

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**



**“REVISIÓN DEL GÉNERO *Rhodymenia* (RHODOPHYTA) DE LA COSTA CENTRAL DEL PERÚ MEDIANTE ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y CÓDIGO DE BARRAS DE ADN”**

Presentada por:

**MELISSA LIA PEREZ ALANIA**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO**

Lima – Perú

**2021**

---

La UNALM es la titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art. 24 - Reglamento de Propiedad Intelectual)

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**“REVISIÓN DEL GÉNERO *Rhodymenia* (RHODOPHYTA) DE LA  
COSTA CENTRAL DEL PERÚ MEDIANTE ANÁLISIS  
MORFOLÓGICO Y CÓDIGO DE BARRAS DE ADN”**

Presentada por:

**MELISSA LIA PEREZ ALANIA**

Tesis para Optar el Título Profesional de:

**BIÓLOGO**

Sustentada y aprobada por el siguiente jurado:

---

Mg.Sc. Rosa Espejo Joya  
PRESIDENTE

---

Mg.Sc. Abelardo Calderón Rodríguez  
MIEMBRO

---

Mg.Sc. Roberto Mansilla Samaniego  
MIEMBRO

---

Dra. Patricia Liliana Gil Kodaka  
ASESORA

---

Dra. Natalia Cristina Arakaki Makishi  
CO ASESORA

**DEDICATORIA**

*A mi familia, gracias por todo su apoyo y enseñanzas*

*A mis abuelos, mis cómplices*

## AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica por el financiamiento de esta investigación como parte del proyecto “Diversidad de macroalgas de la costa central del Perú usando código de barras de ADN, en las perspectivas de sus usos potenciales y aplicaciones biotecnológicas”. A la Universidad Nacional Agraria La Molina y al Instituto del Mar del Perú.

A mis asesoras, la Dra. Patricia Gil Kodaka y la Ph.D. Natalia Arakaki Makishi, gracias por sus enseñanzas y apoyo durante esta investigación, y por la oportunidad de descubrir el mundo de las macroalgas. Al equipo de investigación y gestión administrativa del proyecto. A la Blga. Albertina Kameya, la Blga. Patricia Carbajal Enzian, al Mg. Alex Gamarra Salazar y a la Blga. Sara Clemente del Área Funcional de Investigaciones en Biodiversidad, por apoyarnos con el uso de las instalaciones, así como sus enseñanzas durante las colectas y acerca de la importancia de la colección científica. A los tesistas, voluntarios y alumnos que participaron en la recolección y procesamiento del material, su apoyo que fue indispensable para los resultados de este trabajo. A la Ph. D. Mónica Arakaki Makishi, gracias por su paciencia, enseñanzas y apoyo en los análisis bioinformáticos. A la profesora María Eliana Ramírez, cuya guía al iniciar la recolección fue fundamental, y que nos inspira con su esfuerzo y entusiasmo en el estudio de las algas. Un agradecimiento especial a la Ph. D. Florence Tellier por su apoyo y disposición durante la revisión de esta tesis, sobretodo durante el proceso de redacción.

Gracias a los miembros del Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos. A la M.Sc. Cecil Tenorio, la Blga. Hanna Hernández, al Bach. Marco Aguirre y al Blgo. Pedro Sánchez, no solo por su guía y enseñanzas, si no también por la calidez y buen humor que brindan al espacio de trabajo. A Paola, Evelyn, Jorman, Sandy, Diego y Sigfried, gracias por la amistad y los momentos compartidos durante el desarrollo de nuestras tesis.

Gracias a los miembros de mi jurado, la Dra. Rosa Espejo, el Mg.Sc. Roberto Mansilla y el Mg.Sc. Abelardo Calderón, cuyas observaciones permitieron mejorar este trabajo. A la Ph.D. Alexandra Elbakyan, cuyo trabajo ha permitido el acceso a literatura científica a estudiantes alrededor del mundo.

Finalmente y muy importante, gracias a mi familia por su apoyo y cariño incondicional, soy muy afortunada de contar con ustedes y con su ejemplo de vida.

# ÍNDICE GENERAL

RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	vii
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. GÉNERO <i>Rhodymenia</i> .....	4
2.1.1. MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA .....	4
2.1.2. ESPECIES DE <i>Rhodymenia</i> EN PERÚ .....	6
2.2. TÉCNICAS MOLECULARES EN TAXONOMÍA.....	8
2.2.1. CÓDIGO DE BARRAS DE ADN.....	13
2.2.2. USO DE TÉCNICAS MOLECULARES EN LA TAXONOMÍA DE <i>Rhodymenia</i> .....	14
III. METODOLOGÍA .....	15
3.1. ZONAS DE COLECTA .....	15
3.2. COLECTA, PRESERVACIÓN Y REVISIÓN DE MUESTRAS.....	15
3.3. ANÁLISIS MOLECULAR .....	17
3.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN.....	17
□ EXTRACCIÓN CON CTAB .....	19
□ EXTRACCIÓN CON EL KIT GF-1 PLANT EXTRACTION.....	19
3.3.2 OBTENCIÓN DE SECUENCIAS.....	20
3.3.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS.....	21
3.3.4 DELIMITACIÓN DE ESPECIES .....	23
□ MODELO GENERALIZADO MIXTO DE YULE Y COALESCENCIA.....	23
□ ÁRBOLES POR PROCESOS DE POISSON .....	24
3.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO .....	25
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	26
4.1 MORFOESPECIES DE <i>Rhodymenia</i> .....	26
4.2 ANÁLISIS MOLECULAR .....	26

4.2.1. ANÁLISIS NEIGHBOUR-JOINING Y DISTANCIAS GENÉTICAS .....	26
4.2.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS .....	30
4.2.3. DELIMITACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES .....	33
4.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO .....	35
□ <i>Rhodymenia corallina</i> (BORY) GREVILLE (Figuras 5 y 6).....	35
□ <i>Rhodymenia corallina</i> 2 (Figura 7) .....	38
□ <i>Rhodymenia</i> sp. (Figura 8).....	40
□ <i>Rhodymenia skottsbergii</i> E. Y. DAWSON (Figura 9).....	42
□ <i>Rhodymenia flabellifolia</i> (BORY) MONTAGNE (Figura 10).....	44
4.4 DISCUSIÓN .....	48
V. CONCLUSIONES .....	54
VI. RECOMENDACIONES .....	55
VII. BIBLIOGRAFÍA .....	56
VIII. ANEXOS .....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de <i>Rhodymenia</i> registradas para Perú, localidad tipo y localidades registradas en Perú.....	9
Tabla 2. Características morfológicas de las especies de <i>Rhodymenia</i> registradas para Perú. ....	10
Tabla 3. Coordenadas referenciales de las localidades donde se recolectaron especies de <i>Rhodymenia</i> en la costa central del Perú.....	16
Tabla 4. Lugar de colecta y código de extracción de especímenes de <i>Rhodymenia</i> utilizados en el análisis molecular.....	17
Tabla 5. Iniciadores utilizados para amplificar las secuencias <i>rbcL</i> de las muestras de <i>Rhodymenia</i> colectadas en la costa central del Perú. ....	21
Tabla 6. Lugar de colecta y referencias de las secuencias <i>rbcL</i> de especies de <i>Rhodymenia</i> y <i>Botryocladia</i> extraídas de GenBank y utilizadas en los análisis filogenéticos .....	22
Tabla 7. Código, morfoespecie identificada y nombre del clado por neighbour-joining de los especímenes de <i>Rhodymenia</i> de la costa central del Perú.....	29
Tabla 8. Distancias máximas intraclados, y distancias mínimas y medias a la especie/clado de <i>Rhodymenia</i> más cercano. ....	30
Tabla 9. Comparación de las características morfológicas las especies de <i>Rhodymenia</i> delimitadas genéticamente. ....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de las zonas de colecta de especies de <i>Rhodymenia</i> en la costa central del Perú .....	16
Figura 2. Dendrograma resultante del análisis <i>neighbour-joining</i> de las secuencias de <i>rbcL</i> de especies de <i>Rhodymenia</i> . .....	28
Figura 3. Construcción filogenética resultante del análisis Máxima verosimilitud (ML) de las secuencias de <i>rbcL</i> , con los valores del análisis de Inferencia Bayesiana (IB).....	32
Figura 4. Solución de los clados inferidos con los modelos de delimitación de especies GMYC (umbral único y umbral múltiple), PTP y bPTP visualizados sobre el árbol ultramétrico inferido en BEAST 2.1. ....	34
Figura 5. Hábito de los especímenes de <i>Rhodymenia corallina</i> colectados en la costa central del Perú .....	36
Figura 6. Morfología externa e interna de soros tetrasporangiales, cistocarpos y segmento vegetativo de <i>Rhodymenia corallina</i> . .....	37
Figuras 7. Hábito, morfología externa e interna de soros tetrasporangiales, cistocarpos y segmento vegetativo de <i>Rhodymenia coralina 2</i> . .....	39
Figura 8. Hábito, morfología externa e interna de soros tetrasporangiales, cistocarpo y segmento vegetativo de <i>Rhodymenia</i> sp. ....	41
Figura 9. Hábito, morfología externa e interna de soros tetrasporangiales y segmento vegetativo de <i>Rhodymenia skottsbergii</i> . ....	43
Figura 10. Hábito, morfología externa e interna de soros tetrasporangiales, cistocarpo y segmento vegetativo de <i>Rhodymenia flabellifolia</i> .....	45



## ÍNDICE DE ANEXOS

- Anexo 1. Ejemplar prensado de *Rhodymenia* colectado y determinado por Dawson  
(1964) como *Rhodymenia californica* y ampliación de la etiqueta de herbario..... 67
- Anexo 2. Matriz de distancias genéticas de todas las secuencias analizadas en el estudio,  
obtenidas con el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros en MEGA 7 ..... 68

## RESUMEN

El desarrollo de técnicas moleculares como complemento de los estudios taxonómicos en algas ha permitido mejorar la clasificación de las especies y nuestro entendimiento de las relaciones filogenéticas entre los diferentes grupos de algas. Estudios taxonómicos y filogenéticos, utilizando secuencias código de barras de ADN de *Rhodymenia* (Rhodymeniaceae) de diferentes partes del mundo, como Australia, Canadá, Estados Unidos, Japón, Sudáfrica, Chile y Perú han revelado la presencia de especies crípticas en el género. Material morfológicamente asignado al género *Rhodymenia*, colectado en la costa central del Perú, fue analizado morfológica y molecularmente, generándose 25 secuencias del marcador cloroplastidial *rbcL*. La aplicación de análisis filogenéticos, modelos de delimitación de especies y el análisis morfológico de muestras de herbarios nacionales e internacionales, permitió diferenciar cinco especies para la costa central peruana. Tres de ellas atribuidas a las especies anteriormente registradas *R. skottsbergii*, *R. flabellifolia* y *R. corallina*, incluyendo en la última a los especímenes morfológicamente identificados como *R. howeana* y *R. multidigitata*. También se diferenciaron dos especies referidas en este manuscrito como *R. corallina 2* y como *Rhodymenia* sp., esta última incluye los especímenes inicialmente identificados como *R. californica*. Análisis morfológicos y moleculares más profundos, complementados con el uso de otros marcadores moleculares, son necesarios para confirmar la identificación de estas especies.

**Palabras clave:** Rhodymeniaceae, técnicas moleculares, costa central peruana, *rbcL*

## ABSTRACT

The development of molecular techniques as a complement of taxonomic studies in algae, has allowed to improve species classification and our understanding of phylogenetic relationships within the different groups of algae. Taxonomic and phylogenetic studies using DNA barcode sequences in *Rhodymenia* (Rhodymeniaceae) from different places around the world, as Australia, Canada, USA, Japan, South Africa, Chile and Perú, they have revealed the variety of cryptic species in the genus. Material morphologically assigned to *Rhodymenia* genus, which has been collected in the central coast of Peru, it was morphologically and molecularly analyzed, for what it has been generated 25 *rbcL* sequences. The use of phylogenetic analysis, application of species delimitation models, and the morphological analysis of national and international herbariums samples, allowed to differentiate five species in the Peruvian central coast. Three of them were attributed to the previous recognized species *R. skottsbergii*, *R. flabellifolia* and *R. corallina*, in the last one were included sequences of samples morphologically identified as *R. howeana* and *R. multidigitata*. Two other species were also identified in this manuscript as *R. corallina 2* and as *Rhodymenia* sp., the last one includes the specimens initially identified as *R. californica*. Deeper morphological and molecular analyzes, complementing the use of other molecular markers, are necessary to confirm the identification of these species.

**Key words:** Rhodymeniaceae, molecular techniques, Peruvian central coast, *rbcL*.

## I. INTRODUCCIÓN

Durante años, el conocimiento taxonómico acerca de macroalgas se ha basado en el análisis y comparación de sus características morfológicas, lo cual supuso una serie de desafíos para los taxónomos en la identificación de individuos incompletos, sin la presencia de estructuras reproductivas informativas, especies con formas distintas durante su ciclo de vida (heteromórfico), especies distintas que han adoptado formas similares (convergencia evolutiva), o especies que presentan variabilidad de formas debido a los factores de su entorno (plasticidad fenotípica) (Saunders, 2005; Cianciola et al., 2010).

Los trabajos de determinación de macroalgas, basados en morfología, realizados en Perú entre los años 1914 y 1973 (Howe, 1914; Dawson et al., 1964; Acleto, 1973), representan los documentos más importantes para la identificación de algas en el país. Esfuerzos posteriores por ampliar el conocimiento en algas rojas fueron dirigidos a grupos específicos, como *Porphyra* y *Chondracanthus chamissoi* (Acleto & Endo, 1977; Acleto, 1980), ambas, especies de macroalgas rojas de conocida importancia comercial.

Las macroalgas rojas presentan especies que tienen un uso directo en alimentación, o para la extracción de compuestos como agar y carragenanos (Craigie, 1990; Lim et al., 2017), y cuyo estudio taxonómico se ha visto reforzado con el uso de técnicas moleculares que han permitido resolver las relaciones filogenéticas entre grupos crípticos a distintos niveles taxonómicos (Freshwater et al., 1994; Saunders & Hommersand, 2004). Por lo tanto, se ha desarrollado una clasificación más objetiva, que utiliza las diferencias en las secuencias génicas para separar grupos que serán identificados y asignados a una especie de acuerdo a sus características morfológicas (Saunders, 2005; Cianciola et al., 2010; Saunders & McDonald, 2010). En Perú, el uso de marcadores moleculares en estudios taxonómicos de distintas especies de algas rojas presentes en las costas del país ha permitido resolver la identidad de estas especies y revisar la sistemática dentro de grupos de algas como en las familias Gracilariaceae (Gurgel et al., 2003; Gurgel & Fredericq, 2004), Halymeniaceae (Calderón et al., 2014a; 2014b), Kallymeniaceae (Arakaki et al., 2011), Phylloporaceae (Calderón & Boo, 2016a; 2016b), Rhodomelaceae (Bustamante et al., 2012; Bustamante et al., 2013; Bustamante et al., 2016; Diaz-Tapia et al., 2017) y Scinaiaceae (Lindstrom et al.,

2015). Una de las técnicas moleculares utilizadas en la identificación de especies es el llamado “código de barras de ADN” o *DNA barcode*, propuesto por Hebert et al. (2003), que sugiere utilizar la región del extremo 5’ del gen mitocondrial de la enzima citocromo oxidasa I (COI-5P) como marcador estándar para la identificación de especies animales. En las macroalgas rojas, los marcadores *rbcL* (gen cloroplastidial de la subunidad mayor de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa), UPA (gen plastidial 23S ADN<sub>r</sub>), y COI-5P han resultado ser útiles para los análisis de código de barras de ADN (Saunders & Moore, 2013).

*Rhodymenia* es el género tipo de la familia Rhodymeniaceae (Rhodophyta) y el que cuenta con el mayor número de especies dentro de la familia, 70 aceptadas taxonómicamente (Guiry & Guiry, 2021). La clasificación de este grupo se ha basado en caracteres reproductivos, con especial énfasis en las características tetrasporangiales, el tipo de ramificación del estipe y la presencia de estolones (Dawson, 1941; Filloramo & Saunders, 2016b). Bajo estos criterios, históricamente se han registrado 10 especies de *Rhodymenia* en la Costa Templada del Pacífico de Sudamérica, que abarca Chile y Perú, con siete registros en Perú: *R. californica* Kylin, *R. corallina* (Bory) Greville, *R. flabellifolia* (Bory) Montagne, *R. howeana* E. Y. Dawson, *R. skottsbergii* E. Y. Dawson y *R. multidigitata* E. Y. Dawson, Acleto & Foldvik (especie endémica de nuestro país) y *R. peruviana* J. Agardh (Ramírez & Santelices, 1991; Dawson, 1941).

A nivel mundial, se han analizado ejemplares de *Rhodymenia* para estudios de filogenia y biogeografía de algas rojas (Freshwater et al., 1994; Hommersand & Fredericq, 2003). En Australia, estudios taxonómicos con aplicación de técnicas moleculares, análisis filogenéticos y de código de barras de ADN, permitieron diferenciar 12 especies de *Rhodymenia*, en un área de estudio donde ocho especies habían sido registradas inicialmente utilizando criterios morfológicos de identificación. Algunas de las especies iniciales fueron confirmadas y otras fueron trasladadas a otros géneros, también se trasladó *Epymenia wilsonis* a *Rhodymenia* y se describieron nuevas especies para la ciencia (Saunders & McDonald, 2010; Filloramo & Saunders, 2016b). En Canadá, Filloramo & Saunders (2018) resolvieron la identidad de cuatro especies de *Rhodymenia*, que por años fueron reconocidas como dos. Ninguno de estos estudios incluyó ejemplares colectados en la costa peruana, pero sí se incluyeron especies reportadas para Perú como *R. corallina* y *R. skottsbergii*, considerándose ejemplares colectados en Chile (donde se encuentra su

localidad tipo: Concepción), y *R. californica* con ejemplares de California, Estados Unidos.

Recientemente, el trabajo realizado por Calderón et al. (2020) ha sido el primero en incluir muestras de *Rhodymenia* colectadas en Perú, como parte de un estudio filogenético de las secuencias de *rbcL* de distintos grupos de algas rojas del país, revelando la presencia de tres taxones genéticamente distintos: *R. corallina*, *R. flabellifolia* y *R. skottsbergii*. En base a estos resultados, Calderón et al. (2020) sugieren que los reportes de *R. howeana* y *R. multidigitata* para Perú en realidad pertenecen a *R. corallina*, abriendo las posibilidades a nuevos estudios que ayuden a esclarecer la distribución de *Rhodymenia* en la costa de Sudamérica.

La aplicación de técnicas moleculares en estudios taxonómicos de *Rhodymenia* ha demostrado ser útil en la diferenciación de especies, cuya apariencia resulta similar debido a la convergencia evolutiva y genera la subestimación de la diversidad de especies (Saunders & McDonald, 2010; Filloramo & Saunders, 2016b; Filloramo & Saunders, 2018). Los resultados de Calderón et al. (2020) presentan el caso contrario, donde los resultados indican que existe una sobreestimación de la diversidad, debido a la plasticidad fenotípica de la especie *R. corallina*.

En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo realizar una revisión del género *Rhodymenia* de la costa central del Perú mediante el análisis morfológico y el uso de la herramienta molecular del código de barras de ADN, utilizando secuencias del gen *rbcL*. La resolución de taxones genéticamente distintos (especies putativas) de *Rhodymenia* de la costa central, así como la descripción y comparación de las características morfológicas externas e internas de dichos taxones generará información disponible acerca de las especies de *Rhodymenia* en Perú.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. GÉNERO *Rhodymenia*

El género *Rhodymenia* fue establecido por Greville en 1830 con el nombre de *Rhodomenia* e ilustrado con dibujos de *Rhodomenia palmetta*, actualmente *Rhodymenia pseudopalmata* (J.V. Lamouroux) P.C. Silva, 1952, la cual fue considerada como especie tipo al no haberse indicado ninguna en la descripción original del género (Dawson, 1941; Guiry, 1977). En 1852, J. Agardh cambió la ortografía del nombre del género a *Rhodymenia* siguiendo la sugerencia de Montagne en 1839.

Históricamente, los aportes de J. Agardh (1852; 1876) y Dawson (1941) han basado la clasificación de las especies de *Rhodymenia* en sus características tetrasporangiales, el tipo de ramificación del estípite, la ocurrencia de estolones y en su distribución geográfica (J. Agardh, 1852; Dawson, 1941; Guiry, 1977; Filloramo & Saunders, 2016b). Actualmente, *Rhodymenia* es el género tipo y el más numeroso de la familia Rhodymeniaceae (Rhodophyta) con 70 especies taxonómicamente aceptadas, según el registro de AlgaeBase (Guiry & Guiry, 2021).

#### 2.1.1. MORFOLOGÍA Y CICLO DE VIDA

El género *Rhodymenia* se caracteriza por poseer un talo erecto o postrado, que se desarrolla a partir de un disco de fijación o estolones rizoidales. Puede desarrollar estípite(s) con forma cilíndrica (terete) o ligeramente aplanada, ramificación monopodial o simpodial, con frondas aplanadas de coloración rojo brillante o violáceo, ligeramente cartilaginosas y de división dicotómica. La forma externa puede ser palmada, irregularmente dividida o lobulada, y desarrollar proliferaciones apicales o marginales. Internamente, presenta una construcción multiaxial (talo constituido por filamentos medulares que crecen a partir de múltiples células apicales), con una médula compacta, pseudoparenquimatoso de (2)4-13(20) capas de células largas y hialinas, axialmente elongadas; y células pigmentadas, pequeñas y axialmente elongadas, diferenciadas en pequeños filamentos de dos a cinco

capas que forman la corteza (Dawson, 1941; Guiry, 1977; Hawkes & Scagel, 1986; Guiry & Guiry, 2021).

Como es común entre los miembros de la clase Florideophyceae, el género *Rhodymenia* presenta un ciclo de vida trifásico con alternancia de generaciones entre la fase haploide (gametofito) y las fases diploides (tetrasporofito y carposporofito) (Guiry, 1977; Dawes, 2016; Filloramo, 2016). Los individuos gametofíticos son femeninos o masculinos (dioicos) y presentan una apariencia similar al tetrasporofito (isomórficos), además, ambas son fases de vida libre; a diferencia del carposporofito, que se desarrolla directamente sobre el gametofito femenino (parásito) (Guiry, 1977; Dawes, 2016; Filloramo, 2016).

Los gametos masculinos o espermacios se producen en los espermatangios, los cuales se forman a partir de células madre de la corteza externa, y se encuentran agregados en soros subapicales o extendidos en parches irregulares sobre toda la lámina (Guiry, 1977; Hawkes & Scagel, 1986; Filloramo, 2016). Los procarpos se forman en las partes jóvenes del talo del gametofito femenino. El procarpo está conformado por una célula soporte de la que emergen la rama de la célula auxiliar, con dos células, y la rama carpogonial, con tres a cuatro células cuya célula terminal es el carpogonio (gameto femenino) (Guiry, 1977; Hawkes & Scagel, 1986; Filloramo, 2016).

Después de la singamia (fusión de gametos) el núcleo diploide es transferido a la célula auxiliar, a partir de la cual se desarrollará el carposporofito (fase diploide y parásita), que genera el carposporangio (Filloramo, 2016). El carposporofito se encuentra rodeado por un tejido protector del gametofito llamado pericarpo, juntos conforman el cistocarpo. Los cistocarpos se disponen en la zona apical o a lo largo de la fronda, son semiesféricos, sobresalientes y presentan un ostiolo central, por el cual se liberan las carposporas, que al asentarse darán lugar al tetrasporofito (Guiry, 1977; Hawkes & Scagel, 1986; Filloramo, 2016).

En el tetrasporofito se desarrollan los tetrasporangios, dispersos en la fronda o agregados en soros en la zona subapical. Los tetrasporangios se forman directamente a partir de las células corticales, intercalados con filamentos estériles de dos a tres células. Cada tetrasporangio se divide por meiosis, con un patrón de división cruciada, formando cuatro tetrásporas, que son liberadas en la columna de agua y que al establecerse sobre una



superficie generan los gametofitos, cerrando así el ciclo (Hawkes & Scagel 1986; Filloramo, 2016).

### 2.1.2. ESPECIES DE *Rhodymenia* EN PERÚ

Siete especies de *Rhodymenia* han sido registradas en Perú: *R. corallina*, *R. flabellifolia*, *R. californica*, *R. howeana*, *R. skottsbergii*, *R. multidigitata* y *R. peruviana* (Ramírez & Santelices, 1991; Calderón et al., 2020; Guiry & Guiry, 2021). Seis de estas especies presentan registros en la costa central del Perú (Ica, Lima, Áncash) (Tabla 1), mientras que *R. peruviana* solo ha sido registrada en la costa sur del Perú (J. Agardh, 1852).

En su libro *The marine algae of Peru*, Howe (1914) se refiere a *R. peruviana*, en base a una fotografía del espécimen original, como “una planta del hábito general de *R. palmata*”; actualmente *R. palmata* es sinónimo de *Palmaria palmata* (Linnaeus) F. Weber & D. Mohr (Guiry & Guiry, 2021). Además, Howe (1914) señala la posibilidad de que esta especie haya sido colectada fuera de los límites actuales de Perú, lo cual parece confirmarse ante la ausencia de reportes posteriores de *R. peruviana*.

*Rhodymenia corallina* (antes *Sphaerococcus corallina* Bory) y *R. flabellifolia* (antes *Sphaerococcus flabellifolius* Bory) fueron reportadas para Perú como pertenecientes al género *Sphaerococcus* (Bory de Saint-Vincent, 1828; Ramírez & Santelices, 1991). Greville (1830) trasladó *S. corallina* a *Rhodymenia corallina*, especie de apariencia larga y erecta, con un estipe, que crece a partir de un disco de fijación con presencia de estolones, también presenta ramificación simpodial, láminas dicotómicamente divididas y soros tetrasporangiales redondeados y apicales (Tabla 2) (Dawson, 1941; Dawson et al., 1964; Guiry, 1977; Ramírez & Santelices, 1991). *Rhodymenia flabellifolia* fue trasladada de *S. flabellifolius* por Montagne en 1846 (Ramírez & Santelices, 1991). Esta especie se caracteriza por su forma arbustiva, con ramificaciones estipadas, usualmente abundantes, erectas y de forma cilíndrica que nacen a partir de estolones, cada una ramificada de forma simpodial y láminas sésiles que se expanden de forma flabelar, y no muestra una estructura amplexicaule (Tabla 2) (Dawson, 1941; Dawson et al., 1964).

*Rhodymenia californica* fue descrita por Kylin en 1931 con material colectado en EE. UU. (Monterrey, California) y es considerada una especie común y variable a lo largo de la costa de California (Dawson, 1941; Ramírez & Santelices, 1991; Guiry & Guiry, 2021). En

1964, Dawson et al. ampliaron su registro para Perú en base a material colectado en Pucusana (Lima, Perú). Esta especie se caracteriza por presentar un tamaño pequeño (2.5-7 cm), talo tupido con estipe muy corto, casi ausente, y frondas dicotómicas con tendencia a dividirse de forma palmada (Tabla 2) (Dawson, 1941).

*Rhodymenia howeana* y *R. skottsbergii* fueron descritas por Dawson (1941) para Perú y Chile, respectivamente. *Rhodymenia howeana* fue inicialmente identificada como *R. corallina* por Howe (1914) en base a ejemplares colectados en La Punta (Callao, Perú). Posteriormente, Dawson (1941) describió *R. howeana* basándose en estos ejemplares y adicionó uno tetrasporofítico recolectado en Isla Lobos de Tierra (Piura, Perú). Dawson diferenció estos ejemplares como una especie distinta de *R. corallina*, por poseer un estipe corto (0.4-0.5 cm de longitud) y frondas de expansión flabelar con abundantes divisiones dicotómicas (Tabla 2). Actualmente, Calderón et al. (2020) proponen volver a considerar *R. howeana* como reportes de *R. corallina*, en base al análisis genético de especímenes recolectados en La Punta, Isla San Lorenzo y Barranco (Callao-Lima, Perú). *Rhodymenia skottsbergii* fue registrada solo para Chile (Concepción) hasta el reporte de Acleto en 1980 que amplió su registro hacia la costa sur de Perú en Arequipa y Moquegua (Ramírez & Santelices, 1991). Posteriormente, Calderón et al. (2020) registraron la especie para Pisco (Ica, Perú), ampliando su distribución hasta la costa central del país. Esta especie se caracteriza por sus frondas dicotómicas y cartilaginosas que crecen de forma amplexicaule alrededor del estipe (Tabla 2) (Dawson, 1941).

*Rhodymenia multidigitata* fue descrita por Dawson et al. (1964) con especímenes colectados en La Punta (Callao, Perú) y se caracteriza por presentar márgenes multidigitados en las últimas ramificaciones (Tabla 2). Esta especie no ha sido reportada en otro país (Tabla 1) (Ramírez & Santelices, 1991; Guiry & Guiry, 2021), además, el reciente trabajo de Calderón et al. (2020) propone considerar *R. multidigitata* como conoespecífica de *R. corallina*.

Actualmente, se considera el registro de seis especies del género *Rhodymenia* para Perú: *R. corallina*, *R. flabellifolia*, *R. californica*, *R. howeana*, *R. skottsbergii* y *R. multidigitata* (Guiry & Guiry, 2021), todas ellas presentes en la costa central (Tabla 1).

## 2.2. TÉCNICAS MOLECULARES EN TAXONOMÍA

Los avances en el campo de la biología molecular y el desarrollo de nuevas tecnologías han permitido la integración de datos moleculares en la taxonomía, dando lugar a una clasificación más objetiva basada en secuencias de ADN (Cianciola et al., 2010; de la Cadena Mendoza, 2016).

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) (Mullis et al., 1986) revolucionó la biología molecular al permitir la replicación *in vitro* de un fragmento específico de ADN, multiplicándolo millones de veces (Lara Lorenzo, 2008; Serrato Díaz et al., 2014). Esta técnica se basa en la replicación celular, donde se sintetizan dos nuevas hebras de ADN a partir de una que funciona como molde y consiste en la repetición sucesiva de tres etapas: desnaturalización de la cadena de ADN, alineamiento de los *primers* o iniciadores a la cadena y extensión de la cadena (Serrato Díaz et al., 2014). Gracias al desarrollo de esta técnica, ha sido posible generar secuencias de ADN de genes específicos (marcadores moleculares) y la creación de bases de datos moleculares (librerías como GenBank y BOLD systems) que se utilizan como fuente de datos para comparar y diferenciar poblaciones y especies (Lara Lorenzo, 2008).

Con el fin de resolver la identidad de especies de macroalgas, se han realizado diversos estudios para comprobar la eficacia de marcadores moleculares, tales como los marcadores nucleares de la subunidad mayor del ADN ribosomal o *large subunit ribosomal DNA* (LSU) (Freshwater & Bailey, 1998; Harper & Saunders, 2001; Saunders & Lehmkuhl, 2005), region espaciadora interna transcrita o *internal transcribed spacer region of the ribosomal cistron* (ITS) (Steane et al., 1991; Tai et al., 2001; Ross et al., 2003; Saunders & McDevit, 2012); los marcadores plastidiales: amplicón plastidial universal o *universal plastid amplicon* (UPA, V dominio del gen plastidial 23S ADNr) (Sherwood & Presting, 2007; Clarkston & Saunders, 2010; 2013), el extremo 5' del gen mitocondrial de la enzima citocromo c oxidasa I o *cytochrome c oxidase subunit 1* (COI-5P) (Saunders 2005; 2009; Saunders & McDonald., 2010; Saunders & McDevit, 2012; Filloramo & Saunders, 2016b) y el gen cloroplastidial de la subunidad mayor de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa o *ribulose-1,5-biphosphate carboxylase large subunit* (*rbcL*) (Saunders & Moore, 2013).

**Tabla 1.** Especies de *Rhodymenia* registradas para Perú, localidad tipo y localidades registradas en Perú.

<b>Especie</b>	<b>Localidad tipo</b>	<b>Referencia</b>	<b>Registros en Perú</b>	<b>Referencia</b>
<i>R. californica</i>	Pacific Grove, California, EE. UU.	Kylin, 1931	Lima: Pucusana	Dawson et al., 1964
<i>R. corallina</i>	Concepción, Chile	Bory de Saint-Vincent, 1828	Ica: Bahía Independencia e Islas Chincha Callao: Isla San Lorenzo y Callao La Libertad: Salaverry y Bahía de Pacasmayo Lambayeque: Islas Lobos de Tierra Piura: Bahía de Sechura y Paíta	Bory de Saint-Vincent, 1828; Howe, 1914; Dawson et al., 1964; Ramírez & Santelices, 1991; Calderón et al., 2020
<i>R. flabellifolia</i>	Concepción, Chile	Bory de Saint-Vincent, 1828	Ica: Islas Ballestas, Pisco Lima: Barranco, Isla San Lorenzo y Ancón Callao: La Punta Ancash: Anconcillo (Bahía de Chimbote) La Libertad: Huanchaco Lambayeque: Isla Lobos de Afuera e Isla Lobos de Tierra Piura: Bahía de Sechura, Paíta y Talara	Bory de Saint-Vincent, 1828; Howe, 1914; Dawson et al., 1964; Ramírez & Santelices, 1991; Calderón et al., 2020
<i>R. howeana</i>	La Punta, Callao, Perú	Howe, 1914; Dawson, 1941	Ica: Islas Chincha Callao: La Punta y Callao Lima: Lima y Ancón Ancash: Anconcillo (Bahía de Chimbote) La Libertad: Bahía de Pacasmayo Lambayeque: Isla Lobos de Tierra Piura: Bahía de Sechura	Howe, 1914; Dawson et al., 1964; Ramírez & Santelices, 1991
<i>R. multidigitata</i>	La Punta, Callao, Perú	Dawson et al., 1964	Callao: La Punta	Dawson et al., 1964
<i>R. skottsbergii</i>	Bahía de Concepción, Concepción, Chile	Dawson, 1941	Moquegua: Ilo Arequipa: Mollendo Ica: Pisco	Acleto, 1980; Ramírez & Santelices, 1991; Calderón et al., 2020

*Nota:* Elaborado a partir de Ramírez & Santelices (1991) y Guiry & Guiry (2021).

**Tabla 2.** Características morfológicas de las especies de *Rhodymenia* registradas para Perú.

	<i>R. corallina</i>	<i>R. flabellifolia</i>	<i>R. californica</i>	<i>R. howeana</i>	<i>R. skottsbergii</i>	<i>R. multidigitata</i>
<b>Tamaño</b>	20-25 cm	Hasta 35 cm	2.5-7 cm de alto	15-20(30) cm	Hasta 17 cm	Hasta 10 cm
<b>Talo</b>	Con múltiples frondas estipadas	Con múltiples ejes	Talo tupido, con una o varias láminas dicotómicas erectas	Con frondas membranosas gelatinosas	-	Consiste en varios ejes flabelados
<b>Estructura de fijación</b>	Disco simple con estructuras estoloníferas	Estolones rhizoidales, a veces flageliformes	Disco simple primario. Estolones subcilíndricos en la base del estipe	Disco simple, con estolones accesorio	Disco simple, con proliferaciones estoloníferas enredadas al estipe	Disco de 3-4 mm de diámetro, crece sobre conchas y piedras
<b>Estipe</b>	6 cm de largo, subcilíndrico en la base y comprimido arriba	1.5-3 mm de diámetro. Ejes notorios subcilíndrico, erectos, semi-rígidos	3-7(12) mm de longitud, cilíndrico y a veces ausente	4-5 mm de longitud, subcilíndrico y fino. Se expande gradualmente	Se extiende a partir de las ramificaciones cortadas en la base, que dejan cicatrices a lo largo del eje	2-3 mm de longitud y 1 mm de diámetro, cilíndrico, con una a dos bifurcaciones
<b>Ramificación</b>	Simpodial	Muy ramificado, de forma simpodial, repetida en cada eje	-	-	Simpodial, 2-3 proliferaciones por yema. Organización amplexicaule	-
<b>Láminas</b>	Expansión flabelar gradual o abrupta desde el estipe. 8-10 × 14 cm	Láminas primarias sésiles, surgen sucesivamente en los ejes a intervalos de 1-2(4) cm	Láminas estipadas. A intervalos de 5-12(15) mm	Láminas semi flabeladas, con abundantes divisiones dicotómicas. Márgenes enteros y ápices redondeados, con muescas que se dicotomizan activamente	Frondas sésiles, se extienden de forma oblicua o en ángulo recto desde el estipe. Miden hasta 8 cm. Frondas jóvenes y anchas forman láminas dicótomo-flabeladas con ápices redondeados (4-5 mm de ancho)	Láminas flabeladas, con un segmento basal largo (3-4 mm) y estrechamente cuneado, 6-8 cm de ancho. Márgenes externos multidigitados

*Nota:* Elaborado a partir de Howe (1914), Dawson (1941), Dawson et al. (1964) y Alveal & Romo (1979).

Continuación

	<i>R. corallina</i>	<i>R. flabellifolia</i>	<i>R. californica</i>	<i>R. howeana</i>	<i>R. skottsbergii</i>	<i>R. multidigitata</i>
<b>Segmento laminar</b>	2-2.5 cm de largo, 6-9 mm de ancho (hasta 4-3) y 200 µm de espesor	Flabellar, estrechamente cuneados en la base, 3-6 mm de ancho	(1.1)1.5-3(4) mm de ancho y 70-150(230) µm de espesor	1-1.5 cm x 4-6(9) mm y 100 µm de espesor.	12 mm de ancho, se expanden hacia el ápice	300 µm de espesor, segmentos flabellares de ancho variable, se reducen de 6-7 mm a 1-2 mm o menos en los márgenes exteriores
<b>Divisiones</b>	6-7(9) divisiones dicotómicas	3-4(6) divisiones dicotómicas	2-5 divisiones dicotómicas	-	Dicotómica irregular	Dicotómica
<b>Proliferaciones</b>	A partir de puntas dañadas, o en el estipe	A partir de puntas dañadas, a veces en el área de divergencia del estipe	Estolones subcilíndricos, nacen en la base del estipe, como de estructuras secundarias de agarre	En ápices dañados. Estolones accesorios en el soporte, algunos se desarrollan como pequeñas láminas	Estolones que crecen en la base del estipe y se enredan en su base	-
<b>Corteza</b>	-	-	Capa cortical externa con células de 4-6 µm de diámetro máximo	-	12-15 µm de espesor. Dos capas de células, la externa con células pequeñas y pigmentadas	Densa, con capas profundamente pigmentadas, la más externa con células de 7 µm de diámetro
<b>Médula</b>	-	-	Compacta: 2-3 capas de células de 30-50 µm de diámetro máximo. Se reducen abruptamente a través de 2-3 capas	-	240-250 µm de espesor, células grandes y redondeadas (87 × 57 µm máximo), disminuyen gradualmente hacia la corteza	Parenquimatosa con células largas de 50-70 µm de diámetro, que se reducen hacia la corteza

*Nota:* Elaborado a partir de Howe (1914), Dawson (1941), Dawson et al. (1964) y Alveal & Romo (1979).

Continuación

	<i>R. corallina</i>	<i>R. flabellifolia</i>	<i>R. californica</i>	<i>R. howeana</i>	<i>R. skottsbergii</i>	<i>R. multidigitata</i>
<b>Tetrasporangios</b>	Elípticos de 28 µm de largo.	-	Ovoides, 30 µm de largo.	Cruciados, con forma elíptica alargada.	Cruciados (hasta 46 × 22 µm).	-
<b>Soros</b>	Soros apicales redondeados	Soros apicales redondeados, superficiales y con márgenes estériles	Soros apicales redondeados	Soros apicales o subapicales redondeados	Soros redondeados. Apicales, en la parte media de la fronda (frondas viejas), o dispersos en toda la superficie (láminas jóvenes y pequeñas)	
<b>Modificación en la corteza</b>	Ligera modificación nematecial	-	Nematecios pronunciados o pequeños, distribuidas de forma variable (a ambas caras de la lámina o solo una)	Ligeras modificaciones en la corteza	No produce alteración en la corteza	
<b>Cistocarpos</b>	Forma cónica-esférica o mamiforme, 0.65-0.85 mm de diámetro. Dispersos o agregados en ambas caras de la lámina o los bordes	Forma subglobosa o semiesférica, 0.66-0.83 mm de diámetro, ostiolos con forma de pico o con una especie de corona de 0.16-0.32 × 0.32 mm	Prominentes, de forma subesférica, 0.5-0.9 mm de diámetro, apenas o semi rostrado (que acaba en pico). Agregados en los segmentos terminales	Forma hemisférica, no rostrada, dispersos sobre la porción media de las láminas	-	-

*Nota:* Elaborado a partir de Howe (1914), Dawson (1941), Dawson et al. (1964) y Alveal & Romo (1979).

### 2.2.1. CÓDIGO DE BARRAS DE ADN

Hebert et al. en el año 2003, propusieron el uso del marcador molecular COI-5P (extremo 5 del gen de la enzima citocromo oxidasa I) como secuencia estándar para la identificación de especies animales, denominándolo “código de barras de ADN” en analogía al Código Universal de Productos. La variación en la secuencia de nucleótidos de una misma región genética fue utilizada para la identificación de organismos, asociando cada secuencia de código de barras con un espécimen de referencia o *voucher* (Lanteri, 2007; Lara-Lorenzo, 2008). La elección de un gen mitocondrial como COI-5 sobre uno nuclear se realizó por las ventajas que ofrece: la universalidad de los iniciadores o *primers* que permiten recuperar el extremo 5’ de este gen en organismos de una amplia variedad de *phyla* (Hebert et al., 2003). También fueron consideradas otras ventajas del ADN mitocondrial, como su limitada exposición a la recombinación, la herencia haploide, la ausencia de intrones y la relativamente rápida velocidad de divergencia en animales (Saunders, 2005). Sin embargo, en otros grupos como las plantas se deben emplear regiones de genes cloroplastidiales *rbcL* y *matK* (Maturase K) (Lanteri, 2007).

La iniciativa “Base de datos de código de barras para la vida” (BOLD por sus siglas en inglés) es un proyecto colaborativo que ambiciona crear una librería de código de barras de todas las especies con los respectivos datos de sus especímenes ingresados en colecciones. Esta iniciativa generó distintos megaproyectos a nivel mundial para la identificación de especies de grandes grupos taxonómicos, permitiendo acelerar este proceso y la elaboración de los inventarios de biodiversidad (Lanteri, 2007). Durante las últimas décadas, distintos trabajos en algas rojas han comprobado la eficacia del uso de COI y *rbcL* como secuencias código de barras de ADN: Saunders (2005; 2008; 2009) utilizando COI-5 resolvió la identidad de especies de *Mazzaella*, *Dilsea*, *Neodilsea*, y *Asteromenia*, y especies de la familia Dumontiaceae y del orden Gracilariales. Posteriormente, se hicieron análisis similares para las Rhodymeniales (Saunders & McDonald, 2010). Koh et al. (2013) comprobó la eficacia de COI y *rbcL* en la identificación de especies y de relaciones filogenéticas de *Champia*, describiendo cuatro nuevas especies. El marcador *rbcL* ha sido utilizado con éxito en estudios de código de barras de ADN y también de filogenia de macroalgas rojas ya que presenta buena resolución tanto a nivel de especies como en niveles taxonómicos superiores de algas rojas (Freshwater et al., 1994; Hommersand et al., 1994; Hommersand & Fredericq, 2003; Wilkes et al., 2006).



### 2.2.2. USO DE TÉCNICAS MOLECULARES EN LA TAXONOMÍA DE *Rhodymenia*

Saunders & McDonald (2010) revisaron las especies del orden Rhodymeniales de Australia utilizando el marcador mitocondrial COI-5 y el nuclear ITS. Como resultado se describió *Rhodymenia novahollandica* GB Saunders como especie nueva y se reasignó *Rhodymenia wilsonis* (Sonder) GB Saunders, antes considerada como *Epymenia*. Utilizando los marcadores COI-5P y *rbcL*-3P en especímenes colectados en la Colonia Británica (Canadá), se resolvió la identidad de cuatro especies de *Rhodymenia* donde solo se esperaba encontrar dos, separándose genéticamente la especie *R. bamfieldensis* Filloramo & G.W. Saunders a partir de individuos inicialmente identificados como *R. californica*; y se reinstauró *R. rhizoides* E. Y. Dawson a partir de colectas identificadas en campo como *R. pacifica* Kylin (Filloramo & Saunders, 2018). Posteriormente, Filloramo & Saunders (2016b) presentaron una revisión de las especies de *Rhodymenia* de Australia aplicando la “taxonomía alfa molecularmente asistida” o *molecular-assisted alpha taxonomy* (MAAT), utilizando los marcadores COI-5P e ITS y obteniendo nuevos datos sobre la diversidad de *Rhodymenia* y su distribución geográfica, así como el reconocimiento de 12 especies, donde solo se habían reportado cinco.

En Perú, el análisis molecular de secuencias *rbcL* de especímenes de *Rhodymenia* realizado por Calderón et al. (2020) reveló la presencia de tres grupos genéticamente distintos: *R. corallina*, *R. skottsbergii* y *R. flabellifolia*; agrupando dentro de *R. corallina* ejemplares inicialmente identificados con la forma de *R. howeana*, *R. multidigitata* y *R. californica*.

### **III. METODOLOGÍA**

#### **3.1. ZONAS DE COLECTA**

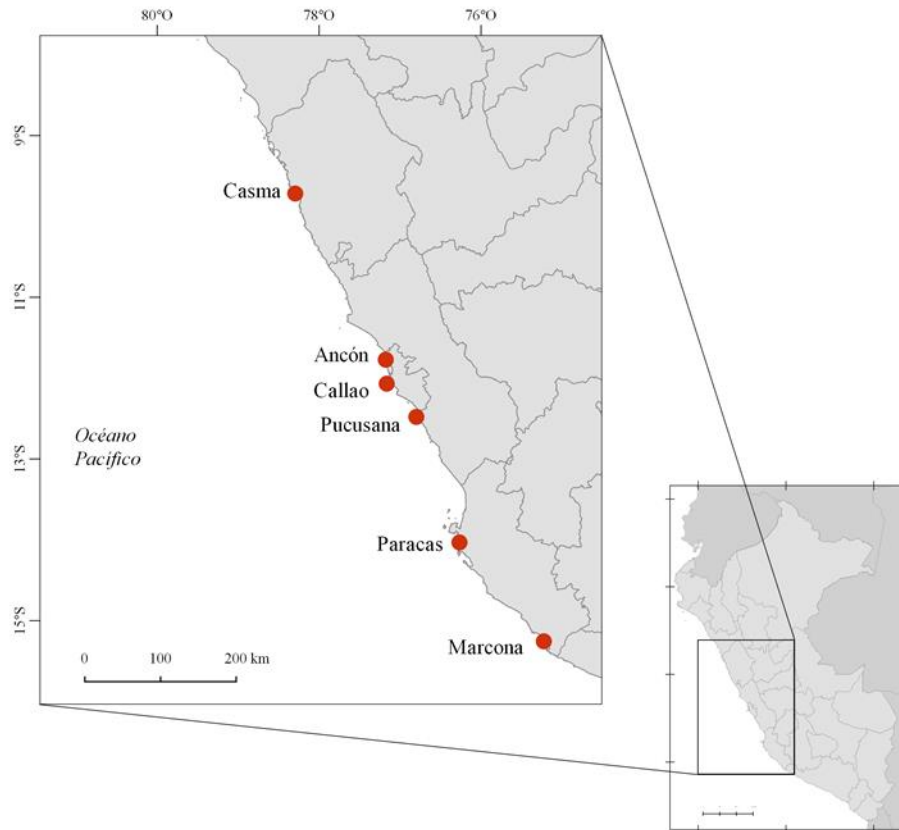
Durante el año 2016 se recolectaron 129 muestras, identificadas como parte del género *Rhodymenia*, procedentes de las siguientes localidades: Casma (8 muestras), Ancón (17 muestras), Callao e Isla San Lorenzo (19 muestras), Pucusana (10 muestras), Paracas (36 muestras) y Marcona (39 muestras), cubriendo aproximadamente 820 km de extensión total, entre los 9° y 15° de latitud Sur (Figura 1, Tabla 3). Adicionalmente se incluyeron dos especímenes de la colección científica del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), colectados en Callao el año 2015.

#### **3.2. COLECTA, PRESERVACIÓN Y REVISIÓN DE MUESTRAS**

Las muestras de *Rhodymenia* fueron recolectadas en la zona submareal, por medio de buceo SCUBA, entre 1-8 m de profundidad. En la zona intermareal los especímenes fueron removidos del sustrato o colectados de las varazones sobre los roqueríos, playas de arena y pozas intermareales.

El material colectado fue identificado y seleccionado para herbario, análisis morfológico y análisis molecular. Los especímenes herborizados fueron escaneados y depositados en la Colección Científica del IMARPE. Para el análisis morfológico se seleccionó material con estructuras reproductivas (de estar presentes), el que fue preservado en una solución de formol al cuatro por ciento en agua de mar, y depositado en la Colección Científica del IMARPE.

Para el análisis molecular se seleccionaron talos frescos, limpios y libres de epífitos, los cuales fueron cuidadosamente secados y almacenados en bolsas con sílica gel y cierre hermético, cada muestra con su respectivo código. En la mayoría de los casos se tomaron trozos de material herborizado para el análisis molecular, de esta forma se aseguró la correlación posterior con el hábito de la especie.



**Figura 1.** Ubicación de las zonas de colecta de especies de *Rhodymenia* en la costa central del Perú.

**Tabla 3.** Coordenadas referenciales de las localidades donde se recolectaron especies de *Rhodymenia* en la costa central del Perú.

Localidad	Latitud	Longitud
Casma	9° 29' 7.5" S	78° 21' 6" O
Ancón	11° 44' 4" S	77° 10' 2.5" O
Pucusana	12° 27' 54" S	76° 47' 0" O
Callao	12° 5' 23" S	77° 13' 26" O
Paracas	14° 3' 15" S	76° 15' 43" O
Marcona	15° 11' 41" S	75° 16' 27" O

Los análisis morfológicos y moleculares fueron realizados en el laboratorio del Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos (BGOA) del IMARPE.

Las muestras preservadas fueron clasificadas morfológicamente, incluyendo 129 especímenes colectados en este estudio y dos ejemplares de la colección científica del IMARPE. Con la ayuda de catálogos taxonómicos de macroalgas de Perú, revisiones de las especies de *Rhodymenia* (Howe, 1914; Dawson, 1941; Dawson et al., 1964; Acleto, 1973; Alveal & Romo, 1979), la comparación con especímenes revisados en el Herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (USM) y la Colección de Algas del Museo Nacional de Historia Natural de Chile (SGO), y el apoyo de la ficóloga Prof. María Eliana Ramírez, se agruparon los individuos en morfoespecies. De cada grupo se seleccionaron el o los individuos representativos para el análisis molecular, procurando incluir individuos completos y de preferencia tetrasporofitos (para fines comparativos) o con estructuras reproductivas femeninas (Tabla 4).

### **3.3. ANÁLISIS MOLECULAR**

Veinticinco especímenes fueron seleccionados por ser representativos de las morfoespecies previamente asignadas. Dentro de la selección se incluyó un ejemplar procedente de la Colección Científica del IMARPE (Tabla 4).

#### **3.3.1 EXTRACCIÓN DE ADN**

En el laboratorio, las muestras preservadas en sílica gel y aquellas porcedentes de ejemplares herborizados fueron revisadas y sometidas a una limpieza adicional antes del procedimiento de extracción. Trozos de talo fueron molidos con la ayuda de un mortero y nitrógeno líquido, y transferidos a tubos de centrífuga de 1.5 a 2 mL de capacidad. En 21 muestras se realizó la extracción de ADN utilizando el protocolo CTAB modificado de Soltis Lab (2002), basado en los procedimientos de Doyle & Doyle (1987) y de Cullings (1992) y en cuatro muestras se utilizó el kit de extracción GF-1 Plant DNA Extraction Kit (Vivantis™).

**Tabla 4.** Lugar de colecta y código de extracción de especímenes de *Rhodymenia* utilizados en el análisis molecular. Los especímenes se agrupan de acuerdo a su morfoespecie (cf.)

<b>Morfoespecie</b>	<b>Lugar y fecha de colecta</b>	<b>Código</b>
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>corallina</i>	Punta Gallinazo, Paracas (Ica); 2 de abril del 2016	BG-216
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>corallina</i>	Mendieta, Paracas (Ica); 3 de abril del 2016	BG-276
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>corallina</i>	Mendieta, Paracas (Ica); 3 de abril del 2016	BG-278
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>howeana</i>	Muelle, Marcona (Ica); 27 de abril del 2016	BG-218
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>howeana</i>	Cantolao, La Punta (Callao); 17 de octubre del 2016	BG-241
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>howeana</i>	Muelle de Imarpe, Chucuito (Callao); 30 de diciembre del 2016	BG-259
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>multidigitata</i>	El Chuncho, Pucusana (Lima); 22 de mayo del 2016	BG-246
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>multidigitata</i>	Isla San Lorenzo (Callao); 6 de julio del 2015	BG-256
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>multidigitata</i>	Muelle de Imarpe, Chucuito (Callao); 30 de diciembre del 2016	BG-258
<i>Rhodymenia</i> sp.1	Bahía San Nicolás, Marcona (Ica); 22 de octubre del 2016	BG-239
<i>Rhodymenia</i> sp.1	Bahía San Nicolás, Marcona (Ica); 22 de octubre del 2016	BG-245
<i>Rhodymenia</i> sp.1	Mendieta, Paracas (Ica); 3 de abril del 2016	BG-277
<i>Rhodymenia</i> sp.2	Bahía de Ancón, Ancón (Lima); 11 de noviembre del 2016	BG-237
<i>Rhodymenia</i> sp.3	Bahía San Nicolás, Marcona (Ica); 22 de octubre del 2016	BG-244
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>corallina</i>	Tortugas, Casma (Áncash); 31 de mayo del 2016	BG-249
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>corallina</i>	Tortugas, Casma (Áncash); 31 de mayo del 2016	BG-250
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>corallina</i>	Tortugas, Casma (Áncash); 31 de mayo del 2016	BG-300
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>californica</i>	Siete huecos, Marcona (Ica); 21 de octubre del 2016	BG-243
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>californica</i>	Las Ninfas, Pucusana (Lima); 21 de mayo del 2016	BG-275
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>skottsbergii</i>	Poza de Lapa, Marcona (Ica); 21 de octubre del 2016	BG-242
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>flabellifolia</i>	Bahía San Nicolás, Marcona (Ica); 22 de octubre del 2016	BG-236
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>flabellifolia</i>	Bahía de Ancón, Ancón (Lima); 12 de noviembre del 2016	BG-238
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>flabellifolia</i>	Mendieta, Paracas (Ica); 2 de abril del 2016	BG-299
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>flabellifolia</i>	Playa Hermosa, Marcona (Ica); 27 de abril del 2016	BG-302
<i>Rhodymenia</i> cf. <i>flabellifolia</i>	Cantolao, La Punta (Callao); 29 de julio del 2016	N256

- **EXTRACCIÓN CON CTAB**

En la campana de extracción se adicionó 500 µL de buffer CTAB a cada tubo con muestra de tejido pulverizado. Las muestras fueron incubadas a 55°C por 40 minutos, agitando cada tres a cuatro minutos. Posteriormente se agregó 500 µL de la solución cloroformo/alcohol isoamílico 24:1 y se mezcló por agitación. Los tubos fueron centrifugados por 10 minutos a velocidad máxima (14 000 RPM) hasta que se observó la separación de tres fases. Con la ayuda de una micropipeta, se extrajo 300 µL de la fase acuosa superficial que fue trasladada a un tubo nuevo.

Posteriormente se realizaron dos lavados del pellet de ADN: antes del primer lavado se vació el líquido sobrante conservando el pellet adherido a la pared del tubo y se adicionó 700 µL de etanol al 95 %, invirtiendo el tubo delicadamente hasta soltar el pellet. Seguidamente, todos los tubos fueron centrifugados por un minuto a velocidad máxima. El siguiente lavado se repitió adicionando etanol al 70% (en vez de 95 %) y cuidando de vaciar lo máximo posible de alcohol del tubo. Luego los tubos fueron colocados en posición invertida sobre un papel kim-wipe y dejados de esta forma durante una hora, para eliminar todo rastro de alcohol. Finalmente se adicionó 100 µL de buffer TE, previamente incubado a 55°C, a las muestras, y se dejaron reposar a temperatura ambiente por una hora antes de almacenar los tubos a -4 °C.

- **EXTRACCIÓN CON EL KIT GF-1 PLANT EXTRACTION**

En cada microtubo con muestra de tejido pulverizado, se adicionó 280 µL del buffer PL (*Plant Tissue Lysis Buffer*) y se agitó por 30 segundos en el vórtex para homogenizar la mezcla. Posteriormente se adicionó 20 µL de proteinasa K y se mezcló invirtiendo cada tubo repetidamente. Las muestras fueron incubadas a 65°C por 30 minutos mezclando continuamente cada tres a cuatro minutos. Los tubos fueron centrifugados a 16 000 ×g (14 725 RPM) por cinco minutos y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, al cual se adicionó dos volúmenes de buffer PB (*Plant Genomic Binding Buffer*), se mezcló e incubó a 65°C por 10 minutos.

Después de la incubación, se adicionaron 200 µL de etanol absoluto e inmediatamente se mezcló la solución por inversión, para luego transferirla a un microtubo con columna y centrifugar a 10 000 ×g (11 641 RPM) por un minuto. Se procedió a descartar el filtrado y repetir el procedimiento para lo que quedó de muestra.

El lavado de columna se realizó agregando 650  $\mu\text{L}$  de *Wash Buffer* (buffer de lavado) para luego centrifugar las muestras por un minuto a 10 000  $\times g$ . Se descartó el filtrado y se repitió el proceso de lavado. Para extraer todo rastro de etanol de la columna, los tubos fueron centrifugados por un minuto a 10 000  $\times g$ .

Finalmente, se trasladó la columna a un nuevo tubo y se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de *Elution buffer* (buffer de elución), previamente incubado a 65°C. Después de esperar dos minutos, se centrifugó la muestra a 10 000  $\times g$  por un minuto y se descartó la columna, para luego almacenar el tubo (con el ADN filtrado) a 4°C.

### 3.3.2 OBTENCIÓN DE SECUENCIAS

La obtención de la secuencia final del gen cloroplastidial de la subunidad mayor de la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco, *rbcL*) se amplificó en dos partes, utilizando la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Las mezclas fueron preparadas de acuerdo al protocolo utilizado en el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos (BGOA) del IMARPE, con los siguientes volúmenes por cada tubo: 2.5  $\mu\text{L}$  de buffer 10X con Mg, 1.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 10.75  $\mu\text{L}$  de agua para PCR, 4  $\mu\text{L}$  de dNTPs, 0.25  $\mu\text{L}$  de Taq polimerasa, 1  $\mu\text{L}$  de cada iniciador o *primer* (Tabla 5) y 1.5  $\mu\text{L}$  de betaína como mejorador del proceso, y se adicionó 1-1.5  $\mu\text{L}$  de ADN, dependiendo de la concentración de la muestra. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler® nexus gradient (Eppendorf), con el siguiente perfil de amplificación: 94°C por dos minutos (desnaturalización, separación de las hebras de ADN), 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 48.5°C de temperatura de alineamiento (hibridación o alineamiento de los iniciadores al extremo 3' del fragmento) por 1:20 minutos, extensión de la cadena a 72 °C (actividad catalítica de la enzima Taq polimerasa) por dos minutos, seguido por la extensión final a 72°C por siete minutos (modificado a partir de los perfiles utilizados en el BGOA y Saunders & Moore, 2013).

Los productos de amplificación fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa (1.2 %) para visualizar las bandas. Los productos de amplificación fueron enviados a la compañía Macrogen ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)) para su secuenciamiento, obteniéndose cuatro secuencias por cada individuo (dos secuencias parciales de *rbcL*, cada una en ambas direcciones). Los electroferogramas fueron visualizados, y las secuencias ensambladas y editadas manualmente utilizando el programa Codon Code Aligner 7.0. (CodonCode Corporation, [www.codoncode.com](http://www.codoncode.com)).

**Tabla 5.** Iniciadores utilizados para amplificar las secuencias *rbcL* de las muestras de *Rhodymenia* colectadas en la costa central del Perú.

Iniciador	Secuencia	Referencia
F15	5'-GTAATHCCNTAHGCNAAAATGGG-3'	Gabriel et al., 2016
F57	5'-GTAATTCGATATGCTAAAATGGG-3'	Hommersand et al., 1994
F577	5'-GTATATGAAGGTCTAAAAGGTGG-3'	Hommersand et al., 1994
R916	5'-CCWGCCATDCKCATCCA-3'	Gabriel et al., 2016
R753	5'-GCTCTTTCATACATATCTTCC-3'	Hommersand et al., 1994
R1150	5'-GCATTTGTCCGCAGTGAATAC-3'	Hommersand et al., 1994
R1381	5'-ATCTTTCATAGATCTAAAGC-3'	Hommersand et al., 1994

### 3.3.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Utilizando el servidor en línea del programa de alineamiento múltiple MAFFT 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Katoh et al., 2002; Katoh & Standley, 2013; Katoh et al., 2017), se alinearon las secuencias de *rbcL* de *Rhodymenia* de la costa central del Perú, con la adición de 14 secuencias de *Rhodymenia* disponibles en GenBank y tres secuencias del género *Botryocladia* como grupo externo o *outgroup* también disponibles en GenBank (Tabla 6). Las secuencias fueron analizadas utilizando el método de “unión de vecinos” o *neighbour-joining* (NJ) en MEGA 7 (Kumar et al., 2016) utilizando el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (K2P) utilizando la técnica de *bootstrap* o re-muestreo con 1 000 repeticiones para visualizar la agrupación de secuencias, lo que permitió ordenarlas para obtener una matriz de distancias bajo el modelo NJ, con 1 000 repeticiones *bootstrap* en MEGA 7.

El análisis de Máxima verosimilitud o *Maximum likelihood* (ML) fue realizado en RAxML v8.2.X (Stamatakis, 2014) utilizando la interfaz gráfica de usuario raxmlGUI 1.5 (Silvestro & Michalak, 2012) con el modelo GTRGAMMAI (General Time Reversible con distribución gamma y proporción de sitios invariables) como mejor modelo de sustitución nucleotídica, seleccionado con el análisis en jModelTest 2 (Darriba et al., 2012) con tres esquemas de sustitución utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC), y 1 000 repeticiones *bootstraps*.



**Tabla 6.** Lugar de colecta y referencias de las secuencias *rbcL* de especies de *Rhodymenia* y *Botryocladia* extraídas de GenBank y utilizadas en los análisis filogenéticos

<b>Especie</b>	<b>Lugar de colecta</b>	<b>Código Genbank</b>	<b>Referencia</b>
<i>Rhodymenia pseudopalmata</i> Greville	Bahía de Onslow, Carolina del Norte, EE. UU	KF367793	No publicado
<i>Rhodymenia californica</i> Kylin	Bahía de Onslow, Carolina del Norte, EE. UU	KU687844	No publicado
<i>Rhodymenia pacifica</i> Kylin	McAbee Beach, Monterey, California, EE. UU	KU687850	No publicado
<i>Rhodymenia rhizoides</i> E. Y. Dawson	Monterey Bay, Aquarium Reef, California, EE. UU	KU687865	No publicado
<i>Rhodymenia bamfieldensis</i> Filloramo & G. W. Saunders	Bordelais Islands (Bahía Norte), Bamfield, British Columbia, Canadá	KU687884	No publicado
<i>Rhodymenia intricata</i> Okamura	Ei, Ibusuki County, Kagoshima, Japón	AB383120	Suzuki et al., 2010
<i>Rhodymenia corallina</i> Greville	Playa Choya, Coquimbo, Chile	AY168657	Gavio & Fredericq, 2003
<i>Rhodymenia delicatula</i> P. J. L. Dangeard	Woods Hole (MBL), Massachusetts, EE. UU	KU726696	Filloramo & Saunders, 2016b
<i>Rhodymenia skottsbergii</i> E. Y. Dawson	La Boca, Navidad, Chile	AY294354	Gavio et al., 2005
<i>Rhodymenia stenoglossa</i> J. Agardh	Warrnambool, Victoria, Australia	KU726706	Filloramo & Saunders, 2016b
<i>Rhodymenia capensis</i> J. Agardh	Península Cape, Sudáfrica	AF385646	Hommersand & Fredericq, 2003
<i>Rhodymenia obtusa</i> (Greville) Womersley	Península Cape, Sudáfrica	AF385647	Hommersand & Fredericq, 2003
<i>Botryocladia botryoides</i> (Wulfen) Feldmann	Trieste, Italia	AY444169	Wilkes et al., 2006
<i>Botryocladia pseudodichotoma</i> (Farlow) Kylin	Monterey Bay, Aquarium Reef, California, EE. UU	KU687853	No publicado
<i>Botryocladia leptopoda</i> (J. Agardh) Kylin	Australia	HQ400597	Schmidt et al., 2017

El análisis de Inferencia Bayesiana (IB) fue realizado con el programa Mr. Bayes v3.2.6 (Ronquist et al., 2012). Debido a que en el programa no se encuentra implementado el modelo TrN+G+I (Tamura-Nei con distribución gamma y proporción de sitios invariables), seleccionado con el Criterio de Información Bayesiana o *Bayesian Information Criterion* (BIC) en jModelTest 2 con 11 esquemas de sustitución, se escogió el modelo cercano más complejo (GTR+G+I), de acuerdo a la sugerencia de Ronquist et al. (2011). El análisis consistió en dos procesos independientes, cada uno con tres cadenas templadas y una cadena fría, cinco millones de generaciones y muestreo cada 1 000 generaciones. La convergencia de ambas corridas fue evaluada con el programa Tracer v1.6.0 (Rambaut et al., 2014) descartando el primer diez por ciento de los árboles de cada proceso como periodo de calentamiento o *burn-in*. El valor de las probabilidades posteriores obtenidas en el árbol consenso fue mapeado en el árbol de ML.

### **3.3.4 DELIMITACIÓN DE ESPECIES**

Los modelos de delimitación utilizados se basan en el análisis de árboles filogenéticos inferidos a partir de un solo *locus*, para identificar clados formados dentro del grupo de estudio, en este caso *Rhodymenia*. En cada modelo presentado, se pueden realizar dos tipos de análisis.

Para los análisis de delimitación, se utilizó una secuencia de cada haplotipo identificado en los análisis filogenéticos para las *Rhodymenia* de la costa central del Perú, eliminando las secuencias repetidas. En el alineamiento también se incluyeron las secuencias de *R. corallina* (AY168657), *R. skottsbergii* (AY294354) y dos de *Botryocladia* (AY444169 y KU687853), disponibles en el GenBank.

- **MODELO GENERALIZADO MIXTO DE YULE Y COALESCENCIA**

El Modelo Generalizado Mixto de Yule y Coalescencia o *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC por sus siglas en inglés) calcula un umbral único o un umbral múltiple que varía a lo largo del árbol filogenético (Monaghan et al., 2009). Para ello, se requiere un árbol ultramétrico, el cual fue elaborado con el programa BEAST v2.4.5 (Bouckaert et al., 2014) utilizando la aplicación de interfaz de usuario gráfica BEAUti2 (*Bayesian Evolutionary Analysis Utility*), de acuerdo los siguientes *priors* o parámetros previos: reloj normal relajado (*relaxed log-normal clock*) (Drummond et al., 2006), modelo de coalescencia de tamaño poblacional constante (Monaghan et al., 2009) y el modelo de

substitución nucleotídica TrN+G (Tamura-Nei con distribución gamma), seleccionado por jModelTest bajo el Criterio de Información Bayesiana (BIC) con 11 esquemas de sustitución. El análisis Bayesiano se realizó utilizando los siguientes parámetros: 10 millones de generaciones evaluadas con el método de las Cadenas de Markov Monte Carlo MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*), con muestreos establecidos cada 1 000 generaciones, generando un total de 10 000 árboles. En Tracer v1.6 se evaluó la convergencia de las MCMC, constatando que todos los parámetros alcancen el tamaño de muestra estimado (ESS mayor a 200). Por último, la información de los árboles inferidos fue resumida en un solo “árbol objetivo”, utilizando el programa TreeAnnotator v2.4.6 (Drummond & Rambaut, 2007) con un valor de calentamiento (*burn-in*) establecido en 10 %. Con el árbol inferido, el análisis de delimitación se realizó con la interfaz web de The Exelixis Lab (<http://species.h-its.org/gmyc/>), utilizando ambos métodos: umbral único y umbral múltiple.

- **ÁRBOLES POR PROCESOS DE POISSON**

La implementación bayesiana del modelo bPTP y el modelo PTP (*Poisson Tree Processes*) infieren límites entre especies putativas a partir de un árbol filogenético (Zhang et al., 2013). Para obtener la construcción filogenética, se realizó un análisis de Máxima verosimilitud (ML) en RAxML v8.2.X (Stamatakis, 2014), utilizando la interfaz de usuario gráfica raxmlGUI 1.5 (Silvestro & Michala, 2012) con el modelo de sustitución nucleotídica GTRGAMMA (General Time Reversible con distribución gamma), seleccionado por jModelTest2 (Darriba et al., 2012) con tres esquemas de sustitución y utilizando el Criterio de Información de Akaike (AIC), y 1 000 replicaciones *bootstraps*. Con el árbol inferido, se realizaron los análisis en el servidor en línea de bPTP de The Exelixis Lab (<http://species.h-its.org/ptp/>) de acuerdo a las siguientes especificaciones: 500 mil generaciones MCMC, árbol enraizado con las secuencias de *Botryocladia* (AY444169 y KU687853), y remoción de las secuencias externas (*Botryocladia*) para mejorar los resultados del análisis; el resto de especificaciones fueron dejadas por defecto (Zhang et al., 2013).

### **3.4. ANÁLISIS MORFOLÓGICO**

El hábito de los ejemplares de herbario fue registrado digitalmente utilizando un escáner de computadora y fotografiados con el estereoscopio Zeiss Discovery V.12, para detalles morfológicos particulares. Se evaluó la forma y medida del talo, presencia o ausencia del disco de fijación y/o estolones, tipo de ramificación, forma de las láminas (mediciones de los segmentos), presencia de proliferaciones, color y terminación de los ápices, así como la distribución de tetrasporangios en soros y disposición de los cistocarpos en las láminas y sus proliferaciones.

Con una hoja de afeitar, se realizaron cortes longitudinales a mano alzada bajo un estereoscopio Zeiss Discovery V.12 para analizar la morfología interna de las estructuras vegetativas y reproductivas. Algunos segmentos del talo fueron teñidos con azul de anilina al 1 % durante aproximadamente cinco minutos, posteriormente enjuagados con HCl al 1 % (mordiente) e inmediatamente lavados con agua destilada; los segmentos a preservar fueron montados en jarabe de maíz KARO al 50 %. Las observaciones morfológicas fueron registradas con un capturador de imágenes Leica DFC290 HD acoplado a un microscopio Leica DM1000 LED.

Para el análisis de la estructura interna vegetativa, se evaluó el número de capas de células de la médula y corteza. También se registró la morfología del soro tetrasporangial, la inserción de las tetrásporas en la corteza, y su grado de modificación en la misma. En las frondas femeninas se registraron la forma y disposición de los cistocarpos (Dawson, 1941; Filloramo & Saunders, 2016b).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 MORFOESPECIES DE *Rhodymenia*

La clasificación morfológica del material de *Rhodymenia* recolectado en la costa central del Perú, permitió seleccionar 25 especímenes representativos en base a su morfología externa: un ejemplar procedente de la Colección Científica del IMARPE (2015) y 24 ejemplares de las colectas realizadas en el 2016. Previo al análisis molecular, se diferenciaron nueve morfotipos, seis correspondientes a las especies de *Rhodymenia* registradas en Perú y tres morfotipos que no pudieron ser asignados a especies descritas: *R. corallina* (seis especímenes), *R. howeana* (tres especímenes), *R. multidigitata* (tres especímenes), *R. californica* (dos especímenes), *R. skottsbergii* (un espécimen), *R. flabellifolia* (cinco especímenes), *Rhodymenia* sp. (tres especímenes), *Rhodymenia* sp. 2 (un espécimen) y *Rhodymenia* sp. 3 (un espécimen) (Tabla 4).

### 4.2 ANÁLISIS MOLECULAR

El análisis del alineamiento de las secuencias de *rbcL* de 25 especímenes de *Rhodymenia* de la costa central del Perú, reveló la presencia de nueve haplotipos y 145 sitios polimórficos de los 1 005 pares de bases (pb) analizados. Los siguientes análisis también incluyeron 12 secuencias de *Rhodymenia* de otras partes del mundo y tres secuencias de *Botryocladia* como grupo externo u *outgroup*, todas obtenidas de GenBank (Tablas 4 y 6).

#### 4.2.1. ANÁLISIS NEIGHBOUR-JOINING Y DISTANCIAS GENÉTICAS

El dendrograma resultante del análisis NJ de las secuencias estudiadas muestra la agrupación de cinco clados: *R. flabellifolia*, *R. skottsbergii*, *Rhodymenia* sp., *R. corallina* y *R. corallina* 2 (Figura 2).

El clado *R. flabellifolia* agrupa cinco secuencias de la costa central del Perú (BG-236, BG-238, BG-299, BG-300, N256), de especímenes que morfológicamente fueron identificados

como *R. flabellifolia* (Tabla 7), con una divergencia intra-clado máxima de 0.1 % (Tabla 8) entre sus tres haplotipos.

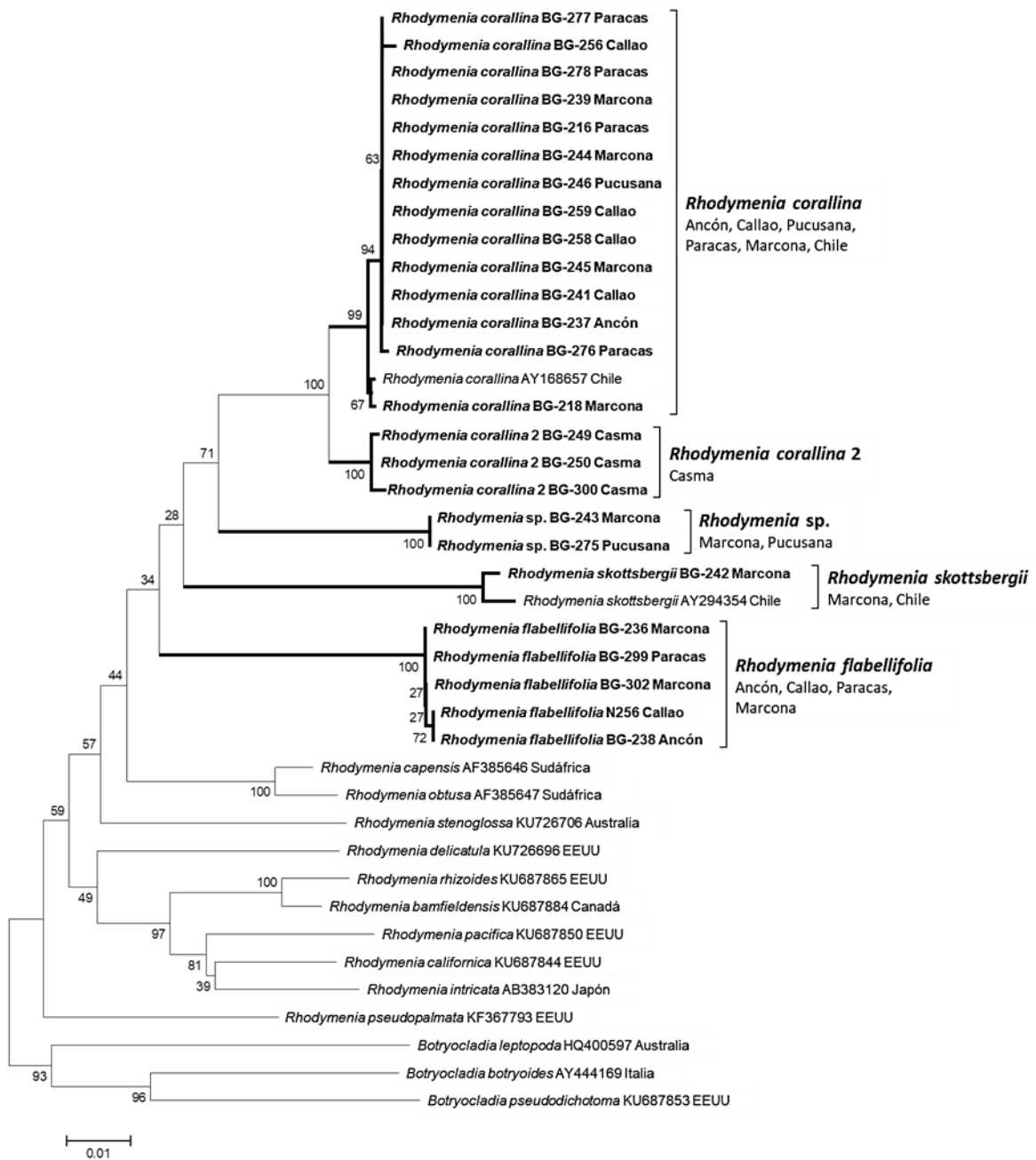
El clado *R. skottsbergii* asocia la secuencia de Chile para esta especie (AY294354, GenBank) y una secuencia de Perú (BG-242), correspondiente al espécimen morfológicamente identificado como *R. skottsbergii* (Tabla 7). Estas secuencias difieren genéticamente en un 0.7 % (Tabla 8).

El clado *Rhodymenia* sp. agrupa dos secuencias de la costa central de Perú (BG-243, BG-275), que corresponden a especímenes morfológicamente identificados como *R. californica* (Tabla 7), pero las secuencias BG-243 y BG-275 no se asocian a la secuencia de *R. californica* de EE. UU. (KU687844, GenBank), ni a ninguna otra secuencia disponible en la base de datos de GenBank (Figura 2). Las secuencias de *Rhodymenia* sp. corresponden a un mismo haplotipo (divergencia genética=0).

El clado *R. corallina* agrupa la secuencia de *R. corallina* de Chile (AY168657, GenBank) y 14 secuencias de Perú (Tabla 7). Estas 14 secuencias, corresponden a especímenes de las siguientes morfoespecies: *Rhodymenia* cf. sp. 1 (BG-239, BG-245, BG-277), *Rhodymenia* sp. 2 (BG-237), *Rhodymenia* sp. 3 (BG-244), *R. cf. multidigitata* (BG-246, BG-256, BG-258), *R. cf. howeana* (BG-218, BG-241, BG-259), y *R. cf. corallina* (BG-216, BG-276, BG-278) (Tabla 7). Este clado presenta cinco haplotipos y una divergencia intra-clado máxima de 0.5 % (Tabla 8).

El clado *R. corallina 2* agrupa las secuencias de los especímenes con forma *R. corallina* muestreados en Casma (BG-249, BG-250 y BG-300). Presenta tres haplotipos y una divergencia intra-clado máxima de 0.3 %, separándose de *R. corallina* (el clado más cercano) por una distancia inter-clado media de 1.6 % (Tabla 8). La distancia inter-clado mínima entre *R. corallina* y *R. corallina 2* es 1.4 % (Tabla 8).

La divergencia intra-clado en las secuencias de *Rhodymenia* de la costa central del Perú varía entre 0 y 0.7 % y los valores de las de distancias inter-clado, incluyendo todas las secuencias de *Rhodymenia* analizadas (generadas en este estudio y de GenBank), varían entre 1.4 y 11.4% (Anexo 2).



**Figura 2.** Dendrograma resultante del análisis neighbour-joining de las secuencias *rbcL* de especies de *Rhodymenia*.

**Tabla 7.** Código, morfoespecie identificada y nombre del clado por neighbour-joining de los especímenes de *Rhodymenia* de la costa central del Perú.

<b>Código</b>	<b>Morfoespecie</b>	<b>Clado</b>
BG-216	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>corallina</i>	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-276	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>corallina</i>	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-278	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>corallina</i>	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-218	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>howeana</i>	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-241	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>howeana</i>	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-259	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>howeana</i>	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-246	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>multidigitata</i>	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-256	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>multidigitata</i>	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-258	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>multidigitata</i>	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-239	<i>Rhodymenia</i> sp.1	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-245	<i>Rhodymenia</i> sp.1	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-277	<i>Rhodymenia</i> sp.1	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-237	<i>Rhodymenia</i> sp.2	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-244	<i>Rhodymenia</i> sp.3	<i>Rhodymenia corallina</i>
BG-249	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>corallina</i>	<i>Rhodymenia corallina</i> 2
BG-250	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>corallina</i>	<i>Rhodymenia corallina</i> 2
BG-300	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>corallina</i>	<i>Rhodymenia corallina</i> 2
BG-243	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>californica</i>	<i>Rhodymenia</i> sp.
BG-275	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>californica</i>	<i>Rhodymenia</i> sp.
BG-242	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>skottsbergii</i>	<i>Rhodymenia skottsbergii</i>
BG-236	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>flabellifolia</i>	<i>Rhodymenia flabellifolia</i>
BG-238	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>flabellifolia</i>	<i>Rhodymenia flabellifolia</i>
BG-299	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>flabellifolia</i>	<i>Rhodymenia flabellifolia</i>
BG-302	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>flabellifolia</i>	<i>Rhodymenia flabellifolia</i>
N256	<i>Rhodymenia</i> cf. <i>flabellifolia</i>	<i>Rhodymenia flabellifolia</i>



**Tabla 8.** Distancias máximas intraclados, y distancias mínimas y medias a la especie/clado de *Rhodymenia* más cercano.

Especie/clado	Distancia máxima intra-clado (%)	Distancia mínima inter-específica/clado (%)	Especie/clado más cercano	Distancia media al más cercano (%)
<i>R. corallina</i>	0.5	1.4	<i>R. corallina 2</i>	1.6
<i>R. corallina 2</i>	0.3	1.4	<i>R. corallina</i>	1.6
<i>R. flabellifolia</i>	0.1	6.7	<i>R. capensis</i>	6.8
<i>Rhodymenia</i> sp.	0.0	5.4	<i>R. corallina</i>	5.8
<i>R. skottsbergii</i>	0.7	7.6	<i>R. corallina 2</i>	7.9
<i>R. pseudopalmata</i>	-	7.7	<i>R. delicatula</i>	7.7
<i>R. capensis</i>	-	1.6	<i>R. obtusa</i>	1.6
<i>R. obtusa</i>	-	1.6	<i>R. capensis</i>	1.6
<i>R. californica</i>	-	4.1	<i>R. intricata</i>	4.1
<i>R. intricata</i>	-	4.1	<i>R. californica</i>	4.1
<i>R. pacifica</i>	-	4.7	<i>R. intricata</i>	4.7
<i>R. rhizoides</i>	-	1.7	<i>R. bamfieldensis</i>	1.7
<i>R. bamfieldensis</i>	-	1.7	<i>R. rhizoides</i>	1.7
<i>R. delicatula</i>	-	7.1	<i>R. rizoides/ R. bamfieldensis</i>	7.1
<i>R. stenoglossa</i>	-	6.7	<i>R. capensis</i>	6.7

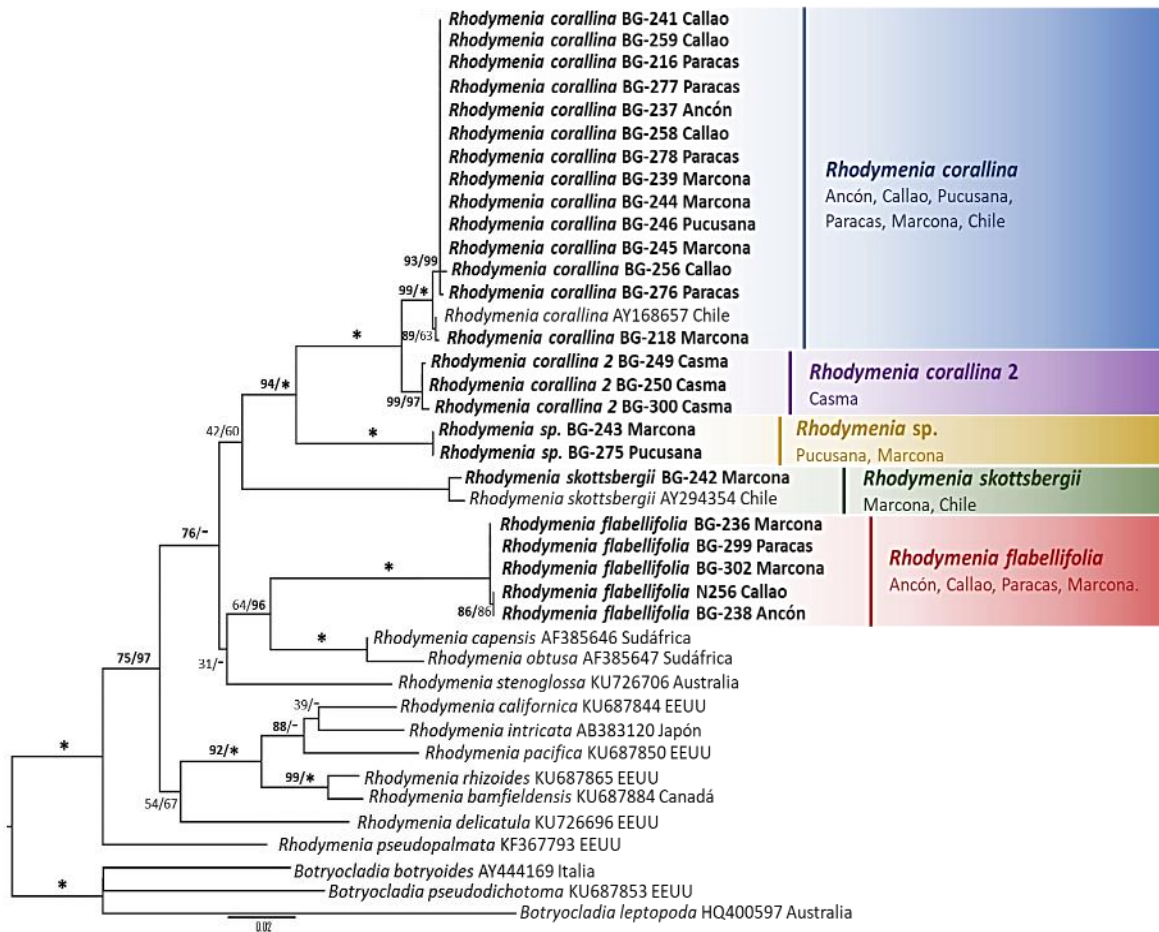
#### 4.2.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Las especies de *Rhodymenia* se agruparon en un clado monofilético que se divide en *R. pseudopalmata* y otro subclado (valores de *bootstrap* en ML BS=100 y valores de probabilidad posterior bayesiana BP=100), que está formado por dos subclados (BS=75/BP=97): en el primero se agrupan secuencias del Pacífico Norte (EE. UU., Canadá y Japón), y en el segundo subclado se agrupan secuencias pertenecientes al Pacífico y Atlántico Sur (Sudamérica, Australia y Sudáfrica) (Figura 3).

Las muestras de *Rhodymenia* de la costa central del Perú formaron las mismas cinco agrupaciones que en el análisis NJ: *Rhodymenia* sp., *R. skottsbergii*, *R. flabellifolia*, *R. corallina* y *R. corallina 2*. El clado *Rhodymenia* sp. agrupa dos secuencias (BG-243, BG-275), de Marcona y Pucusana, en un clado con alto soporte (BS=100/BP=100) que no se

asocia a otras secuencias de la base de datos y se encuentra más cercano al grupo de *R. corallina*. El clado *R. skottsbergii* agrupa la secuencia BG-183 de Marcona (Perú) con *R. skottsbergii* de Chile (AY294354, GenBank) en un clado con alto soporte (BS=100/BP=100). El clado *R. flabellifolia* agrupa cinco secuencias (BG-236, BG-302, BG-299, BG-238, N256) de especímenes colectados en Marcona (2), Paracas (1), Callao (1) y Ancón (1); estas secuencias forman un clado monofilético con alto soporte (BS=100/BP=100), que es parte del clado que contiene las especies *R. obtusa* y *R. capensis* de Sudáfrica (BS=64/BP=96). Hasta la fecha, no existen secuencias disponibles de *R. flabellifolia* de Concepción, Chile (localidad tipo) en GenBank.

Por otro lado, 17 especímenes de gran variabilidad morfológica de *R. corallina* formaron un grupo monofilético (BS=94/BP=100) dividido en dos clados, denominados *R. corallina* y *R. corallina 2* (BS=100/BP=100 de soporte). El clado *R. corallina* se divide formando dos subclados (BS=99/BP=100), uno de ellos incluye secuencias de Ancón (BG-237), Callao (BG-241, BG-259, BG-258, BG-256), Pucusana (BG-246), Paracas (BG-216, BG-277, BG-278, BG-276) y Marcona (BG-239, BG-244, BG-245), observándose la presencia de tres haplotipos. El segundo grupo incluye la secuencia BG-218 de Marcona y la secuencia de *R. corallina* (AY168657) de Chile, para la cual no se especifica si el espécimen fue colectado en la localidad tipo (Concepción). El segundo clado *R. corallina 2* (BS=99/BP=97) incluye tres secuencias (BG-249, BG-250, BG-300) de especímenes recolectados en Casma (Áncash).

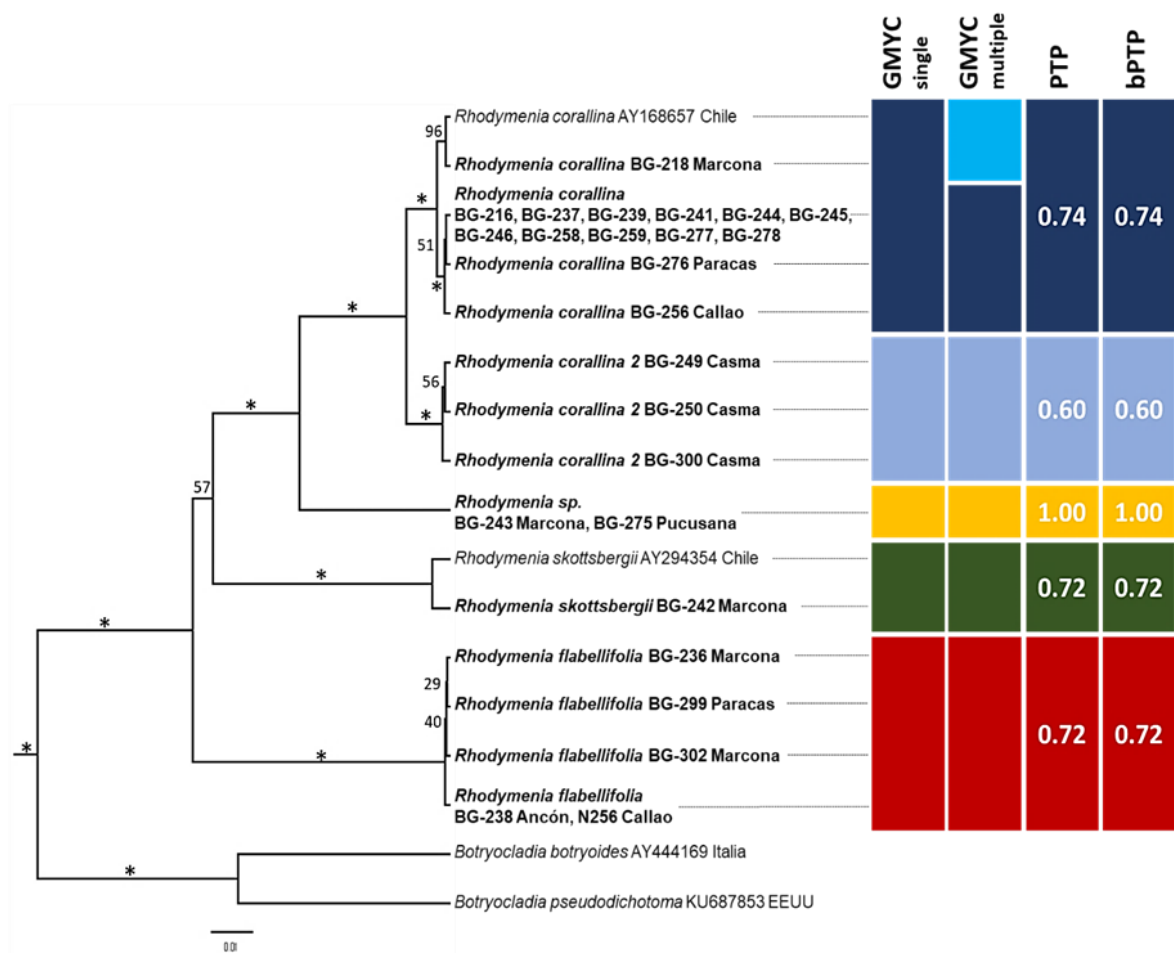


**Figura 3.** Construcción filogenética resultante del análisis Máxima verosimilitud (ML) de las secuencias de *rbcL*, incluyendo valores del análisis de Inferencia Bayesiana (IB). Los valores de bootstrap mayores a 74 y los valores de probabilidades bayesianas posteriores mayores a 89 están resaltados, mientras los valores representados con un guion (-) corresponden a los nodos donde la topología del análisis de IB y ML no de corresponden. Los soportes al 100% están representados con un asterisco (\*).

### 4.2.3. DELIMITACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES

Los modelos GMYC (Generalized Mixed Yule Coalescent) y PTP (Poisson Tree Processes) permitieron inferir el número de especies distintas a partir de árboles filogenéticos. Utilizando el árbol ultramétrico obtenido en BEAST se realizaron los análisis para el cálculo de un límite o umbral único y umbrales múltiples con GMYC; y con la construcción filogenética de ML, resultante en RAxML, se realizaron los análisis PTP y bPTP (de la Cadena Mendoza, 2016).

Tres de los cuatro análisis realizados (PTP, bPTP y el cálculo de un umbral único en GMYC) coinciden en la delimitación de los cinco clados identificados en los árboles filogenéticos los clados *R. flabellifolia*, *R. skottsbergii*, *Rhodymenia* sp., *R. corallina* y *R. corallina 2* como especies genéticas distintas, en base al marcador *rbcL*. Sólo el cálculo de umbrales múltiples en GMYC resultó en la delimitación de seis especies putativas, al considerar como una especie distinta al subclado formado por *R. corallina* de Chile (AY294354, GenBank) y *R. corallina* de Marcona, Perú (BG-218) (Figura 4).



**Figura 4.** Solución de los clados inferidos con los modelos de delimitación de especies GMYC (umbral único y umbral múltiple), PTP y bPTP visualizados sobre el árbol ultramétrico inferido en BEAST 2.1. Este fue construido con las secuencias estudiadas (una por cada haplotipo), con la adición de secuencias de GenBank: *R. corallina* (AY168657 Chile), *R. skottsbergii* (AY294354 Chile) y dos especies de *Botryocladia* como grupo externo. Sobre cada rama se indica el valor de la probabilidad posterior, (\*) representa soporte total (100). Se indica el valor de soporte de cada clado, inferido con los modelos PTP y bPTP.

### 4.3 ANÁLISIS MORFOLÓGICO

A continuación, se presentan las características morfológicas de los cinco clados de *Rhodymenia* de la costa central del Perú diferenciados molecularmente.

- ***Rhodymenia corallina* (BORY) GREVILLE (Figuras 5 y 6)**

**BASÓNIMO:** *Sphaerococcus corallina* Bory 1828

**SINÓNIMOS:** *Sphaerococcus corallina* Bory 1828

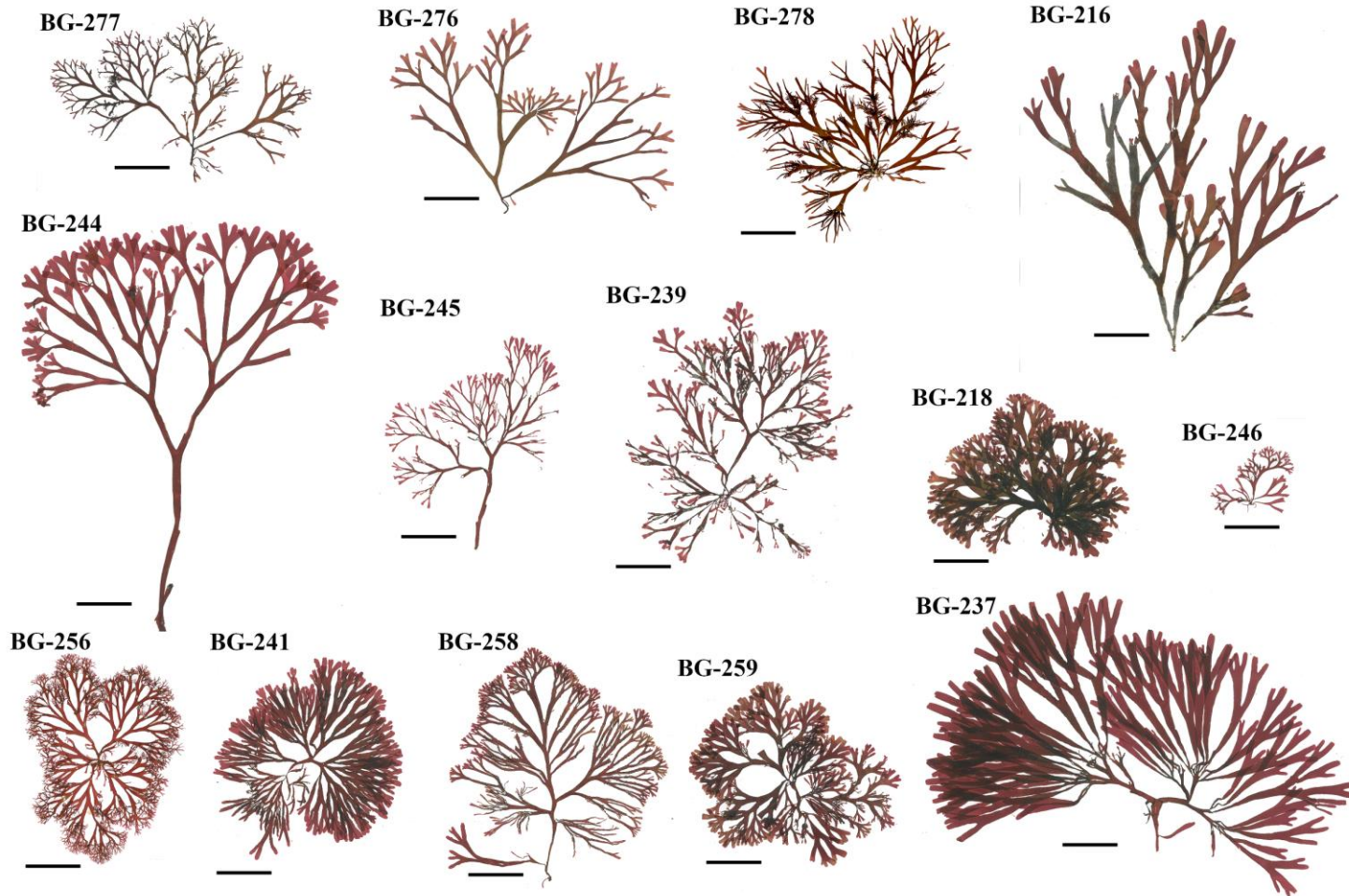
**LOCALIDAD TIPO:** Concepción, Chile (Bory de Saint-Vincent 1828).

**MATERIAL COLECTADO:** Ochenta especímenes

**LOCALIDAD DE COLECTA:** Ancón, Callao, Pucusana, Paracas, Marcona

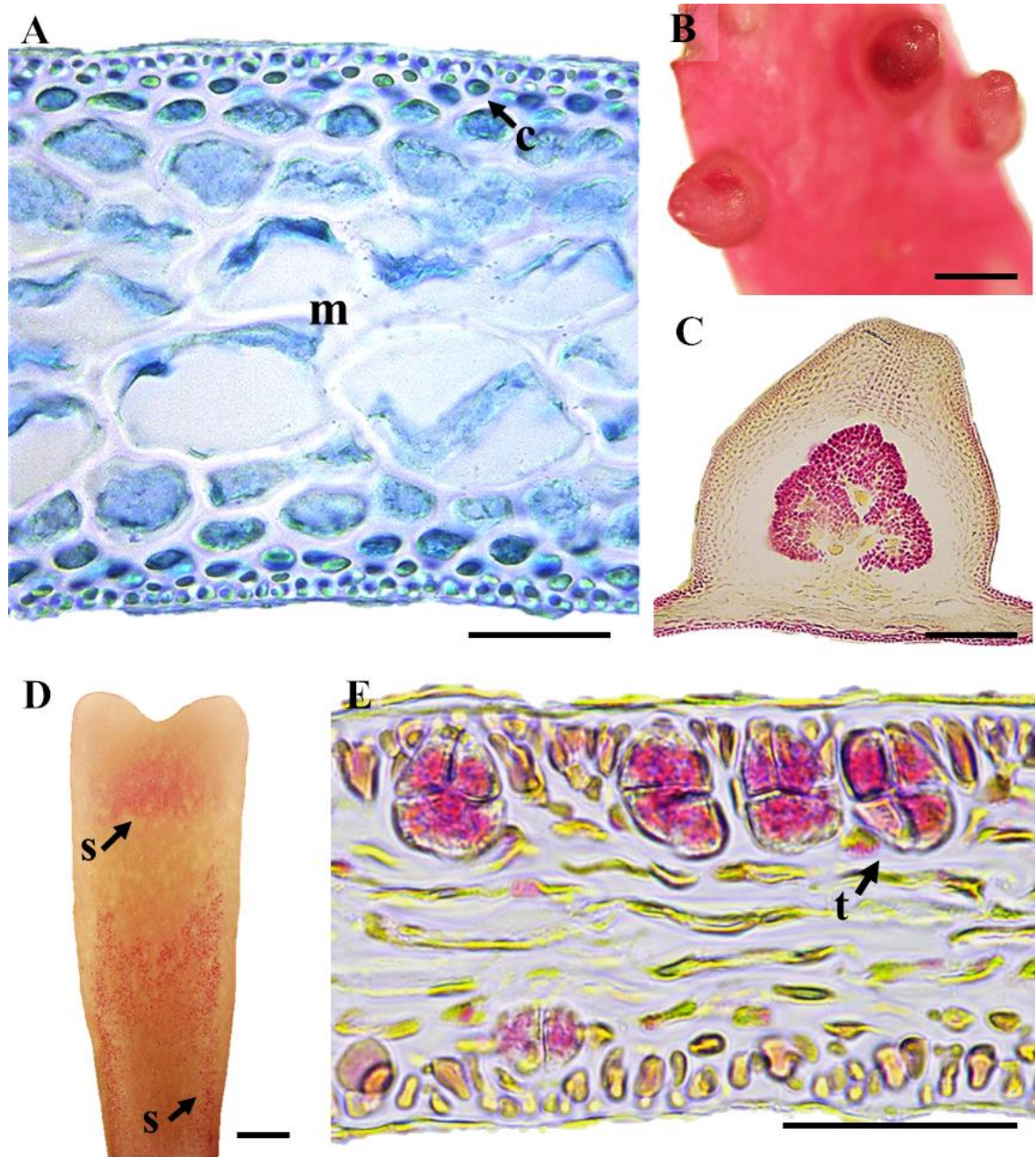
Talo de 6-44.5 cm de longitud, con un disco de fijación pequeño (0.5-3 mm), adhesivo y con forma irregular, del cual crecen estolones y estipes con forma semi-cilíndrica en la base (hasta 2.5 cm de longitud), que se aplanan formando láminas de base acuñada. Ramificación simpodial, con frondas divididas tres a 17 veces de forma dicotómica e irregular en un solo plano. Los segmentos varían en longitud (0.2-7.6 cm) y ancho (0.1-6 cm), pero suelen ser estrechos en la base. Existe una gran variedad morfológica de las frondas, en tamaño (8.9-44.5 cm), expansión y división de las mismas (Figura 5), también pueden presentar abundantes proliferaciones a partir de zonas dañadas de la lámina, así como del estipe. Presentan médula compacta con cuatro a siete capas de células pseudoparenquimatosas, dos a tres células centrales son redondeadas o axialmente alargadas e incoloras en la parte central y disminuyen de tamaño hacia la corteza. La corteza está conformada por una a tres capas de células rojizas, la capa externa de células pequeñas y la interna de células oblongas horizontalmente más alargadas (Figura 6A).

Los cistocarpos se distribuyen de forma irregular, desde la parte media de la lámina hasta los ápices, en ambas caras e incluso pueden crecer en los bordes de las láminas. Poseen forma semiesférica y globosa, con un ostiolo prominente, a veces picudo (Figuras 6B y 6C) o no sobresaliente. Mientras que los tetrasporangios se encuentran agrupados en soros con bordes no definidos que se extienden desde los extremos hacia el centro del segmento en ambas caras. Se ubican en la zona subapical y en las últimas divisiones de la fronda, o extendidos en hileras paralelas a los bordes (Figura 6D). Los tetrasporangios cruciados se encuentran insertos en la corteza, sin generar modificación (Figura 6E). No se encontró material reproductivo masculino.



**Figura 5.** Hábito de los especímenes de *Rhodymenia corallina* colectados en la costa central del Perú que fueron incluidos en el análisis molecular. BG-277, BG-276, BG-278 y BG-216 fueron colectados en Paracas; BG-244, BG-245, BG-239 y BG-218 en Marcona; BG-246 en Pucusana; BG-256, BG-241, BG-258 y BG-259 en Callao; y BG-237 en Ancón. Barras de escala: 5 cm.





**Figura 6.** Morfología externa e interna de soros tetrasporangiales, cistocarpos y segmento vegetativo de *Rhodymenia corallina*. **A:** Sección longitudinal de un segmento vegetativo de la zona subapical, tinción con azul de anilina, mostrando la corteza (c) y la médula (m) (BG-276). **B.** Distribución de los cistocarpos sobre la fronda (BG-245). **C.** Sección transversal de un cistocarpio maduro (BG-245). **D.** Soros tetrasporangiales de forma irregular y borde no definido (s), ubicados en la zona subapical, se extienden formando hileras paralelas a los bordes (BG-276). **E.** Sección longitudinal de un soro tetrasporangial, mostrando tetrasporangios con división cruciada insertos en la corteza (t) (BG-277). Barras de escala: Fig. 6, 500  $\mu\text{m}$ ; Fig. 7, 50  $\mu\text{m}$ ; Fig. 8, 1 mm; Fig. 9, 500  $\mu\text{m}$ ; Fig. 10, 200  $\mu\text{m}$ ; Fig. 11, 50  $\mu\text{m}$ .



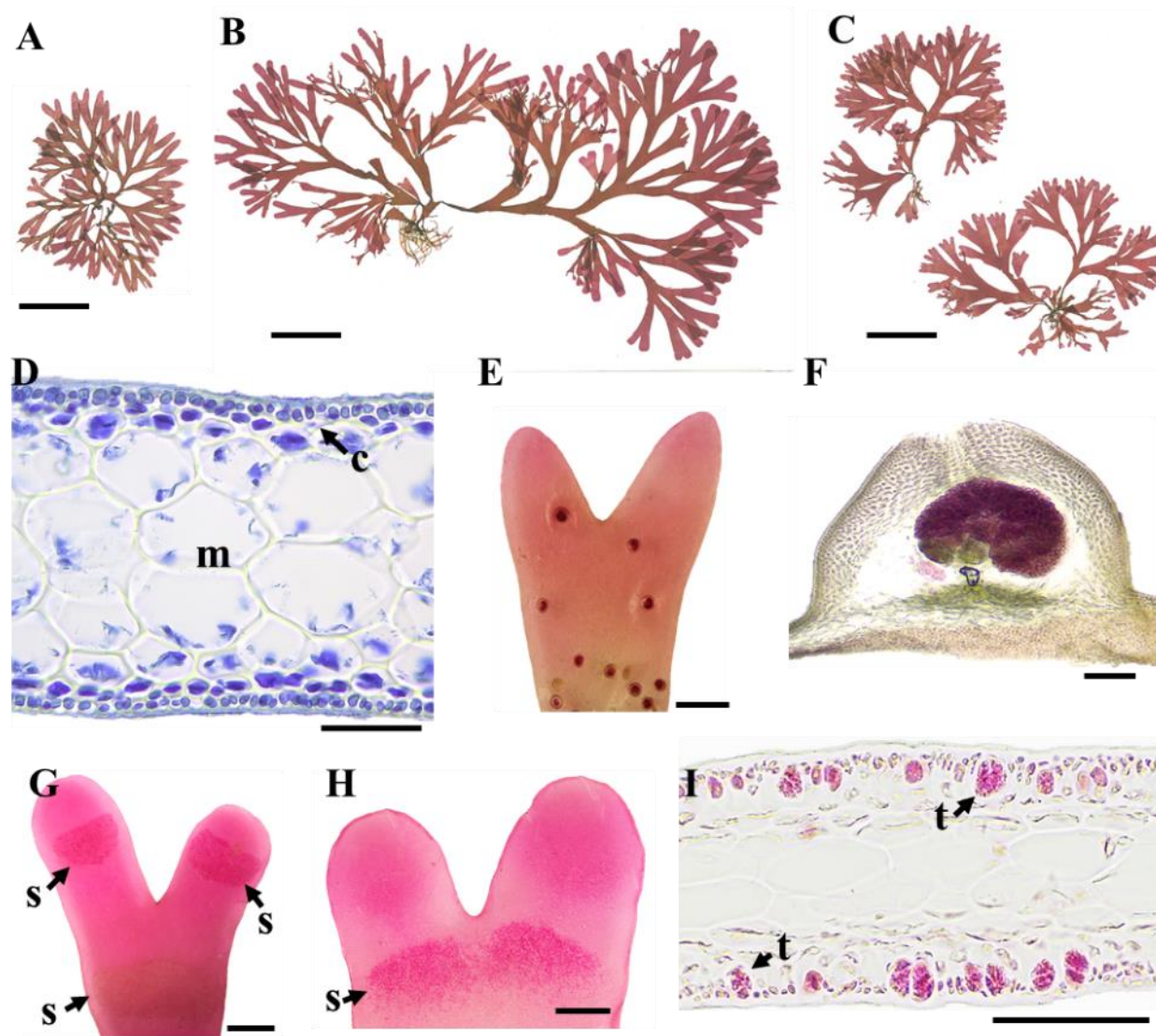
- ***Rhodymenia corallina* 2 (Figura 7)**

**MATERIAL COLECTADO:** Siete especímenes

**LOCALIDAD DE COLECTA:** Casma

Talo de 10-29.5 cm de alto con un disco basal simple (2-4.5 mm). Posee un estipe corto (1 cm) de 1-4.5 mm de diámetro, con proliferaciones estoloníferas (a veces abundantes) que crecen desde la base del disco y a lo largo de todo el estipe, incluso desde el inicio de la lámina, que pueden desarrollarse a modo de rhizoides o formar otras frondas. Frondas aplanadas y estipadas, con expansión flabelar (con mayor notoriedad desde la parte media de la lámina) y división dicotómica irregular; la dicotomía también se ve ensombrecida por la ocurrencia de proliferaciones a partir de áreas dañadas de la lámina (Figuras 7A, 7B y 7C). Las frondas se dividen dicotómicamente de 5 a 11 veces, con segmentos de 3-30 mm de longitud y 4-12 mm de ancho. La corteza está conformada por una a dos capas de células pigmentadas; la capa externa con células redondeadas y la interna con células oblongas; médula compacta con 4-7 capas de células en los segmentos medios y finales, siendo las 2-3 centrales, de mayor diámetro, reduciéndose de tamaño hacia la corteza, con una capa de células oblicuas como una forma intermedia entre las células de la corteza y la médula (Figura 7D).

Cistocarpos semiesféricos, con presencia de un ostiolo; se encuentran dispersos en la fronda, desde la parte media, y en las proliferaciones (Figuras 7E y 7F). Los tetrasporangios se encuentran agregados en soros de forma irregular o de media luna, que están ubicados en la parte apical o subapical de los últimos segmentos (Figuras 7G y 7H). No todos los soros presentan un contorno definido, sobre todo en proliferaciones jóvenes; algunos tienden a dispersarse en el límite más cercano a la base (Figura 7H). Los tetrasporangios presentan división cruciada y se encuentran incrustados en las células de la corteza, generando una leve modificación por el desplazamiento de las células aledañas frente al crecimiento de las tetrásporas (Figura 7I). No se encontró material reproductivo masculino.



**Figura 7.** Hábito, morfología externa e interna de soros tetrasporangiales, cistocarpos y segmento vegetativo de *Rhodymenia coralina* 2.

**A:** Hábito del gametofito femenino (BG-300).

**B y C:** Hábito de los tetrasporofitos BG-250 y BG-249.

**D:** Sección longitudinal de un segmento vegetativo, teñido con azul de anilina, mostrando la corteza (c) y la médula (m) (BG-300).

**E:** Distribución de los cistocarpos sobre el área apical (BG-300). **F:** Sección transversal de un cistocarpio maduro (BG-300).

**G:** Distribución de los soros tetrasporangiales (s) con contorno definido, ubicados cerca al ápice (BG-250).

**H:** Distribución de dos soros tetrasporangiales (s) con contorno definido solo de un lado, ubicado cerca al ápice (BG-249).

**I:** Corte longitudinal de un soro tetrasporangial, con tetrasporangios de división cruciada insertos en la corteza. Barras de escala: Figs A, B y C, 5 cm; Fig. D, 50  $\mu$ m; Fig. E, 2 mm; Figs F, 100  $\mu$ m; Fig. G, 2 mm; Fig. H, 1 mm; Fig. I, 100  $\mu$ m.

- ***Rhodymenia* sp. (Figura 8)**

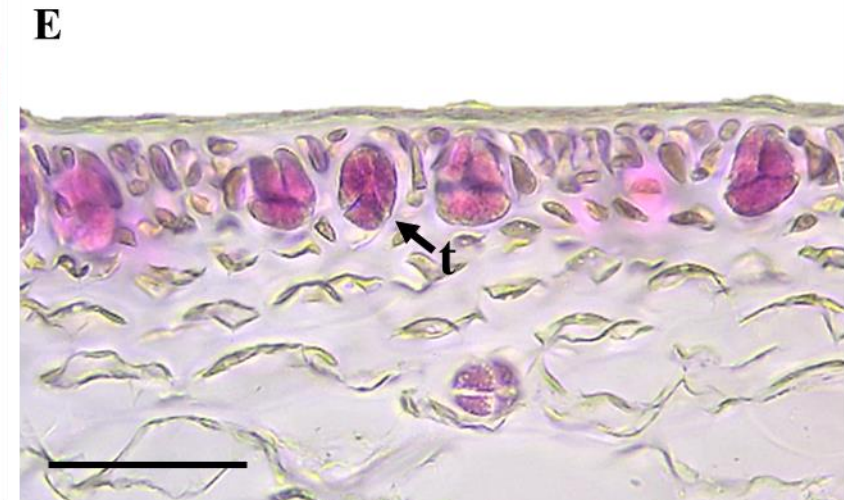
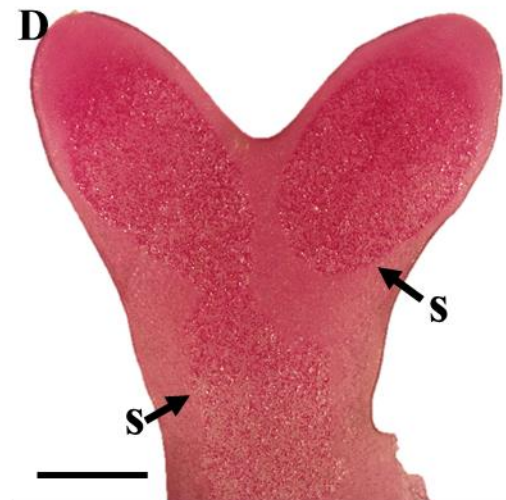
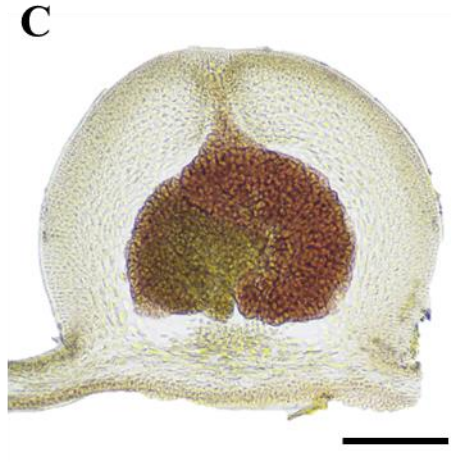
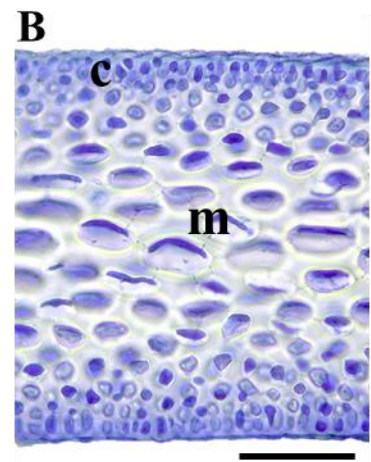
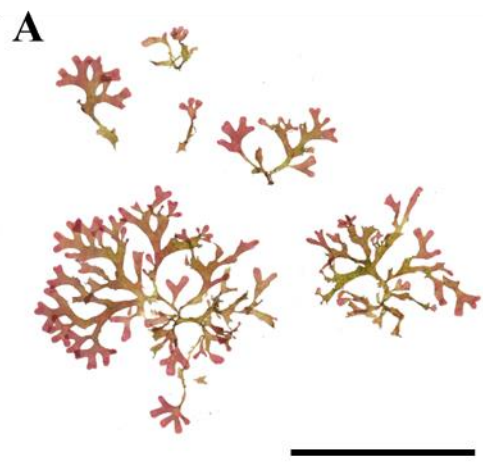
**OTROS REGISTROS:** *Rhodymenia californica* (Dawson et al., 1964)

**MATERIAL COLECTADO:** Dos especímenes

**LOCALIDADES DE COLECTA:** Pucusana, Marcona

Talo pequeño, de 3-5 cm, fronda aplanada y presencia de un pequeño disco de fijación (menor a 2 mm); se observó que algunos individuos crecían a partir de láminas viejas, sobre las que se adhieren discos de otros individuos, en algunos ejemplares no se encontraron discos, y las frondas se presentaron unidas en distintos puntos. Posee un estipe subcilíndrico muy corto (1 mm), con frondas divididas dicotómicamente de forma irregular en un solo plano (6-9 veces dividida) y segmentos de 0.9-5.8 mm de largo y 1.2-2.5 mm de ancho. Proliferaciones presentes en la base, y a partir de áreas dañadas (Figura 8A). Internamente, presenta una médula compacta, con 4-9 capas de células, las más grandes se encuentran al centro y su tamaño va disminuyendo gradualmente hacia la corteza, conformada por 1-4 capas de células pequeñas, el límite entre ambas parece confuso en algunas áreas (Figura 8B).

Cistocarpos globosos semiesféricos (Figura 8C). Tetrasporangios agregados en soros redondeados, con bordes definidos que se ubican en la parte apical y cerca al ápice (Figura **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**8D). Tetrasporangios con división cruciada, a veces tetraédrica se encuentran insertos entre las células de la corteza, generando una ligera modificación por el alargamiento y desplazamiento de las células (Figura 8E). No se encontró material reproductivo masculino.



**Figura 8.** Hábito, morfología externa e interna del soro tetrasporangial, un cystocarpio y segmento vegetativo de *Rhodymenia* sp.

**A:** Hábito de individuos tetrasporofitos (BG-175).

**B:** Sección longitudinal de un segmento vegetativo, teñido con azul de anilina, mostrando la corteza (c) y la médula (m) (BG-243).

**C:** Sección transversal de un cystocarpio maduro (BG-275).

**D:** Distribución de los soros tetrasporangiales sobre el área apical (s) (BG-275).

**E:** Sección longitudinal de un soro tetrasporangial mostrando los tetrasporangios cruciados (t) insertos en la corteza (BG-243).

Barras de escala: Fig. A, 5 cm; Fig. B, 50  $\mu$ m; Fig. C, 200  $\mu$ m; Fig. D, 1 mm; Fig. E, 50  $\mu$ m.

- ***Rhodymenia skottsbergii* E. Y. DAWSON (Figura 9)**

**SINÓNIMOS:** *Dendrymenia skottsbergii*

**LOCALIDAD TIPO:** Bahía de Concepción, Concepción, Chile (Dawson, 1941)

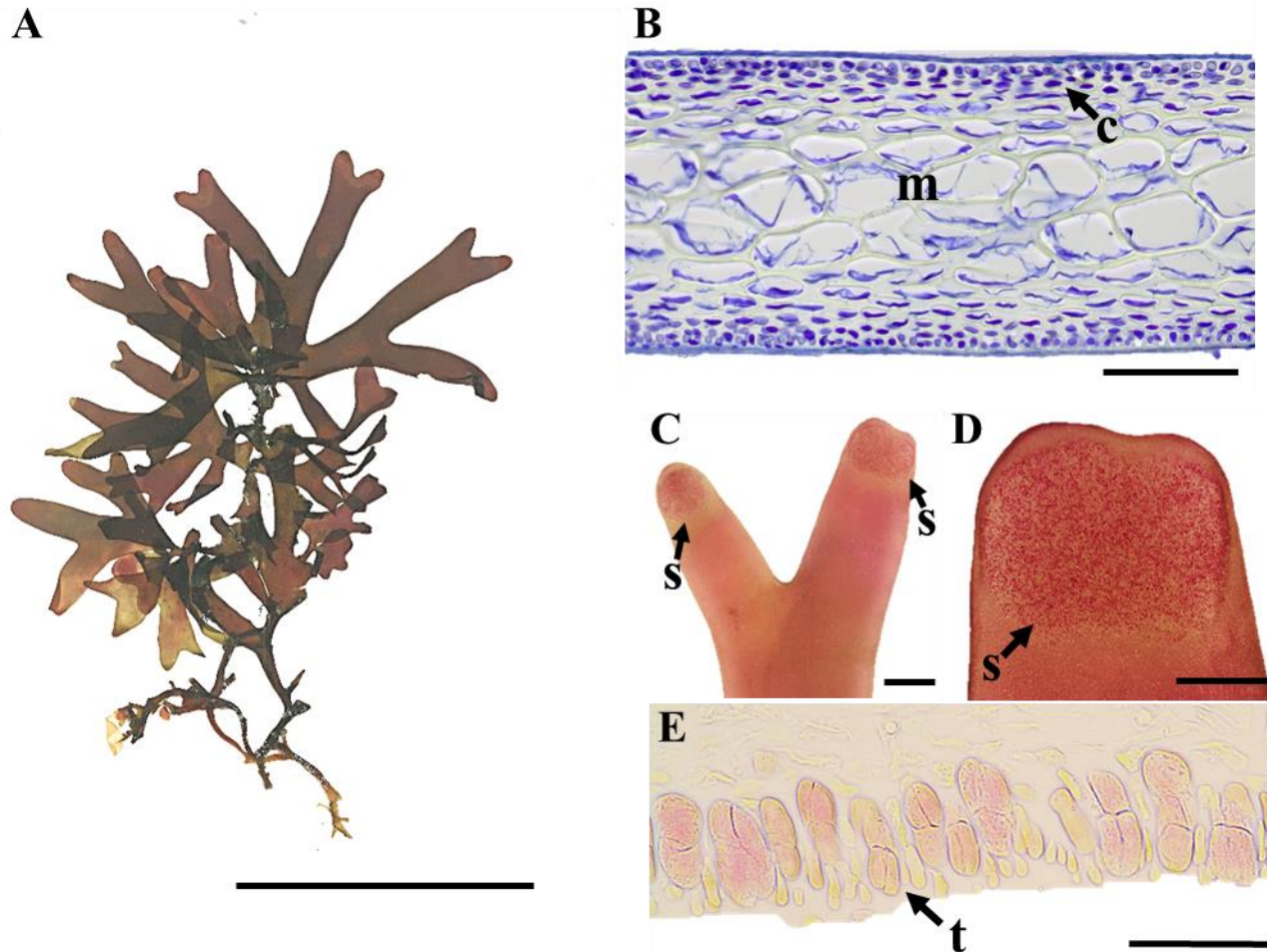
**MATERIAL COLECTADO:** Tres especímenes

**LOCALIDAD DE COLECTA:** Marcona

Talos de hasta 12 cm de alto con un disco simple (1.2-6 mm de diámetro) del cual crecen estipes rígidos y erectos de 1-3 cm de longitud. De la base de los estipes, se desarrollan proliferaciones estoloníferas que envuelven la base a la cual se fijan, cumpliendo la función de estructuras secundarias de fijación. Ramificación simpodial, con frondas (2.5-5 cm de longitud) palmadas de textura coriácea y división dicotómica irregular, con segmentos de 1-2.6 cm de longitud y 0.4-1.6 cm de ancho, presenta un tipo de organización amplexicaule (crecimiento alrededor del estipe) (Figura 9A). Posee una médula compacta con 7-9 capas de células con mayor tamaño en las 2-3 capas centrales que va disminuyendo hacia la corteza. El límite entre las células de la médula y la corteza no siempre es claro, debido al cambio gradual de tamaño de sus células. La corteza se encuentra formada por 2-4 capas de células, la capa externa, con células pequeñas y redondeadas; mientras que las células de las capas internas son oblongas con mayor tamaño hacia el centro (Figura 9B).

Los tetrasporangios se agrupan en soros redondeados con bordes definidos, que abarcan casi todo el ancho del ápice donde se ubican, excepto los bordes (Figuras 9C y 9D). Tetrasporangios cruciados y alargados, insertos en la corteza, producen una ligera modificación debido al alargamiento y desplazamiento de las células de la corteza (Figura 9E). No se encontró material reproductivo femenino ni masculino.





**Figura 9.** Hábito y morfología externa e interna del soro tetrasporangial y segmento vegetativo de *Rhodymenia skottsbergii*.

**A:** Hábito del tetrasporofito (BG-242).

**B:** Sección longitudinal de un segmento vegetativo, teñida con azul de anilina, mostrando la corteza (c) y médula (m) (BG-242).

**C y D:** Distribución de tres soros tetrasporangiales (s) con contorno definido, ubicados en el ápice (BG-242).

**E:** Sección transversal de un soro tetrasporangial, mostrando las tetrásporas cruciadas (t) insertas en la corteza (BG-242).

Barras de escala: Fig. A, 5 cm; Fig. B, 100  $\mu$ m; Fig. C, 2 mm; Fig. D, 1 mm; Fig. E, 500  $\mu$ m.

- ***Rhodymenia flabellifolia* (BORY) MONTAGNE (Figura 10)**

**BASÓNIMO:** *Sphaerococcus flabellifolius* Bory 1828

**SINÓNIMOS:** *Sphaerococcus flabellifolius* Bory 1828

*Dendrymenia flabellifolia* (Bory) Skottsberg 1923

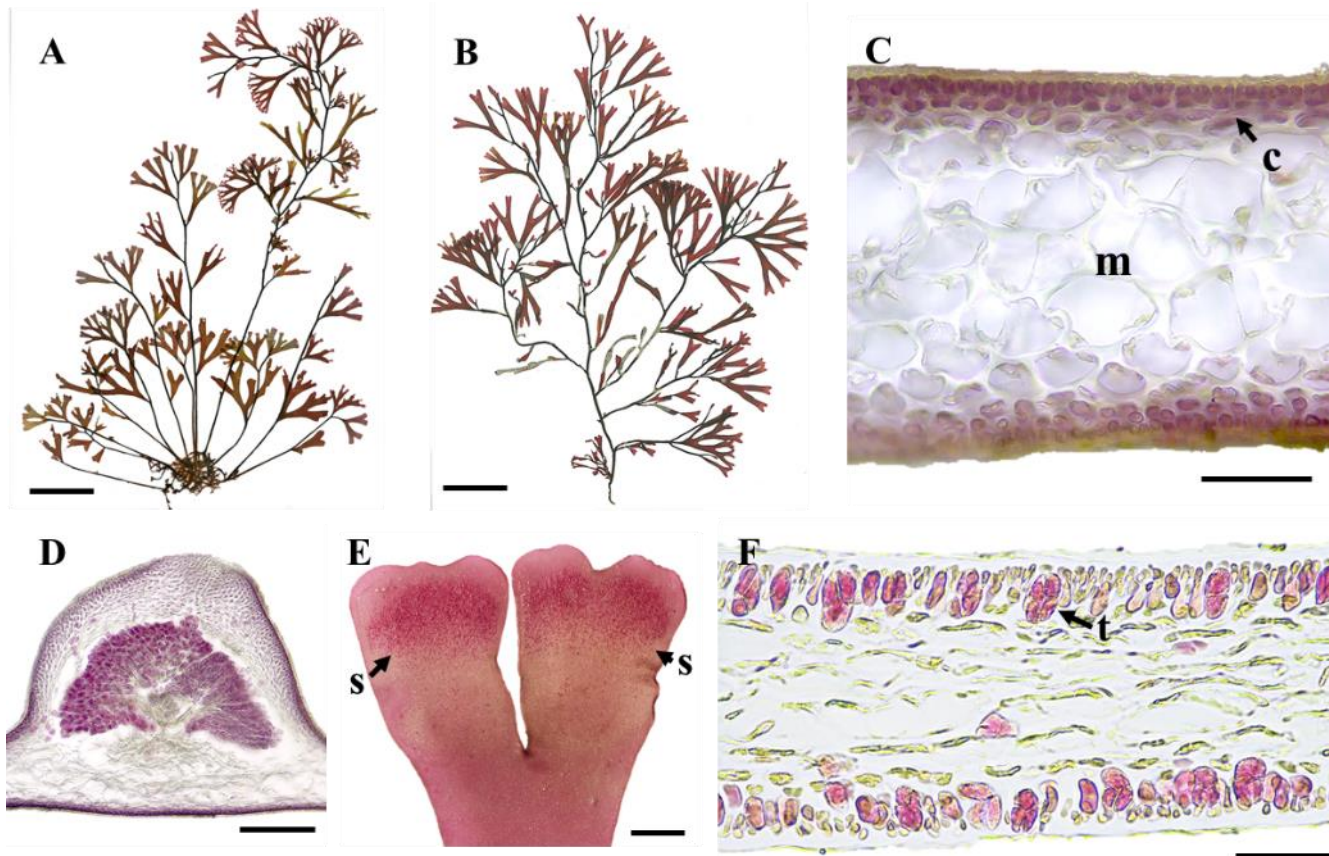
**LOCALIDAD TIPO:** Concepción, Chile (Bory de Saint-Vincent 1828)

**MATERIAL COLECTADO:** Veinte especímenes

**LOCALIDADES DE COLECTA:** Casma, Ancón, Callao, Pucusana, Paracas, Marcona

Talos con numerosas ramificaciones en ejes que miden hasta 44 cm de alto. Crecen a partir de rizoides estoloníferos, que originan ejes semicilíndricos, rígidos y erectos de 1-3 mm de diámetro y con ramificación simpodial. Frondas de hasta 11 cm de longitud, estipadas, sésiles, angostas en la base, flabeladas y divididas de forma dicotómica irregular, con segmentos de 0.3-4.6 cm de longitud y 0.1-2.2 cm de ancho. Presentan proliferaciones que crecen a partir del estipe, algunos estolones y de partes dañadas de la lámina (Figuras 10A y 10B). Internamente presenta una corteza formada por 1-4 capas de células, la capa externa con células pequeñas y redondeadas, y las internas con células oblongas con un ligero alargamiento horizontal, que se pronuncia más en capas más internas; la médula compacta está conformada por 4-10 capas de células transparentes, cuyo tamaño disminuye gradualmente hacia la corteza (Figura 10C).

Cistocarpos semiesféricos y globosos, crecen en ambas caras de las láminas, incluso en los bordes (Figura 10D). Los tetrasporangios se agrupan en un área limitada en la zona subapical formando soros sin bordes definidos (Figura 10E). Los tetrasporangios, con división cruciada a veces tetraédrica, crecen insertos en la corteza generando un ligero alargamiento y desplazamiento en las células de la capa más externa, sin presentar estructuras nemateciales o modificación en la corteza (Figura 10F). No se encontró material reproductivo masculino.



**Figura 10.** Hábito, morfología externa e interna del soro tetrasporangial, un cistocarpio y segmento vegetativo de *Rhodymenia flabellifolia*.

**A y B:** Hábito del tetrasporofito (BG-299, BG-236).

**C:** Sección longitudinal de un segmento vegetativo mostrando la médula (m) y la corteza (c) (N256).

**D:** Sección transversal de un cistocarpio maduro (N256).

**E:** Distribución de los soros tetrasporangiales (s) en el área apical y subapical (BG-302).

**F:** Sección transversal de un soro tetrasporangial, mostrando tetrasporangios cruciados (t) insertos en la corteza (BG-302).

Barras de escala: Figuras 31 y 32, 5 cm; Fig. 33, 200  $\mu$ m; Fig. 34, 50  $\mu$ m; Figuras 35 y 36, 1 mm; Fig. 37, 50  $\mu$ m.



**Tabla 9.** Comparación de las características morfológicas las especies de *Rhodymenia* delimitadas genéticamente.

	<i>Rhodymenia corallina</i>	<i>Rhodymenia corallina 2</i>	<i>Rhodymenia sp.</i>	<i>Rhodymenia skottsbergii</i>	<i>Rhodymenia flabellifolia</i>
<b>Tamaño</b>	6-44.5 cm	10-29.5 cm	3-5 cm	5.5-12 cm	27.5-44 cm
<b>Estructura(s) de fijación</b>	Disco adhesivo irregular (0.5-3 mm de diámetro). Puede desarrollar proliferaciones rizoidales	Base callosa o disco (hasta 4.5 mm de diámetro). Rizoides estoloníferos que crecen a partir del estipe	Pequeño disco de fijación (<2mm), puntos de unión en las láminas de distintos individuos	Disco simple y estolones rizoidales como estructura secundaria	Rizoides estoloníferos fuertemente agregados
<b>Estipe</b>	Semicilíndrico, delgado 0.8-2.5 cm de largo y 0.6-1.6 mm de diámetro	Semicilíndrico, semirígido 0.2-1 cm de largo y 1-4.5 mm de diámetro	Semicilíndrico, muy corto (1-3 mm de largo), se aplana formando una lámina	Semicilíndrico, rígido y erecto de 1-3 cm de largo	Semicilíndrico, rígido y erecto, 1.5-3 mm de diámetro. Crecen como ramificaciones a partir de estolones
<b>Láminas</b>	Estipadas, aplanadas, de división dicotómica e irregular, pueden expandirse de forma flabelar, angostas en la base	Estipadas, aplanadas, divididas dicotómicamente de forma irregular Expansión flabelar, angostas en la base, y luego de cada división	Aplanadas, nacen del disco o a partir de un estipe corto. Se expanden de forma dicotómica irregular, más angostas en la base, luego de cada división	Coriáceas de 2.5-5 cm de longitud, se desarrollan a partir de ramificaciones estipadas rígidas	Sésiles y coriáceas, crecen de ramificaciones estipadas, expandidas de forma flabelar
<b>Ramificación</b>	Ramificación simpodial	Ramificación simpodial	No clara, división dicotómica irregular	Ramificación simpodial, de estructura amplexicaule	Ramificaciones subcilíndricas rígidas, divididas simpodialmente
<b>Segmento laminar</b>	0.2-7.6 cm de largo y 0.1-1.6 cm de ancho	0.3-3 cm de largo y 0.3-1.2 cm de ancho	0.9-5.8 mm de largo y 1.2-2.5 mm de ancho	1-2 cm de largo y 0.4-1.6 cm de ancho	0.3-4.6 cm de largo y 0.1-2.2 cm de ancho
<b>Número de divisiones</b>	3-17	5-11	6-9	5-7	2-9
<b>Corteza (Segmentos medios y apicales)</b>	1-3 capas de células	1-2 capas de células	1-4 capas de células	2-4 capas de células	1-4 capas de células

Continuación

	<i>Rhodymenia corallina</i>	<i>Rhodymenia corallina 2</i>	<i>Rhodymenia sp.</i>	<i>Rhodymenia skottsbergii</i>	<i>Rhodymenia flabellifolia</i>
<b>Médula (Segmentos medios y apicales)</b>	4 a 7 capas de células	4-7 capas de células	4-9 capas de células	7-9 capas de células	4-10 capas de células
<b>Proliferaciones</b>	Crecen sobre el estipe y a partir de las partes dañadas de la lámina	Crecen sobre el estipe, la base de algunas láminas, y a partir de las partes dañadas de la lámina	Crecen a partir de zonas dañadas de la lámina	Crecen a partir de la base del estipe, como rizoides	Crecen en la base del estipe, a partir de algunos estolones, y sobre áreas dañadas de la lámina
<b>Tetrasporangios</b>	Tetrasporangios insertos en la corteza	Tetrasporangios insertos en la corteza	Tetrasporangios insertos en la corteza	Tetrasporangios insertos en la corteza	Tetrasporangios insertos en la corteza
<b>Distribución de los tetrasporangios</b>	Dispersos o ligeramente agregados en la zona subapical de las láminas y las proliferaciones, crecen a partir de los bordes hacia el centro del segmento y/o paralelo a los bordes	Agregados en soros, usualmente con borde definido, crecen a partir del centro del segmento laminar, en la parte apical y subapical de los últimos segmentos y las proliferaciones	Agregados en soros redondeados con borde definido, ubicados en la parte apical y/o subapical de los últimos segmentos y las proliferaciones	Agregados en soros redondeados, con borde definido, ubicados en la parte apical de las láminas	Agregados en soros con forma de bandas o de forma irregular, sin borde definido, en el área apical de los últimos segmentos y de las proliferaciones
<b>Modificación de la corteza por los tetrasporangios</b>	No generan modificación, salvo el desplazamiento de las células aledañas por el crecimiento de los tetrasporangios	No generan modificación, salvo el desplazamiento de las células aledañas por el crecimiento de los tetrasporangios	No generan modificación, salvo el desplazamiento de las células aledañas y un ligero alargamiento de las mismas	Ligera modificación por el alargamiento y desplazamiento de las células y la alta densidad de tetrasporangios	Ligera modificación por el alargamiento y desplazamiento de las células

#### 4.4 DISCUSIÓN

Las especies de *Rhodymenia* presentan una gran diversidad morfológica (Filloramo & Saunders, 2016b). El grosor del talo y la conformación de los segmentos es tan variable que dificulta la determinación de muestras a nivel de especie (Filloramo & Saunders, 2016b). Es por ello que la clasificación de especies de *Rhodymenia* se ha basado en características reproductivas como la conformación de los soros tetrasporangiales, así como de las características vegetativas del desarrollo del estípite y de las estructuras de fijación (J. Agardh, 1852; 1876; Dawson, 1941).

La clasificación en base a morfología externa del material colectado durante esta investigación resultó en la diferenciación de nueve morfotipos, seis de ellos correspondientes a las especies de *Rhodymenia* registradas en la costa central del Perú: *Rhodymenia flabellifolia*, *R. skottsbergii*, *R. howeana*, *R. corallina*, *R. multidigitata* y *R. californica*; así como la diferenciación de tres morfotipos crípticos asignados como *Rhodymenia* sp. 1, sp. 2 y sp. 3. Los ejemplares de *R. flabellifolia* y *R. skottsbergii* fueron clasificados con mayor facilidad debido a la morfología característica de *R. flabellifolia* con ejes repetidamente ramificados de forma simpodial, y frondas sésiles y flabeladas (Howe, 1914; Dawson, 1941; Dawson et al., 1964), así como el característico crecimiento amplexicaule en *R. skottsbergii* (Dawson, 1941).

Ejemplares de *R. howeana* se caracterizan por el tamaño pequeño del estipe (0,4-0,5 cm) y la expansión de las frondas, que se presentan abundantemente divididas de forma dicotómica; diferenciándose del estipe de hasta 6 cm de largo y la ramificación simpodial de *R. corallina* (Dawson, 1941). Tres especímenes (dos de los cuales fueron colectados en Callao, la localidad tipo) fueron diferenciados como *R. howeana* y seis especímenes como *R. corallina*, los cuales presentan una gran variabilidad en la longitud y ancho de los segmentos entre divisiones, así como en la forma de los ápices.

Los especímenes de *R. multidigitata* fueron morfológicamente identificados por la forma multidigitada de los ápices en base a la descripción realizada por Dawson et al. (1964), incluyendo dos especímenes colectados en la localidad tipo (Callao), diferentes entre sí por el ancho de los ápices.

Dawson et al. (1964) diferenciaron *R. californica* por su tamaño pequeño y talo tupido. Esta descripción y la comparación con el hábito de los especímenes colectados en

Pucusana por Dawson, depositados en el herbario del Museo de Historia Natural de San Marcos (USM) (ANEXO 1), permitieron la clasificación de dos especímenes colectados en Pucusana y Marcona como *R. californica* por la similitud morfológica del hábito con el ejemplar determinado por Dawson.

La ausencia del disco y del estipe, así como el daño ocasionado por predadores, dificultó la clasificación de los especímenes agrupados como *Rhodymenia* sp. 1. El material varado se encontró incompleto, sin estructuras de fijación ni estipe, y con patrones de división dicotómica ensombrecidos por la depredación de las frondas o el crecimiento de proliferaciones. Este material fue clasificado como *Rhodymenia* sp. 2 y *Rhodymenia* sp. 3. En estos ejemplares se ignora si el material colectado pertenece a la totalidad o la parte final de la fronda, dificultando su clasificación como *R. corallina* o *R. howeana*.

El análisis Neighbor-Joining (NJ) de las secuencias de *rbcL* de *Rhodymenia* de Perú evidencia la formación de cinco clados con altos valores de *bootstrap* (Figura 2). El análisis confirma la presencia de las especies *R. skottsbergii* y *R. corallina* en la costa central del Perú, por comparación y asociación de los clados con las secuencias de *R. skottsbergii* y *R. corallina* disponibles en GenBank provenientes de la localidad tipo o de una localidad cercana a la tipo (Chile). Los ejemplares morfológicamente clasificados como *R. flabellifolia* se agruparon en un clado monofilético, sin asociarse a otra especie de *Rhodymenia* de la base de datos de GenBank (a la fecha del análisis aún no se habían secuencias disponibles en GenBank de *R. flabellifolia* que permitan su comparación molecular). El clado *Rhodymenia* sp. agrupa los ejemplares morfológicamente identificados como *R. californica*; sin embargo, no se asocian a la secuencia *R. californica* (KU687844, GenBank) de la localidad tipo (EE. UU.), ni a otra secuencia de la base de datos, lo que sugiere la presencia de una especie nueva de *Rhodymenia*. Finalmente, con base en el agrupamiento resultante del análisis NJ se calcularon las distancias genéticas intra e inter-clado. Las distancias genéticas entre las secuencias de los clados *R. corallina* y *R. corallina* 2 (1.4 a 1.9 %) superan los valores de las distancias intra-clado (hasta 0.7 %), y la divergencia entre ambos clados (1.6%) es comparable con la distancia genética entre las secuencias de las especies *R. capensis* y *R. obtusa* (1.6 %), y *R. rizoides* y *R. bamfieldensis* (1.7 %) (disponibles en GenBank) (Tabla 8) evidenciando la existencia de una brecha o *gap* entre las distancias intra-clado (0-0.7 %) e inter-clado (1.4-11.4 %) de las

secuencias *rbcL* de *Rhodymenia* analizadas. Por ello *R. corallina* y *R. corallina 2* se consideran como clados separados.

En la construcción filogenética resultante, las secuencias de *Rhodymenia* procedentes del hemisferio sur se agrupan en un clado monofilético. Dentro de este grupo, el clado *R. flabellifolia* se encuentra más cercano a la agrupación de las secuencias *R. capensis* y *R. obtusa* de Sudáfrica que a la agrupación del resto de secuencias de la Costa Templada del Pacífico de Sudamérica (Chile y Perú) (Figura 3). En el análisis filogenético de secuencias *rbcL* de Hommersand & Fredericq (2003) también se observa la separación entre especies de *Rhodymenia* del hemisferio norte y sur; pero las secuencias del hemisferio sur *R. wilsonis*, procedente de Nueva Zelanda, se posiciona de forma basal respecto al grupo que contiene el clado con especies de Sudáfrica (*R. capensis* y *R. obtusa*) y el clado con especies de Sudamérica (*R. skottsbergii* de Chile y *Rhodymenia* sp. de Argentina). Hommersand & Fredericq (2003) sugieren que las especies de *Rhodymenia* del hemisferio sur se habrían originado en Australasia, y se dispersaron hacia Sudamérica y Sudáfrica. En el presente estudio, no es posible concluir acerca de la posición de *R. stenoglossa* (Australia) respecto a los otros clados, debido al bajo soporte de la rama en la que deriva. Pero, de forma similar a los resultados de Hommersand y Fredericq, se observa la formación de un clado que agrupa secuencias de Sudamérica, exceptuando el clado *R. flabellifolia*, que se agrupa con las secuencias de Sudáfrica.

Al igual que el análisis NJ, la construcción filogenética inferida resulta en la formación de cinco clados monofiléticos bien soportados (100% de soporte o valores mayores a 95 en BS y BP) (Figura 3): *R. skottsbergii*, *R. flabellifolia*, *R. corallina*, *R. corallina 2* y *Rhodymenia* sp. Los análisis de delimitación de especies, aplicados a las secuencias de *Rhodymenia* de la costa central para determinar el número de especies entre los clados, resultaron en la identificación de cinco grupos de especies genéticamente diferenciadas (Figura 4).

*Rhodymenia skottsbergii* se presenta como un clado bien definido en la construcción filogenética. Presenta dos haplotipos, procedentes de Chile (localidad tipo) y de la muestra de estudio de Perú (BG-242). Morfológicamente, las muestras colectadas en Perú se diferencian de otras especies de *Rhodymenia*, principalmente, por la estructura amplexicaule, así como por la coloración rojo parduzca a verde, similar a la de algunos ejemplares de *R. flabellifolia*. Los especímenes analizados morfológicamente (tres)

presentan formas poco variables y no se confunden con *R. flabellifolia*. Históricamente, *R. skottsbergii* solo ha sido registrada en Perú para Arequipa y Moquegua; sin embargo, recientemente se amplió su distribución hasta Ica con su reporte en la localidad de Pisco (Calderón et al., 2020). En el presente estudio, sólo se registró la especie *R. skottsbergii* para la localidad de Marcona (Ica).

La clasificación morfológica de *R. flabellifolia* se facilitó debido a su forma característica, por el tipo de ramificación simpodial, con múltiples ramificaciones estipadas que emergen de estolones rizoidales, así como la forma y coloración de sus láminas flabeladas que facilitan su determinación. No obstante, hasta la fecha no existen registros de secuencias de *R. flabellifolia* colectadas en la localidad tipo (Concepción, Chile), ni colectas recientes de la especie en Concepción que permitan la comparación molecular con especímenes de la localidad tipo. Por lo anterior, molecularmente se puede confirmar su pertenencia a un clado monofilético diferenciado y morfológicamente se puede confirmar su identidad. Es importante aclarar que, si bien no se incluyeron secuencias de Casma ni Pucusana en el análisis molecular, sí se colectaron especímenes de *R. flabellifolia* en dichas localidades, confirmando su presencia a lo largo de la costa central.

En la construcción filogenética inferida de ML (Figura 3), el clado asociado a *R. corallina* de Chile (localidad tipo) agrupa 14 secuencias de especímenes identificados morfológicamente como *R. cf howeana*, *R. cf multidigitata*, *R. cf corallina*, así como los morfotipos *Rhodymenia* sp. 1, sp 2., y sp.3 (Figura 3). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Calderón et al. (2020), cuyas secuencias de *R. cf howeana* y *R. cf multidigitata* también se asocian a *Rhodymenia corallina*, sugiriendo que las especies *R. howeana* y *R. multidigitata* son en realidad registros de *R. corallina*.

En el análisis de las secuencias de *R. corallina* 2 como un clado distinto, se evidenció la presencia de un *gap* o una brecha entre las distancias intra-clado máximas y las distancias inter-clado mínimas de todas las secuencias analizadas (Tabla 8). Además, el rango de divergencia entre ambos clados (nombrados *R. corallina* y *R. corallina* 2) varía entre 1.4 y 1.9 %, siendo la distancia mínima (1.4 %) de un valor cercano, aunque menor, a las distancias interespecíficas entre otras especies de *Rhodymenia* (1.6 y 1.7 %) (Tabla 8). Ante estos resultados, los análisis de delimitación molecular de especies con los modelos PTP y GMYC coincidieron en mostrar la separación de ambos clados como especies genéticamente distintas, en base al marcador *rbcL* (Figura 4). Morfológicamente, los

especímenes analizados de *R. corallina 2*, presentan las siguientes características que los distinguen de *R. corallina*: pueden desarrollar rizoides estoloníferos que crecen a partir de un estipe (1-4.5 mm de diámetro); la forma de las láminas es de amplia expansión flabelar; los tetrasporangios crecen desde el centro del ancho del segmento subapical o ápice y se agregan hasta formar soros, con borde definido o disperso hacia el lado opuesto al ápice; y los tetrasporangios generan una ligera modificación en la corteza de los individuos tetrasporofíticos analizados (Figuras 7G y 7H). Siendo las características tetrasporangiales la principal distinción morfológica entre los grupos de *Rhodymenia* (Dawson, 1941).

La distribución geográfica de *R. corallina*, observada en el presente estudio, alcanza hasta el norte de Lima, mientras *R. corallina 2* solo ha sido colectada en Casma. La distribución geográfica diferenciada de *R. corallina 2*, así como la evidencia molecular y las emergentes diferencias morfológicas sugieren que se trate de una especie distinta. La poca divergencia genética entre ambos clados podría deberse a un proceso de especiación incipiente, o una reciente divergencia, considerando que el análisis realizado corresponde a un solo locus, reflejando el proceso de divergencia para el gen *rbcL*, pero no necesariamente el proceso evolutivo de la especie. En base a la evidencia molecular apoyada por los resultados del análisis morfológico, en el presente estudio *R. corallina 2* es considerada una especie distinta. Para corroborar estos resultados es necesario el uso de otras técnicas moleculares que permitan delimitar las especies identificadas y tener un mejor entendimiento de las relaciones filogenéticas dentro del género, utilizando otros marcadores plastidiales y nucleares como ITS. Este último utilizado para corroborar la inferencia de delimitación de especies, especialmente en linajes que han divergido recientemente (Leliaert et al., 2014). También es necesario profundizar los análisis morfológicos y ampliar el rango geográfico y el esfuerzo de muestreo, así como aumentar el número de muestras para determinar precisamente la distribución de *R. corallina* y *R. corallina 2* en la costa peruana.

*Rhodymenia californica* fue reportada para Perú por Dawson et al. en 1964, quienes ampliaron su registro en base a material colectado en Pucusana (Lima). Por otro lado, Calderón et al. (2020) sugieren que los reportes de dicha especie pertenecen a *R. corallina*, en base a los resultados obtenidos al analizar las secuencias *rbcL* de muestras identificadas en campo como *R. californica*. En la presente investigación, las muestras correspondientes a los códigos BG-242 y BG-275, colectadas en Marcona y Pucusana e identificadas

morfológicamente como *R. californica* (en base a su tamaño, talo tupido y la comparación del hábito con herbarios de la colección del Museo de Historia Natural de San Marcos - USM.), se agruparon en un clado fuertemente soportado (BS=100/BP=100) (Figura 3) que no se encuentra asociado a *R. californica* de EE.UU., y se presenta como un clado distinto a la especie *R. corallina* (Figura 4), lo cual sugiere la presencia de una nueva especie de *Rhodymenia*. Morfológicamente, las muestras recolectadas se diferencian de *R. corallina* por su tamaño pequeño (3-5 cm) y láminas dicotómica e irregularmente divididas con segmentos claramente más delgados y pequeños, así como la densa agregación de los tetrasporangios formando soros apicales y subapicales de borde definido (aunque no necesariamente con forma regular) y usualmente de forma redondeada. Estos resultados evidencian la diferenciación morfológica y genética de clado *Rhodymenia* sp. por lo cual se considera una especie distinta a las descritas para Perú. Un mayor esfuerzo de muestreo y el análisis de los herbarios de la colección del Museo de Historia Natural de San Marcos, donde se encuentra el *voucher* del espécimen identificado por Dawson (E. Y. Dawson 24610, año 1963, Herbario San Marcos), así como de otras colecciones de *Rhodymenia* son necesarios para confirmar si se trata de una nueva especie, o un nuevo registro.



## V. CONCLUSIONES

- Mediante el uso de las secuencias código de barras *rbcL* y el análisis morfológico se identificaron cinco especies del género *Rhodymenia* para la costa central del Perú: las tres especies ya reportadas *R. corallina*, *R. flabellifolia* y *R. skottsbergii*; y se diferenciaron dos especies referidas en el presente manuscrito como *Rhodymenia* sp. y *Rhodymenia corallina* 2.
- El marcador *rbcL* presenta buena resolución para análisis molecular a nivel de especies en el género *Rhodymenia*.
- *Rhodymenia corallina* posee una gran variabilidad morfológica externa en ejemplares distribuidos en Ica y Lima (10-15°S), en el presente estudio no se han reportado especímenes de *R. corallina* en Casma (9°S).
- Las especies *R. howeana* y *R. multidigitata* reportadas en Ica y Lima son registros de *R. corallina*.
- El registro de *Rhodymenia californica* para Pucusana-Perú (12°S) es en realidad una especie distinta no reportada para Perú, *Rhodymenia* sp., la cual también se encuentra en Marcona (15°S)
- *Rhodymenia flabellifolia* está presente en todas las localidades muestreadas de la costa central del Perú (Casma, Ancón, Callao, Pucusana, Paracas y Marcona) (9-15°S).
- *Rhodymenia skottsbergii* está presente en la costa central del Perú, en Ica, siendo recolectada en el presente estudio en Marcona (15°S).

## VI. RECOMENDACIONES

- Se recomienda complementar el estudio con otros marcadores moleculares, que también han probado ser de utilidad en el estudio de *Rhodymenia*, como COI-5P e ITS.
- Incluir un mayor número de especímenes por taxón, para obtener un mejor panorama de la variabilidad de haplotipos y morfotipos de cada especie. Esto permitiría un análisis morfológico más profundo que permita identificar los caracteres comunes de importancia taxonómica.
- Realizar trabajos colaborativos que permitan el estudio de la diversidad y distribución del género en el ecosistema de la costa temperada del Pacífico y no solo dentro de los límites de Perú.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acleto, C. (1973). Algas marinas del Perú. Boletín de la Sociedad Peruana de Botánica, 6(1 y 2), 1-163.
- Acleto, C. (1980). Notas sobre las algas marinas del Perú. I. Nuevos registros. Publicaciones del Museo de Historia Natural «Javier Prado». Serie Botánica, 30, 1-16.
- Acleto, C., Endoa, J. (1977). Las especies peruanas de *Porphyra* (Rhodophyta, Bangiales), I. Taxonomía y distribución geográfica. Publicaciones del Museo de Historia Natural «Javier Prado». Serie Botánica, 29, 1-4.
- Agardh, J. G. (1852). Species, genera et ordines Floridearum, seu descriptiones succinctae specierum, generum et rodinum, quibus Floridearum classis constituitur. Lund: C.W.K. Gleerum, 2(2), 337–720.
- Agardh, J. G. (1876). Species, genera et ordines algarum: seu descriptiones succinctae specierum, generum et rodinum, quibus algarum regnum constituitur. Lund: C.W.K. Gleerum.
- Alveal, K., & Romo, H. (1979). Aspectos reproductivos de *Dendrymenia skottsbergii* (Dawson) Kylin (Rhodophyceae, Rhodymeniales). Revista de Biología Marina, 16(3), 203-210.
- Arakaki, N., Alveal, K., Ramírez, M. E., & Fredericq, S. (2011). The genus *Callophyllis* (Kallymeniaceae, Rhodophyta) from the central-south Chilean coast (33° to 41°S), with the description of two new species. Revista Chilena de Historia Natural, 84(4), 481-499.
- Bory de Saint-Vincent, M. (1828). Voyage autour du monde, exécuté par ordre du Roi, sur la corvette de Sa Majesté, la Coquille, pendant les années 1822, 1823, 1824 et 1825. Botanique. París: A. Bertrand, 301 py Atlas, 38 pls.

- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C. H., Xie, D.,... Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Computational Biology*, 10(4), 1-6.
- Bustamante, D. E., Won, B. Y., & Cho, T. O. (2013). *Neosiphonia ramirezii* sp. nov. (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from Peru. *Algae*, 28(1), 73-82.
- Bustamante, D. E., Won, B. Y., & Cho, T. O. (2016). The conspecificity of *Pterosiphonia spinifera* and *P. arenosa* (Rhodomelaceae, Ceramiales) inferred from morphological and molecular analyses. *Algae*, 31(2), 105-115.
- Bustamante, D. E., Won, B. Y., Ramírez, M. E., & Cho, T. O. (2012). *Neosiphonia peruviansis* sp. nov. (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from the Pacific coast of South America. *Botanica Marina*, 55, 359-366.
- Calderón, M. S., & Boo, S. M. (2016a). A new genus *Phyllophorella* gen. nov. (Phyllophoraceae, Rhodophyta) from central Peru, including *Phyllophorella peruviana* comb. nov., *Phyllophorella humboldtiana* sp. nov., and *Phyllophorella limaensis* sp. nov. *Botanica Marina*, 59, 339-352.
- Calderón, M. S., & Boo, S. M. (2016b). Phylogeny of Phyllophoraceae (Rhodophyta, Gigartinales) reveals *Asterfilopsis* gen. nov. from the Southern Hemisphere. *Phycologia*, 55(5), 543-554.
- Calderón, M. S., Boo, G. H., & Boo, S. M. (2014a). Morphology and phylogeny of *Ramirezia osornoensis* gen. & sp. nov. and *Phyllymenia acletoi* sp. nov. (Halymeniales, Rhodophyta) from South America. *Phycologia*, 53(1), 23-36.
- Calderón, M. S., Boo, G. H., & Boo, S. M. (2014b). *Neorubra decipiens* gen. & comb. nov. and *Phyllymenia lancifolia* comb. nov. (Halymeniales, Rhodophyta) from South America. *Phycologia*, 53(5), 409-422.
- Calderón, M. S., Bustamante, D. E. & Boo, G. H. (2020). Red algal diversity (Rhodophyta) from Peru based on molecular analysis. *Phytotaxa*, 454 (1), 001–023.
- Cianciola, E. N., Popolizio, T. R., Schneider, C. W., & Lane, C. E. (2010). Using molecular-assisted alpha taxonomy to better understand red algal biodiversity in Bermuda. *Diversity*, 2, 946-958.

- Clarkston, B. E., & Saunders, G. W. (2010). A comparison of two DNA barcode markers for species discrimination in the red algal family Kallymeniaceae (Gigartinales, Florideophyceae), with a description of *Euthora timburtonii* sp. nov. *Botany*, 88, 119-131.
- Clarkston, B. E., & Saunders, G. W. (2013). Resolving species diversity in the red algal genus *Callophyllis* (Kallymeniaceae, Gigartinales) in Canada using molecular assisted alpha taxonomy. *European Journal of Phycology*, 48(1), 27-46.
- Craigie, J. S. (1990). Chapter 10 - Cell wall. En K. M. Cole y R. G. Sheath (Eds.), *Biology of the Red Algae* (pp. 221-257). Cambridge: Cambridge University Press.
- Cullings, K. W. (1992). Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology*, 1(4), 233-240.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(772).
- Dawes, C. (2016). Chapter 4 - Macroalgae Systematics. En J. Fleurence e I. A. Levine (Eds.), *Seaweed in Health and Disease Prevention* (pp. 107-148). San Diego: Academic Press.
- Dawson, E. Y. (1941). A review of the genus *Rhodymenia* with descriptions of new species. *Allan Hancock Pacific Expeditions*, 3, 123-180, 13pls.
- Dawson, E. Y., Acleto, C., & Foldvik, N. (1964). *The Seaweeds of Peru*. Stuttgart: Schweizerbart Science Publishers.
- De la Cadena Mendoza, G. (2016). Eliminación de impedimentos taxonómicos y ecológicos en «hot-spots» de biodiversidad mediante herramientas moleculares: los Chrysomelidae y sus asociaciones tróficas en el bosque seco tropical de Nicaragua (Tesis doctoral). Universidad de Barcelona, Barcelona.
- Díaz-Tapia, P., McIvor, L., Freshwater, D. W., Verbruggen, H., Wynne, M. J., & Maggs, C. A. (2017). The genera *Melanothamnus* Bornet & Falkenberg and *Vertebrata* S. F. Gray constitute well-defined clades of the red algal tribe Polysiphonieae. *European Journal of Phycology*, 52(1), 1-30.

- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull*, 19, 11-15.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 214.
- Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., & Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology*, 4(5), 699-710.
- Filloramo, G V. (2016). A molecular systematic and taxonomic assessment of the Rhodymeniales (Tesis doctoral). The University of New Brunswik, New Brunswik.
- Filloramo, G. V., & Saunders, G. W. (2016a). Application of multigene phylogenetics and site-stripping to resolve intraordinal relationships in the Rhodymeniales (Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 52(3), 339-355.
- Filloramo, G. V., & Saunders, G. W. (2016b). Molecular-assisted alpha taxonomy of the genus *Rhodymenia* (Rhodymeniaceae, Rhodymeniales) from Australia reveals overlooked species diversity. *European Journal of Phycology*, 51(3), 1-14.
- Filloramo, G. V., & Saunders, G. W. (2018). Assessment of the order Rhodymeniales (Rhodophyta) from British Columbia using an integrative taxonomic approach reveals overlooked and cryptic species diversity. *Botany*, 96(6), 359-383.
- Freshwater, D. W., & Bailey, J. C. (1998). A multigene phylogeny of the Gelidiales including nuclear large-subunit rRNA sequence data. *Journal of Applied Phycology*, 10(3), 229-236.
- Freshwater, D. W., Fredericq, S., Butler, B. S., Hommersand, M. H., & Chase, M. W. (1994). A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(15), 7281-7285.
- Gabriel, D., Draisma, S. G. A., Sauvage, T., Schmidt, W. E., Schils, T., Lim, P.-E., Harris, D. J., & Fredericq, S. (2016). Multilocus phylogeny reveals *Gibsmithia hawaiiensis* (Dumontiaceae, rhodophyta) to be a species complex from the Indo-Pacific, with the proposal of *G. eilatensis* sp. nov. *Phytotaxa*, 277(1), 1-20.

- Gavio, B., & Fredericq, S. (2003). *Botryocladia caraibica* (Rhodymeniales, Rhodophyta), a new species from the Caribbean. *Cryptogamie Algologie*, 24(2), 93-106.
- Gavio, B., Hickerson, E., & Fredericq, S. (2005). *Platoma chrysymenioides* sp. nov. (Schizymeniaceae), and *Sebdenia integra* sp. nov. (Sebdeniaceae), two new red algal species from the Northwestern Gulf of Mexico, with a phylogenetic assessment of the Cryptonemiales complex (Rhodophyta). *Gulf of Mexico Science*, 23(1), 38-57.
- Greville, R. K. (1830). *Algae britannicae or descriptions of the marine and other inarticulated plants of the British Islands belonging to the Order Algae, with plates illustrative of the genera*. Edinburgh & London: McLachlan & Stewart; Baldwin & Cradock.
- Guiry, M. D. (1977). Studies on marine algae of the British Isles. 10. The genus *Rhodymenia*. *British Phycological Journal*, 12(4), 385-425.
- Guiry, M. D., & Guiry, G. M. (2021). *AlgaeBase*. Consultado 20 dic. 2017. Recuperado de <http://www.algaebase.org>
- Gurgel, C. F. D., & Fredericq, S. (2004). Systematics of the Gracilariaceae (Gracilariales, Rhodophyta): a critical assessment based on *rbcL* sequence analyses. *Journal of Phycology*, 40(1), 138-159.
- Gurgel, C. F. D., Liao, L. M., Fredericq, S., & Hommersand, M. H. (2003). Systematics of *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) based on *rbcL* sequence analyses and morphological evidence. *Journal of Phycology*, 39(1), 154-171.
- Harper, J. T., & Saunders, G. W. (2001). The application of sequences of the ribosomal cistron to the systematics and classification of the florideophyte red algae (Florideophyceae, Rhodophyta). *Cahiers de Biologie Marine*, 42(1-2), 25-38.
- Hawkes, M. W., & Scagel, R. F. (1986). The marine algae of British Columbia, northern Washington: division Rhodophyta (red algae), class Rhodophyceae, order Rhodymeniales. *Canadian Journal of Botany*, 64, 1549-1580.

- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings. Biological sciences/The Royal Society*, 270(1512), 313-21.
- Hommersand, M. H., & Fredericq, S. (2003). Biogeography of the marine red algae of the South African West Coast : a molecular approach. In A. R. O., Chapman, R. J. Anderson, V. J., Vreeland, I. R., Davison. (Eds.), *Proceedings XVIIth International Seaweed Symposium Cape Town*, 2001.
- Hommersand, M. H., Fredericq, S., & Freshwater, D. W. (1994). Phylogenetic systematics and biogeography of the Gigartinaceae (Gigartiales, Rhodophyta) based on sequence analysis of *rbcL*. *Botanica Marina*, 37, 193-203.
- Howe, M. A. (1914). *The marine Algae of Peru*. New York: The New Era Printing Company.
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14), 3059-3066.
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2017). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 1-7.
- Koh, Y. H., Cho, G. Y., & Kim, M. S. (2013). Species delimitation of the genus *Champia* (Rhodymeniales, Rhodophyta) from Korea using DNA barcoding. *Journal of Ecology and Environment*, 36(4), 449-463.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets Brief communication. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.



- Lanteri, A. A. (2007). Código de barras del ADN y sus posibles aplicaciones en el campo de la Entomología. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 66(3-4), 15-25.
- Lara Lorenzo, A. (2008). Código de barras de ADN de las especies cubanas de peces duceacuícolas (Tesis de maestría). Universidad de la Habana, Ciudad de La Habana.
- Leliaert, F., Verbruggen, H., Vanormelingen, P., Steen, F., López Bautista, J. M., Zuccarello, G. C., & De Clerck, O. (2014). DNA based species delimitation in algae. *European Journal of Phycology*, 49(2), 179-196.
- Lim, P.-E., Yang, L.-E., Tan, J., Maggs, C. A., & Brodie, J. (2017). Advancing the taxonomy of economically important red seaweeds (Rhodophyta). *European Journal of Phycology*, 52(4), 438-451.
- Lindstrom, S. C., Gabrielson, P. W., Hughey, J. R., Macaya, E. C., & Nelson, W. A. (2015). Sequencing of historic and modern specimens reveals cryptic diversity in *Nothogenia* (Scinaiaceae, Rhodophyta). *Phycologia*, 54(2), 97-108.
- Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. J. G., & Vogler, A. P. (2009). Accelerated species Inventory on Madagascar using coalescent-based models of species Delineation. *Systematic Biology*, 58(3), 298-311.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
- Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, D., & Drummond, A. J. (2014). Tracer v1.6. Recuperado de <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- Ramírez, M. E., & Santelices, B. (1991). Catálogo de las algas marinas bentónicas de la costa temperada del Pacífico de Sudamérica. *Monografías Biológicas*, 5, 1-437.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J. P., & Teslenko, M. (2011). MrBayes Version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries, 1-103.

- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539-542.
- Ross, P. J., Donaldson, S. L., & Saunders, G. W. (2003). A molecular investigation of *Mazzaella* (Gigartinales, Rhodophyta) morphologically intermediate between *Mazzaella linearis* and *M. splendens*. *Botanica Marina*, 46, 202.
- Saunders, G. W. (2005). Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360(1462), 1879-1888.
- Saunders, G. W. (2009). Routine DNA barcoding of Canadian Gracilariales (Rhodophyta) reveals the invasive species *Gracilaria vermiculophylla* in British Columbia. *Molecular Ecology Resources*, 9, 140-150.
- Saunders, G. W., & Hommersand, M. H. (2004). Assessing red algal supraordinal diversity and taxonomy in the context of contemporary systematic data. *American Journal of Botany*, 91(10), 1494-1507.
- Saunders, G. W., & Lehmkuhl, K. V. (2005). Molecular divergence and morphological diversity among four cryptic species of *Plocamium* (Plocamiales, Florideophyceae) in northern Europe. *European Journal of Phycology*, 40(3), 293-312.
- Saunders, G. W., & McDevit, D. C. (2012). Methods for DNA Barcoding Photosynthetic Protists Emphasizing the Macroalgae and Diatoms. En W. J. Kress y D. L. Erickson (Eds.), *DNA Barcodes: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 207-222). Totowa: Humana Press.
- Saunders, G. W., & McDonald, B. (2010). Chapter 10: DNA barcoding reveals multiple overlooked Australian species of the red algal order Rhodymeniales (Florideophyceae), with resurrection of *Halopeltis* J. Agardh and description of *Pseudohalopeltis* gen. nov. *Botany-Botanique*, 88(7), 639-667.


- Saunders, G. W., & Moore, T. E. (2013). Refinements for the amplification and sequencing of red algal DNA barcode and RedToL phylogenetic markers: A summary of current primers, profiles and strategies. *Algae*, 28(1), 31-43.
- Schmidt, W. E., Ballantine, D. L., Arakaki, N., Gabriel, D., Norris, J. N., & Fredericq, S. (2017). Taxonomic transfer of the red algae *Chrysomenia enteromorpha* and *C. wrightii* to the genus *Botryocladia* (Rhodymeniaceae, Rhodymeniales). *Phytotaxa*, 324(2), 122-138.
- Serrato Díaz, A., Flores Rentería, L., Aportela Cortez, J., & Sierra Palacios, E. (2014). PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 53-73.
- Sherwood, A. R., & Presting, G. G. (2007). Universal primers amplify a 23S rDNA plastid marker in eukaryotic algae and cyanobacteria. *Journal of Phycology*, 43(3), 605-608.
- Silvestro, D., & Michalak, I. (2012). RaxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution*, 12(4), 335-337.
- Soltis Lab. (2002). Florida Museum. Consultado 8 ene. 2017. Recuperado de <https://www.floridamuseum.ufl.edu/museum-voices/soltis-lab/files/2014/02/CTAB-DNA-Extraction.pdf> (Soltis Lab CTAB DNA Extraction Protocol).
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
- Steane, D. A., McClure, B. A., Clarke, A. E., & Kraft, G. T. (1991). Amplification of the polymorphic 5.8S rRNA gene from selected australian gigartinean species (Rhodophyta) by polymerase chain reaction. *Journal of Phycology*, 27(6), 758-762.
- Suzuki, M., Hashimoto, T., Takeshi, N., & Yoshizaki, M. (2010). Morphology and molecular relationships of *Leptofauchea rhodymenioides* (Rhodymeniales, Rhodophyta), a new record for Japan. *Phycological Research*, 58(2), 116-131.

- Tai, V., Lindstrom, S. C., & Saunders, G. W. (2001). Phylogeny of the Dumontiaceae (Gigartinales, Rhodophyta) and associated families based on SSU rDNA and internal transcribed spacer sequence data. *Journal of Phycology*, 37(1), 184-196.
- Wilkes, R. J., McIvor, L., & Guiry, M. D. (2006). Vegetative morphology and *rbcL* phylogeny of some members of the genera *Botryocladia* and *Irvinea* (Rhodymeniaceae, Rhodophyta). *Phycologia*, 45(5), 481-494.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.

## **VIII. ANEXOS**

**Anexo 1.** Ejemplar prensado de *Rhodymenia* colectado y determinado por Dawson (1964) como *Rhodymenia californica* y **amplificación de la etiqueta de herbario**. Depositado en el Herbario del Museo de Historia Natural de San Marcos (USM), código 24610



 UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL  
PLANTAS DEL PERU

Depto.: LIMA                      Prov. LIMA

Rhodymenia californica Kylin

Localidad: Pucusana

Talo: rosado

Habitat: playa protegida en el puerto.

Fecha: 9 abril 1963                      Altitud:

N. V.:                                      Det. E.Y.Dawson

Colector: E Y.Dawson 24610

Herbario San Marcos U S M

**Anexo 2.** Matriz de distancias genéticas de todas las secuencias analizadas en el estudio, obtenidas con el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros en MEGA 7

	<b>Espécimen</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>
<b>1</b>	<i>Rhodymenia pseudopalmeta</i> KF367793																				
<b>2</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> AY168657	0.090																			
<b>3</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-218	0.092	0.001																		
<b>4</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-241	0.090	0.003	0.003																	
<b>5</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-245	0.090	0.003	0.003	0.000																
<b>6</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-258	0.090	0.003	0.003	0.000	0.000															
<b>7</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-259	0.090	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000														
<b>8</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-246	0.090	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000													
<b>9</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-244	0.090	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000												
<b>10</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-216	0.090	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000											
<b>11</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-239	0.090	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
<b>12</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-278	0.090	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
<b>13</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-277	0.090	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
<b>14</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-276	0.089	0.004	0.004	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001							
<b>15</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-256	0.093	0.005	0.005	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.003						
<b>16</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-237	0.090	0.003	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.002					
<b>17</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-249	0.086	0.015	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.017	0.018	0.016				
<b>18</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-250	0.086	0.014	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015	0.016	0.017	0.015	0.001			
<b>19</b>	<i>Rhodymenia corallina</i> BG-300	0.088	0.016	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.017	0.018	0.019	0.017	0.003	0.002		
<b>20</b>	<i>Rhodymenia</i> sp. BG-243	0.087	0.054	0.056	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.059	0.060	0.058	0.058	0.058	0.059	

Continuación

	<b>Espécimen</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	
21	<i>Rhodymenia</i> sp. BG-275	0.087	0.054	0.056	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.058	0.059	0.060	0.058	0.058	0.058	0.059	0.000	
22	<i>Rhodymenia capensis</i> AF385646	0.086	0.071	0.071	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.068	0.067	0.071	0.068	0.069	0.070	0.068	0.068	
23	<i>Rhodymenia obtusa</i> AF385647	0.093	0.075	0.075	0.072	0.072	0.072	0.072	0.072	0.072	0.072	0.072	0.072	0.072	0.071	0.075	0.072	0.075	0.073	0.072	0.074	
24	<i>Rhodymenia flabellifolia</i> BG-236	0.093	0.077	0.077	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.076	0.077	0.075	0.073	0.073	0.073	0.089	
25	<i>Rhodymenia flabellifolia</i> BG-299	0.093	0.077	0.077	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.076	0.077	0.075	0.073	0.073	0.073	0.089	
26	<i>Rhodymenia flabellifolia</i> BG-302	0.093	0.077	0.077	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.075	0.076	0.077	0.075	0.073	0.073	0.073	0.089	
27	<i>Rhodymenia flabellifolia</i> N256	0.094	0.079	0.079	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.077	0.078	0.076	0.075	0.075	0.075	0.089	
28	<i>Rhodymenia flabellifolia</i> BG-238	0.094	0.079	0.079	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.077	0.078	0.076	0.075	0.075	0.075	0.089	
29	<i>Rhodymenia skottsbergii</i> BG-242	0.094	0.076	0.077	0.080	0.080	0.080	0.080	0.080	0.080	0.080	0.080	0.080	0.080	0.079	0.082	0.080	0.077	0.076	0.079	0.089	
30	<i>Rhodymenia skottsbergii</i> AY294354	0.097	0.079	0.080	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.082	0.085	0.083	0.080	0.079	0.082	0.089	
31	<i>Rhodymenia californica</i> KU687844	0.084	0.092	0.093	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.092	0.090	0.094	0.092	0.090	0.089	0.088	0.092	
32	<i>Rhodymenia intricata</i> AB383120	0.083	0.096	0.097	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.097	0.101	0.098	0.094	0.093	0.092	0.088	
33	<i>Rhodymenia pacifica</i> KU687850	0.084	0.097	0.099	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.097	0.096	0.100	0.097	0.093	0.092	0.093	0.100	
34	<i>Rhodymenia rhizoides</i> KU687865	0.087	0.092	0.093	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095	0.095	0.096	0.097	0.095	0.088	0.088	0.086	0.093	
35	<i>Rhodymenia bamfieldensis</i> KU687884	0.087	0.086	0.088	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.089	0.090	0.092	0.089	0.085	0.085	0.084	0.087
36	<i>Rhodymenia delicatula</i> KU726696	0.077	0.090	0.092	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.094	0.093	0.097	0.094	0.090	0.090	0.090	0.084	
37	<i>Rhodymenia stenoglossa</i> KU726706	0.084	0.084	0.085	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.082	0.084	0.085	0.082	0.081	0.080	0.083	0.077	
38	<i>Botryocladia botryoides</i> AY444169	0.102	0.119	0.120	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.121	0.126	0.123	0.114	0.113	0.114	0.125	
39	<i>Botryocladia pseudodichotoma</i> KU687853	0.103	0.122	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.123	0.121	0.126	0.123	0.121	0.122	0.123	0.131	
40	<i>Botryocladia leptopoda</i> HQ400597	0.105	0.117	0.118	0.119	0.119	0.119	0.119	0.119	0.119	0.119	0.119	0.119	0.119	0.118	0.122	0.119	0.111	0.110	0.112	0.131	



Continuación

	Espécimen	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
21	<i>Rhodymenia</i> sp. BG-275																				
22	<i>Rhodymenia capensis</i> AF385646	0.068																			
23	<i>Rhodymenia obtusa</i> AF385647	0.074	0.016																		
24	<i>Rhodymenia flabellifolia</i> BG-236	0.089	0.067	0.085																	
25	<i>Rhodymenia flabellifolia</i> BG-299	0.089	0.067	0.085	0.000																
26	<i>Rhodymenia flabellifolia</i> BG-302	0.089	0.067	0.085	0.000	0.000															
27	<i>Rhodymenia flabellifolia</i> N256	0.089	0.069	0.086	0.001	0.001	0.001														
28	<i>Rhodymenia flabellifolia</i> BG-238	0.089	0.069	0.086	0.001	0.001	0.001	0.000													
29	<i>Rhodymenia skottsbergii</i> BG-242	0.089	0.089	0.087	0.100	0.100	0.100	0.101	0.101												
30	<i>Rhodymenia skottsbergii</i> AY294354	0.089	0.092	0.090	0.103	0.103	0.103	0.104	0.104	0.007											
31	<i>Rhodymenia californica</i> KU687844	0.092	0.073	0.075	0.098	0.098	0.098	0.099	0.099	0.087	0.088										
32	<i>Rhodymenia intricata</i> AB383120	0.088	0.075	0.078	0.096	0.096	0.096	0.097	0.097	0.090	0.092	0.041									
33	<i>Rhodymenia pacifica</i> KU687850	0.100	0.086	0.085	0.112	0.112	0.112	0.114	0.114	0.089	0.091	0.049	0.047								
34	<i>Rhodymenia rhizoides</i> KU687865	0.093	0.076	0.080	0.108	0.108	0.108	0.109	0.109	0.094	0.095	0.050	0.056	0.062							
35	<i>Rhodymenia bamfieldensis</i> KU687884	0.087	0.071	0.075	0.102	0.102	0.102	0.103	0.103	0.088	0.090	0.047	0.056	0.055	0.017						
36	<i>Rhodymenia delicatula</i> KU726696	0.084	0.080	0.084	0.093	0.093	0.093	0.094	0.094	0.084	0.087	0.077	0.082	0.086	0.071	0.071					
37	<i>Rhodymenia stenoglossa</i> KU726706	0.077	0.067	0.072	0.091	0.091	0.091	0.093	0.093	0.095	0.096	0.084	0.077	0.084	0.085	0.082	0.079				
38	<i>Botryocladia botryoides</i> AY444169	0.125	0.116	0.120	0.117	0.117	0.117	0.118	0.118	0.118	0.121	0.107	0.100	0.108	0.097	0.101	0.106	0.114			
39	<i>Botryocladia pseudodichotoma</i> KU687853	0.131	0.111	0.114	0.117	0.117	0.117	0.118	0.118	0.129	0.129	0.127	0.116	0.130	0.115	0.114	0.108	0.118	0.080		
40	<i>Botryocladia leptopoda</i> HQ400597	0.131	0.128	0.123	0.130	0.130	0.130	0.131	0.131	0.116	0.116	0.115	0.121	0.127	0.124	0.122	0.124	0.130	0.114	0.109	