



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Caracterización taxonómica de *Ralfsia expansa* y *R. hancockii*  
(Ralfsiaceae, Phaeophyta) basada en evidencias morfológicas y  
moleculares

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(SISTEMÁTICA)

P R E S E N T A

MARÍA LUISA NÚÑEZ RESENDIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DANIEL LEÓN ÁLVAREZ

COMITÉ TUTOR: DRA. DENÍ CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS

DR. ABEL SENTÍES GRANADOS

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2012



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.





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias

Caracterización taxonómica de *Ralfsia expansa* y *R. hancockii*  
(Ralfsiaceae, Phaeophyta) basada en evidencias morfológicas y  
moleculares

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(SISTEMÁTICA)

P R E S E N T A

MARÍA LUISA NÚÑEZ RESENDIZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DANIEL LEÓN ÁLVAREZ

COMITÉ TUTOR: DRA. DENÍ CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS

DR. ABEL SENTÍES GRANADOS

MÉXICO, D.F.

AGOSTO, 2012



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/300/12

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 16 de abril de 2012 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (SISTEMÁTICA) del (la) alumno (a) NUÑEZ RESENDIZ MARÍA LUISA con número de cuenta 300174074 con la tesis titulada "Caracterización taxonómica de *Ralfsia expansa* y *R. hancockii* (Ralfsiaceae, Phaeophyta) basada en evidencias morfológicas y moleculares.", realizada bajo la dirección del (la) DR. DANIEL LEÓN ÁLVAREZ:

Presidente: DRA. JHOANA DÍAZ LARREA  
Vocal: DRA. MARÍA EDITH PONCE MÁRQUEZ  
Secretario: DRA. DENÍ CLAUDIA RODRÍGUEZ VARGAS  
Suplente: DRA. NORMA ANGÉLICA LÓPEZ GÓMEZ  
Suplente: DR. ABEL SENTÍES GRANADOS

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 15 de junio de 2012

*M. del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa



MCAA/MJFM/ASR/mnm\*

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue subsidiado por los proyectos PAPIIT “Taxonomía de *Ralfsia* (Phaeophyceae) y *Gymnogongrus* (Rhodophyceae) de México” (No. de proyecto IN215108) y “Taxonomía de *Stragularia* (Phaeophyceae) y *Ahnfeltiopsis* (Rhodophyceae) de México (No. de proyecto IN229711).

Su realización fue posible por el apoyo económico como becaria, brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). No. de becario 239902.

El trabajo de investigación fue dirigido puntual y muy atentamente por el comité tutor, integrado por:

Dr. Daniel León Álvarez (Tutor principal)

Dra. Dení Claudia Rodríguez Vargas (Miembro del Comité tutor)

Dr. Abel Sentíes Granados (Miembro del Comité tutor)

Dra. María Edith Ponce Márquez (Miembro del Jurado)

Dra. Jhoana Díaz Larrea (Miembro del Jurado)

El material biológico, fotografías de campo y el equipo de microscopía empleado en la investigación, pertenece a la Sección de Algas del Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Las técnicas histológicas se llevaron a cabo con la infraestructura del Taller de Protistas y Algas de la Facultad de Ciencias, UNAM. Las técnicas moleculares se llevaron a cabo con la infraestructura del Taller de Procariontes de la Facultad de Ciencias, UNAM, asesoradas y supervisadas por la Dra. María Edith Ponce Márquez y la M. en C. Fabiola Ramírez Corona.

Las secuencias moleculares fueron enviadas al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología con la M. en C. Laura Márquez Valdelamar.

Los cortes histológicos se llevaron a cabo con la infraestructura del Taller de Plantas I de la Facultad de Ciencias, UNAM, asesorados por la M. en C. Ma. de Lourdes López Curto.

Las fotografías de microscopía fueron tomadas con el apoyo de la Dra. Hilda Patricia León Tejera y la M. en C. María Laura González Resendiz.

Los análisis filogenéticos fueron realizados con la infraestructura del Laboratorio de Macroalgas de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I) con el apoyo de la Dra. Jhoana Díaz Larrea y el M. en C. Jorge Gregorio Lozano Orozco.

*Con todo el cariño y amor por las personas que han estado conmigo siempre.*

*Mis padres: Leonor Resendiz Dorantes, José Manuel Núñez Sánchez y Fernando Núñez Sánchez.*

*Mis hermanas: Guadalupe C. Núñez Resendiz*

*Rosa María Núñez Resendiz*

*Martha P. Núñez Resendiz*

*Mis recuerdos y todo el amor para mi gordito que aunque físicamente no está conmigo sigue acompañándome en cada paso.*

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUCCIÓN.....	10
2 ANTECEDENTES.....	14
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
4 HIPÓTESIS.....	19
5 OBJETIVOS.....	20
6 ZONA DE ESTUDIO.....	21
7 ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....	23
8 RESULTADOS.....	32
9 DISCUSIÓN.....	50
10 CONCLUSIONES.....	59
11 PERSPECTIVAS.....	61
12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62



**LISTA DE FIGURAS Y TABLAS**

Figura 1.....	21
Figura 2.....	27
Figura 3.....	29
Figura 4.....	34
Figura 5.....	35
Figura 6.....	36
Figura 7.....	37
Figura 8.....	38
Figura 9.....	39
Figura 10.....	40
Figura 11.....	41
Figura 12.....	47
Figura 13.....	49
Tabla 1.....	16
Tabla 2.....	22
Tabla 3.....	24
Tabla 4.....	28
Tabla 5.....	30
Tabla 6.....	31
Tabla 7.....	32
Tabla 8.....	33
Tabla 9.....	42
Tabla 10.....	45

## RESUMEN

*Ralfsia expansa* (J. Agardh) J. Agardh y *R. hancockii* E.Y. Dawson forman un complejo morfológico por ser prácticamente idénticas. Algunos autores dedicados al estudio del género las distinguieron entre sí porque *R. expansa* presentaba una simetría predominantemente bilateral al corte longitudinal radial y unangios pedicelados por una célula. En contraste, *R. hancockii* presentaba una simetría predominantemente unilateral y unangios pedicelados por tres a siete células. Sin embargo, el valor diagnóstico de dichas características continúa siendo motivo de controversia ya que el holotipo de *R. expansa* se encuentra en estado vegetativo.

A partir de estudios moleculares de la región *rbcL* del cloroplasto, *Ralfsia expansa* (como *Myrionema expansum* J. Agardh) ha sido transferida al género de reciente creación, *Neoralfsia* P.-E.Lim & H.Kawai, como su basónimo. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos en el presente estudio, a partir del análisis morfológico y de secuencias moleculares de *rbcL* para ambas especies de la localidad tipo, han demostrado que son diferentes entre sí y diferentes de *Neoralfsia expansa*.

Bajo la evidencia molecular, consideramos que tanto la simetría como el número de células en el pedicelo de los unangios no son un carácter diagnóstico para delimitar a *Ralfsia expansa* y *R. hancockii*. Sin embargo, el análisis de la evidencia morfológica, ha mostrado que ambas especies son diferentes en el diámetro de los filamentos vegetativos. La primera, presenta filamentos medulares de casi el triple de diámetro de los filamentos corticales, mientras que la segunda presenta filamentos medulares de casi el doble del diámetro de los filamentos corticales.

La distribución de *Ralfsia hancockii* en México, está restringida al Golfo de California, mientras que bajo el epíteto de *R. expansa* (J. Agardh) J. Agardh se ha registrado a más de una especie en el Atlántico mexicano, cuya única diferencia morfológica es la simetría de los filamentos vegetativos y la forma de crecimiento en campo, alguna de las cuales podría estar relacionada con *R. hancockii* del Pacífico de México. Consecuentemente, *R. expansa* no es el basónimo del género *Neoralfsia*, y además, continúa siendo una especie válida en el género *Ralfsia*, por lo que sugerimos retipificar a *Neoralfsia*.

## ABSTRACT

*Ralfsia expansa* (J. Agardh) J. Agardh and *R. hancockii* E.Y. Dawson form a morphological complex for being practically identical. Some authors devoted to the study of genus differences between them because *R. expansa* had a predominantly bilateral symmetry radial and longitudinal unangios stalked by a cell. In contrast, *R. hancockii* had a predominantly unilateral symmetry unangios stalked for three to seven cells. However, the diagnostic value of these features continues to cause controversy as the holotype of *R. expansa* is in a vegetative state.

From molecular studies of the chloroplast *rbcl* region, *Ralfsia expansa* (J. Agardh as *Myrionema expansum*) has been transferred to the newly created genus, P.-E.Lim *Neoralfsia* & H.Kawai as its basionym. However, our results obtained in this study, based on analysis of morphological and molecular *rbcl* sequences for both species from the type locality, have been shown to be different and different *Neoralfsia expansa*.

Under molecular evidence, we believe that both symmetry as the number of cells in the pedicel of unangios are not a diagnostic character for delimiting *Ralfsia expansa* and *R. hancockii*. However, the analysis of morphological evidence have shown that both species are different in the filament diameter vegetative. The first medullar filaments has almost three times the diameter of the filaments cortical, while the second medullar filaments has almost twice the diameter of the filaments cortices.

*Ralfsia hancockii* distribution in Mexico is restricted to the Gulf of California, while under the epithet of *R. expansa* (J. Agardh) J. Agardh has registered more than one species in the Mexican Atlantic, the only difference is the morphological symmetry of the vegetative filaments and the growth form in the field, some of which may be related to *R. hancockii* Pacific Mexico. Consequently, *R. expansa* is not the basionym *Neoralfsia*, and also remains a valid species in the genus *Ralfsia*, so we suggest retipificar to *Neoralfsia*.

## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Ralfsia* Berkeley in J.E.Smith & Sowerby (Ralfsiaceae Farlow) pertenece al orden Ralfsiales Nakamura (Phaeophyceae) que cuenta con cinco familias: Lithodermataceae Hauck, Mesosporaceae J.Tanaka & Chihara, Nemodermataceae Feldmann, Neoralfsiaceae Lim & Kawai y Ralfsiaceae.

La familia Ralfsiaceae está integrada por aproximadamente 6 géneros (*Basispora*, *Hapalospongidion*, *Lithoderma*, *Petroderma*, *Pseudolithoderma* y *Ralfsia*), de amplia distribución mundial. A las especies se les encuentra principalmente en el intermareal rocoso, en una gran variedad de condiciones ambientales y son, junto con las algas rojas costrosas, las más abundantes en el litoral mexicano (León-Álvarez *et al.* 1993).

Desde la creación del género *Ralfsia* al presente, se han descrito 38 especies de las cuales 18 son, en la actualidad, nombres taxonómicamente válidos (Guiry & Guiry, 2011).

Las principales características que definen al género son: talos costrosos, orbiculares o irregulares, con márgenes nítidos, colores que van desde el café claro al oscuro casi negro, adheridos al sustrato en la porción basal (total o parcialmente) por rizoides o filamentos postígenos (Joly 1967, León-Álvarez 1996, Womersley 1987). En las primeras etapas de su desarrollo se caracterizan por formar un disco basal parenquimatoso, el cual posteriormente se vuelve pseudoarenquimatoso con filamentos postígenos erectos poco o muy fusionados entre sí. Presentan médula y corteza diferenciada por la orientación y el diámetro de las células de los filamentos postígenos. Los filamentos que se orientan de manera erecta y curvada por las repetidas ramificaciones, conforman a la corteza y los que se orientan de manera postrada conforman a la médula (León-Álvarez 1996). Cloroplastos parietales, laminares, sin pirenoide, uno en cada una de las células de los filamentos corticales (León-Álvarez 1996, Silva *et al.* 1996, Womersley 1987). Soros claramente distinguibles en la superficie del talo que contienen a las estructuras reproductoras. Unangios rodeados por paráfisis, insertos terminal o lateralmente en los filamentos reproductivos. Plurangios insertos subterminalmente, uno por filamento reproductor, debajo de una o varias células, por lo que puede considerarse que están insertos de manera intercalar (León-Álvarez 1996, León-Álvarez & Norris 2005). A su vez, las especies de *Ralfsia* pueden ser divididas también en dos grupos dependiendo si presentan o no una corteza multiestratificada, demarcada claramente de la médula por ser éstas células de mayor tamaño y diferente forma que las células corticales (León-Álvarez 1996, Tanaka & Chihara 1980 a, b).

En México, han sido registradas 9 especies principalmente en el Pacífico mexicano: *Ralfsia expansa* (J. Agardh) J. Agardh, *R. fungiformis* (Gunnerus) Setchell & N.L. Gardner, *R. hancockii* E.Y. Dawson, *R. hesperia* Setchell & N.L. Gardner, *R. integra* Hollenberg, *R. longicellularis* Perestenko, *R. occidentalis* Hollenberg, *R. pacifica* Hollenberg y *R. verrucosa* (Areschoug) Areschoug (González *et al.* 1996, Ortega *et al.* 2001, Pedroche *et al.* 2005). Actualmente se consideran taxonómicamente válidas sólo 7 especies, *R. expansa* es sinónimo de *Neoralfsia expansa* (J. Agardh) P.-E. Lim & H. Kawai ex Cormaci & G. Furnari y *R. occidentalis* sinónimo de *R. pacifica* (Guiry & Guiry, 2012).

La delimitación morfológica de las especies de *Ralfsia*, con énfasis en las especies mexicanas, ha sido complicada ya que son muy similares entre sí. En algunas especies ni siquiera se conoce el ciclo de vida completo (Ej. *R. hancockii*). Los caracteres vegetativos que han sido ponderados para delimitar especies son: forma de las motas en el crecimiento, corteza multiestratificada (clara delimitación entre médula y corteza por tamaño y forma de las células), simetría en los filamentos vegetativos, dimensiones celulares y presencia de rizoides (Fletcher 1987, León-Álvarez 1996, Nelson 1982). Los caracteres reproductivos ponderados son: dimensión de los unangios, inserción de los unangios en el filamento reproductivo, número de células en el pedicelo del unangio, paráfisis, tamaño de la paráfisis y el número de células terminales estériles en los plurangios (Fletcher 1987, León-Álvarez 1996, León-Álvarez & Norris 2005, Nelson 1982, Tanaka & Chihara 1982, Womersley 1987).

Siguiendo el criterio morfológico, la corteza multiestratificada separa a las especies mexicanas de *Ralfsia* en dos grupos como sigue: 1) Corteza no multiestratificada: *R. longicellularis*, *R. verrucosa*, *R. pacifica*, *R. occidentalis*, *R. integra* y 2) Corteza multiestratificada: *R. fungiformis*, *R. hesperia*, *R. hancockii*, *R. expansa* (León-Álvarez 1996).

En las especies del primer grupo, León-Álvarez (1996) detectó el complejo formado por *Ralfsia verrucosa*-*R. integra*, especies morfológicamente similares excepto en el tamaño de la paráfisis, y el complejo *R. verrucosa*-*R. pacífica*, especies morfológicamente similares excepto en la simetría variable y plurangios parcialmente biseriados que presenta la primera especie, en contraste con la simetría bilateral y plurangios uniseriados que presenta la segunda especie, diferencia morfológica observada también por Setchell y Gardner (1925).

León-Álvarez (1996) detectó además, entre las especies del segundo grupo, un complejo formado por *R. expansa* y *R. hancockii*, especies morfológicamente similares, excepto por la simetría y diámetro de los filamentos vegetativos y el número de células en el pedicelo de los unangios, caracteres descritos también en las obras de Børgesen 1912, Dawson

1944, León-Álvarez & González-González 1995, 2003, Tanaka & Chihara 1980 a, b). Sin embargo, el valor diagnóstico de los caracteres propuestos para la delimitación de las especies continúa en controversia ya que desde la descripción original de las especies en conflicto, dichos caracteres fueron omitidos, por lo que la interpretación de los mismos queda a criterio de los diferentes autores dedicados a su estudio.

Parte de la problemática interespecífica de *Ralfsia*, es la falta de trabajos que aborden al grupo, pues generalmente forman parte de trabajos florísticos más generales. Si bien es cierto que las especies son muy abundantes en los litorales de todo el mundo, en el campo suele confundírseles con el sustrato en que crecen, pues se extienden completamente sobre él y adquieren su forma y relieve. También crecen en ambientes poco accesibles y de difícil maniobra para su recolecta. Otro aspecto importante es el estado fenológico en el que se recolectan los especímenes pues muchos de los caracteres delimitatorios son de tipo reproductivo y si éstos se encuentran en estado vegetativo, resulta complicada la identificación a nivel específico. En consecuencia hay un escaso conocimiento sobre la variación fenotípica de las especies de *Ralfsia*, y con ello una sistemática compleja, controvertida e inestable, donde la morfología por sí sola ya no es suficiente para resolver dicha problemática.

León-Álvarez (1996), propuso como una posible solución a los complejos morfológicos previamente mencionados, por un lado la observación de las características morfológicas propuestas directamente en el tipo de cada especie, y por otra parte, la aplicación de técnicas moleculares a especímenes que exhiban las características del ejemplar tipo de cada especie y los caracteres morfológicos que han sido propuestos para delimitarlas.

Las técnicas moleculares son una herramienta ampliamente usada en la actualidad en los principales grupos de algas (pardas, rojas o verdes), que ha dado buen resultado en el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas entre los taxones a diferentes niveles jerárquicos, a través de la comparación de secuencias homólogas (Bacci, 2005), ya que ofrece una fuente ilimitada de caracteres, en contraste con la morfología, que posibiliten generar hipótesis filogenéticas para la resolución de problemáticas taxonómicas planteadas (Liu *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2007; Hwang *et al.*, 2009; Buchanan *et al.*, 2010; Vis & Oliveira, 2010; Krienitz *et al.*, 2011).

Uno de los marcadores moleculares comúnmente empleado para la resolución de problemáticas intergenéricas o interespecíficas en las algas pardas, es el gen *rbcl* que codifica para la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa, subunidad larga<sup>1)</sup>. En

1) Proteína oligómera formada por 16 polipéptidos que son de dos tipos, uno grande (subunidad L) y otro pequeño (subunidad S). Esta enzima tiene un doble comportamiento que justifica su nombre, catalizando dos procesos opuestos: 1) la fijación del CO<sub>2</sub> a una forma orgánica y 2) la fotorrespiración, en la que actúa como oxigenasa del mismo sustrato.

estudios recientes con algas pardas, han sido probados marcadores que han arrojado mejores resultados a nivel supraespecífico, que *rbcl*, como son los genes mitocondriales *cox1* (codifica para la citocromo c oxidasa, subunidad I) y *cox3* (codifica para la citocromo c oxidasa, subunidad III) (Kucera & Saunders 2008, Ni-Ni-Win 2011, McDevit & Saunders 2009, Matio & Payri 2010). Los estudios basados en el gen *rbcl*, han permitido validar el orden Ralfsiales, y la reubicación de ciertos taxa con estatus taxonómico incierto, además de la propuesta de la nueva familia Neoralfsiaseae, el nuevo género *Neoralfsia* y la nueva combinación *Neoralfsia expansa* (Lim *et al.* 2007).

Sin embargo, en el caso de las especies del orden Ralfsiales sólo ha sido trabajado el gen *rbcl* del ADN del cloroplasto. Ante la problemática morfológica descrita entre las especies mexicanas de *Ralfsia* y los métodos moleculares que han contribuido a la resolución de problemáticas similares en otros grupos de algas, en el presente estudio hemos abordado la problemática que existe en el complejo *R. expansa* y *R. hancockii* con el propósito de caracterizar a ambas especies a partir de la combinación de caracteres morfológicos y moleculares, y proponer hipótesis filogenéticas con la combinación de ambos caracteres.

Los resultados generados en el presente estudio, nos han permitido resolver las siguientes interrogantes sobre estas dos especies ¿Son *Ralfsia expansa* y *R. hancockii* diferentes especies? ¿Los caracteres morfológicos ponderados como diagnósticos entre ambas especies son realmente delimitatorios? ¿El criterio molecular resuelve el complejo? ¿El gen *rbcl* tiene el nivel de resolución necesario para separar a las especies de *Ralfsia*? ¿*Ralfsia expansa* y *R. hancockii* son especies taxonómicamente válidas en el género *Ralfsia*?

## 2. ANTECEDENTES

El orden Ralfsiales fue creado por Nakamura en 1972, en él agrupó a los géneros cuyas especies presentan un solo cloroplasto sin pirenoide por célula, una historia de vida isomórfica y un desarrollo temprano del talo. Con base en la posición de las estructuras reproductoras en el filamento vegetativo, dividió al orden en tres familias: 1) Lithodermataceae Hawk (con uniloculares y pluriloculares terminales), Nemodermataceae Feldman (con uniloculares y pluriloculares laterales) y Ralfsiaceae Farlow (con uniloculares laterales y pluriloculares intercalares). Sin embargo, en su publicación, Nakamura deja implícita la posibilidad de reunir a las tres familias como una sola en la familia Ralfsiaceae.

Posteriormente, Tanaka & Chihara (1980 a,b,c y 1981 a,b,c) aceptan el orden Ralfsiales e incorporan una nueva familia, Mesosporaceae J.Tanaka & Chihara, que incluye a los géneros *Mesospora* Weber-van Bosse, *Hapalospongidion* De A. Saunders y *Basispora* D. M. John & G. W. Lawson. Dicha propuesta fue aceptada también por Silva & Reviere (2000).

Nelson (1982) hace una revisión del orden Ralfsiales y lo rechaza porque la propuesta del orden hecha por Nakamura (1972) no cubría con todas las reglas del código internacional de nomenclatura botánica, es decir, no contenía una descripción o diagnóstico en latín. Así mismo, propone reunir a todas las familias del orden en una única familia denominada Ralfsiaceae y ubicarla dentro del orden Ectocarpales Kawai (1989). Su propuesta se basa en que *Gabia saxicola* Okamura *et. Yamada* tiene un estado gametofítico costroso en su historia de vida, por lo que reclasifica a las especies de *Ralfsia* en *Heteroralfsia saxicola* (Okamura *et. Yamada*) Kawai, lo que da como resultado que dentro del orden Ralfsiales se incluyan géneros de algas pardas costrosas que presentan ciclos de vida isomórficos y heteromórficos.

León-Álvarez y Norris (2005), en acuerdo con la propuesta del orden de Nakamura (1972), reconocen como un carácter crítico a la posición de las estructuras reproductoras en el talo de las costras, no sólo para diferenciar a las familias sino también para separar géneros y especies. Por lo anterior y por las inconsistencias observadas en el uso de los caracteres por los diferentes autores, León-Álvarez y Norris (2005), proponen una estandarización del uso de la terminología e interpretación de los caracteres entre los diferentes grupos del orden Ralfsiales. Asimismo proporcionan tablas comparativas donde describen las estructuras reproductoras e ilustran su posición para cada grupo.

Lim *et. al.* (2007) aceptan al orden Ralfsiales y reexaminan la validez de su clasificación dentro de las Phaeophyceae, elaborando una filogenia de los representantes (de Asia y Europa) del orden a partir de secuencias de la región *rbcL* del ADN del cloroplasto. A partir



de sus resultados describen una nueva familia, Neoralfsiaceae Lim & Kawai, la cual incorporan también al orden Ralfsiales.

Actualmente el orden Ralfsiales es considerado por los diferentes autores como un orden válido en la clase Phaeophyceae, integrado por cinco familias.

### 2.1 El género *Ralfsia* Berkeley

Berkeley (Smith & Sowerby, 1843) describió el género *Ralfsia* a partir de la especie tipo del género, *R. deusta* (C. Agardh) Berkeley, tomando como basónimo a *Zonaria deusta* C. Agardh descrita por Agardh en 1817. Al describir al basónimo, Agardh (1817) propuso como sinónimos a *Fucus Oeder* y *Fucus fungiformis* Gunnerus. Este último, además de ser un nombre legítimo, está incluido en la circunscripción de Agardh (1817), por lo que en realidad es la especie tipo del género *Ralfsia*. Setchell y Gardner (1924), hicieron el cambio de *F. fungiformis* a *Ralfsia fungiformis* (Gunnerus) Setchell & N.L.Gardner y en 1925 excluyeron de la sinonimia a *R. deusta* de Berkeley. Actualmente *R. fungiformis* es el nombre comúnmente aceptado para la especie tipo de *Ralfsia* (Guiry & Guiry 2011).

Batters (1890 y 1902) y De Toni (1895) dividieron al género *Ralfsia* en *Eu-Ralfsia* Batters y *Stragularia* (Steömf). El primero presenta filamentos vegetativos dispuestos ascendentemente y curvados respecto de la capa basal y presenta soros prominentes. El segundo presenta filamentos vegetativos dispuestos vertical o transversalmente respecto de la capa basal y soros en manchas (Batters 1890). Esta clasificación ha sido aceptada por Tanaka & Chihara (1980 a, b, c, 1981 a, b, c), León-Álvarez (1996, 2005) y León-Álvarez & González-González (1995, 2003). Tanaka & Chihara (1980 a y b) separan *Eu-Ralfsia* en dos grupos: 1) los que presentan corteza multiestratificada (a partir del tamaño celular) y médula y 2) aquellos en los que no se puede diferenciar la corteza de la médula.

Este género tiene gran importancia tanto por su amplia distribución en las costas mexicanas y en todo el mundo, como por la controversia que ha generado la delimitación de sus especies.

Estudios moleculares recientes han sugerido que algunas especies de *Ralfsia* podrían ser en realidad la fase costrosa descrita en el ciclo de vida de otras especies, por ejemplo Buchanan *et al.* (2010) sugieren que *R. verrucosa* constituye la fase costrosa en el ciclo de vida de *Colpomenia bullosa* (D. A. Saunders) Yamada.

En México, el género *Ralfsia* era prácticamente desconocido hasta principios de los años 90's. León-Álvarez *et al.* (1993) realizaron una primera evaluación de estado de conocimiento de las algas costrosas mexicanas y en sus resultados obtienen una lista de las especies de *Ralfsia* presentes, sus antecedentes y su estatus nomenclatural.

Con base en los caracteres morfológicos de las especies mexicanas del género *Ralfsia*, León-Álvarez (1996) describe nueve especies distribuidas principalmente en las costas del Pacífico tropical. En las costas del Golfo sólo encuentra a *R. expansa* la cual tiene una amplia distribución. De los resultados de su estudio surge la problemática del complejo *R. expansa* y *R. hancockii*, especies morfológicamente muy similares entre sí.

## 2.2 *Ralfsia expansa sensu Børgesen* y *Ralfsia hancockii* Dawson

*Ralfsia expansa* y *R. hancockii* son las especies del género más abundantes y más ampliamente distribuidas en los litorales mexicanos (Tabla 1). La primera ha sido registrada en el Pacífico tropical mexicano y Golfo de México y la segunda en el Pacífico tropical mexicano y Golfo de California.

Tabla 1. Citas de autores que registran *Ralfsia expansa* y *R. hancockii* en México.

	Pacífico tropical mexicano (PTM)	Golfo de México (GM)	Golfo de California
<i>Ralfsia expansa</i>	Kützing 1849, Hervey 1852, Murray 1889, León-Álvarez <i>et. al.</i> 1993, León-Álvarez & González-González, 2003.	Agardh 1848, Taylor 1960, Earle 1969, Garza-Barrientos 1976, Huerta & Garza-Barrientos 1980, Sánchez 1980, Treviño 1986, Huerta <i>et. al.</i> 1987, Valenzuela 1987, Zavaleta 1991, León-Álvarez & González-González 2003 y León-Álvarez 2005.	
<i>Ralfsia hancockii</i>	León-Álvarez <i>et. al.</i> 1993, León-Álvarez & González-González 1995, 2003.		Dawson 1944, 1953, 1954, Norris 1975.

*Ralfsia expansa* fue descrita originalmente por Agardh (1847) como *Myrionema expansum* J. Agardh (1848) a partir de especímenes<sup>2</sup> estériles recolectados por Liebmann en una localidad inespecífica de la costa de Veracruz, México.

Børgesen (1912) hizo observaciones del tipo de Agardh con el que compara a sus especímenes recolectados en las islas danesas y posteriormente los identifica como *Ralfsia expansa* y redescubre a la especie incluyendo los caracteres reproductivos, unangios con pedicelos unicelulares, que se encontraban en sus especímenes. Esta propuesta fue aceptada por los diferentes autores que la registran (Weber van Bosse 1913, Joly 1965, Earle 1969, Taylor 1960, Schneter 1976, Lawson & John 1982).

2) Especímen (es). Conjunto de individuos que se toman como muestra y que se consideran representativos de los caracteres de la población a la que pertenecen.

Tanaka & Chihara (1980a,b,c, 1981a,b,c) en su revisión de Ralfsiales aceptan esta propuesta, y a partir de especímenes recolectados en islas de Japón y Tahití, en los que observan unangios con pedicelos de 3-6 células, consideran a la sola presencia del pedicelo, sin importar el número de células, como un carácter diagnóstico para delimitar *Ralfsia expansa* de otras especies del género. Sin embargo, en su revisión, Tanaka & Chihara (1980a,b,c, 1981a,b,c) no mencionaron a la especie *R. hancockii* que describió Dawson (1944) a partir de especímenes recolectados en San José del Cabo, B.C., México, la cual presenta unangios pedicelados con 3 a 6 células.

A partir de la observación de especímenes provenientes de Veracruz, Tahití y el Pacífico mexicano, León-Álvarez (1996) establece que hay una clara delimitación entre *Ralfsia expansa* y *R. hancockii*, pues tanto el espécimen de Tahití como los especímenes provenientes del Pacífico mexicano, son morfológicamente idénticos a lo que Dawson (1944) describió como *R. hancockii*: presencia de 3-6 células (raramente 2 y nunca de 0-1) en el pedicelo de los unangios y diferentes de los especímenes de Veracruz. Años más tarde hace observaciones al tipo de *R. expansa* de Agardh y caracteriza morfológicamente a *R. expansa* con las observaciones del tipo y de especímenes recolectados en las costas de Veracruz, México (León-Álvarez, 2005).

Con base en este criterio León-Álvarez & González-González (1995, 2003) afirman que en México se encuentran ambas especies. En el lado del Pacífico *Ralfsia hancockii* Dawson (1944) y en el Golfo de México *R. expansa sensu* Børgesen (1912).

Lim *et al.* (2007) estudiaron los caracteres moleculares a partir de las secuencias de la región *rbcL* de especímenes provenientes de Malasia (Johor, Desaru) y Japón (Okinawa, Isla Ishigaki, Hamasaki, Hyogo, Igumi) con 3-6 células en el pedicelo del unangio a los que identificaron como *Ralfsia expansa*. Con base en sus resultados separan a ésta especie de la familia Ralfsiaceae y la trasladan como *Neoralfsia expansa* (J. Agardh) P.-E. Lim & H. Kawai ex Kraft comb. nov. en el género *Neoralfsia* gen. nov. P.-E. Lim & H. Kawai dentro de Neoralfsiaceae fam. nov.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de las características morfológicas diagnósticas descritas para *Ralfsia expansa* y *R. hancockii*, no es posible delimitarlas entre sí, pues el peso diferente que cada autor le asigna a dichas características hace que persista una situación controversial.

A pesar de que molecularmente *Ralfsia expansa* ha sido transferida a un género distinto, en su análisis molecular, Lim *et al.* (2007) no consideraron especímenes de *Ralfsia expansa* provenientes de la localidad tipo en Veracruz (caracterizados por presentar unangios sésiles o con pedicelos unicelulares), tampoco incluyeron especímenes identificados como *R. hancockii* (con unangios pedicelados por 3-6 células). Derivado de ello, no se tiene certeza de que los especímenes japoneses a los que se están refiriendo como *Neoralfsia expansa*, se traten de lo mismo que los especímenes mexicanos que reconocemos como *R. expansa sensu* Børgesen. Por lo tanto, tampoco se tiene la certeza de que éstos últimos, sean diferentes o iguales de los especímenes de *R. hancockii* Dawson. En consecuencia, el problema de delimitación entre ambas especies persiste.

#### 4. HIPÓTESIS

Dado que con el uso de la evidencia morfológica se considera que *Ralfsia expansa* y *R. hancocki* son la misma especie, el estudio de los caracteres moleculares hará posible caracterizar *R. expansa* y *R. hancocki* como especies diferentes.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general:

- Caracterizar morfológica y molecularmente a *Ralfsia expansa* y *R. hancockii*.

### 5.2 Objetivos particulares:

- Describir las características morfológicas externas e internas de *Ralfsia expansa* y *R. hancockii*.
- Obtener las secuencias de ADN de la región *rbcL* del genoma del cloroplasto para *Ralfsia expansa* y *R. hancockii*.
- Proponer una hipótesis filogenética para la comparación, reubicación o validación de éstas especies en el Orden Ralfsiales.

## 6. ZONA DE ESTUDIO

El presente estudio se llevó a cabo en seis localidades mexicanas, dos en el Pacífico de Baja California (PBC), tres en el Pacífico tropical mexicano (PTM) y una en el Golfo de México (GM) (Tabla 2, Fig. 1). San José del Cabo, Baja California fue elegida por ser la localidad Tipo de *Ralfsia hancockii* y El Morro de la Mancha, Veracruz, como posible localidad tipo o cercana de *R. expansa*. El resto de las localidades fueron elegidas con el conocimiento previo de la presencia de estas especies (León-Álvarez 1996, León-Álvarez *et al.* 1993 y León-Álvarez & González-González 1995, 2003).

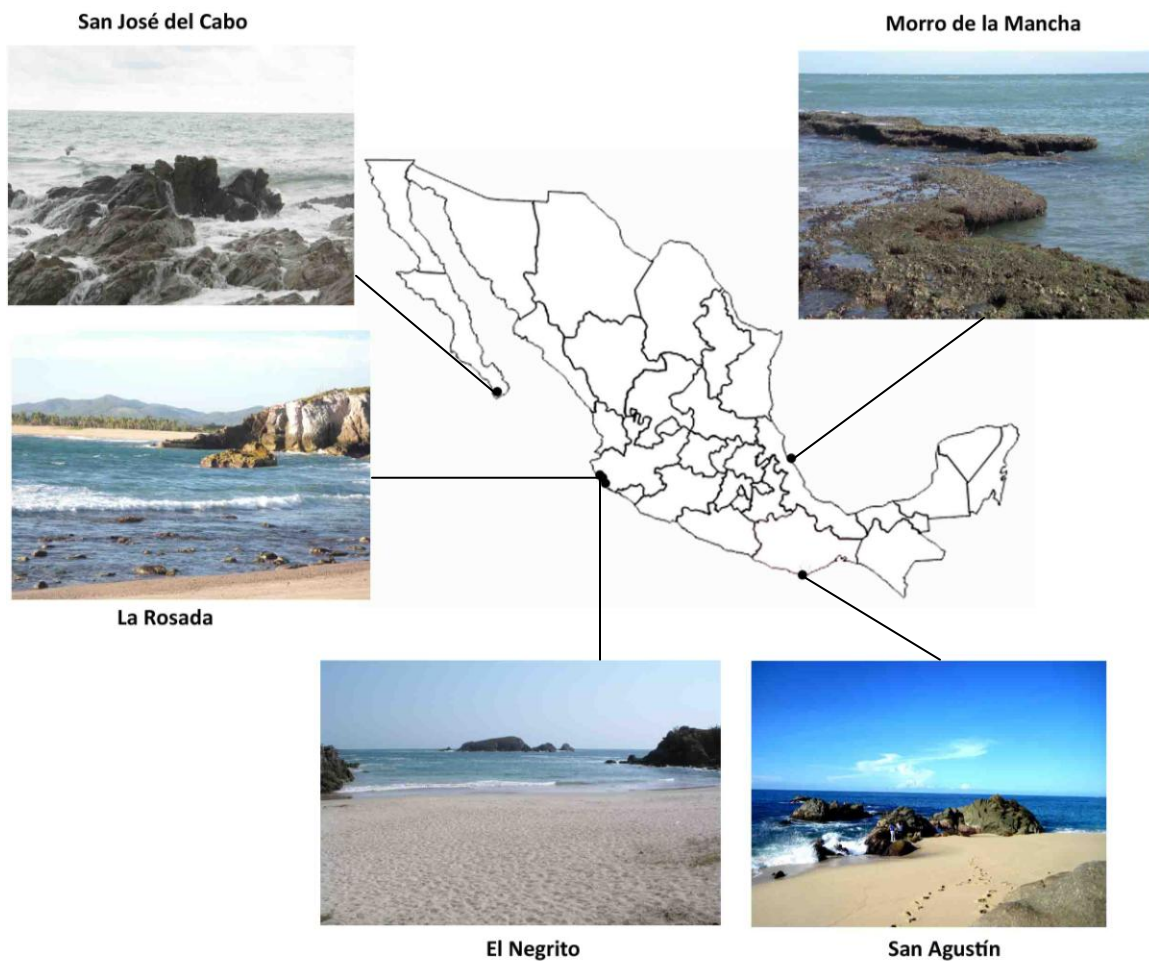


Fig. 1. Sitios de recolecta.

Tabla 2. Datos de localidades.

Localidad	Geoposición	Acceso	Fisiografía	Orientación	Clima
San José del Cabo, B.C.S. (Club Campestre)	N 23° 01' 04.0" W 109° 42' 56.9"	Campo del Golf "La Palmilla	Bloques rocosos de granito expuestos al oleaje.	Suroeste	Temperatura 34°C. Nubosidad.
San José del Cabo, B.C.S. (La Palmilla)	N 23° 03' 31.8" W 109 41' 23.3"		Escollera y bloques rocosos de granito expuestos directamente a la luz solar y oleaje. Bloques rocosos sumergidos en la bahía, expuestos al oleaje, siempre sumergidos.	Noreste	
La Rosada, Jalisco	N 19° 33' 21.6" W 105° 05' 16.6"	Carretera Federal #200 km 68	Peñasco, grandes bloques de roca y playa de cantos rodados.	Este-Oeste	Seco
El Negrito, Jalisco	N 19° 31' 36.5" W 105° 04' 55.00"	Carretera Federal #200 Desviación km 63	Acantilados con puntas rocosas irregulares.	Este-Oeste	Cálido-seco
San Agustín, Oaxaca	N 15° 41' 00.2" W 96° 14' 24.0"	Carretera Federal #200 km 294	Playa con arena de granito suelta y hundidisa. Grandes bloques rocosos de granito en la arena y expuestos al oleaje.	Suroeste	Nubosidad, poco viento y temperatura de 30°C.
Morro de la Mancha, Veracruz	N 19° 35' 22" W 96° 22' 43"	Carretera costera Villa Cardel-Nautla.	Puntas rocosas expuestas a manera de riscos y varios bloques rocosos formando una plataforma.	Noreste	Temperatura 30° C



## 7. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

La estrategia metodológica seguida en el presente estudio se dividió en trabajo de campo, trabajo de gabinete, trabajo de laboratorio y análisis de datos.

### 7.1 Trabajo de campo

El trabajo de campo se llevó a cabo en la zona litoral de las localidades trabajadas (Tabla 2, Fig. 1), siguiendo la estrategia siguiente:

#### 7.1.1 Recolecta de muestras

Con ayuda de un cincel y un mazo o una espátula, fueron desprendidas de las rocas costras pardas que pudieran tratarse de especímenes de *Ralfsia*. De cada roca se recolectaron de tres a más rocas en pedazos de piedra y fueron depositados en una bolsa de plástico con cierre hermético, previamente etiquetada con los datos del nombre de localidad, la clave del ambiente donde se recolectó, el nombre del recolector, la fecha de recolecta y el número de campo para esa muestra total. Posteriormente la muestra se dividió en tres.

#### 7.1.2 Notas de campo

En formatos preestablecidos, se tomaron los datos ambientales y fisiográficos de las localidades de recolecta, de los ambientes generales y de los ambientes particulares en los que fueron recolectados los especímenes. Concretamente se tomaron los datos morfológicos de campo para cada espécimen previo a ser recolectado. Con ayuda de un GPS se tomaron las coordenadas geográficas en cada localidad.

#### 7.1.3 Preservación de las muestras

Las muestras recolectadas fueron preservadas en tres medios diferentes: un espécimen fue preservado en sílica gel para el análisis molecular, otro espécimen fue preservado en formol para el análisis morfológico y otro espécimen fue preservado en papel secante para ser incorporado a la colección de algas del Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM como referencia.

### 7.2 Trabajo de gabinete

Las muestras recolectadas fueron incorporadas a la Colección de Algas del Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM. Estas fueron numeradas consecutivamente en los catálogos PTM (Pacífico Tropical Mexicano) o GM (Golfo de México) y depositadas en cajas de

cartón etiquetadas con los datos de localidad de recolecta, fecha y número de catálogo (Tabla 3). Una vez ubicadas en su estante correspondiente dentro de la colección, se capturaron en el Sistema de Información los datos de la expedición y los datos relacionados a las muestras que se tomaron en el campo para su disponibilidad.

Tabla 3. Referencias de las muestras recolectadas.

Especie	Localidad	Año	Mes	Día	Referencia de herbario	Referencia en campo	Referencias de preparaciones
<i>R. hancockii</i>	San José del Cabo (El Palmar), B.C.S	2009	09	30	PTM 9165	Rh1	1139-1142
	San José del Cabo (Club Campestre), B.C.S	2009	09	30	PTM 9167	Rh2	1132-1138
	La Rosada, Jalisco	2008	11	14	PTM 8982	R1	1148-1152
	San Agustín, Oaxaca	2009	11	04	PTM 9178	RhSA	1143-1147
<i>R. expansa</i>	Morro de la Mancha, Veracruz	2010	09	27	GM 635	R5	1174-1177
		2010	04	29	GM 651	ReLL	1170-1174
		2010	05	18	GM 649	Re	1153-1156
		2009	12	04	GM 650	Re2	1165-1169
<i>R. hesperia</i>	El Negrito	2008	11	12	PTM 8970	Rns	1157-1160
<i>Stragularia</i> sp.	San José del Cabo (Club Campestre)	2009	09	30	PTM 9166	St4	-
<i>Hapalospongidion</i> sp.	San Agustín	2009	11	04	PTM9185	Hpn	1161-1164

### 7.3 Trabajo de laboratorio

El trabajo de laboratorio se llevó a cabo en dos partes, una parte para el análisis morfológico y otra parte para el análisis molecular.

#### 7.3.1 Análisis morfológico

Bajo el microscopio estereoscópico fueron observadas a simple vista las muestras recolectadas con el propósito de identificar regiones en estados reproductivos.

Posteriormente fueron desprendidas porciones longitudinales radiales, de 1 a 2 cm de diámetro, de costra por cada espécimen recolectado (vegetativas o reproductivas).

### **7.3.1.1 Montaje en parafina.**

Para el montaje en parafina, se cortó de la costra un pedazo longitudinal radial de aproximadamente 1 cm de longitud x 0.5 cm de diámetro. El fijador fue removido de los trozos de muestra con agua corriente durante 5 minutos, posteriormente fueron sometidas a deshidratación con alcoholes siguiendo la siguiente gradación:

- Alcohol etílico 10%, 20%, 30% 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y 100% durante 30 minutos en cada concentración,
- alcohol-xilol (50% a 50%) durante 5 minutos y,
- xilol (100%) durante 5 minutos.

Posteriormente fueron transferidas a una estufa a 65°C para ser incluidas en parafina. La infiltración en parafina se llevó a cabo de la siguiente manera:

Solución xilol paraplast Plus:

- 2 xilol 1 parafina, durante 12 horas,
- 1 xilol 1 parafina durante 12 horas y,
- parafina pura durante 24 horas.

Finalmente fueron colocadas en un molde hecho con papel albanene e incluidas en parafina pura. Se dejó secar por 48 horas a temperatura ambiente y 12 horas en refrigeración.

### **7.3.1.2 Cortes con micrótopo de rotación manual**

En un micrótopo de rotación manual (Leyca), se hicieron cortes de 10 µm de grosor. Se montaron en un portaobjetos con la ayuda de un baño maria.

### **7.3.1.3 Tinción doble safranina (metilcelosolve)-verde rápido (metilcelosolve)**

Los cortes fueron desparafinados en la estufa a 60°C y removidos los excesos de parafina en alcoholes hasta alcohol al 96%. Posteriormente se tiñeron los cortes siguiendo una modificación de la técnica "tinción doble safranina (metilcelosolve)-verde rápido (metilcelosolve)" descrita en López-Curto *et al.* 2005, de la siguiente manera:

1. Tinción en safranina por 15 minutos.
2. Lavar el exceso de colorante con agua destilada (sobre el cubreobjetos no directo sobre el corte).
3. Deshidratar con etanol al 96% más ácido pícrico por 5 segundos.

4. Lavar inmediatamente con etanol al 96% más amoníaco (detiene la acción del ácido pícrico), no más de 10 segundos.
5. Deshidratar en etanol absoluto (100%) por 10 segundos.
6. Teñir con verde rápido por 10 segundos.
7. Lavar con aceite de clavo para secar el exceso de colorante.
8. Aclarar con una mezcla de aceite de clavo, xilol y etanol absoluto.
9. Aclarar con lavados de xilol.

Finalmente los cortes fueron montados con resina sintética.

### **7.3.2 Análisis molecular**

Para el análisis molecular, los especímenes fueron limpiados perfectamente de epífitas bajo un microscopio estereoscópico. Posteriormente fueron colocadas en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y guardadas a  $-86^{\circ}\text{C}$  en un ultracongelador.

#### **7.3.2.1 Extracción de ADN**

Se trituró una porción de 20-40 mg de la muestra en un mortero con Nitrógeno líquido y se colocaron en un nuevo Eppendorf de 1.5 ml. La extracción de ADN se realizó con el kit DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen, siguiendo la técnica del fabricante (Fig. 2). El ADN obtenido (2  $\mu\text{l}$  de buffer de carga + 10  $\mu\text{l}$  de ADN) se colocó en un gel de agarosa (0.8 gr de agarosa + 50 ml de EDTA al 5%) en una cámara de electroforesis con EDTA durante 30 minutos a 100 volts.

Posteriormente el ADN fue limpiado utilizando el kit DNeasy Blood and Tissue de Qiagen siguiendo la técnica del fabricante. Se guardó el ADN a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## EXTRACCIÓN DNA (Plant Mini-kid)

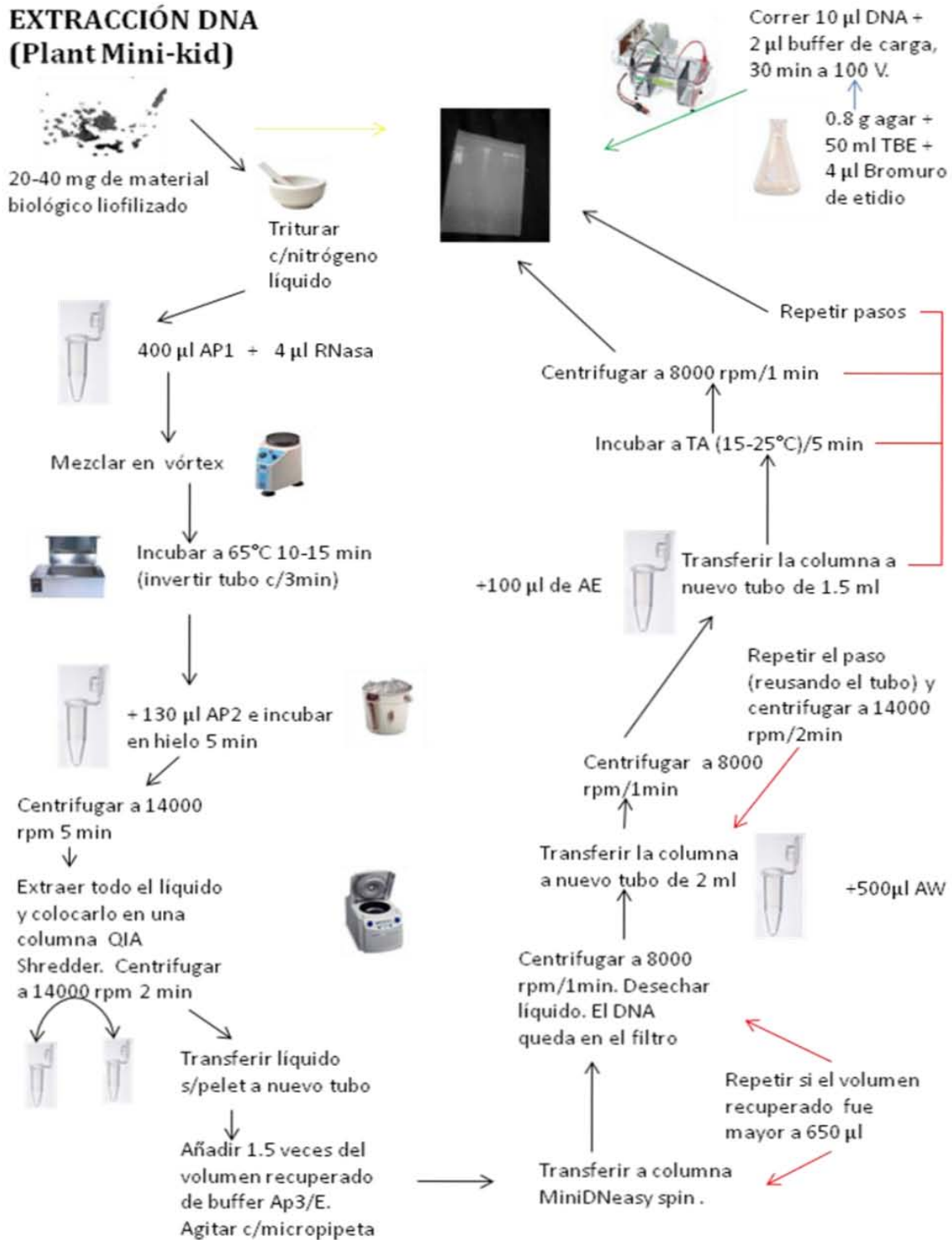


Fig. 2. Esquema del proceso de extracción de ADN descrito en el manual Plant Mini Kit de Qiagen.

### 7.3.2.2 Amplificación de ADN (PCR)

El gen *rbcL* se amplificó en dos partes con la combinación de primers que se muestra en la Tabla 4. Cabe destacar que se obtuvo la secuencia parcial de la región (908 pb, correspondiente con el 62% del total de la región).

Tabla 4. Primers utilizados y las condiciones de PCR.

Región	Primer	Secuencia del primer	Cita
<i>rbcL</i>	rbc-F0	ATCGAACTCGAATAAAAAGTGA	Kawai & Sasaki, 2001
	rbc-R2	CGCATGAATGGTTGTG	
	rbc-F3	CACAACCATTTCATGCG	
	Ral-R952	CATACGCATCCATTTACA	Lim <i>et al.</i> , 2007

Condiciones de PCR										
DI	D1	A1	E1	D2	A2	E2	D3	A3	E3	EF
94°C 3'	94°C 1'	50°C 1'	72°C 1'	94°C 1'	48°C 1'	72°C 1'	94°C 1'	46°C 1'	72°C 1'	72°C 10'
1 ciclo		3 ciclos		3 ciclos			30 ciclos		1 ciclo	

DI= Desnaturalización inicial; D1-3= Desnaturalización 1, 2 y 3; A1-3= Alineación 1, 2 y 3; E1-3=Elongación 1, 2 y 3; EF=Elongación final.

La mezcla de reacción fue preparada en un tubo de 0.2 ml utilizando el Kit PCR Core Kit de Qiagen añadiendo las siguientes proporciones de los reactivos: 2.5 µl de buffer, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de dNTPs, 1 µl de primer forward a 10 pmol (rbc-F0 ó rbc-F3), 1 µl de primer reverse a 10 pmol (rbc-R2 ó Ral-R952), 5 µl de Q Solution, 0.5 µl de Taq Polimerasa, 3 µl de ADN a 20 ng y 9.5 µl de agua inyectable. La mezcla se corrió en el termociclador Techne Flexi-gene, U.K. siguiendo el programa descrito por Lim *et al.* (2007) (Tabla 4, Fig. 3). Para revisar los productos del amplificado se cargaron en un gel de agarosa (0.8 gr de agarosa en 50 ml de TAE 5 M) 4 µl de la muestra con 2 µl de buffer de carga y se corrieron las muestras en una cámara de electroforesis con TAE a 5 M durante 30 minutos a 100 volts (Fig. 3).

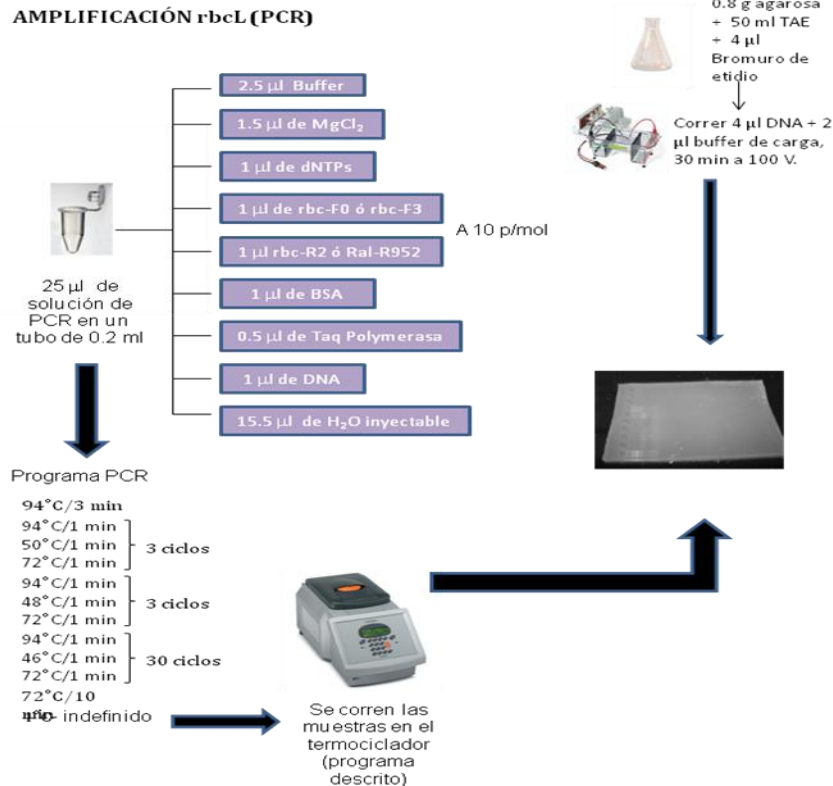


Fig. 3. Esquema del proceso de PCR realizado.

### 7.3.3 Secuenciación

Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación al laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología de la UNAM.

### 7.4 Análisis de divergencia nucleotídica

Se calcularon los intervalos de valores de divergencia nucleotídica interespecífica e intergenérica en las secuencias parciales de *rbcL* utilizando distancia no corregida "p" con el programa PAUP versión 4.2, para Macintosh (Swofford, 2003).

### 7.5 Análisis filogenéticos

Los datos obtenidos de las observaciones morfológicas y las técnicas moleculares fueron analizados en programas de cómputo como se menciona a continuación:

#### 7.5.1 Análisis morfológico

En el programa Excel (Office 2007) se conformó una matriz de datos morfológicos con 19 taxa y 10 caracteres. Se incluyeron en dicha matriz los especímenes de *Ralfsia* recolectados en el presente estudio y otros especímenes de *Ralfsia* y *Neoralfsia*, cuyas

descripciones diagnósticas fueron tomadas de Bittner *et al.* (2008), Kazuhiro Kogame *et al.* 2011, Lim *et al.* 2007. También se incluyeron las observaciones hechas por León-Álvarez (2005) al tipo de Agardh y a un espécimen de *R. expansa* en estado reproductivo recolectado en Punta Limón, Veracruz. *Hapalospongidion* sp. y *Stragularia* sp. se incluyeron como grupo externo (León-Álvarez 1996).

Los caracteres incluidos fueron los que han sido ponderados como diagnósticos para delimitación de especies (Børgesen 1912, Dawson 1944, León-Álvarez 1996, 2005, León-Álvarez & Gozález-González 2003, Lim *et al.* 2007, Tanaka & Chihara 1980 a,b,c y 1981 a,b,c) (Tabla 5). Se guardó la matriz en formato de texto.

Una vez conformada la matriz, se corrió un análisis de Máxima Parsimonia (MP) en el programa de PAUP. El análisis consistió en una búsqueda exacta con la rutina rama y unión (Branch and Bound), corriendo 1000 réplicas. El intercambio de ramas se realizó por medio de la opción bisección de árboles y reconexión (Tree Bisection and Reconnection) (TBR) y todos los caracteres fueron considerados como no ordenados y de igual peso. El apoyo interno de los clados se evaluó mediante un análisis de bootstrap (Felsenstein, 1985), con 10,000 réplicas. Se calculó el Índice de Consistencia (IC) de la matriz de datos para evaluar el nivel de Homoplasia en el programa de PAUP.

Tabla 5. Matriz de datos morfológicos utilizada en el análisis filogenético.

Taxa/Caracteres	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Ralfsia expansa</i> GM635	1	1	1	1	1	0	?	0	?	?
<i>R. expansa</i> GM649	1	1	0	1	1	1	0	0	?	?
<i>R. expansa</i> GM650	1	1	0	1	1	1	0	0	?	?
<i>R. expansa</i> GM651	1	1	2	1	1	1	0	0	?	?
<i>R. hancockii</i> PTM9165	1	1	0	1	1	-	-	1	1	0
<i>R. hancockii</i> PTM9167	1	1	0	1	1	-	-	1	1	0
<i>R. hancockii</i> PTM8982	1	1	0	1	1	-	-	0	?	?
<i>R. hancockii</i> PTM9178	1	1	0	1	1	-	-	1	1	0
<i>R. fungiformis</i> EU579936	0	1	0	1	1	0	?	0	?	?
<i>R. hesperia</i> PTM8970	0	0	0	1	1	-	-	1	1	1
<i>R. fungiformis</i> AB250071	0	1	0	1	1	0	?	0	?	?
<i>R. verrucosa</i> AB250072	1	0	1	0	1	1	1	0	?	?
<i>N.expansa</i> AB250077	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
<i>N. expansa</i> AB250078	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
<i>N. expansa</i> AB250079	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0
<i>Hapalospongidion</i> sp. PTM9185	0	0	-	0	0	0	?	0	?	?
<i>Stragularia</i> sp. PTM9166	0	0	-	0	0	0	?	0	?	?
<i>R. expansa</i> Holotipo	1	1	0	1	1	0	?	0	?	?
<i>R. expansa</i> León-Álvarez	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1

0 ausencia, 1 presencia, ? desconocido y - no aplica.

En carácter 3) 0 unilateral 1 bilateral 2 ambos.

1. Adherencia.
2. Rizoides.
3. Simetría.
4. Diferenciación (médula y corteza).
5. # de cloroplastos.
6. Plurangios.
7. Inserción de plurangios.
8. Unangios.
9. Unangios pedicelados.
10. # de cels. en pedicelos.



### 7.5.2 Análisis molecular

Las secuencias obtenidas de las muestras fueron editadas y alineadas en los programas Bioedit (Hall, 1999) y Clustal W (Thompson, 1994) junto con siete secuencias tomadas de la base de datos GeneBank (NCBI) pertenecientes a especies de *Ralfsia*, *Neoralfsia* y *Petalonia* Derbès & Solier (Tabla 6).

Tabla 6. Referencias de secuencias tomadas de la base de datos del GeneBank.

Espece	Localidad	País	Referencia	No. de Acceso al Gen Bank
<i>Neoralfsia expansa</i>	Hyogo, Igumi	Japón	Lim <i>et al.</i> 2007	AB250079
<i>N. expansa</i>	Johor, Desaru	Malasia	Lim <i>et al.</i> 2007	AB250078
<i>N. expansa</i>	Okinawa, Ishigaki Island, Hamasaki	Japón	Lim <i>et al.</i> 2007	AB250077
<i>Ralfsia fungiformis</i>	Hokkaido, Akkeshi	Japón	Lim <i>et al.</i> 2007	AB250071
<i>Ralfsia fungiformis</i>	Cap du Bon Désir, Quebec	Canadá	Bittner <i>et al.</i> 2008	EU579936
<i>Ralfsia verrucosa</i>	Britany, Roscoff	Francia	Lim <i>et al.</i> 2007	AB250072
<i>Petalonia fascia</i>	Co. Kerry, Sleah Head	Irlanda	Kogame <i>et al.</i> 2011	AB579001.1

Una vez conformada la matriz de nucleótidos con 18 taxa [incluyendo a los grupos externos *Hapalospongidion* sp., *Stragularia* sp. y *Petalonia fascia* (O.F. Müller) Kuntze] y 908 caracteres, se corrió un análisis de MP en el programa PAUP. El análisis consistió en una búsqueda exacta con la rutina rama y unión (Branch and Bound), con 1000 réplicas. El intercambio de ramas se realizó por medio de la opción TBR. Todos los caracteres fueron considerados como no ordenados y de igual peso. El apoyo interno de los clados se evaluó mediante un análisis de bootstrap con 10,000 réplicas. Se calculó el Índice de Consistencia (IC) de la matriz de datos en el programa de PAUP.

Para encontrar el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se ajustara a la matriz de datos se empleó el programa ModelTest v.3.7 (Posada & Crandall, 1998) con el criterio de información Akaike (AIC). El modelo seleccionado para el presente estudio fue GTR (general-time-reversible) + I (proportion of invariable sites).

El análisis bayesiano se realizó con el programa MrBayes 3.1.1 (Huesenbelck & Ronquist, 2001), usando el modelo GTR+I, con 5, 000, 000 de generaciones.

## 8. RESULTADOS

Se presentan los resultados del análisis morfológico y el análisis molecular realizados en el presente estudio.

### 8.1 Análisis morfológico

Se presenta el resumen de los datos de campo asociados a las muestras recolectadas, la caracterización morfológica e ilustración de los especímenes. Se confeccionó además una tabla comparativa de las características diagnósticas entre los especímenes recolectados y los que fueron tomados de la base de datos del GeneBank para el análisis molecular. Se ilustra el cladograma del análisis filogenético hecho con los caracteres morfológicos diagnósticos de las especies de *Ralfsia* (Fig. 12). El árbol presentado es el árbol de consenso de Regla de Mayoría (Majority rule, MJ), con una longitud de 19 y un Índice de Consistencia (IC) de 0.6.

#### 8.1.1 Datos de campo

En la Tabla 7 se muestran las características del ambiente general en que fueron recolectados los especímenes y en la Tabla 8 las características del ambiente particular y de la forma biológica como se tomaron en el campo.

Tabla 7. Características de los ambientes generales de los especímenes.

Especie	Muestra	Ambiente general	Ubicación respecto de la marea	Sustrato	Iluminación	Oleaje		Series de comunidades	
						Intensidad	Forma	Patrón de distribución y forma	Color dominante
<i>R. hancockii</i>	PTM 9165	PMX	Intermareal alto	Roca-arena	Parcial	Fuerte	Rompiente	Motas grandes y continuas	Pardo-negruzco
	PTM 9167	PRE	Supramareal bajo	Rocoso	Total	Muy fuerte	Barrido	Alfombra con motas pequeñas	Verde con medallones rojizos
	PTM 8982	PCR	Intermareal alto	Rocoso	Total	Medio-débil	Lavado	Motas	Negro
	PTM 9178	ZRP	Intermareal alto	Roca-arena	Parcial	Nulo	-	Tapete	Negro-Pardo
<i>R. expansa</i>	GM 635	PLA	Intermareal bajo	Rocoso	Total	Nulo	-	Alfombra con motas	Pardo con motas verde pálido
	GM 651	PLA	Intermareal bajo	Rocoso	Parcial	Fuerte	Barrido	Alfombra con motas irregulares	Pardo con motas verde pálido
	GM 649	PMX	Supramareal bajo	Roca-arena	Parcial	Medio-fuerte	Cubetazo	Motas	Pardo
	GM 650	PMX	Supramareal bajo	Roca-arena	Total	Débil	Lavado	Motas	Pardo

Ambiente general. PMX: playa mixta roca-arena; PRE: puntas rocosas expuestas; PCR: playas de cantos rodados; ZRP: zonas rocosas protegidas; PLA: plataforma rocosa.

Tabla 8. Características de los ambientes particulares y de los especímenes.

Muestra	Ambiente particular	Orientación en el ambiente	Sustrato		Color del crecimiento	Forma de la asociación	Formas biológicas conspicuas
			Tipo	Textura			
PTM 9165	CAL	Vertical	Roca de granito	Protuberante	Verde negruzco	Sobrepuestas con márgenes más o menos nítidos	-
PTM 9167	CAF	Superior	Roca de granito	Protuberante	Café claro	Juntas no delimitadas	<i>Stragularia</i> sp.
PTM 8982	OQD	Horizontal	Canto rodado	Protuberante	Café claro amarilloso	Medallones delimitados	<i>Ralfsia hesperia</i>
PTM 9178	CAP	Vertical	Roca sedimentaria	Protuberante	Café oscuro	Sobrepuestas con márgenes poco delimitados	<i>Hapalospongidion</i> sp.
GM 635	PLA	Superficie	Roca sedimentaria	Protuberante	Café negruzco	Continúas no delimitadas	<i>Laurencia</i>
GM 651	PLA	Superficie	Roca sedimentaria	Protuberante	Café claro	Continúas no delimitadas	<i>Laurencia</i> y <i>Gelidium</i>
GM 649	CAL	Vertical	Roca dura	Verrucosa	Café oscuro	Medallones con márgenes nítidos	<i>Ectocarpus</i>
GM 650	CAF	Horizontal	Roca sedimentaria	Verrucosa	Café oscuro	Medallones delimitados, margen nítido	<i>Stragularia</i> sp.

Ambiente particular. CAL: cara lateral del risco o piedra; CAF: cara frontal del risco o piedra; OQD: oquedad o grieta; CAP: cara posterior del risco o piedra; PLA: plataforma. Estado fenológico. UNA: unangios; VEG: vegetativo.

### 8.1.2 Caracterización morfológica de los especímenes

#### *Ralfsia expansa* GM 635

**Caracteres morfológicos:** Talo costroso, irregular, 4-8 cm de diámetro, color café oscuro casi negro cuando está húmedo y negruzco cuando está seco, epilítico, adherido al sustrato por rizoides, rugoso, coriáceo, creciendo de manera radial sin líneas de crecimiento, superficie con protuberancias, márgenes no lobulados y no diferenciados entre sí.

Al corte longitudinal radial: 200-295  $\mu\text{m}$  de grosor. Filamentos vegetativos con simetría unilateral, diferenciados en médula y corteza por el diámetro de los filamentos

vegetativos, en médula casi el triple de diámetro de los filamentos corticales. Filamentos medulares, con células basales cilíndricas de 32-35  $\mu\text{m}$  de longitud x 11-13  $\mu\text{m}$  de diámetro. Capa cortical con cinco células cilíndricas de 4.5-6  $\mu\text{m}$  de longitud x 4-5.5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cloroplastos presentes, uno por célula, sin pirenoide.

**Caracteres reproductivos:** Espécimen estéril.

**Otras observaciones:** Observaciones de campo en Tablas 7 y 8.

**Literatura consultadas:** León-Álvarez 1996, 2005, León-Álvarez & González-González 2003.

Detalle del crecimiento.

Detalle de corteza y médula al corte radial.

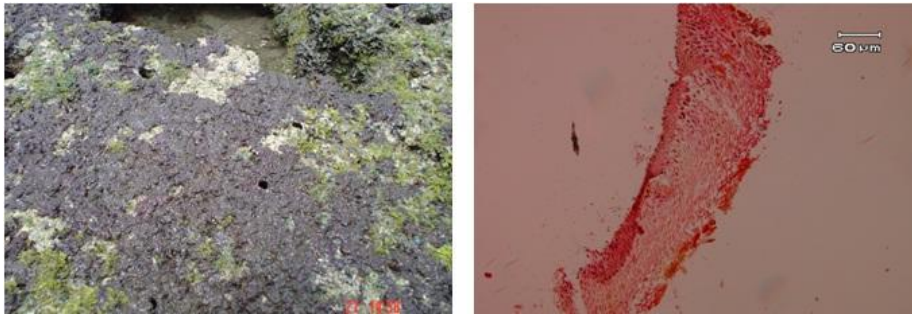


Fig. 4. *Ralfsia expansa*, GM 635, Morro de la Mancha, Veracruz.

*Ralfsia expansa* GM 649

**Caracteres morfológicos:** Talo costroso, orbicular, 4-12 cm de diámetro, color café oscuro cuando está húmedo y café rojizo cuando está seco, epilítico, adherido al sustrato por rizoides, rugoso, coriáceo, creciendo de manera radial con líneas de crecimiento conspicuas, superficie verrucosa, márgenes lobulados decolorados a café claro, medallones diferenciados entre sí.

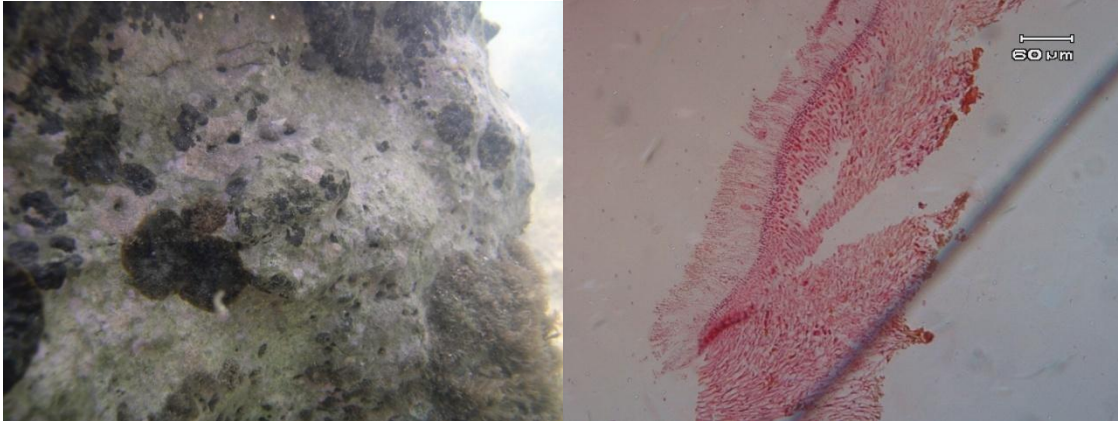
Al corte longitudinal radial: 195-300  $\mu\text{m}$  de grosor. Filamentos vegetativos con simetría unilateral hacia los extremos y bilateral en la porción central, diferenciados en médula y corteza por el diámetro de los filamentos vegetativos, en médula casi el triple de diámetro de los filamentos corticales. Filamentos medulares, con células basales cilíndricas de 30-34  $\mu\text{m}$  de longitud x 12-14  $\mu\text{m}$  de diámetro. Capa cortical con cinco células cilíndricas de 4-6  $\mu\text{m}$  de longitud x 5-6  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cloroplastos presentes, uno por célula, sin pirenoide.

**Caracteres reproductivos:** Plurangios insertos intercalarmenete en los filamentos medulares, uno por filamento, cilíndricos, alargados, 36-40  $\mu\text{m}$  de longitud x 3-5  $\mu\text{m}$  de

diámetro, con una hilera de células cilíndricas y una célula terminal estéril con forma de capuchón, 5-7  $\mu\text{m}$  de longitud x 3-5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**Otras observaciones:** Observaciones de campo en Tablas 7 y 8.

**Literatura consultadas:** León-Álvarez 1996, 2005, León-Álvarez & González-González 2003.



Crecimiento en forma de medallón.

Corte longitudinal radial.

Fig. 5. *Ralfsia expansa*, GM649, Morro de la Mancha, Veracruz.

#### *Ralfsia expansa* GM 650

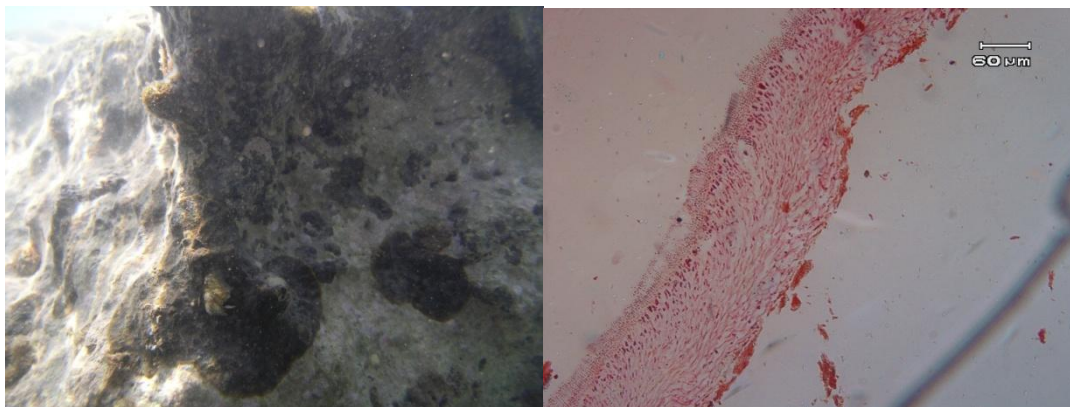
**Caracteres morfológicos:** Talo costroso, orbicular, 5-8 cm de diámetro, color café oscuro cuando está húmedo y café rojizo cuando está seco, epilítico, adherido al sustrato por rizoides, rugoso, coriáceo, creciendo de manera radial con líneas de crecimiento conspicuas, superficie verrucosa, márgenes lobulados decolorados a café claro, costras delimitadas unas de otras formando medallones.

Al corte longitudinal radial: 160-260  $\mu\text{m}$  de grosor. Filamentos vegetativos con simetría bilateral, diferenciados en médula y corteza por el diámetro de los filamentos vegetativos y por una capa central formada por las ramificaciones ascendentes y descendentes de los filamentos vegetativos. Filamentos medulares con casi el triple de diámetro de los filamentos corticales, con células basales cilíndricas de 32-35  $\mu\text{m}$  de longitud x 13-15  $\mu\text{m}$  de diámetro. Capa cortical con tres células cilíndricas de 5-6.5  $\mu\text{m}$  de longitud x 5-6  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cloroplastos presentes, uno por célula, sin pirenoide.

**Caracteres reproductivos:** Plurangios insertos intercaladamente en los filamentos medulares, uno por filamento, cilíndricos, 40-42  $\mu\text{m}$  de longitud x 3-4.5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con una serie de hileras de células cilíndricas y una célula terminal estéril comprimida, 5.5-6.4  $\mu\text{m}$  de longitud x 3.5-5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**Otras observaciones:** Observaciones de campo en Tablas 7 y 8.

**Literatura consultadas:** León-Álvarez 1996, 2005, León-Álvarez & González-González 2003.



Crecimiento en medallón.

Corte longitudinal radial.

Fig. 6. *Ralfsia expansa*, GM650, Morro de la Mancha, Veracruz.

#### *Ralfsia expansa* GM 651

**Caracteres morfológicos:** Talo costroso, irregular, 4-6 (-10) cm de diámetro, color café claro cuando está húmedo y café oscuro cuando está seco, epilítico, adherido al sustrato por rizoides, rugoso, coriáceo, creciendo de manera radial sin líneas de crecimiento conspicuas, superficie con ligeras protuberancias, márgenes irregulares, no claramente diferenciados entre sí.

Al corte longitudinal radial: 190-300  $\mu\text{m}$  de grosor. Filamentos vegetativos con simetría bilateral diferenciados en médula y corteza por el diámetro de los filamentos vegetativos y por una capa central formada por su ramificación ascendente y descendente. Filamentos medulares con casi el triple de diámetro de los filamentos corticales, con células basales cilíndricas de 35-42  $\mu\text{m}$  de longitud x 12-15  $\mu\text{m}$  de diámetro. Capa cortical con cinco células cilíndricas de 5-6.8  $\mu\text{m}$  de longitud x 4-6  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cloroplastos presentes, uno por célula, sin pirenoide.

**Caracteres reproductivos:** Plurangios insertos intercalarmenete en los filamentos medulares, uno por filamento, cilíndricos, 43-46  $\mu\text{m}$  de longitud x 3.5-5  $\mu\text{m}$  de diámetro, con una serie de hileras de células cilíndricas y una célula terminal estéril comprimida, 6-6.5  $\mu\text{m}$  de longitud x 3.5-4.5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**Otras observaciones:** Observaciones de campo en Tablas 7 y 8.

**Literatura consultadas:** León-Álvarez 1996, 2005, León-Álvarez & González-González 2003.

Detalle del crecimiento.



Detalle de médula y corteza al corte radial.

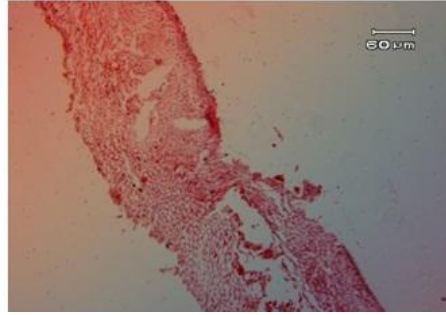


Fig. 7. *Ralfsia expansa* GM 651, Morro de la Mancha, Veracruz.

#### *Ralfsia hancockii* PTM 8982

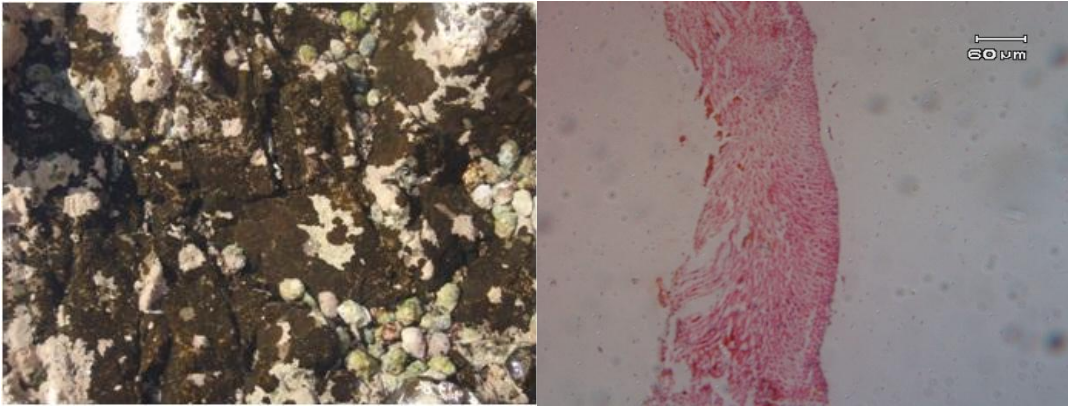
**Caracteres morfológicos:** Talo costroso, orbicular, 5-10 cm de diámetro, color café oscuro cuando está húmedo y café claro cuando está seco, epilítico, adherido al sustrato por rizoides, rugoso, coriáceo, creciendo de manera radial con líneas de crecimiento conspicuas, superficie con protuberancias, márgenes nítidos decolorados a café muy claro casi amarillo, formando medallones delimitados entre sí y lobulados.

Al corte longitudinal radial: 130-400  $\mu\text{m}$  de grosor. Filamentos vegetativos con simetría bilateral, diferenciados en médula y corteza por la ramificación curvada ascendente y descendente a partir de una capa central. Filamentos medulares erectos, con células basales cilíndricas de 20-31  $\mu\text{m}$  de longitud x 8-10  $\mu\text{m}$  de diámetro. Células subcorticales cilíndricas o irregulares, 15-22  $\mu\text{m}$  de longitud x 10-13  $\mu\text{m}$  de diámetro. Capa cortical con cuatro a seis células cilíndricas de 3  $\mu\text{m}$  de longitud x 2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cloroplastos presentes, uno por célula, sin pirenoide.

**Caracteres reproductivos:** Especimen estéril.

**Otras observaciones:** Observaciones de campo en Tablas 7 y 8.

**Literatura consultadas:** León-Álvarez 1996, 2005, León-Álvarez & González-González 2003.



Crecimiento

Corte radial

Fig. 8. *Ralfsia hancockii* PTM 8982 Las Rosadas, Jalisco.*Ralfsia hancockii* PTM 9165

**Caracteres morfológicos:** Talo costroso, irregular, 5-8 cm de diámetro, color café oscuro a verdoso cuando está húmedo y café oscuro casi negro cuando está seco, epilítico, adherido al sustrato por rizoides, rugoso, coriáceo, creciendo de manera radial sin líneas de crecimiento, superficie con protuberancias, márgenes ligeramente ondulados y creciendo encimados sobre ellos.

Al corte longitudinal radial: 130-210  $\mu\text{m}$  de grosor. Filamentos vegetativos con simetría bilateral, diferenciados en médula y corteza por la ramificación curvada ascendente y descendientemente a partir de una capa central. Filamentos medulares erectos, con células basales cilíndricas de 32-36  $\mu\text{m}$  de longitud x 12-14  $\mu\text{m}$  de diámetro. Células subcorticales cilíndricas o irregulares, 22-25  $\mu\text{m}$  de longitud x 10-12  $\mu\text{m}$  de diámetro. Capa cortical con seis a ocho células cilíndricas de 6-9  $\mu\text{m}$  de longitud x 5-7  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cloroplastos presentes, uno por célula, sin pirenoide.

**Caracteres reproductivos:** Unangios en soros dispersos no delimitados diferenciados como zonas decoloradas en la superficie del talo, claviformes, de 70-76  $\mu\text{m}$  de longitud x 28-31  $\mu\text{m}$  de diámetro, uno por filamento, pedicelados por 3 células, asociados a paráfisis. Paráfisis claviforme, 95-107  $\mu\text{m}$  de longitud, con 25 células de 4-5  $\mu\text{m}$  de longitud x 2-3  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**Otras observaciones:** Observaciones de campo en Tablas 7 y 8.

**Literatura consultadas:** León-Álvarez 1996, 2005, León-Álvarez & González-González 2003.



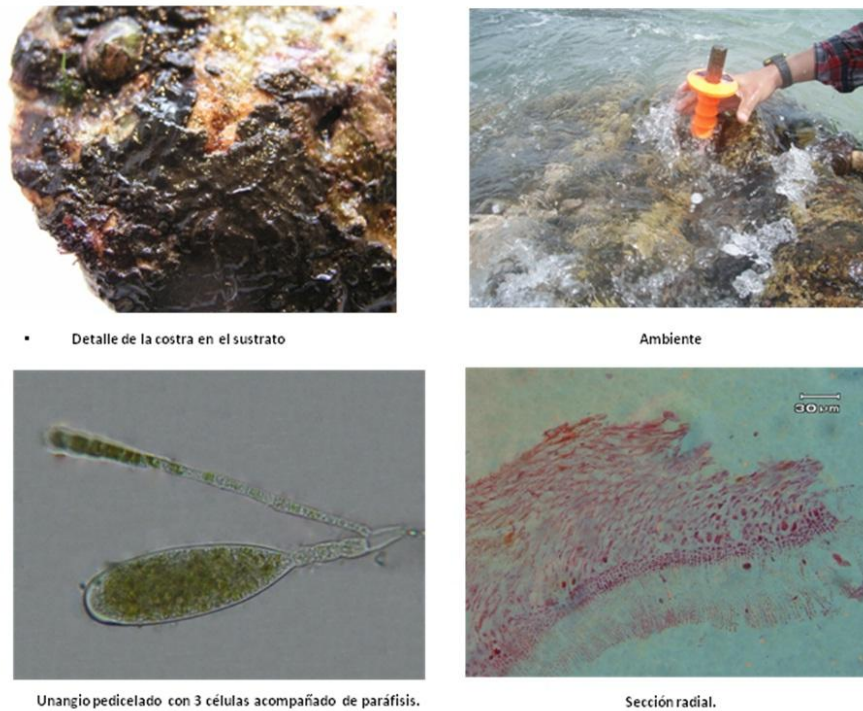


Fig. 9. *Ralfsia hancockii* PTM 9165 San José del Cabo, B.C., La Palmilla.

*Ralfsia hancockii* PTM 9167

**Caracteres morfológicos:** Talo costroso, irregular u orbicular, 1-4 cm de diámetro, color café claro cuando está húmedo y café oscuro con zonas reproductivas verdosas cuando está seco, epilítico, adherido al sustrato por rizoides, rugoso, coriáceo, creciendo de manera radial sin líneas de crecimiento, superficie con protuberancias, márgenes no lobulados diferenciados entre sí.

Al corte longitudinal radial: 160-300  $\mu\text{m}$  de grosor. Filamentos vegetativos con simetría bilateral, diferenciados en médula y corteza por la ramificación curvada ascendente y descendentemente a partir de una capa central. Filamentos medulares erectos, con células basales cilíndricas de 29-35  $\mu\text{m}$  de longitud x 11-12  $\mu\text{m}$  de diámetro. Células subcorticales cilíndricas o irregulares, 20-25  $\mu\text{m}$  de longitud x 10-12  $\mu\text{m}$  de diámetro. Capa cortical con cinco a siete células cilíndricas de 7-9  $\mu\text{m}$  de longitud x 5-7  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cloroplastos presentes, uno por célula, sin pirenoide.

**Caracteres reproductivos:** Unangios en soros dispersos no delimitados diferenciados como zonas decoloradas en la superficie del talo, ovoides o claviformes, de 78-86  $\mu\text{m}$  de longitud x 30-36  $\mu\text{m}$  de diámetro, uno por filamento, pedicelados por 3-6 células de 8-10

$\mu\text{m}$  de diámetro, asociados a paráfisis. Paráfisis claviforme, 100-110  $\mu\text{m}$  de longitud, con 11 a 13 células de 8-10  $\mu\text{m}$  de longitud x 4-5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**Otras observaciones:** Observaciones de campo en Tablas 7 y 8.

**Literatura consultadas:** León-Álvarez 1996, 2005, León-Álvarez & González-González 2003.

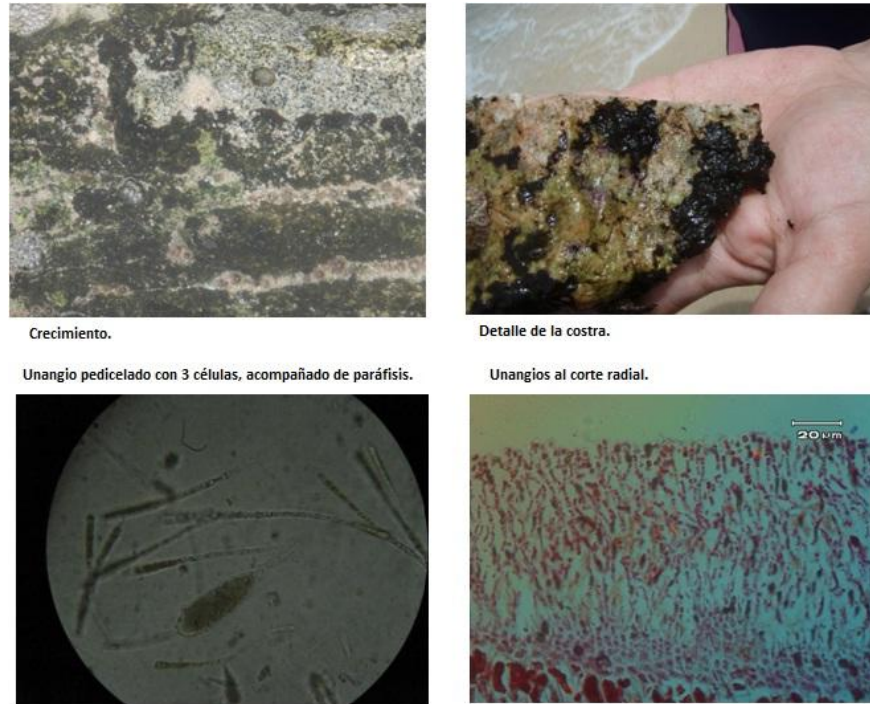


Fig. 10. *Ralfsia hancockii*. San José del Cabo, B.C., Club Campestre.

*Ralfsia hancockii* PTM 9178.

**Caracteres morfológicos:** Talo costroso, orbicular, 4-10 cm de diámetro, color café negruzco cuando está húmedo y café casi anaranjado cuando está seco, epilítico, adherido al sustrato por rizoides, rugoso, coriáceo, creciendo de manera radial con líneas de crecimiento conspicuas, superficie con protuberancias, márgenes lobulados y diferenciados entre sí.

Al corte longitudinal radial: 140-320  $\mu\text{m}$  de grosor. Filamentos vegetativos con simetría bilateral, diferenciados en médula y corteza por la ramificación curvada ascendente y descendientemente a partir de una capa central. Filamentos medulares erectos, con células basales cilíndricas de 22-30  $\mu\text{m}$  de longitud x 9-10  $\mu\text{m}$  de diámetro. Células subcorticales cilíndricas o irregulares, 18-25  $\mu\text{m}$  de longitud x 11-15  $\mu\text{m}$  de diámetro. Capa cortical con siete células cilíndricas de 3.5  $\mu\text{m}$  de longitud x 2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Cloroplastos presentes, uno por célula, sin pirenoide.

**Caracteres reproductivos:** Unangios en soros dispersos no delimitados diferenciados como zonas decoloradas en la superficie del talo, ovoides, de 50-60  $\mu\text{m}$  de longitud x 20-22  $\mu\text{m}$  de diámetro, uno por filamento, pedicelados por 3 células, asociados a paráfisis. Paráfisis claviforme, 86-90  $\mu\text{m}$  de longitud, con 13 células de 10-12  $\mu\text{m}$  de longitud x 3-5  $\mu\text{m}$  de diámetro.

**Otras observaciones:** Costras creciendo unas sobre otras lo que da la impresión de crecimiento continuo no diferenciado.

Observaciones de campo en Tablas 7 y 8.

**Literatura consultadas:** León-Álvarez 1996, 2005, León-Álvarez & González-González 2003.

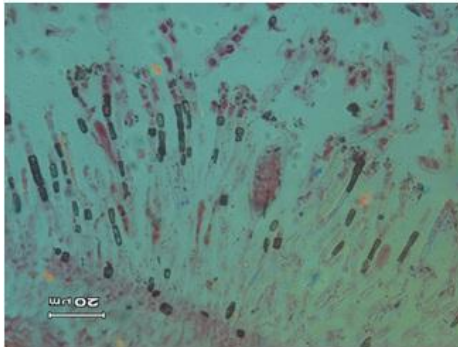


Crecimiento.



Detalle de la costra.

Unangios pedicelados con 6 células al corte radial.



Unangio pedicelado con 3 células.

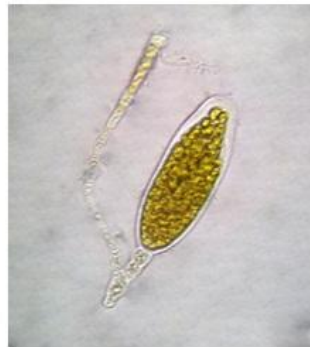


Fig. 11. *Ralfsia hancockii* PTM 9178 San Agustín, Oaxaca.

Tabla 9. Comparación morfológica de las especies de *Ralfsia* incluidas en el análisis molecular, siguiendo las características diagnósticas propuestas en la literatura.

Taxa	Diámetro del talo ( $\mu\text{m}$ )	Simetría de los filamentos vegetativos	Delimitación entre médula y corteza	Paráfisis	Pluriloculares	Uniloculares	# de cloroplastos
* <i>R. fungiformis</i> (Quebec)	280-520	Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	presente	-	-	Uno
* <i>R. fungiformis</i> (Japón)	265-575	Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	Presente	-	-	Uno
* <i>R. verrucosa</i> (Japón)	143-215	Unilateral; curvado ascendentemente hacia la superficie, surgiendo de una parte basal	No	Presente	Subterminal con una célula terminal estéril	-	Uno
<i>R. hesperia</i>	710-820	Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	Presente	No vistos	Terminal, pedicelo con una célula	Uno
* <i>N. expansa</i> (Okinawa)	138-390	Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	Presente	Subterminal con una célula estéril	Terminal, pedicelo con tres células	Uno
* <i>N. expansa</i> (Malasya)	110-280	Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	Presente	Subterminal con una célula estéril	Terminal con tres células en el pedicelo	Uno
* <i>N. expansa</i> (Ohio)	141-160	Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	Presente	Subterminal con una célula estéril	Terminal con seis células en el pedicelo	Uno
<i>R. expansa</i> (GM635)	200-295	Unilateral; curvado ascendentemente hacia la superficie surgiendo de la base	Si	Presente	No vistos	Estéril	Uno
<i>R. expansa</i> (GM 649)	195-300	Uni o Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	Presente	Intercalar con una célula estéril	Estéril	Uno
<i>R. expansa</i> (GM 650)	160-260	Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	Presente	Intercalar con una célula estéril	Estéril	Uno

<i>R. expansa</i> (GM 651)	190-300	Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	Presente	Intercalar con una célula estéril	Estéril	Uno
<i>R. hancockii</i> (PTM 9165)	130-210	Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	Presente	No vistos	Terminal con 3 células en el pedicelo	Uno
<i>R. hancockii</i> (PTM 9167)	160-300	Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	Presente	No vistos	Terminal con 3-6 Células en el pedicelo	Uno
<i>R. hancockii</i> (PTM 8982)	130-400	Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	Presente	No vistos	Estéril	Uno
<i>R. hancockii</i> (PTM 9178)	140-320	Bilateral; curvado ascendente y descendente a partir de una capa central	Si	Presente	No vistos	Terminal con 3 células en el pedicelo	Uno

\*Características descritas según Lim *et al.* (2007) para los ejemplares cuya secuencia molecular se incluyó en el presente análisis.

## 8.2 Divergencia nucleotídica intergenérica e interespecífica en las secuencias parciales de *rbcl*

Se analizó un total de 18 secuencias, incluyendo secuencias de *Ralfsia*, *Neoralfsia* y los grupos externos *Hapalospongidion sp.*, *Stragularia sp.* y *Petalonia fascia* (Tabla 10).

Los valores de divergencia intergenérica entre las muestras de *Ralfsia* y *Neoralfsia*, oscilaron entre 8.9 y 14.8%.

A nivel intragenérico, en el género *Ralfsia* los valores de divergencia oscilaron: entre *R. expansa* y *R. hancockii* de la localidad tipo (de 6.2 a 9.9%), entre *R. expansa* de localidad tipo y el grupo de *Ralfsia fungiformis* (especie tipo del género) (de 11 a 13.2%), entre *R. hancockii* de la localidad tipo y *R. fungiformis* (de 12.4 a 12.7%).

A nivel intergenérico, los valores de divergencia oscilaron: entre *R. expansa* de la localidad tipo y *Neoralfsia expansa* (de 9.5 y 12.2%), entre *N. expansa* y *R. hancockii* (de 10.4 a 14.8%), entre *N. expansa* y *R. fungiformis* (de 11.4 a 12.6%).

A nivel intraespecífico, los valores de divergencia oscilaron: entre las muestras de *Ralfsia expansa* recolectadas en la zona de plataforma rocosa del Morro de La Mancha (GM635 y GM651) en 2%; entre las muestras de *R. expansa* recolectadas en la zona de riscos del

Morro de La Mancha (GM650 y GM649) en 1%. Entre *R. hancockii* recolectada en San Agustín, Oaxaca (PTM9178) y *R. hancockii* recolectada en La Rosada, Jalisco (PTM8982) en 4%. Entre *R. hancockii* recolectada en La Palmilla, San José del Cabo, B.C. (PTM9165) y *R. hancockii* recolectada en Country Club, San José del Cabo, B.C. (PTM9167) en 0.08%. Entre *R. hancockii* (localidad tipo PTM9167 y 9165) y *R. hancockii* (PTM8982 y PTM9178) osciló entre 7 a 9.9%. Entre *Neoralgsia expansa* de Japón (AB250077) y *N. expansa* de Malasia (AB250078), en 3.5% y respecto de *N. expansa* de Japón (AB250079), osciló entre 2.1 a 3.3%.

Tabla 10. Distancia no corregida ("p") para secuencias parciales de *rbcl* entre los especímenes incluidos en el análisis.

		1	2	3	4	5	6	7	8
1	<i>Stragularia</i> sp. PTM9166, San José del Cabo, B.C., Mex.	-							
2	<i>Ralfsia expansa</i> GM635, Veracruz, Mex.	0.10903	-						
3	<i>R. hancockii</i> PTM9178, San Agustín, Oax., Mex.	0.12335	0.04405	-					
4	<i>R. expansa</i> GM651, Veracruz, Méx.	0.10903	0.02423	0.03965	-				
5	<i>R. expansa</i> GM650, Veracruz, Méx.	0.11454	0.04846	0.04295	0.04075	-			
6	<i>Hapalospongidion</i> sp. PTM9185, San Agustín, Oax., Méx.	0.10352	0.09251	0.09471	0.09141	0.09361	-		
7	<i>R. hancockii</i> PTM8982, La Rosada, Jal., Méx.	0.12665	0.07159	0.04736	0.06608	0.06828	0.10242	-	
8	<i>R. hancockii</i> PTM9167, San José del Cabo, B.C., Méx.	0.10683	0.06498	0.07048	0.05727	0.07379	0.12004	0.09912	-
9	<i>R. hancockii</i> PTM9165, San José del Cabo, B.C.	0.10352	0.06278	0.07269	0.05617	0.07599	0.12004	0.09912	0.00881
10	<i>R. expansa</i> GM649, Veracruz, Méx.	0.11233	0.04956	0.04295	0.04295	0.01542	0.09361	0.06608	0.07048
11	<i>R. hesperia</i> PTM8970, El Negrito, Jal., Méx.	0.11784	0.11344	0.12115	0.11013	0.11564	0.13546	0.10793	0.10793
12	<i>Neoralfsia expansa</i> , AB250077, Okinawa, Jap.	0.13150	0.12027	0.12012	0.11574	0.11460	0.15063	0.14147	0.11467
13	<i>Petalonia fascia</i> AB579001.1, Co.Kerry, Irl.	0.13436	0.09802	0.11013	0.10132	0.11344	0.13216	0.11894	0.09141
14	<i>N. expansa</i> , AB250079, Hyogo, Igumi, Jap.	0.12004	0.10352	0.10463	0.09581	0.09802	0.14648	0.13546	0.08921
15	<i>N. expansa</i> AB250078	0.13263	0.11696	0.11909	0.11252	0.11247	0.15379	0.14804	0.10921
16	<i>R. fungiformis</i> 579936, Quebec, Can.	0.13678	0.12869	0.13540	0.13206	0.12840	0.15193	0.12847	0.12747
17	<i>R. fungiformis</i> AB250071, Hokkaido, Jap.	0.13767	0.12885	0.13656	0.13216	0.12775	0.15088	0.12885	0.12445
18	<i>R. verrucosa</i> AB250079	0.13106	0.12225	0.13436	0.12775	0.12555	0.14978	0.12555	0.12445

Continuación tabla 10.

		9	10	11	12	13	14	15	16
9	<i>R. hancockii</i> PTM9165, San José del Cabo, B.C.	-							
10	<i>R. expansa</i> GM649, Veracruz, Méx.	0.07269	-						
11	<i>R. hesperia</i> PTM8970, El Negrito, Jal., Méx.	0.10683	0.11674	-					
12	<i>Neoralfsia expansa</i> , AB250077, Okinawa, Jap.	0.11580	0.11353	0.10117	-				
13	<i>Petalonia fascia</i> AB579001.1, Co.Kerry, Irl.	0.09031	0.10903	0.12445	0.14843	-			
14	<i>N. expansa</i> , AB250079, Hyogo, Igumi, Jap.	0.09031	0.09802	0.10022	0.03371	0.13877	-		
15	<i>N. expansa</i> AB250078	0.11031	0.11249	0.10476	0.03588	0.14714	0.02116	-	
16	<i>R. fungiformis</i> 579936, Quebec, Can.	0.12751	0.12608	0.09942	0.11815	0.13797	0.12155	0.12605	-
17	<i>R. fungiformis</i> AB250071, Hokkaido, Jap.	0.12445	0.12445	0.09912	0.11465	0.13656	0.11784	0.12144	0.00350
18	<i>R. verrucosa</i> AB250079	0.12445	0.12004	0.09361	0.11800	0.13106	0.11784	0.12035	0.04680

Continuación tabla 10.

		17	18
17	<i>R. fungiformis</i> AB250071, Hokkaido, Jap.	-	
18	<i>R. verrucosa</i> AB250079	0.04736	-

### 8.3. Análisis filogenéticos

Se realizaron análisis filogenéticos con caracteres morfológicos (Fig. 12) y moleculares (Fig. 13) de los especímenes analizados en el presente estudio y los obtenidos de la base de datos del GeneBank.

Con las muestras trabajadas en el presente estudio, se obtuvieron un total de 11 secuencias parciales del gen *rbcL*. Se secuenciaron 908 de 1467 pares de bases, lo que representa un 62% del total del tamaño del gen.

#### 8.3.1 Filogenia con caracteres morfológicos

En la Figura 12 se muestra la topología resultante del análisis de Máxima Parsimonia (MP) realizado a partir de las características diagnósticas de los especímenes de *Ralfsia* trabajados en el presente estudio y las observaciones de dos especímenes de *R. expansa* hechas por León-Álvarez (2005) a un espécimen de Punta Limón, Veracruz que presentaba unangios y las observaciones hechas al Holotipo de Agardh. Así mismo, se incluyen las características diagnósticas de los especímenes tomados de la base de datos del GeneBank según Lim *et al.* (2007) y las observaciones de los grupos externos excepto *Petalonia fascia*

El cladograma muestr que el género *Ralfsia* no es un grupo monofilético.

Se observan dos clados basales correspondientes con *R. verrucosa* (AB250072), soportado por un valor de bootstrap de 95 y *Ralfsia expansa* (GM635), soportado por un valor de bootstrap de 51.

Como grupo hermano de *Ralfsia expansa* (GM635) se observa una gran politomía en la que se incluyen 15 especímenes. Al interior de esta politomía podemos diferenciar cuatro subgrupos correspondientes a:

Clado I: soportado por bajos valores de bootstrap (55). Incluyó a tres especímenes de *Ralfsia expansa* recolectados en la localidad tipo en Veracruz. Los especímenes GM649 y GM650, recolectados en la zona de riscos y el espécimen GM651 recolectado en la plataforma rocosa.



Clado II: soportado por bajos valores de bootstrap (inferiores a 50). Incluyó a cuatro especímenes, tres de *Neoralfsia expansa* (AB250077 y AB250079 de Japón y AB250078 de Malasia) y uno de *Ralfsia expansa* (recolectado en Punta Limón, Veracruz).

Clado III: soportado por bajos valores de bootstrap (inferiores a 50). Incluyó a cinco especímenes, cuatro de *Ralfsia hancockii* (PTM9165 y PTM9167 recolectados en la localidad tipo, uno en La Palmilla y el otro en Country Club respectivamente, PTM9178 recolectado en San Agustín, Oaxaca y PTM8982 recolectado en La Rosada, Jalisco) y uno de *R. hesperia* (PTM8970 recolectado en El Negrito, Jalisco).

Clado IV: soportado por bajos valores de bootstrap (inferiores a 50). Incluyó a dos especímenes de *R. fungiformis*, EU579936 de Canadá y AB250071 de Japón.

Finalmente se observó que el holotipo de *Ralfsia expansa* (observaciones de León-Álvarez 1996) se agrupó fuera de los clados anteriormente mencionados.

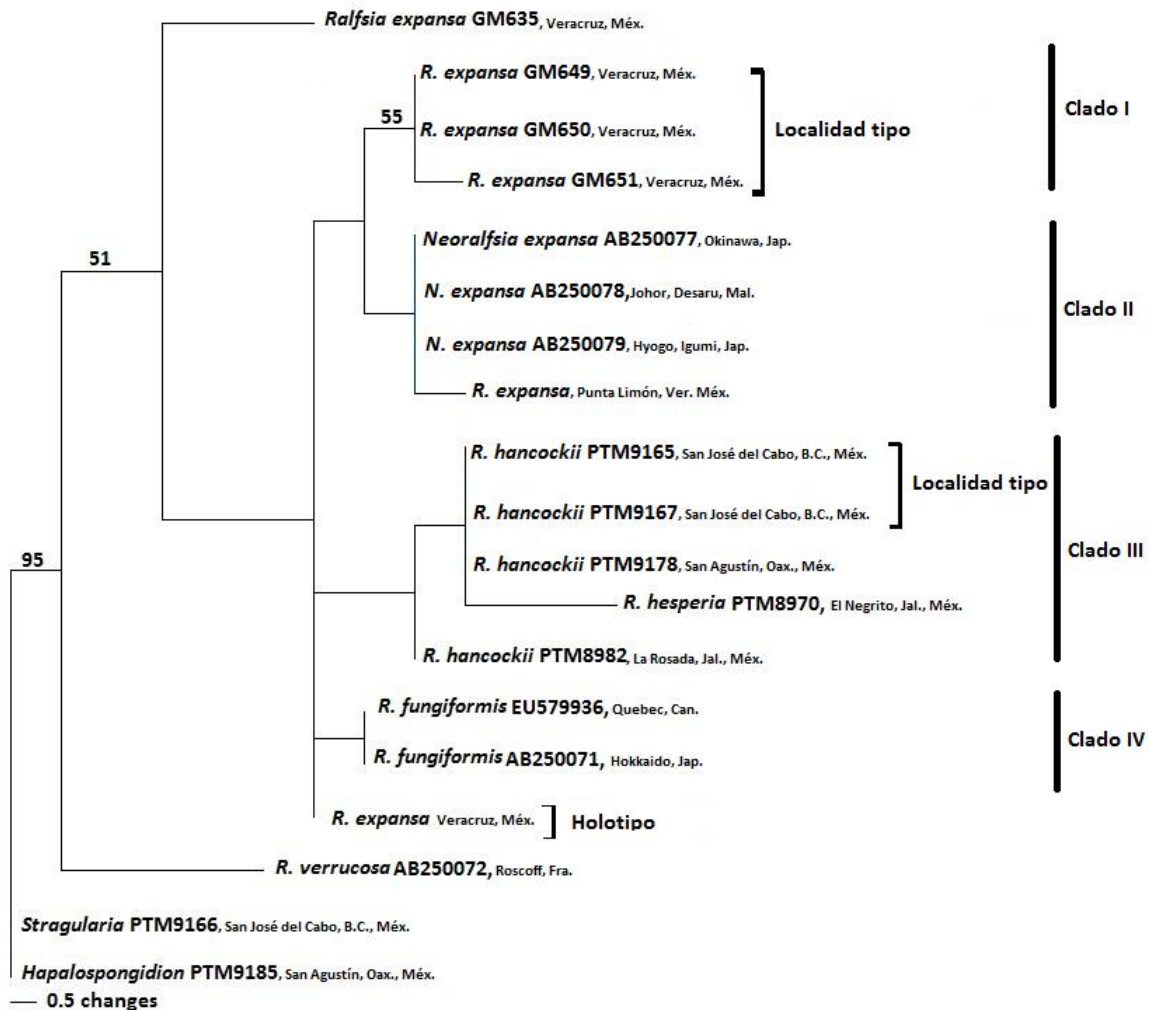


Figura 12. Árbol consenso de regla de mayoría (MJ) obtenido con caracteres morfológicos. Longitud = 19, Índice de Consistencia = 0.6. En los nodos se muestran los valores de bootstrap (1000 réplicas). Los nodos que no presentan valores indican resultados de bootstrap inferiores a 50.

### 8.3.2 Filogenia molecular

En la Figura 13 se muestra la topología del árbol bayesiano obtenido con caracteres moleculares, topología similar a la obtenida en el análisis de Máxima parsimonia.

En la topología se muestra un grupo monofilético (soportado valor de bootstrap de 74 y valor de PPB de 0.99) en donde se encuentran los especímenes de *Ralfsia* y *Neoralfsia*. Dentro del grupo monofilético se distinguen dos grupos hermanos, el primero (soportado por los valores 73/0.99), correspondiente al clado I, incluye a seis especímenes de *Ralfsia* que a su vez están ubicados en dos subgrupos:

Subgrupo I: soportado por los valores 67/0.86. Incluyó a los especímenes GM635 y GM651 de *Ralfsia expansa*, recolectados en la zona de plataforma del Morro de la Mancha, Veracruz, posible localidad tipo.

Subgrupo II: soportado por los valores 69/0.99. Incluyó a cuatro especímenes de *Ralfsia* agrupados en dos subclados. Un primer subclado soportado por los valores 91/1.00, que incluyó a los especímenes de *R. hancockii* del Pacífico (PTM9178 de San Agustín, Oaxaca y PTM8982 de La Rosada, Jalisco) y un segundo subclado soportado por los valores 100/1.00, los especímenes de *R. expansa* de Veracruz (GM650 y GM649 de la zona de risco del Morro de la Mancha, Veracruz).

El segundo grupo, soportado por los valores 74/0.99, incluye a su vez dos subgrupos, uno formado por el clado II y el otro donde se distinguen el clado III y el clado IV.

Clado II: soportado por valores altos, de 100/1.00. Incluyó a dos especímenes de *Ralfsia hancockii* de la localidad tipo, PTM9167 del Country Club y PTM9165 de La Palmilla.

El clado III: soportado por los valores 77/1.00. Incluyó a cuatro especímenes, uno de *Ralfsia hesperia* PTM8970 de Jalisco, dos de *R. fungiformis* (especie tipo del género) EU579936 de Canadá y AB550071 de Japón y uno de *R. verrucosa* AB250072 de Francia.

El clado IV: soportado por los valores 100/1.00. Incluyó a tres especímenes de *Neoralfsia expansa*, AB250077 y AB250079 de Japón y AB250078 de Malasia.

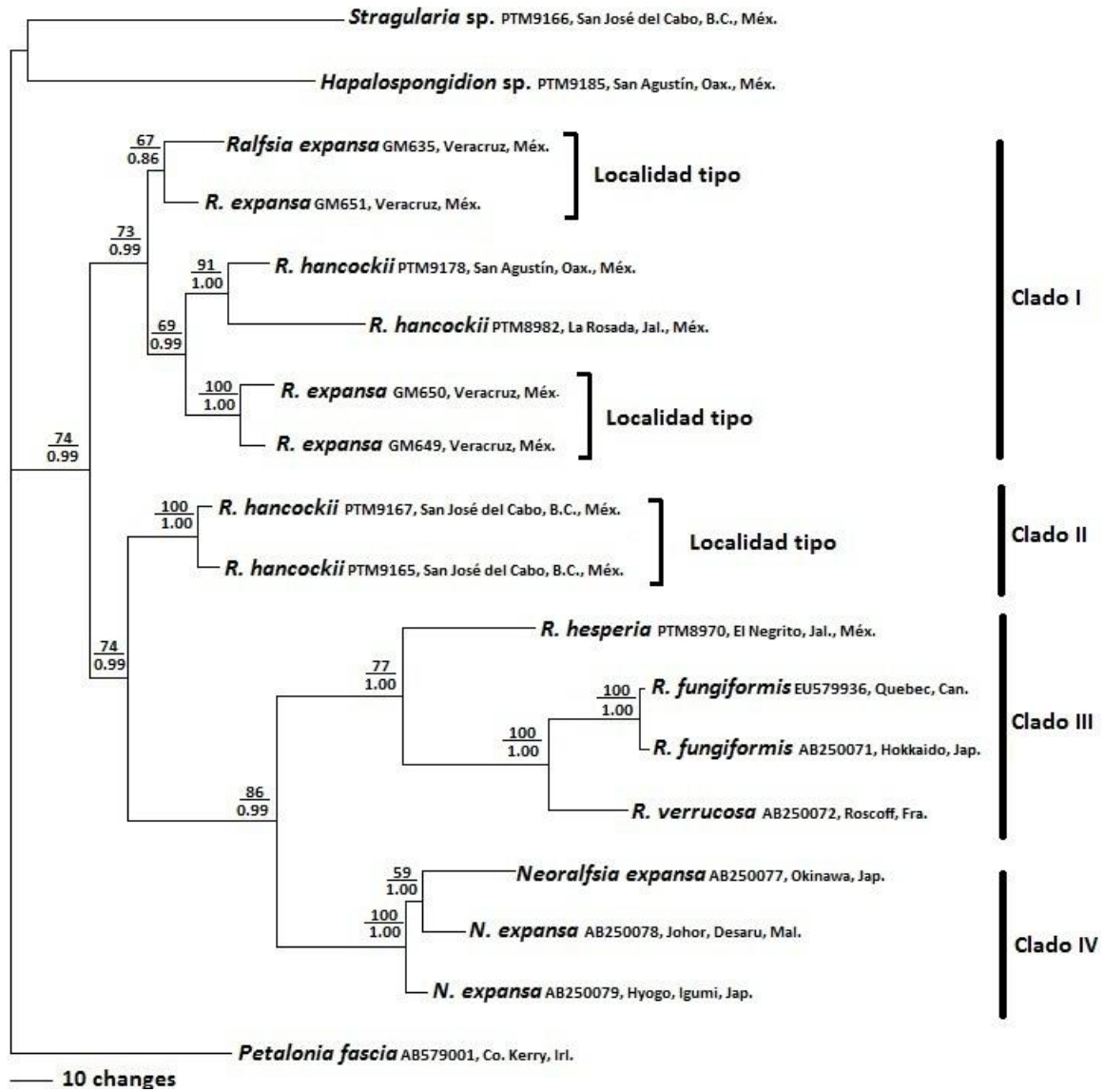


Figura 13. Árbol Bayesiano obtenido con secuencias parciales de *rbCL*. Los valores que se muestran sobre los nodos representan los resultados del análisis de bootstrap (superior) y de probabilidad posterior bayesiana (PPB) (inferior).

## 9. DISCUSIÓN

Con base en el análisis de la evidencia morfológica versus la evidencia molecular, podemos decir que en México se encuentra *Ralfsia hancockii* E. Y. Dawson restringida al Golfo de California, dos entidades morfológicamente coespecíficas con *R. expansa* pero molecularmente diferenciadas entre ellas, en Veracruz, México y una entidad morfológicamente correspondiente con *R. hancockii* Dawson en el Pacífico tropical mexicano pero molecularmente diferenciado de ésta y relacionada con las entidades de *R. expansa* de Veracruz.

### 9.1 Datos de campo

A partir del análisis de los datos de campo asociados a las muestras recolectadas, podemos decir que todos los especímenes de *Ralfsia* crecen en litorales rocosos, zonas de alta intensidad de oleaje, hidratados la mayor parte del día, a la sombra y nunca expuestos a la desecación. También diferenciamos dos formas de crecimiento entre los especímenes de *R. expansa* y *R. hancockii*. Una es formando medallones orbiculares, con márgenes lobulados y decolorados, líneas de crecimiento radial conspicuas y de superficie verrucosa, claramente diferenciados unos de otros aunque crezcan encimados. La otra es un crecimiento irregular continuo, sin lóbulos ni márgenes delimitados, sin líneas de crecimiento radial conspicuas y talos no diferenciados unos de otros. Esta característica llama particularmente la atención, ya que está presente en los especímenes de ambas especies, y, aunque las condiciones ambientales a las que están sometidos los especímenes puede explicar ésta variación fenotípica, en el Morro de la Mancha, Veracruz, observamos estos dos tipos de crecimiento en los especímenes de *R. expansa*, mientras que en las localidades del PTM donde recolectamos *R. hancockii* sólo observamos crecimientos formando medallones orbiculares y en el Golfo de California sólo observamos crecimientos irregulares continuos, nunca mezclados en una misma localidad como en la primera, a pesar de presentar condiciones ambientales similares para el desarrollo de ambas especies. En el análisis molecular que será discutido más adelante, ésta característica cobra cierto sentido en el arreglo de los clados.

### 9.2 Caracterización morfológica

Con base en las características morfológicas diagnósticas identificamos a los especímenes recolectados en el Morro de La Mancha, Veracruz (posible localidad tipo o cercana), como *Ralfsia expansa*, caracterizados por presentar al corte radial longitudinal, simetría predominantemente bilateral en la región central y unilateral hacia los extremos (algunas veces sólo bilateral o unilateral) y un diámetro casi tres veces mayor en los filamentos

postígenos medulares respecto de los filamentos postígenos corticales. Esta variación en el diámetro y la simetría, encontrada no sólo en especímenes distintos sino en un mismo espécimen, ha sido descrita también por Børgesen (1912) en sus especímenes de las islas danesas, Tanaka & Chihara (1980a) en su delimitación de *R. verrucosa* y *R. expansa* y por León-Álvarez & González-González (2003) en sus observaciones al holotipo de Agardh y de especímenes veracruzanos. Estas observaciones son suficientes para reconocer el valor diagnóstico de esta característica en *R. expansa*.

Los especímenes de *Ralfsia hancockii* que fueron recolectados en San José del Cabo, B.C (localidad tipo) y en el PTM, se caracterizan por presentar, al corte longitudinal radial, simetría predominantemente bilateral y delimitación de médula y corteza por una capa central de filamentos que se curvan de manera ascendente y descendente con diámetro similar, poco menos del doble. En el trabajo de León-Álvarez & González-González (2003) se describen dos morfologías de *R. hancockii* en torno a la simetría, una con simetría variable tendiendo a ser bilateral y otra tendiendo al crecimiento unilateral, característica que observaron también en el holotipo de Dawson. En nuestras observaciones de los especímenes de la localidad tipo y los del PTM, la simetría fue predominantemente bilateral, no encontramos especímenes con crecimiento unilateral.

Cuando Tanaka & Chihara (1980 a,b,c 1981 a, b,c) hicieron su revisión de Ralfsiales, describieron los caracteres reproductivos de *Ralfsia expansa* a partir de especímenes japoneses, describieron unangios pedicelados con 3-6 células. Sin embargo, en su revisión no mencionaron a la especie *R. hancockii* descrita por Dawson con unangios pedicelados por 3-6 células. De esta manera *R. expansa* ha sido concebida por diferentes autores de dos maneras, *sensu* Børgesen (1912) (con unangios sésiles o con pedicelos unicelulares) y *sensu* Tanaka & Chihara (1980 a,b,c, 1981 a,b,c) (con unangios pedicelados por 1-6 células). León-Álvarez & González-González (1993, 2003), quienes conciben a *R. expansa sensu* Børgesen, de sus observaciones hechas a especímenes y holotipos de ambas especies, sugirieron que la entidad descrita por Tanaka & Chihara (1980 a,b,c, 1981 a,b,c) era coespecífica con *R. hancockii*.

El valor diagnóstico de los caracteres reproductivos en *Ralfsia expansa* ha sido motivo de controversia porque el holotipo es estéril. Cuando Børgesen describió los caracteres reproductivos en *R. expansa* (unangios con pedicelos unicelulares), también consideró esta característica como esencial para delimitarla de *R. verrucosa*. En nuestros especímenes no fue posible observar unangios por lo que no pudimos constatar la presencia o ausencia del pedicelo, consecuentemente no constatamos el número de células. Sin embargo, consideramos de manera parcial, el valor diagnóstico del carácter ya que las características observadas en nuestros especímenes estériles, son consistentes

con las observadas por León-Álvarez (2005) en especímenes recolectados en la misma localidad en los que describe unangios con pedicelos sésiles o unicelulares. Schnetter (1976) reportó también unangios con pedicelos unicelulares en especímenes de *R. expansa* del Atlántico en Colombia. Pudimos observar la presencia de plurangios intercalares, característica descrita también por León-Álvarez (2005) en un espécimen de Punta Limón, Veracruz.

En nuestros especímenes de *Ralfsia hancockii* encontramos unangios pedicelados por 3-6 células tal como los descritos por Dawson (1944) en el holotipo y los descritos por León-Álvarez & González-González (2003) en sus observaciones del holotipo y en especímenes del PTM. No observamos plurangios en algún espécimen. En las observaciones hechas por Dawson (1944, 1953, 1954), León-Álvarez & González-González (1993, 2003) y Norris (1975) tampoco han sido observados plurangios. Dicha característica es desconocida para la especie desde el holotipo.

Recientemente fue creado un nuevo género denominado *Neoralfsia*, por Lim *et al.* (2007) cuyo origen fueron especímenes japoneses identificados como *Ralfsia expansa sensu* Tanaka & Chihara (1980 a,b,c, 1981 a,b,c). Consecuentemente la especie *R. expansa* fue transferida a este género bajo la nueva combinación *N. expansa*. Sin embargo, no sólo estos especímenes son morfológicamente diferentes de los especímenes veracruzanos (localidad tipo), sino que tal arreglo se basó en el análisis de secuencias moleculares de la región *rbcl* del ADN del cloroplasto en el que no fueron incluidos especímenes mexicanos, consecuentemente especímenes de la localidad tipo en Veracruz, México. Comentamos anteriormente la sugerencia de León-Álvarez & González-González (2003) sobre la coespecificidad de los especímenes descritos por Tanaka & Chihara (1980 a,b,c, 1981 a,b,c) como *Ralfsia expansa* y los descritos por Dawson como *R. hancockii*. Sin embargo, los especímenes japoneses descritos por Lim *et al.* (2007) presentan plurangios subterminales, diferente de lo descrito por Dawson (1947).

Morfológicamente, seguimos considerando a los caracteres diagnósticos ponderados por Børgesen (1912), Dawson (1944), León-Álvarez (2005), León-Álvarez & González-González (1995, 2003) y Tanaka & Chihara (1980 a,b,c, 1981 a,b,c), como válidos para el reconocimiento de las especies de *Ralfsia* en campo. Sin embargo, sugerimos poner atención a la forma de crecimiento. De las dos diferentes formas de crecimiento que observamos en el campo, la que formaba medallones diferenciados con líneas de crecimiento conspicuas, en los especímenes de *Ralfsia hancockii* del PTM, era diferente de la forma de crecimiento irregular y continua sin líneas de crecimiento conspicuas, observada en los especímenes de *R. hancockii* de la localidad tipo.

### 9.3 Divergencia nucleotídica

Los valores de divergencia intergenéricos e intragenéricos obtenidos en el presente estudio fueron comparables, e incluso mayores a los valores reportados por otros autores para el gen *rbcl* en ordenes cercanamente relacionados (Buchanan *et al.*, 2010) con el orden Ralfsiales.

Para el orden Scytosiphonales, Cho *et al.* (2005), registraron valores de divergencia interespecifica de 3.65 a 3.87% entre *Colpomenia peregrina* (Sauvageau) Hamel y *C. bullosa* (D. A. Saunders) Yamada (especie recientemente descrita como fase erecta en el ciclo de vida de *Ralfsia verrucosa* (Buchanan *et al.* 2010)), de 3.80 a 3.94% entre *C. peregrina* y *C. phaeodactyla* M. J. Wynne & J. N. Norris C, y 3.58 a 3.87% entre *C. peregrina* y *C. bullosa*. Los autores reportaron además, valores de divergencia intraespecifica de 0.07% a 1.17% para *C. peregrina*.

Kagome *et al.* (1999), obtuvieron valores intergenéricos de 0.5 a 5.9% para el orden Scytosiphonales, valores mucho menores que los reportados para géneros de Rhodophyta: 3.1 a 11.5% Gelidiales y 1.8 a 6.8% Gracilariales, respectivamente.

Siemer *et al.* (1998) registraron valores de divergencia intergenéricos en Ectocarpales de 7.4% entre *Pylaiella littoralis* (Linnaeus) Kjellman y *Ectocarpus siliculosus* (Dillwyn) Lyngbye.

### 9.4 Análisis filogenéticos

Las topologías resultantes del análisis morfológico y el análisis molecular muestran diferencias sustanciales entre ellas. La topología resultante del análisis morfológico muestra una gran politomía con valores de bootstrap inferiores a 50, en contraste, la topología resultante del análisis molecular mostró mayores valores de bootstrap y PPB, con grupos mejor resueltos.

En ambas topologías es posible observar la agrupación de los especímenes en cuatro clados generales, pero con diferente ubicación en las topologías. Los especímenes de *Ralfsia expansa* de la localidad tipo se ubican en un clado, los especímenes de *R. hancockii* de la localidad tipo están en otro clado, los especímenes de *Neoralfsia expansa* del genbank en otro clado y finalmente los especímenes de *R. fungiformis*, *R. verrucosa* y *R. hesperia* se ubican en otro clado. En el análisis molecular, estos grupos constituyen grupos monofiléticos con valores de bootstrap relativamente altos y valores de PPB elevados, mientras que en el análisis morfológico los clados presentan bajos valores de soporte, ubicados en una gran politomía.

En el análisis morfológico, podemos observar la agrupación de los especímenes de *Ralfsia expansa* de la localidad tipo en el clado I, sin embargo el espécimen GM635 quedó excluido de este grupo y el holotipo de Veracruz. Debemos destacar que el espécimen GM635 sólo se encontró en estado vegetativo, a diferencia de los tres especímenes incluidos en el clado I (GM649, GM650 y GM651), en los cuales se detectó la presencia de pluriloculares. El resto de las características morfológicas descritas fueron similares, por lo que hipotetizamos que el espécimen GM635 se sale del clado por la ausencia de este carácter reproductivo. Con respecto del ejemplar holotipo podemos decir que se sale del clado por la descripción escueta. En el análisis molecular, pudimos observar que se agruparon los 4 especímenes de *Ralfsia expansa* de la localidad tipo junt con los dos especímenes de *R. hancockii* provenientes de Oaxaca y Jalisco, agrupados en el clado I soportado por valores de 67/0.86 (Fig. 13).

Estos seis especímenes se agruparon a su vez en tres subclados; en el primero quedaron agrupados los especímenes de *Ralfsia expansa* GM635 y GM651 que fueron recolectados en una zona con las mismas condiciones ambientales y en nuestras observaciones de campo presentaban un crecimiento extendido en el sustrato y sin márgenes diferenciados. *R. expansa* GM635 y GM651 presentaron una divergencia intraespecífica de 2%, por lo que se sugiere que son la misma especie.

En el segundo subclado, quedaron agrupados los dos especímenes de *Ralfsia hancockii* PTM9178 y PTM8982, el primero presentaba uniloculares y el segundo se encontró en estado vegetativo. En el análisis morfológico, esta diferencia los separó, quedando el primer espécimen agrupado con aquellos provenientes de la localidad tipo que presentaban igualmente uniloculares. *R. hancockii* PTM9178 y *R. hancockii* PTM8982 presentaron una divergencia intraespecífica de 4%, por lo que se sugiere que son especies diferentes.

En el tercer subclado quedaron agrupados los especímenes de *Ralfsia expansa* GM649 y GM650, los cuales en el campo presentaban un crecimiento en forma de medallón con márgenes bien diferenciados. *R. expansa* GM650 y *R. expansa* GM649 presentaron una divergencia intraespecífica de 1%, por lo que se sugiere que son la misma especie.

Con respecto a los especímenes de *Neoralfsia expansa*, en el análisis morfológico los ejemplares provenientes de Japón y Malasia quedaron agrupados en el clado II, hermano al clado I. En el análisis molecular estos especímenes quedaron agrupados en el clado IV hermano al clado III. Este clado fue monofilético en el análisis molecular y presentó mayores valores de soporte, con respecto al análisis morfológico. En el trabajo de Lim *et al.* 2007 el arreglo de estos tres especímenes si coincidió con nuestro arreglo del análisis molecular y estuvo soportado por un valor de bootstrap de 100. *Neoralfsia expansa*



AB250077 y AB250078 presentaron una divergencia intraespecífica de 3.5% y AB250078 presentó una divergencia de 2.1% y 3.3% respecto de AB250077 y AB250079 respectivamente, por lo que se sugiere que son especies diferentes.

Con respecto a los especímenes de *Ralfsia hancockii*, se agruparon en el clado III (con bajos valores de soporte) en el análisis morfológico, incluyendo especímenes de la localidad tipo y de Jalisco y Oaxaca. Los tres especímenes de la localidad tipo y Oaxaca fueron encontrados en estado reproductivo a diferencia del espécimen de Jalisco que se encontró en estado vegetativo. También se agrupó en este clado el espécimen de *R. hesperia* (PTM8970). En el análisis molecular los especímenes de *R. hancockii* de la localidad tipo quedaron agrupados en el clado II sustentado con los valores 100/1.00 y los especímenes del Pacífico mexicano quedaron agrupados en el subclado 2 del clado I. *R. hancockii* PTM9165 y PTM9167 presentó una divergencia intraespecífica de 0.08%, por lo que se sugiere que son la misma especie.

Finalmente en el análisis morfológico el clado IV, con valor de bootstrap menor a 50, quedó conformado por los especímenes de *Ralfsia fungiformis* y en un clado basal quedó agrupado el espécimen de *R. verrucosa*. En el análisis molecular, dichos especímenes se agruparon en el clado III (con altos valores de soporte 77/1.00), junto con el espécimen de *R. hesperia* (PTM8970) de Jalisco y el espécimen de *R. verrucosa* (AB250072). *Ralfsia fungiformis* EU579936 y AB250071 presentaron una divergencia intraespecífica de 0.8%, por lo que se sugiere que son la misma especie. *R. verrucosa* presentó una divergencia de 4.6 a 4.7% respecto de *R. fungiformis* EU579936 y AB250072 respectivamente, por lo que se sugiere que son especies diferentes. *R. hesperia* presentó una divergencia interespecífica de 9.9% respecto de *R. fungiformis* y de 9.3% respecto de *R. verrucosa*, por lo que se sugiere que son especies diferentes.

Los valores de divergencia entre los clados fueron:

Clado I y clado II: oscilaron entre 6.2 a 9.9%, por lo que consideramos que los especímenes que conforman el clado I pertenecen a un género diferente al que pertenecen los especímenes que conforman el clado II.

Clado I y clado III: oscilaron entre 10.6 a 12.7%, por lo que consideramos que los especímenes que conforman el clado I pertenecen a un género diferente al que pertenecen los especímenes que conforman el clado III.

Clado I y clado IV: oscilaron entre 9.8 a 14.8%, por lo que consideramos que los especímenes que conforman el clado I pertenecen a un género diferente al que pertenecen los especímenes que conforman el clado IV.

Clado II y clado III: oscilaron entre 10.6 a 12.7%, por lo que consideramos que los especímenes que conforman el clado II pertenecen a un género diferente al que pertenecen los especímenes que conforman el clado III.

Clado II y clado IV: oscilaron entre 8.9 a 11.5%, por lo que consideramos que los especímenes que conforman el clado II pertenecen a un género diferente al que pertenecen los especímenes que conforman el clado IV.

Clado III y clado IV: oscilaron entre 10 a 12.6%, por lo que consideramos que los especímenes que conforman el clado III pertenecen a un género diferente al que pertenecen los especímenes que conforman el clado IV.

Considerando que *Ralfsia fungiformis* es la especie tipo del género, podemos decir que en el Pacífico mexicano sólo tenemos a la especie *R. hesperia*, ya que en el análisis molecular que fue el mejor resuelto, fue el único espécimen que se agrupó con las especies del género, en contraste con los especímenes de *R. expansa* y *R. hancockii* que se agruparon en clados distantes con valores de divergencia intergenérica altos. Este arreglo sugiere que lo que conocemos como *Ralfsia* en México está conformado por más de una entidad específica y géneros diferentes.

Los resultados que obtuvimos en el presente estudio, nos permiten inferir que tanto la especie *Ralfsia expansa* como la especie *R. hancockii*, no pertenecen al género *Ralfsia*, incluso entre individuos de una especie podría estar dándose un proceso de especiación, ya que los valores de divergencia intraespecífica son altos.

Recientemente han sido publicados trabajos basados en evidencia molecular, en los que se sugiere que algunas especies de *Ralfsia* podrían ser la fase costrosa en el ciclo de vida de otras especies del orden Scytosiphonales, como el trabajo de Buchanan *et al.* (2010) en el que sugiere que *R. verrucosa* es la fase costrosa en el ciclo de vida de *Colpomenia bullosa*.

Bajo esta idea sospechamos que tanto los especímenes de *Ralfsia expansa* agrupados en el clado I, como los especímenes de *R. hancockii* agrupados en el clado II, no pertenecen al género *Ralfsia*, sino a un nuevo género aún no descrito o a alguna fase en el ciclo de vida de otras especies. Con los datos generados en el presente estudio nos resulta imposible decir más al respecto pero queda como una perspectiva a futuro.

De los dos análisis realizados en el presente estudio (morfológico y molecular), consideramos que el que dio una hipótesis mejor resuelta a nivel de clados y mejor soportada por los valores de consistencia fue el análisis molecular. Consideramos que debido a la gran sobreposición de caracteres que se presenta entre las especies del

género *Ralfsia*, es difícil establecer hipótesis filogenéticas sobre la base de la evidencia morfológica. Sin embargo, aunque aún no se ha estudiado mucho al respecto, es posible establecer hipótesis de tipo molecular.

Entre el análisis de Máxima Parsimonia y el de Inferencia Bayesiana realizados con los caracteres moleculares, ambos mostraron la misma hipótesis filogenética, aunque el árbol mejor soportado por valores de consistencia más altos fue el análisis bayesiano.

En la primera hipótesis filogenética de algas pardas costrosas realizada por Lim *et al.* (2007) sobre la base de los caracteres moleculares, se propuso la creación de una nueva familia, Neoralfsiaceae, y un nuevo género, *Neoralfsia*. Esta propuesta fue sustentada por la especie *Ralfsia expansa* (como *Miryonema expansum*) que fue referida como el basónimo en esta nueva propuesta. Sin embargo, tras los análisis realizados en el presente estudio y las hipótesis filogenéticas generadas con los caracteres morfológicos y moleculares de los especímenes de *R. expansa* de la localidad tipo en México, estamos seguros de que la especie *R. expansa* no es el basónimo de esta nueva propuesta.

Creemos que es importante la retipificación de la familia Neoralfsiaceae y el género *Neoralfsia*, pues como bien queda claro a partir de este análisis, tampoco es una entidad perteneciente al género *Ralfsia*. No podemos decir si consideramos o no que la familia sea también distinta a Ralfsiaceae ya que desconocemos los valores de divergencia entre las secuencias de los autores. Sin embargo, si consideramos que el género debe ser retipificado y la especie *R. expansa* debe ser restaurada momentáneamente como especie válida en el género *Ralfsia*.

Bajo el análisis de la evidencia morfológica y molecular, consideramos que la entidad descrita por Tanaka & Chihara (1980 a,b,c, 1981 a,b,c) es completamente diferente a cualquiera de las dos especies mexicanas, pues si bien es cierto los plurangios han sido descritos en *Ralfsia expansa*, la inserción en el filamento reproductivo es diferente, además el número de células en el pedicelo de los unangios no corresponde con lo descrito para los especímenes veracruzanos de la localidad tipo. Consideramos que lo que Tanaka & Chihara (1980 a,b,c, 1981 a,b,c) describen como *R. expansa*, con unangios pedicelados por 3-6 células y plurangios insertos subterminalmente, está más relacionado con el auténtico basónimo de *Neoralfsia expansa* que molecularmente ha quedado separada de *R. expansa*.

A pesar del arreglo diferenciado entre los especímenes de *Ralfsia expansa*, *R. hancockii* y *Neoralfsia expansa* nos permite afirmar que se tratan de entidades diferentes, continúa el problema en el clado de los especímenes de *R. expansa* con los especímenes de *R. hancockii* del PTM, pues aunque como ya discutimos no podemos decir que se traten de

una misma especie sino de especies diferentes, no podemos afirmar su posición taxonómica, aunque si podemos afirmar que son entidades diferentes entre ellas y diferentes de *Ralfsia* y *Neoralfsia*.

Consideramos que el gen *rbcL* es un gen suficientemente robusto para trabajar a los especímenes a un nivel de resolución específico. Sin embargo, la falta de estudios dedicados a las algas pardas costrosas en el mundo genera un sesgo en la resolución de las problemáticas, no obstante, con el presente estudio y el realizado por Lim *et al.* (2007), se tienen las primeras aproximaciones que arrojan resultados muy interesantes y con potencial de continuar en la línea y seguir obteniendo resultados igualmente interesantes que vayan poco a poco resolviendo la problemática taxonómica en la que se encuentra inmersa el orden Ralfsiales.

## 10. CONCLUSIONES

Los valores de divergencia genérica en el gen *rbcl* permitieron segregar categorías taxonómicas a nivel genérico y específico.

Las hipótesis generadas a partir de los caracteres morfológicos y moleculares permitieron resolver las relaciones filogenéticas entre las especies mexicanas del género *Ralfsia*.

La topología resultante del análisis morfológico no fue útil en la resolución de las relaciones filogenéticas de las especies mexicanas del género *Ralfsia*, sin embargo, el uso de los caracteres morfológicos permitió explicar la agrupación brindada en el análisis molecular.

En el análisis morfológico y el análisis molecular, la topología más estable y mejor resuelta fue la resultante del análisis de las secuencias parciales del gen *rbcl*.

Los caracteres moleculares permitieron hacer modificaciones al esquema de clasificación del género *Ralfsia* a nivel intragenérico e intraespecífico. *Ralfsia expansa* GM635 y GM651 constituyen la misma entidad taxonómica, estas a su vez constituyen una entidad taxonómica distinta de *R. expansa* GM650 y GM649, quienes constituyen una misma entidad taxonómica. *R. hancockii* PTM9178 y PTM8982 constituyen entidades taxonómicas distintas, estas a su vez constituyen una entidad taxonómica distinta de *R. hancockii* PTM9167 y PTM9165. Los especímenes de *Neoralfsia expansa* AB250077, AB250078 y AB250079 constituyen tres entidades taxonómicas distintas.

Los taxa que se reconocen al final del presente estudio a partir del género *Ralfsia* en México son: tres géneros y seis especies. Género I: *Ralfsia sensu stricto*, con la especie *R. hesperia*. Género II: aún no descrito, con la especie 1 (GM635 y GM651), la especie 2 (PTM9178), la especie 3 (PTM8982) y la especie 4 (GM 650 y GM649). Género III: aún no descrito, con la especie 5 (PTM 9165 y PTM9167).

Con la base de la evidencia molecular consideramos que *Ralfsia expansa* y *Ralfsia hancockii* son especies diferentes entre ellas y diferentes de *Neoralfsia expansa*. Por lo tanto, *Myrionema expansum* no es el basónimo del género *Neoralfsia*. *R. expansa* es una especie válida en el género y sugerimos retipificar a *Neoralfsia*.

*Ralfsia hancokii* E. Y. Dawson está restringida al Golfo de California y se caracteriza por presentar una simetría bilateral, médula y corteza diferenciada por la ramificación ascendente y descendente de los filamentos vegetativos, unangios pedicelados por 3-6

células y un crecimiento en campo irregular y continuo sin líneas de crecimiento conspicuas.

Bajo el epíteto de *Ralfsia expansa* (J. Agardh) J. Agardh se ha reportado como una sola especie en el Atlántico mexicano a dos entidades taxonómicas distintas. Una caracterizada por presentar simetría uni ó bilateral, médula y corteza diferenciadas por el diámetro de los filamentos vegetativos, que en médula es del doble que en corteza, unangios con pedicelos unicelulares y un crecimiento en campo a manera de medallón diferenciado con líneas de crecimiento conspicuas. Otra, morfológicamente idéntica pero con un crecimiento irregular continuo y sin líneas de crecimiento conspicuas.

En el PTM se ha reportado como *Ralfsia hancockii* a una posible especie relacionada con *R. expansa* del Atlántico mexicano, caracterizada por presentar simetría bilateral, médula y corteza diferenciada por la ramificación ascendente y descendente de los filamentos vegetativos, unangios pedicelados por 3-6 células y un crecimiento en campo a manera de madallones diferenciados con líneas de crecimiento conspicuas.

En México, hasta el momento se conoce como *Ralfsia*, sólo a *R. hesperia*. Lo que se ha registrado como *R. expansa* y *R. hancockii* son especies con estatus taxonómico aún desconocido.

El objetivo del presente estudio se cumplió totalmente.

## 11. PERSPECTIVAS

Consideramos necesario enriquecer los resultados morfológicos haciendo observaciones a individuos de distintas poblaciones de *Ralfsia expansa* y *R. hancockii* de Veracruz y el PTM para comparar medidas celulares que puedan ayudar en la delimitación de las formas molecularmente diferenciadas en el presente estudio.

Es necesario también incluir en el análisis molecular de secuencias de *rbcL* del ADN del cloroplasto, a más especímenes tanto de *Ralfsia expansa* y *R. hancockii* de Veracruz y el PTM, como de otras especies de *Ralfsia* que permitan una mejor resolución de los clados generados en el presente estudio.

Consideramos importante probar con nuevos marcadores moleculares que ofrezcan un nivel de resolución más fino a nivel específico, como los genes mitocondriales *cox1* y *cox3*, a fin de poder proponer hipótesis taxonómicas fuertemente sustentadas sobre el estatus de los especímenes estudiados.

Partiendo del supuesto de que algunas especies pudieran estar relacionadas como fases costrosas en el ciclo de vida de otras especies, como las especies del orden Scytosiphonales, sugerimos incluir en el análisis molecular, representantes de dicho orden.

Finalmente, consideramos necesaria una reevaluación de la taxonomía del género *Ralfsia* bajo el criterio molecular.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agardh, C.A. 1817. Synopsis Algarum Scandinaviae, adjecta dispositione Universati Algarum. Lundae.
- Agardh, J.G. 1847. Nya alger från Mexico. Öfversigt af Kongl. Vetenskaps-Adademiens Förhandlingar, Stockholm 4: 5-17.
- Agardh, J.G. 1848. Species genera et ordines algarum, seu descriptiones succinctae specierum, generum et ordinum, quibus algarum regnum constituitur. Volumen Primum. Algas fucoideas complectens. pp. viii + 363. Lundae [Lund]: C.W.K. Gleerup.
- Bacci, D. S. 2005. Estudos Taxonômicos do Gênero *Chondria* (Ceramiales, Rhodophyta) no litoral dos estados de Sao Paulo e EspíritoSanto, Brasil. Tesis de maestría, Sao Paulo, Brasil.
- Batters, E.A.L. 1890. A list of the marine algae of Berwick-on-Tweed. Alnwick. Hist. Berwickshire Nat. Club 12: 221-392, pls 7-11.
- Batters, E.A.L. 1902. A catalogue of the British marine algae being a list of all the species of seaweeds know to occur on the shores of the British Islands, with the localities where they are found. **Journal of Botany**, Lond. 40: 1-107.
- Bessey, C.E. 1907. A synopsis of plant phyla. Nebraska University Studies 7: 275-373, 1 plate.
- Bittner, L., Payri, C.E., Couloux, A., Cruaud, C., de Reviere, B. & Rousseau, F. 2008. Molecular phylogeny of the Dictyotales and their position within the Phaeophyceae, based on nuclear, plastid and mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49 (1), 211-226.
- Børgesen, F. 1912. Tow crustaceous brown algae from the Danish West Indies. Padova. Nuova Notarisa, serie XXIII: 1-7.
- Buchanan, J., Boo, S. & Lee K. 2010. *Colpomenia bullosa* crust masquerading as *Ralfsia verrucosa* (Phaeophyceae) in southeast Australia. **Phycologia**, 49: 617-627.
- Cho, G.Y., S.M., Boo, W., Nelson & M.N. Clayton. 2005. Genealogical partitioning and phylogeography of *Colpomenia peregrine* (Scytosiphonaceae, Phaeophyceae), based on plastid *rbcL* and nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. **Phycologia**, 44 (1): 103-111.
- Dawson, E.Y. 1944. The marine algae of the Gulf of California. Allan Hancock Pacific Expeditions 3: i-v +189-432, Plates 31-77.
- Dawson, E.Y. 1953. Preliminary results of a marine algal reconnaissance of the Pacific Mexican coast. Proc. Sev. Pac. Sc. Congr. (Auckland, 1949) 5: 43-46.
- Dawson, E.Y. 1954. The marine flora of San Benedicto Island, Mexico following the volcanic eruption of 1952-1953. VIII Congr. Int. Bot. (Paris, 1954) 17: 157-158.
- De Toni, J.B. 1895. Sylloge Algarum. Fucoideae Padua 3: 638 pp.
- Earle, S.A. 1969. Phaeophyta of the Eastern Gulf of Mexico. **Phycologia**, 7(2): 71-254.



- Farlow, W.G. 1881. The marine algae of New England. *In*: Report of the U.S. Commissioner of Fish and Fisheries for 1879. (Eds), pp. 1-210. Washington.
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *American Naturalist* 125:1-15.
- Fletcher R.L. 1987. Seaweeds of the British Isles, vol. 3. British Museum, London. 330 pp.
- Fries, E.M. 1845. Summa vegetabilium Scandinaviae, seu enumeratio, systematica et critica, plantarum tum cotyledonearum, quum nemearum inter mare occidentale et album, inter Eidoram et Nordkap, hactenus lectarum, una cum singulae distributione geographica. pp. Sectio prior: [i], [iii], [i]-258, signatures 1-16 in fours. Holmiae & Lipsiae [Stockholm & Leipzig]: A. Bonnier.
- Garza-Barrientos, M. A. 1976. Primeras consideraciones referentes a la flora marina del sureste de la República Mexicana. *Mem. I. Reun. Lat. Cienc. Tecnol. Ocean. (Mex.)* p. 210-239.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2011. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 31 March 2009.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit a user\_friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hollenberg G.J. 1969. An account of the Ralfsiaceae (Phaeophyta) of California. **Journal of Phycology**, 5: 290-301.
- Huelsenbeck J.P. & F., Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Department of Biology, University of Rochester, Rochester, NY.
- Huerta, M. L. & M. A. Garza-Barrientos. 1980. Contribución al conocimiento de la flora marina de la zona sur del litoral de Quintana Roo, México. *An. Esc. Nac. Cienc. Biol. (Mex.)* 23: 25-44.
- Huerta, M. L., C. Mendoza-González & L. E. Mateo-Cid. 1987. Avance sobre un estudio de las algas marinas de la Península de Yucatán. **Phycologia**, 62(1): 23-53.
- Hwang, I., Lee, W., Kim, H. & De Clerck, O. 2009. Taxonomic reappraisal of *Dilophus okamurae* (Dictyotales, Phaeophyta) from the western Pacific Ocean. **Phycologia**, 48(1): 1-12.
- Joly A.B., 1965. Flora marinha do litoral norte do Estado do Sao Paulo e regioes circunvizinhas. *Boletim* 294, Faculta de de Filosofia, Ciencias e Letras da Universidade de Sao Paulo, Botánica 21: 5-393.
- Joly, A. B. 1967. Gêneros de algas marinhas da costa Atlântica Latino-Americana. (Editora da Universidade de São Paulo).
- Kogame, K., A. Kurihara, G.Y., Cho, K. M., Lee, A.R., Sherwood & S.M., Boo. 2011. *Petalonia tatewakii* sp. nov. (Scytosiphonaceae, Phaeophyceae) from the Hawaiian Islands. **Phycologia**, September 2011, Vol. 50, No. 5, pp. 563-573.
- Kawai, H., H., Sasaki, Y., Maeda & S., Arai. 2001. Morphology, life history, and molecular phylogeny of *Chorda rigida*, sp. nov. (Laminariales, Phaeophyceae) from the Sea of Japan and the genetic diversity of *Chorda* filum. **Journal of Phycology**, 37:130-42.

- Kogame K., T. Horiguchi & M. Masuda. 1999. Phylogeny of the order Scytosiphonales (Phaeophyceae) based on DNA sequences of *rbcl*, partial *rbcS*, and partial LSU nrDNA. **Phycologia**, 38:496-502.
- Krienitz, L., Bock, C., Dadheech, P.K. & Pröschold T. 2011. Taxonomic reassessment of the genus *Mychonastes* (Chlorophyceae, Chlorophyta) including the description of eight new species. **Phycologia**, 50: 89-106.
- Kucera, H. & Saunders, G.W. 2008. Assigning morphological variants of *Fucus* (Fucales, Phaeophyceae) in Canadian waters to recognized species using DNA barcoding. **Botany**, 86: 1065-1079.
- Kuntze, O. 1898. Revisio generum plantarum. Part 3 (3). pp. 1-576. Leipzig, London, Milano, New York, Paris: Arthur Felix, Dulau & Co., U. Hoepli, Gust. A. Schechert, Charles.
- Kützing, F.T. 1849. Species Algarum. F.A. Brockhaus, Leipzig. 922 pp.
- Lawson G.W. & D.M., John. 1982. The marine algae and coastal environment of tropical West Africa. **Nova Hedwigia**, 70: 1-455.
- León-Álvarez, D. 1996. Feofitas costrosas del Pacífico tropical mexicano: contribución a la flora tónica de macroalgas de la región. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 290 pp.
- León-Álvarez, D. 2005. The morphology of *Ralfsia expansa* (J. Agarh) J. Agarh (Ralfsiaceae, Phaeophyta) from Veracruz, México. **Cryptogamie, Algology**, 26(4): 343-354.
- León-Álvarez, D. & J. González-González. 1993. Algas costrosas del Pacífico Tropical. **Biodiversidad Marina y Costera de México**. 865 pp.
- León-Álvarez, D. & J. González-González. 1995. Characterization on the Enviromental Distribution and Morphs of *Ralfsia hancockii* Dawson (Phaeophyta) in the Mexican Tropic Pacific. **Botánica Marina**, vol. 38: 359-367.
- León-Álvarez, D. & J. González-González. 2003. The morphological distinction of *Ralfsia expansa* and *R. hancockii* (Ralfsiaceae, Phaeophyta) from Mexico. **Phycologia**, 42(6): 613-621, 12 figs., 6 tablas.
- León-Álvarez & Norris, J. N., 2005. Terminology and Position of Reproductive Structures in Crustose Brown Algae: Misapplication, Confusion and Clarification. **Cryptogamie, Algology**, 26 (1): 91-102.
- Lim, P.-E., Sakaguchi, M., Hanyuda, T., Kogame, K., Phang, S.-M. & Kawai, H. 2007. Molecular phylogeny of crustose brown algae (Ralfsiales, Phaeophyceae) inferred from *rbcl* sequences resulting in the proposal for Neoralfsiaceae fam. nov.. **Phycologia**, 46(4): 456-466, 1 fig., 3 tablas.
- Liu C., Huang, X., Wang, X., Zhang X. & Li G. 2006. Phylogenetic studies on two strains of Antarctic ice algae based on morphological and molecular characteristics. **Phycologia**, 45: 190-198.
- López-Curto, M. de L., Márque-Guzmán, J. & Murguía-Sánchez, G. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en Angiospermas. Las Prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM. 178 pp.

- Mattio, L. & Payri, C. 2010. Assesment of five markers as potential barcodes for identifying *Sargassum* subgenus *Sargassum* species (Phaeophyceae, Fucales). **Cryptogamie algology**, 31(4): 467-485.
- McDevit, D. & Saunders, G.W. 2009. On the utility of DNA barcoding for species differentiation among brown macroalgae (Phaeophyceae) including a novel extraction protocol. **Phycological Reserch**, 57: 131-141.
- Nakamura Y. 1972. A proposal on the classification of the Phaeophyta. In: *Contributions to the systematics of the benthic marine algae of the North Pacific* (Ed. by I.A. Abbott & M. Kurogi), pp. 147-156. Japanese Society of Phycoiogy, Kobe.
- Nelson W.A. 1982. A critical review of the order Ralfsiales, Ralfsiaceae and the taxonomic position of *Analipus japonicas* (Harv.) Wynne (Phaeophyta). **British Phycotogical Journal**, 17: 311-320.
- NCBI (Genebank). 2003. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>.
- Ni-Ni-Win, Hanyuda,T., Arai,S., Uchimura,M., Abbott,I.A. & Kawai,H. 2008. Three new records of *Padina* in Japan based on morphological and molecular markers. **Phycological Reserch**, 56, 288-300.
- Norris, J.N. 1975. Marine Algae of the Northern Gulf of California. PhD. Dissertation. University of California, Santa Barbara, Calif. 575 pp.
- Perestenko, L.P. (1980). Vodorosli Zaliva Petra Velikogo [The seaweeds of Peter the Great Bay]. pp. 1-232. Moscow: Akad. Nauk. SSSR. Bot. Inst.
- Posada, D. & Crandall, K.A. 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14: 817-818.
- Sánchez, R.M.E., 1980. Ficoflora del sustrato rocoso dentro de las costas del Golfo de México, México. *Bol. Inst. Oceanogr. (Sao Paulo)*. 29 (2): 347-350.
- Schnetter R., 1976. Marine algen der Karibische Küsten von Kolumbien I. Phaeophyceae, Band 24. Vaduz, J. Cramer, 125 p.
- Setchell, W.A. & N.L. Gardner. 1924. Phycological contributions. VII. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 13(1): 1-13.
- Setchell, W.A. & N.L. Gardner. 1925. The marine algae of the Pacific coast of North America. Part III. Melanophyceae. *Univ. Calif. Publ. Botany*, 8: 383-398.
- Siemer, B.L., W.T., Stam, J.J., Olsen & P.M. Pedersen. 1998. Phylogenetic relationships of the brown algal orders. Ectocarpales, Chordariales, Dictyosiphonales and Tilopteridales (Phaeophyceae) based on rubisco large subunit and spacer sequences. **Journal of phycology**, 34: 1038-1048.
- Silva, P.C., P.W. Basson & R.L. Moe, 1996. *Catalogue of Benthic Marine Algae of the India Ocean*. University of California Press, Berkeley (EUA). 1259 pp.
- Silva P.C. & B. De Reviere. 2000. Ordinal names in the Phaeophyceae. **Cryptogamie Algologie**, 21: 49-58.
- Smith, J.E. & J. Sowerby. 1843. *English botany suppl.* Vol. 3 pp. pl 2866. London: Longman.
- Smith, G.M. (1944). *Marine algae of the Monterey Peninsula*. pp. i-ix, 1-622, 98 pls. Stanford: Stanford University Press.
- Swofford, D .2003. PAUP\*. *Phylogenetic analysis Using parsimony (\*and other methods)*, version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

- Tanaka J. & M. Chihara. 1980a. Taxonomic study of the Japanese crustose brown algae (1). General account and the order of Ralfsiales. **Journal of Japanese Botany**, 55: 193-201.
- Tanaka J. & M. Chihara. 1980b. Taxonomic study of the Japanese crustose brown algae (2). *Ralfsia* (Ralfsiaceae, Ralfsiales), part 1. **Journal of Japanese Botany**, 55: 225-236.
- Tanaka J. & Chihara M. 1980c. Taxonomic study of the Japanese crustose brown algae (3). *Ralfsia* (Ralfsiaceae, Ralfsiales), part 2. **Journal of Japanese Botany**, 55: 337-342.
- Tanaka J. & Chihara M. 1981a. Taxonomic study of the Japanese crustose brown algae (4). *Ralfsia* (Ralfsiaceae, Ralfsiales), part 3. **Journal of Japanese Botany**, 56: 97-104.
- Tanaka J. & Chihara M. 1981b. Taxonomic study of Japanese crustose brown algae (5). *Endoplura* and *Diplura* (Ralfsiaceae, Ralfsiales). **Journal of Japanese Botany**, 56: 153-160.
- Tanaka J. & Chihara M. 1981c. Taxonomic study of the Japanese crustose brown algae (6). *Pseudolithoderma* (Lithodermataceae, Ralfsiales). **Journal of Japanese Botany**, 56: 377-381.
- Tanaka J. & Chihara M. 1982. Morphology and taxonomy of *Mesospora schmidtii* Weber van Bosse, Mesosporaceae fam. nov. (Ralfsiales, Phaeophyceae). **Phycologia**, 21: 382-389.
- Taylor, W.R. 1945. Pacific marine algae of the Allan Hancock Expeditions to the Galapagos Islands. Allan Hancock Pacific Expeditions 12: i-iv, 1-528, 3 figs, 100 pls.
- Taylor, R. W., 1960. Marine Algae of the eastern tropical and subtropical coasts of the Americas. Ann Arbor, The University of Michigan Press. 870 pp.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Treviño, M.L., 1986. Estudio florístico del ambiente marino escollera en la zona costera de Lázaro Cárdenas, Michoacán. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 92 pp.
- Valenzuela, D. H. 1987. Contribución al conocimiento de la vegetación marina del litoral rocoso de Playa Escondida, Veracruz. Tesis Profesional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. México. 101 pp.
- Vis, O. & Oliveira, C. 2010. Phylogenetic relationships in *Kumanoa* (Batrachospermales, Rhodophyta) species in Brazil with the proposal of *Kumanoa amazonensis* sp. nov. **Phycologia**, 49: 97-103.
- Weber-Van Bose A., 1913. Liste des algues du Siboga. Siboga Expeditie Monographie 59a, 186p., 5 láms.
- Womersley, H.B.S. 1987. The Marine Benthic Flora of Southern Australia. Part. III. Ed. South Australian Government, Printing Division, Adelaide. 484 pp.

- Zavaleta, C. M. 1991. Ecología de la ficoflora de las Islas arrecifales: Cayo Arcas, Triángulos Oeste, Cayo Arenas e Isla Pérez, Sonda de Campeche, México. Tesis Profesional. Facultad de Biología, Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 76 pp.