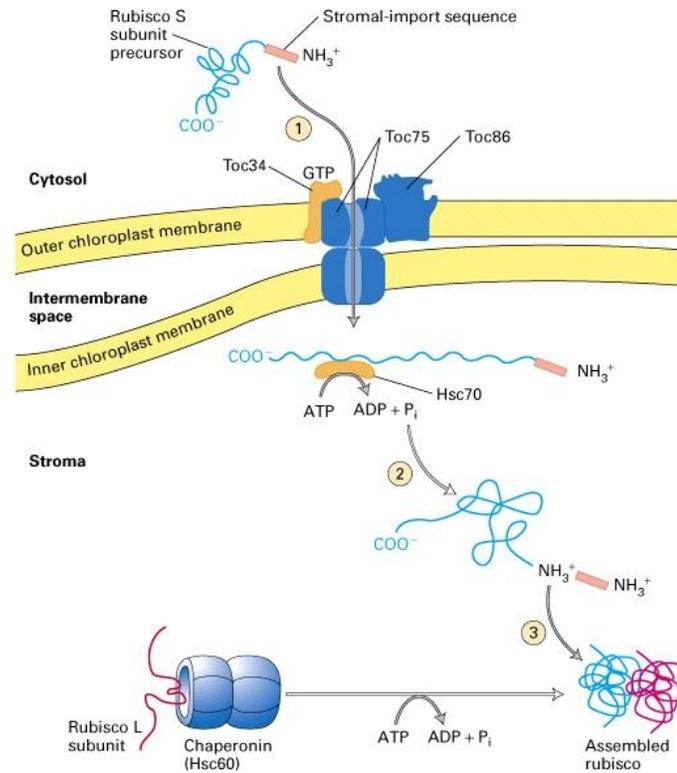
En las plantas coexisten tres genomas diferentes el del cloroplasto, el mitocondrial y el nuclear, cada uno con características peculiares y complicaciones moleculares y genéticas importantes de entender, ya que de ello depende su utilidad para resolver problemas de índole taxonómico y evolutivo a diferentes niveles. El genoma del cloroplasto es un circular, filogenéticamente muy cercano al genoma de las cianobacterias, tiene una estructura muy conservada en plantas superiores y tiene un número pequeño de genes (Eguiarte, *et al.*, 2003)

Los genomas del cloroplasto y mitocondria no presentan recombinación y se heredan por vía materna o paterna, mientras que en el genoma nuclear sí se presenta recombinación y se hereda biparentalmente. De los tres genomas se diferencian en que cada uno cambia a diferentes tasas evolutivas, lo que permite utilizarlos para analizar diferentes problemas taxonómicos y evolutivos a diferentes escalas temporales. Los genes de las mitocondrias en plantas generalmente cambian muy lentamente con algunas excepciones y los genes del cloroplasto también cambian lentamente, pero no tanto como los de las mitocondrias mientras que los genes del núcleo evolucionan o cambian muy rápidamente (Eguiarte, *et al.*, 2003). Esto nos da la ventaja de utilizar los genes que se codifican en el cloroplasto para determinar variabilidad genética en especies con problemas taxonómicos. Los genes que codifican la enzima rubisco ha sido ampliamente usado.

La ribulosa 1-5, bifosfato carboxilasa/ oxigenasa (RuBisCo), es un enzima que facilita el paso de la fijación del CO₂ primario en la fotosíntesis. La estructura cuaternaria de la enzima consiste en

8 largas y 8 pequeñas subunidades. En las algas verdes y en plantas terrestres, la subunidad larga es codificada por el gen *rbcl* del cloroplasto, mientras que la subunidad pequeña es codificada por el gen *rbcS* nuclear (multigen) (Freshwater *et al.* 1994; Spreitzer, 2003). En otras algas, como en Chromophyta y Rhodophyta, ambas subunidades son codificadas por genes del cloroplasto (Freshwater *et al.* 1994).

Las algas que contienen los genes *rbcl* y *rbcS* en el genoma del cloroplasto presentan un intergen llamado “Espaciador *rbcl* y *rbcS*” que separa ambos genes en el genoma. En el caso de las Chlorophyta se habla de la pérdida del gen *rbcS* en el genoma del cloroplasto, como ha ocurrido en otras plantas. Un ejemplo es el caso de la pérdida de genes en la mitocondria de leguminosas el gen *Cox2*, este es un gen típico de la mitocondria y en las leguminosas es “capturada” por el núcleo, en algunas especies el núcleo controla parcial o totalmente la expresión del gen, de esta manera, en la filogenia de las leguminosas el gen y su control se va perdiendo del genoma de las mitocondrias (Eguiarte, *et al.* 2003). Este caso nos puede explicar como se van perdiendo algunos los genes del cloroplasto y de la mitocondria progresivamente durante el proceso evolutivo de las plantas y como algunos de estos genes se van incorporando al núcleo (Dominguez, 1995).



Importación de la subunidad pequeño de la rubisco en el estroma del cloroplasto y el ensamblaje de la enzima rubisco activa (*rbcl* y *rbcS*).

Referencias

- Leister, D. 2003. Chloroplast research in the genomic age. *Trends in Genetics* 19(1):47-56
- León, M.P. 2003. El Cloroplasto. En : (Jiménez y Merchant eds.) *Biología Celular y Molecular*. Prentice Hall 315-337 p.
- Domínguez, C.A. 1995. Genetic conflicts of interest in plants. *Trends in Ecology and evolution*10:412-416
- Eguiarte, I. A. Castillo y U. Souza 2003. Evolución molecular y genómica en angiospermas. *Interciencia* 28(3):141-147
- Freshwater D.W, Fredericq S., Butler. B.S., Hommersand, M.H y Chase M.W. 1994. A gene phylogeny of red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proc. Natl. Accd. Sci.* 91: 7281-7285
- Spreitzer, R.J. 2003. Role of the small subunit in ribulose-1,5-biphosphate carboxilase/oxygenase. *Arch. Biochem. Biophys* 414:141-149
- Woodrow I.E. and J.A. Berry. 1988. Enzymatic regulation of photosynthetic CO₂ fixation in C₃ plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 533 –594