



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

“Evaluación morfológica y molecular del
género *Halimeda* en el estado de Campeche”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

CARLOS PELCASTRE DE LA CRUZ

TUTOR PRINCIPAL : DR. SERGIO DÍAZ MARTÍNEZ

COMITÉ TUTOR : DRA. ALEJANDRINA GRACIELA AVILA ORTIZ

M. en C. MARÍA MAGDALENA AYALA HERNÁNDEZ

DR. URI OMAR GARCÍA VÁZQUEZ

M. en C. LISANDRO HERNÁNDEZ ANAYA



CIUDAD DE MÉXICO

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la formación académica y brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura para llevar a cabo esta investigación.

A los miembros de mi comité tutor: Dr. Sergio Díaz Martínez, Dra. Alejandrina Graciela Avila Ortiz, M. en C. Lisandro Hernández Anaya, Dr. Uri Omar García Vázquez y M. en C. María Magdalena Ayala Hernández.

Al Dr. Sergio Díaz Martínez por su guía experta que ha enriquecido significativamente mi trabajo, el tiempo brindado para sus comentarios constructivos y el empleo de herramientas para desarrollar esta tesis.

A la Dra. Alejandrina Graciela Avila Ortiz por darme clase desde segundo semestre y poder brindarme valiosos comentarios durante la elaboración de este trabajo, para tener un buen manejo de los equipos e instalaciones prestadas.

Al M. en C. Lisandro Hernández Anaya por ayudarme en todas mis preguntas de emergencia y tomarse el tiempo para explicarme conceptos y herramientas que se necesitaron para la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Uri Omar García Vázquez por darme la formación del laboratorio de séptimo y octavo y apoyarme a concluir la licenciatura dándome alternativas de trabajos que fueran más de mi interés pese a trabajar otros grupos de estudio, y a permitirme usar el laboratorio de sistemática molecular para realizar los análisis moleculares de este trabajo.

A la M. en C. María Magdalena Ayala Hernández por aceptar formar parte de mi comité pese a la premura de la solicitud, y brindarme la facilidad para la revisión de este trabajo.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación Tecnológica, PAPIIT-UNAM, IA204921 por el financiamiento para el trabajo de campo y de laboratorio para la realización de este trabajo.

Agradecimientos personales

Agradezco a mi familia:

Mis papás Estela y Pablo por brindarme su apoyo desde la selección de mi carrera hasta la conclusión, no dejar de mostrarme importancia de hacer lo que quieres, permitirme tomar mis propias decisiones con su respaldo y no dejarme en ningún momento.

A mi abue Nica por darme siempre su apoyo y mostrar interés sobre mi carrera y mis objetivos.

A mis hermanas Paola y Pamela, por apoyarme durante toda mi niñez y no dejar de hacerlo aún ya siento adultos, y por escucharme cada vez que lo necesito.

A Skadi y Miez porque con solo verlos me daban la energía para poder seguir adelante, y siempre trasmitirme la calma necesaria.

A mis amigos que hice durante la carrera y a todos los bellakos del tronco por acompañarme en durante toda la licenciatura y en las salidas para “compartir experiencias”

A los juegos y OpenAI por crear el mejor modelo lenguaje de AI, que me permitió desestresarme en mis tiempos de ocio y poder aprender de forma más fluida y a un solo clic.

*“The scientists of today think deeply instead of clearly.
One must be sane to think clearly, but one can think
deeply and be quite insane”*

Nikola Tesla

Índice

	Páginas
Resumen	1
Introducción	2
Marco teórico.....	5
Sistemática y taxonomía.....	5
Métodos de inferencia filogenética	5
Clasificación de algas	6
Concepto de especie	7
Antecedentes.....	9
Historia taxonómica de <i>Halimeda</i>	9
Zona de estudio	10
Estudios moleculares en <i>Halimeda</i>	11
Justificación	12
Hipótesis	12
Objetivos.....	13
General	13
Particulares.....	13
Material y método	13
Muestreo	13
Herborización y revisión morfológica.....	14
Análisis molecular.....	15
Análisis filogenéticos	17
Edición y alineamiento	17
Modelos de sustitución.....	17
Reconstrucción filogenética.....	17
Resultados	19
Revisión morfológica	19
Análisis filogenéticos	22
Análisis de agrupamiento con bPTP	24
Divergencia genética	24
Discusión	28
<i>Halimeda incrassata</i> (J.Ellis) J.V.Lamouroux.....	28
<i>Halimeda opuntia</i> (Linnaeus) J.V.Lamouroux	29
<i>Halimeda discoidea</i> Decaisne 1842.....	31
<i>Halimeda tuna</i> (J.Ellis & Solander) J.V.Lamouroux	33
Conclusiones.....	36
Perspectivas	37
Referencias.....	38
Anexos	48

Índice de figuras

	Páginas
Figura 1 <i>Caracteres en las revisiones morfológicas de Halimeda</i>	3
Figura 2 <i>Localidades de colecta en la costa de Campeche con coordenadas</i>	14
Figura 3 <i>Árbol de máxima verosimilitud empleando secuencias del gen tufA del cloroplasto</i>	26
Figura 4 <i>Distribución de las secuencias usadas de H. tuna y H. discoidea en los análisis filogenéticos</i>	27

Índice de tablas

	Páginas
Tabla 1 <i>Clasificación taxonómica del género Halimeda</i>	4
Tabla 2 <i>Cebadores para gen tufA</i>	16
Tabla 3 <i>Perfil de PCR empleado</i>	16
Tabla 4 <i>Caracteres morfológicos de los cinco grupos de Halimeda</i>	21
Tabla 5 <i>Número de ejemplares colectados por especies y localidades</i>	22
Tabla 6 <i>Distancias “p” interespecíficas de grupos de Halimeda en porcentaje</i>	25

Índice de anexos

	Páginas
Lámina 1 <i>Halimeda incrassata</i>	50
Lámina 2 <i>Halimeda opuntia</i>	51
Lámina 3 <i>Halimeda discoidea</i>	52
Lámina 4 <i>Halimeda tuna</i>	53
Lámina 5 <i>Halimeda tuna sp 2</i>	54

Resumen

En el presente trabajo se evaluaron caracteres morfológicos y moleculares de las cuatro especies de algas clorofitas pertenecientes al género *Halimeda* presentes en el estado de Campeche. Los análisis morfológicos y moleculares realizados aquí son la primera revisión conjunta sobre la diversidad de las especies para el estado. En la revisión morfológica externa, se examinaron las formas y medidas de los segmentos del talo y sistemas de fijación, mientras que en la revisión anatómica se emplearon secciones histológicas para revisar la disposición, tamaño y forma de las capas utriculares. Para los análisis filogenéticos, se emplearon métodos de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana utilizando la región *tufA* como marcador genético.

Los resultados de la revisión morfológica y filogenética coincidieron con la literatura mostrando las especies *Halimeda incrassata* y *H. opuntia* como especies monofiléticas. La especie *H. discoidea* mostró una mayor variación morfológica principalmente debido a la ausencia de la segunda capa utricular subglobosa registrada. Además, se observó una alta divergencia genética entre los clados formados en el análisis filogenético, lo cual separó los ejemplares del Atlántico de los del Indo-Pacífico.

Halimeda tuna presentó discrepancias en la revisión morfológica debido a la identificación de un morfotipo que mostró la presencia de una espina central en los utrículos periféricos. No obstante, este morfotipo se recuperó dentro del mismo clado con los demás ejemplares de la especie en los análisis filogenéticos, y no se observó una divergencia genética entre morfotipos. La topología obtenida mostró dos clados que incluyen a la especie, uno compuesto por ejemplares del Atlántico y otro por ejemplares del Mediterráneo, con una alta divergencia genética superior al 10% entre ambos clados.

Las discrepancias encontradas en las revisiones de las especies *Halimeda discoidea* y *H. tuna* pueden considerarse como evidencia previa para llevar a cabo un análisis de delimitación de especie más exhaustivo. Esto puede requerir un muestreo más amplio y el uso de marcadores moleculares adicionales.

Palabras clave: *Halimeda*, revisión morfológica, análisis filogenéticos, región *tufA*, Campeche

Introducción

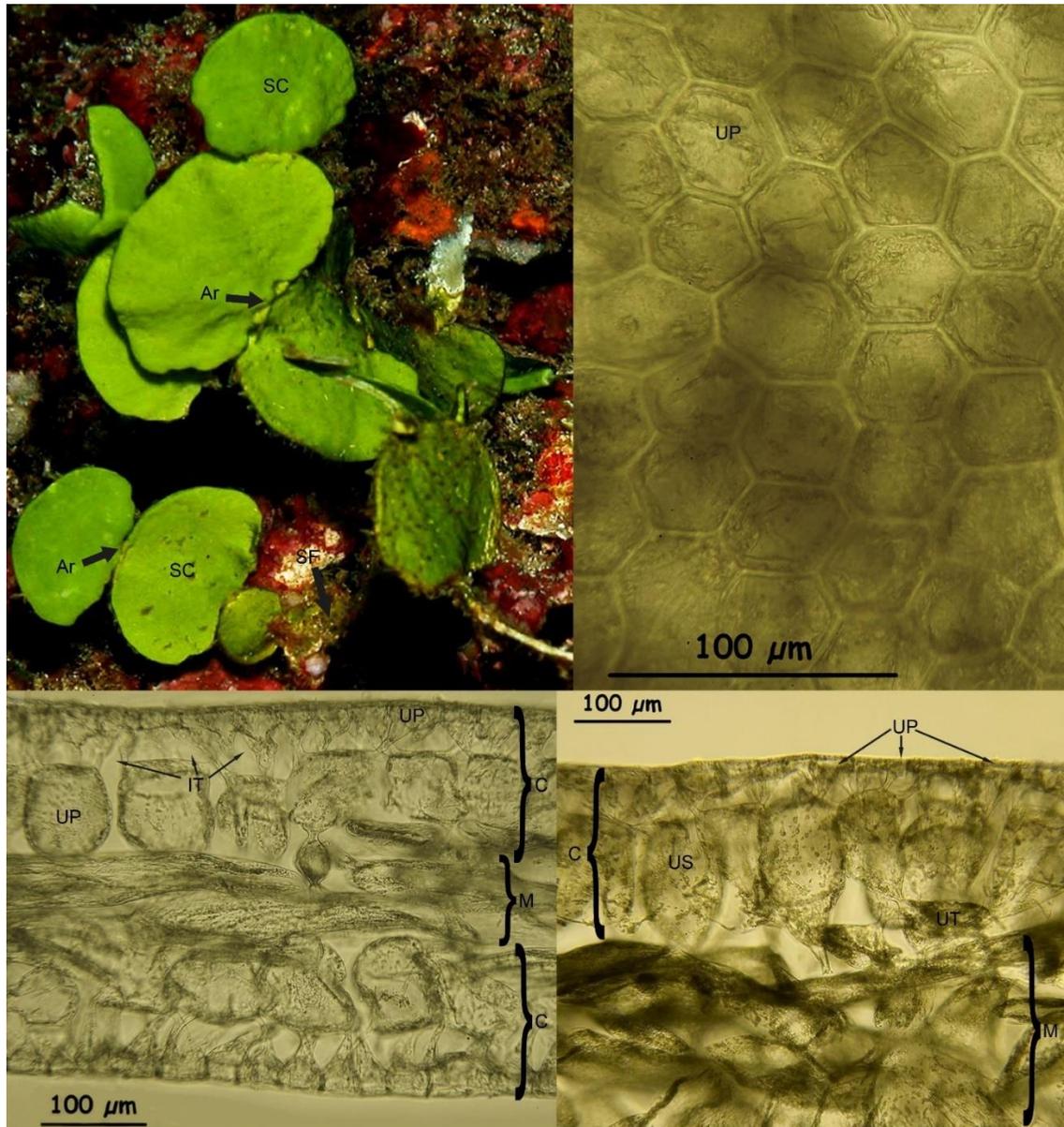
El género *Halimeda* J.V.Lamouroux 1812 (Halimedaceae, Ulvophyceae) (ver Tabla 1) pertenece al phylum Chlorophyta, cuenta con 58 especies aceptadas taxonómicamente (Guiry y Guiry, 2023). Este género de macroalgas marinas presenta talos con segmentos aplanados calcificados (placas) y articulaciones no calcáreas (nodos) (Lamouroux, 1812). Anatómicamente el talo está compuesto por estructuras medulares, nódulos, y una corteza constituida por los utrículos periféricos y subperiféricos. La mayoría de las especies del género presentan de dos a cinco capas utriculares. Los caracteres morfológicos (ver Figura 1) para la identificación de las especies dentro del género son: los sistemas de fijación que pueden permanecer sueltos, formar una masa de hilos o formando una estructura para fijación en sustrato fino; segmentos que varían en tamaño, forma y disposición, desde segmentos grandes aplanados en forma discoidal (*H. discoidea* Decaisne 1842) a segmentos pequeños con forma trilobada acanalada (*H. opuntia* (Linnaeus) J.V.Lamouroux 1816); corteza, con utrículos de tamaño, forma y orden variada y medula con diferentes fusiones (Hillis-Colinvaux, 1980).

El género *Halimeda* presenta una distribución pantropical, con mayor presencia en mares tropicales cálidos y poco profundos. Se consideran organismos sublitorales que se pueden encontrar hasta los 80 metros de profundidad, y pueden llegar a quedar expuestos al sol cuando la marea baja (Hillis-Colinvaux, 1980). El género presenta alta capacidad para colonizar sustratos, ya que se pueden presentar en zonas fangosas, rocosas o arena. Los patrones de distribución presentan una distinción entre los organismos del Atlántico y del Indo-Pacífico pese a sus condiciones óptimas similares para las especies del género (Hillis-Colinvaux, 1980; Verbruggen, De Clerck, Schils, et al., 2005). Las especies de *Halimeda* muestran un potencial como sumidero de carbono y contribuyen en la producción de carbonato de calcio, colaborando en la formación de hábitats y sustratos, generando islas y plataformas (Hillis-Colinvaux, 1980; Payri, 1988; Rees et al., 2007; Wiman y McKendree, 1975). Actualmente, los arrecifes de coral son la zona más estudiada en donde se encuentran estas algas calcáreas, debido a su importante aporte a la formación de estos ecosistemas (Hillis, 1959; Hillis-Colinvaux, 1980; Payri, 1988; Rees et al., 2007; Wiman y McKendree, 1975).

En México se han reportado cerca de 12 especies, en el Golfo de México y Mar Caribe, se presenta una mayor diversidad en comparación con las cinco especies reportadas para el Pacífico mexicano (Pedroche y Sentíes, 2020).

Figura 1

Caracteres en las revisiones morfológicas de Halimeda



Nota. Halimeda discoidea. Segmentos calcificados = SC, Articulaciones = Ar, Sistema de fijación = SF, Médula = M, Corteza = C, Utrículos perifericos = UP, Utrículos subperifericos = US, Utrículos terciarios = UT y Espacio interutrículo = IT. Imágenes tomadas de Smithsonian Tropical Research Institute - Marine Plants Of Pacific Panama DS.

Tabla 1

Clasificación taxonómica del género Halimeda

Imperio	Eucariota Chatton 1925
Reino	Plantae Haeckel 1866
Subreino	Viridiplantae Cavalier-Smith 1981
Infrareino	Chlorophyta infrareino Cavalier-Smith 1993
Filo	Chlorophyta Reichenbach 1834
Subfilo	Chlorophytina Cavalier-Smith 1998
Clase	Ulvophyceae K.R.Mattox & K.D.Stewart 1984
Orden	Bryopsidales J.H.Schaffner 1922
Familia	Halimedaceae Link 1832
Género	<i>Halimeda</i> J.V.Lamouroux 1812

En las costas de México, la mayor diversidad de *Halimeda* se encuentra en el Golfo de México que puede estar relacionado a la mayor presencia de zonas óptimas con una profundidad adecuada para su crecimiento, con respecto al Pacífico mexicano (Hillis-Colinvaux, 1980). De las 12 especies reportadas en México, se encuentra un representante de cada una en la zona del Golfo (ver Anexo 1). Sin embargo, solo cuatro de las 12 especies (*Halimeda discoidea*, *H. incrassata* (J.Ellis) J.V.Lamouroux 1816, *H. opuntia* y *H. tuna* (J.Ellis & Solander) J.V.Lamouroux 1816) han sido reportadas en el estado de Campeche. A pesar de que el género ha sido objeto de estudio en listados ficoflorísticos, a la fecha no se ha realizado un estudio taxonómico exhaustivo incluyendo datos moleculares como se ha hecho en otras regiones del Atlántico (Kooistra et al., 2002; Verbruggen, De Clerck, Kooistra, et al., 2005; Verbruggen, De Clerck, Schils, et al., 2005), Indo-Pacífico (Cremen et al., 2016; Dijoux et al., 2012; Kooistra et al., 2002; Pongparadon et al., 2015; Verbruggen, De Clerck, Kooistra, et al., 2005; Verbruggen, De Clerck, Schils, et al., 2005) y Mediterráneo (Kooistra et al., 2002; Rindi et al., 2020; Verbruggen, De Clerck, Schils, et al., 2005). Con base en lo anterior, en el presente trabajo se analizaron las especies registradas para el estado de Campeche, empleando revisiones morfológicas y moleculares sobre los ejemplares colectados.

Marco teórico

Sistemática y taxonomía

La sistemática es la ciencia que se encarga del estudio y clasificación de los organismos biológicos de forma metodológica y permite establecer hipótesis sobre la diversificación de los grupos a través del tiempo (Morrone, 2000).

La taxonomía es el proceso para clasificar los organismos vivos que se basa en las relaciones evolutivas para proporcionar una clasificación sólida y estable que sea accesible y comprensible por todos. Emplea un sistema de identificación y clasificación basado en taxones de especies, nombrados de acuerdo en códigos internacionales de nomenclatura (Monro y Mayo, 2022).

Actualmente, la sistemática utiliza herramientas moleculares para desarrollar clasificaciones taxonómicas de diversos grupos y comparándolas con enfoques morfológicos tradicionales, proporcionando mayor respaldo a las relaciones filogenéticas entre los grupos que se parecen morfológicamente y aquellos que presentan gran plasticidad (Hillis y Wiens, 2000; Jorgensen y Cluster, 1988; Page y Holmes, 2008; San Mauro y Agorreta, 2010). Así mismo, la universalidad de tipos y estados de carácter, y el gran número de métodos de análisis que están disponibles, permiten un mayor soporte estadístico con las técnicas moleculares. El alto grado de variación en tasas de sustitución entre genes y sus regiones, conocer las funciones de las bases moleculares y sus secuencias, y la facilidad de recopilación de estos datos, son algunas ventajas que presenta el uso de herramientas moleculares (San Mauro y Agorreta, 2010).

La rama de la sistemática filogenética busca clasificar a los organismos en grupos naturales y reconstruir sus relaciones evolutivas, y la clasificación debe ser lógicamente coherente con la filogenia recuperada. La inferencia filogenética es una herramienta que utiliza métodos estadísticos y computacionales para analizar los datos y determinar la hipótesis más probable de la relación evolutiva entre las especies y construir árboles filogenéticos que representen esa relación evolutiva (Wiley y Lieberman, 2011; Yang y Rannala, 2012).

Métodos de inferencia filogenética

Los métodos de reconstrucción filogenética se dividen en dos categorías basados en distancia y caracteres. Para los métodos de distancia se emplea una matriz de distancia con las distancias genéticas calculadas entre cada par de especies. Y el método más empleado es el

algoritmo de unión de vecinos, que emplea agrupaciones en un par de taxones que va uniendo en un árbol de estrella hasta obtener un árbol resuelto. Estos métodos presentan una gran eficiencia computacional pero no presentan una funcionalidad óptima para secuencias muy divergentes (Kapli et al., 2020; Yang y Rannala, 2012).

Los métodos basados en caracteres más empleados son: máxima parsimonia, máxima verosimilitud (MV) e inferencia bayesiana (IB). En máxima parsimonia se obtiene una topología de árbol a través de una búsqueda heurística con el menor número de cambios, una ventaja de este algoritmo es su simplicidad matemática y eficiencia computacional. Pero no permite incorporar un modelo evolutivo (Kapli et al., 2020; Yang & Rannala, 2012).

El algoritmo de MV estima la probabilidad de que una determinada hipótesis filogenética sea verdadera en función de los datos moleculares disponibles. Permite emplear modelos de sustitución molecular a partir de los datos observados y realizar una topología que represente la relación entre las especies en términos de su historia evolutiva. Una ventaja de este algoritmo es su eficiencia en términos de tiempo y recursos computacionales, y la capacidad de manejar grandes conjuntos de datos, pero necesita una medida de confianza (Bootstrap = BS) para poder evaluar la robustez de la topología obtenida (Kapli et al., 2020; Yang y Rannala, 2012).

El algoritmo de IB se basa en la probabilidad a priori y la probabilidad a posteriori, y utiliza el teorema de Bayes y la ley de la verosimilitud para estimar la distribución de la probabilidad de los parámetros del modelo y seleccionar el modelo óptimo. Una ventaja es que puede usar modelos de sustitución realistas y permite incorporar información previa al análisis, pero es un método que requiere mucho tiempo de procesamiento y es computacionalmente costoso (Kapli et al., 2020; Yang y Rannala, 2012).

Clasificación de algas

Las primeras clasificaciones del grupo de las algas fueron clasificaciones artificiales basadas en las características morfológicas y anatómicas de los organismos, utilizando el tamaño como principal criterio para su organización. Según Cavalier-Smith (2007), el grupo se definía de manera general como “fotosintetizadores oxigénicos distintos de las plantas terrestres embriofitas”, que incluye tanto organismos unicelulares como macroalgas bentónicas, funcionando como clasificación artificial. Posteriormente se agrega una clasificación que separa las microalgas (organismos que requieren de un equipo de aumento para ser

observadas) en donde se incluye el fitoplancton, y las macroalgas que son perfectamente visibles a simple vista (Pereira, 2021; Wray, 1977).

Los caracteres taxonómicos básicos de las algas se determinan por el tipo de pared celular, caracteres citológicos, composición química de los pigmentos fotosintéticos, sustancias de almacenamiento, el origen endosimbiótico y las características de los cloroplastos (Pereira y Neto, 2014). Con la publicación de Saiki et al. (1988) de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR; por sus siglas en inglés), los ficólogos propusieron utilizar esta técnica para estudiar la evolución y sistemática de las algas presentando la ventaja de que los datos obtenidos solo están limitados por el tamaño del genoma (Hillis, 1987) y permite llegar a una mejor identificación de los organismos usando los ácidos nucleicos y la secuencia de proteínas para hacer propuestas de las relaciones filogenéticas, y conocer la alta diversidad críptica dentro de un grupo (Payo et al., 2013), e incluso permite proponer nuevas clases de algas como en el caso de Pinguiphyceae propuesto por Kawachi et al. (2002).

Concepto de especie

La especie es considerada como la unidad básica en la biología, y ha sido objeto de debate en la búsqueda de un concepto que pueda ser aplicado en los estudios de sistemática. Actualmente, no existe un consenso universal sobre cuál es el mejor concepto de especie, ya que depende del enfoque y del tipo de datos que se utilicen en los estudios. Uno de los principales conceptos es el propuesto por Mayr (1942), conocido como especie biológica, que se enfoca en la capacidad de las poblaciones naturales para reproducirse entre sí y estar reproductivamente aisladas de otros grupos poblacionales. Sin embargo, existen otros conceptos que abordan diferentes enfoques, como el de especie filogenética propuesto por Cracraft (1983), que se enfoca en la historia evolutiva de los organismos y su relación de parentesco, y el de concepto de especie ecológica propuesto por Van Valen (1976), que se enfoca en la ocupación del nicho ecológico y la adaptación a un conjunto particular de factores ambientales.

La falta de un consenso sobre el concepto de especie genera un conflicto con los métodos de delimitación de especies. Para llevar a cabo una delimitación precisa, es necesario analizar el proceso de especiación de los taxones, lo que puede resultar difícil debido a que cada evento de especiación presenta circunstancias y condiciones particulares (Monro y Mayo, 2022; Ross et al., 2010; Wilkins et al., 2022). En consecuencia, es difícil obtener una hipótesis que sea

aplicable para todos los linajes. Una forma de afrontarlo es aplicar más criterios para la identificación, lo que mejora la precisión del método y otorga más robustez y objetividad en los linajes resultantes. De esta manera, en algunos casos, estos métodos pueden ayudar a encontrar especies pseudocrípticas que no contaban con suficientes datos en su descripción inicial, y el uso de nuevas herramientas y un enfoque más robusto permite proponer la hipótesis del linaje con mayor evidencia (de Queiroz, 2007; de Queiroz, 2022; Monro y Mayo, 2022; Ross et al., 2010; Wilkins et al., 2022).

En este trabajo, se utilizará el concepto unificado de especie propuesto por de Queiroz (2007), que establece a una especie como una línea evolutiva independiente, cohesiva y genéticamente aislada, que puede ser identificada mediante criterios múltiples, incluyendo el biológico, el filogenético, el de cohesión genética y el ecológico. Este concepto ofrece una visión más completa y amplia de las especies, abarcando diferentes enfoques y criterios, y permitiendo un análisis más preciso y completo de la diversidad biológica.

Antecedentes

Historia taxonómica de *Halimeda*

La primera descripción y registro de una especie del género *Halimeda* se publicó en el libro “Dell'istoria naturale di Ferrante Imperato napolitano libri 28” en 1599 describiendo a la actual *Halimeda tuna* (bajo el nombre de *Sertolara*) registrada en el mediterráneo y permaneció siendo la única especie del taxón durante más de un siglo. Ellis presentó los primeros estudios taxonómicos del género en 1755, su publicación incluyó la descripción de cinco especies de *Halimeda* que fueron organizadas taxonómicamente dentro del género *Corallina* Linnaeus, 1758 basados únicamente en su morfología externa. Este grupo era considerado un grupo compuesto por animales y no fue hasta 1812 que se separó el género *Halimeda* de *Corallina* derivado de los estudios elaborados por Lamouroux. Hasta 1840 se aceptó el género *Halimeda* dentro del reino vegetal y las *Corallina* que incorporan grandes cantidades de carbonato de calcio en sus paredes como un grupo dentro de Rhodophyta Wettstein 1901 (Woelkerling, 1988).

Los estudios anatómicos del género comenzaron con el trabajo realizado por Askenasy (1889) trabajando con una colección del grupo en la zona del Pacífico. Estos estudios anatómicos complementaron la taxonomía clásica que solo empleaba caracteres morfológicos externos y se emplearon caracteres microscópicos para distinguir entre las especies del género.

Barton (1901) hizo una guía de caracteres anatómicos diagnósticos de *Halimeda* al trabajar con un gran número de muestras obtenidas sobre la formación de los atolones. Para ello, creó tres categorías de patrones de filamentos medulares para la delimitación de las especies del género. Esta taxonomía fue completada con características microscópicas de la adhesión de los utrículos periféricos y la forma de los segmentos, de esta manera, se redujo la cantidad de especies taxonómicamente aceptadas de 27 a siete. Las demás se consideraron morfotipos, debido a la gran plasticidad intraespecífica de las especies del género.

Howe continuó utilizando la taxonomía de Barton e incluyó nuevos caracteres para la delimitación de las especies, como las espinas utriculares, el tamaño y forma de los utrículos periféricos y subperiféricos, la ausencia de adherencia del utrículo, la presencia de fusiones laterales entre los utrículos periféricos y el número de utrículos periféricos soportados por los utrículos subperiféricos (Howe, 1907, 1909). Hillis (1959) también proporcionó información

sobre el número de utrículos periféricos que llevan los utrículos subperiféricos y publicó ilustraciones que permitieron una mejor percepción de los rasgos morfológicos de la plasticidad intraespecífica y el hábito de los talos y cortezas de las especies. Hillis-Colinvaux (1980), realizó una revisión sobre el grupo en la que se tenía una taxonomía similar a su estudio de 1959, pero incluyendo nueve especies más.

La referencia más antigua y relevante sobre la distribución de las especies de *Halimeda* en México es el trabajo realizado por Taylor (1960) en el que se presentan las descripciones morfológicas de las especies en América, pero aplicando y conservando los nombres de taxones de regiones del Mediterráneo e Indo-Pacífico. En México los estudios sobre el género se han limitado a listados florísticos, sin abordar los datos morfológicos que se revisan en su determinación (Ortega et al., 2001; Pedroche et al., 2005; Pedroche y Sentíes, 2020). La distribución de las especies taxonómicamente aceptadas no es homogénea entre los litorales de México. En el Atlántico Mexicano se registran las 12 especies reportadas para México mientras que para el Pacífico solo se registran cinco de las 12 especies reportadas, estos valores pueden ser variables de acuerdo con las bases de datos revisadas (ver anexo 1).

Zona de estudio

El estado de Campeche se ubica en el suroeste mexicano y cuenta con una extensión territorial de 57.924 km² con una zona litoral de 523 km. Y presenta la mayor plataforma continental más grande del país, con un área de 66,770 km² y un volumen de 20,000 ha de aguas continentales. De los 11 municipios del estado siete presentan costa en el Golfo de México (Alpuche Gual, 2014; Rivera-Arriaga et al., 2019). El Golfo de México es una región semicerrada con conexión con el Atlántico y el Mar Caribe. En el sureste de la cuenca del golfo se encuentra la plataforma continental del Banco de Campeche, que se extiende aproximadamente con 90,000 km² desde la línea de playa a 200 m de profundidad, con una pendiente con bajo grado de inclinación y temperaturas fluctuantes alcanzando los 28°C en verano. Esta plataforma abarca desde los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche y Yucatán. La presencia de las corrientes de Lazo, Yucatán y Florida promueve un alto intercambio de nutrientes y una alta diversidad compartida con la región del Mar Caribe (Alpuche Gual, 2014; Díaz, 2004; Díaz-Flores et al., 2017; García-Cuéllar et al., 2004; Rivera-Arriaga et al., 2019; Velasco, 1994).

Estudios moleculares en *Halimeda*

Los estudios moleculares buscan mejorar la delimitación de las especies para evitar problemas de identificación específica, como las especies crípticas que se encuentran dentro del grupo y tener un mejor análisis de las poblaciones (Bickford et al., 2007; Pongparadon et al., 2015; Verbruggen, De Clerck, Schils, et al., 2005). Además, han ayudado a esclarecer la diversidad de taxones debido a la presencia de linajes crípticos. Las especies crípticas son dos o más especies que son consideradas como una sola especie nominal debido a que son morfológicamente indistinguibles. No obstante, el uso de datos moleculares puede permitir encontrar diferencias que ayuden a delimitar estas especies (Bickford et al., 2007).

Por otra parte, se han llevado a cabo análisis morfométricos y moleculares para proporcionar datos sobre la eficacia de la delimitación de especies según las diferentes técnicas usadas (Kooistra et al., 2002; Verbruggen, De Clerck, Kooistra, et al., 2005; Verbruggen, De Clerck, Schils, et al., 2005; Verbruggen y Kooistra, 2004). Estos estudios son especialmente relevantes en grupos taxonómicos que presentan especies con una alta plasticidad influenciada por el ambiente y que presentan similitudes evidentes a simple vista (El-Manawy y Shafik, 2008; Pongparadon et al., 2017, 2020; Vroom et al., 2003).

De manera específica, los marcadores genéticos como *tufA* han ayudado a tener una mejor resolución en la diversidad específica y ha sido de apoyo para la delimitación de especies de algas verdes (Vieira et al., 2016; Wang et al., 2016). Este gen codifica el factor de elongación de la síntesis de proteínas del cloroplasto de todas las algas verdes, y está ausente en las plantas terrestres, lo que lo convierte en un gen específico para el estudio de las algas. El gen *tufA* ha sido propuesto como el código de barras en Ulvophyceae K.R.Mattox & K.D.Stewart 1984, y ha sido utilizado para la delimitación de especies en *Halimeda* con buenos resultados para su uso en la resolución de clados a nivel específico, mostrando la presencia de especies crípticas dentro del género (Dijoux et al., 2012; Saunders y Kucera, 2010; Verbruggen, De Clerck, Schils, et al., 2005; Verbruggen et al., 2009).

A la fecha no se ha presentado un listado con revisión morfológica del género para las costas mexicanas, y solo se han obtenidos pocos datos moleculares de distintos genes (*rbcl*, *tufA*, ITS) para las especies de *Halimeda*. *tuna*, *H. discoidea*, *H. scabra* M.Howe 1905, *H. simulans* M.Howe 1907, *H. monile* (J.Ellis & Solander) J.V.Lamouroux 1816 y *H. goreau* para México. Ninguno de estos datos moleculares es para las especies distribuidas en las costas

del estado de Campeche (Kooistra et al., 2002; Verbruggen, De Clerck, Schils, et al., 2005; Verbruggen et al., 2009).

Justificación

El género *Halimeda* presenta una alta diversidad de especies, lo que se ha visto aumentado con el uso de estudios moleculares permitiendo una distinción sobre sus especies crípticas. Sin embargo, la diversidad de *Halimeda* no es homogénea entre las zonas del Indo-Pacífico y las del Atlántico debido a la alta plasticidad del grupo, lo que ha llevado a la determinación errónea de algunas especies en diferentes zonas y su registro como una sola especie hasta tener estudios moleculares que refutan esta distribución (Dijoux et al., 2012; Hillis-Colinvaux, 1980; Kooistra et al., 2002; Verbruggen et al., 2006; Ximenes et al., 2017, 2019). Actualmente, en las costas del Golfo de México, los estudios de las especies de *Halimeda* únicamente se han enfocado hacia los listados florísticos faltando estudios sobre la diversidad del género. Particularmente, en el estado de Campeche hace falta una evaluación en la diversidad de *Halimeda* para confirmar el estatus taxonómico de las especies reportadas y determinar si hay especies crípticas en la región.

Hipótesis

La revisión morfológica y molecular ayudarán a confirmar la identidad taxonómica de las especies reportadas en la zona de estudio y permitirá establecer sus relaciones filogenéticas interespecíficas.

Objetivos

General

Estudiar la diversidad de especies del género *Halimeda* en el estado de Campeche a través de la revisión morfológica y molecular para determinar su estatus taxonómico, relaciones interespecíficas y presencia de especies crípticas.

Particulares

Distinguir los caracteres diagnósticos presentes en las especies colectadas.

Determinar si los morfotipos encontrados son consistentes con los nombres asignados.

Generar hipótesis filogenéticas del gen *tufA* de los morfotipos reconocidos en la región.

Analizar la distancia génica de las especies encontradas en el estado de Campeche con especies distribuidas en otras regiones geográficas.

Determinar si existen congruencia entre los morfotipos colectados, los clados recuperados en el análisis filogenético y los nombres asignados.

Evaluar la presencia de especies crípticas del género *Halimeda* en el estado de Campeche.

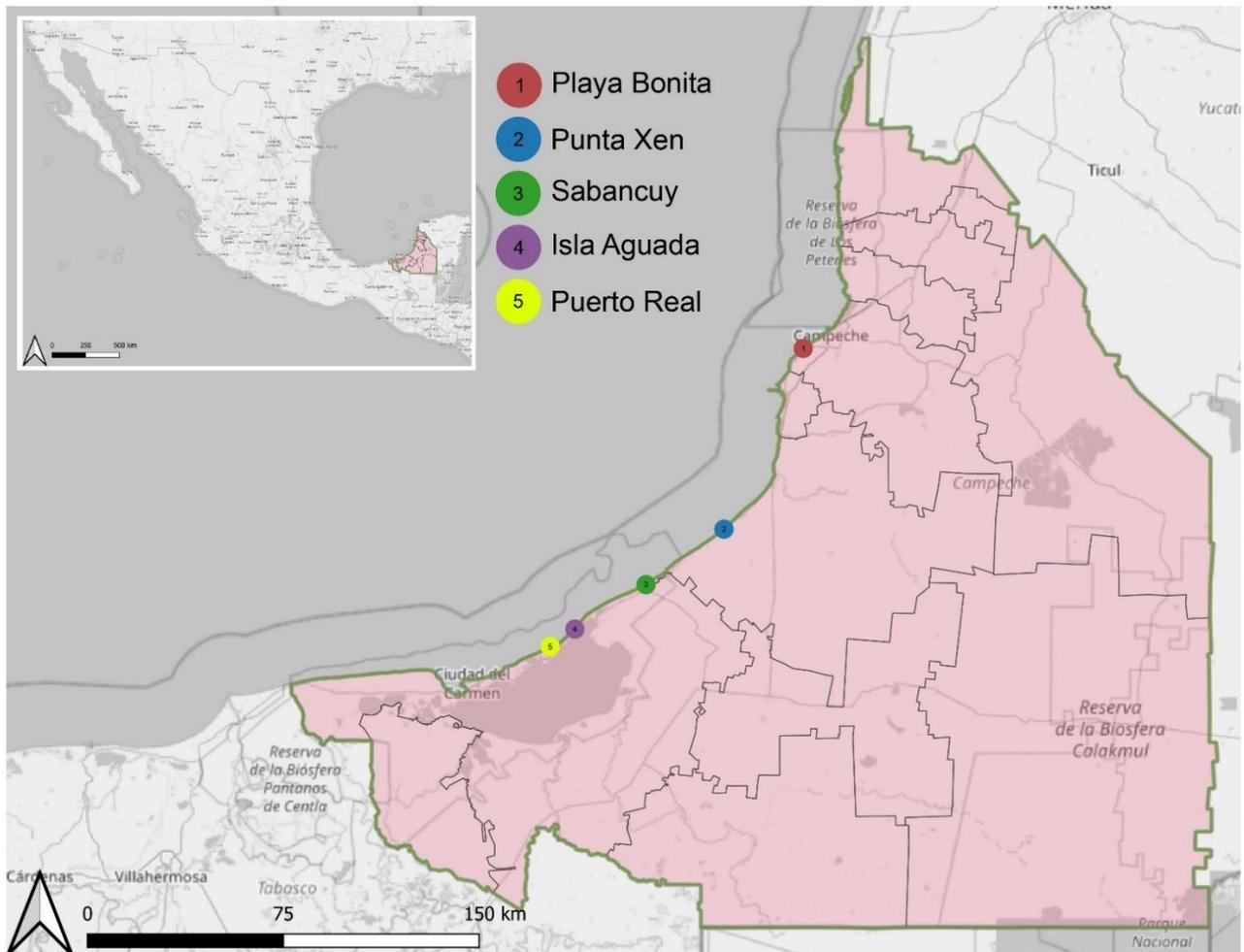
Material y método

Muestreo

El material ficológico se colectó en la zona intermareal en cinco localidades de la costa del estado de Campeche en los meses de noviembre 2021 y mayo 2022 (Fig. 2). Las muestras se trabajaron preservando el mayor material y tratando de conservar el sistema de fijación. Los ejemplares fueron prensados en campo y se tomaron fragmentos para las técnicas moleculares. Los fragmentos se limpiaron con un cepillo y agua destilada y se deshidrataron en sílica gel. El ejemplar de respaldo fue herborizado en el herbario FEZA.

Figura 2

Localidades de colecta en la costa de Campeche con coordenadas



Nota. Las coordenadas se indican en el orden longitud, latitud. 1) Playa bonita (-90° 37' 3.8", 19° 47' 44.3") 2) Punta xen (-90° 54' 9.6", 19° 10' 50") 3) Sabancuy (-91° 11' 8.3", 18° 59' 25") 4) Isla aguada (-91° 26' 32.5", 18° 50' 21.3") 5) Puerto real (-91° 31' 51.6", 18° 46' 44.9").

Herborización y revisión morfológica

Los ejemplares colectados se revisaron con ayuda de claves taxonómicas y literatura especializada (Littler y Littler, 2000; Taylor, 1960) para determinarlos a nivel específico. Ya determinados, se evaluaron los caracteres morfológicos externos y anatómicos. Para el análisis, se revisaron los caracteres externos de los segmentos (forma, textura, distribución, tamaño, grosor, márgenes, lóbulos y articulaciones del segmento), y tipo y forma del sistema de fijación con base en las descripciones de Littler y Littler (2000) y Taylor (1960). Para el

análisis anatómico, los segmentos fueron descalcificados con HCl al 20% y rehidratados con agua y glicerina (50/50) durante una semana. Posteriormente las secciones histológicas se realizaron de forma manual en plano transversal de cada segmento con navajas de doble filo y con el apoyo de un microscopio estereoscópico. Las placas semipermanentes se prepararon con gelatina glicerinada y una tinción con azul de anilina para la revisión de forma, tamaño y disposición de los utrículos. Las medidas de los utrículos periféricos y subperiféricos y cantidad de capas utriculares se registraron en una tabla comparativa (Arina et al., 2019; Bandeira-Pedrosa et al., 2004; Dijoux et al., 2012). Los ejemplares fueron depositados en la colección ficológica del herbario FEZA de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM (Thiers, 2023).

Análisis molecular

La extracción de ADN se realizó con los fragmentos conservados en sílica gel y fragmentos de los ejemplares de respaldo del herbario en caso de no estar disponibles (usando alrededor de 0.5 cm de muestra o 10 mg) (Cremen et al., 2016; Dijoux et al., 2012; Kojima et al., 2015). Los fragmentos se maceraron con un pistilo de plástico y un botón de sílica dentro del tubo eppendorf con el tampón de extracción CTAB (bromuro de cetil trimetilamonio) (Doyle y Doyle, 1987) al 2% (2% CTAB, 5% NaCl, 0,5 M EDTA, 1% PVP (polivinilpirrolidona) y 1 M Tris-HCl, pH 8). En la muestra macerada se agregó 500 µl de tampón con 2 µl de 2-mercaptoetanol y se incubó a 60°C por 20 minutos (agitando manualmente cada 10 minutos). Posteriormente se añadió 500 µl de SEVAG (cloroformol:alcohol isoamílico, 24:1) y se mezcló suavemente con tres inversiones en el tubo permitiendo dejar salir el gas. Se dejó reposar por 15 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 9000 rpm recuperando la fase acuosa con ayuda de una micropipeta en un nuevo tubo de 1.5 ml debidamente etiquetado. Para la precipitación del ADN se adicionó 2/3 partes de la fase acuosa recuperada de isopropanol absoluto (~250 µL) a -20°C y se invirtió el tubo suavemente para mezclar la extracción y alcohol, dejando reposar durante una hora a una noche a -20°C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm y se decantó el alcohol evitando perder el botón de ADN. Posteriormente, se realizó un lavado con 500 µl de alcohol al 70% y se secó el ADN en una centrifuga al vacío por 20 minutos a 45°C. Finalmente, el botón se resuspendió en 15-25 µl de tampón 0.1 x TE (10 mM Tris, pH 8,0 y 1 mM EDTA) y se guardó a -20°C hasta la amplificación (Díaz-Martínez et al., 2023).

Para amplificar la región de ADN de interés se usaron cebadores del gen *tufA* (ver Tabla 2) mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) empleando un mix de amplificación con 0.5 µl de ADN, 0.25 µl (10 µM) de cada cebador, 5 µl de tampón de reacción (5x), 0.125 µl taq (5x) y llevar a un volumen de 25 µl con agua de grado molecular. El perfil de amplificación se modificó del presentado por (Cremen et al., 2016) (ver Tabla 3).

Las amplificaciones positivas se purificaron con ExoSap-IT y se enviaron a secuenciar en los laboratorios de Macrogen (Seúl, Korea) utilizando los mismos cebadores que en la amplificación.

Tabla 2

Cebadores para gen tufA

Cebador	Secuencia	Fuente
tufA F	5'-TGAAACAGAAMAWCGTCATTATGC-3'	Fama <i>et al.</i> , 2002
tufA R	5'-CCTTCNCGAATMGCRAAWCGC-3'	Fama <i>et al.</i> , 2002
tufGF4	5'-GGNGCNGCNCAAATGGAYGG-3'	Saunders y Kucera, 2010

Tabla 3

Perfil de PCR empleado

Temperatura/Tiempo		
Desnaturalización inicial	94°C/4 min	1 ciclo
Desnaturalización	94°C/1 min	36 ciclos
Alineación	47°C/1 min	
Extensión	72°C/2 min	
Extensión final	72°C/5 min	1 ciclo

Análisis filogenéticos

Edición y alineamiento

Los cromatogramas se ensamblaron y editaron usando Geneious (versión 6.1.8). Se realizó un alineamiento con el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) dentro del software para compararlos y revisarlos manual y visualmente con el apoyo de los cromatogramas. Se descargaron secuencias de GenBank de otras especies de *Halimeda* con fines comparativos para el análisis filogenético dando un total de 123 terminales o unidades taxonómicas operativas (Sayers et al., 2020).

Para seleccionar las secuencias que se emplearon en el análisis se realizó una búsqueda de similitud de secuencias BLAST (Altschul et al., 1990; Camacho et al., 2009) y se revisaron los resultados obtenidos para incluir diferentes especies y ubicaciones geográficas a fin de tener una visión general de la distribución del género. Se empleó el género *Udotea* J.V.Lamouroux 1812 como grupo externo (*Udotea flabellum* (J.Ellis & Solander) M.Howe 1904 MG784812) para realizar los análisis filogenéticos debido a su parentesco con el grupo de estudio (Cremen et al., 2019; Verbruggen et al., 2009; Ximenes et al., 2017).

Modelos de sustitución

Se obtuvo el mejor modelo de sustitución para cada posición empleando el criterio de información Akaike corregido con el algoritmo de búsqueda greedy en el software PartitionFinder (versión 2.1.1) (Lanfear et al., 2012, 2016).

Reconstrucción filogenética

El análisis de MV se realizó en IQTREE (versión 2.2.0) con los modelos de sustitución proporcionados por PartitionFinder y un Bootstrap no paramétrico con 1,000 réplicas al azar evaluado con un análisis Bootstrap (BS) considerando un valor $\geq 70\%$ como indicador de soporte para las ramas (Hillis y Bull, 1993; Minh et al., 2020).

Para el análisis de IB se empleó el software MrBayes (versión 3.2.6) utilizando los modelos de sustitución proporcionados por PartitionFinder. Se utilizaron cuatro cadenas de Markov Monte Carlo independientes (tres calientes y una fría) durante 10,000,000 de generaciones con muestro de árboles cada 1,000 generaciones. Se verificó la convergencia con el software Tracer (versión 1.7.1) y se evaluó la robustez de los clados fuertemente soportadas con

probabilidades posteriores (PP) con valores 0.95 (Alfaro et al., 2003; Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Lemey et al., 2009; Rambaut et al., 2018).

Se obtuvieron agrupamientos para la delimitación de especies utilizando un análisis bPTP con un “burn-in” de 0.25, corriendo 500,000 árboles. Se calculó el rango de divergencia genética intra e interespecífica utilizando distancias “ p ” no corregidas en el software MEGA11 (versión 11.0.10) (Tamura et al., 2021; Zhang et al., 2013).

Resultados

Revisión morfológica

Se revisaron un total de 20 ejemplares que fueron asignados a cinco grupos (*H. incrassata*, *H. opuntia*, *H. discoidea*, *H. tuna* y *H. tuna* sp. 2) de acuerdo con su morfología externa (ver Tabla 4 y 5) y con base en la revisión de la forma y tamaño de los utrículos periféricos y subperiféricos.

Para el grupo de *H. incrassata* (ver Lámina 1) se examinó un solo ejemplar, el cual presentó segmentos con forma ovalada con tres lóbulos en los segmentos apicales, con crecimiento lineal-dicotómico con articulaciones comprimidas. Los segmentos presentaron una alta calcificación y medidas de entre 2.9 a 5.8 mm de alto y 2 a 6 mm de ancho (ver Lámina 1 A). Utrículos periféricos (UP) en forma poligonal con tendencia a hexagonal (ver Lámina 1 B y C) con presencia de una a tres capas utriculares (ver Lámina 1 D y E) y con una capa de utrículos subperiféricos (US) de menor tamaño.

En el caso de *H. opuntia* (ver Lámina 2) se examinaron cuatro ejemplares, que presentaron segmentos con formas reniformes a cuneadas de 2.5 a 8.7 mm de alto y 2.8 a 12.1 mm de ancho, con articulaciones aplanadas con tres a cinco lóbulos por segmento y sin un eje principal identificable y con varios sistemas de fijación a lo largo, con un crecimiento dicotómico-tricotómico altamente ramificado (ver Lámina 2 A y B). Con UP en forma poligonal a redonda (ver Lámina 2 C y D) y presencia de dos a cuatro capas utriculares (ver Lámina 2 E y F).

El grupo de *H. discoidea* (ver Lámina 3) contó con nueve ejemplares examinados y presentó mayor diversidad de formas, con segmentos de forma cuneada, ovalada o reniforme con articulaciones convexas y aplanadas con un rango de tamaños de 5.4 a 18.8 mm de alto y 7.8 a 28.9 mm de ancho, con un nodo de fijación con crecimiento lineal-dicotómico (ver Lámina 3 A y B). Una única capa de UP con vista superficial en forma hexagonal muy compactos con utrículos fusionados (UF) (ver Lámina 3 C, D y E).

En el grupo de *H. tuna* (ver Lámina 4) se revisaron cinco ejemplares con segmentos reniformes con articulaciones convexas y varios ejes principales en crecimiento lineal-dicotómico con medidas de 3.3 a 9.6 mm de alto y 3.7 a 11.7 mm de alto (ver Lámina 4 A), con UP en forma poligonal desde la vista superficial (ver Lámina 4 B y C) y con dos a tres capas utriculares (ver Lámina 4 D y E).

Y el quinto grupo, *H. tuna* sp. 2 (ver Lámina 5), solo se revisó un ejemplar de la localidad con segmentos reniformes con articulaciones convexas y comprimidas de 6 a 9.2 mm de alto y 8.2 a 12.3 mm de ancho, con un par de ejes principales con crecimiento lineal-dicotómico (ver Lámina 5 A), con UP poligonales a redondos desde la vista superficial y con espina central (EC) (ver Lámina 5 B y C) y con dos a tres capas utriculares (ver Lámina 5 D y E).

Tabla 4

Caracteres morfológicos de los cinco grupos de Halimeda

Especie	<i>H. incrassata</i>	<i>H. opuntia</i>	<i>H. discoidea</i>	<i>H. tuna</i>	<i>H. tuna</i> sp. 2
Forma del segmento	Ovalada	Reniforme, Cuneada	Reniforme, Cuneada, Ovalada	Reniforme	Reniforme
Articulación	Comprimida	Aplanada, Comprimida	Convexa, Aplanada	Convexa	Convexa, Comprimida
Lóbulos	A veces	Presentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
No. lóbulos	3	3-5	1	1	1
Fijación	-	Sin nodos reconocible	Nodo	Nodo	Nodo
Ejes	1	Sin eje principal	1-2	1-5	2
Crecimiento	Lineal-dicotómico	Dicotómico-tricotómico	Lineal-dicotómico	Lineal-dicotómico	Lineal-dicotómico
Textura	Liso	Rugoso	Liso	Liso	Liso
Grosor (mm)	0.6	0.5-1.4	0.5-1	0.7-1	0.8
Calcificación	Alta	Alta	Baja	Moderada	Moderada
Altura segmentos (mm)	2.9-5.8	2.5-8.7	5.4-18.8	3.3-9.6	6-9.2
Ancho segmentos (mm)	2-6	2.8-12.1	7.8-28.9	3.7-11.7	8.2-12.3
Segmentos hijos	1-2	1-5	1-3	1-5	1-2
Capas utriculares	1-3	2-4	1	2-3	2-3
Fig. utrículos lado vista	5-7 (6)	5-6 a Redondo	4-6 (6)	5-7 (6)	Poligonal-Redondo
Media diámetro UP (µm)	52.95	22.76	45.83	32.28	27.48
Diámetro utrículos periféricos, Vista superficial (µm)	28.98-73.03	15.49-32.41	27.90-71.55	20.20-53.44	21.95-37.27
Media altura UP (µm)	57.12	27.85	44.6	52.85	77.19
Altura utrículos periféricos Vista lateral (µm)	37.12-80.61	16.86-40.98	16.87-97.32	30.23-99.47	55.06-106.21
Media diámetro US (µm)	44.128	15.14	-	24.66	33.32
Diámetro utrículos subperiféricos (µm)	11.83-64.8	6-27.39	-	13.62-39.64	22.16-50.93
Media largo US (µm)	51.034	27.07	-	59.95	74.11
Largo utrículos subperiféricos (µm)	21.55-94.06	11.77-52.76	-	19.84-105.60	40.66-136.48
Referencia	Este Estudio	Este Estudio	Este Estudio	Este Estudio	Este Estudio

Tabla 5

Número de ejemplares colectados por especies y localidades

Especie	Localidad	# Ejemplares
<i>H. discoidea</i>	Isla Aguada	3
<i>H. discoidea</i>	Punta Xen	5
<i>H. discoidea</i>	Sabancuy	1
<i>H. incrassata</i>	Playa Bonita	1
<i>H. opuntia</i>	Playa Bonita	3
<i>H. opuntia</i>	Punta Xen	1
<i>H. tuna</i>	Puerto Real	3
<i>H. tuna</i>	Punta Xen	2
<i>H. tuna</i> sp. 2	Punta Xen	1

Análisis filogenéticos

En el alineamiento se usaron 102 de secuencias obtenidas de GenBank y 21 secuencias obtenidas en este estudio, la matriz consistió en 864 pares de bases. PartitionFinder recuperó tres particiones independientes, cada una correspondiente a cada posición de codón. Para el análisis de MV se usó el modelo GTR + I + G para la primera y segunda posición y TVM + I + G para la tercera posición. Por su parte en IB se usó el modelo GTR + I + G para las tres particiones (Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Lanfear et al., 2016; Sayers et al., 2020) . Los comandos proporcionados por PartitionFinder se encuentran en el Anexo 2.

El árbol de consenso del análisis de IB fue topológicamente muy similar a la filogenia obtenida por el análisis de MV, sin embargo, presentó clados menos resueltos. Para representar los resultados se empleó la hipótesis obtenida por MV con una verosimilitud de -7612.9178. Los clados de *Halimeda scabra*, *H. scabra* - *H. tuna* (Atlántico), *H. discoidea* (México-Brasil) y *H. discoidea* (Canarias) no presentaron soporte de probabilidad posterior (PP), mientras que todos los clados de los grupos de estudio presentaron soporte bootstrap (BS).

En el árbol recuperado se agruparon todas las secuencias de *Halimeda incrassata* obtenidas de GenBank con la obtenida en este trabajo formando un grupo monofilético con un soporte BS de 99% y PP de 1 cuyo grupo hermano es *H. simulans*. El grupo compuesto por *H. opuntia* incluyó todas las secuencias de la especie ingresadas al análisis (generadas en este trabajo y

descargadas de GenBank) y presentó a *H. distorta* (Yamada) Hillis-Colinvaux 1968 como grupo hermano. El clado de *H. opuntia* presentó un alto soporte BS de 99% y PP de 1. El clado de *H. tuna* obtenido en este trabajo se presentó como grupo hermano de *H. scabra* con un soporte BS de 100% y PP de 1. El grupo que incluyó todas las secuencias de *H. tuna* de Brasil y Belice con las de México y *H. scabra* presentó un soporte BS de 98% pero sin soporte PP. La especie hermana de todo el clado compuesto por *H. scabra* y *H. tuna* del Atlántico fue *H. hummii* D.L.Ballantine 1982. Se observó otro clado compuesto por las secuencias de *H. tuna* del Mediterráneo con soporte BS de 100% y PP de 1. Para este clado se presentó *H. jolyana* Ximenes, Bandeira-Pedrosa, Cassano, Oliveira-Carvalho, Verbruggen & S.M.B.Pereira 2017 como grupo hermano.

Las secuencias de *Halimeda discoidea* de México y Brasil formaron un clado con un soporte BS de 87% pero sin soporte de PP, y se formó un grupo monofilético con las secuencias de Canarias presentando un soporte BS de 98% y PP de 0.97. La *H. discoidea* de Jamaica se presentó como un grupo hermano del clado que incluye *H. discoidea* de México, Brasil y Canarias con un soporte BS de 100% y PP de 1. Las secuencias de *H. discoidea* obtenidas de la zona del Indo-Pacífico se separaron en otro clado con un soporte BS de 100% y PP de 1 excluyendo a *H. discoidea* de Omán que se presentó como grupo hermano con un soporte BS de 95% y PP de 1 (ver Figura 3).

La distribución de las especies *Halimeda tuna* y *H. discoidea* de los grupos obtenidos con base a las secuencias incluidas en los análisis filogenéticos se muestran en la Figura 4. Los clados de *H. tuna* se presentan bien delimitados a diferentes zonas geográficas y el grupo de *H. tuna* del mediterráneo está restringido a solo ese mar. Mientras que el grupo de *H. tuna* del Atlántico se presenta únicamente en el continente americano. El grupo de *H. discoidea* del Atlántico presenta una distribución muy amplia, y hay una alta distancia entre los ejemplares del grupo, mientras que el grupo de *H. discoide* de Jamaica se observa más cercano geográficamente a *H. discoidea* de México. Mientras que el grupo Indo-Pacífico se encuentra tanto al este y oeste del Archipiélago malayo y su distribución no parecer estar afectada por esta zona insular. Sin embargo, el grupo de *H. discoidea* de Omán se restringe a la zona del Golfo de Omán ubicado al este del país.

Análisis de agrupamiento con bPTP.

El método computacional de bPTP que utiliza el enfoque bayesiano para inferir la delimitación de especies sugirió ocho agrupamientos de clados (ver Figura 2). El grupo "A" se compuso por las secuencias de *Halimeda tuna* de México, Brasil-Belice, y *H. scabra* de Bahamas con un soporte de 0.817. El grupo "B" contiene las secuencias de *H. tuna* del Mediterráneo con un soporte de 0.766. El grupo "C" incluyó las secuencias de *H. discoidea* de México, Brasil y Canarias con un soporte 0.527. El grupo "D" solo incluyó la secuencia de *H. discoidea* de Jamaica con un soporte de 1. El grupo "E" abarcó las secuencias de *H. discoidea* de Madagascar, Japón, Nueva Caledonia y Yemen con un soporte 0.472. El grupo "F" solo incluyó la secuencia de *H. discoidea* de Omán con un soporte 0.978. El grupo "G" se conformó por todas las secuencias de *H. opuntia* e incluyó las secuencias de *H. distorta*, *H. velasquezii* W.R.Taylor 1962 y *H. minima* (W.R.Taylor) Hillis-Colinvaux 1968 con un soporte de 0.051. Finalmente, el grupo "H" agrupó las secuencias de *H. incrassata* con las secuencias de *H. simulans* de Brasil con un soporte de 0.288.

Divergencia genética

Se obtuvo la distancia "*p*" interespecífica (ver Tabla 6) de los grupos formados *a priori* de los ejemplares de interés recuperados en los árboles filogenéticos y se consideraron valores de 2% a 12.4 % que se han empleado para delimitar las especies en el género (Ximenes et al., 2017, 2019).

La divergencia genética entre *Halimeda opuntia* y *H. distorta* fue de 1.24%. Para el grupo de *H. incrassata* la distancia con respecto a su grupo hermano *H. simulans* fue de 0.93%. El grupo de *H. tuna* de México y *H. tuna* sp. 2 mostraron una ausencia de distancia genética entre ellas. Estas a su vez, presentaron una distancia de 0.6% con respecto a *H. scabra*. *H. tuna* de México presentó distancias genéticas de 1.24% con el grupo de Brasil-Belice. *H. scabra* tuvo una distancia genética de 0.87% con el grupo de *H. tuna* de Brasil-Belice. Las distancias entre *H. tuna* de México y del Mediterráneo fueron de 11.06%, mientras que para *H. tuna* del Mediterráneo y Brasil-Belice los valores fueron de 10.38%.

Tabla 6

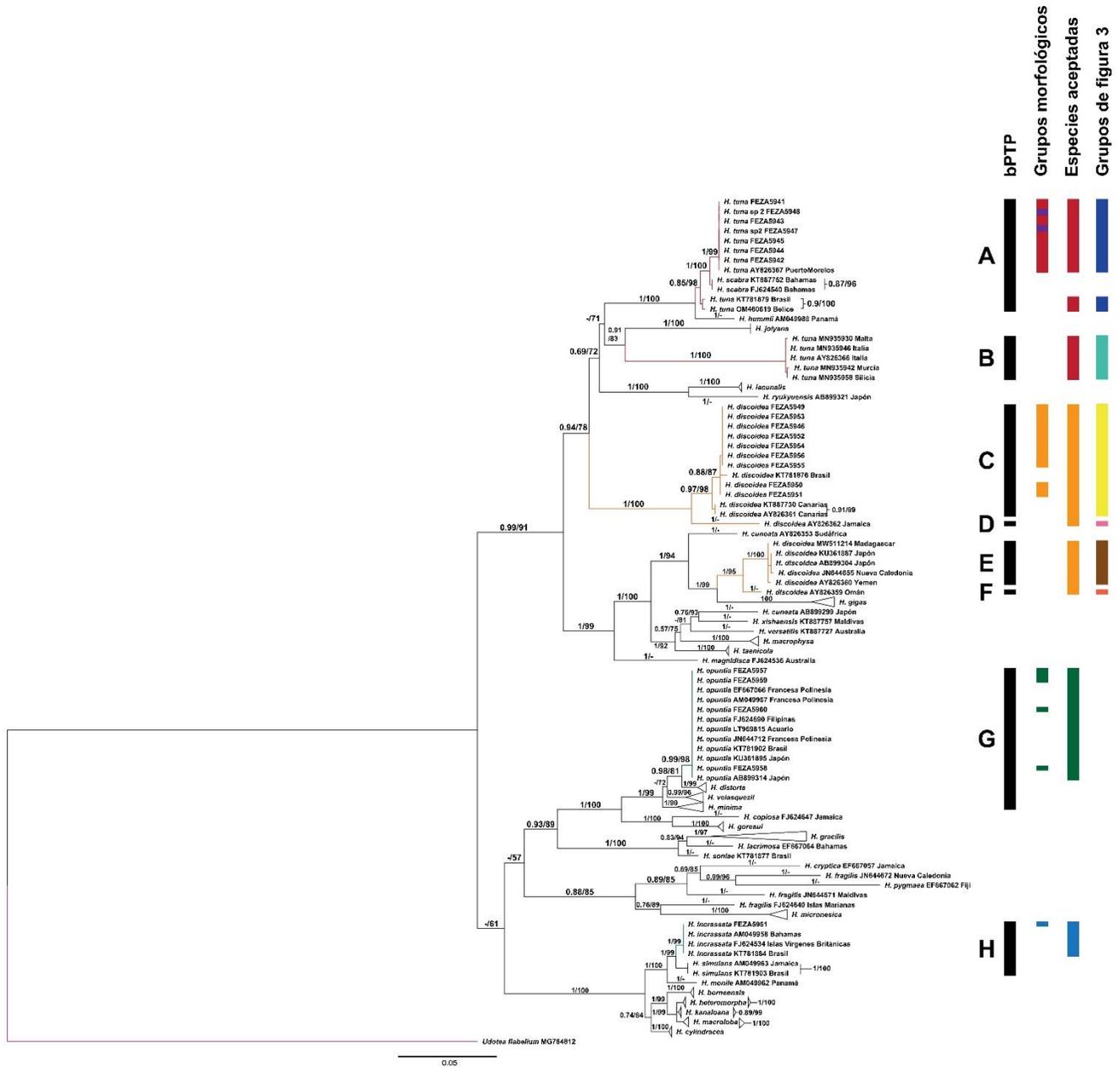
Distancias “p” interespecíficas de grupos de Halimeda en porcentaje

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1) <i>Udotea flabellum</i>																
2) <i>H. opuntia</i>	19.39															
3) <i>H. distorta</i>	19.45	1.24														
4) <i>H. incrassata</i>	19.56	9.25	9.88													
5) <i>H. simulans</i>	19.67	9.61	10.09	0.93												
6) <i>H. monile</i>	19.52	9.27	9.61	2.26	2.49											
7) <i>H. tuna</i> MX	18.99	10.06	10.34	12.17	12.34	12.27										
8) <i>H. tuna</i> sp. 2	19.13	10.07	10.34	12.05	12.20	12.10	0.00									
9) <i>H. tuna</i> BrBe	18.49	9.54	9.79	11.74	12.06	12.13	1.24	1.27								
10) <i>H. tuna</i> Med	20.62	14.68	14.87	14.40	14.69	14.95	11.06	11.17	10.38							
11) <i>H. scabra</i>	18.92	9.80	10.11	11.90	12.07	11.99	0.59	0.60	0.87	10.66						
12) <i>H. discoidea</i> MX	19.44	10.66	10.92	11.52	11.81	11.51	8.85	8.82	8.32	11.74	8.66					
13) <i>H. discoidea</i> Br	19.31	10.62	10.70	11.94	12.26	11.99	9.09	9.16	8.44	11.89	8.96	0.37				
14) <i>H. discoidea</i> Can	19.21	10.71	10.88	11.88	12.05	11.89	8.43	8.38	7.83	11.41	8.33	0.72	1.06			
15) <i>H. discoidea</i> Jam	19.32	10.69	10.99	11.88	12.06	11.97	9.22	9.24	8.70	12.11	9.04	3.92	4.30	3.99		
16) <i>H. discoidea</i> I-P	19.04	9.88	10.15	11.38	11.44	11.23	10.82	10.91	10.39	13.25	10.58	9.85	9.63	9.51	9.99	
17) <i>H. discoidea</i> Omán	18.59	9.42	9.79	10.76	10.82	10.89	9.91	10.07	9.62	12.41	9.70	8.85	8.46	8.39	9.12	1.96

Las distancias más bajas de *Halimeda discoidea* se presentaron entre los grupos de México y Brasil con un valor de 0.37% que se presentan como un clado en la topología de MV. La distancia entre *H. discoidea* de México con su grupo hermano *H. discoidea* Canarias tiene un valor de 0.72%. El grupo de *H. discoidea* de México presentó una distancia de 3.92% con respecto al grupo de Jamaica. La mayor distancia del grupo de *H. discoidea* de México se presentó con el grupo nombrado *H. discoidea* del Indo-Pacífico con valores de 9.85%. Mientras que la distancia más grande dentro la especie *H. discoidea* se presentó entre los grupos de Jamaica e Indo-Pacífico con un valor de 9.99%.

Figura 3

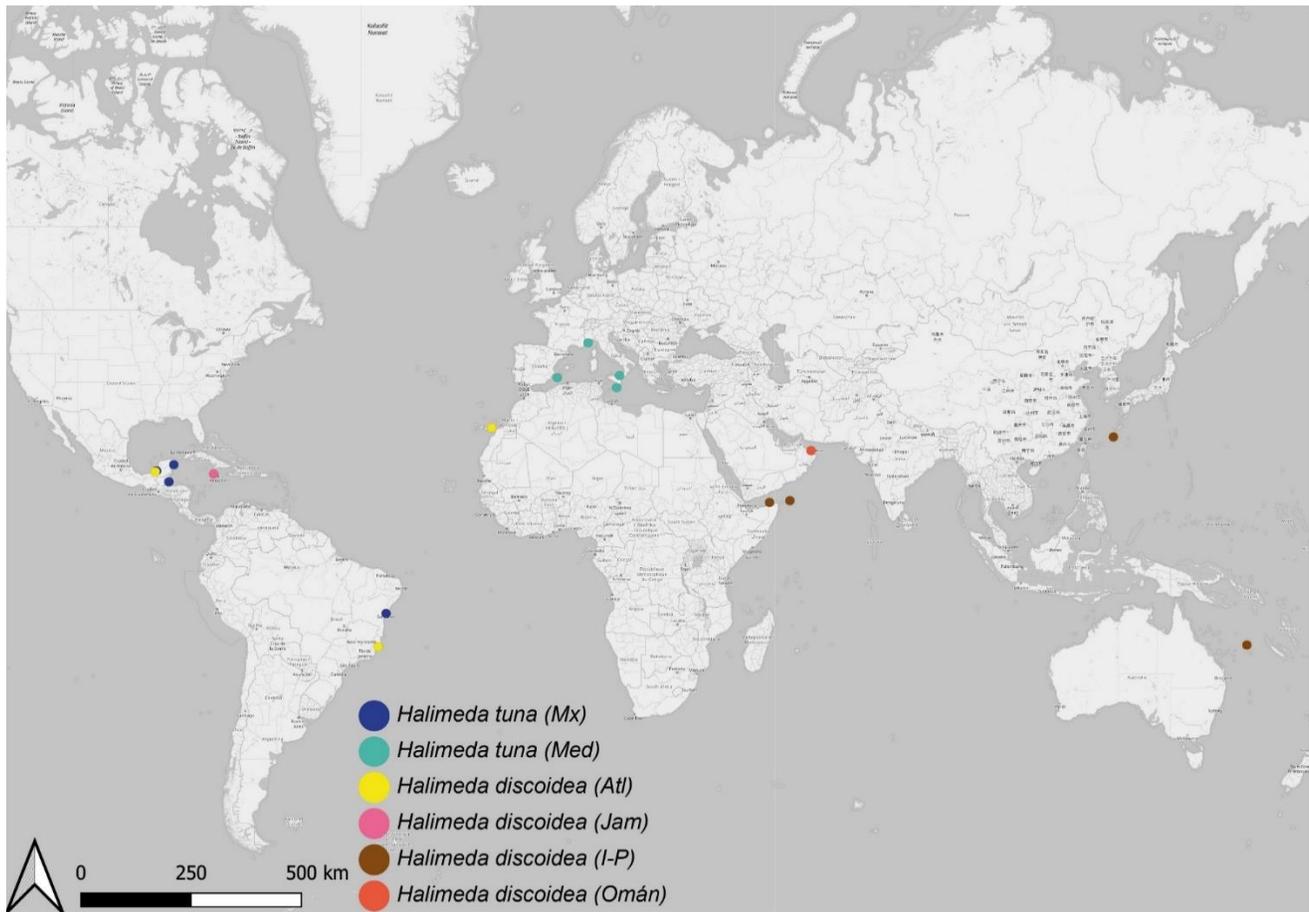
Árbol de máxima verosimilitud empleando secuencias del gen *tufA* del cloroplasto



Nota. La columna “bPPT” presenta los grupos formados por el método de delimitación bPPT; la columna “grupos morfológicos” presenta los ejemplares revisados en el presente trabajo; la columna “especies aceptadas” muestra con diferentes colores las actuales clasificaciones taxonómicas aceptadas; la columna “grupos de figura 3” presenta las diferentes distribuciones que se presentan en los grupos de *Halimeda tuna* y *H. discoides*

Figura 4

Distribución de las secuencias usadas de H. tuna y H. discoidea en los análisis filogenéticos



Discusión

Las revisiones morfológicas con base en las claves taxonómicas (Littler y Littler, 2000; Taylor, 1960) y estudios morfológicos (Dijoux et al., 2012; El-Manawy y Shafik, 2008; Peach et al., 2017; Pongparadon et al., 2015, 2020; Verbruggen et al., 2006; Ximenes et al., 2017) permitieron la determinación de las especies *Halimeda incrassata* y *H. opuntia* con caracteres diagnósticos bien definidos. No obstante, *H. discoidea*, *H. tuna*, y un morfotipo denominado *H. tuna* sp. 2 presentaron características con mayor variación. Por eso la discusión se estructurará por especie, analizando individualmente los resultados y las implicaciones para cada una de ellas.

***Halimeda incrassata* (J.Ellis) J.V.Lamouroux**

Al realizar la revisión anatómica, se observó que los utrículos Periféricos (UP) de *Halimeda incrassata* presentaron formas poligonales con vértices ligeramente más redondeados que las especies pseudocrípticas de *H. incrassata*, *H. kanaloana* Vroom 2006 y *H. heteromorpha* N'Yeurt 2006, las cuales presentan vértices angulares. Además, se identificaron tres capas utriculares con utrículos Subperiféricos (US) con formas variadas, que van de ligeramente globosas hasta alargadas dando lugar a dos UP (Hillis-Colinvaux, 1980; Verbruggen et al., 2006; Ximenes et al., 2017). La alta plasticidad de *H. incrassata* ha llevado a la descripción de especies pseudocrípticas, que una mejor revisión de los caracteres morfológicos y anatómicos, acompañado de datos moleculares, permitieron delimitar (Verbruggen et al., 2006). La presencia de UP de mayor tamaño en la revisión de caracteres anatómicos de *H. incrassata* permitió su diferenciación de su grupo hermano *H. simulans*, con el que comparte algunas áreas de distribución en el Caribe Mexicano (Vilchis et al., 2018; Ximenes et al., 2017).

En el árbol filogenético obtenido se formó un clado fuertemente soportado por el valor de BS y PP de *Halimeda incrassata*, que también incluye todas las secuencias disponibles en GenBank. *H. incrassata* se presenta cercanamente relacionado con el grupo de *H. simulans*, con el que comparte características morfológicas y algunas zonas de distribución en México (Bandeira-Pedrosa et al., 2004). Otros estudios han reportado una distribución más amplia incluyendo el Indo-Pacífico para *H. incrassata* (Kooistra et al., 2002). Sin embargo, Verbruggen et al. (2006) separan genéticamente las especies *H. kanaloana* y *H. heteromorpha* como especies pseudocrípticas del Indo-Pacífico. El ejemplar tipo de *H. Incrassata* fue colectado en Jamaica, pero no existen datos moleculares y el ejemplar se reporta como perdido (Barton,

1901). Tampoco se cuenta con secuencias del gen *tufA* para el lectotipo o ejemplares de la localidad tipo para incluir en el análisis y de esta manera delimitar con mayor certidumbre a *H. incrassata* de Campeche.

En el análisis de bPTP se presentaron las secuencias de *Halimeda incrassata* y *H. simulans* en una agrupación (grupo "H"). La distancia genética entre *H. incrassata* y *H. simulans* fue de 0.93%, que se encuentra por debajo de los valores usados para delimitaciones de especies dentro del género (Ximenes et al., 2017). Ambas especies fueron descritas inicialmente usando solo caracteres morfo-anatómicos. La separación de ambos grupos la realizó Hillis (1959) usando el color de los segmentos, el hábito subestípito u ocasionalmente estipitado de *H. simulans* con segmentos basales comúnmente imbricados lo consideró bastante distintivo del taxón. El tamaño del diámetro de los UP es otro carácter empleado para su delimitación, para el caso de *H. incrassata* la media es mayor (73 μm) frente a *H. simulans* (45 μm) (Hillis, 1959). Clifton (1997) aportado también presentó diferencias morfológicas y reproductivas que separan a los taxones, por lo que pese a su baja distancia genética se siguen considerando taxones diferentes (Verbruggen et al., 2006).

***Halimeda opuntia* (Linnaeus) J.V.Lamouroux**

Halimeda opuntia se determinó mediante la revisión de su morfología externa, la cual coincide con la reportada en la literatura. Esta especie presenta talos compactos de crecimiento no lineal, con ramificaciones azarosas, sistemas de fijación en intervalos, segmentos aplanados altamente calcificados con márgenes lobulados y articulaciones aplanadas a comprimidas tal como se ha descrito en estudios previos (Hillis-Colinvaux, 1980; Littler y Littler, 2000; Taylor, 1960).

En la revisión anatómica, se encontró que *Halimeda opuntia* presentó UP con formas poligonales a redondas vistos superficialmente, con presencia de dos a cuatro capas utriculares. Además, se observó que cada US soporta dos UP (Ximenes et al., 2017).

Es importante destacar que esta especie presenta una alta plasticidad morfológica en el crecimiento y forma de los segmentos, aun así, los valores registrados en los ejemplares revisados se encuentran dentro de los rangos reportados por Pongparadon et al. (2020). Así mismo, es la única especie de este trabajo en la que se reporta una distribución pantropical real (Hillis-Colinvaux, 1980; Kojima et al., 2015; Kooistra et al., 2002; Kooistra y Verbruggen, 2005; Peach et al., 2017; Verbruggen, De Clerck, Kooistra, et al., 2005; Verbruggen, De Clerck,

Schils, et al., 2005; Verbruggen et al., 2009; Wizemann et al., 2014). La alta plasticidad y adaptabilidad de la especie puede estar relacionada con su éxito en la colonización de hábitats en diferentes zonas geográficas, lo que explicaría su amplia distribución (Pongparadon et al., 2020).

En cuanto a la filogenia, el grupo de *Halimeda opuntia* se forma un clado fuertemente soportado con un apoyo BS y PP. Las secuencias del clado incluyeron localidades del Atlántico e Indo-Pacífico, presentando diferencias genéticas muy bajas. El lectotipo de la especie es de Jamaica, pero no se cuentan con datos moleculares de la localidad tipo que se pudieran incluir al análisis para confirmar la identidad de la especie.

La especie se incluyó en el grupo “G” junto con *Halimeda distorta*, *H. velasquezii* y *H. minima* en un solo clado formado en la delimitación de bPTP lo cual puede deberse a las bajas distancias genéticas entre estos taxones (menores a 2.65%). Sin embargo, no se presentaron distancias genéticas entre las diferentes zonas geográficas de *H. opuntia* y los taxones del grupo “G” están resueltos en las hipótesis de MV e IB. Los taxones están bien delimitados por caracteres morfo-anatómicos. Para la descripción de *H. opuntia* su forma de crecimiento es un carácter diagnóstico de la especie. Otra evidencia por considerar es su distribución, ya que *H. opuntia* es pantropical mientras que las especies de *H. distorta*, *H. velasquezii* y *H. minima* se distribuyen en el Indo-Pacífico (Colinvaux, 1968; Taylor, 1962; WoRMS, 2023). Un posible motivo de la subestimación en el método bPTP se debe a que es sensible a la precisión del árbol de entrada, el tamaño de la población, el tiempo de divergencia, y el flujo genético en curso (Xu et al., 2019) por lo que un análisis más detallado pudiera arrojar un resultado distinto.

La distribución de *Halimeda opuntia* se considera como modelo para probar las capacidades de dispersión limitada del género. En este sentido, Kooistra y Verbruggen (2005) sugieren que el origen de *H. opuntia* es en el Indo-Pacífico, y que su dispersión hacia el Caribe y Brasil fueron eventos independientes. También sugieren que su dispersión pudo ocurrir durante el inicio del transporte interoceánico de embarcaciones, estableciéndose poblaciones de la especie dos siglos antes de su recolección y estudio durante el siglo XVIII. Por otra parte, los depósitos de calcio *H. opuntia* del Caribe son de menor profundidad con respecto a los de Pacífico, lo que también apoya la teoría de que la llegada de la especie al Atlántico es reciente (Kooistra y Verbruggen, 2005).

***Halimeda discoidea* Decaisne 1842**

La revisión morfológica externa permitió la determinación de *Halimeda discoidea* en primera instancia. Presentó segmentos aplanados con forma reniforme, cuneada y ovalada, sin lóbulos y con talos mayores a cinco cm, con un pequeño nodo de fijación y con crecimiento erecto lineal a dicotómico coincidente con la literatura (Littler y Littler, 2000; Taylor, 1960) pero con segmentos ligeramente más pequeños (alto <2 cm y ancho <3 cm). Howe (1907) presenta una revisión de *Halimeda* incluyendo *H. discoidea* para América, pero los ejemplares analizados en este trabajo no presentan las características utriculares que el autor registra. En la revisión anatómica de *H. discoidea*, se observaron UP con forma poligonal y la presencia de utrículos fusionados como lo reporta Howe (1907), pero sin una segunda capa utricular reconocible. Esta se presenta con forma subglobosa y de un tamaño superior a los UP de acuerdo con la literatura (Taylor menciona que sus US son de gran tamaño e inflados, mientras que Littler y Littler los describen de mayor tamaño que los UP y que soportan hasta 14 UP cada uno). Otros estudios morfológicos El-Manawy y Shafik (2008) también los presentan como subglobulares y soportando muchos UP. Por su parte, Dijoux et al. (2012) los registran hasta dos veces más ancho que los UP y con forma subglobosa. La variación de los ejemplares revisados con las descripciones de distintos autores generó un problema en la determinación taxonómica y en la revisión anatómica sugiriendo la separación de *H. discoidea* de Campeche como una entidad distinta (Dijoux et al., 2012; El-Manawy y Shafik, 2008; Hillis-Colinvaux, 1980; Littler y Littler, 2000; Taylor, 1960; Ximenes et al., 2017).

Halimeda discoidea se presentó en dos clados formando un grupo polifilético en el análisis, separando las secuencias del Atlántico e Indo-Pacífico. El primer grupo se conformó por muestras de este estudio, Brasil y Canarias, fuertemente soportado por BS y PP, y presentó a *H. discoidea* de Jamaica como grupo hermano. El segundo grupo formado por las secuencias del Indo-Pacífico incluyen las secuencias de Madagascar, Japón, Nueva Caledonia, Yemen y Omán. Estos mismos grupos son congruentes con los formados en otros estudios filogenéticos del género (Dijoux et al., 2012; Kooistra et al., 2002; Verbruggen, De Clerck, Schils, et al., 2005; Verbruggen et al., 2009; Ximenes et al., 2017) sugiriendo también que se trata de especies distintas.

El análisis de delimitación bPTP formó cuatro agrupamientos de *Halimeda discoidea* y separó las secuencias del Atlántico (grupos "C" y "D") y las de Indo-Pacífico (grupos "E" y "F") en dos grupos de cada región, esto puede significar que se necesita más muestro para

esclarecer la delimitación de esta especie y analizar si los grupos “D” y “F” se encuentran en un proceso de especiación más avanzado que el resto de *H. discoidea*. Los análisis de bPTP también tienden a presentar falsos positivos cuando hay dos especies con un flujo genético continuo (Luo et al., 2018), que puede ser el caso que presentan los grupos formados para *H. discoidea*. Los agrupamientos obtenidos para *H. discoidea* pueden estar sobreestimando el número de especies por lo que un análisis con métodos combinados de delimitación podría ayudar a tener un enfoque con mayor credibilidad (Luo et al., 2018; Solovyeva et al., 2023; Xu et al., 2019).

La distancia genética entre los grupos de *Halimeda discoidea* del Atlántico fue variable, las secuencias de México presentaron distancias genéticas de 0.37%, 0.72% y 3.92% con las secuencias de Brasil, Canarias y Jamaica respectivamente. La topología de ML e IB presenta a la especie de *H. discoidea* de Brasil anidado en el grupo de *H. discoidea* de México que concuerda con su baja distancia genética. Así mismo la baja distancia genética entre el *H. discoidea* de México y *H. discoidea* de Canarias puede sugerir que son una entidad diferente a *H. discoidea* de Jamaica, por lo que un mejor muestreo y caracterización de estas zonas puede ayudar a delimitar los taxones.

El ejemplar tipo de *Halimeda discoidea* se encuentra en el Museo de Historia Natural de Paris, y su etiqueta registra Kamtschatka (Rusia) como la localidad tipo. Las condiciones de las aguas de la península de Kamtschatka son demasiado frías para esta especie, por lo que se considera la localidad tipo como incorrecta y desconocida (Hillis-Colinvaux, 1980). Por lo tanto, no se puede incluir una secuencia de la localidad tipo que permita determinar cuál grupo es el verdadero de *H. discoidea* (Ballantine et al., 2023; Hillis, 1959; Hillis-Colinvaux, 1980) sin un análisis que incluya ejemplares de sitios más cercanos y una revisión más detallada de su historia taxonómica.

Los ejemplares revisados en este estudio presentan variaciones morfológicas (tamaño de los segmentos) y anatómicas (US) notables con respecto a las reportadas en otros trabajos. Los valores de distancia genética de *Halimeda discoidea* de México con respecto a *H. discoidea* de Jamaica, Indo-Pacífico y Omán son mayores a las empleadas en la delimitación de *H. soniae* Ximenes, Oliveira-Carvalho, M.E. Bandeira-Pedrosa & Cassano 2019 y *H. jolyana* donde se emplearon distancias genéticas de 3.8% y 8-12% respectivamente empleando el mismo marcado molecular. Por lo tanto, ambas evidencias pueden ser suficientes para hacer

una delimitación empleando el concepto unificado de especie propuesto por de Queiroz (2007) que separe el taxón de *H. discoidea* de México como un taxón independiente a *H. discoidea* del Indo-Pacífico (Ximenes et al., 2017, 2019).

***Halimeda tuna* (J.Ellis & Solander) J.V.Lamouroux**

El grupo de *Halimeda tuna* presentó caracteres morfológicos externos similares a los reportados en la literatura: segmentos aplanados, lisos y ligeramente calcificados con un solo nodo de fijación, pero con segmentos de menor tamaño (Alto <0.9 cm Ancho <1.1 cm) (Littler y Littler, 2000; Taylor, 1960). Las estructuras utriculares se reportan como más alargadas en los trabajos morfológicos revisados y los US se presentaron considerablemente más cortos que los reportados por El-Manawy y Shafik (2008). La descripción de Blair y Norris (1988) para ejemplares de *H. tuna* del Caribe (San Salvador) coincidió con los caracteres obtenidos en este trabajo, en donde reporta segmentos de 3.5 a 13 mm de ancho y 4 a 13 mm de largo, ligeramente calcificados con dos (raramente tres) capas utriculares, con una media del diámetro de 33 µm y media de altura de 47 µm en UP. Howe (1907), determinó que no había suficientes diferencias para separar el grupo de *H. tuna* de América de las del Mediterráneo, pero presenta una revisión taxonómica para identificar entre *H. scabra*, *H. discoidea* y *H. tuna* de América.

Halimeda tuna sp. 2 presentó caracteres morfológicos similares a los de la especie *H. scabra*, donde el carácter diagnóstico es la espina central en los UP (Littler y Littler, 2000; Taylor, 1960). Hillis-Colinvaux (1980) menciona que la distinción entre *H. tuna* y *H. scabra* es esta terminación de los UP, por lo que se necesita una observación en microscopio para poder determinar ambas especies ya que son indistinguibles en morfología externa. Este mismo problema se presentó en el presente estudio, ya que en primera instancia se determinó a los ejemplares como *H. tuna*, y al momento de la revisión en microscopio se asignó a *H. scabra* por la presencia de la espina central. Al momento de revisar los análisis filogenéticos, se recuperó como un morfotipo de *H. tuna*, razón por la cual se le asignó el sufijo sp. 2 al grupo.

Halimeda tuna se presentó como un grupo polifilético con dos clados que separa las secuencias del Atlántico del Mediterráneo. En el árbol obtenido de MV no presentó una distinción entre los morfotipos de *H. tuna* y *H. tuna* sp. 2, y se agruparon las secuencias formando un clado fuertemente soportado por BS y PP. *H. tuna* de México presentó una mayor relación con las secuencias de *H. scabra* obtenidas de GenBank y formaron un clado

fuertemente soportado por BS y PP, por lo que el morfotipo *H. tuna* sp. 2 presentó la misma distancia genética con respecto a *H. scabra*. El grupo de *H. tuna* de Brasil-Belice se presentó como grupo hermano del clado que incluye a *H. tuna* de México, *H. tuna* sp. 2 y *H. scabra*, aunque solo se encontró soportado por BS. Esta situación puede ser de apoyo para inferir que *H. scabra* y *H. tuna* son una sola entidad.

El grupo “A” formado en la delimitación por bPTP incluyó todas las secuencias de *Halimeda tuna* del Atlántico y *H. scabra*. La distancia “*p*” entre los grupos de *H. tuna* de México con respecto a los de Brasil-Belice es de 1.24%, siendo incluso más baja la distancia entre las secuencias de *H. tuna* de México y *H. scabra* con un valor de 0.59%. Ambos valores son menores a los registrado para la delimitación de especies dentro del género (Ximenes et al., 2017, 2019).

También se encontraron UP en el morfotipo *Halimeda tuna* sp. 2 con y sin espina central. Se ha registrado plasticidad morfológica en *Halimeda tuna* que puede ser consecuencia de las condiciones ambientales como lo reportan Neustupa y Nemcova (2018), por lo que la distinción morfológica entre *H. tuna* y *H. scabra* puede no ser suficiente para delimitarlas como especies diferentes, ya que la forma y disposición de los utrículos podrían llegar a considerarse como variaciones morfo-anatómicas de una misma especie. Esta variación en la forma y disposición de los utrículos ya se ha reportado para la especie de *H. macroloba* Decaisne 1841 (Pongparadon et al., 2017). Por lo tanto, se requieren mejores muestreos y revisiones anatómicas de ejemplares de *H. tuna* y *H. scabra* del Caribe y ampliarlo con estudios sobre su ecología y reproducción para presentar una distinción y reevaluar su estatus taxonómico. En este trabajo no se puede realizar una delimitación o unión ya que no se cuentan con ejemplares de la localidad tipo de *H. scabra* (Florida, EUA).

Adicionalmente, en el clado de *Halimeda tuna* del Mediterráneo se incluyen las secuencias de Malta, Italia, Murcia y Sicilia. La distancia genética entre los grupos del Mediterráneo y el Atlántico es muy alta y presentan diferencias morfológicas, por lo que pueden tratarse de dos complejos diferentes que requieren de una revisión detallada para verificar si su estado taxonómico está bien delimitado (Kooistra et al., 2002; Verbruggen, De Clerck, Schils, et al., 2005; Verbruggen et al., 2009; Ximenes et al., 2017).

El grupo “B” formado por bPTP se encontró fuertemente soportado en los análisis filogenéticos, lo que hace una distinción clara de las secuencias obtenidas del Mediterráneo

de *Halimeda tuna* con respecto a *H. tuna* del Atlántico. El grupo "A" presentó una distancia genética con las secuencias del grupo "B" entre el 10.38% y 11.17%. Los valores de distancia genética presentadas de *H. tuna* del Atlántico y del Mediterráneo son mayores a la distancia entre especies ya reconocidas dentro del género (Verbruggen, De Clerck, Schils, et al., 2005; Vroom et al., 2003; Ximenes et al., 2017, 2019). Como referencia, la distancia entre *H. opuntia* y *H. incrassata* del presente estudio fue de 9.25%. Por lo que los ejemplares de México pueden tratarse de entidades diferentes a *H. tuna* del Mediterráneo.

La localidad tipo registrada de *Halimeda tuna* es el mediterráneo, por lo que las muestras trabajadas en este estudio podrían corresponder a otra especie. Los ejemplares de Campeche, puede ser correspondientes al morfotipo "b" de *H. tuna* sensu Lamouroux (1816; figura 8 de la lámina 11) quien distingue al morfotipo "a" para el mediterráneo y "b" para las Antillas. Finalmente, se necesita un análisis más detallado para una delimitación de especies robusta empleando más criterios que permitan primero diferenciar: 1) al grupo del Atlántico con el del Mediterráneo; y 2) la delimitación entre *H. tuna* de México con respecto a *H. scabra*.

Conclusiones

La diversidad del género *Halimeda* encontrada en este trabajo fue similar a la reportada para el estado de Campeche (Mateo-Cid et al., 2013). Se encontraron las mismas especies reportadas previamente, además se caracterizaron las especies de *Halimeda* y se infirieron las relaciones filogenéticas de estos taxones. Las secuencias de ADN obtenidas son las primeras para la región de estudio con lo que respaldan el estado taxonómico de las especies.

Se identificaron dos especies claramente reconocidas (*Halimeda opuntia* y *H. incrassata*), mientras que otras dos (*H. tuna* y *H. discoidea*) no coincidieron con las características diagnósticas descritas para estas especies ni con las secuencias de ADN disponibles a nivel global.

En el presente trabajo se distinguieron caracteres diagnósticos diferentes a la literatura para las especies de *Halimeda tuna* y *H. discoidea*. En el primer caso se observaron los caracteres apicales de los utrículos de *H. scabra* como caracteres que están presentes en las especies mexicanas de *H. tuna*. Se deben realizar más estudios con métodos de delimitación de especies, tales como análisis morfológicos, moleculares, ecológicos, entre otros, para determinar si el estado taxonómico de *H. tuna* de México y *H. scabra* son entidades diferentes o se tratan de morfotipos de una misma especie. Estas investigaciones adicionales permitirán recopilar evidencias exhaustivas y comparativas que respalden una mejor conclusión sobre su clasificación taxonómica. En el caso de *H. discoidea* la ausencia de US subglobosos de gran tamaño en ejemplares mexicanos los diferencia morfológicamente de *H. discoidea* reportada en otras zonas geográficas.

Las especies *Halimeda opuntia* y *H. incrassata* exhibieron baja o nula distancia genética con el gen *tufA* respecto a ejemplares de otras zonas geográficas, incluso diferentes océanos para el caso de *H. opuntia*. Mientras que la especie *H. tuna* mostró una alta distancia genética con respecto a ejemplares de *H. tuna* del Mediterráneo. Y la especie *H. discoidea* de México presentó una alta distancia genética con respecto a ejemplares del océano Indo-Pacífico, y una distancia genética baja con respecto a los ejemplares de *H. discoidea* de Jamaica.

Las especies de *Halimeda tuna* y *H. discoidea* revisadas en este trabajo presentaron evidencia morfológica y molecular que difiere a la presentada para sus localidades tipo. *H. discoidea* y *H. tuna* no fueron mostradas como grupos cercanos entre sus diferentes regiones

geográficas. La información recopilada en este trabajo puede servir de base para determinar si las especies mexicanas de *H. discoidea* y *H. tuna* son especies pseudocríptas.

Perspectivas

Es necesario llevar a cabo un examen más detallado de la presencia de diferentes clados formados mediante el gen *tufA* y emplear otros para evaluar los grupos mexicanos de *Halimeda discoidea* y *H. tuna*, a fin de considerar si los ejemplares mexicanos presentan suficiente evidencia que respalde su delimitación como especies distintas, tal como sugiere esta revisión realizada con el marcador *tufA* y la revisión morfo-anatómica.

Se deben realizar mejores revisiones con ejemplares de diferentes sitios para buscar la presencia de caracteres diagnósticos y volver a revisar la morfología y anatomía de los grupos.

Para el caso de México, hace falta un muestreo más completo donde se incluyan más zonas de estudio y poder realizar comparaciones morfológicas con las demás descripciones de los grupos para el Atlántico. Asimismo, conocer si hay caracteres diagnósticos que sean congruentes con los clados filogenéticos formados en el trabajo.

Referencias

- Acosta Calderón, J. A. (2014). *Estudio ficoflorístico de las algas verdes (Chlorophyta, Ulvophyceae) en la reserva de la biosfera de Sian Ka'an, Quintana Roo, México* [Mestría]. Instituto Politecnico Nacional.
- Aguilar-Rosas, L. E., Espinoza-Avalos, J., y Aguilar-Rosas, R. (2001). Distribucion de las especies de la familia Udoteaceae (Bryopsidales, Chlorophyta) de la península de Yucatan, Mexico. *Anales de la escuela nacional de ciencias biológicas*, 47(1), 99–108.
- Alfaro, M. E., Zoller, S., y Lutzoni, F. (2003). Bayes or Bootstrap? A Simulation Study Comparing the Performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo Sampling and Bootstrapping in Assessing Phylogenetic Confidence. *Molecular Biology and Evolution*, 20(2), 255–266. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSG028>
- Alpuche Gual, L. (2014). *Clasificación de playas campechanas para su manejo integral y desarrollo sostenible*.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Arina, N., Rozaimi, M., y Zainee, N. F. A. (2019). High localised diversity of Halimeda (Chlorophyta: Bryopsidales) in a tropical marine park from Pahang, Malaysia. *Regional Studies in Marine Science*, 31, 100773. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100773>
- Askenasy, E. (1889). Algen. En *Die Forschungsreise S.M.S. Gazelle 1874 bis 1876 unter Kommando des Kapitän See Freiherrn von Schleinitz* (Vol. 4, pp. 11–14). Ernst Siegfried Mittler und Solm Köiigiiclii.
- Ballantine, D. L., Norris, J. N., y Ruiz, H. (2023). *The Marine Benthic Algal Flora of Puerto Rico, II. Chlorophyta and Prasinodermatophyta*. Smithsonian Institution Scholarly Press.
- Bandeira-Pedrosa, M. E., Pereira, S. M. B., y Oliveira, E. C. (2004). Taxonomy and distribution of the green algal genus Halimeda (Bryopsidales, Chlorophyta) in Brazil. *Brazilian Journal of Botany*, 27(2), 363–377. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042004000200015>
- Barton, E. S. (1901). The genus Halimeda. En *Siboga Expeditie: Vol. Mono. 60*. Leyden.
- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., Ingram, K. K., y Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(3), 148–155. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2006.11.004>
- Blair, S. M., y Norris, J. N. (1988). The deep-water species of Halimeda Lamouroux (Halimedaceae, Chlorophyta) from San Salvador Island, Bahamas: species composition, distribution and depth records. *Coral Reefs* 1988 6:3, 6(3), 227–236. <https://doi.org/10.1007/BF00302019>
- Callejas Jiménez, M. E., Senties Granados, A., y Dreckmann, K. M. (2005). Macroalgas bentónicas de Puerto Real, Faro Santa Rosalía y Playa Preciosa, Campeche, México,

con algunas consideraciones florísticas y ecológicas para el estado. *Hidrobiológica*, 15(1), 89–96.

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., y Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>
- Cavalier-Smith, T. (2007). Evolution and relationships of algae: major branches of the tree of life. En J. Brodie & J. Lewis (Eds.), *Unravelling the algae the past, present, and future of algal systematics* (pp. 21–55). CRC Press.
- Clifton, K. E. (1997). Mass Spawning by Green Algae on Coral Reefs. *Science*, 275(5303), 1116–1118. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.275.5303.1116>
- Colinvaux, L. H. (1968). NEW SPECIES OF HALIMEDA: A TAXONOMIC REAPPRAISAL. *Journal of Phycology*, 4(1), 30–35. <https://doi.org/10.1111/J.1529-8817.1968.TB04673.X>
- Cracraft, J. (1983). Species Concepts and Speciation Analysis. En *Current Ornithology* (pp. 159–187). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6781-3_6
- Cremen, M. C. M., Leliaert, F., West, J., Lam, D. W., Shimada, S., Lopez-Bautista, J. M., y Verbruggen, H. (2019). Reassessment of the classification of Bryopsidales (Chlorophyta) based on chloroplast phylogenomic analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 130, 397–405. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2018.09.009>
- Cremen, Ma. C. M., Huisman, J. M., Marcelino, V. R., Verbruggen, H., Cremen, Ma. C. M., Huisman, J. M., Marcelino, V. R., y Verbruggen, H. (2016). Taxonomic revision of Halimeda (Bryopsidales, Chlorophyta) in south-western Australia. *Australian Systematic Botany*, 29(1), 41–54. <https://doi.org/10.1071/SB15043>
- De Queiroz, K. (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Syst. Biol*, 56(6), 879–886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
- de Queiroz, K. (2022). An updated concept of subspecies resolves a dispute about the taxonomy of incompletely separated lineages. *Herpetological Review*, 51(3), 459–461.
- Díaz, M. Á. (2004). *Estudio de las corrientes en la Bahía de Campeche utilizando un perfilador acústico Doppler (ADCP)* [Maestría en Ciencias]. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología.
- Díaz-Flores, M. Á., Salas-de-León, D. A., y Monreal-Gómez, M. A. (2017). Origen y evolución del giro ciclónico de la Bahía de Campeche, Golfo de México. *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(3), 441–450. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572017000300003>
- Díaz-Martínez, S., Hernández-Anaya, L., Avila-Ortiz, A. G., Cabrera-Martínez, L. I., y Zuccarello, G. C. (2023). Lobophora dispersa (Dictyotaceae: Phaeophyceae), a new record for the coast of Veracruz and insights into Lobophora genetic differentiation in the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea. *Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM*.

- Dijoux, L., Verbruggen, H., Mattio, L., Duong, N., & Payri, C. (2012). Diversity of Halimeda (Bryopsidales, Chlorophyta) in New Caledonia: a Combined Morphological and Molecular Study. *Journal of Phycology*, 48(6), 1465–1481. <https://doi.org/10.1111/JPY.12002>
- Doyle, J. J., y Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11–15. <https://worldveg.tind.io/record/33886>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKH340>
- Ellis, J. (1755). *An Essay Towards a Natural History of the Corallines, and Other Marine Productions of the Like Kind, Commonly Found on the Coasts of Great Britain and Ireland*. John Ellis y A. Millar.
- El-Manawy, I., y Shafik, M. (2008). *Morphological Characterization of Halimeda (Lamouroux) from Different Biotopes on the Red Sea Coral Reefs of Egypt Using of of urea herbicides to suppress the growth of Eichhorina crassipes leaves. View project applied seaweeds View project*. <https://www.researchgate.net/publication/237577963>
- Fredericq, S., Cho, T. O., Earle, S. A., Gurgel, C. F., Krayesky, D. M., Mateo-Cid, L. E., Mendoza-González, A. C., Norris, J. N., y Suárez, A. M. (2009). Seaweeds of the Gulf of Mexico. En D. L. Felder & D. K. Camp (Eds.), *Gulf of Mexico—Origins, Waters, and Biota. Biodiversity*. (Vol. 1, pp. 187–259). Texas A&M Press, College Station.
- García-Cuéllar, J. Á., Arreguín-Sánchez, F., Hernández Vázquez, S., y Lluch-Cota, D. B. (2004). Impacto ecológico de la industria petrolera en la sonda de Campeche, México, tras tres décadas de actividad: Una revisión. *Interciencia*, 29(6), 311–319. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004000600006&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Garduño-Solórzano, G., Godínez-Ortega, J. L., y Ortega, M. M. (2005). Distribución geográfica y afinidad por el sustrato de las algas verdes (Chlorophyceae) bénticas de las costas mexicanas del Golfo de México y Mar Caribe. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 76, 61–78.
- Geneious (6.1.8). (2013).
- Guiry, M. D., y Guiry, G. M. (2023). *AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Taxonomy Browser Genus: Halimeda*. <https://www.algaebase.org/browse/taxonomy/#8210>
- Hillis, D. M. (1987). Molecular Versus Morphological Approaches to Systematics. *Source: Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 23–42.
- Hillis, D. M., y Bull, J. J. (1993). An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*, 42(2), 182–192. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/42.2.182>

- Hillis, D. M., y Wiens, J. J. (2000). Molecules versus morphology in systematics: conflicts, artifacts, and misconceptions. En J. J. Wiens (Ed.), *Phylogenetic analysis of morphological data* (pp. 1–19). Smithsonian Institution.
- Hillis, L. W. (1959). A revision of the genus *Halimeda* (Orden Siphonales). *Publications of the Institute of Marine Science, University of Texas*, 6, 321–403.
- Hillis-Colinvaux, L. (1980). Ecology and Taxonomy of *Halimeda*: Primary Producer of Coral Reefs. *Advances in Marine Biology*, 17(C), 1–327. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60303-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60303-X)
- Howe, M. A. (1907). Phycological Studies-III. Further Notes on *Halimeda* and *Avrainvillea*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 34(10), 516. <https://doi.org/10.2307/2479207>
- Howe, M. A. (1909). Phycological Studies-IV. The Genus *Neomeris* and Notes on Other Siphonales. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 36(2), 104. <https://doi.org/10.2307/2479015>
- Huelsenbeck, J. P., y Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Huerta Múzquiz, L. (2021). *Algas marinas bentónicas de la Península de Yucatán y uso potencial de especies selectas*.
- Imperato, F. (1599). *Dell'istoria naturale di Ferrante Imperato napolitano. Libri 28. Nella ... - Ferrante Imperato - Google Libros*. nella stamperia à Porta Reale per Costantino Vitale.
- Jorgensen, R. A., y Cluster, P. D. (1988). Modes and Tempos in the Evolution of Nuclear Ribosomal DNA: New Characters for Evolutionary Studies and New Markers for Genetic and Population Studies. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 75(4), 1238. <https://doi.org/10.2307/2399282>
- Kapli, P., Yang, Z., y Telford, M. J. (2020). Phylogenetic tree building in the genomic age. *Nature Reviews Genetics* 2020 21:7, 21(7), 428–444. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0233-0>
- Kawachi, M., Inouye, I., Honda, D., O'Kelly, C. J., Bailey, J. C., Bidigare, R. R., y Andersen, R. A. (2002). The Pinguiphyceae classis nova, a new class of photosynthetic stramenopiles whose members produce large amounts of omega-3 fatty acids. *Phycological Research*, 50(1), 31–47. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1835.2002.00260.X>
- Kojima, R., Hanyuda, T., y Kawai, H. (2015). Taxonomic re-examination of Japanese *Halimeda* species using genetic markers, and proposal of a new species *Halimeda ryukyuensis* (Bryopsidales, Chlorophyta). *Phycological Research*, 63(3), 178–188. <https://doi.org/10.1111/pre.12095>
- Kooistra, W. H. C. F., Coppejans, E. G. G., y Payri, C. (2002). Molecular systematics, historical ecology, and phylogeography of *Halimeda* (Bryopsidales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 24(1), 121–138. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00221-X](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00221-X)

- Kooistra, W. H. C. F., y Verbruggen, H. (2005). GENETIC PATTERNS IN THE CALCIFIED TROPICAL SEAWEEDS HALIMEDA OPUNTIA, H. DISTORTA, H. HEDERACEA, AND H. MINIMA (BRYOPSIDALES, CHLOROPHYTA) PROVIDE INSIGHTS IN SPECIES BOUNDARIES AND INTEROCEANIC DISPERSAL1. *Journal of Phycology*, 41(1), 177–187. <https://doi.org/10.1111/J.1529-8817.2005.04095.X>
- Lamouroux, J. V. F. (1812). Extrait d'un memoire sur la classification de polypes coralligenes non entièrement pierreux. *Nouveau Bulletin Scientifique de la Société Philomatique*, 63(3), 181–188.
- Lamouroux, J. V. F. (1816). *Histoire des polypiers coralligènes flexibles, vulgairement nommés zoophytes*. F. Poisson.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W., y Guindon, S. (2012). PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29(6), 1695–1701. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., y Calcott, B. (2016). PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution*, msw260. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>
- Lemey, P., Salemi, M., y Vandamme, A.-M. (Eds.). (2009). *The Phylogenetic Handbook*. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511819049>
- Littler, D. S., y Littler, M. M. (2000). *Caribbean Reef Plants: An Identification Guide to the Reef Plants of Caribbean, Bahamas, Florida and Gulf of Mexico*. Offshore Graphics.
- Luo, A., Ling, C., Ho, S. Y. W., y Zhu, C. D. (2018). Comparison of Methods for Molecular Species Delimitation Across a Range of Speciation Scenarios. *Systematic Biology*, 67(5), 830. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYY011>
- Mateo-Cid, L. E., y Mendoza-González, A. C. (1992). Algas marinas bentónicas de la costa sur de Nayarit, México. *Acta Botánica Mexicana*, 20, 13–28.
- Mateo-Cid, L. E., Mendoza-González, A. C., Avila-Ortiz, A. G., y Martínez, S. D. (2013). Algas marinas bentónicas del litoral de campeche, México. *Acta Botanica Mexicana*, 2013(104), 53–92. <https://doi.org/10.21829/ABM104.2013.57>
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press. <https://doi.org/10.17226/11310>
- Mendoza-González, A. C., Mateo-Cid, L. E., Alvarado-Villanueva, R., Sotelo-Cuevas, F., Ceballos-Corona, J. G. A., y Garduño-Acosta, A. G. A. (2018). Nuevos registros y lista actualizada de las algas verdes (Chlorophyta) del litoral de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89(4). <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.4.2604>
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic

- Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530–1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Monro, A., y Mayo, S. (2022). *Cryptic Species: Morphological Stasis, Circumscription, and Hidden Diversity*. Cambridge University Press.
- Morrone, J. J. (2000). *SISTEMÁTICA, BIOGEOGRAFÍA, EVOLUCIÓN Los patrones de la biodiversidad en tiempo-espacio* (1a ed.). Facultad de Ciencias, UNAM.
- Neustupa, J., y Nemcova, Y. (2018). Morphological allometry constrains symmetric shape variation, but not asymmetry, of *Halimeda tuna* (Bryopsidales, Ulvophyceae) segments. *PLOS ONE*, 13(10), e0206492. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0206492>
- Ortega, M., Godínez, J. L., y Garduño Solórzano, G. (2001). *Catálogo de algas bénticas de las costas mexicanas del Golfo de México y Mar Caribe*. CONABIO, UNAM.
- Page, R. D. M., y Holmes, E. C. (2008). *Molecular Evolution: A Phylogenetic Approach* (13a ed.). Blackwell Publishing.
- Payo, D. A., Leliaert, F., Verbruggen, H., D'hondt, S., Calumpong, H. P., y De Clerck, O. (2013). Extensive cryptic species diversity and fine-scale endemism in the marine red alga *Portieria* in the Philippines. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1753). <https://doi.org/10.1098/RSPB.2012.2660>
- Payri, C. E. (1988). *Halimeda* contribution to organic and inorganic production in a Tahitian reef system. *Coral Reefs*, 6(3–4), 251–262. <https://doi.org/10.1007/BF00302021/METRICS>
- Peach, K. E., Koch, M. S., Blackwelder, P. L., Guerrero-Given, D., y Kamasawa, N. (2017). Primary utricle structure of six *Halimeda* species and potential relevance for ocean acidification tolerance. *Botanica Marina*, 60(1), 1–11. <https://doi.org/10.1515/BOT-2016-0055/MACHINEREADABLECITATION/RIS>
- Pedroche, F. F., Rosas, L. E. A., y Dreckmann, K. M. (2005). *Catálogo de las algas marinas bentónicas del Pacífico de México. I. Chlorophycota*. Universidad Autónoma de Baja California.
- Pedroche, F. F., y Senties, A. (2020). Diversidad de macroalgas marinas en México. Una actualización florística y nomenclatural. *Cymbella*, 6(1), 4–55.
- Pereira, L. (2021). Macroalgae. *Encyclopedia 2021, Vol. 1, Pages 177-188*, 1(1), 177–188. <https://doi.org/10.3390/ENCYCLOPEDIA1010017>
- Pereira, L., y Neto, J. M. (2014). *Marine algae : biodiversity, taxonomy, environmental assessment, and biotechnology*. CRC Press. <https://www.routledge.com/Marine-Algae-Biodiversity-Taxonomy-Environmental-Assessment-and-Biotechnology/Pereira-Neto/p/book/9780367739751>
- Pongparadon, S., Nooek, S., y Prathep, A. (2020). Phenotypic plasticity and morphological adaptation of *Halimeda opuntia* (Bryopsidales, Chlorophyta) to light intensity. *Phycological Research*, 68(2), 115–125. <https://doi.org/10.1111/PRE.12404>

- Pongparadon, S., Zuccarello, G. C., Phang, S. M., Kawai, H., Hanyuda, T., y Prathep, A. (2015). Diversity of Halimeda (Chlorophyta) from the Thai–Malay Peninsula. *https://doi.org/10.2216/14-108.1*, 54(4), 349–366. <https://doi.org/10.2216/14-108.1>
- Pongparadon, S., Zuccarello, G. C., y Prathep, A. (2017). High morpho-anatomical variability in Halimeda macroloba (Bryopsidales, Chlorophyta) in Thai waters. *Phycological Research*, 65(2), 136–145. <https://doi.org/10.1111/PRE.12172>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., y Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5), 901–904. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYY032>
- Rees, S. A., Opdyke, B. N., Wilson, P. A., y Henstock, T. J. (2007). Significance of Halimeda bioherms to the global carbonate budget based on a geological sediment budget for the Northern Great Barrier Reef, Australia. *Coral Reefs*, 26(1), 177–188. <https://doi.org/10.1007/S00338-006-0166-X/TABLES/6>
- Rindi, F., Pasella, M. M., Lee, M. F. E., y Verbruggen, H. (2020). Phylogeography of the mediterranean green seaweed Halimeda tuna (Ulvophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 56(4), 1109–1113. <https://doi.org/10.1111/JPY.13006>
- Rivera-Arriaga, E., López, O., León, R., Paredes, J., Arjona, M., Espejel, I., Zetina, R., y Villalobos, G. (2019). *El ordenamiento de la zona costera de Campeche, México*. Corporación Universidad de la Costa.
- Ross, K. G., Gotzek, D., Ascunce, M. S., y Shoemaker, D. D. (2010). Species Delimitation: A Case Study in a Problematic Ant Taxon. *Syst. Biol*, 59(2), 162–184. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp089>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., y Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), 487–491. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.2448875>
- San Mauro, D., y Agorreta, A. (2010). Molecular systematics: A synthesis of the common methods and the state of knowledge. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 15(2), 1–31. <https://doi.org/10.2478/S11658-010-0010-8/XML>
- Saunders, G. W., y Kucera, H. (2010). An evaluation of rbcL, tufA, UPA, LSU and ITS as DNA barcode markers for the marine green macroalgae. *Cryptogamie, Algologie*, 31(4), 487–528.
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Ostell, J., Pruitt, K. D., y Karsch-Mizrachi, I. (2020). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D84–D86. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ956>
- Serviere-Zaragoza, E., Arguero, S. C., y González-González, J. (1998). Descripción ficológica de los ambientes de la región de bahía de Banderas, Nayarit-Jalisco, México. *Boletín del instituto de botánica (Universidad de Guadalajara)*, 5, 157–180.

- Sierra Rodríguez, O. (2013). *Ficoflora de localidades litorales e insulares de Quintana Roo, México* [Licenciatura]. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Smithsonian Tropical Research Institute - Marine Plants Of Pacific Panama DS. Littler & M.M Littler. (s/f). Halimeda cf. discoidea. Recuperado el 12 de abril de 2023, de <https://biogeodb.stri.si.edu/pacificalgae/specie/27>
- Solovyeva, E. N., Dunayev, E. A., Nazarov, R. A., Bondarenko, D. A., y Poyarkov, N. A. (2023). COI-Barcoding and Species Delimitation Assessment of Toad-Headed Agamas of the Genus *Phrynocephalus* (Agamidae, Squamata) Reveal Unrecognized Diversity in Central Eurasia. *Diversity*, 15(2), 149. <https://doi.org/10.3390/D15020149/S1>
- Tamura, K., Stecher, G., y Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Taylor, W. R. (1960). *Marine Algae of the Eastern Tropical and Subtropical Coasts of the Americas*. The University of Michigan Press.
- Taylor, Wm. R. (1962). Two Undescribed Species of Halimeda. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 89(3), 172. <https://doi.org/10.2307/2482564>
- Thiers, B. M. (2023). *Index herbariorum: a global directory of public herbaria and associated staff*. Actualizado constantemente. <https://sweetgum.nybg.org/science/ih/>
- Van Valen, L. (1976). Ecological Species, Multispecies, and Oaks. *Source*, 25(2), 233–239.
- Velasco, H. (1994). *Modelo numérico de circulación para la Bahía de Campeche* [Maestría en Ciencias del Mar]. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología. UNAM.
- Verbruggen, H., De Clerck, O., Kooistra, W. H. C. F., y Coppejans, E. (2005). Molecular and morphometric data pinpoint species boundaries in Halimeda section Rhipsalis (Bryopsidales, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 41(3), 606–621. <https://doi.org/10.1111/J.1529-8817.2005.00083.X>
- Verbruggen, H., De Clerck, O., N'Yeurt, A. D. R., Spalding, H., y Vroom, P. S. (2006). Phylogeny and taxonomy of Halimeda incrassata, including descriptions of H. kanaloana and H. heteromorpha spp. nov. (Bryopsidales, Chlorophyta). <https://doi.org/10.1080/09670260600709315>, 41(3), 337–362. <https://doi.org/10.1080/09670260600709315>
- Verbruggen, H., De Clerck, O., Schils, T., Kooistra, W. H. C. F., y Coppejans, E. (2005). Evolution and phylogeography of Halimeda section Halimeda (Bryopsidales, Chlorophyta). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(3), 789–803. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2005.06.015>
- Verbruggen, H., y Kooistra, W. (2004). Morphological characterization of lineages within the calcified tropical seaweed genus Halimeda (Bryopsidales, Chlorophyta). <https://doi.org/10.1080/0967026042000202163>, 39(2), 213–228. <https://doi.org/10.1080/0967026042000202163>

- Verbruggen, H., Tyberghein, L., Pauly, K., Vlaeminck, C., Nieuwenhuyze, K. Van, Kooistra, W. H. C. F., Leliaert, F., y de Clerck, O. (2009). Macroecology meets macroevolution: evolutionary niche dynamics in the seaweed *Halimeda*. *Global Ecology and Biogeography*, 18(4), 393–405. <https://doi.org/10.1111/J.1466-8238.2009.00463.X>
- Vieira, H. H., Bagatini, I. L., Guinart, C. M., y Vieira, A. A. H. (2016). *tufA* gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae. *Algae*, 31(2), 155–165. <https://doi.org/10.4490/ALGAE.2016.31.4.14>
- Vilchis, M. I., Dreckmann, K. M., García-Trejo, E. A., Hernández, O. E., Senties, A., Vilchis, M. I., Dreckmann, K. M., García-Trejo, E. A., Hernández, O. E., y Senties, A. (2018). Patrones de distribución de las grandes macroalgas en el golfo de México y el Caribe mexicano: una contribución a la biología de la conservación. *Revista mexicana de biodiversidad*, 89(1), 183–192. <https://doi.org/10.22201/IB.20078706E.2018.1.2226>
- Vroom, P. S., Smith, C. M., Coyer, J. A., Walters, L. J., Hunter, C. L., Beach, K. S., y Smith, J. E. (2003). Field biology of *Halimeda* tuna (Bryopsidales, Chlorophyta) across a depth gradient: Comparative growth, survivorship, recruitment, and reproduction. *Hydrobiologia*, 501(1), 149–166. <https://doi.org/10.1023/A:1026287816324/METRICS>
- Wang, C., Zou, S., Fei, C., Wang, C., Gao, Z., Bao, Y., y He, M. (2016). How DNA barcoding can be more effective in microalgae identification: a case of cryptic diversity revelation in *Scenedesmus* (Chlorophyceae). *Scientific Reports 2016 6:1*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep36822>
- Wiley, E. O., y Lieberman, B. (2011). *Phylogenetics: theory and practice of phylogenetic systematics* (2a ed.). Wiley-Blackwell. John Wiley & Sons, Inc.
- Wilkins, J. S., Zachos, F. E., y Pavlinov, I. Ya. (2022). *Species Problems and Beyond*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9780367855604>
- Wiman, S. K., y McKendree, W. G. (1975). Distribution of *Halimeda* plants and sediments on and around a patch reef near Old Rhodes Key, Florida. *Journal of Sedimentary Research*, 45(2), 415–421. <https://doi.org/10.1306/212F6D7A-2B24-11D7-8648000102C1865D>
- Wizemann, A., Meyer, F. W., y Westphal, H. (2014). A new model for the calcification of the green macro-alga *Halimeda opuntia* (Lamouroux). *Coral Reefs*, 33(4), 951–964. <https://doi.org/10.1007/s00338-014-1183-9>
- Woelkerling, W. J. (1988). *The coralline red algae : an analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate Corallinaceae*. Oxford University Press.
- WoRMS Editorial Board. (2023). *World Register of Marine Species*. <https://www.marinespecies.org/index.php>
- Wray, J. L. (1977). Introduction. En *Calcareous algae* (pp. 1–9). Elsevier Scientific Publishing Company .
- Ximenes, C. F., Cassano, V., De Oliveira-Carvalho, M. D. F., Bandeira-Pedrosa, M. E., Gurgel, C. F. D., Verbruggen, H., y Pereira, S. M. B. (2017). Systematics of the genus

Halimeda (Bryopsidales, Chlorophyta) in Brazil including the description of *Halimeda jolyana* sp. nov. <https://doi.org/10.2216/16-77.1>, 56(4), 369–381.
<https://doi.org/10.2216/16-77.1>

Ximenes, C. F., De Oliveira-Carvalho, M. D. F., Bandeira-Pedrosa, M. E., y Cassano, V. (2019). Updates on Section Pseudo-opuntia of *Halimeda*: Phylogenetic analyses of *H. soniae* sp. nov. (Bryopsidales, Chlorophyta) along the Brazilian coast. *Botanica Marina*, 62(4), 327–336. https://doi.org/10.1515/BOT-2018-0094/DOWNLOADASSET/SUPPL/BOT-2018-0094_SUPPL.DOCX

Xu, X., Kuntner, M., Bond, J. E., Ono, H., Liu, F., Yu, L., y Li, D. (2019). A multi-tier species delimitation approach resolves conflicts in delineating the primitively segmented spider genus *Heptathela* endemic to Japanese islands. *bioRxiv*, October, 812214.
<https://doi.org/10.1101/812214>

Yang, Z., y Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics* 2012 13:5, 13(5), 303–314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., y Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869–2876.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>

Anexos

Anexo 1

Especies de *Halimeda* registradas en México

Especie	Ubicación	Referencia
<i>Halimeda cuneata</i> Hering 1846	Pacífico Mexicano (Baja California Sur, Nayarit) Golfo de México	(Mateo-Cid y Mendoza-González, 1992; Pedroche et al., 2005; Pedroche y Senties, 2020)
<i>Halimeda discoidea</i> Decaisne 1842	Pacífico Mexicano (Baja California Sur, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca); Golfo de México (Quintana Roo, Campeche, Veracruz, Tamaulipas)	(Callejas Jiménez et al., 2005; Garduño-Solórzano et al., 2005; Mateo-Cid y Mendoza-González, 1992; Mendoza-González et al., 2018; Pedroche et al., 2005; Serviere-Zaragoza et al., 1998)
<i>Halimeda favulosa</i> M. Howe 1905	Golfo de México (Yucatán, Quintana Roo)	(Acosta Calderón, 2014; Fredericq et al., 2009)
<i>Halimeda goreau</i> W.R. Taylor 1962	Golfo de México (Quintana Roo)	(Aguilar-Rosas et al., 2001)
<i>Halimeda gracilis</i> Harvey ex J. Agardh 1887	Golfo de México (Quintana Roo)	(Aguilar-Rosas et al., 2001)
<i>Halimeda incrassata</i> (J. Ellis) J.V.Lamouroux 1816	Golfo de México (Campeche, Quintana Roo, Yucatán)	(Aguilar-Rosas et al., 2001; Huerta Múzquiz, 2021)
<i>Halimeda lacrimosa</i> M. Howe 1909	Golfo de México (Quintana Roo, Yucatán)	(Acosta Calderón, 2014; Aguilar-Rosas et al., 2001; Garduño-Solórzano et al., 2005)
<i>Halimeda monile</i> (J. Ellis & Solander) J.V.Lamouroux 1816	Golfo de México (Quintana Roo, Yucatán)	(Aguilar-Rosas et al., 2001; Garduño-Solórzano et al., 2005; Sierra Rodríguez, 2013)
<i>Halimeda opuntia</i> (Linnaeus) J.V. Lamouroux 1816	Pacífico Mexicano (Baja California Sur), Golfo de México (Quintana Roo, Yucatán, Campeche)	(Aguilar-Rosas et al., 2001; Garduño-Solórzano et al., 2005; Pedroche et al., 2005)
<i>Halimeda scabra</i> M. Howe 1905	Pacífico Mexicano (Baja California Sur) Golfo de México (Quintana Roo, Yucatán)	(Acosta Calderón, 2014; Garduño-Solórzano et al., 2005; Pedroche et al., 2005; Sierra Rodríguez, 2013)
<i>Halimeda simulans</i> M. Howe 1907	Golfo de México (Quintana Roo)	(Pedroche y Senties, 2020; Verbruggen, De Clerck, Schils, et al., 2005)
<i>Halimeda tuna</i> (J. Ellis & Solander) J.V.Lamouroux 1816	Pacífico Mexicano (Michoacán, Guerrero, Oaxaca) Golfo de México (Quintana Roo, Yucatán, Campeche)	(Aguilar-Rosas et al., 2001; Garduño-Solórzano et al., 2005; Mendoza-González et al., 2018; Pedroche et al., 2005)

Anexo 2

Comandos empleados en el análisis de IB

lset applyto=(1)	nst=6	rates=invgamma
------------------	-------	----------------

lset applyto=(2)	nst=6	rates=invgamma
------------------	-------	----------------

lset applyto=(3)	nst=6	rates=invgamma
------------------	-------	----------------

```
prset applyto=(all) ratepr=variable; unlink statefreq=(all) revmat=(all) shape=(all)
pinvar=(all) tratio=(all)
```

Lámina 1

Halimeda incrassata: A) Ejemplar herborizado, B) y C) Vista superficial de los utrículos, D) y E) Vista lateral de los utrículos

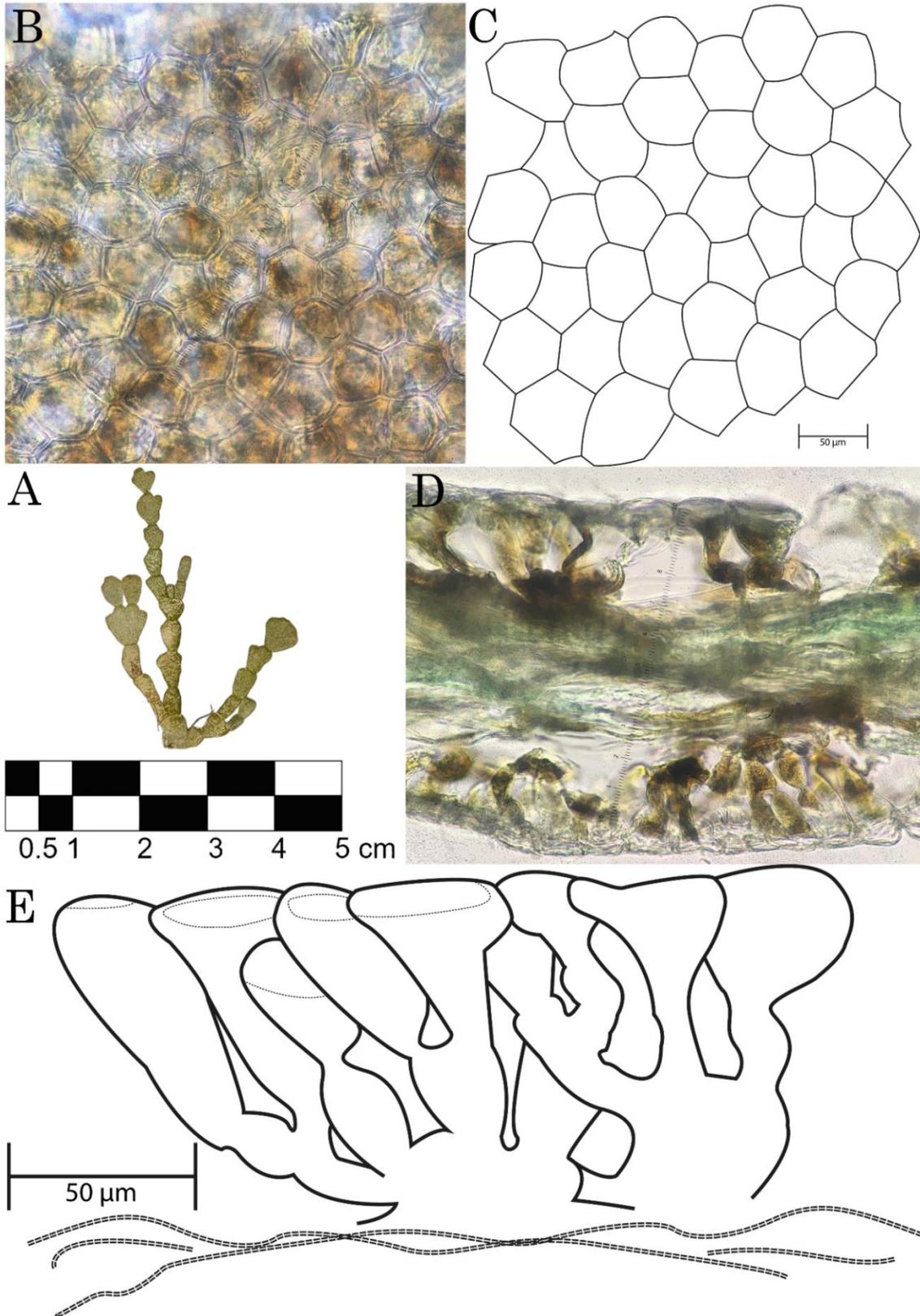


Lámina 2

Halimeda opuntia: A) y B) Ejemplares herborizados, C) y D) Vista superficial de los utrículos, E) y F) Vista lateral de los utrículos

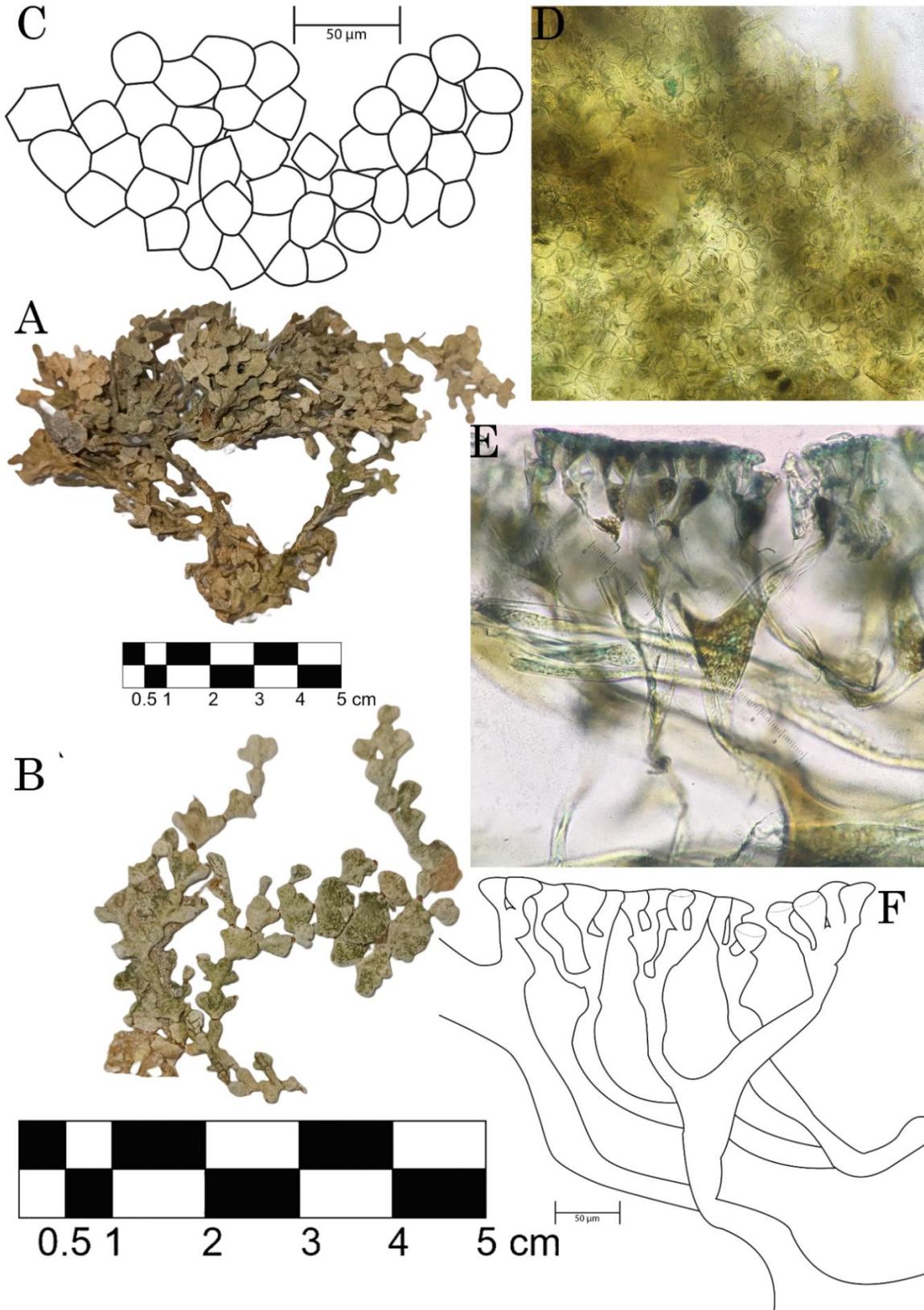


Lámina 3

Halimeda discoidea: A) y B) Ejemplares herborizados, C) y D) Vista lateral de los utrículos, E) y F) Vista superficial de los utrículos con presencia de utrículos fusionados

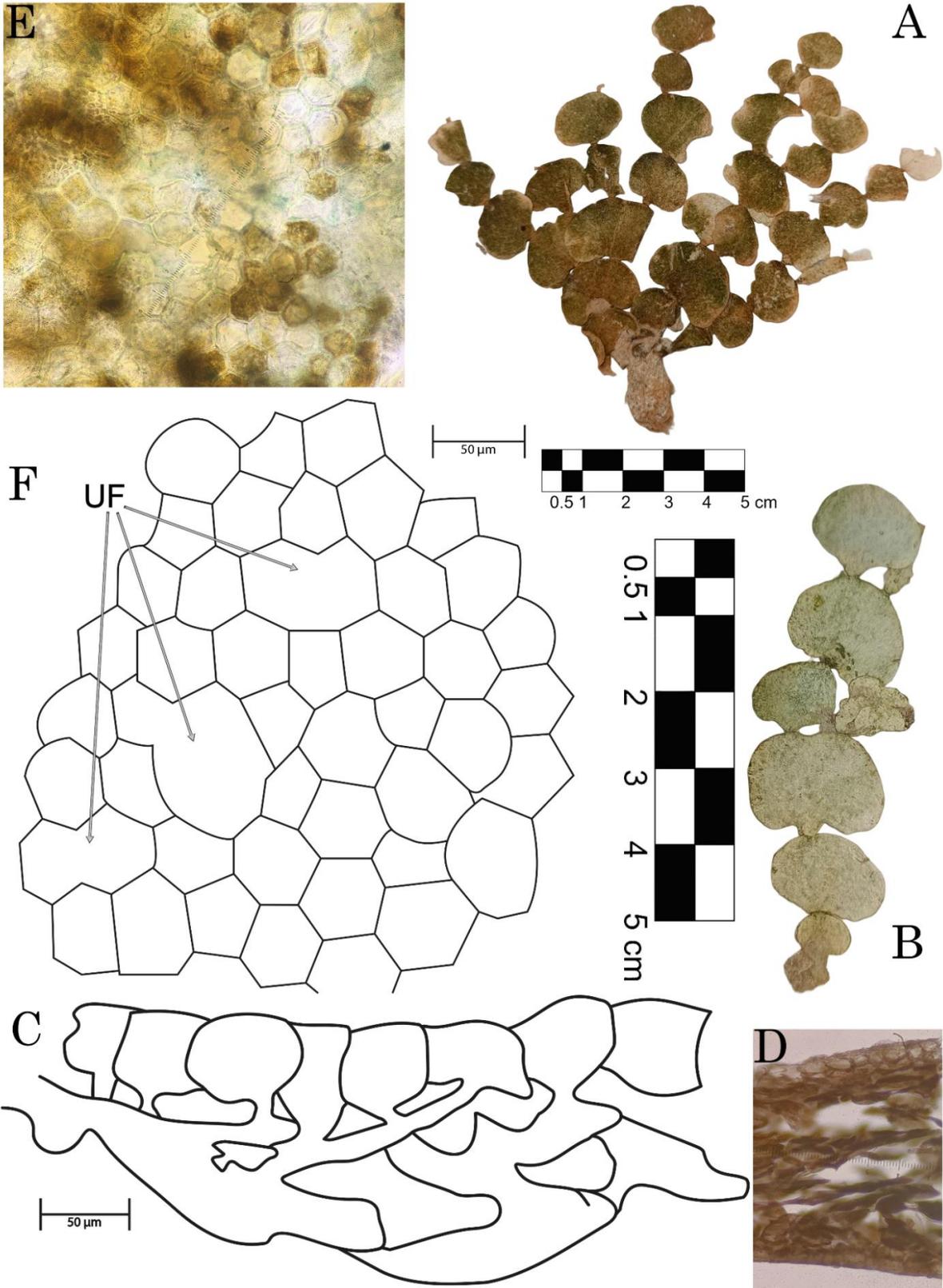


Lámina 4

Halimeda tuna: A) y B) Ejemplar herborizado, C) y D) Vista superficial de los utrículos, E) y F) Vista lateral de los utrículos

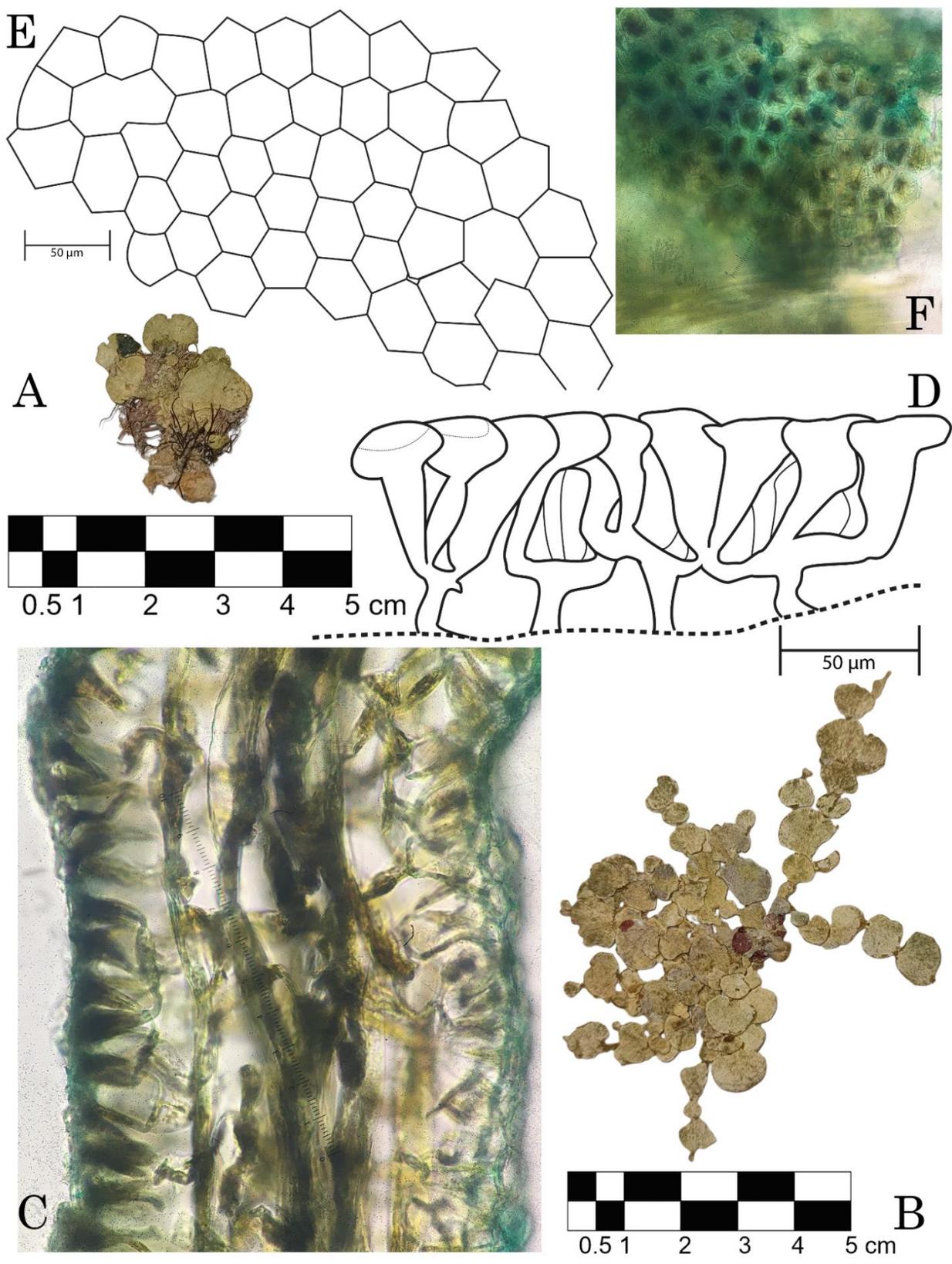


Lámina 5

Halimeda tuna sp 2: A) Ejemplar herborizado, B) y C) Vista superficial de los utrículos con espina central (EC), D), E) y F) Vista lateral de los utrículos

